

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Др Иван Д. Миловановић, *mr sc. med.*

ЛИПИДНИ МЕТАБОЛИЗАМ ДОМАЋИНА У
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОЈ ТОКСОПЛАЗМОЗИ

Докторска дисертација

Београд, 2012. год.

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF MEDICINE

Ivan D. Milovanovich, M.D., M.Sc.

HOST LIPID METABOLISM IN
EXPERIMENTAL TOXOPLASMOSIS

Ph.D. Thesis

Belgrade, Serbia, 2012.

Ментор: Доц. др Александар М. Трбовић, Институт за патолошку физиологију, Медицински факултет, Универзитет у Београду

Коментор: Dr sc. med. Олгица Ђурковић-Ђаковић, научни саветник, Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду

Комисија за оцену завршене тезе:

1. Проф. др Ђорђе Јевтовић, Институт за инфективне и тропске болести, Медицински факултет, Универзитет у Београду
2. Проф. др Сања Митровић, Институт за микробиологију и имунологију, Медицински факултет, Универзитет у Београду
3. Проф. др Мирјана Шумарац-Думановић, Институт за ендокринологију, дијабетес и болести метаболизма, Медицински факултет, Универзитет у Београду
4. Доц. др Силвио Де Лука, Институт за патолошку физиологију, Медицински факултет, Универзитет у Београду
5. Проф. др Гордана Ђорђевић-Денић, редовни професор Медицинског факултета, Универзитета у Београду у пензији

Ова дисертација је урађена на Универзитету у Београду и то Институту за медицинска истраживања (ИМИ) и Институту за патолошку физиологију Медицинског факултета у оквиру пројекта Министарства за науку и технологију, М 145002 под називом *Инфекције интрацелуларним микроорганизмима растућег значаја: трансмисија, однос патоген – домаћин, молекуларна епидемиологија и клинички значај*, којим је руководила научни саветник Dr sc. med. Олгица Ђурковић-Ђаковић.

Захваљујем се:

Др Алекси Трбовићу, мом ментору, који ме је увео у свет експерименталног рада и научног мишљења, несебично ми даривајући подршку, знање и животно искуство чиме је стекао моју вечну захвалност и пријатељство,

Др Олгици Ђурковић-Ђаковић, коментору, на храбрости да споји наизглед неспојиво (липидологију и паразитологију), интуицији да ме подржи у мом истраживању, и вољи да све то финансијски омогући,

Особљу Лабораторије за токсоплазмозу, Института за медицинска истраживања, где је изведен највећи део експеримената из ове дисертације, који су ме у почетку прихватили као колегу и свог члана, а касније и као пријатеља.

Др Владимиру Ивовићу, вишем научном сараднику из наведене лабораторије, чија је непроцењива помоћ у анализи генске експресије далеко премашила колегијалне и прешла у пријатељске оквире.

Мојим родитељима, брату и нани који су ме од детињства усмеравали ка научном мишљењу.

Мојој супрузи Марини, на љубави, разумевању и безусловној подршци током свих ових година.

САЖЕТАК

Инфекција паразитом *T. gondii* се зове токсоплазмоза и представља једну од најраспрострањенијих антропозооза. Истраживања патогенезе токсоплазмозе, у *in vitro* условима, су показала да *T. gondii* не може да синтетише холестерол, већ га мора преузети од ћелије домаћина. Како су међутим подаци о утицају ове инфекције на липидни метаболизам домаћина у *in vivo* условима веома оскудни, предмет ове тезе је било истраживање утицаја експерименталне инфекције *T. gondii* на серумски и ткивни липидни метаболизам домаћина.

У експериментима смо користили женке мишева соја *Swiss-Webster*, старе шест недеља које смо инфицирали са 8 цисти *BGD* соја *T. gondii* путем орофарингеалне гаваже. У првом експерименталном моделу смо анализирали динамику кретања серумских липида мерећи укупни серумски холестерол, *HDL*, *LDL* и триглицериде код инфицираних и контролних мишева након 7, 14, 21, 28 и 42 дана од експерименталне инфекције. Након 42 дана, мишеви су жртвовани а у мозговима су анализирани цисте паразита. У другом експерименталном моделу смо жртвовали групе од 6-12 мишева 14 и 42 дана након инфекције и анализирали елементе ткивног липидног метаболизма (рецепторе за *HDL* и *LDL*, аполипопротеине А-I и Б-100, транспортни протеин *ABCA1*, и ензим *HMG-CoA* редуктазу) у ткиву јетре и мозга инфицираних и контролних животиња.

Резултати нашег истраживања су показали значајан пад серумских вредности укупног холестерола и *HDL*-а, код инфицираних животиња од 14. па до 42. дана и позитивну корелацију овог пада са бројем цисти у мозгу индивидуално праћених мишева, након 42 дана од инфекције ($p < 0,05$). Поред серумског, долази и до поремећаја ткивног липидног метаболизма у смислу снижења генске експресије рецептора за *HDL* у јетри 14. дана и пораста активности *LDL* рецептора у мозгу 42. дана код инфицираних животиња ($p < 0,05$). Додатно, 42. дана у мозгу инфицираних животиња долази и до пораста активности транспортног протеина *ABCA1*, као и ензима *HMG-CoA* редуктазе ($p < 0,05$).

На основу изложених резултата можемо закључити да *T. gondii* користећи холестерол домаћина доводи до смањења реверзног холестеролског транспорта од мозга ка јетри. Поред тога, паразит доводи до повећане синтезе и транспорта холестерола у мозгу инфицираних животиња као и до повећања директног холестеролског транспорта ка мозгу, па можемо рећи да су у патогенезу инфекције *T. gondii* укључене и промене на нивоу метаболизма липида домаћина.
Кључне речи: липиди, метаболизам, токсоплазмоза, домаћин.

SUMMARY

T. gondii infection is called toxoplasmosis and it is one of the most prevalent anthroozoonosis. Investigations of toxoplasmosis pathogenesis in the *in vitro* conditions have showed that *T. gondii* cannot synthesize cholesterol and therefore takes it from host cells. Since there is very limited information on lipid metabolism during *T. gondii* infection in the *in vivo* conditions, the aim of this work was to analyze the influence of experimental *T. gondii* infection on host serum and tissue lipid metabolism in the *in vivo* conditions.

Six-week old female Swiss-Webster mice on regular diet were inoculated with 8 cysts of the *Toxoplasma* BGD-1 strain or left uninfected to serve as controls. In the first experimental model, infected and control mice were bled at day 0 and 42 post-infection (p.i.), and subgroups of 6-12 mice were bled weekly at alternative weeks for the measurement of total, HDL, and LDL cholesterol, and triglyceride levels. At d42 p.i., all brains were harvested for cyst enumeration. In model 2, groups of infected and control mice were sacrificed at, d14 and d42, for measurement of gene expression of HDL and LDL receptors, apolipoproteins A-I and B-100, transport protein ABCA1 and enzyme HMG-CoA reductase in brain and liver of infected mice

We showed that there was a significant decrease in HDL, and in total Chl, in infected vs. control mice at d14 which persisted up to d42. This drop was in positive correlation with number of cysts in brain. In addition there was a tissue lipid metabolism alteration in infected mice. There was a gene expression decrease in liver HDL receptor at d14 and increase in brain LDL receptor expression at d 42. Additionally, there was an increase in gene expression of ABCA1 and HMG-CoA reductase in brain of infected animals at d42 post infection.

On the basis of our *in vivo* results, we concluded that *T. gondii* uses host cholesterol for its growth and consequently induces a decrease in host reverse cholesterol transport from brain to liver. In addition, this parasite increases brain cholesterol synthesis and transport. Moreover, *T. gondii* increases direct cholesterol transport toward the brain of infected animals. We have concluded that *T. gondii* alters host lipid metabolism on both serum and tissue level in infected animals.

Key words: lipids, metabolism, toxoplasmosis, host.

САДРЖАЈ

САЖЕТАК.....	i
SUMMARY	ii
1 УВОД	1
1.1 Липиди.....	1
1.1.1 Опште особине и подела	1
1.1.2 Варење, апсорпција и транспорт липида	3
1.1.3 Липопротеини.....	6
1.1.3.1 Хиломикрони.	7
1.1.3.2 Липопротеини веома мале густине (VLDL)	8
1.1.3.3 Липопротеини средње густине (IDL)	9
1.1.3.4. Липопротеини мале густине (LDL).....	9
1.1.3.5 Липопротеини велике густине (HDL).....	11
1.1.3.6 Остали липопротеини	13
1.1.4 Метаболизам липида	13
1.1.5 Регулација метаболизма липида.....	15
1.1.5.1 Карактеристике метаболизма липида у инфекцији	18
1.2 Интрацелуларни паразит, <i>Toxoplasma gondii</i>	19
1.2.1 Структура и животни циклус	19
1.2.2 Ћелијски аспекти инфекције паразитом <i>T. gondii</i>	23
1.2.3 Метаболички профил <i>T. gondii</i>	24
1.2.4 Липидни метаболизам домаћина и инфекција Апикомплексним паразитима.	26
2 ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА.....	28
3 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	29
3.1 Огледне животиње	29
3.2 Паразити	29
3.3 Дизајн експеримента.....	30
3.4 Анализа биохемијских параметра у серуму	31
3.4.1 Одређивање серумског липидног статуса	31
3.4.2 Одређивање серумског аполипопротеина А-I (<i>Apo A-I</i>)	32
3.4.3 Одређивање серумског аполипопротеина Б-100 (<i>Apo B-100</i>).....	33

3.4.4	Одређивање серумског Ц-реактивног протеина	33
3.4.5	Одређивање серумског адипонектина	33
3.5	Анализа генске експресије елемената липидног метаболизма у ткиву	34
3.5.1	Изолација РНК из ткива	34
3.5.2	Квантитативно одређивање РНК	35
3.5.3	Метода обрнутог преписивања РНК (реверзна транскрипција)	36
3.5.4	Ланчана реакција умножавања полимеразом праћена у стварном времену (<i>Real time PCR</i>).....	37
3.6	Паразитолошка анализа ткива мозга	38
3.6.1	Квантитативно одређивање броја циста у нативном препарату	38
3.6.2	Хистопатолошка анализа циста у обојеним препаратима	39
3.6.2.1	Припрема трајног хистолошког препарата	39
3.6.2.2	Бојење трајног хистолошког препарата	40
3.6.2.3	Одређивање величине циста.....	41
3.7	Статистичка обрада добијених резултата	42
4	РЕЗУЛТАТИ	43
4.1	Серумски липидни статус током огледа	43
4.1.1	Вредност укупног серумског холестерола код контролних и инфицираних животиња	44
4.1.2	Вредност серумског <i>HDL</i> -а код контролних и инфицираних животиња	45
4.1.3	Вредност серумског <i>LDL</i> -а код контролних и инфицираних животиња	46
4.1.4	Вредност серумских трилицерида код контролних и инфицираних животиња	47
4.2	Серумски аполипопротени	48
4.2.1	Серумски аполипопротеин А-I код контролних и инфицираних животиња	49

4.2.2 Серумски аполипопротеин Б-100 код контролних и инфицираних животиња	50
4.3 Серумски Ц-реактивни протеин (CRP) код контролних и инфицираних животиња.....	51
4.4 Серумски адипонектин код контролних и инфицираних животиња	52
4.5 Однос серумског липидног статуса и броја циста у мозгу инфицираних животиња	53
4.5.1 Укупни серумски холестерол и број циста у мозгу.....	54
4.5.2 Серумски HDL и број циста у мозгу.....	55
4.5.3 Серумски LDL и број циста у мозгу.....	56
4.5.4 Серумски триглицериди и број цисти у мозгу	57
4.6 Однос између промене серумских липида и броја циста у мозгу инфицираних животиња	58
4.6.1 Промена укупног серумског холестерола и броја циста у мозгу	59
4.6.2 Промена серумског HDL-а и броја циста у мозгу.....	60
4.7 Однос између серумских липида и пречника циста у мозгу инфицираних животиња	61
4.7.1 Укупни серумски холестерол и пречник циста у мозгу	62
4.7.2 Серумски HDL и пречник циста у мозгу	63
4.7.3 Серумски LDL и пречник циста у мозгу	64
4.7.4 Серумски триглицериди и пречник циста у мозгу.....	65
4.8 Ткивна експресија гена липидног метаболизма током огледа	66
4.8.1 Ткивна експресија гена липидног метаболизма у јетри	67
4.8.1.1 Експресија гена за ензим HMG-CoA редуктазу у јетри	68
4.8.1.2 Експресија гена за ATP-везујући касет А1 протеин (ABCA1) у јетри	69
4.8.1.3 Експресија гена за Apo A-I у јетри	70
4.8.1.4 Експресија гена за Apo B-100 у јетри	71
4.8.1.5 Експресија гена за HDL рецептор (SR-BI) у јетри	72

4.8.1.6	Експресија гена за <i>LDL</i> рецептор (<i>LDLR</i>) у јетри.....	73
4.8.2	Ткивна експресија гена липидног метаболизма у мозгу	74
4.8.2.1	Експресија гена за ензим <i>HMG-CoA</i> редуктазу у мозгу	75
4.8.2.2	Експресија гена за транспортер <i>ABCA1</i> у мозгу	76
4.8.2.3	Експресија гена за <i>SR-BI</i> у мозгу.....	77
4.8.2.4	Експресија гена за <i>LDLR</i> у мозгу	78
5	ДИСКУСИЈА	79
6	ЗАКЉУЧАК.....	86
7	ЛИТЕРАТУРА	87
8	БИОГРАФИЈА АУТОРА.....	96

1 УВОД

1.1 Липиди

1.1.1 Опште особине и подела

Људски организам за одржавање физиолошких функција користи три врсте хранљивих материја: угљене хидрате, беланчевине и масти (липиде). Док се угљени хидрати првенствено користе као извор енергије а беланчевине за изградњу биолошких структура, липиди су особени по томе што имају и енергетске и градивне особине. По хемијској дефиницији, липиди су једињења која су углавном нерастворљива у води а разлагањем (хидролизом) дају масне киселине и сложене алкоhole. Са метаболичке тачке гледишта, они се деле на масне киселине, триглицериде, фосфолипиде и холестерол и његове естре.

Масне киселине се највећим делом налазе у саставу сложених липида (холестерол естара, триглицерида и фосфолипида), а само 5% присутно је у крви у слободном или невезаном облику (слободне масне киселине). Саграђене су у виду ланаца у којима су атоми угљеника спојени везама, које могу бити једноструке или двоструке. У зависности од врсте ковалентних веза којима су повезани атоми угљеника, деле се на незасићене са једном или већим бројем двоструких веза и засићене, код којих су везе једноструке. Незасићене учествују у оксидоредуктивним реакцијама док засићене предствљају градивне делове сложенијих масти. Међусобно се разликују и према дужини ланца, а незасићене масне киселине се могу појавити и у облику *цис* и *транс* конфигурације. У природи постоји велики број масних киселина, од којих неке од њих људски организам није у стању да синтетише па се стога морају уносити храном – есенцијалне масне киселине. Поред чињенице да су веома значајне као извор енергије, масне киселине, као

градивна компонента одређују и особине неких сложенијих липида тј. триглицерида, естара холестерола и фосфолипида. (Leršanović Lj, 1997).

Триглицериди или триацилглицероли, саграђени су од алкохола глицерола за који су везане по три масне киселине. Представљају енергетско складиште организма из кога се хидролизом ослобађају масне киселине, а из њих процесом оксидације енергија потребна за живот и рад свих ћелија. Далеко највећи део триглицерида (око 95%) се налази ускладиштен у специјализованом ткиву (масном ткиву), док су у крвотоку присутне само незнатне количине. Масно ткиво представља не само прост депо триглицерида већ метаболички активан орган који учествује у регулацији енергетске хомеостазе организама акумулацијом или одпуштањем триглицерида, који се крвљу преносе до других органа.

Фосфолипиди имају сложенију структуру од триглицерида јер садрже поред глицерола, масних киселина и фосфатну групу и азотну базу. Један од три остатка масних киселина је замењен азотном базом која је за глицерол везана преко фосфатног остатка. Две најзначајније групе фосфолипида су глицерофосфолипиди и сфингофосфолипиди. Фосфолипиди су углавном синтетишу у слузници танког црева и јетри. Циркулишу плазмом као макромолекулски комплекси везани за протеине и битне су градивне компоненте свих ћелија, нарочито ћелија нервног система. Поред тога врло су значајни као унутарћелијске сигналне молекуле. Не улазе у састав депоа масти у организму.

Холестерол садржи циклопентаноперхидрофенантренски прстен, непоходни је саставни део организма и улази у састав свих ћелија као структурна материја у ћелијским и интраћелијским мембранама. Поред тога, изворна је супстанца за синтезу стероидних хормона коре надбубрега и

гонада, витамина Д и за синтезу жучних киселина у јетри. Његово порекло је двоструко: већина ћелија располаже способношћу да га сама ствара мевалонатским путем, а други део се уноси храном. Установљено је да око 2/3 холестерола настаје синтезом у организму (800-900 mg дневно), а свега 1/3 се уноси храном, због чега његов физиолошки алиментарни унос износи свега 150-300 mg на дан.

Основна функција липида у организму је да служе као извори енергије и као структурни делови ћелија. Да би се користили у ове сврхе, липиди се плазмом транспортују од једног до другог ткива. У плазми се липиди налазе везани са молекулима протеина као липопротеини, помоћу којих се као нерастворљиве супстанце у води преносе плазмом до одговарајућих ткива. С обзиром на то да промене у концентрацији липида плазме током обољења, одражавају промене у концентрацијама различитих типова липопротеина, липиде и липопротеине треба увек посматрати заједно (Lepšanović L и Lepšanović Lj, 2000).

1.1.2 Варење, апсорпција и транспорт липида

Највећи део масти које се уносе харном и то око 98%, чине триглицериди. Преосталих 2% чине холестерол, фосфолипиди, диглицериди, моноглицериди, стероиди, и друге масти (Lepšanović L и Lepšanović Lj, 2000). У току варења, које се највећим делом одиграва у танком цреву, унети триглицериди се прво преводе у емулзију а затим подлежу ензимској липолизи. Апсорпција масти се одвија кроз три фазе:

1. Интралуминална фаза подразумева физичку и хемијску промену масти у лумену црева. Липиди се прво под дејством жучних соли и лецитина

преводе у емулзију (мицеле) чиме се смањује површински напон масних честица и тиме се олакшава њихово даље разлагање посредством ензима (панкреасна и цревна липаза, холестерол естераза, фосфолипаза). Ензимским разлагањем се од триглицерида добијају масне киселине и моноглицериди а од холестерол естара и глицерофосфолипида се добијају слободни холестерол, глицерол и масне киселине. Ови производи разлагања остају унутар мицела којима се преносе до слузнице танког црева.

2. Апсорптивна или целуларна фаза укључује прелазак већ модификованих масти до ћелија слузнице танког црева. Апсорпција масних киселина, моноглицерида и холестерола се одвија процесом дифузије од мицела кроз плазма мембрану ентероцита до глатког ендоплазматског ретикулума. У ендоплазматском ретикулуму ћелија слузнице, холестерол, моноглицериди и масне киселине се заједно са холестеролом из жучи реестерификују у триглицериде, естерификовани холестерол и фосфолипиде.
3. Транспортна фаза се односи на пренос апсорбованих липида из ћелија слузнице црева до других ткива и органа путем лимфе. У ћелијама слузнице црева се од протеина, естерификованог холестерола и фосфолипида стварају капљице које се називају хиломикрони. Ове честице процесом реверзне пиноцитозе напуштају ентероците и одлазе прво у абдоминалне лимфне судове, а затим у системску циркулацију. Између 80 и 90% свих апсорбованих масти из дигестивног тракта се на овај начин преноси до свих ткива у телу, укључујући и масно ткиво као главно складиште масти. Мала количина масних киселина кратких ланаца се апсорбује директно у портну циркулацију, не претварајући се у триглицериде који се апсорбују путем лимфе.

Транспорт масти путем крви од дигестивног тракта до периферних ткива, се највећим делом одвија хиломикронским честицама чија је концентрација у физиолошким условима највећа 2 до 4 сата после масног оброка. Већина хиломикрона се потпуно уклањају из циркулације за 6 до 10 сати после оброка проласком кроз капиларе масног ткива и јетре, где их разлаже ензим липопротеинска липаза. Овај ензим делује у капиларном ендотелу и хидролизује хиломикронске триглицериде на масне киселине и алкохол глицерол. Масне киселине које лако пролазе ћелијску мембрану дифундују одмах у масне ћелије или хепатоците. Када се једном нађу у овим ћелијама, масне киселине поново прелазе у триглицериде, користећи глицерол настао у метаболичким путевима ћелије. Са друге стране ензим липопротеинска липаза узрокује разлагање и фосфолипида којим се добијају масне киселине које се депонују у ћелији на исти начин. Холестерол се не разлаже под дејством ензима у капиларима већ дифундује директно у ћелије јетре, где се користи првенствено за синтезу жучних соли а у стероидогеним ткивима и за синтезу различитих хормона.

Поремећај апсорпције масти се јавља у различитим патофизиолошким стањима која обично доводе до повећаног садржаја масти у столицама (стеатореја). Узроци смањене апсорпције масти могу бити недовољно уношење, лоша емулзификација код гастректомије, одсуство жучи код опструктивне жутице, поремећена секреција панкреасних ензима код обољења панкреаса, смањење апсорпционе површине црева код ресекције танког црева, улцерозног колитиса, Кронове болести и др. У свим овим поремећајима може доћи до значајног недостатка масти и витамина растворљивих у мастима у организму, који за последицу имају различите метаболичке поремећаје.

1.1.3 Липопротеини

Липопротеини представљају макромолекулске спојеве липида и специфичних протеина којима се липиди преносе плазмом до одговарајућих ткива. Они се састоје од хидрофобног језгра, које је чине већим делом липиди и спољашњег, хидрофилног дела кога чине протеини.

Протеини који улазе у састав липопротеина се називају аполипипротеини и њих има више врста:

- аполипипротеин А (*apo A I* и *apo A II*),
- аполипипротеин Б (*apolipoprotein B*),
- аполипипротеин Ц (*apolipoprotein C I, C II, C III*),
- аполипипротеин Д (*apolipoprotein D*),
- аполипипротеин Е (*apolipoprotein E I, E II, E III*),
- аполипипротеин Ф (*apolipoprotein F*),
- аполипипротеин Г (*apolipoprotein G*).

Са друге стране липиди који улазе у састав липопротеина су:

- фосфолипиди,
- триглицериди,
- естерификован холестерол,
- неестерификован-слободан холестерол,
- неестерификоване масне киселине.

По својој грађи, аполипипротеини су полипептидни ланци, мада међу њима има и гликопротеина. Њихова улога у организму је вишеструка. Поред обезбеђивања преноса у води нерастворљивих липида, они су и покретачи неких ензима пр. лецитин холестерол ацил трансферазе (*LCAT*), а везивањем

за специфичне рецепторе на ћелијским мембранама обезбеђују улаз липида у ћелије и њихов даљи метаболизам. Важно је нагласити да је врста и концентрација појединих аполипопротеина у одређеној липопротеинској честици као и код свих протеина генетски регулисана, за разлику од садржаја серумских липида, који нису под генском контролом већ под утицајем начина исхране и стања метаболизма (Schonfeld, 1990).

Липопротеини се синтетишу у јетри и у танком цреву, а у њиховом транспорту учествује неколико ензима: *LCAT*, липопротеинска липаза, хепатична липаза и хормон-осетљива липаза. Липопротеински транспорт има две најважније улоге: пренос триглицерида из црева и јетре до ткива у којима се користе или складиште и пренос холестерола до периферних ткива где се користи за синтезу ћелијских мембрана или стероидних хормона као и пренос холестерола до јетре где се користе за синтезу жучних соли.

На основу брзине седиментације приликом ултрацентрифугирања, липопротеини крвне плазме се могу поделити на: хиломикроне, липопротеине врло мале густине (*VLDL*), липопротеине мале густине (*LDL*), липопротеине велике густине (*HDL*) и липопротеине врло велике густине (*VHDL*). Поред горе наведених, у плазми су нормално присутни још и липопротеин (а), и краткотрајно и у минималним количинама липопротеин средње густине (*IDL*) (Lepšanović L и Lepšanović Lj, 2000).

1.1.3.1 Хиломикрони

Хиломикрони представљају најлакше липопротеине (са густином мањом од плазме), који се синтетишу у цревима, већином од егзогених липида и уз помоћ *Apo B*. Састоје се углавном од триглицерида (близу 90%) и различитих аполипопротеина (*B-48*, *A1*, *AII*, *AIV*, *CI*, *CII*, *CIII* и *E*). Они представљају основу тзв. егзогеног липидног пута. Из црева путем лимфних

судова и *ductus thoracicus*-а улазе у крвоток. У системској циркулацији, односно у капиларним зидовима масног и мишићног ткива на њих делују липопротеинска липаза (везана за хепарин-сулфат на луминалној страни ендотелних ћелија), која их, после контакта са *Apo CII* (активатор ензима), хидролизује до моноглицерола и слободних масних киселина. Масне киселине простим дифузијом улазе у ћелије где се користе као извор енергије (мишићне ћелије), за ресинтезу триглицерида (масне ћелије), или се даље преносе плазмом везане за протеине и долазе до јетре где се синтетише *VLDL*. Холестеролски део хиломикрона остаје углавном сачуван. Приликом филтрирања хиломикрона из лимфе у плазму и у системској циркулацији, долази до преласка аполипопротеина *C*, *AI* и *AII* на *HDL* честице уз преостајање тзв. хиломикронског остатка (*apolipoprotein B-48*, *apolipoprotein E* уз холестерол), који се брзо разграђују у лизозомима јетриних ћелија (Thompson, 1990).

1.1.3.2 Липопротеини веома мале густине (*VLDL*)

Ове честице се као и хиломикрони састоје претежно од триглицерида (55-58%), холестерола (10%) и неколико типова аполипопротеина (*Apo B-100*, *C I*, *C II*, *C III*, *E II*). Липопротеини веома мале густине су много мањих димензија од хиломикрона, али су још увек знатно већи од *LDL* и *HDL* честица. Синтеза које се обавља углавном у јетри је подстакнута вишком енергије, а време полуживота *VLDL* у серуму је до 3 сата. Основна функција *VLDL* честица је транспорт триглицерида синтетисаних у јетри, до свих периферних ткива и ћелија. Важан аполипопротеин за *VLDL* је *Apo C II* који помаже липопротеинској липази у уклањању триглицерида из *VLDL* након чега се триглицериди преносе на *HDL*, а затим поново на *VLDL* и хиломикроне (кружни циклус). Уз *LDL* и *HDL*, *VLDL* честице представљају основ тзв. ендогеног липидног пута, где је јетра главни извор ендогених

синтетисаних липида. Са друге стране важан извор хепатичних и *VLDL* триглицерида су слободне масне киселине које потичу из масног ткива. У стањима стреса или одређених патолошких поремећаја као што је неконтролисана шећерна болест, слободне масне киселине представљају најважнији извор *VLDL*. У условима гладовања ове масне киселине из масног ткива се оксидацијом у јетри преводе у кетонска тела и обезбеђују енергију за глуконеогенезу, уз малу синтезу *VLDL*-а. Као резултат издвајања триглицерида из *VLDL*-а, у периферним ткивима, настаје нова врста честица, *IDL* (Lepšanović L и Lepšanović Lj, 2000))

1.1.3.3 Липопротеини средње густине (*IDL*)

Липопротеини средње густине настају у плазми при преласку *VLDL* у *LDL*. Они садрже холестерол, ендogene триглицериде и *apo B-100* и *apo E*. Посебну улогу има *apo B-100* који активира липопротеинску липазу при преласку *IDL*-а у *LDL* честицу. Код човека се око половине *IDL* честица одстрањује из циркулације врло брзо, за 2-6 сати, што се може приписати присуству *apo E*, чији је афинитет везивања за *IDL* или *apoB/E* рецепторе чак већи од афинитета везивања *apo B-100*. У неким поремећајима, као што је породична дисбеталипопротеинија може доћи до нагомилавања *IDL* честица у плазми, услед успореног пребацавања *VLDL* у *LDL* (Mahley и Innerarity, 1983).

1.1.3.4 Липопротеини мале густине (*LDL*)

Ове честице настају у јетри из *IDL*, даљим уклањањем триглицерида и *apo E* пре излучивања у плазму. Мањих су димензија од *VLDL* честица, око 2-2,5 пута, садрже највише холестерола (око 45-48%), знатно мање триглицерида, док протеинска компонента чини око 20-25% од целокупне честице, а то је највећим делом *apoB-100*. Наиме, од целокупног холестерола

присутног у крви чак око 70% налази се у саставу *LDL* честица. Због мањег афинитета везивања *apo B-100* за *LDL* рецепторе, *LDL* честице имају дуг полуживот (око 2,5 дана), пре него што се вежу за специфичне рецепторе на ћелијама јетре и многих других ткива. Везивањем за поменуте рецепторе *LDL* честице оставарују своју основну улогу, унос холестерола у ћелије периферних ткива, што представља основу **директног холестеролског транспорта** (Слика бр. 1).

Механизам везивања за *LDL* рецепторе и начин уласка *LDL* честица у ћелију описује се изразим "рецептором посредована ендоцитоза" (Anderson и сар. 1976). Честица *LDL*-а, везана за рецептор, продире у виду везикуле у унутрашњост ћелије, а затим се ослобађа од рецептора, који се враћа на површину ћелије. Интернализована *LDL* честица се излаже дејству ензима који хидролизују протеински део све до аминокиселина и доводе до разградње холестеролских естара у масне киселине и слободни холестерол. Настали слободни холестерол напушта лизозоме и ставља се на располагање ћелији. Као што је раније поменуто, све ћелије уграђују холестерол у новостворене мембране, а у неким специјализованим ткивима служи за синтезу стероидних хормона. У нормалним околностима се око 80% *LDL* честица уклања из циркулације посредством поменутих специфичних *LDL* рецептора, овај процес регулисан је процесом ауторегулације, којим се ћелија штити од прекомерног нагомилавања холестерола (Stein, 1986). Уколико дође до оксидације *LDL* честице, она се уклања из циркулације путем рецептора "чистача" (*scavenger receptors*), за које не постоји систем ауторегулације. Недостатак регулације доводи до нагомилавања холестерола, пореклом из *LDL*-а, пре свега у зидовима крвних судова што представља патофизиолошку основу развоја атеросклерозе. Поред стечених, постоје и генетски поремећаји

у функционисању *LDL* рецептора што доводи до појаве фамилијарне хиперхолестеролемије (Ђорђевић VB, 2006).

1.1.3.5 Липопротеини велике густине (*HDL*)

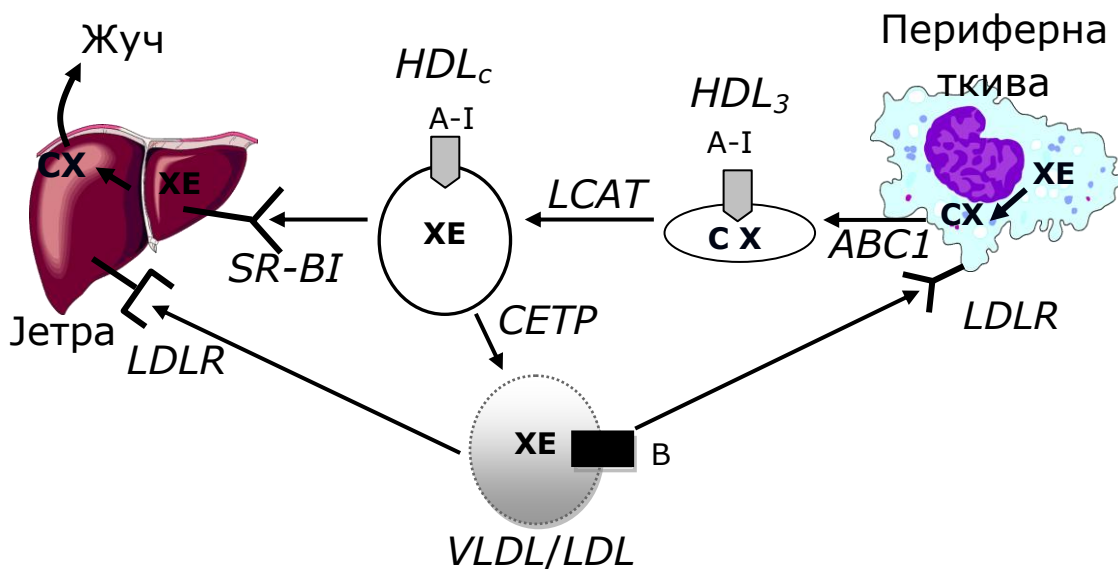
Они представљају најмање честице липопротеина са највећом густином. Састоје се од холестерола (око 20%), фосфолипида (око 30%), протеина (око 50%), углавном *Apo A I* и *Apo A II*, уз мање количине триглицерида. Помоћу ових честица се холестерол преноси у јетру из периферних ткива, што представља основу **реверзног холестеролског транспорта** (Слика бр. 1). Истраживања су показала да су *HDL* честице врло хетерогене и познате су најмање три подгрупе: *HDL_c*, *HDL₂* и *HDL₃* (Stein EA, 1986). Нативне, односно новостворене *HDL* честице тзв. *HDL₃* подгрупа, су дискоидалног облика, а после прихватања холестерола са површине ћелијске мембране периферних ткива преко *ABC* протеина постају лоптасте и већих димензија. У процесу прихватања холестерола од периферних ћелија *HDL₃* честица прелази у *HDL₂* честицу, која је већа и садржи већи проценат липида. У овом процесу важну улогу имају *LCAT*, хепатичка липаза и фосфолипидни трансфер протеин. Када се *HDL₂* честица потпуно засити холестеролом настаје *HDL_c* који прима *Apo E* и посредством рецептора бива преузет од стране јетре или бубрега где се катаболише. Поред овог начина, *HDL* честице се могу синтетисати у јетри и цревима, и њихов полуживот је око 4 дана.

Основне улоге *HDL* честица у организму су да:

- учествују у интраваскуларној разградњи хиломикрона и *VLDL*-а тако што предају *Apo E*, *CII* који активира липопротеинску липазу,
- посредством специфичних *HDL* рецептора (*SRBI-I*) прихватају холестерол из периферних ткива и транспортују га у јетру (хепатоците),

где се он даље метаболише или улази поново у састав других липопротеина,

- штите *LDL* честице од слободних кисеоничних радикала и последичне оксидације - антиоксидативни ефекат,
- *HDL* честице спречавају адхезију моноцита на ендотелне ћелије, стабилизују продукцију простациклина због чега су значајне у превенцији процеса атеросклерозе (Stein, 1986; Parthasarathy, 1990).



Слика бр. 1. Схематски приказ директног и реверзног холестеролског транспорта између јетре и периферних ткива

XE - холестерол естар; CX - слободни холестерол; ABC1 - ATP везујући касетни протеин 1; LCAT - лецитин-холестерол-ацил-трансфераза; CETP - холестерол естар трансфер протеин; A-I - аполипопротеин A-I; B - аполипопротеин B; SR-BI - рецептор чистач класа Б, тип 1; LDLR - рецептор за LDL; HDL₃ - нативни липопротеин велике густине; HDL_c - зрели липопротеин велике густине; VLDL - липопротеин врло мале густине; LDL - липопротеин мале густине.

1.1.3.6 Остали липопротеини

Поред набројаних, постоје и други липопротеини који су заступљени у мањим количинама, тзв. липопротеини веома велике густине (*VHDL*), као и неки специфични липопротеини као што је липопротеин а [*Lp(a)*] и липопротеин Икс (*lipoprotein X*) значајни пре свега у процесу атеросклерозе.

1.1.4 Метаболизам липида

Допремањем масти у форми триглицерида, фосфолипида или холестерола путем липопротеина као и доласком слободних масних киселина до периферних ткива, стварају се услови за њихово метаболичко искоришћавање у циљу адекватног функционисања ћелија, ткива и органа.

Масне киселине, добијене хидролизом триглицерида и транспортоване протеинима плазме (албуминима), највећим делом служе за добијање енергије процесом бета, омега или алфа оксидације масних киселина. Оксидација се одиграва у пероксизомима и митохондријама већине ћелија људског тела и представља процес са великим позитивним енергетским билансом. Добијање енергије оксидацијом масних киселина је нарочито значајно за срчани и скелетне мишиће. Поред њих, разлагањем виших масних киселина своје енергетске потребе подмирују и јетра, бубрези, плућа, тестиси и масно ткиво. Поред катаболичких процеса у метаболизму масних киселина су значајни и анаболички процеси који се одвијају највише у јетри и масном ткиву и то: синтеза засићених масних киселина, пре свега палмитинске, елонгација односно издуживање масних киселина и синтеза триглицерида. Како и поред складиштења гликогена у јетри и мишићима, организам у суштини нема велике резерве угљених хидрата због ограничене могућности њиховог депоновања, то се сав вишак угљених хидрата али и

беланчевина, преводи у триглицериде, чије су могућности складиштења практично неограничене. Овако створене масти се користе као енергетска резерва али и за синтезу неки липопротеина (Ђорђевић VB, 2006).

Фосфолипиди који се допремају до периферних ткива у саставу хиломикрона се највећим делом користе као градивне компоненте ћелија. Глицерофосфолипиди улазе у састав биолошких мембрана, активирају поједине ензиме (бета-хидрокси-бутират дехидрогеназа), активирају тромбоците (плазмалоген) и снижавају површински напон као део сурфактанта у алвеолама плућа. Међу сфингофосфолипидима наважнији представник је сфингомијелин, који је главни структурни липид мембрана нервног ткива. Поред егзогеног уноса, фосфолипиди се могу синтетисати у свим ћелијама човечијег тела, изузев у еритроцитима (Ђорђевић VB, 2006).

Егзогени холестерол се допрема до периферних ткива у саставу липопротеина, пре свега у облику *LDL*-а. Уласком холестерола у ћелију долази до његове естерификације посредством ензима ацил-холестерол-ацил-трансферазе и око 90% укупног унутарћелијског холестерола се налази у естерификованој форми. У том облику се користи за синтезу стероидних хормона, жучних киселина, витамина Д и других биоактивних молекула. Неестерификовани холестерол служи као градивна компонента плазма мембране и унутарћелијских мембрана. Ендогени холестерол се добија синтезом од ацетил-коензима А у цитоплазми, посредством мевалонатског пута где је кључни ензим бета-хидрокси-бета-метил-глутарил коензима А редуктаза (*HMG-CoA* редуктаза). Овај процес се одвија у јетри, стероидогеним ткивима (надбубрег, гонаде), слузници танког црева, плаценти и кожи. Овако синтетисан холестерол као и егзогени, пакује се у липопротеине *VLDL* и *LDL* и из јетре транспортује до периферних ткива. Катаболизам односно разградња холестерола није од великог биолошког значаја због његове

градивне улоге и важности у физиологији хормона. Уколико постоји вишак холестерола у ћелији, он из ње излази и везује се за површину *HDL* честице, где се естерификује посредством ензима *LCAT*-а. Естерификовани холестерол потом улази у унутрашњост *HDL* честице и транспортује се од јетре, где се даље метаболише односно користи за ресинтезу липопротеина или пак екскретује у виду жучних соли. Када се холестерол елиминше из тела не долази до разлагања цикличне структуре већ само до промене на нивоу бочних ланаца приликом стварања жучних соли у јетри.

Метаболизам липида односно степен њиховог стварања и разградње зависи од потреба организма, степена уноса масти, као и од секреције различитих хормона (Ђорђевић ВВ, 2006).

1.1.5 Регулација метаболизма липида

Регулација метаболизма масти се остварује на неколико начина: исхраном, преко појединих ћелијских органела и путем хормона.

Исхраном богатом угљеним хидратима брзо се попуњавају депои гликогена у јетри, па се сав вишак усмерава у правцу синтезе триглицерида. На тај начин се поспешује липогенеза, долази до повећања запремине масног ткива и пораста телесне масе. Ово је један од основних механизма настанка гојазности. Међутим, исхрана богата мастима а сиромашна угљеним хидратима, делује неповољно на процес липогенезе, односно, синтезу нових молекула триацилглицерола. Овај ефекат настаје као последица инхибиторног деловања слободних масних киселина на синтезу нових масних киселина. Инхибиција процеса липогенезе се јавља још и током гладовања као и у хипоинсулинемији (Ђорђевић ВВ, 2006).

Од ћелијских органела, највећи утицај на процес липогенезе имају микрозоми. Сматра се да они стимулишу липогенезу катализовањем естерификације ацетил-*CoA* и глицерофосфата. На овај начин се уклања инхибиторно дејство ацетил-*CoA* на синтезу виших масних киселина и повећава количина новосинтетисаних триглицерида (Ђорђевић VB, 2006).

Метаболизам холестерола је регулисан контролом његове биосинтезе и његове потрошње. Контролу највећим делом обавља јетра и то испољавањем *LDL* рецептора на површини хепатоцита, претварањем холестерола у жучне киселине и синтезом холестерола преко ензима хидрокси-метил-глутарил-конезим А редуктазе (*HMG-CoA* редуктазе). Недостатак холестерола у храни доводи до повећања активности *HMG-CoA* редуктазе и појачане синтезе ендогеног холестерола док повећање уноса холестерола храном изазива супротан ефекат на нивоу *HMG-CoA* редуктазе. Смањена биосинтеза холестерола је узрокована активношћу *LDL* рецептора на нивоу хепатоцита. Наиме, вишак холестерола преко *LDL*-а активира *LDL* рецепторе на мембрани хепатоцита узрокујући њихову ендоцитозу заједно са лигандом (*LDL*-ом). На тај начин се ствара везикула унутар цитосола названа ендозом, која се спаја са лизозомима пуним хидролитичких ензима. Ови ензими одвајају *LDL* од свог рецептора који се враћа на површину ћелије. Сама *LDL* честица се разлаже тако што се одваја протеински од липидног дела. Протеини се даље разлажу под дејством протеаза, док се липидни део односно холестерол естри разлажу до слободног холестерола и масних киселина путем холестерол естераза. Након стварања, слободни холестерол излази у цитосол, долази до једра и на нивоу ДНК спречава даљу синтезу ензима *HMG-CoA* редуктазе и или пак инхибира ензимску активност већ створеног ензима. Поред тога, повећана интрацелуларна концентрација слободног холестерола доводи до смањеног испољавања *LDL* рецептора на

површини ћелије чиме се смањује преузимање новог холестерола. Овај механизам негативне повратене спреге је поремећен у фамилијарној хиперхолестролемији. Код ових болесника постоје три врсте поремећаја: одсуство *LDL* рецептори на површини ћелија, оштећеност *LDL* рецептори, и поремећај у интернализацији споја рецептор-*LDL*. Сви они за последицу имају високе вредности серумског *LDL*-а што за последицу има јављање превремене атеросклерозе (Ђорђевић VB., 2006).

Многи хормони директно или индиректно утичу на синтезу или разградњу масти као и на промену концентрације липопротеина у серуму. Најповољнији утицај на липогенезу има инсулин. Он поспешује транспорт глукозе у ћелије и стимулише ензиме гликолизе, па нема потреба за разградњом масти у циљу добијања енергије. Поред тога инсулин инхибира процес липолизе у масном ткиву доводећи до пада интраћелијског нивоа цикличног аденозин монофосфата (*cAMP*). Када инсулин недостаје (шећерна болест тип I) или када постији смањена осетљивост инсулинских рецептора (шећерна болест тип II) јавља се појачана липолиза и повећање концентрације масти у плазми што доводи до њиховог повећаног нагомилавања у зиду артерија и убрзања процеса атеросклерозе код таквих особа. Хормони који стимулишу липолизу су далеко бројнији и то су пре свега: катехоламини, глукагон, тиреоидни, стероидни хормони, вазопресин и др. Њихово дејство се одвија повећањем концентрације нивоа *cAMP*-а који стимулише хормон сензитивну липазу, кључни ензим липолизе у масном ткиву (Ђорђевић VB., 2006). Поред тога, хормони масног ткива укључујући лептин, адипонектин и протеин који стимулише ацилацију, у великој мери поред утицаја на метаболизам угљених хидрата утичу и на метаболизам масти. Познато је да лептин повећава инсулинску осетљивост, стимулише бета оксидацију масних киселина и повећава разлагање триглицерида.

Адипонектин који има слично дејство на инсулинску осетљивост и метаболизам триглицерида као лептин, позитивно корелира са серумским нивоом *HDL*-а (Rajala и Scherer, 2010).

1.1.5.1 Карактеристике метаболизма липида у инфекцији

Поред хормонског утицаја, на метаболизам масти могу утицати различита патолошка стања међу којима је једно од најраспрострањенијих, инфекција. У фази акутног одговора на инфекцију, као облик неспецифичне одбране организма јављају се између осталих и промене у серумским вредностима липида. У првих неколико сати од инфекције долази до пораста серумског нивоа триглицерида, повећане синтезе холестерола у јетри преко повећане активности *HMG-CoA* редуктазе и повећане липолизе у масним ткиву из разлога повећаних енергетских потреба организма (Hardardottir и сар., 1995). Поред тога смањена је бета оксидација масних киселина, разградња холестерола у јетри и уклањање *LDL* липопротеина из плазме. Сврха ове неспецифичне реакције организма на инфекцију је обезбеђивање енергије за борбу против узрочника инфекције и прилагођавање метаболичког статуса организма новонасталој ситуацији (Khovidkuht и сар., 2004).

Поред општих, промена метаболизма липида током инфекције има и неке специфичне одлике које се јављају у различитим тренуцима током бактеријских и вирусних инфекцијама. У акутној фази лептоспирозе код пацијената долази до повишења серумских триглицерида а снижења нивоа укупног холестерола, *HDL*-а и *LDL*-а (Liberopoulos и сар., 2004). Поред тога, истраживања су показала да и у хроничној инфекцији *Helicobacter-om pylori* такође долази до пораста серумских триглицерида (Laurila и сар., 1999).

Поређењем серумских липида код пацијената са менингитисом различитог узрока, показан је значајнији пад укупног серумског холестерола и *HDL*-а код пацијаната са вирусним у односу на пацијенте са бактеријским менингитисом (Kertula и Weger, 1986). Из ових резултата се може закључити, да поред неких заједничких особина, промене серумских липида одликују специфичности везане како за дужину трајања, тако и за врсту узрочника инфекције.

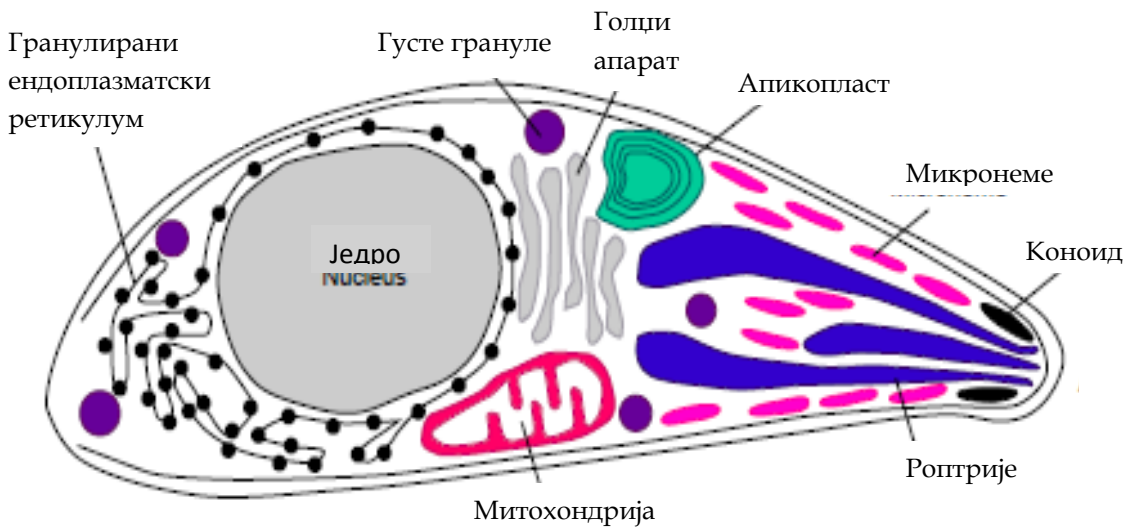
Из свих горе наведених разлога се ниво липида у плазми и периферним ткивима може посматрати као резултанта бројних процеса: брзине уноса липида храном, синтезе липида у јетри и масном ткиву, мобилизација из депоа масти, брзине оксидација у различитим ткивима, секреције појединих хормона као и различитих инфективних стања у којима се организам може наћи.

1.2 Интрацелуларни паразит, *Toxoplasma gondii*

1.2.1 Структура и животни циклус

Toxoplasma gondii је убиквитаран, облигатно унутарћелијски паразит, који је препознат и идентификован још почетком двадесетог века (Nicolle и Мансеау, 1909). Припада роду *Toxoplasma* и phylum-у *Apicomplexa*, где се још налазе и *Cryptosporidia*, *Plasmodium*, *Babesia* и друге протозое. Најважнија структурна карактеристика *T. gondii*, као и осталих апиокомплекса, је апикални комплекс (Слика бр. 2), а састоји се од коноида (конусне тубуларне структуре) и секреторних органела (роптрија и микронема). Ћелијска морфологија се поред наведеног састоји и од мреже микротубула која чине унутрашњу мембрану, а која је чврсто повезана са плазма мембраном. У

унутрашњости ћелије се налази апикопласт, органела која је слична хлоропласту код биљака, затим Голџи апарат и ендоплазматски ретикулум који оружују једро. Поред тога, у цитоплазми се налазе и митохондрија која је локализована у непосредној близини апикопласта, као и различите врсте густих гранула.



Слика бр.2. Схематски приказ ћелијске структуре *T. gondii*

(Модификовано из *Ajioka JW et al. Expert Reviews in Molecular Medicine, 2001, p.1-19.*)

T. gondii има особину да зарази и да се умножава у свим ћелијама са једром, и представља једаног од најуспешнијих паразита која инфицира све топлокрвне сисаре и птице. Преваленца инфекције овим паразитом, токоплазма, се креће од 0-100%, и износи 25% у Сједињеним Америчким Државама (Jones и сар., 2007) а у Европи између 20-80% (Tenter и сар., 2000). Процењено је да је овим паразитом инфицирана једна трећина човечанства (Dubey, 1996)

T. gondii се јавља у сојевима различите вируленције, али су популациона истраживања показала да *T. gondii* има клонску структуру и да

се у Северној Америци и Европи јавља у свега три клонска типа: тип I, II и III (Howe and Sibley, 1995).

T. gondii има сложени животни циклус који карактеришу три различита животна стадијума: ооциста, тахизоит и брадизоит. Сексуално размножавање, које као крајњи продукт има ооцисту, одвија се само у цревима животиња из породице *Felidae* (код нас домаћа мачка), које отуда представљају сталне домаћине. Код свих осталих домаћина (прелазни домаћини), укључујући ту и човека, одиграва се бесполно размножавање, које као производ има брзоделећи тахизоит и спороделећи брадизоит (Frenkel, 1973). Уколико дође до ингестије ткивних циста од стране сталног домаћина (мачке), долази до инвазије епитела танког црева, преласка брадизоита из циста прво у тахизоите, који преко неколико прелазних облика стварају микро и макро гамете. Микро и макро гамети парењем дају ооцисте, које бивају фецесом избачене у спољну средину и у спорулисаном облику у земљишту остају инфективне више година. Инфекција прелазног домаћина може настати на два начина: вертикалним путем, односно трансплацентним преношењем са мајке на плод, и хоризонталним путем, односно *per os*. У природним условима, инфекција најчешће настаје пероралним уношењем, било брадизоита из ткивних циста у недовољно термички обрађеном месу, било ооциста излучених фецесом мачке које контаминирају земљиште (Ђурковић-Ђаковић и сар., 1997). Након ингестије паразита (брадизоита или ооциста), у танком цреву прелазног домаћина настаје њихов брз прелазак у тахизоите. Тахизоити који обележавају акутну фазу инфекције, улазе у ћелије домаћина активно пробијајући ћелијску мембрану. Унутар ћелија домаћина се интензивно размножавају, чиме изазивају механичко разарање нападнутих ћелија. Паразити ослобођени из разорених ћелија нападају суседне ћелије или се преко макрофага и лимфоцита разносе путем крви или лимфе у све

ћелије организма, што представља фазу паразитемије. Активацијом елемената неспецифичне имуности, а затим и хуморалних и ћелијских имунских механизма, одстрањује се велики број тахизоита, зауставља се умножавање паразита и даља инвазија, и долази до конверзије ("претварања") тахизоита у спороделеће брадизоите у ткивним цистама (хронична фаза инфекције). Предилекциона места за развој циста су централни нервни систем, укључујући и мрежњачу као његов део, и мишићно ткиво, укључујући и срчани мишић (Dubey и сар., 1998). У овом облику паразити опстају веома дуго, сматра се и до краја живота домаћина, и управо се вијабилне цисте, које делују антигено, сматрају одговорним за доживотни имунитет на реинфекцију једном инфициране особе. Способност паразита да се у неповољним животним условима конвертује у метаболички мање захтеван животни облик обезбеђује му преживљавање. Имуни одговор на инфекцију обухвата разне механизме (активација макрофага, хуморални имуни одговор) али је, као и код инфекција другим интрацелуларним микроорганизмима, ћелијски имуни одговор најзначајнији. Протективни имунитет се остварује индукцијом антиген-специфичних CD4⁺ и CD8⁺ Т ћелија које стварају интерферон-гама као главни ефекторни молекул (Ђурковић-Ђаковић и сар., 1997). Под физиолошким условима стално настају мање руптуре циста, али мањи број тахизоита који се из њих ослобађају, брзо бива уклоњен ефекторним имунским механизмима као што су активисани макрофаги, цитотоксични лимфоцити и интерферон-гама. С друге стране, уколико престане имуни надзор (нпр код AIDS-а), долази до реактивације паразита тј. до поновног преласка, сада из брадизоита у тахизоит, чија неконтролисана деоба на месту руптуре циста доводи до жаришног запаљења (енцефалитис, ретинитис и миокардитис). Отуда је токсоплазмоза и једна од најзначајнијих опортунистичких инфекција код имунолошки компромитованих особа. Оваква динамичка имунска равнотежа између

паразита и домаћина представља суштину паразитизма *T. gondii* (Ђурковић-Ђаковић, 1998).

1.2.2 Ћелијски аспекти инфекције паразитом *T. gondii*

Интрацелуларни паразит, *T. gondii* улази у ћелију домаћина активним процесом стварајући себи могућност да од ње узима хранљиве материје са једне стране, а да не доведе до њене деструкције са друге стране. Процес уласка паразита започиње секрецијом адхезивних протеина од стране микронема, којим се паразит везује за плазма мембрану ћелије домаћина (Cerede и сар., 2005; Нуун и сар., 2003). Након везивања, започиње процес инвагинације када се укључују поред протеина микронема, протеини и липиди роптрија, стварајући покретне везе са плазма мембраном, који на крају формирају јединствену органелу, паразитофорну вакуолу (ПВ), унутар које паразит живи у цитоплазми ћелије домаћина. У састав ПВ улазе како протеини паразита, тако и протеини и липиди који потичу од ћелије домаћина (Sibley, 1995). Селективни одабир протеина домаћина у структури ПВ је од изузетне важности за опстанак паразита, јер се тиме он брани од фузије са лизозомима ћелије домаћина и могуће деструкције од стране лизозомалних ензима (Mordue и сар., 1999). Међутим, немогућност фузије ПВ са лизозомима ћелије домаћина ствара и баријеру за преузимање хранљивих материја од домаћина, који су потребни за раст и развој паразита. Да би се омогућило преузимање хранљивих материја, ПВ мембрана је пропустљива за мале молекуле (до 1300 далтона), укључујући ту шећере и аминокиселине (Schwab и сар., 1994). За преузимање већих и сложенијих органских молекула, ПВ паразита је у блиском контакту са митохондријама, ендоплазматским

ретикулумом, микротубулама и нанотубулама ћелије домаћина, преко којих преузима додатне хранљиве материје.

1.2.3 Метаболички профил *T. gondii*

Метаболичке потребе паразит задовољава преузимањем како готових хранљивих материја, њихових прекурсора тако и *de novo* синтезом сложених органских једињења. Енергетске потребе *T. gondii* највећим делом задовољава метаболизмом угљених хидрата. Поред преузимања глукозе кроз поре мембране ПВ (Fulton и Spooner, 1960), *T. gondii* има ензимске системе за разлагање метаболита као и синтезу различитих врста угљених хидрата. Бројна истраживања су показала присуство ензима гликолизе (Fleige и сар., 2007), циклуса лимунске киселине (Fleige и сар., 2008) и пентозофосфатног пута (Bahl и сар., 2010) у цитосолу паразита. Поред катаболичких, *T. gondii* поседује и ензиме који учествују у анаболизму угљених хидрата, пре свега у процесу глуконеогенезе (Fleige и сар., 2008; Bahl и сар., 2010).

Када је у питању метаболизам аминокиселина до сада постоји врло мало експерименталних података о њиховом значају у физиологији *T. gondii*. Оно што је познато је да биосинтетски путеви метаболизма аминокиселина у највећој мери личе на аналогне путеве код човека, па је *T. gondii* ауксотрофична за аминокиселине аргинин и триптофан (Dai и сар., 1994), и да лизин за њу не представља есенцијалну аминокиселину (Chaudhary и Roos, 2005).

Подаци о липидном профилу *T. gondii* односно о саставу, количини, дистрибуцији и путевима синтезе липида унутар паразита су оскудни. Показано је да се у апикопласту налазе ензими за синтезу масних киселина

(White и сар., 2005). Поред *de novo* синтезе, паразит такође има и способност да преузме масне киселине од ћелије домаћина (Quitnat и сар., 2004). Што се тиче триацилглицерола, *T. gondii* их синтетише преко ацил-коензим А диацилглицерол ацилтрансферазног пута који се налази у ендоплазматском ретикулуму паразита (Quitnat и сар., 2004). Ови глицеролипиди се складиште унутар липидних телашаца који се налазе у цитоплазми паразита и служе као резервоар енергије. Квантификација фосфолипидног профила *T. gondii* је показала да доминантни облик фосфолипида унутар паразита представља фосфатидил холин, а затим следе фосфатидил етаноламин, фосфатидил инозитол и фосфатидил серин (Gupta и сар., 2005). Они представљају важне састојке ПВ мембране и поред преузимања од ћелије домаћина паразит их може синтетисати и *de novo* преко *Kennedy*-евог биохемијског пута (Charron и Sibley, 2002 ; Vance и Vance, 2004). Паразит може синтетисати и гликосфинголипиде, и то пре свега инозитол фосфорилцерамид, који служе највећим делом за везивање и стабилизацију протеина плазма мембране (Azzouz и сар., 2002). С друге стране, анаболички пут за синтезу стероида није идентификован код *T. gondii* (Correns и сар., 2000). Међутим, истраживања спроведена у *in vitro* условима су показала да биолошке мембране паразита садрже високе концентрације холестерола (Sehgal и сар., 2005). Од великог значаја су пионирска истраживања у овој области, која су показала да паразит није у могућности сам да синтетише холестерол, већ га преузима од ћелије домаћина и то у облику *LDL*-а (Correns и сар., 2000). Новија истраживања спроведена на генетски измењеним мишевима којима недостаје рецептор за *LDL*, показала су да паразит за преузимање холестерола осим *LDL* рецептора користи и други рецептор под именом алтернативни *LDL* рецептор (Portugal и сар., 2008).

1.2.4 Липидни метаболизам домаћина и инфекција апикомплексним паразитима

Промене липидног метаболизма домаћина након инфекције различитим групама интрацелуларних паразита су примећене, како у експерименталним тако и у клиничким студијама. Међутим број ових студија је до сада незнатан, што представља широку област за даље истраживање, како због објашњења патогенезе тако и због развоја нових лекова у циљу лечења паразитских инфекција.

Пре више деценија је откривено да је *HDL* неопходан за раст и развој *Plasmodium falciparum*-а у *in vitro* условима (Grellier и сар., 1991). Такође је показано да недостатак холестерола инхибира инвазију *P. falciparum* на еритроците (Lauer и сар., 2000). С друге стране, различите клиничке студије су у *in vivo* условима испитивале серумски липидни статус код пацијента оболелих од маларије у ендемичним подручјима Африке. Ова истраживања су показала да у акутној маларији долази до снижења серумског холестерола (Chukwuocha и сар., 2011) као и снижења серумских вредности *HDL*-а и *LDL*-а, као и повишења вредности срумских триглицерида (Nilson и Nilson, 1990). Ови налази су потврђени и анализом серумског липидног профила деце оболеле од маларије у ендемским подручјима Африке (Baptisa и сар., 1996).

Експерименти на моделу инфекције *Cryptosporidium muris* су показали да овај паразит изазива промене у организацији холестерола плазма мембране ћелије домаћина (Yoshikawa и сар., 1997). Међутим промене липида домаћина током инфекције *C. muris* на нивоу серума још увек нису уочене.

Истраживања патогенезе токсоплазмозе су показала да је за успешну инвазију *T. gondii* непоходно присуство холестерола из ћелије домаћина (Corpens и Joiner, 2003). Поред инвазије, холестерол домаћина је неопходан и

за оптималну деобу паразита унутар инфициране ћелије (Sonda и сар., 2001). Холестерол домаћина се преузима од стране паразита посредством Р-гликопротеина и користи за раст и развој паразита (Bottova и сар., 2009). Већина ових студија су изведене у *in vitro* условима, па је било потребно испититати елементе липидног метаболизма и у *in vivo* системима. Једине до сада такве студије од стране *Portugal* и сарадника (2004, и 2008), су показала да у генетски модификованом домаћину долази до промена липидног статуса током експерименталне токоплазмозе и то у виду пада *VLDL*-а и *LDL*-а. Са друге стране, нема података о метаболичким путевима липида унутар природног, генетски непромењеног, домаћина током инфекције са *T. gondii*.

2 ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Паразит *T. gondii* нема могућности да синтетише сопствени холестерол, већ га мора преузети од ћелије домаћина. Пошто до данас нема података о евентуалној улози липида у патогенези токсоплазмозе, циљ овог истраживања је испитивање утицаја инфекције овим паразитом на липидни метаболизам домаћина.

Циљ је реализован кроз испитивање липидног метаболизма домаћина у току експерименталне токсоплазмозе миша, и то на нивоу серума анализом биохемијских маркера липидног метаболизма, а на ткивном нивоу, анализом експресије гена значајних за метаболизам липида.

3 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1 Огледне животиње

У огледима су коришћене женке мишева *Swiss-Webster* соја старе 4-6 недеља и тежине 18-20 грама. Мишеви су набављени од Управе за војно здравство (Војномедицинска академија, Београд, Србија) и распоређени по 6 јединки у кавезу, са дневно-ноћним циклусом од 12 часова и доступном храном и водом *ad libitum*. Сви огледи су спроведени у складу са Европском конвенцијом о заштити животиња (86/609/ЕС) а одобрени су од стране Етичког Комитета, Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду а потом потврђени од стране Етичког комитета за рад са експерименталним животињама Медицинског факултета Универзитета у Београду.

3.2 Паразити

За експерименталну инфекцију је коришћен *BGD-1* сој *T. gondii* ниске вируленције који је изолован и генетски и имунолошки окарактерисан у Лабораторији за медицинску паразитологију, Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду (Djurković-Djaković и сар. 2006). Коршћење овог соја у експериментима је омогућено одржавањем хроничне инфекције у женкама мишева *Swiss-Webster* соја који су инфицирани најмање 6 месеци пре извођења огледа. На дан инфекције, жртвован је миш који је служио за одржавање соја, процедуром цервикалне дислокације. Након

жртовања, узет је мозак животиње и направљен је хомогенат ткива, механичким ситњењем ткива у епрувети, уз додатак 1 ml физиолошког раствора. Од начињеног хомогената, узиман је узорак од 25 µl у коме је бројањем на микроскопу *Carl Zeiss Axioskop 2 plus* (Гетинген, Немачка), на увељачању 40 пута утврђен број циста. Животиње су потом инокулисане *per os* са по 8 циста *BGD-1* соја. Број циста за инокулацију је изабран на темељу претходних огледа у којима је показанао 90% преживљавање мишева у периоду од 8 седмица након инфекције (Djurković-Djaković и сар., 2006).

3.3 Дизајн експеримента

Утицај експерименталне инфекције паразитом *T. gondii* на елемента липидног метаболизма домаћина смо испитивали користећи два експериментална модела.

Први експериментални модел је служио да покаже динамику кретања серумских липида током инфекције. Коришћено је 18 контролних и 54 заражена миша. Поступак се састојао у томе да се након експерименталне инфекције узме крв контролних и заражених подгрупа мишева (6-12 јединки) пункцијом ретроорбиталног синуса 0., 7., 14., 21., 28., 42. дана. Из крви смо добили серум, у коме смо анализирали параметре серумског липидног статуса: укупни холестерол, *HDL*, *LDL* и триглицериде. Након 42 дана од инфекције, мишеви су жртвовани цервикалном дислокацијом, а мозгови хомогенизовани ради изолације и пребројавања циста *T. gondii*.

Други експериментални модел је служио да покаже, како серумске тако и елементе ткивног липидног метаболизма, код контролних (неинфицираних) и инфицираних животиња. У овом моделу смо групе

контролних (6 јединки) и заражених животиња (9-11 јединки) жртвовали у две временске тачке, 14. и 42. дана ради испитивања параметара липидног метаболизма у серуму (*Apo A-I*, *Apo B-100* и адипонектин) и параметра запаљења (Ц-реактивни протеин). Ове две временске тачке смо изабрали на темељу претходних огледа у којима смо уочили најизразитије промене серумских липида код инфицираних животиња. Поред серумских анализа, 14. и 42. дана након инфекције смо анализирали и генску експресију ткивних параметра липидног метаболизма у јетри и мозгу мишева. У ткиву јетре смо анализирали генску експресију рецептора за *HDL* (*SR-BI*), рецептора за *LDL* (*LDLR*), транспортног протеина за *HDL* (*Apo A-I*), транспортног протеина за *LDL* (*Apo B-100*), мембранског транспортног протеина за холестерол (*ABCA1*), ензима хидрокси-метил-глутарил коензима А редуктазе (*HMG-CoA* редуктазе) и глицерол-алдехид-6-фосфат дехидрогеназе (*GAPDH*). У ткиву мозга смо анализирали генску експресију *SR-BI* рецептора, *LDLR* рецептора, мембранског транспортног протеина *ABCA1*, ензима *HMG-CoA* редуктазе и ензима *GAPDH*.

3.4 Анализа биохемијских параметара у серуму

3.4.1 Одређивање серумског липидног статуса

Мерење укупног серумског холестерола је било засновано на чињеници да слободни холестерол и холестерол естри, под дејством ензима холестерол естеразе, холестерол оксидазе и пероксидазе дају обојене спојеве (квинонеимине), који се могу мерити спектрофотометријски на 500 ± 20 nm таласане дужине.

Мерење серумског *HDL*-а је било засновано на чињеници да се холестерол из *LDL*-а, *VLDL*-а и хиломикрона разлаже помоћу холестерол естеразе у реакцији у који се не ствара боја. Остатак холестерола у облику *HDL*-а се везује посредством детергента дајући бојену реакцију, а интензитет боје се мери на 600 ± 20 nm таласне дужине.

Мерење серумског триглицерида је било засновано на чињеници, да се серумски триглицериди у процесу везаних реакција под дејством липазе, глицерол киназе, глицерол-три-фосфат оксидазе и пероксидазе претварају у обојени спој квинонеимина, који се мери спектрофотометријски на таласној дужини од 500 ± 20 nm.

Вредност серумског *LDL*-а је израчунавана преко *Friedwald*-ове формуле: укупни холестерол-*HDL*-триглицериди/5 (*Friedewald* и сар. 1972).

Реагенси су набављени од *Olympus System Reagent* (Хамбург, Немачка), док је мерење укупног холестерола, *HDL*-а, *LDL*-а и триглицерида је извршено на биохемијском аналајзеру *Olympus AU 400* (Хамбург, Немачка) по упутству произвођача.

3.4.2 Одређивање серумског аполипопротеина А-I (*Apo A-I*)

Одређивање серумског аполипопротеина А-I је вршено методом таложења помоћу антитела на *Apo A-I*. Количина талога антиген-антитело је пропорционална количини *Apo A-I* у серуму и измерена је турбидиметријском методом на таласној дужини од 340 nm. Реагенси за одговарајућу анализу су набављени од *Biosystems S.A.* (Коста Брава, Шпанија), а мерење је извршено на спекрофотометру *Biosystems BTS - 330* (Барселона, Шпанија) према упутству произвођача.

3.4.3 Одређивање серумског аполипопротеина Б-100 (*Apo B-100*)

Одређивање серумског аполипопротеина *B-100* је вршеном методом таложења помоћу антитела на *ApoB-100*. Количина талога антиген-антитело је пропорционална количини *ApoB-100* у серуму и измерена је турбидиметријски на таласној дужини од 340 nm. Коришћени су реагенси од *Biosystems S.A.* (Коста Брава, Шпанија), а мерење је извршено на спектрофотометру *Biosystems BTS - 330* (Барселона, Шпанија) према упутству произвођача.

3.4.4 Одређивање серумског Ц-реактивног протеина (*CRP*)

За одређивање серумског Ц-реактивног протеина је коришћена метода аглутинације честицама латекса, обложених антителима на људски *CRP* која реагују и на мишји *CRP*. Аглутинација латекс честица је пропорционална концентрацији *CRP* и измерена је турбидиметријски на таласној дужини од 540 nm. Коришћени су реагенси од *Biosystems S.A.* (Коста Брава, Шпанија), а мерење је извршено на спектрофотометру *Biosystems BTS - 330* (Барселона, Шпанија) према упутству произвођача.

3.4.5 Одређивање серумског адипонектина

Количина серумског адипонектина је одређивана сендвич ензимским имуноесејом користећи кит *Quantikine Mouse adiponectin/Acrp 30 Immunoassay*, (*R&D Systems*, Абингтон, Велика Британија). Принцип технике се заснива на везивању моноклонског антитела (на плочи) специфичног за мишји адипонектин са серумским адипонектином са једне стране, а потом везивање поликлонског антитела специфичног за серумски адипонектин за серумски

адипонектин са друге стране. Након тога је додаван ензимски субстрат, који у реакцији са ензимом на поликлоналном антители ствара плаву боју која прелази у жуту након додавања раствора за заустављање реакције. Интензитет жуте боје је мерен на 405 nm таласне дужине и сразмеран је количини серумског адипонектина са почетка реакције. Све анализе су урађене у дупликату, а концентрација адипонектина је одређивана конструисањем стандардне криве по упутству произвођача. Реагенси за одговарајуће анализе су набављени од *R&D Systems* (Абингтон, Велика Британија) а мерење оптичке густине је извршено на уређају *Multiscan Labsystems* (Хелсинки, Финска).

3.5 Анализа генске експресије елемената липидног метаболизма у ткиву

3.5.1 Изолација рибонуклеинске киселине (РНК) из ткива

Да би се спречила раградња РНК, узорци ткива из којих је она изолована су прво испрани у диетилпиروкарбонатној (*DEPC*). У сваки узорак од 50 mg који се налази на леду је додато 500 μ l *TRIzol*[®] раствора (*Invitrogen*, Лек, Холандија). Након тога је сваки узорка посебно хомогенизован помоћу ултрасоничног хомогенизатора *Hielscher UP50H* (Телтов, Немачка). Садржај је потом инкубиран 5 минута на 20°C а затим промешан на уређају *Bio-Rad BR-2000 Vortexer* (Херкулес, Калифорија, САД). Након мешања у сваки узорак је додато 100 μ l хлороформа (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД) па су потом поново промешани на машини *Bio-Rad BR-2000 Vortexer*. Након мешања узорци су инкубирани 3 минута на 20°C а затим центрифугирани 15 минута (1200 обртаја/мин. на +4°C) на ултрацентрифуги *Eppendorf 5415R* (Хамбург, Немачка). После центрифугирања надталог је премештен у нову

епрувету од 1,5 ml (*Eppendorf*, Хамбург, Немачка). У следећем кораку надталог је промешан са серијом алкохола ради таложења соли приликом одвајања РНК. Прво је у сваки узорак додато 250 μ l 2-пропанола (*Sigma-Aldrich*). Након чега су узорци промешани на машини *Bio-Rad BR-2000 Vortexer* и инкубирани 10 мин. на 20°C. Након инкубације, узорци су центрифугирани 15 минута (1200 обртаја/мин на +4°C) на уређају *Eppendorf 5415R*. После центрифугирања надталог из узорка је одбачен а епрувета са талогом је стављена на лед. У сваку епрувету са остатком талога испитиваног узорка је додато по 500 μ l 70% етанола (*Applichem*, Дармштат, Немачка). Након тога су узорци промешани на машини *Bio-Rad Vortexer* а затим центрифугирани 5 минута (7500 обртаја/мин на +4°C). После центрифугирања надталог је уклоњен наставцима од 200 μ l. Узорци су потом кратко центрифугирани, а остаци надталого су уклоњени наставцима од 10 μ l. Потом су узорци осушени у ламинату *Thermo Electron LED* (Остероде, Немачка), 4 минута на собној температури. У сваки узорак је потом додато 10 μ l *DEPC* воде. Након тога узорци су брзо промешани и кратко центрифугирани. На крају су узорци инкубирани 10 минута на 55°C у инкубатору *Boekel 133730* (Фестервил, Пенсилванија, САД). Узорци са изолованом РНК су чувани на -80°C у фрижидеру *Kendro Hereus* (Лангесболд, Немачка).

3.5.2 Квантитативно одређивање РНК

Квантификација РНК је одређена на фотометру *Eppendorf Biophotometar*, (Хамбург, Немачка) и таласној дужини од 260 nm. Пре почетка мерења, нула инструмента је подешена слепом пробом, која садржи *DEPC* воду. Затим је узорак РНК који је претходно 200 пута разблажен *DEPC* водом пребачен у кивету фотометра и измерена апсорбанца на таласној дужини од 260 nm.

Узимајући у обзир разблажење израчуната је концентрација РНК у сваком појединачном узорку.

3.5.3 Метода обрнутог преписивања РНК (реверзна транскрипција РНК)

Поступак реверзне транскрипције је извршен коришћењем *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (*Fermentas*, Виљнус, Литванија). Поступак је започет тиме што је у узорке РНК масе 1µg, који су се налазили на леду, додато је до 10 µl DEPC воде. Потом су у претходну смесу додати 1 µl почетног олигонуклеотидног низа (*primer*) и 1 µl DEPC воде до укупне запремине од 12 µl. Након тога су узорци центрифугирани и инкубирани 5 минута на 65°C. После инкубације узорци су враћени на лед и кратко центрифугирани 10 секунди. Потом је у сваки узорак додато 4 µl, 5 пута разблаженог пуфера [250mM *Tris-HCl* (pH 8,3), 250mM KCl, 20mM MgCl₂, 50mM DTT] а затим и 1 µl 20u/µl *Ribolock RNase Inhibitor* из *Synthesis* кита. На крају је додато у сваки узорак 2 µl 10mM *dNTP Mix* и 1 µl 200u/µl *RevertAid M-MuLV* реверзне транскриптазе из овог кита. Укупна запремина течности је на крају ове фазе поступка била 20 µl. Потом је узорак инкубиран у уређају за ланчано умножавање полимеразом-PCR (*Applied Biosystems*, Карлсбад, Калифорнија, САД) 60 минута на 42°C, па затим 5 минута на 70°C који је служио за прекид реверзне транскрипције. Након процеса реверзне транскрипције, добијени су узорци комплементарне ДНК (кДНК) који су чувани на -80°C у фрижидеру *Kendro Hereus* за каснију даљу анализу.

3.5.4 Ланчана реакција умножавања полимеразом праћена у стварном времену (*Real time PCR*)

Пре додавања 2 μ l кДНК узорка направљена је мешавина од 25 μ l *Taq* полимеразе (*Fermentas*, Виљнус, Литванија), 2 μ l почетног олиго-нуклеотидног низа у правцу преписивања (*forward primer*) гена од интереса (Табела бр. 1), 2 μ l почетног олигонуклеотидног низа супротно од правца преписивања (*reverse primer*) гена од интереса (Табела бр. 1), 2 μ l флуоресцентне боје *SYBRGreen* (*Invitrogen*, Леек, Холандија) 1000 пута разблажен са диметил сулфоксидом (*Zorka Pharma*, Шабац, Србија) и 17 μ l воде без нуклеазе (*Fermentas*, Виљнус, Литванија). Мешавина је распоређена у бунаре микро плоче (*Eppendorf*, Хамбург, Немачка) у количини од 48 μ l по бунару после чега је у сваки од тих бунара додато 2 μ l кДНК испитиваног узорка јетре или мозга. Након додавања испитиваног узорка плоче су покривене заштитном фолијом *MicroAmp* (*Applied Biosystem*, Карлсбад, Калифорнија, САД) и центрифугиране 30 секунди на 2000 обртаја/минути на уређају *Eppendorf Centrifuge 5430* (Хамбург, Немачка). Након центрифугирања узорци су умножени у *PCR* уређају *Eppendorf Mastercycler epgradientS Realplex 4* (Хамбург, Немачка). Процес умножавања ДНК се одвијао током 45 циклуса од којих се сваки циклус састојао од: загревања 10 минута на 95°C, потом 1 минут на 94°C, затим 1 минут на 52°C и 1 минут на 72°C. Крајња екстезија је трајала 10 минута на 72°C.

Активност појединачног гена смо изражавали као разлику (ΔC_t) праговог циклуса гена од интереса и праговог циклуса *house-keeping* (*GAPDH*) гена.

Табела бр. 1. Листа *primer*-а коришћених у *real time PCR* реакцији

Ген	<i>Primer</i>	Произвођач
ABCA1	<i>Forward</i> 5'-CTCAGAGGTGGCTCTGATGAC-3'	<i>Metabion</i> , (Мартинсрид, Немачка)
	<i>Reverse</i> 5'-CCCATACAGCAAGAGCAGAAG-3'	
LDL рецептор	<i>Forward</i> 5'-GGATCCACCGCAACATCTAC-3'	<i>Invitrogen</i> , (Лек, Холандија)
	<i>Reverse</i> 5'-TCTTTACGCCCTTGGTGTCA-3'	
Apo A-I	<i>Forward</i> 5'-AAAGCTGTGGTGGCTGGCC GTG-3'	<i>Invitrogen</i> , (Лек, Холандија)
	<i>Reverse</i> 5'-ACTAACGGTTGAACCCAGAGT-3'	
Apo B-100	<i>Forward</i> 5'-CGTGGGCTCCAGCATTTCTA-3'	<i>Invitrogen</i> , (Лек, Холандија)
	<i>Reverse</i> 5'-AGTCATTTCTGCCTTTGCGTC-3'	
HMG-CoA редуктаза	<i>Forward</i> 5'-TCTGGCAGTCAGTGGGAACТАТТ-3'	<i>Invitrogen</i> , (Лек, Холандија)
	<i>Reverse</i> 5'-CCTCGTCCTTCGATCCAATTT-3'	
GAPDH	<i>Forward</i> 5'-TGGCCTTCCGTGTTCCCT-3'	<i>Invitrogen</i> , (Лек, Холандија)
	<i>Reverse</i> 5'-AGGCGGCACGTCAGATC-3'	
SRB-I рецептор	<i>Forward</i> 5'-GCCTACTCTGAGTCCCTGATGTC-3'	<i>Invitrogen</i> , (Лек, Холандија))
	<i>Reverse</i> 5'-AGGACCCTATAGCTTGGCTTCT-3'	

3.6 Паразитолошка анализа ткива мозга

3.6.1 Квантитативно одређивање броја циста у нативном препарату

Одмах након жртвовања мишева, мозгови су издвојени и хомогенизовани у 1 ml фосфатног пуфера-*PBS* (137 mmol/l NaCl, 2,7mmol/l KCl, 10 mmol/l Na₂HPO₄×2H₂O, 2,0 mmol/l KH₂PO₄, pH 7,4). Након

хомогенизације, узето је 25 μl хомогенизата и стављено на микроскопску плочицу *Objektträger (Manzel-Glaser, Брауншвајг, Немачка)*. Цисте су избројене под фазним контрастном на микроскопом *Axioskop 2 Plus Carl Zeiss* од стране три искусна независна истраживача, након чега је узета средња средност броја циста по узорку. Укупан број циста по једном узорку мозга је израчунат тако што је избројан број циста у четири капи помножен са бројем 10. На тај начин је добијен праг осетљивости ове методе, од 10 циста по мозгу.

3.6.2 Хистопатолошка анализа циста у обојеним препаратима

3.6.2.1 Припрема трајног хистолошког препарата

Након жртвовања животиња, узорци органа мозга и јетре су чувани у 4% раствору формалина {11,43 ml 35% формалина и 1000ml Соренценовог фосфатног пуфера [70ml раствора бр.1(1000ml дестиловане воде и 9,465g NaH_2PO_4) и 30ml раствор бр. 2 (1000ml дестиловане воде и 9,7g KH_2PO_4)]}. Тим процесом је ткиво фиксирано и очувано за даљу микроскопску анализу. Приликом прављења хистолошких препарата ткиво је извађено из формалина и узет је исечак. Затим је извршена дехидратација потапањем ткива сукцесивно у низ раствора етил-алкохола растућих концентрација. Прво је ткиво потопљено у 75% етил-алкохол (*Zorka Pharma, Шабац, Србија*) где остављено преко ноћи, да би потом следећег дана било потопљено по сат времена у 86%, па 96% и на крају 100% етил-алкохол (*Zorka Pharma*). У следећем кораку је ткиво потопљено у раствор хлороформа (*Sigma-Aldrich*) да би се ослободило алкохола, у трајању од 2 сата на 60°C. Потом су ткива прожета раствором парафина (*Zorka Pharma*), преко ноћи на 60°C. Након што су исечци ткива прожети парафином, пренети су у одговарајући калуп (*Спектар, Чачак, Србија*) и заливени топлим воском. После 20 минута, када се восак охладио, калупи су пренети на дрвени носач на даље сечење и обраду.

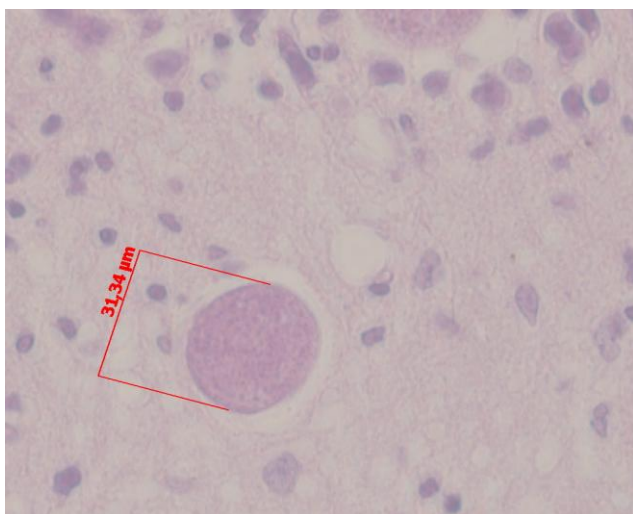
Сечење укалупљених исечака је обављено на клизајућем микротому *Leica Jung Histoslide 2000* (Нуслох, Немачка). Дебљина одсеченог дела је била од 5-10 μm , која је након сечења стављана у водено купатило Неомедика (Ниш, Србија) на 56°C, а одатле пребачени на предметно стакло *Objektträger*. Депарафинисање узорка је извршено потапањем предметног стакла са залепљеном парафинском кришчицом у раствор ксилола (*Zorka Pharma*) у трајању од 20 минута а након тога је узорак потопљен у серију раствора етил алкохола (*Zorka Pharma*) и то 100% етил алкохол 10 минута, затим 96% етил алкохол 10 минута, затим 86% етил алкохол 10 минута, и на крају 75% етил алкохол такође 10 минута. На крају је узорак испран у текућој води.

3.6.2.2 Бојење трајног хистолошког препарата

У поступку бојења, узорци су прво обојени раствором хематоксилина (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД) током 10 минута, па потом испрани у текућој води. Након испирања су обојени раствором еозина (*Sigma-Aldrich*) у трајању од 3 минута а затим испрани у текућој води. Након бојења, узорци су дехидратисани поновним третирањем са по 10 минута растућом серијом концентрација етил алкохола и то од 75%, 86%, 96% и 100% (*Zorka Pharma*). Потом су препарати поринути у раствор ксилола (*Zorka Pharma*) у трајању од два пута по 20 минута. На крају је на сваки препарат стављена кап Канада балзама (*Reanal*, Будимпешта, Мађарска) и покривен је покровним стаклом (*Objektträger*). Тиме је направљен трајан хистолошки препарат, који је потом микроскопски анализиран на микроскопу *Carl Zeiss Axioskop 2 plus* ради одређивања пречника циста.

3.6.2.3 Одређивање величине циста

Величина циста је посматрана као мера инфективности, јер је њихова величина директно сразмерна броју инфективних брадизоита. Као мера величине је измерен пречник уочених циста на трајном хистолошком препарату бојеним хематоксилин-еозином. Мерење је извршено на микроскопу *Carl Zeiss Axioskop 2 plus*, на увељачању од 400. Након уочене цисте на микроскопу (Слика бр. 3), иста је снимљена помоћу камере *AxioCam MRc5* (Гетинген, Немачка) и након тога је мерен пречник, помоћу софтверског пакета *AxioVision Rel 4.7.1.* за *Windows* (*Microsoft*, Редмонт, Вашингтон, САД). С обзиром на велику варијабилност броја циста у узорцима мозга заражених животиња, као вредност пречника циста појединачног узорка је узимана средња вредност из најмањег садржаоца појединачних прегледаних препарата možданог ткива.



Слика бр. 3. Приказ цисте *T. gondii* на увељачању 400 пута, са измереним пречником.

3.7 Статистичка обрада добијених резултата

Сви резултати добијени из експеримената су обрађени у статистичком програму SPSS за *Windows* (верзија 16.0, Чикаго, Илиној, САД). За поређење нумеричких података из две групе користили смо Студентов *t*-тест или Ман-Витнијев *U* тест у зависности од хомогености добијених података. За поређење нумеричких података из више од две групе смо користили анализу варијансе (*ANOVA*), коју је потом следио *Tuckey*-ев *HSD post hoc* тест. Повезаност посматраних варијабли смо испитивали праметарском односно непараметарском регресијом а чврстина везе је испитивана Спирмановом методом корелације. Резултат је сматран статистички значајним уколико је $p < 0,05$.

4 РЕЗУЛТАТИ

4.1 Серумски липидни статус током огледа

Да бисмо проценили липидни метаболизам домаћина током инфекције са *T. gondii*, прво смо анализирали елементе серумских липида код инфицираних и неинфицираних (контролних) животиња. Током експерименталне инфекције, анализирали смо основне параметре серумског липидног статуса и то:

- укупни холестерол,
- *HDL*,
- *LDL*,
- триглицериде.

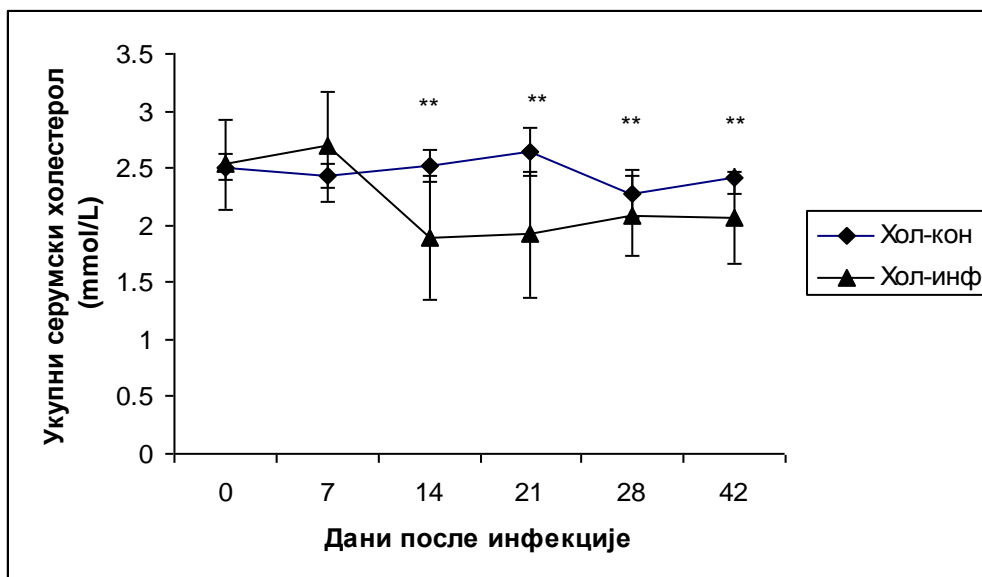
Да бисмо уочили могућу промену серумских липида анализирали смо горе наведене параметре код контролних и инфицираних животиња у данима 0, 7, 14, 21, 28, и 42 након инфекције. Овакав дизај експеримента је омогућио испитивање динамике у промени серумских липида у току експерименталне инфекције паразитом *T. gondii*.

Резултати серумског липидног статуса су показали да под утицајем инфекције *T. gondii* долази до промена на нивоу укупног серумског холестерола и *HDL*-а.

4.1.1 Вредност укупног серумског холестерола код контролних и инфицираних животиња

Први елемент серумског липидног статуса који смо анализирали код инфицираних и контролних животиња је био укупни серумски холестерол и то у данима 0, 7, 14, 21, 28, и 42 након инфекције

Графикон бр. 1. Кретање вредности укупног серумског холестерола током огледа



Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна грешка.

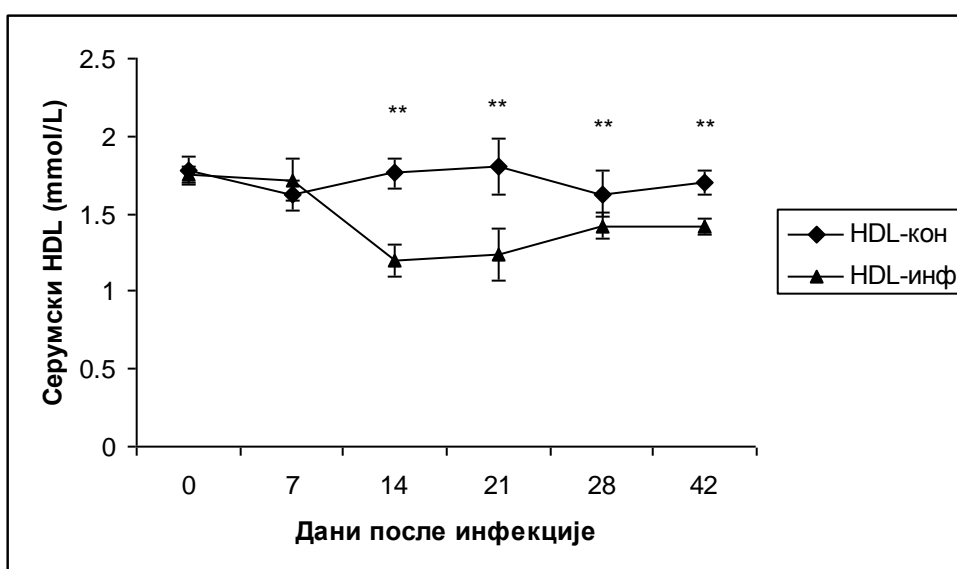
** $, p < 0.01$ у односу на 0-ти и 7-ми дан после инфекције. Хол-кон; вредност укупног серумског холестерола у контролној групи; Хол-инф; вредност укупног серумског холестерола у групи инфицираних животиња.

Испитивање кретања вредности укупног серумског холестерола током огледа код инфицираних мишева (Графикон бр. 1), показало је да је почев од 14. дана после инфекције дошло до високо статистички значајног пада, који се одржавао све до 42. дана ($p < 0,01$). Овај пад се није јавио код контролних мишева ($p > 0,05$)

4.1.2 Вредност серумског *HDL*-а код контролних и инфицираних животиња

Други параметар серумског липидног статуса који смо анализирали код контролних и инфицираних животиња је био серумски *HDL*, и то у данима 0, 7, 14, 21, 28, и 42 након инфекције

Графикон бр. 2. Кретање вредности серумског *HDL*-а током огледа



Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна грешка.

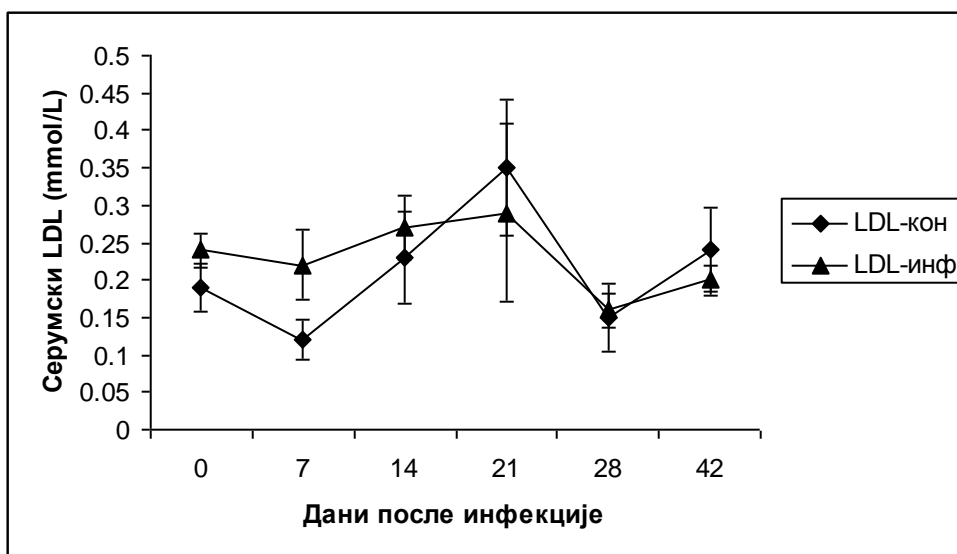
** $p < 0.01$ у односу на 0-ти и 7-ми дан после инфекције. HDL-кон; вредност серумског HDL-а код контролних мишева; HDL-инф; вредност серумског HDL-а код инфицираних мишева

Резултати су показали да се вредности серумског *HDL*-а током огледа код инфицираних мишева мењају тако да је почев од 14. дана након инфекције дошло до високо статистички значајног пада, који се одржавао све до 42. дана ($p < 0,01$). Овај пад се није јавио код контролних мишева (Графикон бр. 2), ($p > 0,05$).

4.1.3 Вредност серумског *LDL*-а код контролних и инфицираних животиња

Трећи параметар серумског липидног статуса који смо анализирали код контролних и инфицираних животиња је био серумски *LDL*, и то у данима 0, 7, 14, 21, 28, и 42 након инфекције.

Графикон бр. 3. Кретање вредности серумског *LDL*-а током огледа



Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна грешка.

LDL-кон; вредност серумског *LDL*-а код контролних мишева; LDL-инф; вредност серумског *LDL*-а код инфицираних мишева.

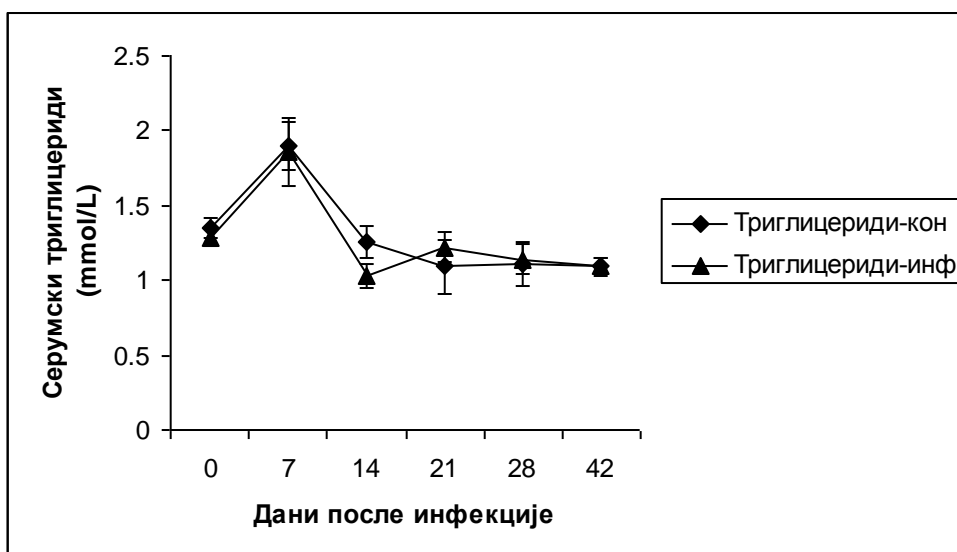
Резултати су показали да иако је током огледа долазило до извесних промена у нивоу серумског *LDL*-а, ове промене нису биле значајне када се упореде са вредностима *LDL*-а код контролних животиња (Графикон бр. 3), ($p > 0,05$).

Овај резултат указује, да експериментална инфекција није утицала на динамику кретања серумског *LDL*-а током огледа.

4.1.4 Вредност серумских триглицерида код контролних и инфицираних животиња

Четврти параметар серумског липидног статуса који смо анализирали код контролних и инфицираних животиња били су серумски триглицериди и то у данима 0, 7, 14, 21, 28, и 42 након инфекције.

Графикон бр. 4. Кретање вредности серумских триглицерида током огледа



Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна грешка.

Триглицериди-кон; вредност серумских триглицерида код контролних мишева;
Триглицериди-инф; вредност серумских триглицерида код инфицираних мишева

Током огледа није дошло до статистички значајне промене серумских триглицерида код инфицираних мишева у односу на контролне мишеве (Графикон бр. 4), ($p > 0,05$).

Овај резултат указује да експериментална инфекција није утицала на динамику кретања серумских триглицерида током огледа.

4.2 Серумски аполипопротеини

Анализирајући серумски липидни статус, добили смо пад вредности укупног серумског холестерола и *HDL* липопротеина код инфицираних животиња од 14. дана након инфекције који је трајао све до 42. дана. Да би смо утврдили да ли је ова промена последица промене у концентрацији липида или промене у концентрацији аполипопротеина, који представљају саставне делове липопротеинских честица, анализирали смо ниво серумских аполипопротеина код контролних и инфицираних животиња. Два аполипопротеина која смо анализирали су:

- аполипопротеин А-I (*Apo A-I*) који представља главни аполипопротеин *HDL* липопротеина и,
- аполипопротеин Б-100 (*Apo B-100*) који представља главни аполипопротеин *LDL* липопротеина.

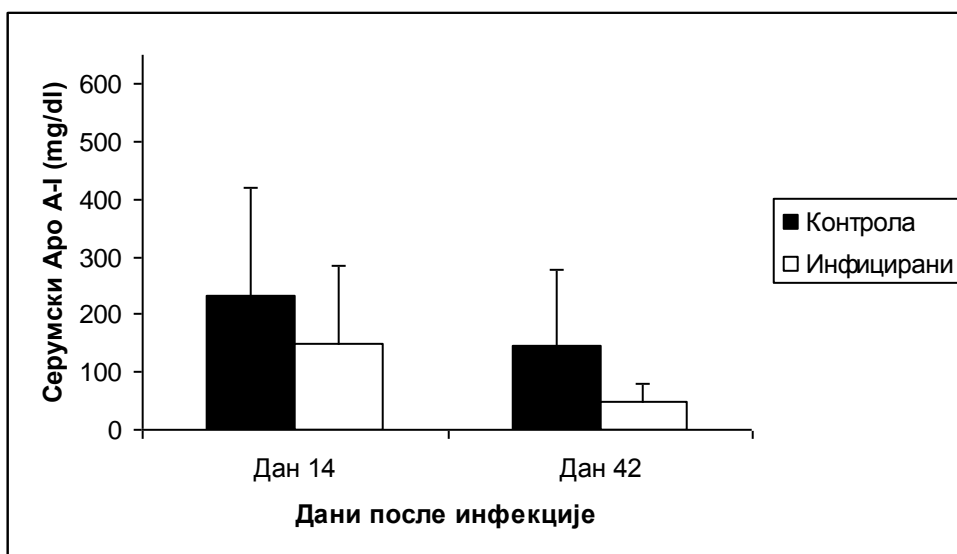
Временске тренутке које смо одабрали за анализу серумских аполипопротеина су били 14. и 42. дана након инфекције, из разлога што је прва промена у серумском липидном статусу уочена 14. дана и трајала је све до 42. дана.

Резултати серумских аполипопротеина су показали да инфекција са *T. gondii* не утиче на серумски ниво *Apo A-I* и *Apo B-100*.

4.2.1 Серумски аполипопротеин A-I код контролних и инфицираних животиња

Серумски Apo A-I, као главни апопротеин HDL липопротеина је анализиран у 14. и 42. дану после инфекције.

Графикон бр. 5. Вредност серумског Apo A-I током огледа



Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација

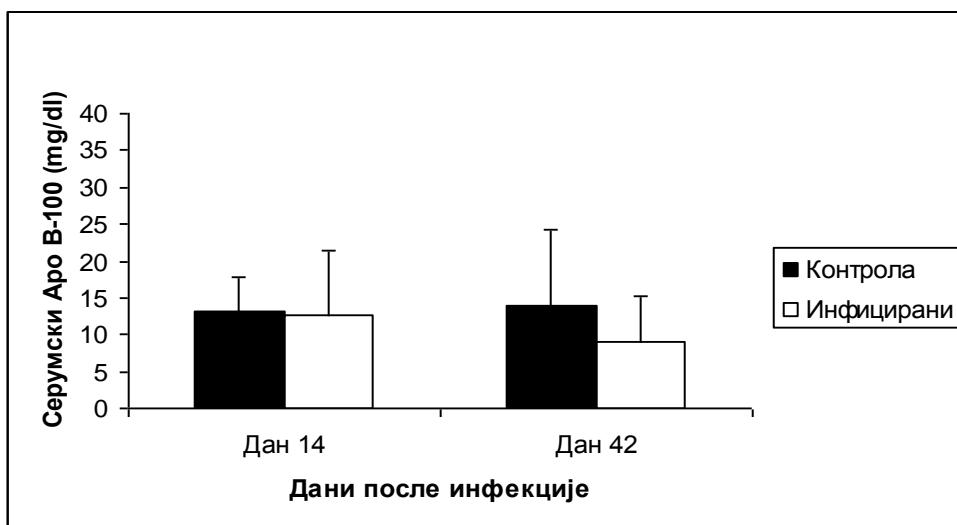
Упркос примећеном снижењу серумског Apo A-I, и 14., и 42. дана код инфицираних мишева у односу на контролу, ова разлика није била статистички значајна (Графикон бр. 5.), ($p > 0,05$).

Овај резултат указује да експериментална инфекција није утицала на вредност серумског Apo A-I током огледа.

4.2.2 Серумски аполипопротеин B-100 код контролних и инфицираних животиња

Серумски *Apo B-100*, као главни апопротеин *LDL* липопротеина је анализиран у 14. и 42. дану после инфекције.

Графикон бр. 6. Вредност серумског *Apo B-100* током огледа



Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација

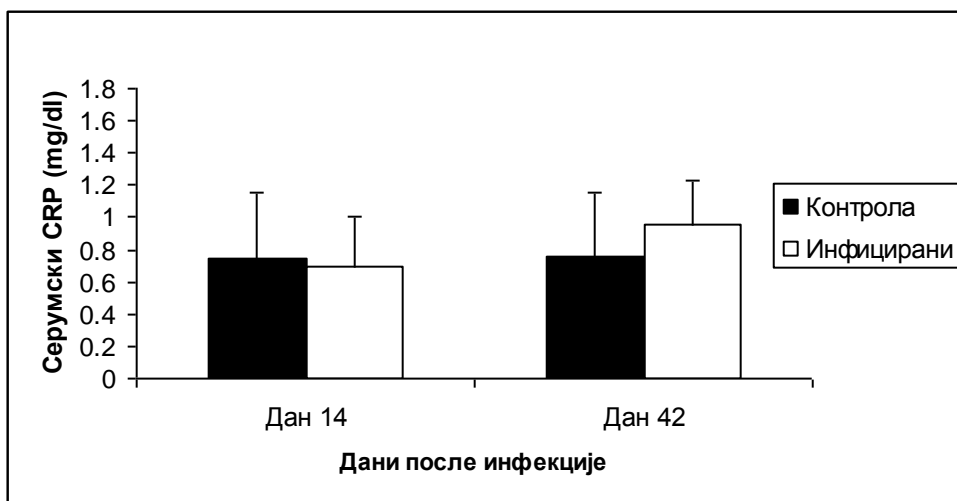
Анализирајући вредности серумског *Apo B-100*, утврђено је да није дошло до статистички значајне промене у вредности серумског *Apo B-100* између контролних и инфицираних мишева како 14. дана тако ни 42. дана након инфекције (Графикон бр. 6.), ($p > 0,05$).

Овај резултат указује да експериментална инфекција није утицала на вредност серумског *Apo B-100* током огледа.

4.3 Серумски Ц-реактивни протеин (CRP) код контролних и инфицираних животиња

С обзиром на то да промене у вредностима серумских липида током инфекције могу бити последица и запаљенске реакције, током огледа у 14. и 42. дану је анализирана вредност серумског *CRP*-а као једног од главних неспецифичних показатеља запаљења.

Графикон бр. 7. Вредност серумског *CRP* током огледа



Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација

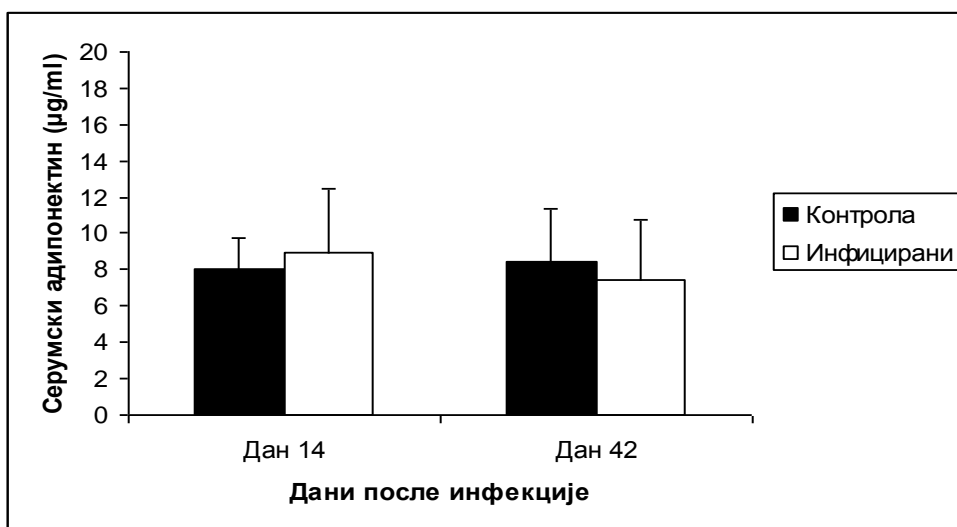
Анализирајући вредности серумског *CRP*-а, утврдили смо да није дошло до статистички значајне промене нивоа *CRP*-а између контролних и инфицираних мишева како 14. тако ни 42. дана након инфекције (Графикон бр. 7), ($p > 0,05$).

Овај резултат указује на то да експериментална инфекција није утицала на вредности серумског *CRP*-а, током огледа.

4.4 Серумски адипонектин код контролних и инфицираних животиња

С обзиром да промене у серумским вредностима липида, нарочито HDL-а, могу бити последица промене у концентрацији серумског адипонектина, током огледа у 14. и 42. дану је анализирана вредност серумског адипонектина, код контролних и инфицираних животиња.

Графикон бр. 8. Вредност серумског адипонектина током огледа



Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација

Анализирајући вредности серумског адипонектина, утврдили смо да није дошло до статистички значајне промене у вредности серумског адипонектина између контролних и инфицираних мишева како 14. тако ни 42. дана након инфекције (Графикон бр. 8), ($p > 0,05$).

Овај резултат указује на то да експериментална инфекција није утицала на вредности серумског адипонектина, током огледа.

4.5 Однос између серумског липидног статуса и броја циста у мозгу инфицираних животиња

Један од параметара тежине инфекција у нашим огледима, био је број уочених циста *T. gondii* у мозгу. Да бисмо утврдили однос између степена инфекције и серумских липида домаћина, анализирали смо повезаност између броја циста и серумског липидног статуса.

Анализиран је однос између:

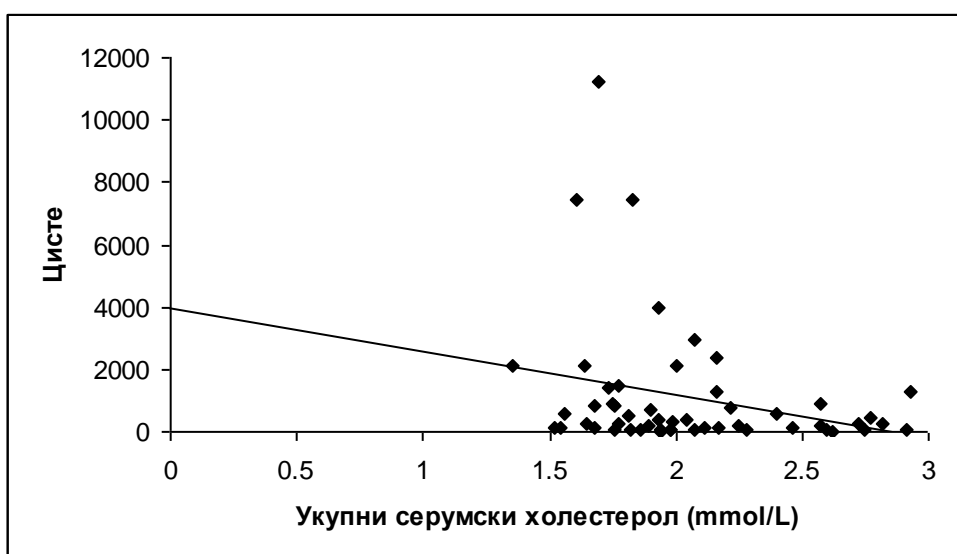
- укупног серумског холестерола и броја циста у мозгу,
- серумског *HDL*-а и броја циста у мозгу,
- серумског *LDL*-а и броја циста у мозгу,
- серумских триглицерида и броја циста у мозгу инфицираних животиња.

Резултати анализе односа између серумског липидног статуса и тежине инфекције изражене кроз број циста у мозгу, показали су да постоји негативна корелација између укупног серумског холестерола и *HDL*-а са бројем циста у мозгу.

4.5.1 Серумски холестерол и број циста у мозгу

Пошто је код инфицираних животиња дошло до пада вредности укупног серумског холестерола који се одржавао до 42. дана, прво смо анализирали однос укупног серумског холестерола и броја циста у мозгу инфицираних животиња.

Графикон бр. 9. Однос између укупног серумског холестерола и броја циста



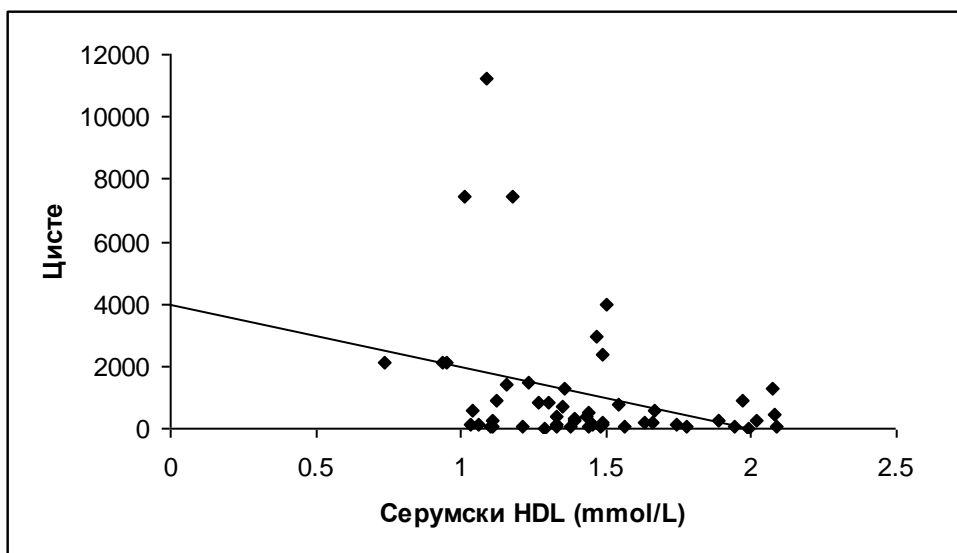
Анализирајући однос између вредности укупног серумског холестерола и броја циста код инфицираних животиња (Графикон бр. 9), утврдили смо да постоји значајна негативна корелација (вредност Спирмановог коефицијента корелације $\rho = -0,274$; $p < 0,05$).

Овај резултат указује да мишеви са већим бројем циста у мозгу имају ниже вредности серумског холестерола.

4.5.2 Серумски HDL и броја циста у мозгу

С обзиром да је код инфицираних животиња дошло до пада вредности серумског HDL-а, који се одржавао до 42. дана анализирали смо однос серумског HDL-а холестерола и броја циста у мозгу инфицираних животиња.

Графикон бр. 10. Однос између серумског HDL-а и броја циста



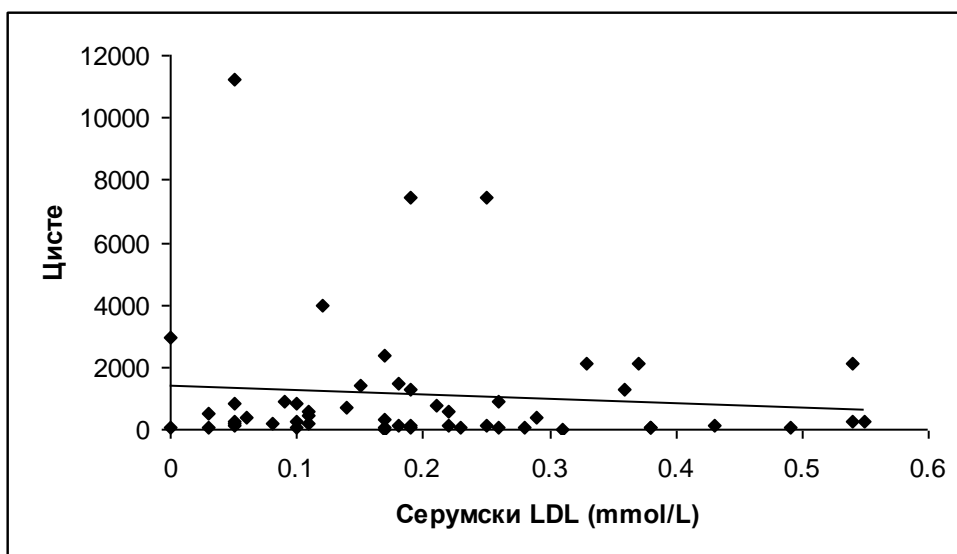
Анализирајући однос између вредности серумског HDL-а и броја циста у мозгу инфицираних животиња (Графикон бр. 10), уврдили смо да постоји значајна негативна корелација (вредност Спирмановог коефицијента корелације $\rho = -0,278$; $p < 0,05$).

Овај резултат показује да мишеви са већим бројем циста у мозгу имају ниже вредности серумског HDL-а.

4.5.3 Серумски *LDL* и број циста у мозгу

Иако је раније показано да на нивоу *LDL*-а у серуму није било промене у току инфекције, нити у односу на контролне животиње, испитали смо и однос серумског *LDL*-а и броја циста у мозгу инфицираних животиња.

График бр. 11. Однос серумског *LDL*-а и броја циста



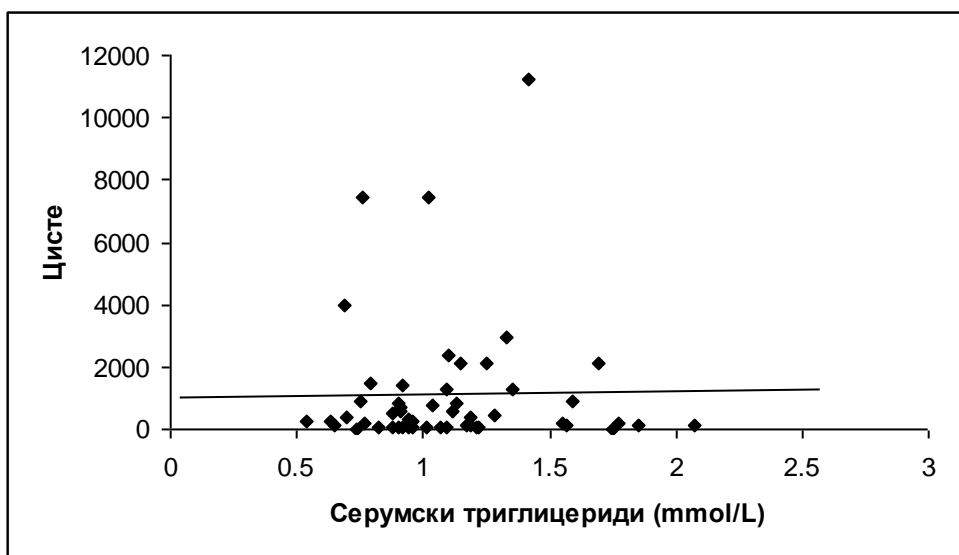
Анализирајући однос између вредности серумског *LDL*-а и броја циста у мозгу инфицираних животиња (Графикон бр. 11), утврдили смо да не постоји значајна корелација између ових параметара (вредност Спирмановог коефицијента корелације $\rho = -0,093$; $p > 0,05$).

Овај резултат показује да са променом степена инфекције, израженим кроз број циста у мозгу, не долази до повезане промене у серумском вредностима *LDL*-а код инфицираних животиња.

4.5.4 Серумски триглицериди и број циста у мозгу

Иако је раније показано да на нивоу триглицерида у серуму није било промене у току инфекције, нити у односу на контролне животиње, испитали смо и однос серумских триглицерида и броја циста у мозгу инфицираних животиња.

Графикон бр. 12. Однос између серумских триглицерида и броја циста



Анализирајући однос између серумских вредности триглицерида и броја циста у мозгу инфицираних животиња (Графикон бр. 12), показали смо да не постоји значајна корелација између ових параметара (вредност Спирмановог коефицијента корелације $\rho = -0.023$; $p > 0,05$).

Овај налаз указује да са променом степена инфекције, израженим кроз број циста у мозгу, не долази до повезане промене у серумском вредностима триглицерида код инфицираних животиња.

4.6 Однос између промене (Δ) серумских липида и броја циста у мозгу инфицираних животиња

Обзиром да смо у нашим огледима показали промене на нивоу укупног серумског холестерола и *HDL*-а код инфицираних животиња, у следећем кораку смо пратили животиње након инфекције и измерили промену (Δ) укупног серумског холестерола и *HDL*-а од нултог до 42. дана појединачно за сваку инфицирану животињу. Након тога смо за сваку појединачну животињу анализирали однос између:

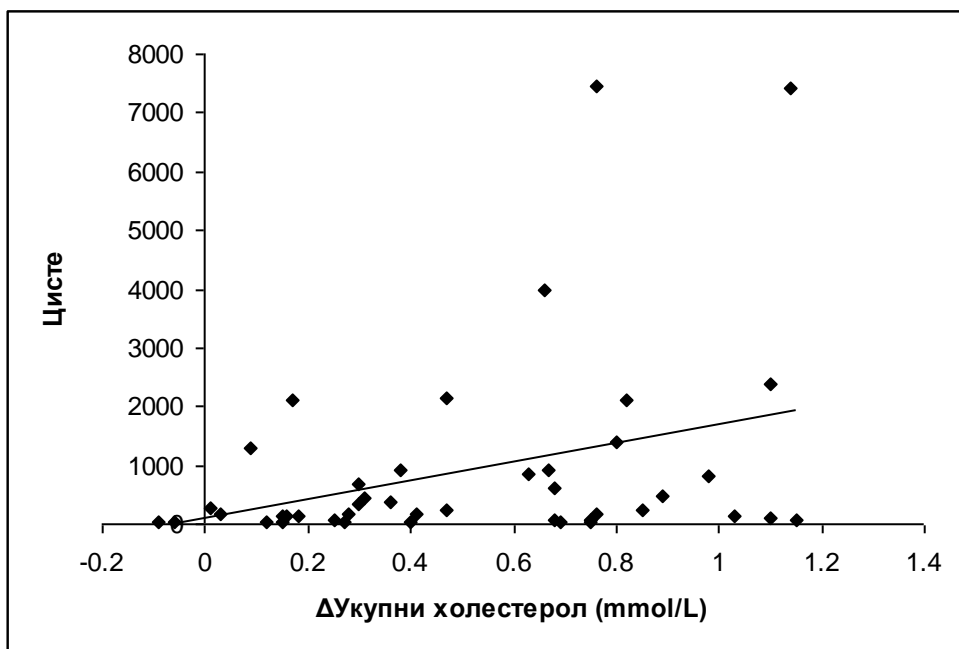
- промене укупног серумског холестерола и броја циста у мозгу
- промене серумског *HDL*-а и броја циста у мозгу инфицираних животиња.

Резултати односа промене серумских липида и броја циста у мозгу су показали повећан пад укупног и *HDL* холестерола са повећањем броја циста паразита у мозгу инфицираних животиња.

4.6.1 Промена укупног серумског холестерола и број циста у мозгу

Анализирајући промене укупног серумског холестерола код инфицираних животиња које су представљене падом серумског холестерола, у следећој фази нашег истраживања анализирали смо однос између пада укупног серумског холестерола и броја циста у мозгу инфицираних животиња.

Графикон бр. 13. Однос између пада укупног серумског холестерола и броја циста



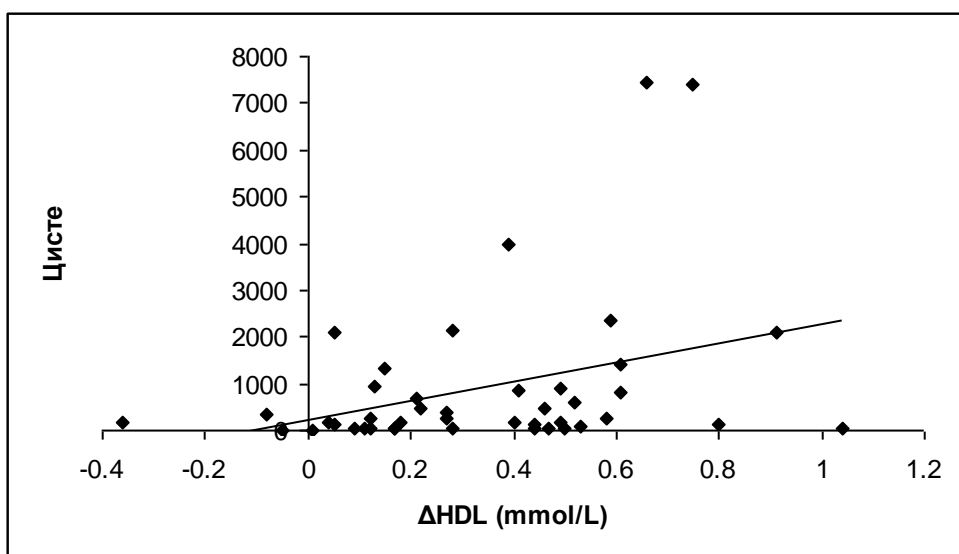
Посматрајући однос пада укупног серумског холестерола и броја циста (Графикон бр. 13), уочена је значајна позитивна корелација између пада укупног серумског холестерола и броја циста у мозгу инфицираних животиња (вредност Спирмановог коефицијента корелације $\rho=0,331$; $p<0,05$).

Овај налаз указује на то да што је већи број циста у мозгу, то је и већи пад укупног серумског холестерола.

4.6.2 Промена серумског *HDL*-а и броја циста у мозгу

Анализирајући промене серумског *HDL*-а код инфицираних животиња које су представљене падом серумског *HDL*-а, у следећој фази нашег истраживања анализирали смо однос између пада серумског *HDL*-а и броја циста у мозгу инфицираних животиња.

Графикон бр. 14. Однос између пада серумског *HDL*-а (ΔHDL) и броја циста у мозгу



Анализирајући однос пада серумског *HDL*-а и броја циста (Графикон бр. 14), уочена је значајна позитивна корелација између пада серумског *HDL*-а и броја циста у мозгу инфицираних животиња (вредност Спирмановог коефицијента корелације $\rho=0,335$; $p<0,05$).

Овај резултат показује да што је већи број циста у мозгу, то је и већи пад серумског *HDL*-а.

4.7 Однос између серумских липида и пречника циста у мозгу инфицираних животиња

Поред броја циста у мозгу као параметар тежине инфекције узиман је и пречник циста у мозгу инфицираних животиња. Из тог разлога смо посматрали однос серумских липида и степена инфекције у мозгу инфицираних животиња, изражен кроз пречник циста. Анализиран је однос између:

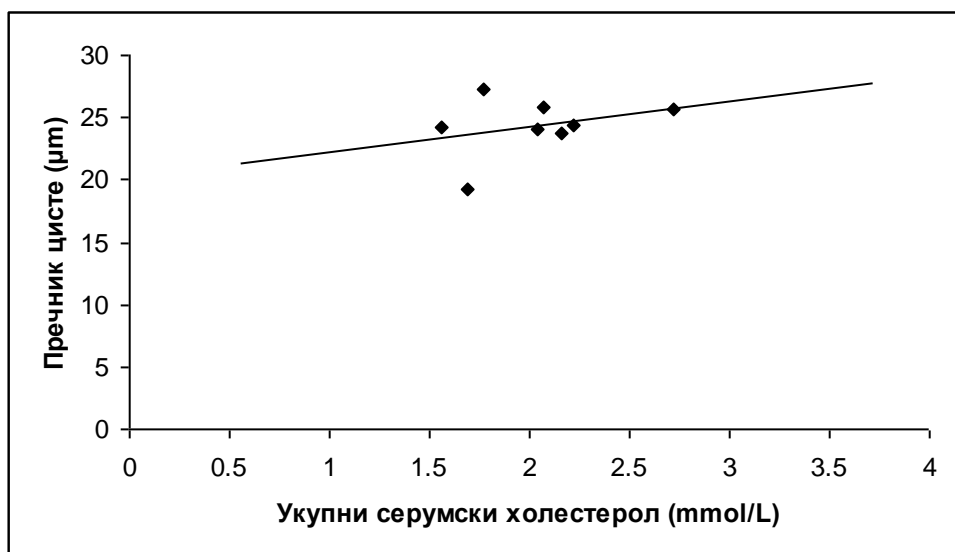
- укупног серумског холесетрола и пречника циста
- серумског HDL-а и пречника циста
- серумског LDL-а и пречника циста
- серумских триглицерида и пречника циста у мозгу инфицираних животиња.

Резултати односа између серумских липида и пречника циста су показали да ниво серумских липида не зависи од величине пречника циста у мозгу инфицираних животиња.

4.7.1 Укупни серумски холестерол и пречник циста у мозгу

С обзиром на то да је код инфицираних животиња дошло до пада вредности укупног серумског холестерола који се одржавао до 42. дана, анализирали смо однос укупног серумског холестерола и пречника циста у мозгу инфицираних животиња.

Графикон бр. 15. Однос између укупног серумског холестерола и пречника циста у мозгу

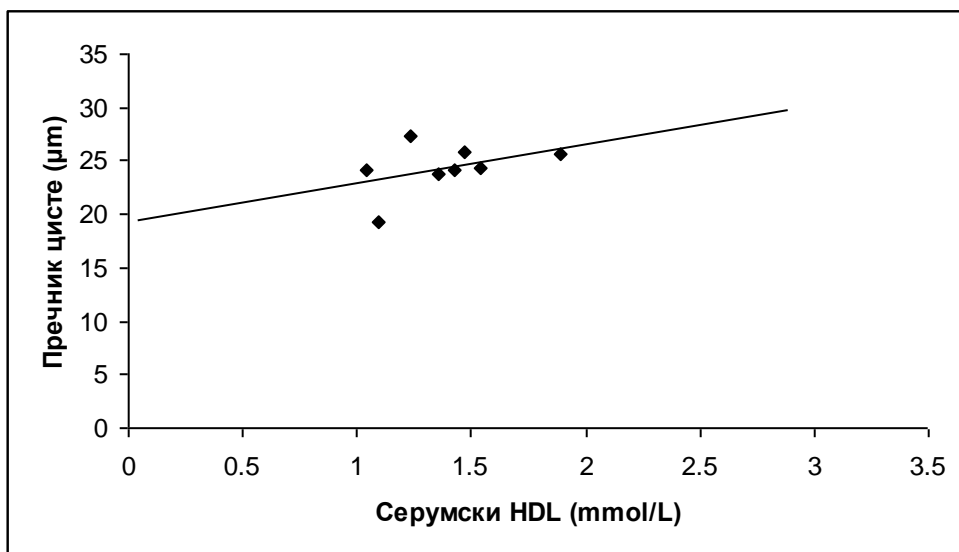


Анализирајући однос укупног серумског холестерола и пречника цисте (Графикон бр. 15), уочено је да не постоји значајна корелација између укупног серумског холестерола и пречника циста у мозгу инфицираних животиња (вредност Спирмановог коефицијента корелације $\rho=0,238$; $p>0,05$).

Овај резултат указује на чињеницу да величина пречника цисте у мозгу не утиче на серумске вредности укупног холестерола.

4.7.2 Серумски HDL и пречника циста у мозгу

С обзиром да је код инфицираних животиња дошло до пада вредности серумског HDL-а, који се одржавао до 42. дана анализирали смо однос серумског HDL-а холестерола и броја циста у мозгу инфицираних животиња. Графикон бр. 16. Однос између серумског HDL-а и пречника циста у мозгу



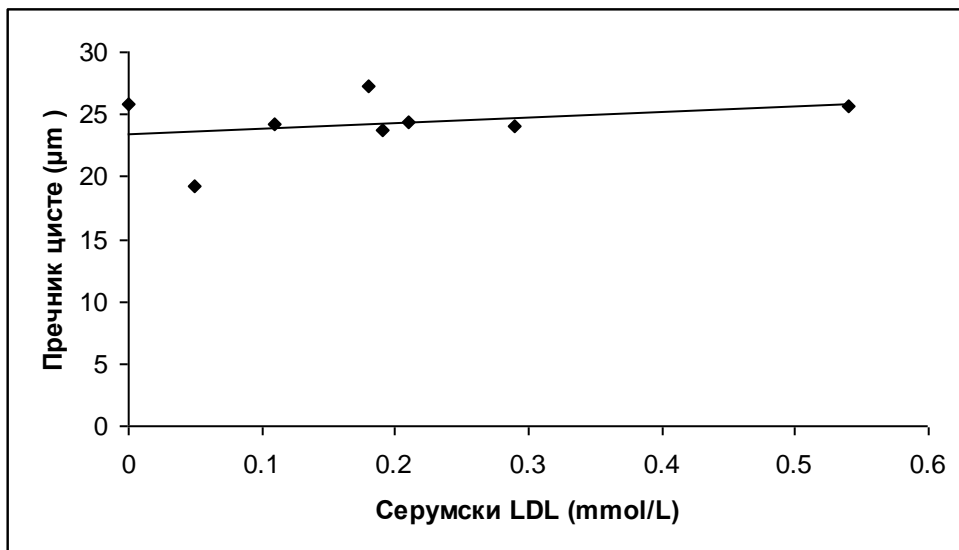
Анализирајући однос вредности серумског HDL-а и пречника циста у мозгу инфицираних животиња (Графикон бр. 16), показано је да не постоји значајна корелација између вредности серумског HDL-а и пречника циста (вредност Спирмановог коефицијента корелације $\rho=0,381$; $p>0,05$).

Овај резултат указује на чињеницу да величина пречника цисте у мозгу инфициране животиње не утиче на серумске вредности HDL-а код исте животиње.

4.7.3 Серумски LDL и пречник циста у мозгу

Када смо анализирали серумске вредности LDL-а нисмо добили међугрупну разлику али смо ипак посматрали однос између серумског LDL-а и пречника циста у мозгу инфицираних животиња.

Графикон бр. 17. Однос између серумског LDL-а и пречника циста



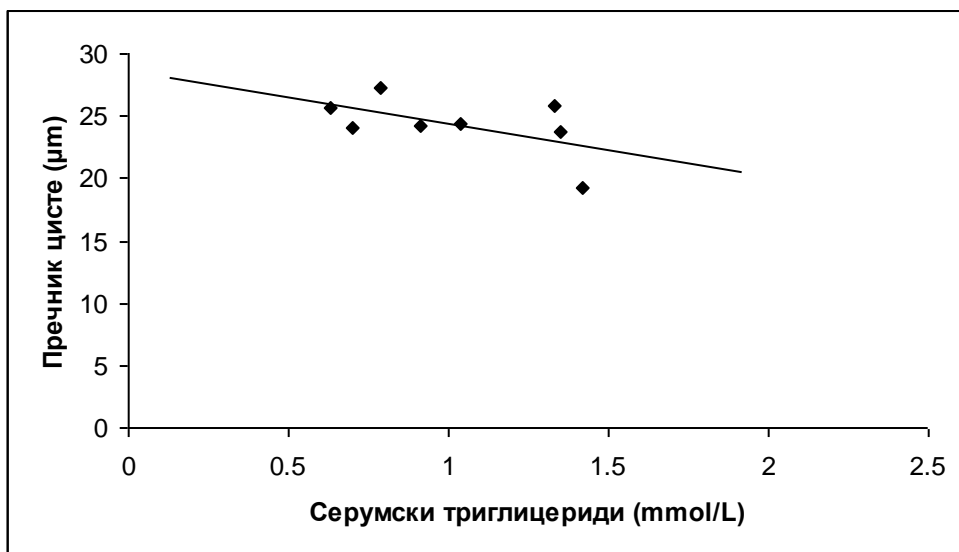
Анализирајући однос вредности серумског LDL-а и пречника циста у мозгу инфицираних животиња (Графикон бр.17), уочено је да не постоји значајна корелација између вредности серумског LDL-а и пречника циста (вредност Спирмановог коефицијента корелације $\rho = 0,0$; $p > 0,05$).

Овај резултат показује да величина пречника цисте у мозгу инфициране животиње не утиче на серумске вредности LDL-а код исте животиње.

4.7.4 Серумски триглицериди и пречник циста у мозгу

Када смо анализирали серумске вредности триглицерида нисмо добили међугрупну разлику али смо ипак посматрали однос између њих и пречника циста у мозгу инфицираних животиња.

Графикон бр. 18. Однос између серумских триглицерида и пречника циста



Анализирајући однос вредности серумских триглицерида и пречника циста у мозгу инфицираних животиња (Графикон бр. 18), показано је да не постоји статистички значајна корелација (вредност Спирмановог коефицијента корелације $\rho = -0,5$; $p > 0,05$).

Овај резултат показује да величина пречника цисте у мозгу инфициране животиње не утиче на серумске вредности триглицерида код исте животиње.

4.8 Ткивна експресија гена липидног метаболизма током огледа

У досадашњем излагању смо показали да током експерименталне инфекције са *T. gondii* долази до промена липидног, односно холестеролског метаболизма, у серуму инфицираних мишева. Да бисмо истражили да ли су промене у серуму праћене адекватним променама у ткиву, анализирали смо експресију гена елемената холестеролског метаболизма у ткиву инфицираних и неинфицираних мишева. Ткива која смо анализирали су били јетра, као средишњи орган холестеролског метаболизма, и мозак, као једно од предилекционих места за развој инфекције *T. gondii*. Анализа је обухватала два временска тренутка, 14. и 42. дан након инфекције, у којима смо уочили промене серумских вредности укупног холестерола и *HDL*-а.

4.8.1 Ткивна експресија гена липидног метаболизма у јетри

У јетри инфицираних и неинфицираних животиња смо анализирали експресију гена за:

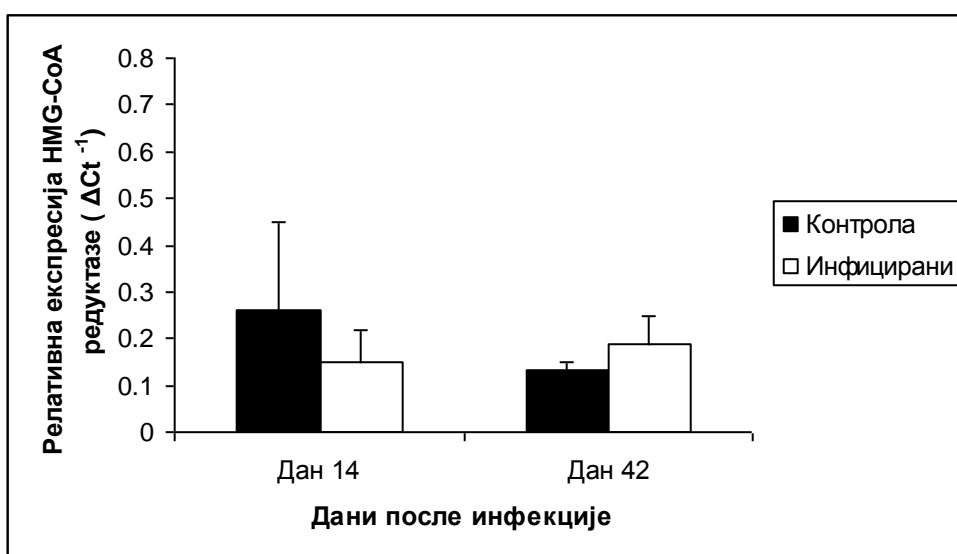
- ензим за синтезу холестерола (*HMG-CoA* редуктаза),
- главни аполипопротеин *HDL*-а (*Apo A-I*),
- главни аполипопротеин *LDL*-а (*Apo B-1,00*)
- *HDL* рецептор (*SR-BI*),
- *LDL* рецептор (*LDLR*),
- транспортни протеин за холестерол (*ABCA1*).

Резултати анализе нивоа генске експресије су показали да долази до смањене синтезе и смањеног преузимања *HDL*-а од стране јетре и то 14. дана од експерименталне инфекције.

4.8.1.1 Експресија гена за ензим *HMG-CoA* редуктазу у јетри

Ензим хидрокси-метил-глутарил-коензима А редуктаза (*HMG-CoA* редуктаза) представља кључни ензима у синтези холестерола преко мевалонатског пута. Овај ензим представља најважнију карику у регулацији синтезе холестерола у зависности од потреба организмa.

Графикон бр. 19. Експресија гена *HMG-CoA* редуктаза у јетри током огледа



Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација.

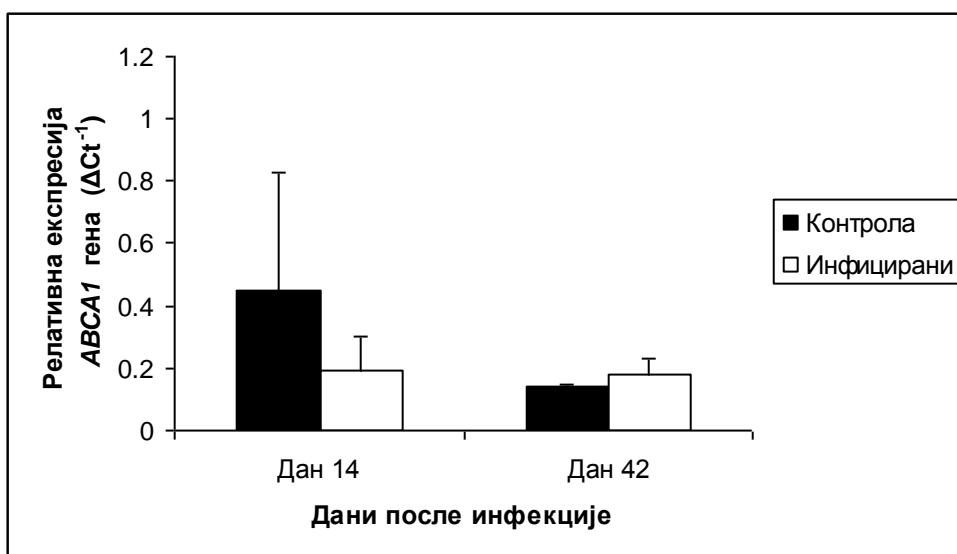
Анализа ткива јетре (Графикон бр. 19), је показала да не постоји статистички значајна разлика у експресији гена за *HMG-CoA* редуктазу између контролних и инфицираних мишева током огледа ($p > 0,05$).

Овај резултат указује на то да експериментална инфекција није утицала на експресију гена за синтезу холестерола у јетри током огледа.

4.8.1.2 Експресија гена за *АТФ*-везујући касетни А1 протеин (*АВСА1*) у јетри

АТФ-везујући А1 касетни протеин представља један од основних протеина за транспорт холестерола кроз ћелијску мембрану. Овај транспорт је регулисан у зависности од потреба ћелије за холестеролом.

Графикон бр. 20. Експресија гена за *АВСА1* у јетри током огледа



Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација.

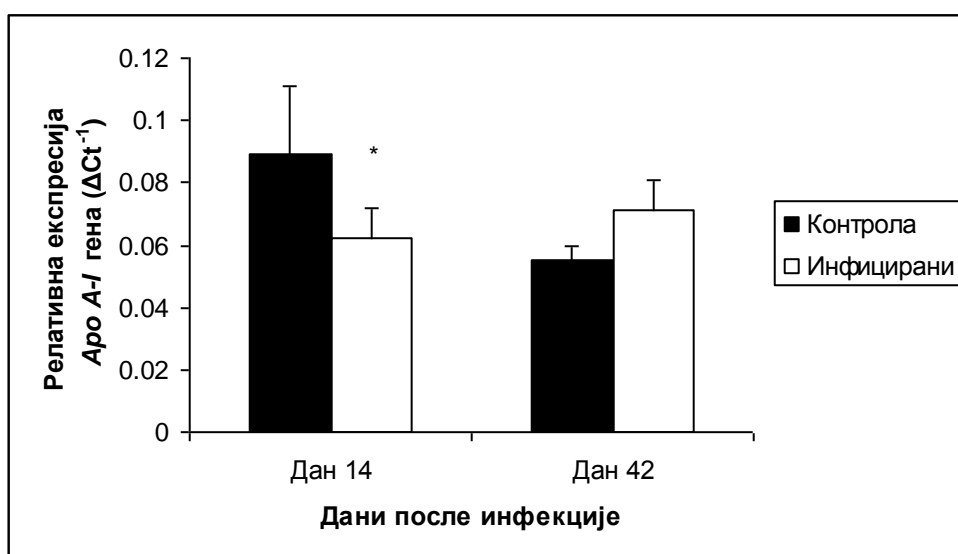
Анализа ткива јетре (Графикон бр. 20), је показала да не постоји статистички значајна разлика у експресији гена за *АВСА1* у јетри између контролних и инфицираних мишева током огледа ($p > 0,05$).

Овај резултат показује да експериментална инфекција није утицала на експресију гена за транспорт холестерола кроз ћелијску мембрану у јетри током огледа.

4.8.1.3 Експресија гена за аполипопротеин А-I (*Apo A-I*) у јетри

Због тога што је у претходно изложеним резултатима показано да постоји пад у серумском нивоу *HDL*-а код инфицираних животиња анализирали смо експресију *Apo A-I* као главног аплипопротеина *HDL* липопротеина у јетри.

Графикон бр. 21. Експресија гена за *Apo A-I* у јетри током огледа



Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација.

* $p < 0,05$ у односу на контролне мишеве 14. дана.

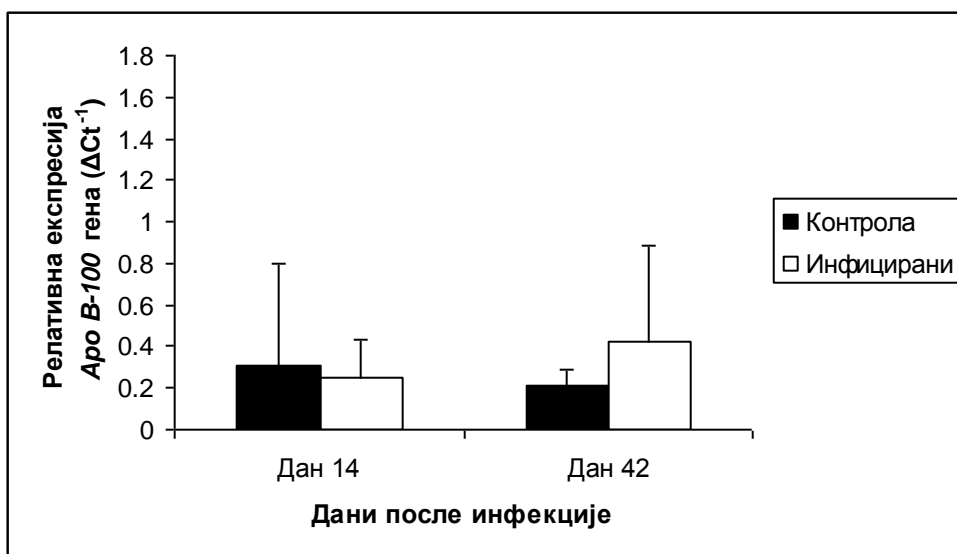
Показано је да постоји значајно снижена експресије *Apo A-I* у јетри код инфицираних мишева 14. дана у односу на контролне мишеве (Графикон бр. 21), која се губи 42. дана ($p < 0,05$).

Овај резултат указује да експериментална инфекција снижава експресију гена за протеински део *HDL*-а (*Apo A-I*) у јетри 14. дана након инфекције, док на експресију 42. дана не утиче.

4.8.1.4 Експресија гена за аполипопротеин Б-100 (*Apo B-100*) у јетри

Након анализе експресије главног протеина *HDL*-а, истражили смо експресију аполипопротеина *Apo B-100*, као главног апопротеина *LDL* липопротеина у јетри.

Графикон бр. 22. Експресија гена за *Apo B-100* у јетри током огледа



Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација.

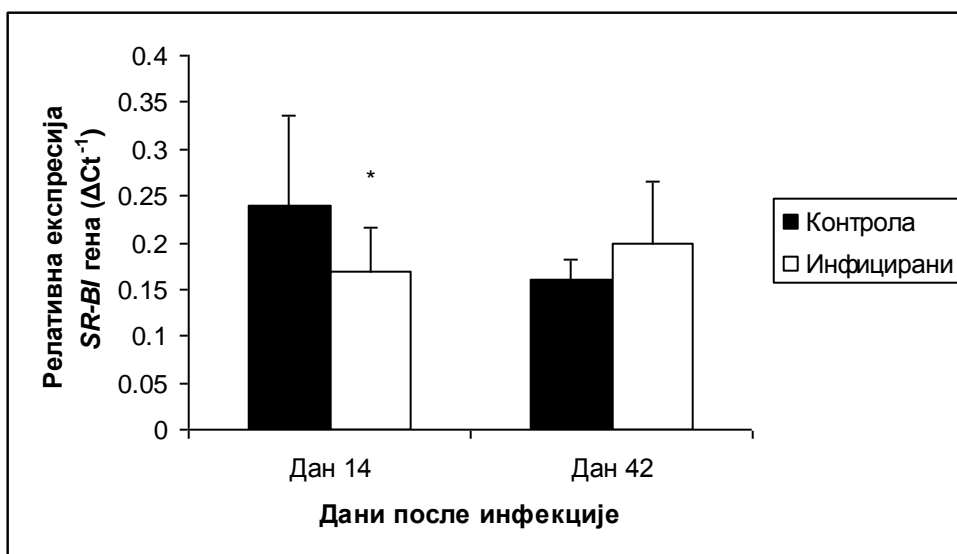
Не постоји статистички значајна разлика у експресији гена за *Apo B-100* у јетри између инфицираних и контролних мишева (Графикон бр. 22), током огледа ($p > 0,05$).

Овај резултат показује да експериментална инфекција није утицала на експресију гена за *Apo B-100* у ткиву јетре током огледа.

4.8.1.5 Експресија гена за *HDL* рецептор (*SR-BI*) у јетри

С обзиром на то да је досадашње истраживање показало промене у *HDL* метаболизму код инфицираних мишева, анализирали смо експресију *SR-BI* рецептора, као главног рецептора за *HDL* у ткиву јетре.

Графикон бр. 23. Експресија гена *SR-BI* рецептора у јетри током огледа



Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација.

* $p < 0,05$ у односу на контролне мишеве 14. дана.

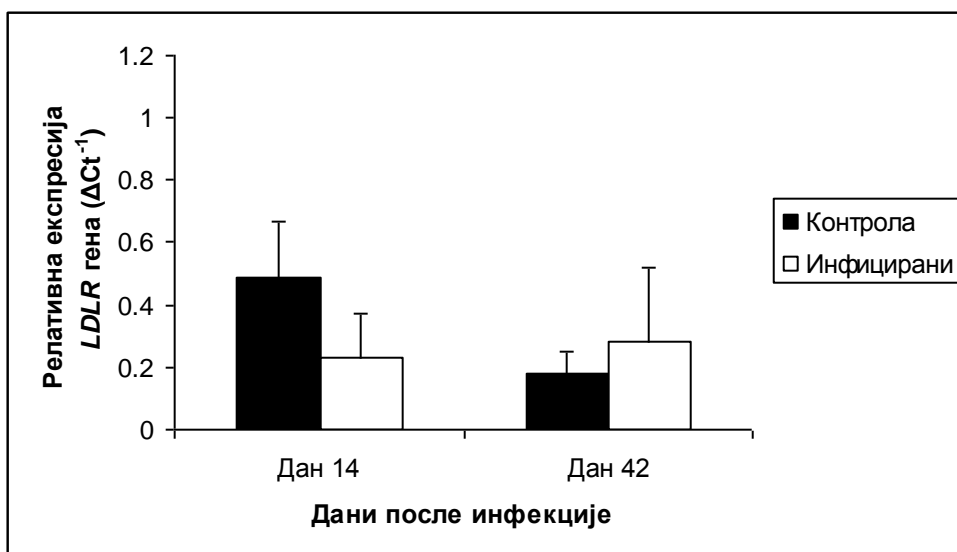
Постоји статистички значајно снижење експресије *SR-BI* гена у јетри код инфицираних мишева 14. дана од инфекције ($p < 0,05$). Не постоји значајна међугрупна разлика у експресији *SR-BI* гена у јетри 42. дана (Графикон бр. 23), ($p > 0,05$).

Овај резултат показује да експериментална инфекција снижава експресију гена за *HDL* рецептор у јетри 14. дана док на експресију касинје не утиче.

4.8.1.6 Експресија гена за *LDL* рецептор (*LDLR*) у јетри

Поред анализе *HDL* метаболизма, у експерименталној инфекцији смо анализирали и елементе *LDL* метаболизма. Један од основних елемената *LDL* метаболизма је и *LDLR*, чију смо експресију анализирали у ткиву јетре.

Графикон бр. 24. Експресија гена за *LDLR* у јетри током огледа



Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација.

Не постоји статистички значајна разлика у експресији гена за *LDLR* у јетри (Графикон бр. 24), између инфицираних и контролних мишева током огледа ($p > 0,05$).

Овај резултат показује да инфекција изазвана *T. gondii*. не утиче на експресију *LDLR* у ткиву јетре.

4.8.2 Ткивна експресија гена липидног метаболизма у мозгу

Мозак представља водећи предилекциони орган за развој циста паразита, и отуда смо се одлучили да анализирамо генску експресију елемената холестеролског метаболизма у мозданом ткиву.

У мозгу неинфицираних и инфицираних животиња смо анализирали експресију следећих гена за:

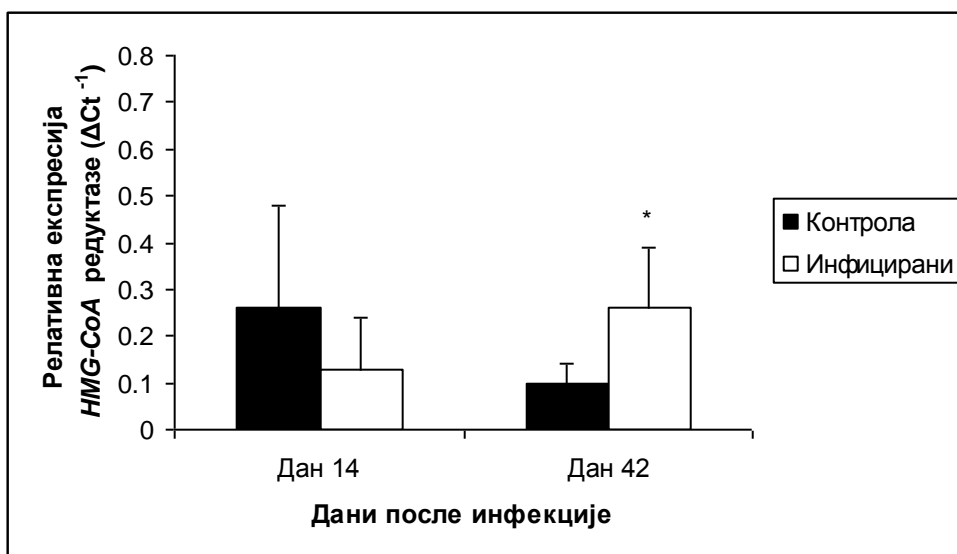
- ензим за синтезу холестерола (*HMG-CoA* редуктаза),
- *HDL* рецептор (*SR-BI*),
- *LDL* рецептор (*LDLR*),
- транспортни протеин за холестерол (*ABCA1*).

Резултати нивоа генске експресије су показали повећану производњу холестерола у мозгу, као повећан пренос холестерола између ћелија 42. дана од експерименталне инфекције.

4.8.2.1 Експресија гена за синтезу ензима *HMG-CoA* редуктазу у мозгу

С обзиром на могућност паразита да се развија у можеаном ткиву, поред јетре анализирали смо експресију гена за ензим *HMG-CoA* редуктазу и у мозгу.

Графикон бр. 25. Експресија гена *HMG-CoA* редуктазу у мозгу током огледа



Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација.

* $p < 0,05$ у односу на контролне мишеве 42. дана.

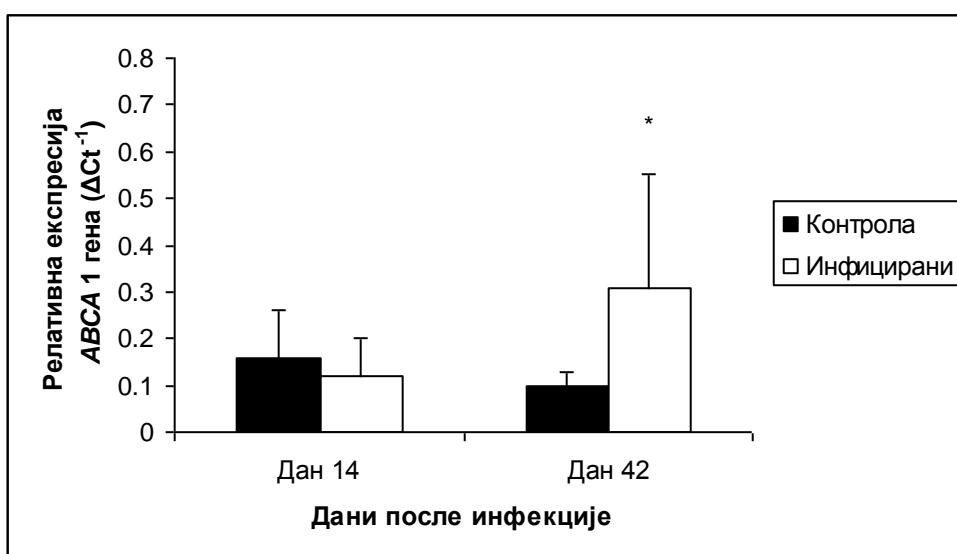
Дана 14. после инфекције не постоји разлика у експресији *HMG-CoA* редуктазе у мозгу, али 42. дана инфицирани мишеви имају значајно већу експресију гена за *HMG-CoA* редуктазу у односу на контролне (Графикон бр. 25), ($p < 0,05$).

Овај резултат указује на повећану синтезу холестерола у можданом ткиву 42. дана након инфекције паразитом *T. gondii*.

4.8.2.2 Експресија гена за транспортни протеин *ABCA1* у мозгу

Транспортни протеин за холестерол је анализиран у мозгу због могућег поремећаја метаболизма холестерола у мозданом ткиву након инфекције паразитом *T. gondii*.

Графикон бр. 26. Експресија гена за транспортер *ABCA1* у мозгу током огледа



Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација.

*, $p < 0,05$ у односу на контролне мишеве 42. дана.

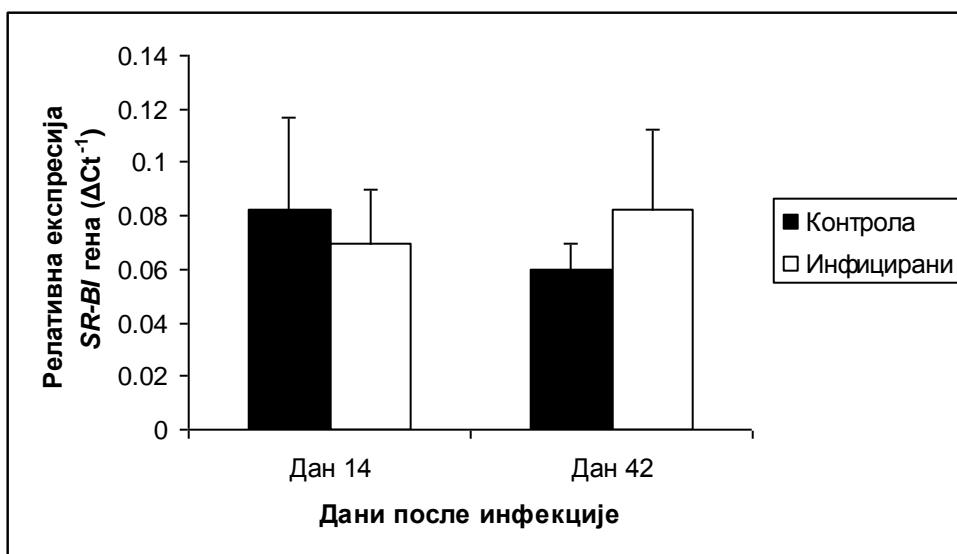
Дана 14 после инфекције не постоји статистички значајна разлика у експресији *ABCA1* у мозгу, али се 42. дана запажа да инфицирани мишеви имају значајно већу експресију гена за *ABCA1* у односу на контролне животиње (Графикон бр. 26), ($p < 0,05$).

Овај резултат указује на повећан транспорт холестерола у мозданом ткиву 42. дана након инфекције паразитом *T. gondii*.

4.8.2.3 Експресија гена за *HDL* рецептор (*SR-BI*) у мозгу

С обзиром на промене у метаболизму *HDL*-а код инфицираних мишева, анализирали смо експресију *SR-BI* рецептора, као главног рецептора за *HDL* у ткиву мозга.

Графикон бр. 27. Експресија гена за *SR-BI* рецептор у мозгу током огледа



Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација.

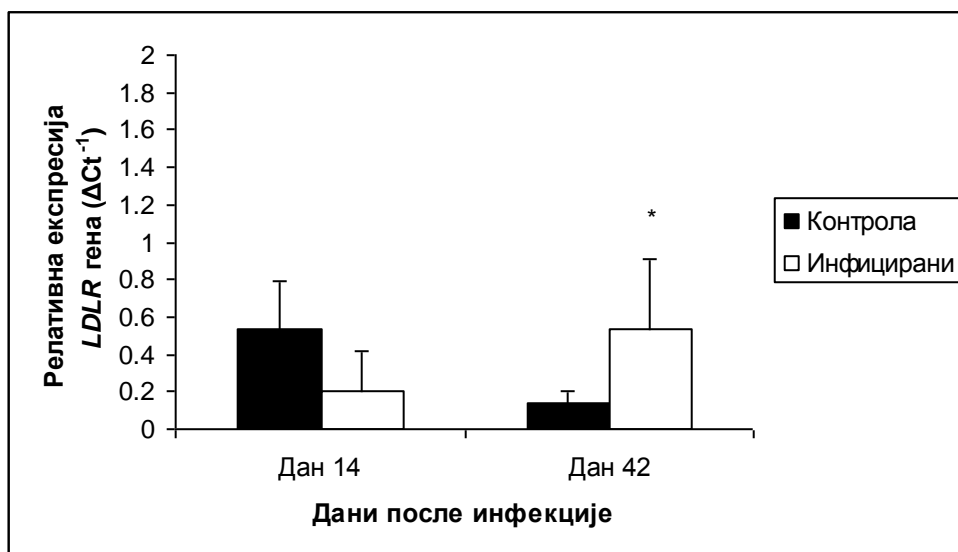
Не постоји статистички значајна разлика у експресији гена за *SR-BI* рецептор у мозгу између инфицираних и контролних мишева (Графикон бр. 27), током огледа ($p > 0,05$).

Овај резултат указује да експериментална инфекција није утицала на експресију гена за *SR-BI* рецептор у мозгу, током огледа.

4.8.2.4 Експресија гена за *LDL* рецептор (*LDLR*) у мозгу

Поред јетре, експресију *LDLR*-а смо анализирали и у мозданом ткиву инфицираних животиња.

Графикон бр. 28. Експресија гена за *LDLR* у мозгу током огледа



Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација.

*, $p < 0,05$ у односу на контролне мишеве 42. дана.

Дана 14 после инфекције не постоји статистички значајна разлика у експресији *LDLR* у мозгу, али 42. дана инфицирани мишеви имају статистички значајно већу експресију гена за *LDLR* у односу на контролне животиње (Графикон бр. 28), ($p < 0,05$).

Овај резултат указује на повећано преузимање серумског холестерола посредством *LDLR*-а од стране мозданог ткива 42. дана након инфекције паразитом *T. gondii*.

5 ДИСКУСИЈА

Липиди представљају једну од три групе органских молекула који су основа свих живих система. Док су беланчевине највећим делом градивне структуре а угљени хидрати основни извор енергије, липиди могу имати и једну и другу улогу. Међу липидима се због своје своје сложене структуре из које проистиче и његов биолошки значај, издваја холестерол са великим бројем функција како у физиолошким тако и патофизиолошким процесима. Његова важност је уочена и у истраживањима патогенезе токсоплазмозе, која су показала да је за успешну инвазију овог паразита неопходно присуство холестерола из ћелије домаћина, јер га сам паразит не може синтетисати (Coppens и сар., 2000; Coppens и Joiner, 2003). Из тог разлога смо се и одлучили да испитамо утицај инфекције паразитом *T. gondii* на липидни метаболизам домаћина.

У нашем истраживању, најочљивија промена липидног метаболизма код инфицираних животиња био је пад серумског *HDL*-а и следствено томе пад укупног серумског холестерола, почев од 14. дана након инфекције, који се одржавао све до 42. дана. Промена укупног серумског холестерола и *HDL*-а је негативно корелирала са степеном инфекције инфицираних мишева, израженом преко броја циста паразита у мозгу. Поред тога посматрајући појединачне животиње, овај пад укупног холестерола и *HDL*-а је био директно сразмеран броју циста у мозгу инфицираних животиња 42. дана после инфекције. С друге стране, промене на нивоу серумског *LDL*-а, триглицерида, аполипопротеина А-I и аполипопротеина Б-100 нису уочене у било ком тренутку након експерименталне инфекције. Поред тога није уочена ни повезаност серумских липида и пречника измерених циста у мозгу инфицираних животиња.

Анализирајући ткиво, односно експресију гена у јетри и мозгу инфицираних животиња, уочено је да долази до пада експресије *HDL* рецептора и аполипопротеина А-I 14. дана након инфекције у јетри и пораста експресије *LDL* рецептора 42. дана након инфекције у мозгу. Поред тога, 42. дана) у мозгу инфицираних животиња, дошло је до пораста и експресије гена ензима за синтезу холестерола (*HMG-CoA* редуктаза) као и мембранског транспортног протеина за холестерол (*ABCA1*).

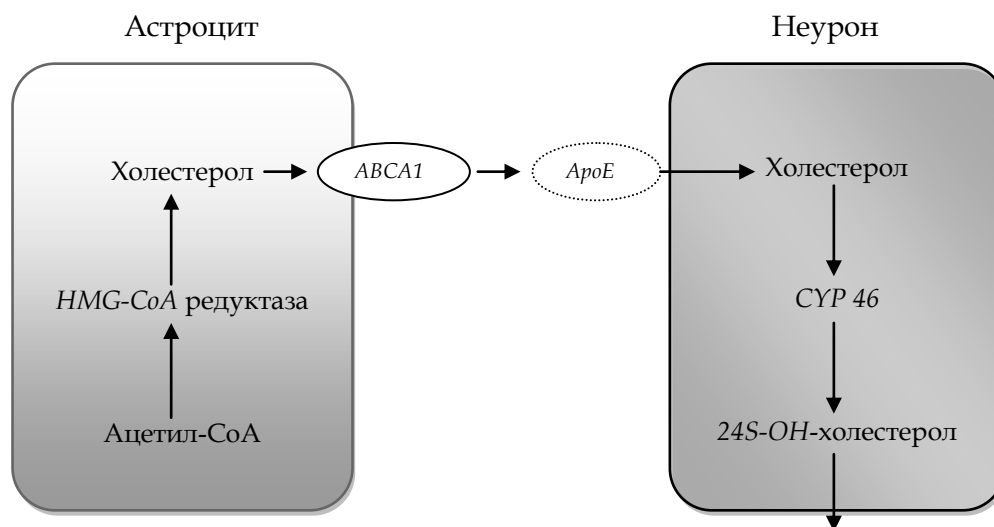
Холестеролски метаболизам у ћелијама сисара се са физиолошког становишта може поделити на директни холестеролски транспорт, којима се масти транспортују од јетре до периферних ткива путем *VLDL*-а и *LDL*-а и реверзни холестеролски транспорт, којим се преко *HDL*-а вишак холестерола из периферних ткива враћа у јетру, где се даље метаболише (Слика бр. 1, страна 12), (Fielding CJ и Fielding PE, 1995). Имајући то у виду, пад серумског *HDL*-а и укупног холестерола у нашем истраживању указује на снижење реверзног холестеролског транспорта код инфицираних животиња. Код пацијената инфицираних *P. falciparum*-ом (Chukwuocha и сар., 2011) и као код нормалних мишева инфицираних са *S. mansoni* (Doenhoff и сар, 2002) и *T. cruzi* (Sunnemark и сар., 2000) показано је снижења укупног холестерола што се слаже са резултатима нашег истраживања. Овакава пад се објашњава преузимањем холестерола домаћина од стране паразита за сопствени раст и развој. Поред тога у експерименталним моделима инфекција са *P. falciparum*-ом (Nilson и Nilson, 1990) и *S. mansoni* (Doenhoff и сар, 2002) је додатно показано и снижење серумског *HDL*-а што смо ми такође показали и индивидуалним праћењем инфицираних животиња. Штавише, индивидуални пад укупног холестерола и *HDL*-а је био пропорционалан степену инфективности животиње, израженим кроз број циста и мозгу, па се може рећи да је холестерол који *T. gondii* користи у облику *HDL*-а (Milovanovic

и сар, 2009). Потврда специфичности пада *HDL*-а је и непромењен ниво *CRP*-а, маркера одговора акутне фазе (Sabana и сар., 1989) као и непромењена концентрација адипонектина који позитивно корелира са нивоом *HDL*-а (Rajala и Scherer, 2010). Зато се може рећи да пад *HDL*-а у серуму код инфицираних животиња није последица неспецифичног одговора организма на инфекцију, нити је хормонски посредован, већ је узрокован паразитом и његовом потребом за холестеролом који преузима од ћелије домаћина.

Поред серума, елементи реверзног холестеролског транспорта су се променили и у ткиву јетре што је показано падом експресије *SR-BI* рецептора и *Apo A-I*. Наиме, обзиром да регулација експресије *SR-BI* рецептора у јетри зависи од нивоа холестерола у јетри и у серуму (Ji и сар., 1999), снижење серумског *HDL*-а и смањена експресија рецептора који га уклања из серума (*SR-BI*) код инфицираних мишева указују на смањену разградњу холестерола у јетри. Овоме у прилог говори и снижење експресије *Apo A-I* протеина у јетри, који указује на смањено формирање *HDL*-а (Fielding и сар., 2000). Као крајњи резултат, смањена је и синтеза и преузимање *HDL*-а у јетри, чиме се снижава холестеролски прилив у јетру због повећане потребе за холестеролом у периферним ткивима, пре свега мозгу.

У нашем истраживању је промена елемената холестеролског метаболизма показана и мозгу али 4 недеље касније у односу на јетру. Наиме, 42. дана од инфекције је дошло до пораста експресије ензима за синтезу холестерола *HMG-CoA* редуктазе и мембранског транспортера за холестерол *ABCA1*. Количина холестерола у мозгу је резултанта његове синтезе посредством *HMG-CoA* редуктазе и његове разградње посредством *CYP 46* ензима (Dietschy и Turley, 2001). Поред тога, синтеза холестерола се у адултном периоду одвија првенствено у астроцитима (Kopre и сар., 1984; Saito и сар., 1987), док неурони немају ту способност (Dietschy и сар., 1983). С

обзиром на то да је холестерол потребан како астроцитима, олигодендроцитима тако и неуронима, његов транспорт обављају протеини који пребацују синтетисан холестерол из астроцита у неуроне, где се он користи као градивна материја (Xu и сар., 2000; Wahrle и сар., 2004) (Слика бр. 3). Међу овим мембранским протеинима свакако је један од најзначајних *ABCA1*, који је локализован у ћелијској мембрани астроцита и омогућава пребацување холестерола на неуроне преко аполипопротеина Е (Wahrle, и сар. 2004). Чињеница да *T. gondii* индукује повећану синтезу холестерола преко *HMG-CoA* редуктазе показана је у *in vitro* условима (Blader и сар., 2001), што је објашњено повећаном потребом паразита за холестеролом. Поред тога, повећана експресија *ABCA1* у мозгу инфицираних животиња представља комплементаран резултат *in vitro* студији која је показала важност транспортера *ABCB1* у преузимању холестерола од стране *T. gondii* (Bottova и сар., 2009). Наиме, *ABCB1* (Р-гликопротеин) представља један од главних протеина којима паразит преузима холестерол од ћелије домаћина за сопствене метаболичке потребе. Имајући у виду да се развој циста *T. gondii* у мозгу одиграва интрацелуларно и то пре свега у неуронима (Halonen и сар., 1996), можемо закључити да под утицајем паразита долази до повећаног транспорта холестерола са астроцита на неуроне (Слика бр. 2). Непромењена активност *SR-BI* рецептора у мозгу инфицираних животиња у односу на контролне се може објаснити његовом пре свега васкуларном локализацијом (Husemann и Silverstein, 2001), тј. физичком удаљеношћу од самог паразита, па стога можемо рећи да активност *SR-BI* рецептора није ни значајна за преузимање холестерола. Повећање експресије ензима за синтезу холестерола као и транспортера за холестерол у нашим *in vivo* условима, показује значајно повишен интензитет метаболизма холестерола у мозгу инфицираних животиња, који треба да задовољи потребе паразита.



Слика бр. 3. Схема холестеролског метаболизма у мозгу

(Модификовано из Björkhem I and Meaney S., *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 2004, 24:806-815.)

ABCA1 – АТФ везујући касетни протеин 1; *ApoE* – аполипопротеин Е; *CYP 46* – цитохром П 450 оксидаза; 24S-OH холестерол – 24 хидроксид холестерол.

Узимајући у обзир резултате холестеролског метаболизма на нивоу серума и ткива, можемо рећи да под дејством *T. gondii* долази до орган специфичне промене у динамици реверзног холестеролског транспорта. Наиме, због повећане потребе паразита за холестеролом (Sonda и сар. 2001) у првим недељама после инфекције долази до трајног пада серумског *HDL*-а, који је показатељ смањења реверзног холестеролског транспорта ка јетри, јер периферна ткива немају вишка холестерола, већ је напротив холестеролски метаболизам на периферији повећан. У инфекцији паразитом *T. gondii* главно периферно ткиво је мозак, као једно од предилекционих места у коме се паразит размножава, и он има интензиван холестеролски метаболизам. Повећање интензитета холестеролског метаболизма је показано повећањем производње холестерола у астроцитима и повећаним транспортом ка инфицираним неуронима у каснијим фазама инфекције. На овај начин

паразит и локалним и системским ефектима, у различитим фазама инфекције, обезбеђује довољну количину холестерола можданом ткиву за сопствени раст и развој.

Посматрајући директан холестеролски транспорт, можемо рећи да се он током инфекције у нашим огледима није значајније мењао. Наиме, у нашим огледима на нивоу серума након експерименталне инфекције нисмо уочили промене ни серумског *LDL*-а и триглицерида, нити аполипопротеина Б-100 као главног протеина *LDL* честице. Осим тога, нисмо нашли било какву повезаност серумског *LDL*-а и триглицерида са бројем и пречником циста у мозгу инфицираних животиња, као ни ткиву промену аполипопротеина Б-100 и *LDL* рецептора на нивоу јетре. Ови резултати се разликују од резултата претходних студија спроведеним на *ApoE knock-out* мишевима који су показали снижење серумског *VLDL*-а и *LDL*-а након експерименталне инфекција цистогеним сојем *T. gondii* и тиме потврдили потрошњу холестерола од стране паразита (Portugal и сар. 2004, и 2008). Разлика између наших и њихових резултата се може приписати разлици у коришћеним експерименталним моделима. У њиховом моделу су коришћени мишеви чији је највећи део серумског холестерола био у форми *LDL*-а, док је у нашем моделу у коме смо користили генетски неизмењене (*wild-type*) мишеве, највећи део серумског холестерола био у форми *HDL*-а док је ниво *LDL*-а врло низак (Lizenko и сар. 2008). Из тог разлога, а с обзиром на већ раније познату чињеницу да *T. gondii* преузима холестерол од ћелије домаћина (Coppens и Joiner 2003), може се рећи да паразит преузима холестерол из серума у облику, *HDL*-а или *LDL*-а а у зависности од тога који облик доминира у серуму домаћина. Поред тога у нашем моделу је 42. дана дошло до пораста експресије *LDL* рецептора у мозгу што се слаже са резултатима других студија (Coppens и сар. 2000; Portugal и сар. 2008) које су показале улогу *LDL*-а у

преузимању холестерола од стране паразита. Могуће је да се у нашем експерименталном моделу неки елементи директног холестеролског транспорта (*LDLR*) укључују касније, када реверзани транспорт више не може да задовољи потребе паразита за холестеролом.

Пречник циста, заједно са бројем циста изража оптерећење (*burden*) јединке инфекцијом (Dubey, 1996). У нашем истраживању неповезаности серумских липида и пречника циста се може објаснити великом варијабилношћу броја брадизоита у цистама, коју су показали бројни истраживачи (Dubey и сар., 1998). Из разлога велике варијабилности броја брадизоита, није могуће констатовати повезаност између серумских липида и пречника циста. Поред тога, у нашем истраживању се просечна вредност пречника циста кретала од 19,3 до 25,8 μm са максималним дијаметром од 35 μm што се слаже са резултатима других истраживача (Ferguson и Hutchison 1987; Dubey, 1996) који су добили просечан дијаметар од 30 μm , 28-ог односно 72-ог дана од инфекције.

Из свега наведеног се може рећи да паразит ради задовољења сопствених потреба за холестеролом мења реверзни холестеролски транспорт домаћина и повећава производњу холестерола у мозгу инфицираних животиња, показујући тиме утицај на физиолошке путеве холестерола домаћина, како на локалној тако и на системској равни.

6 ЗАКЉУЧАК

На основу изложених резултата истраживања, показано је да *T. gondii* ради задовољења сопствених потреба за холестеролом доводи до значајних промена липидног метаболизма домаћина. Најзначајније су:

- смањење реверзног холестеролског транспорта, и то преко смањења транспорта *HDL*-а од мозга ка јетри и смањеног стварања *HDL*-а у јетри у акутној инфекцији, које је сразмерно тежини инфекције,
- повећање директног холестеролског транспорта показано на нивоу ткива (мозга) преко преузимања холестерола путем *LDL* рецептора у време конверзије инфекције у хроничитет и,
- повећање интензитета холестеролског метаболизма у мозгу преко повећане продукције и транспорта холестерола од астроцита ка инфицираним неуронима.

Смањење реверзног а повећање директног холестеролског транспорта представљају значајне патофизиолошке промене у организму домаћина узроковане инфекцијом *T. gondii*. Ове промене повећавају доступност холестерола у периферним ткивима, пре свега мозгу као предилекционом месту стварања паразитских циста. Да се под утицајем инфекције повећана потрошња холестерола у мозгу показују изложени резултати о корелацији пада реверзног холестеролског транспорта са повећањем броја циста у мозгу *wild type* мишева. Осим што приказани резултати показују значај липида у патогенези инфекције паразитом *T. gondii*, они најављују и могућност да елементи липидног метаболизма могу бити терапијска места деловања лекова против *T. gondii*.

7 ЛІТЕРАТУРА

- Anderson, R.G.W., Goldstein, J.L, Brown, M.S. (1976). Localization of low density lipoprotein receptor on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in cells from a familial hypercholesterolemia homozygote. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:2434-2438.
- Azzouz, N., Rauscher, B., Gerold, P., Cesbron-Delauw, M.F., Dubremetz, J.F., and Schwarz, RT. (2002). Evidence for de novo sphingolipid biosynthesis in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 32:677-6784.
- Bahl, A., Davis, P.H., Behnke, M., Dzierszynski, F., Jagalur, M., Chen, F., Shanmugam, D., White, M.W., Kulp, D., and Roos, D.S. (2010). A novel multifunctional oligonucleotide microarray for *Toxoplasma gondii*. *BMC Genomics* 11: 603.
- Baptisa, J.L., Vervoort, T., Vander, S.P., Wery, M. (1996). Changes in plasma lipid levels as a function of *Plasmodium falciparum* infection in Sao Tome. *Parasite* 3:335-40.
- Blader, I.J., Manger, I.D. and Boothroyd, J.C. (2001). Microarray analysis reveals previously unknown changes in *Toxoplasma gondii*-infected human cells. *J Biol Chem* 276(24): 223-24231.
- Bottova, I., Hehl, A.B., Stefanic, S., Fabrias, G., Casas, J., Schrane, R E., Pieters, J., and Sabrina, S. (2009). Host cell P-glycoprotein is essential for cholesterol uptake and replication of *Toxoplasma gondii* *J Biol Chem* 284(26): 17438-17448.
- Cerede, O., Dubremetz, JF., Soete, M., Deslee, D., Vial, H., Bout, D., and Lebrun, M.(2005). Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. *J Exp Med* 201:453-463.

- Charron, A.J., and Sibley, L.D. (2002). Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* 115:3049-3059.
- Chaudhary, K. and Roos, D.S. (2005). Protozoan genomics for drug discovery. *Nature Biotech* 23:1089-91.
- Chukwuocha, U.M., Eke, K.N. (2011). Malaria parasite status and cholesterol level of malaria patients in parts of the IMO River Basin of Nigeria. *Asian Pac J Trop* 4(12):993-6.
- Coppens, I., and Joiner, K.A. (2003). Host but not parasite cholesterol controls *Toxoplasma* cell entry by modulating organelle. *Mol Bio Cell* 14:3804-20.
- Coppens, I., Sinai AP, Joiner KA (2000). *Toxoplasma gondii* exploits host-low density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition. *J Cell Biol* 149(1):167-180.
- Dai, W., Pan, H., Kwok, O. and Dubey, J.P. (1994). Human indoleamine 2,3-dioxygenase inhibits *Toxoplasma gondii* growth in fibroblast cells. *J Interferon Res* 14:313-317.
- Dietschy, J.M., Kita, T., Suckling, K.E., Goldstein, J.L., Brown, M.S. (1983), Cholesterol synthesis in vivo and in vitro in the WHHL rabbit, an animal with defective low density lipoprotein receptors. *J Lipid Res* 24:469-480.
- Dietschy, J.M., Turley, S.D. (2001). Cholesterol metabolism in brain. *Curr Opin Lipidol* 12:105-112.
- Djurković-Djaković O, Klun I, Khan A, Nikolić A, Knežević-Ušaj S, Bobić B, Sibley LD (2006). A human origin type II strain of *Toxoplasma gondii* causing severe encephalitis in mice. *Microbes Infect* 8:2206-2212.
- Djurkovic-Djakovic, O., Milenkovic, V., Nikolic, A., Bobic, B. and Grujic, J. (2002). Efficacy of atovaquone combined with clindamycin against murine

infection with a cystogenic (Me49) strain of *Toxoplasma gondii*. *J Antimicrob Chemother* 50:981-987.

- Doenhoff, M.J., Stanley, R.G., Griffiths, K., Jackson, C.L. (2002). An antiatherogenic effect of *Schistosoma mansoni* infections in mice associated with a parasite-induced lowering of blood total cholesterol. *Parasitology* 125: 415-421.
- Dorđević, V.B. (2006). Metabolizam masti. U: Biohemija. Savremena administracija, Beograd, str. 342-408.
- Dubey, J. P., Lindsay D.S., and Speer C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 11(2):267-299.
- Dubey, J. P. 1996. Pathogenicity and infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts for rats. *J Parasitol* 82:951-956.
- Ferguson, D. J. P., and W. M. Hutchison. 1987. An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. *Parasitol. Res* 73:483-491.
- Fielding, C.J., and Fielding, P.E. 1995. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 36:211-228.
- Fielding, C.J., Fielding, P.E. (1995). Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 36:211-228.
- Fielding, P.E., Nagao, K., Hakamata, H., Chimini, G., Fielding, C.J. (2000). A two-step mechanism for free cholesterol and phospholipid efflux from human vascular cells to apolipoprotein A-1. *Biochemistry* 39:14113-14120.
- Fleige, T., Fischer, K., Ferguson, D.J., Gross, U., and Bohne, W. (2007) Carbohydrate metabolism in the *Toxoplasma gondii* apicoplast: localization of three glycolytic isoenzymes, the single pyruvate dehydrogenase complex, and a plastid phosphate translocator. *Eukaryot Cell* 6:984-996.

- Fleige, T., Pfaff, N., Gross, U., and Bohne, W. (2008) Localisation of gluconeogenesis and tricarboxylic acid (TCA)-cycle enzymes and first functional analysis of the TCA cycle in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 38: 1121-1132.
- Frenkel, J.K. (1973). *Toxoplasma* in and around us. *BioScience* 23:343-352.
- Friedewald, W.T., Levy, R.I., Fredrickson, D.S. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18:499-502
- Fulton, J.D. and Spooner, D.F. (1960). Metabolic studies on *Toxoplasma gondii*. *Exp Parasitol* 9:293-301.
- Ginger, M.L. (2006) Niche metabolism in parasitic protozoa. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:101-118.
- Grellier, P., Rigomier, D., Clavey, V., Fruchart, J.C., Schrevel, J. (1991). Lipid traffic between high density lipoproteins and *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *J Cell Biol* 112:267-77.
- Gupta, N., Zahn, M.M., Coppens, I., Joiner, K.A., and Voelker, D.R. (2005) Selective disruption of phosphatidylcholine metabolism of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* arrests its growth. *J Biol Chem* 280: 16345-16353.
- Halonen, S.K., Lyman, W.D., Chiu, F.C. (1996). Growth and development of *Toxoplasma gondii* in human neurons and astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:1150-1156.
- Hardardóttir, I., C. Grunfeld, and K. R. Feingold. 1995. Effects of endotoxin on lipid metabolism. *Biochem Soc Trans* 23:1013-1018.
- Howe, D.K., and Sibley, L.D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 172 (6):1561-1566.

- Husemann, J., Silverstein, S.C. (2001). Expression of scavenger receptor class B, type I, by astrocytes and vascular smooth muscle cells in normal adult mouse and human brain and in Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol* 158: 825–832
- Huynh, M.H., Rabenau, K. E., Harper, J.M., Beatty, W.L., Sibley, L.D., and Carruthers, V.B. (2003). Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex, *EMBO J* 22:2082-2090.
- Ji, Y., Wang, N., Ramakrishnan, R., Sehayek, E., Huszar, D., Breslow, J.L., Tall, A.R. (1999). Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile. *J Biol Chem* 274:33398–33402.
- Jones, J.L., Kruszon-Moran, D., Sanders-Lewis, K., and Wilson, M. (2007) *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999–2004, decline from the prior decade. *Am J Trop Med Hyg* 77: 405-410.
- Kertula, Y., and Weber, T.H. (1986). Serum lipids in viral and bacterial meningitis. *Scand J Infec Dis* 18 (3):211-215.
- Khovidkuht, W., Min-Sun, K., Memon, R.A., Shingenaga, J.K., Moser, A.H., Feingold, K.R., Grunfeld, C. (2004). Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *Journal of Lipid Research* 45:1169-1186.
- Kopre, J.W., Zeinstra, E.C., Lopes-Cardozo, M., van Golde, L.M. (1984). Acetoacetate and glucose as substrates for lipid synthesis by rat brain oligodendrocytes and astrocytes in serum-free culture. *Biochim Biophys Acta* 796:20-26.

- Lauer, S. и сар. (2000). Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection. *EMBO J* 19:3556–3564.
- Laurila, A., Bloigu, A., Nayähä, S., Hassi, J., Leinonen, M., Saikku, P. (1999). Association of *Helicobacter pylori* infection with elevated serum lipids *Atherosclerosis* 142:207–210.
- Lepšanović Lj. (1997). Savremena shvatanja o ulozi masnih kiselina u ishrani. *Med Pregl* 50:341-344.
- Lepšanović, L., Lepšanović, Lj (2000). Klinička lipidologija. Savremena administracija, Beograd 2000: стр. 9-57.
- Liberopoulos, E., Apostolou, F., Eisaf, M. (2004). Serum lipid profile in patients with severe leptospirosis. *Nephrol Dial Transplant* 19(5): 1328-1329.
- Lizenko, M.V., Regerand, T.I., Bakhirev, A.M., and Lizenko, E.I. (2008). Comparative biochemical analysis of lipids of blood serum-lipoproteins of human and some animal species. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 44 (5):581-590.
- Mahley, R.W., Innerarity, T.L. (1983). Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. *Biochem Biophys Acta* 737:197-222.
- Milovanovic, I., Vujanic, M., Klun, I., Bobic B., Nikolic, A., Ivovic, V., Trbovich, A.M., Djurkovic-Djakovic, O. (2009). *Toxoplasma gondii* infection induces lipid metabolism alterations in the murine host. *Mem I Oswaldo Cruz* 104 (2):175-178.
- Mordue, D.G., Hakansson, S., Niesman, I., and Sibley, L.D. (1999) *Toxoplasma gondii* re-sides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Exp Parasitol* 92:87-99.
- Nicolle, C. and Manceaux, L. (1909). Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C R Seances Acad Sci* 148:369–372.

- Nilson, E.I., and Nilson, E.P. (1990). Changes in plasma lipoproteins in acute malaria. *J Intern Med* 227:151-55.
- Parthasarathy, S., Barnett, J., Fong, L.G. (1990). High density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low density lipoprotein. *Biochem Biophys Acta* 1044:275-283.
- Portugal, L.R., Fernandes, L.R., Cesar, G.C., Santiago, H.C., Oliveira, D.R., Silva, N.M., Silva, A.A., Lannes-Vieira, J., Arantes, R.M.E., Gazzinelli, R.T., Alvarez-Leite, J.I. (2004). Infection with *Toxoplasma gondii* increases atherosclerotic lesion in ApoE-deficient mice. *Infect Immun* 72: 3571-3576.
- Portugal, L.R., Fernandes, L.R., Pietra Pedrosa, и cap. (2008). Influence of low-density lipoprotein (LDL) receptor on lipid composition, inflammation and parasitism during *Toxoplasma gondii* infection. *Microbes Infect* 10(3):276-284
- Quittnat, F., Nishikawa, Y., Stedman, TT., и cap (2004). On the biogenesis of lipid bodies in ancient eukaryotes: synthesis of triacylglycerols by a *Toxoplasma* DGAT1-related enzyme. *Mol Biochem Parasitol* 138:107-122.
- Rajala, M.W., and Scherer, P.E. (2010). Minireview: The Adipocyte-at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 144 (9):3765-3773.
- Saito, M., Benson, E.P., Rosenberg, A. (1987). Metabolism of cholesterol and triacylglycerol in cultured chick neuronal cells, glial cells, and fibroblasts: accumulation of cholesterol in serum-free culture. *J Neurosci Res* 18:319-325.
- Schonfeld G. Inherited disorders of lipid transport. In: Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, Lipid Disorders (LaRosa JC, guest editor), Saunders, Philadelphia-London-Toronto-Montreal-Sydney-Tokyo 1990; 19:229-257.

- Schwab, J.C., Beckers, C.J., and Joiner, K.A. (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:509-513.
- Sehagal, A., Bettioli, S., Wenk, M.R., Pypaert, M., Kaasch, A., Blader, I., и cap. (2005). Peculiarities of host cholesterol transport to the unique intracellular compartment containing *Toxoplasma gondii*. *Traffic* 6:1-17.
- Sibley, L.D. (1995). Invasion of vertebrate cells by *Toxoplasma gondii*. *Trends Cell Biol* 5:129-132.
- Sibley, L.D., Boothroyd, J.C. (1992). Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359:82-5.
- Sonda, S., Ting, L.M., Novak, S., Kim, K., Maher, J.J., Farese, R.V., Ernst, J.D. (2001). Cholesterol esterification by host and parasite is essential for optimal proliferation of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 276:34434-40.
- Stein, E.A. (1986). Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. In: Textbook of clinical chemistry. Norbert W. Tietz (editor). W.B.Sounders Company.
- Sunnemark, D., Harris, R.A., Frostegård, J., Örn, A. (2000). Induction of early atherosclerosis in CBA/J mice by combination of *Trypanosoma cruzi* infection and a high cholesterol diet. *Atherosclerosis* 153:273-282.
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., and Weiss, L.M. (2000) *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30:1217-1258.
- Thompson, G.R. (1990). A Handbook of Hyperlipidemia, MSD, Current Science, London. 23-41.
- van der Waaij, D. (1959). Formation, growth and multiplication of *Toxoplasma gondii* cysts in mouse brains. *Trop Geogr Med* 11:345-360.
- Vance, J.E. and Vance, D.E. (2004). Phospholipid biosynthesis in mammalian cells. *Biochem Cell Biol* 82:113-128.

- Wahrle, S.E., Jiang, H., Parsadanian, M., Legleiter, J., Han, X., Fryer, J.D., Kowalewski, T., Holtzman D. M. (2004), ABCA1 is required for normal central nervous system ApoE levels and for lipidation of astrocyte-secreted apoE. *J Biol Chem* 279:40987–40993.
- White, S.W., Zheng, J., Zhang, Y.M., and Rock, C.O. (2005). The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Biochem* 74:791–831.
- Xu, Q., Li, Y., Cyras, C., Sanan, D.A., Cordell, B. (2000). Isolation and characterization of apolipoproteins from murine microglia. Identification of a low density lipoprotein-like apolipoprotein J-rich but E-poor spherical particle. *J Biol Chem* 275:31770–31777.
- Yoshikawa, H., Kimata, I., Iseki, M. (1997): Heterogenous distribution of membrane cholesterol at the attachment site of *Cryptosporidium muris* to host cells. *J Eukaryot Microbiol* 44:454-56.
- Ђурковић-Ђаковић О. (1998). Токсоплазма и имуносупресија. *Срп Арх Целок Лек* 126:197-203.
- Ђурковић-Ђаковић, О. (1997). Токсоплазмоза: близу или далеко од ефикасне контроле? У: О. Ђурковић-Ђаковић (уред.). Биомедицинска наука на прагу новог миленијума. САНУ и Институт за медицинска истраживања, Београд стр.117-124.

БИОГРАФИЈА АУТОРА

- Др Иван (Драгољуб) Миловановић је рођен 1976. год. у Крагујевцу, Србија, где је завршио основну и средњу школу.
- Дипломирао на Медицинском факултету у Београду, 2002. год. са просечном оценом 9,56.
- Магистрирао на Медицинском факултету у Београду, 2006. год. са тезом: *Липидни статус и цитохемијско одређивање липида у импринтима атеросклеротичног каротидног плака.*
- У 2000. год. студент стипендиста Амбасаде Краљевине Норвешке.
- У периоду од 2002-2004. год стипендиста Министарства за науку и технолошки развој, Републике Србије.
- У октобру месецу 2011, стипендиста *ÖeAD* фондације, Владе Републике Аустрије.
- Од 2002-2003.год. лекар стажиста ИКВБ Дедиње у Београду.
- Од 2004 до 2007. год запослен на Институту за патолошку физиологију, Медицинског факултета у Београду, у звању асистента-приправника.
- Од 2007 до данас, запослен на Институту за патолошку физиологију, Медицинског факултета у Београду, у звању асистента.
- Изабрани објављени радови:
 1. Djordjevich DM, De Luka SR, Milovanovich ID, Jankovic S, Stefanovic S, Veskovic-Moracanin S, Cirkovic S, Ilic AZ, Risitic-Djurovic JL, Trbovich AM. Hematological parameters changes in mice subchronically exposed to static magnetic fields of different orientations. *Ecotox Environ Safe* 2012 81: 98-105. ISSN 0147-6513, **M21**, IF 2,718 .
 2. Milovanovic I, Vujanic M, Klun I, Bobic B, Nikolic A, Ivovic V, Trbovich A, Djurković-Djakovic O. *Toxoplasma gondii* infection induces lipid metabolism alterations in the murine host. *Mem I Oswaldo Cruz* 2009; 104 (2):175-178. ISSN 0074-0276, **M22**, IF 2,097.
 3. Stojisic J, Milovanovic I, Milenkovic B. Lung cancer in women: histological type and patient's age from 1985 to 2005. *Med Oncol* 2009; 26:265-268. ISSN 1357-0560, **M23**, IF 1,227.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ЛИПИДНИ МЕТАБОЛИЗАМ ДОМАЦИНА У
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОЈ ТОКСОПЛАЗМОЗИ

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 21.06.2012.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Иван Милосављевић

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада Питвања штељивости финансија у Београдској Технолошкој

Ментор Др. др Александар Ђуковић
НС др Оливера Ђуковић - Ђуковић

Потписани _____

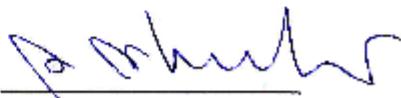
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 21.06.2012



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Дипломна магистарска дисертација у области лингвистике
Терминологија

које је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 21. 06. 2012.

