

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ljupka N. Gligorovska

**METABOLIZAM LIPIDA I SIGNALNI PUT
GLUKOKORTIKOIDA U VISCERALNOM
MASNOM TKIVU I JETRI *Mif*^{-/-} MIŠEVA NA
REŽIMU ISHRANE OBOGAĆENE
FRUKTOZOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2022.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ljupka N. Gligorovska

**THE LIPID METABOLISM AND
GLUCOCORTICOID SIGNALING IN VISCERAL
ADIPOSE TISSUE AND LIVER OF *Mif*^{-/-} MICE
ON FRUCTOSE ENRICHED DIET**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022.

MENTOR:

Dr Ana Đorđević, naučni savetnik,
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, Srbija

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Goran Brajušković, redovni profesor,
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija

Dr Đorđe Miljković, naučni savetnik,
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, Srbija

Dr Biljana Bursać, viši naučni saradnik,
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, Srbija

Datum odbrane:

Zahvalnica

Veliku zahvalnost dugujem mojoj mentorki, **dr Ani Đorđević**, koja je bila velika podrška i verovala u mene, nesebično delila svoje savete, znanje i vreme tokom izrade ove teze. Hvala puno za nepresušnu energiju, kreativnost, inspiraciju, optimizam, strpljenje i razumevanje kada mi je to bilo najpotrebnije i u najtežim trenucima.

Prof. **dr Gordani Matić** dugujem veliku zahvalnost što me je primila u svoj tim, na ukazanom poverenju, velikoj podršci i korisnim savetima tokom izrade ove disertacije.

Hvala puno **dr Đorđu Miljkoviću** na podršci, izdvojenom vremenu i korisnim savetima prilikom izrade ove disertacije, na ukazanom poverenju i pruženoj prilici na početku karijere.

Zahvaljujem se prof. **dr Goranu Brajuškoviću** na korisnim savetima i prijatnoj saradnji tokom pisanja ove doktorske disertacije.

Mojoj **Biljiti (dr Biljana Bursać)** dugujem veliku zahvalnost za rukovođenje delom teze koji se odnosi na masno tkivo i jer sam sa njom napravila svoje prve eksperimentalne korake. Hvala za prijateljstvo, što je bila moja podrška i oslonac tokom izrade ove disertacije i što je nesebično delila svoje znanje, vreme i energiju sa mnom. Bila je moj "wingman" tokom ovog maratona.

Zahvaljujem se puno **dr Ani Teofilović** za veliku pomoć u eksperimentalnom radu, na podršci, rečima ohrabrenja, korisnim savetima i što je delila svoju energiju i vreme sa mnom.

Koleginicama **dr Danijeli Vojnović Milutinović, dr Nataši Veličković, dr Jeleni Nestorov, dr Marini Nikolić, Bojani Mičić** i kolegi **Milošu Vratariću** hvala za pomoć u eksperimentalnom radu, za korisne savete i podršku.

Zahvaljum se puno mojoj prijateljici i koleginici, **dr Sanji Kovačević**, za veliku pomoć tokom izrade ove disertacije, za podršku, smeh i razgovore. Hvala za sve što smo delile!

Zahvaljujem se mojim prijateljima, **Mariji, Sofiji, Bokiju, Maretu, Sonji, Anji, Maraji, Mikiju i Nikoli**. Hvala vam za divne trenutke, smeh, podršku i ljubav. Sa vama je sve bilo lakše i lepše!

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, roditeljima **Ljiljani i Nikoli**, sessi **Nini** i mojim dečacima, **Zvekiju i Bogdalencetu**. Hvala vam za svu ljubav, podršku, razumevanje i veru u mene. Bili ste mi oslonac i vetar u jedra. Ovaj rad posvećujem vama!

Metabolizam lipida i signalni put glukokortikoida u visceralnom masnom tkivu i jetri *Mif*^{-/-} miševa na režimu ishrane obogaćene fruktozom

SAŽETAK

Faktor inhibicije migracije makrofaga (MIF) jedan je od glavnih pro-inflamatornih citokina sa ulogom u metaboličkoj inflamaciji. Metabolička inflamacija niskog intenziteta u visceralnom masnom tkivu i jetri povezana je sa gojaznošću i dislipidemijom - metaboličkim poremećajima koji su često izazvani ishranom obogaćenom fruktozom i predstavljaju faktore rizika za razvoj dijabetesa tipa 2.

Cilj ove doktorske disertacije bio je da se utvrdi da li MIF ostvaruje svoj uticaj na lipidni metabolizam u masnom tkivu i jetri posredstvom glukokortikoidnih hormona (GH), važnih regulatora energetskog metabolizma. U tom cilju bili su ispitani najvažniji parametri lipidnog metabolizma i inflamacije, signalni put GH-a, kao i enzimi i transkripcioni regulatori uključeni u lipidni metabolizam, direktno ili indirektno regulisani glukokortikoidnim receptorom, kod miševa „divljeg tipa“ i miševa sa deletiranim genom za MIF (*MIF*^{-/-}) u normalnim uslovima i pod uslovima energetskog opterećenja izazvanog fruktozom.

Rezultati su pokazali da nedostatak gena *Mif* dovodi do hiperleptinemije, hiperglikemije, hiperinsulinemije i sistemske insulinske rezistencije nezavisno od režima ishrane. Iako nije bilo promena u nivou triglicerida i slobodnih masnih kiselina u krvi, ishrana bogata fruktozom dovela je do pojave visceralne gojaznosti, steatoze jetre, ali i aktivacije signalnog puta GH-a u masnom tkivu i jetri *MIF*^{-/-} miševa. Inflamacija u masnom tkivu nije zabeležena, dok je u jetri svih *MIF*^{-/-} miševa primećeno povećanje ekspresije pro-inflamatornih citokina, kao i nekrotične i regenerativne promene.

Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da ishrana obogaćena fruktozom izaziva poremećaj metabolizma glukoze i lipida kod *MIF*^{-/-} miševa usled pojačane signalizacije GH-a u uslovima insulinske rezistencije.

Ključne reči: faktor inhibicije migracije makrofaga; fruktoza; visceralno masno tkivo; jetra; glukokortikoidni hormoni; lipidni metabolizam; insulinska rezistencija, inflamacija

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biohemija i molekularna biologija

The lipid metabolism and glucocorticoid signaling in visceral adipose tissue and liver of *Mif*^{-/-} mice on fructose enriched diet

ABSTRACT

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is one of the main pro-inflammatory cytokines with a role in metabolic inflammation. Low-grade inflammation in the visceral adipose tissue and liver is associated with obesity and dyslipidemia - metabolic disorders that are often caused by a fructose-enriched diet and are risk factors for the development of type 2 diabetes.

The aim of this doctoral dissertation was to determine whether MIF exerts its influence on lipid metabolism in the adipose tissue and liver through glucocorticoid hormones (GC), important regulators of energy metabolism. To this end, the most important parameters of lipid metabolism and inflammation, the GC signaling pathway, as well as enzymes and transcriptional regulators involved in lipid metabolism, directly or indirectly regulated by the glucocorticoid receptor, were examined in *wild type* mice and mice with deleted *Mif* gene (MIF^{-/-}) under normal conditions and under fructose-induced energy overconsumption.

The results showed that *Mif* deficiency leads to hyperleptinemia, hyperglycemia, hyperinsulinemia, and systemic insulin resistance independently of diet. Although there were no changes in blood triglycerides and free fatty acids levels, a fructose-enriched diet led to visceral obesity, liver steatosis, and activation of the GC signaling pathway in adipose tissue and the liver of MIF^{-/-} mice. Inflammation was not found in adipose tissue, while an increase in the expression of pro-inflammatory cytokines, as well as necrotic and regenerative changes, were observed in the liver of all MIF^{-/-} mice.

Based on the obtained results, it was concluded that fructose-enriched diet causes disturbances in glucose and lipid metabolism in MIF^{-/-} mice due to enhanced GC signaling in conditions of insulin resistance.

Key words: macrophage migration inhibitory factor; fructose; visceral adipose tissue; liver; glucocorticoid hormones; lipid metabolism; insulin resistance; inflammation;

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Biochemistry and molecular biology

SKRAĆENICE

ACC	acetil-CoA karboksilaza (eng. <i>acetyl-CoA carboxylase</i>)
Acil-CoA	acil-koenzim A (eng. <i>acyl-coenzyme A</i>)
ACLY	ATP-citrat liaza (eng. <i>ATP-citrate lyase</i>)
ACTH	adrenokortikotropni hormon (eng. <i>adrenocorticotropic hormone</i>)
AF	funkcija aktivacije transkripcije (eng. <i>activation function</i>)
AGPAT	acilglicerol-fosfat aciltransferaza (eng. <i>acylglycerol-3-phosphate acyltransferase</i>)
Akt	protein kinaza B (eng. <i>protein kinase B</i>)
AMPK	AMP-aktivirana proteinska kinaza (eng. <i>adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>)
AP-1	transkripcijski regulator 1 (eng. <i>activator protein-1</i>)
aP2	protein koji vezuje masne kiseline adipocita 2 (eng. <i>adipocyte fatty acid binding protein</i>)
apoB 100	apolipoprotein B 100
ATGL	adipozna lipaza triglicerida (eng. <i>adipose triglyceride lipase</i>)
ATM	makrofagi masnog tkiva (eng. <i>adipose tissue macrophages</i>)
BAT	braon masno tkivo (eng. <i>brown adipose tissue</i>)
C/EBP	proteini koji se vezuju za pojačivač CCAAT (eng. <i>CCAAT/enhancer-binding proteins</i>)
cAMP	ciklični adenzin monofosfat (eng. <i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CBG	kortikosteroid-vezujući globulin (eng. <i>corticosteroid-binding globulin</i>)
ChREBP	protein koji reaguje na ugljene hidrate (eng. <i>carbohydrate response element binding protein</i>)
COX2	ciklooksigenaza 2 (eng. <i>cyclooxygenase 2</i>)
cPLA2	citosolna fosfolipaza A2 (eng. <i>cytosolic phospholipase A2</i>)
CPT1	karnitin palmitoil acil-CoA transferaza 1 (eng. <i>carnitine palmitoyl acyl-CoA transferase 1</i>)
CREB	protein koji vezuje element odgovora na ciklični AMP (eng. <i>cyclic AMP response element-binding protein</i>)
CRH	kortikotropin-oslobađajući hormon (eng. <i>corticotropin-releasing hormone</i>)
DAG	diacilglicerol
DBD	DNK-vezujući domen (eng. <i>DNA-binding domain</i>)
DGAT	DAG aciltransferaza
ELOVL6	elongaza dugog lanca masnih kiselina (eng. <i>elongation of very long chain fatty acids protein 6</i>)

ERK	kinaze regulisane ekstracelularnim signalima (eng. <i>extracellular signal-regulated kinases</i>)
FABP	protein koji vezuje masne kiseline (eng. <i>fatty acid binding protein</i>)
FAS	sintaza masnih kiselina (eng. <i>fatty acid synthase</i>)
FAT/CD36	translokaza masnih kiselina (eng. <i>fatty acid translocase</i>)
FATP	protein transportera masnih kiselina (eng. <i>fatty acid transporter protein</i>)
G6PC	glukoza-6-fosfataza (eng. <i>glucose-6-phosphatase</i>)
GLUT	glukozni transporter
GPAT	glicerol-fosfat aciltransferaza (eng. <i>glycerol-3-phosphate acyltransferase</i>)
GR	glukokortikoidni receptor
GRE	DNK sekvence koje su regulisane glukokortikoidima (eng. <i>glucocorticoid response elements</i>)
HADH	hidroksiacil-CoA dehidrogenaza (eng. <i>hydroxyacyl-CoA dehydrogenase</i>)
H6PDH	heksoza-6-fosfat dehidrogenaza (eng. <i>hexose-6-phosphate dehydrogenase</i>)
HDL	lipoprotein visoke gustine (eng. <i>high-density lipoprotein</i>)
HFCS	visokofruktozni kukuruzni sirup (eng. <i>high-fructose corn syrup</i>)
HFD	ishrana obogaćena mastima (eng. <i>high-fat diet</i>)
HHA osa	hipotalamo-hipofizno-adrenokortikalna osa
11 β HSD	11 β hidroksisteroid dehidrogenaza (eng. <i>11β-hydroxysteroid dehydrogenase</i>)
HSL	lipaza osetljiva na dejstvo hormona (eng. <i>hormone sensitive lipase</i>)
HSP	protein toplotnog stresa (eng. <i>heat shock protein</i>)
IL	interleukin
IP-GTT	intraperitonealni test tolerancije na glukozu (eng. <i>intraperitoneal glucose tolerance test</i>)
IP-ITT	intraperitonealni test tolerancije na insulin (eng. <i>intraperitoneal insulin tolerance test</i>)
IRS-1	supstrat 1 insulinskog receptora (eng. <i>insulin receptor substrate 1</i>)
I κ B	inhibitorni protein κ B (eng. <i>inhibitor of κB</i>)
JNK	c-Jun kinaza (eng. <i>C-Jun N-terminal kinases</i>)
KLF	familija faktora sličnih Krupelu (eng. <i>Kruppel-like factor family</i>)
LBD	domen odgovoran za vezivanje liganda (eng. <i>ligand binding domain</i>)
LCAD	dugolančana acil-CoA dehidrogenaza (eng. <i>long-chain acyl-CoA dehydrogenase</i>)
LDL	lipoprotein niske gustine (eng. <i>low-density lipoprotein</i>)
LPL	lipoproteinska lipaza (eng. <i>lipoprotein lipase</i>)

LPS	lipopolisaharid
LXR α/β	receptor jetre X (eng. <i>liver X receptor α/β</i>)
MAPK	proteinska kinaza aktivirana mitogenom (eng. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MCP-1	protein hemoatraktant monocita-1 (eng. <i>monocyte chemo-attractant protein-1</i>)
MGL	monoacilglicerol lipaza (eng. <i>monoacylglycerol lipase</i>)
MIF	faktor inhibicije migracije makrofaga (eng. <i>macrophage migration inhibitory factor</i>)
MKP-1	mitogenom-aktivirana protein kinaza fosfataze-1 (eng. <i>mitogen-activated protein kinase phosphatase-1</i>)
mTOR	ciljni protein rapamicina kod sisara (eng. <i>mammalian target of rapamycin</i>)
MTP	protein za prenos mikrozomalnih triglicerida (eng. <i>microsomal triglyceride transfer protein</i>)
NADPH	oksidovano/redukovani nikotinamid dinukleotid fosfat
NAFLD	nealkoholna masna bolest jetre (eng. <i>nonalcoholic fatty liver disease</i>)
NASH	nealkoholni steatohepatitis
NF κ B	nuklearni faktor κ B (eng. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NLRP3	pirinski domen koji sadrži gen 3 (eng. <i>pyrin domain containing 3 gene</i>)
NTD	N-terminalni transaktivacioni domen (eng. <i>N-terminal transactivation domain</i>)
PAP	fosforilaze fosfatidne kiseline (eng. <i>phosphatidic acid phosphatase</i>)
PEPCK	fosfoenolpiruvat karboksikinaza (eng. <i>phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>)
PGC-1 α	koaktivator 1 α receptora aktiviranog peroksizomalnim proliferatorom (eng. <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α</i>)
PGE2	prostaglandin E2
PKC	protein kinaza C (eng. <i>protein kinase C</i>)
POMC	pro-opiomelanokortin (eng. <i>pro-opiomelanocortin</i>)
PPAR	receptor aktiviran peroksizomalnim proliferatorom (eng. <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>)
SAT	potkožno masno tkivo (eng. <i>subcutaneous adipose tissue</i>)
SCD1	steroil-CoA desaturaza 1 (eng. <i>stearoyl-CoA desaturase 1</i>)
SREBP	protein koji se vezuje za element regulisan sterolom (eng. <i>sterol regulatory element binding protein</i>)
TAG	triacilglicerol
TGF β	transformišući faktor rasta (eng. <i>transforming growth factor β</i>)
TLR	receptor sličan Toll-u (eng. <i>Toll-like receptor</i>)
TNF	tumorski faktor nekroze (eng. <i>tumor necrosis factor</i>)

VAT visceralno masno tkivo (eng. *visceral adipose tissue*)
VLDL lipoprotein veoma niske gustine (eng. *very low-density lipoprotein*)
WAT belo masno tkivo (eng. *white adipose tissue*)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Ishrana obogaćena fruktozom i metabolički poremećaji.....	1
1.1.1 Metabolizam fruktoze u jetri.....	2
1.1.2 Insulinska rezistencija.....	3
1.1.3 Gojaznost	4
1.1.3.1 Visceralna gojaznost	5
1.1.4 Nealkoholna masna bolest jetre	7
1.2 Lipidni metabolizam	9
1.2.1 Lipidni metabolizam u masnom tkivu.....	9
1.2.1.1 Lipogeneza	9
1.2.1.2 Adipogeneza	10
1.2.1.3 Lipoliza	10
1.2.2 Lipidni metabolizam u jetri	11
1.2.2.1 Preuzimanje slobodnih masnih kiselina iz cirkulacije.....	11
1.2.2.2 De novo lipogeneza u jetri	12
1.2.2.3 β -oksidacija masnih kiselina u jetri.....	13
1.2.2.4 Oslobođanje triglicerida iz jetre	15
1.2.3 Hormonska regulacija lipidnog metabolizma	15
1.3 Glukokortikoidni hormoni.....	17
1.3.1 Prereceptorski metabolizam glukokortikoida	18
1.3.2 Glukokortikoidni receptor	20
1.4 Metabolička inflamacija	21
1.4.1 Faktor inhibicije migracije makrofaga (MIF).....	22
1.4.1.1 Fiziološke posledice delecije gena Mif.....	24
1.4.1.2 MIF i glukokortikoidi u regulaciji inflamacije i energetskog metabolizma	25
2. CILJ	28
3. MATERIJAL I METODE	29
3.1. Materijal	29
3.2. Metode	31
3.2.1 Gajenje i tretman eksperimentalnih životinja.....	31
3.2.2 Analiza fizioloških parametara	31
3.2.3 Priprema krvne plazme i određivanje biohemijskih parametara	33
3.2.3.1 Karakterizacija sistemske insulinske osetljivosti.....	33
3.2.3.2 Određivanje koncentracije glukoze, insulina, triglicerida i slobodnih masnih kiselina.....	33
3.2.3.3 Određivanje koncentracije leptina i kortikosterona	33

3.2.3.4	Određivanje koncentracije ALT i AST.....	34
3.2.4	Izolovanje visceralnog masnog tkiva i jetre.....	34
3.2.5	Histološka analiza tkiva	34
3.2.6	Izolovanje RNK.....	34
3.2.7	Reakcija reverzne transkripcije.....	35
3.2.8	Reakcija lančane polimeraze u realnom vremenu.....	35
3.2.9	Priprema ćelijskih frakcija tkiva.....	36
3.2.9.1	Priprema ukupnog ćelijskog ekstrakta visceralnog masnog tkiva.....	36
3.2.9.2	Priprema ukupnog ćelijskog ekstrakta jetre	37
3.2.9.3	Priprema citosolne, jedarne i mikrozomalne frakcije jetre	37
3.2.9.4	Određivanje koncentracije proteina u ćelijskim frakcijama tkiva	38
3.2.10	Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu.....	38
3.2.11	Western blot metoda.....	38
3.2.12	Statistička analiza	39
4.	REZULTATI.....	40
4.1.	Fiziološki i biohemijski parametri miševa nakon ishrane obogaćene fruktozom	40
4.1.1	Fiziološki parametri mužjaka miševa.....	40
4.1.2.	Biohemijski parametri insulinske osetljivosti.....	41
4.1.3	Biohemijski parametri lipidnog metabolizma	43
4.2.	Visceralno masno tkivo.....	44
4.2.1.	Prereceptorski metabolizam glukokortikoida u visceralnom masnom tkivu	44
4.2.2	Signalni put glukokortikoida u visceralnom masnom tkivu.....	45
4.2.3	Ekspresija gena lipidnog metabolizma regulisanih glukokortikoidnim receptorom	46
4.2.4	Proteinski nivo transkripcionih regulatora uključenih u lipidni metabolizam.....	47
4.2.5	Histološka i morfometrijska analiza visceralnog masnog tkiva.....	48
4.2.6	Signalni put p38 MAP kinaze u visceralnom masnom tkivu.....	49
4.2.7	Markeri inflamacije u visceralnom masnom tkivu	50
4.3	Jetra.....	51
4.3.1	Prereceptorski metabolizam glukokortikoida u jetri.....	51
4.3.2	Signalni put glukokortikoida i unutarćelijska preraspodela glukokortikoidnog receptora.....	52
4.3.3	Nivo enzima uključenih u transport lipida i <i>de novo</i> lipogenezu u jetri.....	53
4.3.4	Proteinski nivo transkripcionih regulatora uključenih u lipidni metabolizam u jetri	55
4.3.5	Nivo proteina uključenih u β -oksidaciju masnih kiselina.....	56
4.3.6	Signalni putevi p38 i AMPK kinaza.....	58
4.3.7	Biohemijski markeri oštećenja jetre	59
4.3.8	Histološka analiza jetre.....	60

4.3.9	Markeri inflamacije u jetri.....	63
5.	DISKUSIJA.....	64
5.1	Nedostatak gena <i>Mif</i> i ishrana obogaćena fruktozom pokreću razvoj sistemske insulinske rezistencije ne menjajući lipidni profil u krvi	65
5.2	Lipogeneza i adipogeneza u visceralnom masnom tkivu MIF ^{-/-} miševa nakon ishrane obogaćene fruktozom povezana je sa stimulisanom glukokortikoidnom signalizacijom.....	67
5.3	Aktivacija lipogeneze i inhibicija β -oksidacije u jetri MIF ^{-/-} miševa nakon ishrane obogaćene fruktozom nastaju kao posledica stimulisane glukokortikoidne signalizacije	72
5.4	Komunikacija između visceralnog masnog tkiva i jetre u regulaciji metabolizma lipida kod MIF ^{-/-} miševa hranjenih fruktozom.....	78
6.	ZAKLJUČCI.....	80
7.	LITERATURA.....	81
8.	PRILOZI	103

1. UVOD

1.1 Ishrana obogaćena fruktozom i metabolički poremećaji

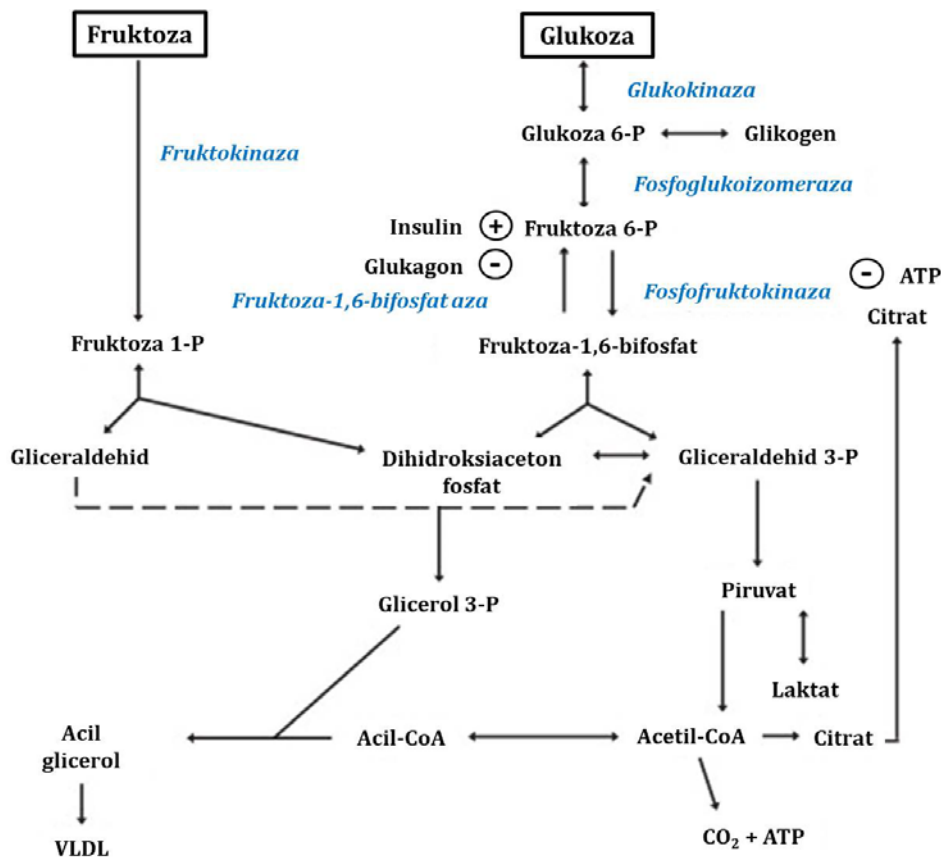
Fruktoza je prirodni šećer koji se u vidu monosaharida nalazi u voću, povrću i medu, i u ovom obliku predstavlja komponentu zdrave, izbalansirane ishrane. Međutim, primarni izvor fruktoze u današnjoj ishrani su zaslađivači koji se koriste u industriji hrane i pića. Fruktoza se u njima nalazi u obliku saharoze (koja sadrži 50% glukoze i 50% fruktoze) i visokofruktoznog kukuruznog sirupa (eng. *high-fructose corn syrup*, HFCS; koji sadrži između 42% i 55% fruktoze) (Sangüesa et al., 2019). I saharoza i HFCS se u velikoj meri koriste kao dodati šećeri kako bi se hrani obezbedila slatkoća, tekstura i ukus. Ovi šećeri takođe doprinose i izgledu, konzerviranju i energetsom sadržaju prehrambenih proizvoda. Proizvodi u koje se najčešće dodaju ovi šećeri su bezalkoholna i voćna pića, slatkiši i peciva na bazi žitarica (Keim and Havel, 2013).

Globalne promene u ljudskoj ishrani poslednjih decenija su doprinele povećanoj potrošnji fruktoze u celom svetu, a posebno u industrijalizovanim zemljama. Američki podaci o ishrani pokazuju da je između 1977. i 1998. godine prosečna dnevna potrošnja fruktoze porasla za 35% (Popkin and Nielsen, 2003). Povećanje unosa fruktoze se u velikoj meri pripisuje povećanoj potrošnji zaslađenih pića (bezalkoholna, energetska i voćna pića), koja su trenutno glavni izvor dodatog šećera u ishrani. Poslednjih godina potrošnja zaslađenih napitaka se smanjuje u Severnoj Americi, Australiji i Zapadnoj Evropi, ali u isto vreme raste u oblastima sa niskim i srednjim prihodima (Popkin and Hawkes, 2016). Uprkos smanjenju uočenom u nekim zemljama, unos dodatog fruktoze čini preko 20% ukupnog dnevnog unosa ugljenih hidrata, što znatno premašuje preporuke Svetske zdravstvene organizacije (SZO) da dodati šećeri ne bi trebalo da prelaze 5% ukupnog dnevnog energetskeg unosa (Rippe and Angelopoulos, 2016).

Zabrinutost zbog prevelikog sadržaja dodatog šećera u ishrani proizilazi iz zapažanja da je porast potrošnje zaslađivača paralelan sa povećanom pojavom metaboličkih poremećaja, kao što su gojaznost, insulinska rezistencija i nealkoholna masna bolest jetre (eng. *non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) (Dekker et al., 2010). Štaviše, uočeno je da je konzumiranje šećera u tečnom obliku, odnosno fruktoze u zaslađenim pićima, štetnije za ljudsko zdravlje od konzumiranja u čvrstom obliku, jer unos tečnih ugljenih hidrata ne izaziva proporcionalno kompenzatorno smanjenje unosa hrane, što rezultira pozitivnim energetskeim balansom (DiMeglio and Mattes, 2000). Tečna hrana ne zahteva žvakanje i drugačije utiče na osećaj sitosti, usled čega su odgovor pankreasa i sekrecija insulina smanjeni. Međutim, čini se da štetne posledice visokog unosa zaslađenih napitaka nisu samo pitanje kalorija, već mogu zavistiti i od vrste šećera koji se unosi. Studije koje su poredile efekte uzimanja napitaka zaslađenih fruktozom i glukozom uz obroke su pokazale da fruktoza dovodi do manjeg povećanja koncentracije glukoze i insulina u krvi nakon obroka, u poređenju sa glukozom (Schaefer et al., 2009; Stanhope et al., 2009). Pored toga, uočena je smanjena koncentracija leptina u cirkulaciji, kao i produkcija hormona grelina. Glukoza, insulin, leptin i grelin su uključeni u dugoročnu kontrolu unosa hrane i regulaciju telesne mase preko centralnog nervnog sistema. Pošto su ovi ključni signali odsutni ili oslabljeni sa konzumacijom fruktoze, hronična ishrana obogaćena fruktozom doprinosi povećanom unosu energije, kao i razvoju insulinske i leptinske rezistencije, dislipidemije i visceralne gojaznosti (Keim and Havel, 2013).

1.1.1 Metabolizam fruktoze u jetri

Dosadašnja saznanja ukazuju da povećan unos fruktoze utiče na razvoj gojaznosti i pridruženih metaboličkih poremećaja putem promena u regulaciji signalnih i metaboličkih puteva u jetri i masnom tkivu. Jetra predstavlja glavno mesto metabolizma fruktoze, gde se ona lako apsorbira i brzo metaboliše (Tappy and Le, 2010). Nakon apsorpcije u gastrointestinalnom traktu, glukoza i fruktoza se dopremaju do jetre putem portalne vene. Iako su slične po hemijskoj strukturi, njihovi katabolički putevi se razlikuju, i štetni efekti fruktoze se mogu pripisati njenoj specifičnoj metaboličkoj sudbini. Dok se glukoza transportuje u ćelije pomoću proteina transportera glukoze GLUT4 (eng. *glucose transporter type 4*, GLUT4), koji je regulisan insulinom, fruktoza se apsorbira u crevima procesom olakšanog transporta, preko GLUT5 transportera visokog afiniteta (Havel, 2005). Transport fruktoze u jetru se obavlja iz portalnog krvotoka putem GLUT2 transportnog proteina. U jetri se fruktoza razgrađuje u procesu glikolize na način koji je nezavisan od insulina. Prvi korak u metabolizmu fruktoze je fosforilacija fruktoze u fruktozo-1-fosfat. Ova reakcija zahteva ATP i katalizuje je fruktokinaza, enzim visokog afiniteta i specifičnosti za fruktozu (**Slika 1.1**) (Keim and Havel, 2013).



Slika 1.1. Metabolizam glukoze i fruktoze u jetri. Fruktoza se fosforiliše i formira se fruktoza-1-fosfat u reakciji koja je katalizovana fruktokinazom. Za razliku od glukoze, fruktoza ulazi u glikolitički put zaobilazeći kritični regulatorni korak glikolize gde se fruktoza-6-fosfat pretvara u fruktoza-1,6-bisfosfat. Ovu reakciju katalizuje enzim fosfofruktokinaza koja je regulisana citratom i ATP-om. Alosterična inhibicija fosfofruktokinaze smanjuje unos glukoze u jetru, dok fruktoza ulazi u glikolizu bez ovog ograničenja dajući intermedijere za sintezu triglicerida i masnih kiselina. Preuzeto i modifikovano iz (Keim and Havel, 2013).

Fruktozo-1-fosfat se zatim pomoću enzima aldolaze B prevodi u trioze fosfata, gliceraldehid i dihidroksiaceton-fosfat, koji je intermedijer i glukoneogeneze i glikolize. Gliceraldehid se

fosforilacijom prevodi u gliceraldehid-3-fosfat, koji može biti uključen u proces formiranja glikogena ili glukoze, ili se može dalje metabolisati do piruvata i finalno do CO₂ i H₂O u ciklusu trikarboksilnih kiselina. Na taj način, jedinjenja trioza-fosfata obezbeđuju supstrate za glikolizu i oksidativni metabolizam, formiranje glikogena i sintezu glukoze i masnih kiselina (Keim and Havel, 2013). Dakle, fruktoza ulazi u glikolitički put zaobilazeći kontrolni korak prevođenja fruktozo-6-fosfata u fruktozo-1,6-bisfosfat. Ovu reakciju katalizuje enzim fosfofruktokinaza, koji je alosterički negativno regulisan od strane ATP-a i citrata. Alosterična inhibicija fosfofruktokinaze efektivno smanjuje brzinu glikolize, kao i ukupni unos glukoze u jetru. Nasuprot tome, ulazak fruktoze u glikolitički put se odvija bez ograničenja što dovodi do povećane produkcije trioza fosfata (Mayes, 1993). Uzimajući u obzir da je metabolizam fruktoze nezavisan od insulina i energetskog statusa, i da može dovesti do povećane sinteze masnih kiselina i triglicerida, razumno je očekivati da prekomerna konzumacija fruktoze može dovesti do insulinske rezistencije, ektopične akumulacije lipida i hepatosteatoze (Taskinen et al., 2019).

1.1.2 Insulinska rezistencija

Insulin je hormon kojeg sintetišu i luče β -ćelije pankreasa. Glavna biološka funkcija insulina je održavanje normalnog nivoa glukoze u krvi. Insulin olakšava ćelijski unos glukoze u masno tkivo, jetru i skeletne mišiće, reguliše metabolizam ugljenih hidrata, lipida i proteina i promoviše deobu i rast ćelija (Wilcox, 2005). Poremećaji u delovanju insulina dovode do narušavanja energetske homeostaze i često su praćeni nastankom insulinske rezistencije. Insulinska rezistencija je definisana kao stanje oslabljenog biološkog odgovora insulina u uslovima normalne ili povećane koncentracije insulina. Iako se prvenstveno odnosi na poremećaj unosa glukoze u skeletne mišiće, insulinska rezistencija takođe predstavlja i poremećaj proizvodnje glukoze u jetri i narušenu supresiju lipolize u masnom tkivu (Fabbrini et al., 2010). Istraživanja u kojima su korišćeni testovi osetljivosti na insulin su pokazala da je insulinska rezistencija često praćena hiperinsulinemijom i hiperglikemijom natašte, kao i postprandijalnom hiperglikemijom. Dodatno, dolazi i do nastanka hiperlipidemije, poremećene tolerancije na glukozu i insulin, smanjene proizvodnje glukoze i povećanja inflamatornih markera u krvnoj plazmi (Ye, 2013). Na molekularnom nivou do razvoja insulinske rezistencije dolazi usled smanjenja broja insulinskih receptora ili promene u njegovom afinitetu prema insulinu, kao i usled promene u prenosu signala nizvodno od insulinskog receptora (Ronald Kahn, 1978).

Veliki broj kliničkih studija ukazuje na snažnu vezu između visceralne gojaznosti, razvoja insulinske rezistencije i nastanka dijabetesa tipa 2. Međutim, ćelijski mehanizmi odgovorni za razvoj insulinske rezistencije u jetri još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Povećano oslobađanje slobodnih masnih kiselina poreklom iz lipolize u omentalnom i mezenteričnom masnom tkivu u portalnu cirkulaciju indukuje nastanak insulinske rezistencije u jetri kod gojaznih osoba (Item and Konrad, 2012). Štaviše, smanjenje mase visceralnog masnog tkiva je povezano sa poboljšanom osetljivošću na insulin, što ukazuje na to da akumulacija intraabdominalnih lipida može biti uzročno povezana sa insulinskom rezistencijom (Item and Konrad, 2012). Povećana koncentracija unutarćelijskog nivoa slobodnih masnih kiselina može dovesti do kompeticije sa glukozom za oksidaciju supstrata, što dovodi do serijske inhibicije aktivnosti brojnih enzima, poput piruvat dehidrogenaze, fosfofruktokinaze i heksokinaze II (Kahn et al., 2006). Dodatno, povećana isporuka masnih kiselina ili smanjeni nivo unutarćelijskog metabolizma masnih kiselina rezultira povećanjem sadržaja njihovih metabolita, diacilglicerola (DAG), acil-koenzima A (acil-CoA) i ceramida u ćeliji. Pomenuti metaboliti masnih kiselina dalje aktiviraju kaskadu protein kinaza, uključujući protein kinazu C (eng. *protein kinase C*, PKC), c-Jun kinazu (eng. *c-Jun N-terminal kinases*, JNK),

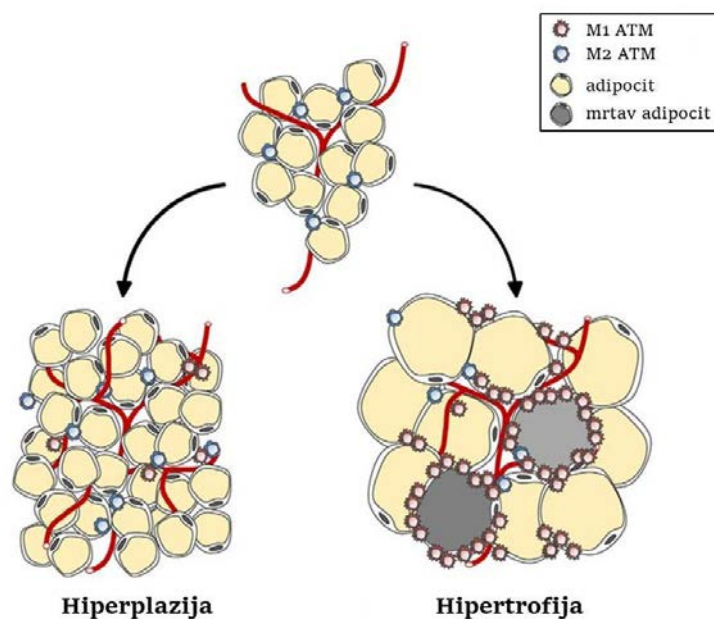
MAPK (eng. *mitogen-activated protein kinase*) i kinaze regulisane ekstracelularnim signalom (eng. *extracellular signal-regulated kinases*, ERK) (Boden and Shulman, 2002; Qatanani and Lazar, 2007). Ove kinaze fosforilišu protein supstrat insulinskog receptora (eng. *insulin receptor substrate*, IRS), koji može imati pozitivne ili negativne efekte na insulinski signalni put (Asrih and Jornayvaz, 2013). Lipidni intermedijeri nastali u metabolizmu masnih kiselina, uključujući DAG, ceramide, lizofosfatidnu i fosfatidnu kiselinu, ometaju insulinski signalni put aktiviranjem PKC i mTOR (eng. *mammalian target of rapamycin*) signalnog puta, kao i inhibicijom kinaze Akt (eng. *protein kinase B*, PKB/Akt) (Fabbrini et al., 2010). Pored toga, pokazano je da povećanje oksidacije masnih kiselina stimuliše proizvodnju reaktivnih vrsta kiseonika i uzrokuje oksidativni stres koji otežava promet komponenti insulinske signalizacije i dovodi do pojave insulinske rezistencije (Asrih and Jornayvaz, 2013).

Do razvoja insulinske rezistencije može doći i usled povećane sinteze i oslobađanja pro-inflamatornih citokina od strane makrofaga i drugih ćelija koje naseljavaju masno tkivo. Među njima, najznačajni su pro-inflamatorni citokini interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 i tumorski faktor nekroze (eng. *tumor necrosis factor*, TNF), kao i protein hemoatraktant monocita-1 (eng. *monocyte chemo-attractant protein-1*, MCP-1). Pro-inflamatorni citokin TNF narušava insulinsku signalizaciju putem inhibitorne fosforilacije serina na IRS-1 i/ili smanjenja ekspresije gena *GLUT4* (Kahn and Flier, 2000). Dodatno, TNF, IL-6 i IL-1 β deluju na stimulaciju signalnih puteva JNK, p38 MAP kinaze i nuklearnog faktora- κ B (eng. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF- κ B), što rezultira povećanom produkcijom medijatora inflamacije koji mogu dovesti do insulinske rezistencije (Kahn et al., 2006; Qatanani and Lazar, 2007).

1.1.3 Gojaznost

Gojaznost predstavlja kompleksno oboljenje koje usled povezanosti sa nastankom brojnih patoloških poremećaja, uključujući dijabetes tipa 2, dislipidemiju, NAFLD, tumore, hipertenziju i kardiovaskularne bolesti, predstavlja ozbiljnu pretnju opštem zdravlju ljudi (Engin, 2017; Fabbrini et al., 2010). Prema podacima SZO, 39% odraslih osoba ima prekomernu telesnu težinu, dok je 13% gojazno u celom svetu. Broj gojaznih osoba je porastao tri puta u odnosu na 1975. godinu i predviđa se da će se taj broj utrostručiti do 2030. godine ("Obesity and overweight," 2021). Gojaznost je složena, multifaktorska bolest na čiji razvoj utiču brojni faktori, kao što su genetika, hormonski status, epigenetika, kvalitet i poreklo hrane, životna sredina, kao i socio-ekonomski status. Više studija je pokazalo da je gojaznost „stečena“ bolest, koja u velikoj meri zavisi od faktora životnog stila, uključujući nisku stopu fizičke aktivnosti i hroničan prekomerni unos hrane, uprkos genetskim i epigenetskim faktorima (Lin and Li, 2021; Safaei et al., 2021). Iako je gojaznost predmet istraživanja brojnih naučnih studija poslednjih godina, osnovni molekularni mehanizmi još uvek nisu razjašnjeni i postoji potreba za identifikacijom kliničkih biomarkera i novih terapijskih pristupa u njenom lečenju.

SZO definiše gojaznost kao prekomerno nakupljanje masnih naslaga usled povećanog energetskeg unosa, u poređenju sa energetskeg potrošnjom, u meri koja može da ugrozi zdravlje ("Obesity and overweight," 2021). Na ćelijskom nivou, višak energije se akumulira u masnom tkivu u vidu triglicerida, što dovodi do povećanja zapremine masnih ćelija (hipertrofija) i/ili povećanja broja masnih ćelija stvaranjem novih ćelija procesom adipogeneze (hiperplazija) (Slika 1.2) (Choe et al., 2016).

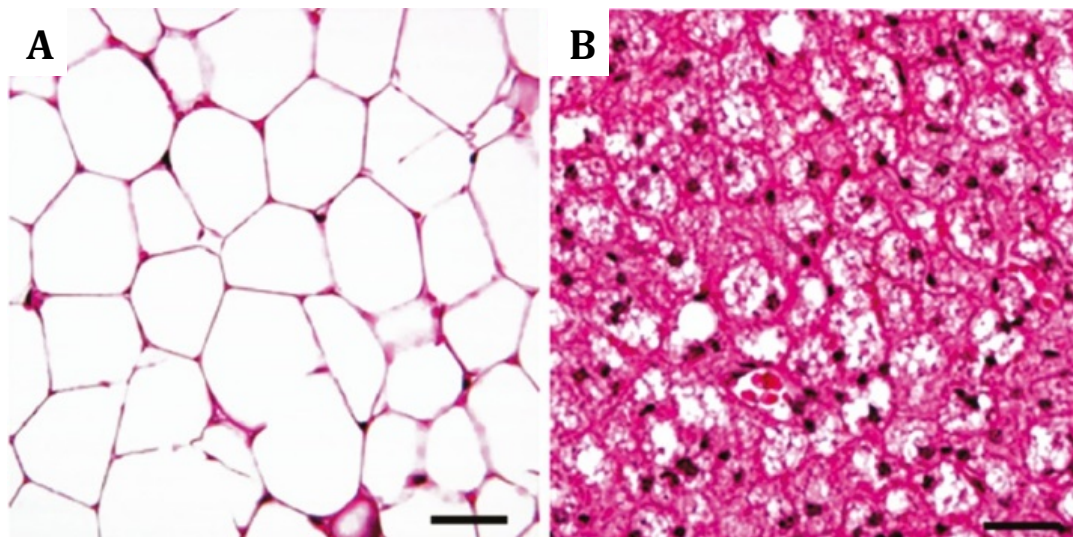


Slika 1.2. Hipertrofija i hiperplazija adipocita. Kod gojaznosti do ekspanzije masnog tkiva dolazi pomoću dva različita mehanizma: hiperplazija predstavlja povećanje broja adipocita, dok prilikom hipertrofične ekspanzije dolazi do povećanja veličine adipocita. Preuzeto i modificirano iz (Choe et al., 2016).

U kliničkoj praksi, gojaznost se najčešće procenjuje izražavanjem telesne mase kao funkcije visine, i u tu svrhu se koristi indeks telesne mase (eng. *body mass index*, BMI), koji se dobija izračunavanjem odnosa težine i visine [(težina u kg)/(visina u m²)]. Na osnovu BMI, odrasle osobe se klasifikuju u jednu od tri kategorije: “normalna težina” (BMI ≤ 24.9), “prekomerna težina” (BMI 25.0-29.9) i “gojaznost” (BMI ≥ 30) (Akram et al., 2000). Pored indeksa telesne mase, stepen gojaznosti se dodatno procenjuje i na osnovu odnosa između obima struka i kuka (eng. *waist-to-hip ratio*, WHR), koji je izražen u centimetrima (Pouliot et al., 1994).

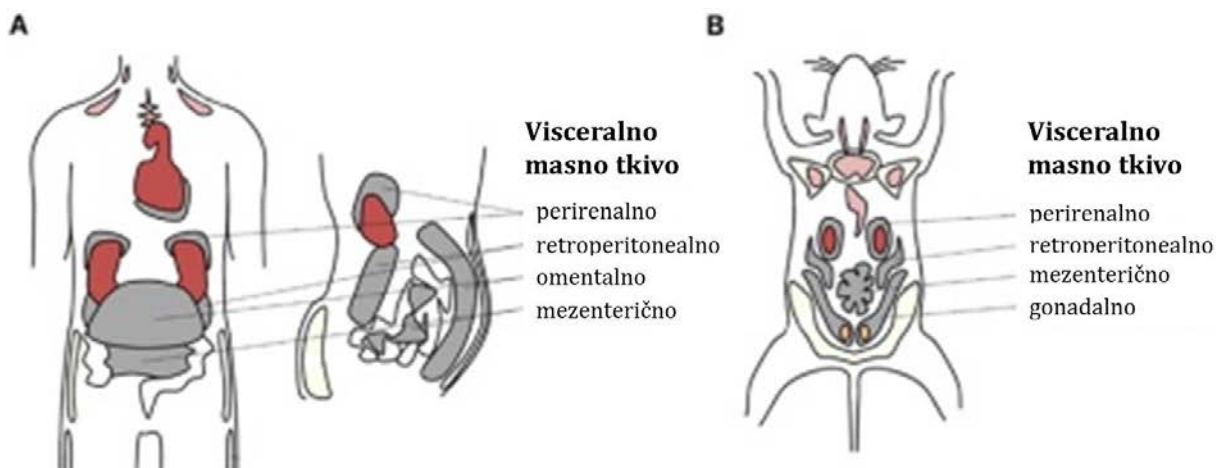
1.1.3.1 Visceralna gojaznost

Ćelije masnog tkiva (adipociti) se grupišu u različitim regionima tela formirajući depoe masnog tkiva, a obrazac njihove distribucije zavisi od mnogih faktora, uključujući pol, starost, rasu, etničku pripadnost, genotip, ishranu, fizičku aktivnost, hormonski status i lekove (Shuster et al., 2012). Kod ljudi postoje dve vrste masnog tkiva: belo masno tkivo (eng. *white adipose tissue*, WAT) i mrko masno tkivo (eng. *brown adipose tissue*, BAT). U ćelijama belog masnog tkiva prisutna je jedna masna kap koja je centralno postavljena, dok su citoplazma i jedro potisnuti na periferiju ćelije. Ćelije mrkog masnog tkiva se odlikuju brojnim masnim kapima i velikim brojem mitohondrija (**Slika 1.3**) (Esteve Ràfols, 2014).



Slika 1.3. Mikroskopski prikaz belog i mrkog masnog tkiva. Adipociti belog masnog tkiva (A) imaju jednu masnu vakuolu koja zauzima celu citoplazmu, dok adipocite mrkog masnog tkiva (B) karakteriše prisustvo više masnih vakuola, kao i obilje mitohondrija u njihovoj citoplazmi. Preuzeto i modifikovano iz (Bargut et al., 2017).

Anatomski, WAT se sastoji od dva glavna depoa sa različitim metaboličkim karakteristikama: potkožno masno tkivo (eng. *subcutaneous adipose tissue*, SAT) i visceralno masno tkivo (eng. *visceral adipose tissue*, VAT). Visceralno masno tkivo je koncentrisano u trbušnoj duplji oko unutrašnjih organa, i ono se dalje deli na mezenterični, omentalni, perirenalni i peritonealni depo. Kod glodara postoji i gonadalno masno tkivo koje se takođe smatra delom VAT-a (Slika 1.4) (Choe et al., 2016).



Slika 1.4. Visceralno masno tkivo kod ljudi i glodara. Visceralno masno tkivo okružuje intraabdominalne organe i poseduju značajne kapacitete za skladištenje energije. Kod ljudi i glodara, visceralno masno tkivo se deli na perirenalni, peritonealni, omentalni i mezenterični depo. Glodari poseduju još i gonadalno masno tkivo koje se proučava kao model visceralnog masnog tkiva. Preuzeto i modifikovano iz (Choe et al., 2016).

Pored uloge u skladištenju energije, i potkožno i visceralno masno tkivo predstavljaju metabolički aktivne organe koji proizvode i izlučuju različite medijatore, uključujući egzosome, informacione RNK, lipide, inflamatorne citokine, kao i peptidne hormone koji deluju na parakrini i endokrini način. Najznačajniji hormoni masnog tkiva su leptin i

adiponektin, i promene u regulaciji ovih hormona doprinose sistemskoj metaboličkoj disfunkciji, kao i patogenezi hroničnih metaboličkih bolesti (Richard et al., 2020). Nivo hormona leptina je u korelaciji sa masom masnog tkiva kod miševa i ljudi. Ovaj hormon deluje kao senzor energetskeg statusa ćelije i regulator energetskeg unosa i potrošnje. Leptin deluje na specifične neurone hipotalamusa i dovodi do smanjenja unosa hrane i povećanja energetske potrošnje (De Luca et al., 2005; Enriori et al., 2007). Međutim, tokom gojaznosti dolazi do poremećaja negativne povratne sprege između povećanog nivoa leptina i inhibicije unosa hrane, usled razvoja leptinske rezistencije. Leptinska rezistencija predstavlja nemogućnost reagovanja na biološku ulogu leptina, uprkos dovoljnoj ili čak povećanoj koncentraciji ovog hormona u cirkulaciji, a koja nastaje usled akumulacije viška masnih naslaga (Enriori et al., 2007; Richard et al., 2020). Sa druge strane, adiponektin ima anti-hiperglikemijsko i anti-inflamatorno dejstvo. Za razliku od leptina, njegova koncentracija opada sa povećanjem mase masnog tkiva kod glodara i ljudi sa gojaznošću (Hu et al., 1996).

Iako su oba tipa masnog tkiva važna tokom razvoja gojaznosti, posebna pažnja je usmerena na ulogu visceralnog masnog tkiva zbog njegove povezanosti sa različitim metaboličkim poremećajima, među kojima su narušavanje metabolizma glukoze i lipida, insulinska rezistencija i dijabetes tipa 2 (Shuster et al., 2012). Visceralnu gojaznost karakteriše nagomilavanje masnog tkiva koje okružuje intraabdominalne organe i često se naziva abdominalna ili centralna gojaznost. Jedna od glavnih karakteristika primećena kod pacijenata sa visceralnom gojaznošću je stanje dislipidemije koje uključuje povećanu koncentraciju triglicerida u cirkulaciji, niske nivoe lipoproteina visoke gustine (eng. *high-density lipoprotein*, HDL), relativno normalne nivoe ukupnog i lipoproteina niske gustine (eng. *low-density lipoprotein*, LDL), ali veći broj ovih čestica koje su manje i gušće od normalnog. Hipertrigliceridemija i nizak HDL holesterol u krvi mogu doprineti, uz mnoge druge faktore, nakupljanju masnih naslaga u krvnim sudovima i nastanku ateroskleroze (Tchernof and Després, 2013). Povećanje mase visceralnog masnog tkiva je povezano i sa razvojem hipertenzije, infarktom miokarda i drugim oboljenjima kardiovaskularnog sistema, pri čemu su obim struka i odnos obima struka i kuka bolji prediktori kardiovaskularnih oboljenja nego BMI indeks (Dagenais et al., 2005). Istraživanja su pokazala da je visceralna gojaznost povezana sa insulinskom rezistencijom i dijabetesom tipa 2, čak nezavisno od koncentracije insulina, glikemije, porodične anamneze i indeksa telesne mase (Boyko et al., 2000). Posebnu ulogu u tome imaju mezenterično i omentalno masno tkivo, jer je jetra preko portalne vene direktno izložena oslobađajućim faktorima iz ovih depoa masnog tkiva (Choe et al., 2016). Dodatno, pacijenti sa visceralnom gojaznošću imaju povećani postprandijalni nivo slobodnih masnih kiselina i imaju veći rizik od nastanka NAFLD-a i insulinske rezistencije u jetri (Gastaldelli et al., 2007).

Faktori koji doprinose varijacijama u akumulaciji visceralnog masnog tkiva su starost, pol, genetika i etnička pripadnost. Specifični mehanizmi odgovorni za proporcionalno povećano skladištenje visceralnog masnog tkiva prilikom pozitivnog energetskeg balansa i povećanja telesne mase, uključuju polne hormone, lokalnu sintezu glukokortikoida u abdominalnom masnom tkivu, hormon rasta i ishranu obogaćenu fruktozom (Tchernof and Després, 2013).

1.1.4 Nealkoholna masna bolest jetre

Jetra predstavlja centralni organ u održavanju energetske homeostaze. U njoj se odvija metabolizam osnovnih energetskeg supstrata, kako glukoze i masnih kiselina, tako i hranljivih materija apsorbiranih iz hrane koji putem portalne vene stižu do nje. Ključnu ulogu u održavanju nivoa šećera u krvi jetra ostvaruje putem regulacije ravnoteže između procesa glikogeneze (skladištenje glukoze u obliku glikogena), glukoneogeneze (sinteze glukoze iz

glicerola, laktata i glukogenske aminokiseline) i glikogenolize (razgradnje glikogena do glukoze) (Han et al., 2016). U ovim procesima glavnu ulogu imaju hormoni insulin i glukagon, hormoni pankreasa koji do jetre dospevaju putem portalne cirkulacije. Nakon obroka, kada je nivo glukoze u krvi visok, insulin se oslobađa i stimuliše skladištenje glukoze u glikogen. Sa druge strane, prilikom gladovanja, glukagon aktivira procese glukoneogeneze i glikogenolize, što dovodi do povećanja nivoa glukoze u krvi (Röder et al., 2016). Važni regulatori nivoa glukoze u krvi su i glukokortikoidni hormoni koji deluju suprotno u odnosu na insulin i stimulišu proces glukoneogeneze (Kuo et al., 2015). Pored regulacije nivoa šećera u krvi, jetra ima ulogu i u održavanju homeostaze lipida. I ovaj proces je regulisan delovanjem insulina i glukokortikoida, pri čemu ovi hormoni deluju sinergistički, stimulišući lipogenezu (Rahimi et al., 2020).

Kao što je već pomenuto, gojaznost nastaje kao rezultat hronično pozitivnog energetskeg balansa, pri čemu dolazi do narušavanja metabolizma glukoze i lipida u različitim organima, pre svega u masnom tkivu i jetri. U uslovima narušene energetske homeostaze, visceralno masno tkivo gubi sposobnost daljeg skladištenja lipida, što dovodi do povećanog priliva i akumulacije lipida u jetri (stetaoza jetre) i posledično do razvoja insulinske rezistencije, kao jedne od osnovnih karakteristika NAFLD-a. (Longo et al., 2019). Poreklo ovako deponovanih lipida u jetri je složeno. *Donnelly* i kolege su pokazali da je najveći deo triglicerida u jetri poreklom od priliva slobodnih masnih kiselina iz masnog tkiva portalnom cirkulacijom, jedan deo lipida jetra sintetiše tokom procesa *de novo* lipogeneze, dok najmanji udeo lipida potiče iz nutrijenata unetih hranom (Donnelly et al., 2005). NAFLD obuhvata širok spektar patoloških stanja, u rasponu od hepatocelularne steatoze sa benignom prognozom, preko nealkoholnog steatohepatitisa (eng. *nonalcoholic steatohepatitis*, NASH) praćenog inflamacijom i nekrozom. NASH može dovesti do fibroze, ciroze i hepatocelularnog karcinoma, što rezultira povećanim morbiditetom i smrtnošću (Lau et al., 2017; Postic and Girard, 2008). U zapadnom svetu, prevalenca NAFLD-a se povećava sa indeksom telesne mase i varira između 20 i 30%, pri čemu može da raste i do 90% kod morbidno gojaznih osoba. Sa druge strane, prevalenca NASH-a je manja, i pogađa 2-3% opšte populacije i do 37% morbidno gojaznih osoba (Dowman et al., 2009). Morfološki, steatoza jetre se manifestuje kao akumulacija velikih (makrovezikularnih) intracitoplazmatskih masnih kapljica u 5% ili više parenhimskih ćelija jetre. Sa druge strane, kod pacijenata sa NASH-om primećeni su steatoza sa balonirajućom degradacijom hepatocita, fibroza sa ili bez Malorijevih telašaca i inflamacija (Parthasarathy et al., 2020). Inflamaciju karakteriše aktivacija makrofaga (Kupferove ćelije), nekroza i disbalans adipocitokina, faktora transkripcije i pro-inflamatornih citokina, kao što su IL-1 β , IL-6 i TNF (Cusi, 2012; Tilg and Moschen, 2008). Tako nastalo pro-inflamatorno stanje doprinosi razvoju insulinske rezistencije u jetri i zajedno sa hiperinsulinemijom utiče na sadržaj masti u jetri, što dovodi do povećanja transkripcije lipogenih gena, inhibicije β -oksidacije masnih kiselina i smanjenja ekspresije glukoneogenih gena (Dowman et al., 2009).

Brojne studije su pokazale da ishrana obogaćena fruktozom dovodi do poremećaja lipidne homeostaze, uzrokujući povećanje koncentracije triglicerida u cirkulaciji, nakupljanje lipida u masnom tkivu, kao i povećanu ektopičnu akumulaciju lipida u jetri i mišićima (Lê et al., 2009). Konzumiranje velikih doza fruktoze dovodi do povećane proizvodnje lipogenih prekursora u jetri, svih enzima i glavnih regulatora transkripcije uključenih u *de novo* lipogenezu, što sve dovodi do povećane produkcije lipida. Takođe, fruktoza ispoljava svoju lipogenu aktivnost inhibirajući oksidaciju masnih kiselina (Keim et al., 2016). Povećani nivo intrahepatičnih lipida podstiče povećanu proizvodnju i lučenje lipoproteina veoma male gustine (eng. *very low density lipoprotein*, VLDL) što dovodi do dislipidemije, sistemske insulinske rezistencije, razvoja NAFLD i metaboličkog sindroma (Keim et al., 2016). Međutim, još uvek nije u potpunosti rasvetljeno koji su osnovni molekularni mehanizmi nastanka metaboličkih poremećaja kao posledice prekomernog unosa fruktoze.

1.2 Lipidni metabolizam

1.2.1 Lipidni metabolizam u masnom tkivu

Pored uloge u obezbeđivanju izolacije i mehaničke potpore, masno tkivo ima važnu ulogu u održavanju energetskog balansa organizma kroz regulaciju, kako unosa hrane, tako i potrošnje energije. Tokom perioda povećanog unosa hrane i/ili smanjene potrošnje energije, višak energije se skladišti u masnom tkivu u obliku triglicerida. Međutim, kada je unos hrane smanjen, a energetske potrebe povećane, dolazi do aktivacije procesa lipolize prilikom čega se trigliceridi razgrađuju do masnih kiselina, koje se oslobađaju u cirkulaciju i bivaju korišćene od strane većine organa (Luo and Liu, 2016). Pored toga, masno tkivo deluje kao endokrini organ koji luči različite signalne molekule poput leptina i adiponektina. Ovi faktori su uključeni u održavanje energetske homeostaze putem komunikacije sa drugim tkivima, kao što su mišići, mozak i jetra (Song et al., 2018).

1.2.1.1 Lipogeneza

De novo lipogeneza je proces koji obuhvata sintezu masnih kiselina iz acetil-koenzima A (acetil-CoA), koje se zatim preusmeravaju za skladištenje u lipidnim kapima u formi triglicerida ili se koriste za kasniju oksidaciju, ugradnju u strukturne lipide ili posttranslacione modifikacije (Wallace and Metallo, 2020). *De novo* lipogeneza se može javiti kako u stanju gladovanja, tako i tokom hranjenja. Nakon obroka sa visokim sadržajem ugljenih hidrata, višak glukoze dovodi do povećanja nivoa acetil-CoA koji se prevodi u malonil-CoA pomoću enzima acetil-CoA karboksilaze (eng. *acetyl-CoA carboxylases*, ACC) (Luo and Liu, 2016). Nakon toga, sintaza masnih kiselina (eng. *fatty acid synthase*, FAS), ključni enzim koji ograničava brzinu *de novo* lipogeneze, pretvara malonil-CoA u palmitat, koji je prvi proizvod sinteze masnih kiselina u ovom procesu. Ovo je energetski zahtevan proces za koji je potreban značajan broj molekula ATP-a, acetil-CoA i NADPH (eng. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) molekula. Kao rezultat toga, *de novo* lipogeneza je visoko regulisan proces na transkripcionom i posttranslacionom nivou (Wallace and Metallo, 2020). Palmitat se zatim podvrgava reakcijama elongacije i desaturacije pri čemu nastaju zasićene masne kiseline, kao što su oleinska, palmitoleinska i stearinska kiselina (Song et al., 2018). Ove masne kiseline se pomoću enzima stearoil-CoA desaturaze 1 (eng. *stearoyl-CoA desaturase 1*, SCD1) konvertuju u mononezasićene masne kiseline, ključne supstrate za stvaranje triglicerida (Gathercole et al., 2013).

U normalnim uslovima, nivo *de novo* lipogeneze je relativno nizak u masnom tkivu u poređenju sa jetrom. Masne kiseline koje se koriste za biosintezu triglicerida u adipocitima uglavnom potiču od cirkulišućih lipoproteina koji sadrže trigliceride, kao što su hilomikroni i VLDL. Hidrolizu masnih kiselina iz cirkulišućih triglicerida katalizuje enzim lipoproteinska lipaza (eng. *lipoprotein lipase*, LPL). Enzim LPL luče adipociti, nakon čega se transportuje u susedni kapilarni lumen gde obavlja svoju lipolitičku funkciju (Kersten, 2014). Ovako nastale masne kiseline mogu biti preuzete od strane okolnih tkiva i korišćene kao energetski supstrati (Luo and Liu, 2016).

Ekspresija enzima *de novo* lipogeneze je kontrolisana brojnim transkripcionim regulatorima, od kojih je najznačajniji protein koji se vezuje za element regulisan sterolom (eng. *sterol regulatory element binding protein*, SREBP) (Song et al., 2018). SREBP pripada porodici transkripcionih regulatora vezanih za membranu koji su identifikovani kao važni regulatori homeostaze holesterola i masnih kiselina. Kod sisara postoje tri SREBP izoforme (SREBP1a, SREBP1c i SREBP2) koje aktiviraju različite, ali preklapajuće programe u metabolizmu lipida. Dok SREBP1a i SREBP2 aktiviraju sintezu i unos holesterola, SREBP1c je odgovoran za sintezu masnih kiselina i njegova funkcija je regulisana insulinom (Eberlé et al.,

2004). Od ove tri izoforme, SREBP1c je najzastupljeniji u tkivima sa aktivnom *de novo* lipogenezom, kao što su jetra i masno tkivo. U ovim tkivima, SREBP1c reguliše ekspresiju gena uključenih u *de novo* lipogenezu i sintezu triglicerida, među kojima su najznačajniji ACC, FAS i SCD1 (Gathercole et al., 2013). Pored toga, SREBP1c direktno reguliše aktivnost receptora aktiviranog peroksizomalnim proliferatorom γ (eng. *peroxisome proliferator-activated receptor γ* , PPAR γ), koji ima važnu ulogu u diferencijaciji adipocita (Kim and Spiegelman, 1996).

1.2.1.2 Adipogeneza

Adipogeneza je ćelijski proces tokom kojeg se preadipociti slični fibroblastima diferenciraju u zrele adipocite i ima važnu ulogu u razvoju masnog tkiva i sistemske energetske homeostazi (Ali et al., 2013; Lefterova and Lazar, 2009). Adipogeneza je višestepeni proces koji uključuje dve glavne faze. U prvoj fazi, ćelije prolaze kroz mitotičku klonalnu ekspanziju, koja podrazumeva replikaciju DNK i umnožavanje ćelija, dok druga faza predstavlja ranu i terminalnu diferencijaciju adipocita (Lazar et al., 2018). Kada pluripotentne matične ćelije izgube sposobnost diferencijacije u druge tipove ćelija, one postaju unipotentni adipociti, koji prolaze kroz morfološke i funkcionalne promene usled aktivacije brojnih signalnih puteva i faktora transkripcije gena (Chen et al., 2016). Tokom rane diferencijacije, preadipociti dobijaju izgled loptaste strukture, dok terminalnu fazu diferencijacije karakteriše sinteza i transport lipida, lučenje proteina specifičnih za adipocite, aktivacija metaboličkih procesa povezanih sa insulinom i dobijanje morfologije zrelih adipocita (Farmer, 2006). Adipogeneza je regulisana signalnim putevima koji podrazumevaju aktivaciju brojnih faktora transkripcije, uključujući familiju proteina koji se vezuju za pojačivač CCAAT (eng. *CCAAT/enhancer-binding proteins*, C/EBP) i PPAR γ . Tokom ranih faza diferencijacije dolazi do visoke ekspresije C/EBP β/δ izoforme, dok tokom srednje faze adipogeneze, C/EBP β/δ stimuliše ekspresiju C/EBP α izoforme i PPAR γ . Ova dva transkripciona faktora kooperativno promovišu diferencijaciju i indukciju nekoliko gena specifičnih za adipocite, uključujući LPL, protein koji vezuje masne kiseline adipocita 2 (eng. *adipocyte fatty acid binding protein*, aP2), ACC, FAS, SCD1, perilipin i leptin (Rosen et al., 2000).

PPAR γ je jedarni receptor koji deluje kao glavni regulator adipogeneze na taj način što kontroliše ekspresiju brojnih gena uključenih u diferencijaciju adipocita, metabolizam glukoze i lipida, inflamaciju i druge fiziološke procese. Štaviše, PPAR γ nije samo ključan za adipogenezu, već je takođe potreban i za održavanje diferenciranog stanja adipocita (Rosen et al., 2000). Aktivacija PPAR γ dovodi do povećanja broja adipocita osetljivih na insulin i reguliše adiponektin, što poboljšava osetljivost na insulin u mišićima i jetri (Moseti et al., 2016). Pored PPAR γ , identifikovano je još nekoliko pozitivnih regulatora adipogeneze. Među njima, najznačajniji su familija faktora sličnih Krupelu (eng. *Kruppel-like factor family*, KLF), protein koji vezuje element odgovora na ciklični AMP (eng. *cyclic AMP response element-binding protein*, CREB) i SREBP1c. Kao što je već pomenuto, SREBP1c reguliše ekspresiju enzima FAS i LPL i povećava aktivnost PPAR γ , čime dovodi do povećanja nivoa adipogeneze (Kim and Spiegelman, 1996). *In vitro* studije su pokazale da insulin i kortikosteroidi indukuju ekspresiju iRNK za PPAR γ , dok TNF smanjuje njegovu ekspresiju (Vidal-Puig et al., 1997). Pored ovih faktora, brojni drugi faktori, uključujući pol, starost i stil života, mogu uticati na proces adipogeneze. Povećanje broja i veličine adipocita uzrokuje širenje belog masnog tkiva i dovodi do razvoja visceralne gojaznosti.

1.2.1.3 Lipoliza

Lipidi se skladište u masnom tkivu u obliku triacilglicerola (eng. *triacylglycerol*, TAG), koji se još nazivaju i trigliceridima, i sastoje se od tri masne kiseline vezane za glicerol. Prilikom procesa lipolize, odnosno razgradnje deponovanih lipida, enzimi lipaze razgrađuju trigliceride na slobodne masne kiseline i glicerol. Adipozna lipaza triglicerida (eng. *adipose*

triglyceride lipase, ATGL) je enzim koji ograničava brzinu lipolize i odgovorna je za prevođenje TAG-a u DAG uz oslobađanje jednog molekula slobodnih masnih kiselina, što predstavlja prvi korak lipolize (Peckett et al., 2011; Trites and Clugston, 2019). Lipaza osetljiva na dejstvo hormona (eng. *hormone sensitive lipase*, HSL) takođe je sposobna da razgradi TAG do DAG-a, ali u manjoj meri od ATGL. Njena primarna funkcija je konverzija DAG-a u monoacilglicerol, tokom koje se oslobađa još jedan molekul slobodnih masnih kiselina. Enzim HSL se nalazi u citoplazmi i u bazalnom stanju ima malu lipolitičku aktivnost, dok se u stimulisanoj stanju premešta u masne kapi gde ostvaruje značajan uticaj na lipolizu. U završnoj fazi lipolize, razgradnja monoacilglicerola do glicerola i trećeg molekula slobodnih masnih kiselina je katalizovana enzimom monoacilglicerol lipazom (eng. *monoacylglycerol lipase*, MGL) (Ahmadian et al., 2010; Duncan et al., 2007). Masne kiseline dobijene lipolizom se, u većini slučajeva, vezuju za albumin, ili se u formi triglicerida, kao komponenta VLDL-a ili hilomikrona, prenose krvotokom do drugih tkiva (Duncan et al., 2007). Ipak, deo slobodnih masnih kiselina ostaje unutar adipocita gde deluju kao unutarćelijski signalni medijatori, supstrati za sintezu drugih masnih kiselina i lipida, regulatori transkripcije gena ili prolaze kroz proces reesterifikacije kako bi ponovo sintetisali trigliceride (Zechner et al., 2012).

1.2.2 Lipidni metabolizam u jetri

Iako je belo masno tkivo primarni organ za akumulaciju triglicerida, jetra takođe skladišti značajne količine lipida u uslovima poremećene energetske homeostaze. Povećano skladištenje masnih kiselina u jetri predstavlja metabolički poremećaj koji je povezan sa gojaznošću, hiperglikemijom, insulinskom rezistencijom i hipertenzijom. Mehanizmi koji dovode do povećanog deponovanja masnih kiselina i triglicerida u jetri su (Geisler and Renquist, 2017):

- Povećana koncentracija triglicerida u ishrani koji u jetru dospevaju kao hilomikronske čestice iz creva;
- Povećanje priliva masnih kiselina u jetru poreklom od lipolize masnog tkiva i naknadnom konverzijom u trigliceride;
- Povećana sinteza triglicerida u jetri iz masnih kiselina nastalih *de novo* lipogenezom;
- Inhibicija β -oksidacije masnih kiselina u mitohondrijama hepatocita;
- Smanjen izvoz lipida iz jetre u vidu lipoproteina veoma niske gustine.

Lipidni metabolizam je strogo regulisan udruženim dejstvom transkripcionih regulatora, unutarćelijskih signalnih puteva, jedarnih receptora i hormona. Poremećaji koji utiču na priliv masnih kiselina u jetru, njihovu *de novo* sintezu i konverziju u trigliceride i/ili oksidaciju, doprinose poremećenoj homeostazi lipida u jetri i razvoju lipotoksičnosti, inflamacije i NAFLD-a (Enjoji et al., 2016).

1.2.2.1 Preuzimanje slobodnih masnih kiselina iz cirkulacije

Koncentracija slobodnih masnih kiselina u plazmi je direktno povezana sa prilivom masnih kiselina u jetru, što ukazuje na mehanizam zavisano od koncentracije, posebno za masne kiseline sa kratkim ili srednjim lancem. Shodno tome, Lavoie i kolege su sugerisali da jetra može delovati kao pufer za priliv masnih kiselina iz masnog tkiva, i na taj način neutralisati njihovu toksičnost (Lavoie and Gauthier, 2006). Hepatociti preuzimaju masne kiseline uglavnom iz dva izvora: hidrolizom esterifikovanih masnih kiselina iz triglicerida koji se transportuju hilomikronima iz creva, i/ili neesterifikovanih masnih kiselina, koje nastaju hidrolizom kompleksnih lipida u masnom tkivu tokom perioda posta (Canbay et al., 2007). Proces preuzimanja masnih kiselina zavisi od broja i aktivnosti transporternih proteina i translokaza eksprimiranih na plazma membrani hepatocita. Među njima, najznačajni su protein transportera masnih kiselina (eng. *fatty acid transporter protein*, FATP), kaveolin,

protein koji vezuje masne kiseline (eng. *fatty acid binding protein*, FABP) i translokaza masnih kiselina (eng. *fatty acid translocase*, FAT/CD36) (Berlanga et al., 2014). Iako je ekspresija FAT/CD36 u jetri slabije izražena, pokazano je da je njegova koncentracija pozitivno korelisana sa koncentracijom triglicerida u steatoznoj jetri kod pacova, kao i kod osoba sa NAFLD-om (Alves-Bezerra and Cohen, 2018). Takođe, povećanje nivoa ovog transportera u jetri je povezano sa insulinskom rezistencijom, hiperinsulinemijom i povećanom steatozom kod pacijenata sa NASH-om (Miquilena-Colina et al., 2011).

1.2.2.2 *De novo* lipogeneza u jetri

U normalnim fiziološkim uslovima, putevi *de novo* lipogeneze u jetri se retko koriste. Međutim, u uslovima pozitivnog energetskeg balansa i povećanog priliva masnih kiselina u jetru, povećan nivo *de novo* lipogeneze značajno doprinosi razvoju masne jetre. *De novo* lipogeneza je složen metabolički proces koji obuhvata sintezu i elongaciju masnih kiselina i formiranje triglicerida od produkata katabolizma ugljenih hidrata. Prvi korak u ovom putu je katalizovan ATP-citrat liazom (eng. *ATP-citrate lyase*, ACLY), koja prevodi citrat u acetil-CoA, a koji se zatim karboksilira u malonil-CoA pomoću enzima ACC (Alves-Bezerra and Cohen, 2018). Kod sisara se enzim ACC javlja u dve izoforme: citosolna ACC1, koja je važna za *de novo* lipogenezu i ACC2, koja se nalazi na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani i reguliše β -oksidaciju. ACC2 proizvodi malonil-CoA koji potom inhibira karnitin palmitoiltransferazu 1 (eng. *carnitine palmitoyltransferase*, CPT1), enzim koji je odgovoran za premeštanje masnih kiselina iz citosola u mitohondrijalni matriks gde se odigrava proces β -oksidacije (McGarry et al., 1978). Enzim ACC1 je inhibiran fosforilacijom od strane AMP-aktivirane protein kinaze (eng. *AMP-activated protein kinase*, AMPK) i cAMP-zavisne protein kinaze. Pored fosforilacije, aktivnost ACC1 može biti inhibirana i većom koncentracijom malonil-CoA i palmitoil-CoA (Wallace and Metallo, 2020). Sledeći korak u *de novo* lipogenezi predstavlja prevođenje malonil-CoA u palmitat, pri čemu je ovaj proces katalizovan enzimom FAS. Zajedničkim delovanjem elongaze dugog lanca masnih kiselina (eng. *elongation of very long chain fatty acids protein 6*, ELOVL6) i SCD1, palmitat se dalje modifikuje u različite vrste masnih kiselina (Alves-Bezerra and Cohen, 2018).

Tokom *de novo* sinteze triglicerida, enzimi glicerol-fosfat aciltransferaza (eng. *G3P acyltransferase*, GPAT) i acilglicerol-fosfat aciltransferaza (eng. *acylglycerol-3-phosphate acyltransferases*, AGPAT) vrše prevođenje masnih kiselina u fosfatidnu kiselinu (Coleman and Lee, 2004). Ona se dalje defosforiliše delovanjem fosforilaze fosfatidne kiseline (eng. *phosphatidic acid phosphatase*, PAP) da bi se dobio DAG. DAG aciltransferaza (DGAT) katalizuje acilaciju DAG-a, što predstavlja završni korak sinteze triglicerida. Novosintetizovani molekuli triglicerida se zatim deponuju u citoplazmi u vidu lipidnih kapi (Sanders and Griffin, 2016).

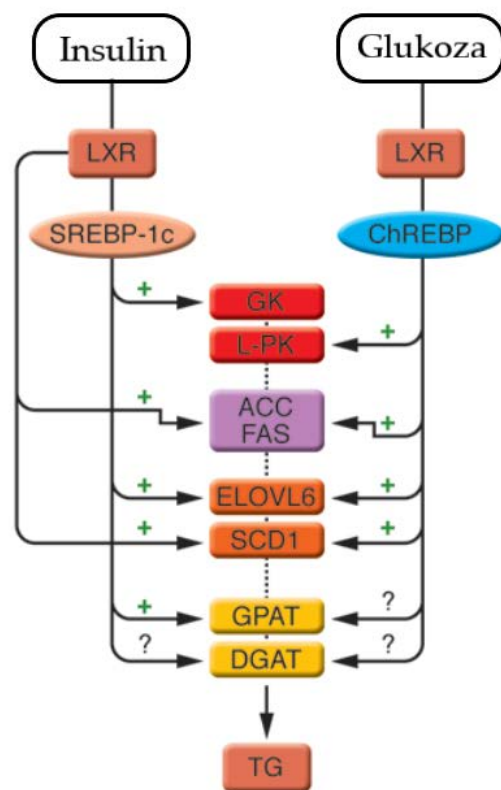
Mnogi enzimi koji su uključeni u *de novo* lipogenezu i sintezu triglicerida su prvenstveno regulisani na nivou transkripcije. Transkripciona aktivacija lipogenih gena se postiže preko složenih mehanizama koji uključuju više faktora transkripcije i javlja se u odgovoru na aktivnost insulina i glukoze. Insulin aktivira specifične kinaze i fosfataze koje modifikuju faktore transkripcije, uključujući SREBP1c, protein koji reaguje na ugljene hidrate (eng. *carbohydrate responsive element binding protein*, ChREBP) i receptor jetre X (eng. *liver X receptor α/β* , LXRA/ β) (Wallace and Metallo, 2020). Specifični metaboliti glukoze, koji se povećavaju nakon obroka, utiču na funkciju ili lokalizaciju nekih od ovih faktora transkripcije koji se zatim regrutuju u promotorske regione lipogenih gena formirajući komplekse sa drugim faktorima transkripcije (Wang et al., 2015). SREBP1c je transkripcioni faktor koji reguliše ekspresiju skoro svih gena uključenih u sintezu masnih kiselina i triglicerida, među kojima su ACC, FAS, ELOVL6, SCD1, kao i mitohondrijalna GPAT (Choi and Ginsberg, 2011). Insulin stimuliše aktivnost SREBP1c promovišući njegovu fosforilaciju, što dovodi do

povećane akumulacije zrelog oblika SREBP1c. Nasuprot tome, AMPK, koji je marker ćelijskih zaliha energije, smanjuje ekspresiju SREBP1c i inhibira lipogenezu, dok stimuliše oksidaciju masnih kiselina (Enjoji et al., 2016). Pored SREBP1c, LXR α/β je takođe prepoznat kao važan regulator lipogenih gene (FAS, ACC i SCD1), ali je uključen i u kontrolu transkripcije SREBP1c od strane insulina. Glukoza stimuliše ekspresiju ChREBP i LXR α/β u jetri, kao i transkripciju gena ACC, FAS i SCD1 (Saponaro et al., 2015). Činjenica da je LXR α/β ključni regulator SREBP1c, ali i da reguliše aktivnost ChREBP tokom ekspresije glikolitičkih i lipogenih gena, ukazuje na veoma bitnu ulogu insulina i glukoze u regulaciji lipogeneze u jetri (Slika 1.5) (Postic and Girard, 2008).

Narušavanje ekspresije lipogenih enzima i aktivnosti regulatornih faktora, kao i pojava insulinske rezistencije u jetri, dovodi do povećane sinteze i skladištenja masnih kiselina i razvoja NAFLD-a (Byrne et al., 2009). Tačan mehanizam koji pokreće proces *de novo* lipogeneze kod pacijenata sa NAFLD-om još uvek nije poznat. Jedan od centralnih pokretača bi mogla biti aktivacija proteina SREBP1c i ChREBP, u odgovoru na povećanje nivoa insulina i glukoze u krvi usled pojave sistemske insulinske rezistencije. Pored toga, pokazano je da poremećena signalizacija leptina u centralnom nervnom sistemu moduliše *de novo* lipogenezu, a inflamatorna signalizacija i stres endoplazmatskog retikuluma dodatno utiču na aktivaciju transkripcionih regulatora koji pokreću ekspresiju enzima *de novo* lipogeneze (Reddy and Rao, 2006).

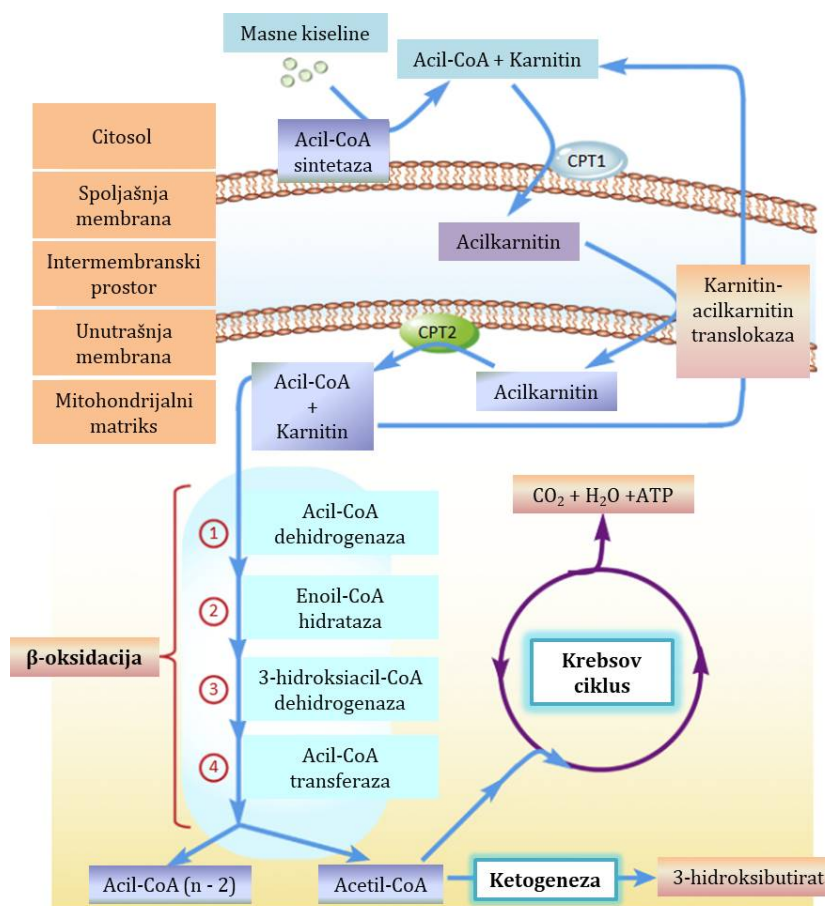
1.2.2.3 β -oksidacija masnih kiselina u jetri

Oksidacija masnih kiselina obezbeđuje glavni izvor energije tokom perioda gladovanja. U takvim uslovima dolazi do povećanja koncentracije glukagona, što uzrokuje povećan priliv masnih kiselina iz masnog tkiva u jetru. Stoga, β -oksidacija masnih kiselina igra ključnu ulogu u metabolizmu masti, a poremećaji u oksidaciji doprinose stanju masne jetre. β -oksidacija masnih kiselina dobijenih hidrolizom triglicerida u jetri, cirkulišućih lipida ili tokom procesa *de novo* lipogeneze, dešava se unutar mitohondrija i peroksizoma (Canbay et al., 2007). Unutar mitohondrija se oksiduju masne kiseline kratkog (<C4), srednjeg (C4-C12) i dugog lanca (C12-C20), dok se toksične i veoma dugolančane (C20-C26) masne kiseline oksiduju unutar peroksizoma (Alves-Bezerra and Cohen, 2018). Masne kiseline kratkog i srednjeg lanca prolaze mitohondrijalnu membranu bez aktivacije, dok dugolančane masne kiseline moraju biti aktivirane da bi se stvorio ATP i acetil-CoA i omogućio njihov uvoz iz citosola u mitohondrije. Ovaj proces zahteva dve uzastopne reakcije katalizovane enzimima koji



Slika 1.5. Regulacija ekspresije lipogenih gena u jetri. Transkripcioni regulatori SREBP1c, LXR α/β i ChREBP regulišu ekspresiju enzima uključenih u sintezu triglicerida. Signalni putevi insulina i glukoze se aktiviraju kao odgovor na ugljene hidrate u ishrani i sinergistički indukuju ekspresiju gena. Preuzeto i modifikovano iz (Postic and Girard, 2008).

ograničavaju brzinu β oksidacije. Prvi od njih je enzim CPT1, koji je smešten na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani. Drugi enzim je CPT2 smešten na unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani (Enjoji et al., 2016; Xiong, 2018). Aktivnost enzima CPT1, ali ne i CPT2, inhibirana je interakcijom sa malonil-CoA, ranim intermedijerom *de novo* lipogeneze (Nguyen et al., 2008). Malonil-CoA reguliše ulazak masnih kiselina u mitohondrije, a njegova inhibicija povećava nivo β -oksidacije i smanjuje sadržaj triglicerida u hepatocitima. Da bi masne kiseline mogle da prođu kroz membrane i uđu u organele, potrebno je da se razgrade pomoću acil-CoA-sintetaze do acil-CoA. Tokom procesa β -oksidacije unutar mitohondrija, acil-CoA se prevodi u acetil-CoA, koji ulazi u ciklus trikarboksilne kiseline ili se prevodi u ketonska tela (Slika 1.6) (Xiong, 2018).



Slika 1.6. Šematski prikaz β -oksidacije masnih kiselina. U citosolu se dugolančane masne kiseline aktiviraju i formiraju acil-CoA, koji se esterifikuje u acilkarnitin pomoću CPT1, enzima koji se nalazi na spoljašnjoj membrani mitohondrija. Acilkarnitin se zatim transportuje u mitohondrijalni matriks i prevodi u acil-CoA i karnitin pomoću enzima CPT2, koji se nalazi na unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani. Potom, acil-CoA ulazi u proces β -oksidacije i njegovi krajnji proizvodi se mogu dalje metabolisati u Krebsovom ciklusu ili učestvovati u ketogenezi. Preuzeto i modifikovano iz (Xiong, 2018).

Ekspresija gena uključenih u mitohondrijalnu i ekstramitohondrijalnu oksidaciju masnih kiselina je u velikoj meri regulisana aktivnošću PPAR α , koji stimuliše transkripciju gena i formiranje ketonskih tela. Konkretno, PPAR α pojačava ekspresiju hidroksiacil-CoA dehidrogenaze (eng. *hydroxyacyl-CoA dehydrogenase*, HADH), dugolančane acil-CoA dehidrogenaze (eng. *long-chain acyl-CoA dehydrogenase*, LCAD), CPT1, kao i gena uključenih u peroksizomalnu β -oksidaciju (Mandard et al., 2004). PPAR α funkcioniše i kao senzor lipida reagujući na priliv masnih kiselina u jetru. U slučaju produženog gladovanja, povećani priliv

masnih kiseline može dovesti do neefikasnosti PPAR α sistema i pojave steatoze jetre, što je primećeno kod PPAR $\alpha^{-/-}$ miševa. Ove životinje ne uspevaju da oksiduju unete masne kiseline i posledično razviju tešku steatozu jetre (Reddy and Rao, 2006).

Ekspresija gena uključenih u β -oksidaciju je dodatno regulisana i koaktivator 1 α receptorom aktiviranog peroksizomalnim proliferatorom (eng. *peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator-1 α* , PGC-1 α). Ovaj jedarni hormonski receptor koaktivira PPAR α i dovodi do povećanja enzimskog kapaciteta za β -oksidaciju masnih kiselina, Krebsov ciklus i oksidativnu fosforilaciju. Takođe, PGC-1 α stimuliše biogenezu mitohondrija i povećava njihovu respiratornu funkciju (Lin et al., 2005; Vega et al., 2000).

1.2.2.4 Oslobođanje triglicerida iz jetre

Poslednji korak u lipidnom metabolizmu u jetri obuhvata oslobođanje triglicerida u obliku VLDL-a i njihov transport u mišiće radi oksidacije, kao i u masno tkivo za skladištenje. Sinteza VLDL-a je proces iz dva koraka koji počinje u lumenu endoplazmatskog retikuluma. U prvom koraku, protein za prenos mikrozomalnih triglicerida (eng. *microsomal triglyceride transfer protein*, MTP) vrši translaciju apolipoprotein B 100 (apoB 100) i inkorporira malu količinu triglicerida u njega (Gordon et al., 1995). U drugom koraku, dodatni trigliceridi se pakuju u čestice koje sadrže apoB100 u nastajanju, dok prelaze iz endoplazmatskog retikuluma u Goldžijev aparat, i formiraju VLDL čestice koje se uklanjaju iz jetre egzocitozom (Cohen and Fisher, 2013).

Brojna istraživanja su ukazala na postojanje veze između povećane sekrecije VLDL-a i metaboličkih bolesti, kao što su insulinska rezistencija, NAFLD i dijabetes. Razvoj insulinske rezistencije i narušavanje regulatornih mehanizama za pakovanje i oslobođanje VLDL čestica dovodi do akumulacije triglicerida u jetri, zahvaljujući povećanom unosu masnih kiselina iz belog masnog tkiva i povećanoj *de novo* lipogenezi. Veća dostupnost triglicerida zajedno sa većom aktivnošću enzima MTP promoviše prekomernu proizvodnju VLDL čestica i intenzivno oslobođanje triglicerida u plazmu (Alves-Bezerra and Cohen, 2018; Cohen and Fisher, 2013). Usled toga su poremećaji u održavanju metaboličke ravnoteže, kao što su metabolički sindrom i NAFLD, praćeni istovremeno povećanom koncentracijom triglicerida i u cirkulaciji i u jetri (Choi and Ginsberg, 2011).

1.2.3 Hormonska regulacija lipidnog metabolizma

Glavni hormoni uključeni u metabolizam lipida su glukokortikoidi, insulin, glukagon, kateholamini i hormon rasta. Koncentracije ovih hormona se menjaju u hroničnim patološkim stanjima kao što su gojaznost, dijabetes, NAFLD i kardiovaskularne bolesti, što zauzvrat dovodi do promena u tkivnim lipidima (Bhathena, 2000).

Glukokortikoidni hormoni regulišu mnoštvo fizioloških procesa, uključujući metabolizam, imunski odgovor, rast i razviće, reprodukciju, pamćenje, i imaju izrazito važnu ulogu u normalnom funkcionisanju centralnog nervnog i kardiovaskularnog sistema (Chrousos et al., 2004). Metabolički efekti glukokortikoida su povezani sa fiziološkim mehanizmima koji mogu dovesti do pojave sistemske i periferne insulinske rezistencije, hiperglikemije i dislipidemije. U normalnim okolnostima, insulin se luči kao odgovor na unos hrane i stimuliše unos glukoze u tkiva, dok istovremeno inhibira glukoneogenezu. Glukokortikoidi deluju antagonistički, ali i sinergistički u odnosu na insulin, što zavisi od vrste tkiva, unosa hrane, ali i od interakcije sa kateholaminima, koji se luče kao odgovor na stres (Sapolsky et al., 2000). Brojne *in vivo* i *in vitro* studije su pokazale da prekomerna ekspresija glukokortikoidnog receptora (GR) u β -ćelijama pankreasa može direktno da inhibira oslobođanje insulina (Akalestou et al., 2020). Dodatno, glukokortikoidni hormoni smanjuju

sekreciju insulina indukujući apoptozu u β -ćelijama pankreasa. U jetri, glukokortikoidi inhibiraju dejstvo insulina stimulišući transkripciju glukoneogenih enzima, fosfoenolpiruvat karboksikinaze (eng. *phosphoenolpyruvate carboxykinase*, PEPCK) i glukozo-6-fosfataze (eng. *glucose-6-phosphatase*, G6PC) (Vegiopoulos and Herzig, 2007). Takođe, glukokortikoidi povećavaju ekspresiju PGC-1 α , koji stimuliše ekspresiju gena za G6PC (Rahimi et al., 2020). Pored toga što ima važnu ulogu u hepatičkoj glukoneogenezi, PEPCK predstavlja ključni enzim u glicerogenezi (*de novo* sinteza 3-glicerofosfata iz aminokiselina i piruvata) u adipocitima, obezbeđujući na taj način prekursore za sintezu triglicerida (Reshef et al., 2003). Za razliku od jetre, GR negativno reguliše ekspresiju gena *PEPCK* u adipocitima i na taj način, glukokortikoidi inhibiraju skladištenje masnih naslaga i smanjuju veličinu masnog tkiva (Vegiopoulos and Herzig, 2007).

Efekti glukokortikoida na adipocite se razlikuju u zavisnosti od tipa masnog tkiva. Glukokortikoidi stimuliše lipolizu u potkožnom masnom tkivu, dok u visceralnom masnom tkivu stimulišu diferencijaciju i hipertrofiju adipocita (Rahimi et al., 2020). Delujući antagonistički u odnosu na insulin, glukokortikoidi stimulišu lipolizu i oslobađanje masnih kiselina iz adipocita indukujući ekspresiju ključnih enzima lipolize: HSL i ATGL (Peckett et al., 2011; Shen et al., 2017). Delovanje glukokortikoida na povećanje razgradnje triglicerida i oslobađanje slobodnih masnih kiselina direktno utiče na sistemsku insulinsku osetljivost.

S obzirom na to da su glukokortikoidi široko okarakterisani kao „lipolitički“ u delovanju, zanimljivo je da su ovi hormoni povezani sa adipoznošću kada se daju egzogeno ili kada su povišeni usled prekomerne endogene proizvodnje. Povećana koncentracija glukokortikoida koja se javlja u odgovoru na stres, ili usled narušenog tkivnog metabolizma glukokortikoida posredovanog enzimom 11 β -hidroksisteroid dehidrogenaza-1 (eng. *11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-1*, 11 β HSD-1), ima direktne efekte na adipocite i masno tkivo, dovodeći do hipertrofije, hiperplazije i izmenjene produkcije hormona u masnom tkivu. U stanju sitosti, glukokortikoidi deluju sinergistički sa insulinom i stimulišu ekspresiju lipogenih gena, *ACC* i *FAS* (Gathercole et al., 2011). Dodatno, glukokortikoidi povećavaju unos i skladištenje masnih kiselina delujući na aktivnost enzima LPL, bilo povećanjem transkripcije ili posttranslacionim modifikacijama (povećana aktivacija ili smanjena degradacija). Na ovaj način bi mogla da se objasni povećana akumulacija visceralnog masnog tkiva kod osoba sa povišenim nivoima glukokortikoida (Peckett et al., 2011). Sa druge strane, kateholamini deluju na suprotan način u odnosu na glukokortikoide, dovodeći do smanjenja ekspresije i aktivnosti LPL-a (Ong et al., 1992). Pored hipertrofije, glukokortikoidi mogu dovesti i do hiperplazije masnog tkiva usled stimulacije ekspresije transkripcionog faktora PPAR γ , što dovodi do povećane diferencijacije preadipocita u zrele adipocite (Tomlinson et al., 2006). Takođe, povišeni nivo enzima 11 β HSD-1 u adipocitima utiče na adipogeni PPAR γ signalni put prilikom diferencijacije preadipocita u zrele ćelije (Liu et al., 2006).

Hronično povećana koncentracija glukokortikoidnih hormona je povezana i sa pojavom masne jetre i razvojem steatoze, kao što je primećeno kod metaboličkog sindroma. Glukokortikoidi iz egzogenih i endogenih izvora su dobro poznati uzrok nastanka NAFLD-a. Pacijenti sa Kušingovim sindromom, koji imaju povećani nivo glukokortikoida u cirkulaciji, razvijaju karakterističan metabolički fenotip centralne gojaznosti, insulinske rezistencije i dijabetesa. Veliki broj ovih pacijenata ima i steatozu jetre (Dowman et al., 2009). Mehanizmi pomoću kojih glukokortikoidni hormoni podstiču akumulaciju masti u jetri uključuju aktivaciju ključnih lipogenih enzima, ACC i FAS, kao i stimulaciju sinteze i sekrecije VLDL-a iz jetre, pri čemu glukokortikoidi deluju sinergistički sa insulinom (Rahimi et al., 2020). Pored toga, pokazano je da glukokortikoidi inhibiraju β -oksidaciju mitohondrijalnih masnih kiselina smanjujući transkripcionu aktivnost PPAR α , čime dalje doprinose unutarćelijskoj akumulaciju lipida (Lettéron et al., 1997). Međutim, većina pacijenata sa NAFLD-om ima normalni nivo

kortizola u cirkulaciji, što sugerira da metaboličku disfunkciju pokreću tkivno-specifični mehanizmi. Ovo je dovelo do pojave interesovanja za ispitivanje enzima 11 β HSD-1, koji igra ključnu ulogu u lokalnom metabolizmu i dostupnosti glukokortikoida za vezivanje i aktiviranje GR-a. Istraživanja tokom poslednjih decenija su utvrdila ključnu ulogu glukokortikoida u izazivanju teških metaboličkih poremećaja, kao što su hiperglikemija ili NAFLD. Međutim, dok su efekti glukokortikoida na metabolizam glukoze u jetri detaljno analizirani na molekularnom nivou, mehanizmi dejstva glukokortikoida na metabolizam lipida i razvoj masne jetre još uvek nisu rasvetljeni.

1.3 Glukokortikoidni hormoni

Glukokortikoidni hormoni (kortizol kod ljudi, kortikosteron kod glodara) spadaju u steroidne hormone neophodne za život. Oni se sintetišu i oslobađaju iz nadbubrežne žlezde na cirkadijalni način, delujući na skoro svako tkivo i organ. Glukokortikoidi imaju ulogu u održavanju homeostaze u odgovoru na normalne dnevne promene metabolizma, ali i u uslovima stresa, pa se još nazivaju i hormonima stresa.

Otkriće anti-inflamatornog dejstva glukokortikoida je predstavljalo veliki napredak u lečenju inflamatornih poremećaja. Glukokortikoidi regulišu imunski odgovor na ćelijskom i na transkripcionom nivou (Busillo and Cidlowski, 2013). Na ćelijskom nivou, glukokortikoidi indukuju apoptozu T limfocita, neutrofila, bazofila i eozinofila, i na taj način smanjuju inflamaciju. U modelu sepse izazvane lipopolisaharidom (LPS) pokazano je da glukokortikoidi inhibiraju p38 MAPK signalni put i na taj način moduliraju proizvodnju citokina u makrofagima. Takođe, kod alergijskih poremećaja, glukokortikoidi smanjuju inflamaciju regulacijom ekspresije IL-1 β , hemoatraktantnog proteina monocita-1 (eng. *monocyte chemoattractant protein-1*), proteina 10 indukovano IFN- γ (eng. *interferon- γ -inducible protein 10*) i inflamatornog proteina makrofaga-2 (eng. *macrophage inflammatory protein-2*) (Busillo and Cidlowski, 2013; Cruz-Topete and Cidlowski, 2015). Mehanizmi inhibicije transkripcione aktivnosti glukokortikoidima uključuju smanjenje aktivnosti transkripcionih regulatora AP-1 (eng. *activator protein-1*) i NF- κ B. Dakle, primarno anti-inflamatorno dejstvo glukokortikoida se ostvaruje putem inhibicije transkripcije mnoštva pro-inflamatornih gena koji kodiraju citokine, hemokine, molekule ćelijske adhezije, inflamatorne enzime i receptore, sa ciljem da se obnovi homeostaza. Iako se delovanje glukokortikoida obično opisuje kao anti-inflamatorno, studije sugeriraju da glukokortikoidi mogu imati i pro-inflamatorno dejstvo kao odgovor na akutni stres (Cruz-Topete and Cidlowski, 2015). Pokazano je da glukokortikoidi indukuju ekspresiju porodice receptora sličnih NOD-u, konkretno pirinskog domena koji sadrži gen 3 (eng. *pyrin domain containing 3 gene*, NLRP3), centralne komponente inflamazoma u makrofagima. Ovako stimulirana ekspresija NLRP3 dovodi do aktivacije makrofaga i sinteze pro-inflamatornih citokina TNF, IL-1 β i IL-6 (Busillo et al., 2011). Ovi naizgled suprotni efekti glukokortikoida funkcionišu zajedno kao odbrambeni mehanizam imunskog sistema da prvobitno odgovori na stresor, a potom i da smanji imunski odgovor kako bi se uspostavila ravnoteža (Busillo et al., 2011).

Neravnoteža u fiziološkom nivou glukokortikoida može dovesti do patoloških stanja, kao što su teške kardiovaskularne, metaboličke i imunološke komplikacije uočene kod Adisonove bolesti i Kušingovog sindroma. Adisonovu bolest karakteriše smanjeni nivo glukokortikoida u cirkulaciji, a uzrokovana je autoimunskim odgovorom na korteks nadbubrežne žlezde, bolešću hipofize ili naslednom disfunkcijom sinteze glukokortikoida. Usled nastalog nedostatka pravilnog delovanja glukokortikoida javlja se smanjena otpornost na stres, hipertrofija limfoidnog tkiva, hipoglikemija i gubitak težine (Nieman and Chanco Turner, 2006). Nasuprot tome, pacijenti sa Kušingovim sindromom, usled trajne

hipersekreције glukokortikoida i povećanja koncentracije glukokortikoida u cirkulaciji, imaju kliničku sliku koja se karakteriše pojavom visceralne gojaznosti, hipertenzijom, smanjenjem mišićne mase, povećanjem nivoa holesterola, masnom jetrom, hiperglikemijom i insulinskom rezistencijom (Shibli-Rahhal et al., 2006). Mnoge od navedenih komplikacija povećanog nivoa glukokortikoida takođe predstavljaju i komponente metaboličkog sindroma. Metabolički sindrom se opisuje kao skup blisko povezanih metaboličkih poremećaja, kao što su hipetrigliceridemija, hipertenzija, hiperglikemija i smanjena tolerancija na glukozu. Ovo metaboličko stanje je obično povezano sa gojaznošću, starenjem, sedentarnim načinom života i genetskom predispozicijom, i može dovesti do pojave ateroskleroze, dijabetesa tipa 2 i kardiovaskularnih bolesti (Vegiopoulos and Herzig, 2007).

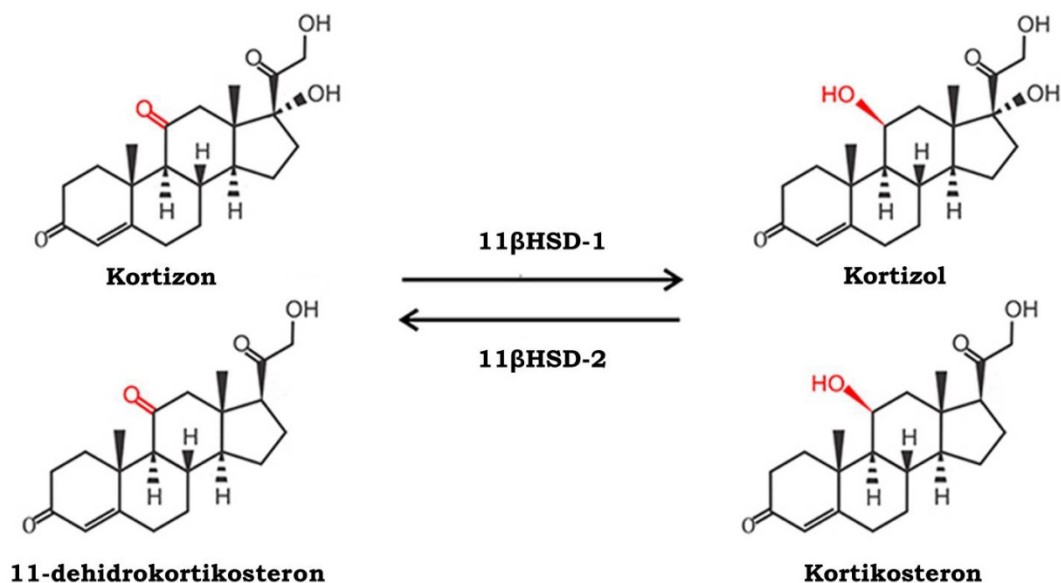
Zbog svog snažnog anti-inflamatornog i imunosupresivnog delovanja, glukokortikoidi su danas jedni od najčešće propisivanih lekova za lečenje inflamatornih i autoimunskih bolesti uključujući sepsu, alergije, astmu, reumatoidni artritis i multiplu sklerozu. Nažalost, terapijske prednosti glukokortikoida su ograničene kod hronične upotrebe, pojavom teških neželjenih efekata, kao što su hipertenzija, osteoporoza, atrofija kože, abdominalna gojaznost, dijabetes i glaukom. Dodatno, pacijenti na dugotrajnoj terapiji glukokortikoidima često razvijaju tkivno-specifičnu rezistenciju na glukokortikoide (Ramamoorthy and Cidlowski, 2016).

1.3.1 Prereceptorski metabolizam glukokortikoida

Glukokortikoidni hormoni se sintetišu u kori nadbubrežne žlezde u odgovoru na aktivaciju fiziološkim stimulusom, kao što je stres. Sinteza i lučenje glukokortikoidnih hormona je pod kontrolom neuroendokrinog sistema povratne sprege, hipotalamo-hipofizo-adrenokortikalne (HHA) ose. Aktivacija HHA ose počinje sekrecijom hipotalamičnog kortikotropin-osobađajućeg hormona (eng. *corticotropin-releasing hormone*, CRH), koji stimuliše transkripciju hipofiznog pro-opiomelanokortina (POMC) gena. Sintetisani POMC stimuliše proizvodnju adrenokortikotropnog hormona (eng. *adrenocorticotropic hormone*, ACTH) u hipofizi, i posledično sintezu i oslobađanje glukokortikoidnih hormona iz nadbubrežne žlezde. Veće koncentracije glukokortikoidnih hormona u cirkulaciji inhibiraju ekspresiju gena *CRH* na nivou hipotalamusa, i smanjuju transkripciju POMC i sekreciju ACTH u prednjem režnju hipofize, čime se uspostavlja negativna povratna sprega (Engelmann et al., 2004). Neaktivna forma glukokortikoida se u plazmi uglavnom transportuje u slobodnom nevezanom obliku, dok se aktivni glukokortikoidi najvećim delom transportuju i održavaju u neaktivnom stanju vezani za kortikosteroid-vezujući globulin (eng. *corticosteroid-binding globulin*, CBG), i u manjoj meri za albumin (Hammond, 2016). Nivo glukokortikoida u cirkulaciji prolazi kroz cirkadijalne varijacije, dostižući svoju najveću vrednost rano ujutru, dok se najniža vrednost javlja oko ponoći. Glodari, kao noćne životinje, pokazuju suprotan obrazac cirkadijalnog ritma, sa najnižim nivoima glukokortikoida u cirkulaciji u ranim jutarnjim satima i maksimalnom koncentracijom oko ponoći (Wang, 2005).

Zbog svoje lipofilne prirode, slobodni glukokortikoidi difunduju kroz ćelijsku membranu da bi izvršili svoju funkciju. Međutim, stvarna biodostupnost glukokortikoidnih hormona u citoplazmi je regulisana ravnotežom između aktivnih i neaktivnih oblika glukokortikoida. Dva enzima su odgovorna za prereceptorski metabolizam glukokortikoida, odnosno za konverziju iz neaktivnog kortizona (11-dehidrokortikosteron kod miševa) u aktivni kortizol (kortikosteron, kod miševa). Enzim 11 β HSD-1 katalizuje konverziju kortizona u kortizol (11-dehidrokortikosterona u kortikosteron), dok enzim 11 β HSD-2 (eng. *11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-2*, 11 β HSD 2) katalizuje suprotnu reakciju (Slika 1.7) (Draper and Stewart, 2005; Timmermans et al., 2019). Ovi enzimi se nalaze u membrani endoplazmatičnog retikuluma i regulišu aktivaciju glukokortikoidnih i mineralokortikoidnih

receptora. Ekspresija ovih enzima je tkivno specifična, a 11β HSD-1 i 11β HSD-2 se međusobno razlikuju po fiziološkoj ulozi, afinitetu za supstrat i specifičnosti kofaktora (Timmermans et al., 2019).



Slika 1.7. Konverzija neaktivnih formi glukokortikoida u aktivnu formu glukokortikoida.

Neaktivni kortizon i 11-dehidrokortikosteron se prevode u aktivni kortizol i kortikosteron pomoću 11β -hidroksisteroid dehidrogenaze-1 (11β HSD-1), i ponovo se inaktiviraju pomoću 11β -hidroksisteroid dehidrogenaze-2 (11β HSD-2). Preuzeto i modifikovano iz (Timmermans et al., 2019).

Enzim 11β HSD-2 je dehidrogenaza koja pretvara kortizol u kortizon kod ljudi, odnosno kortikosteron u 11-dehidrokortikosteron kod glodara, i u tom procesu koristi nikotinamid adenin dinukleotid (eng. *nicotinamide adenine dinucleotide*, NAD^+) kao kofaktor. Ovaj enzim se eksprimira u tkivima sa visokom ekspresijom mineralokortikoidnog receptora, kao što su bubrezi, debelo crevo, pljuvačne žlezde i placenta. Na taj način, enzim 11β HSD-2 sprečava vezivanje glukokortikoida za mineralokortikoidne receptore i reguliše homeostazu soli i vode u organizmu (Draper and Stewart, 2005; Seckl, 2004).

Iako enzim 11β HSD-1 funkcioniše i kao reduktaza i dehidrogenaza, u *in vivo* uslovima gotovo uvek ima reduktaznu aktivnost, pri čemu prevodi neaktivne forme glukokortikoida u aktivne. Za njegovu enzimsku aktivnost je neophodan redukovani NADPH kao kofaktor, koga sintetiše heksozo-6-fosfat dehidrogenaza (eng. *hexose-6-phosphate dehydrogenase*, H6PDH). Enzim H6PDH generiše NADPH od $NADP^+$ u reakciji oksidacije glukozo-6-fosfata u 6-fosfoglukonolakton, i nalazi se u lumenu endoplazmatičnog retikuluma fizički spregnut sa enzimom 11β HSD-1 (Draper and Stewart, 2005). 11β HSD-1 je visoko ekspimiran u metabolički aktivnim tkivima, kao što su masno tkivo, jetra, skeletni mišići, mozak i pluća, gde održava glukokortikoide u aktivnom stanju u skladu sa energetske potrebama tkiva (Walker and Stewart, 2003).

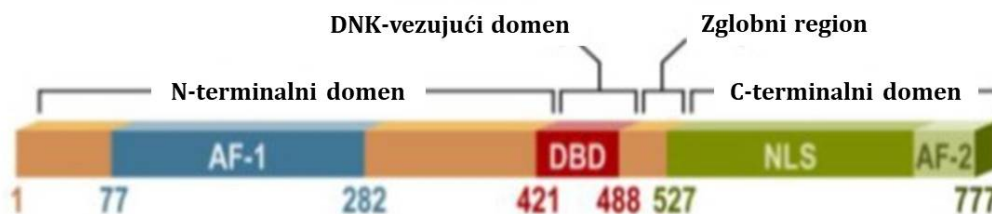
Kao što je već spomenuto, pacijenti sa Kušingovim sindromom imaju razvijenu centralnu gojaznost i povišen nivo glukokortikoida u plazmi (Bujalska et al., 1997). Sa druge strane, kod visceralne gojaznosti i metaboličkog sindroma nivo kortizola u plazmi je normalan ili čak niži, što sugeriše da bi metabolizam kortizola mogao biti narušen u perifernim tkivima, i to preko enzima 11β HSD-1. Zaista, brojne studije o gojaznosti na životinjama i ljudima su pokazale da su nivo iRNK za 11β HSD-1, kao i njegova enzimska aktivnost značajno povećani u masnom tkivu, dok je nivo proteina 11β HSD-1 u jetri smanjen (Masuzaki et al., 2001; Rask et al., 2001). Posledično, povišen nivo kortizola u masnom tkivu dovodi do metaboličkih

poremećaja, kao što su hiperlipidemija, insulinska rezistencija, dijabetes tipa 2 i hipertenzija, dok se normalni nivo kortizola u cirkulaciji održava netaknutom HHA osom (Seckl et al., 2004). Dodatno, pokazano je da inhibicija 11 β HSD-1 smanjuje telesnu težinu i nivo lipida i poboljšava toleranciju na glukozu kod životinjskih modela, dok kod ljudi povećava osetljivost jetre na insulin (Dowman et al., 2009). Istraživanja u kojima je genetičkim modifikacijama izazvana prekomerna ekspresija enzima 11 β HSD-1 u jetri pokazala su da u takvim uslovima dolazi do akumulacije lipida u jetri, kao i povećane ekspresije jedarnih receptora, LXR α i PPAR α (Paterson et al., 2004). Činjenica da ovi transgeni miševi nisu gojazni ukazuje na autonomnu ulogu glukokortikoidnog signalnog puta u kontroli metabolizma lipida u jetri (Paterson et al., 2007, 2004).

1.3.2 Glukokortikoidni receptor

Na ćelijskom nivou, fiziološko delovanje glukokortikoida je posredovano GR-om, članom superfamilije jedarnih receptora. Ovaj ligand-zavisni transkripcioni regulator je protein od 97 kDa koji je konstitutivno eksprimiran u skoro svakoj ćeliji tela, i neophodan je za život (Oakley and Cidlowski, 2013). Ipak, glukokortikoidi ispoljavaju ćelijske i tkivno specifične efekte usled postojanja različitih izoformi GR-a, s jedne strane, i alosteričnih signala specifičnih za ćeliju koji utiču na funkciju GR-a, s druge strane (Weikum et al., 2017).

Protein GR je sastavljen od tri glavna domena: N-terminalnog transaktivacionog domena (eng. *N-terminal transactivation domain*, NTD), centralnog DNK-vezujućeg domena (eng. *DNA-binding domain*, DBD) i C-terminalnog domena odgovornog za vezivanje liganda (eng. *ligand binding domain*, LBD) (Slika 1.8) (Kumar and Thompson, 2005). DNK-vezujući domen je najkonzerviraniji domen i sadrži dva motiva cinkovih prstiju koji omogućavaju prepoznavanje i vezivanje za ciljne DNK sekvence koje su regulisane glukokortikoidima (eng. *glucocorticoid responsive element*, GRE). N-terminalni domen poseduje funkciju aktivacije transkripcije (eng. *activation function-1*, AF-1), koja je u interakciji sa koregulatorima i mašinerijom za bazalnu transkripciju, i predstavlja primarno mesto za posttranslacione modifikacije. C-terminalni domen formira hidrofobni džep za vezivanje glukokortikoida i takođe sadrži aktivacionu funkciju (AF2) koja stupa u interakciju sa koregulatorima na način zavisian od liganda. Između DNK-vezujućeg domena i domena za vezivanje liganda se nalazi zglobni region (eng. *hinge*), pri čemu ovi regioni sadrže signal za premeštanje receptora u jedro (Bledsoe et al., 2002; Kadmiel and Cidlowski, 2013).



Slika 1.8. Struktura glukokortikoidnog receptora. GR je modularni protein koji sadrži N-terminalni transaktivacioni domen (NTD), DNK-vezujući domen (DBD) i C-terminalni domen za vezivanje liganda (LBD). Preuzeto i modifikovano iz (Kadmiel and Cidlowski, 2013).

Kada hormon nije vezan za receptor, GR se nalazi u citoplazmi ćelija kao deo velikog multiproteinskog kompleksa koji uključuje šaperonske proteine toplotnog stresa (eng. *heat*

shock proteins, HSPs) HSP90, HSP70 i p23 i imunofilne porodice FK506: FKBP51 (eng. *FK506 binding protein*) i FKBP52 (Pratt and Toft, 1997). Ovi proteini održavaju receptor u konformaciji koja je transkripciono neaktivna, ali favorizuje vezivanje liganda visokog afiniteta. Nakon vezivanja glukokortikoidnog hormona, GR se aktivira i podleže konformacionoj promeni što dovodi do disocijacije GR proteina iz kompleksa. Ovo strukturno preuređenje dovodi do oslobađanja regiona koji sadrže signal za jedarnu lokalizaciju, nakon čega se GR premešta u jedro. U jedru, aktivirani GR stupa u interakciju sa GRE sekvencama na ciljnim genima i reguliše njihovu ekspresiju na pozitivan ili negativan način (Kadmiel and Cidlowski, 2013). Ukoliko je vezan za pozitivne GRE sekvence, receptor prolazi kroz dodatne konformacione promene koje dovode do angažovanja koregulatora i kompleksa za remodeliranje hromatina, koji dalje utiču na aktivnost RNK polimeraze II (Jenkins et al., 2001). Neki od primera pozitivne regulacije GR-om su geni koji kodiraju MKP-1, serum/glukokortikoidom regulisanu kinazu 1 (eng. *serum/glucocorticoid regulated kinase 1*), leucinski rajsferšlus indukovan glukokortikoidima (eng. *glucocorticoid-induced leucine zipper*) i tristetraprolin. Sa druge strane, kada se GR veže za negativne GRE sekvence dolazi do regrutovanja korepresora i smanjene ekspresije nekih od sledećih gena: β -arestina, osteokalcina i samog gena *GR* (Kadmiel and Cidlowski, 2013).

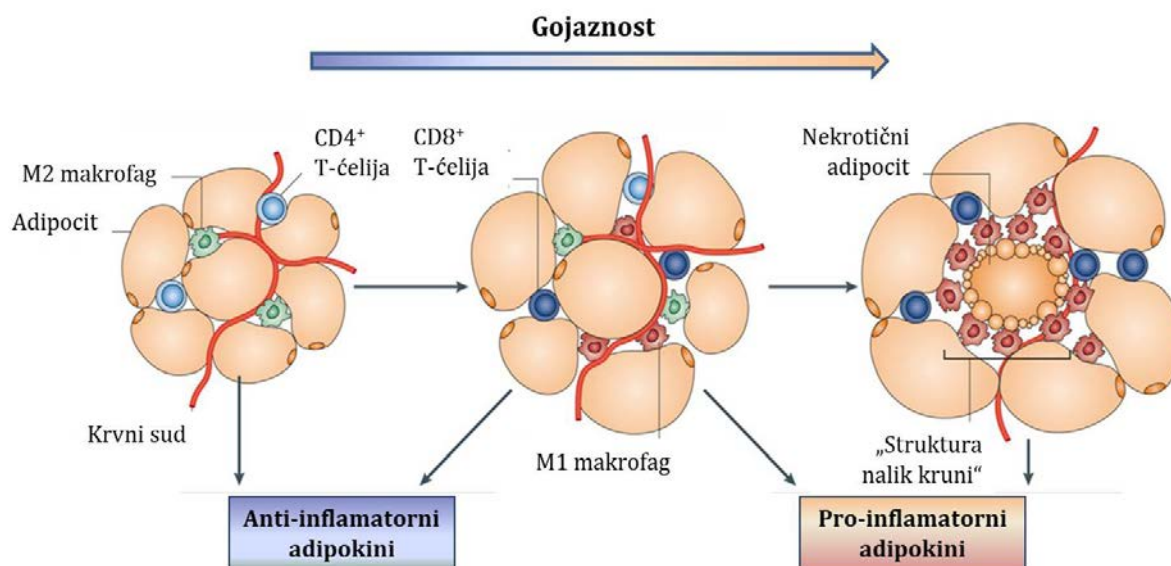
Pored direktne regulacije transkripcije vezivanjem za specifične regulatorne sekvence, GR reguliše transkripciju ciljnih gena i na indirektan način, fizičkom interakcijom sa drugim transkripcionim faktorima, kao što su NF- κ B i AP-1. Vezujući se direktno za Jun podjedinicu AP-1a i p65 subjedinicu NF- κ B, GR inhibira aktivnost ovih pro-inflamatornih transkripcionih faktora i na taj način ostvaruje svoje anti-inflamatorno dejstvo (Nissen and Yamamoto, 2000; Yang-Yen et al., 1990).

1.4 Metabolička inflamacija

Metabolička inflamacija ili „metainflamacija“ predstavlja hroničnu inflamaciju niskog intenziteta koja može biti izazvana prekomernim unosom hrane i narušavanjem metaboličke ravnoteže. Ovakav tip inflamacije je prisutan u svim tkivima koja su uključena u održavanje energetske homeostaze, uključujući masno tkivo, jetru, mišiće i debelo crevo. Metabolička inflamacija može dovesti do razvoja gojaznosti, dislipidemije, dijabetesa tipa 2, insulinske rezistencije i predstavlja jednu od glavnih karakteristika metaboličkog sindroma (Monteiro and Azevedo, 2010; Russo et al., 2021).

Gojaznost, odnosno akumulacija lipida u visceralnom masnom tkivu praćena hiperplazijom i hipertrofijom adipocita, dovodi do hipoksije, oskidativnog i mehaničkog stresa i smrti adipocita. Ekspanzija masnog tkiva je povezana sa aktivacijom inflamatornog odgovora i lokalnom infiltracijom različitih inflamatornih ćelija, naročito makrofaga (Longo et al., 2019). Makrofagi su najzastupljeniji leukociti u VAT-u miševa i ljudi, čiji broj raste kao posledica povećanja više faktora, uključujući slobodne masne kiseline, holesterol i lipopolisaharide (Weisberg et al., 2003). Makrofagi masnog tkiva (eng. *adipose tissue macrophages*, ATM) klasifikovani su u dva glavna podtipa: M1 aktivirani makrofagi sa pro-inflamatornim svojstvima, i M2 aktivirani makrofagi povezani sa anti-inflamatornim profilom (Castoldi et al., 2015). U masnom tkivu zdravih životinja i ljudi su najviše zastupljeni makrofagi sa M2 fenotipom, koji oslobađaju anti-inflamatorne citokine, kao što su TGF β (eng. *transforming growth factor β*), IL-10 i IL-1RA (eng. *interleukin-1 receptor antagonist*) (Lumeng et al., 2007). Zahvaljujući oslobađanju ovih medijatora, makrofagi doprinose održavanju insulinske osetljivosti u adipocitima i inhibiraju deregulaciju i inflamaciju masnog tkiva. Kod gojaznosti, hipertrofični adipociti ispoljavaju nekrotične abnormalnosti, što sprečava normalno funkcionisanje masnog tkiva, izaziva inflamaciju i infiltraciju monocita oko nekrotičnih

adipocita gde se diferenciraju u pro-inflamatorne M1 makrofage formirajući „strukturu nalik kruni“ (Slika 1.9) (Longo et al., 2019).



Slika 1.9. Podtipovi makrofaga u masnom tkivu i formiranje „strukture nalik kruni“.

Makrofagi u normalnom masnom tkivu izražavaju markere za M2 alternativno aktivirane makrofage, dok gojaznost dovodi do regrutovanja i akumulacije M1 ili klasično aktiviranih makrofaga. Metabolički disfunkcionalno masno tkivo proizvodi velike količine pro-inflamatornih faktora i povezano je sa višim nivoima nekroze adipocita, pri čemu se M1 makrofagi raspoređuju oko ovih mrtvih ćelija formirajući „strukturu nalik kruni“. Preuzeto i modifikovano iz (Ouchi et al., 2011).

M1-polarizovani makrofagi sekretuju različite inflamatorne citokine, uključujući TNF, IL-6, IL-1 β i IL-8, koji doprinose lokalnoj i sistemske inflamaciji i insulinske rezistenciji. Ovi makrofagi takođe oslobađaju hemokine da bi regrutovali nove monocite i druge imunske ćelije (Lumeng et al., 2007).

Ključnu ulogu u polarizaciji makrofaga u masnom tkivu ima faktor inhibicije migracije makrofaga (eng. *macrophage migration inhibitory factor*, MIF). Iako je poznato da ovaj plejotropni citokin reguliše metaboličku inflamaciju kao glavni regulator mnogih pro-inflamatornih citokina koji su karakteristični za status M1 polarizacije, njegova uloga u metaboličkoj inflamaciji još uvek nije dovoljno razjašnjena (Morrison and Kleemann, 2015; Verschuren et al., 2009).

1.4.1 Faktor inhibicije migracije makrofaga (MIF)

MIF je prvi put opisan '60-ih godina prošlog veka, kao proizvod aktiviranih T-ćelija koji inhibira nasumične migracije makrofaga (Bloom and Bennett, 1966). U periodu između 1970. i 1989. godine, brojna istraživanja su pokazala da MIF poboljšava funkcije monocita i makrofaga, međutim, biološke aktivnosti MIF-a su ostale nepoznate sve do 1989. godine kada je kloniran ljudski MIF (Weiser et al., 1989). Par godina kasnije, istraživanja novih regulatora inflamacije dovela su do ponovnog otkrivanja MIF-a kao molekula koji, slično hormonu, oslobađaju ćelije prednje hipofize nakon izlaganja endotoksinu LPS-u (Bernhagen et al., 1993). Ovo otkriće ukazalo je na potencijalnu ulogu MIF-a kao posrednika koji povezuje imunski, endokrini i nervni sistem. Sa druge strane, rendgenska kristalografija pacovskog i humanog MIF-a je ukazala na potencijalnu enzimsku aktivnost MIF-a na osnovu njegove

trodimenzionalne strukture i sličnosti sa prokariotskim enzimima (Sugimoto et al., 1996; Suzuki et al., 1996). O aktivnosti proteina MIF i njegovim karakteristikama saznalo se nešto više nakon proizvodnje bioaktivnog rekombinantnog MIF-a i neutrališućih antitela, dok su miševi sa deletiranim genom *Mif* (*MIF knockout*, *Mif*^{-/-}) dodatno doprineli rasvetljavanju funkcije proteina MIF (Bozza et al., 1999).

Poznato je da se gen *MIF* konstitutivno eksprimira u brojnim tkivima, poput pluća, kože, gastrointestinalnog i urinarnog trakta, kao i u različitim endokrinim žlezdama (β ćelije pankreasa, ćelije jajnika, testisa, hipotalamusa, nadbubrežne žlezde i hipofize) i ćelijama imunskog sistema (T i B ćelije, monociti/makrofagi, neutrofili, eozinofili, bazofili, mastociti) (Toso et al., 2008). U ćelijama se MIF skladišti u prethodno formiranim, citoplazmatskim strukturama i brzo se oslobađa u odgovoru na različite aktivirajuće stimulse. Među njima, najznačajni su proliferativni signali, hipoksija, lipopolisaharidi u monocitima/makrofagima, mitogeni u T ćelijama, citokin IL-5 u eozinofilima, faktor oslobađanja kortikotropina u ćelijama hipofize, kao i povećanje nivoa glukoze u β -ćelijama pankreasnih ostrvaca i u adipocitima (Calandra and Roger, 2003; Fingerle-Rowson and Bucala, 2001; Simons et al., 2011). Ovaj visoko konzervirani protein molekulske težine 12.5 kDa svoju biološku funkciju ostvaruje vezivanjem za transmembranski protein CD74, što dovodi do fosforilacije i aktivacije proteina CD44 i pokretanja, kako urođenog, tako i adaptivnog imunskog odgovora (Toso et al., 2008). Endotoksini i različiti inflamatorni citokini, uključujući TNF i IFN- γ (eng. *interferon gamma*), povećavaju ekspresiju gena *MIF* i oslobađanje proteina od strane makrofaga, dok IL-10 inhibira njegovo oslobađanje. MIF stimuliše proizvodnju TNF, ciklooksigenaze 2 (eng. *cyclooxygenase 2*, COX2) i prostaglandina E2 (PGE2), pojačavajući inflamacijsku reakciju (Calandra and Roger, 2003). Takođe, MIF povećava proizvodnju receptora za TNF i tip 1 IL-1 na različitim ćelijama, kao i proizvodnju receptora sličnog Toll-u (eng. *Toll-like receptor 4*, TLR4) na makrofagima (Roger et al., 2001; Toh et al., 2006). Kada se oslobodi, MIF dovodi do migracije makrofaga i limfocita na mesto inflamacije, čime se povećava odgovor urođenog imunskog sistema i propagira adaptivni odgovor. MIF ima značajnu ulogu u adaptivnom imunskom odgovoru, delujući autokrino na limfocite. MIF promoviše oslobađanje IL-2 i TNF, povećava ekspresiju gena koji kodira IL-2 receptor (CD25), i stimuliše aktivaciju i proliferaciju T i B ćelija (Bacher et al., 1996). Svoje pro-inflamatorno dejstvo MIF ostvaruje i delujući na glukokortikoidne hormone koji imaju anti-inflamatornu ulogu. Niska koncentracija glukokortikoida dovodi do oslobađanja MIF-a iz T limfocita i makrofaga. Oslobođeni MIF se suprotstavlja inhibitornom dejstvu glukokortikoida na ekspresiju citokina u makrofagima (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8), kao i u aktiviranim T-limfocitima (IL-2, IFN- γ) (Bacher et al., 1996; Calandra et al., 1995). Na ovaj način, MIF i glukokortikoidi deluju antagonistički i tako modulišu urođeni i adaptivni imunski odgovor.

Novija istraživanja ukazuju da MIF, pored primarne uloge u regulaciji urođenog i adaptivnog imunskog odgovora, ima ulogu i u energetskom metabolizmu. MIF je ekspimiran u metabolički aktivnim tkivima, kao što su masno tkivo i jetra, pri čemu je njegova ekspresija regulisana glukozom i insulinom (Sakaue et al., 1999). Štaviše, MIF je ko-lokalizovan sa insulinom unutar sekretornih granula β -ćelija pankreasa i modulator je oslobađanja insulina (Waeber et al., 1997). Sve veći broj dokaza sugerije da MIF može da kontroliše inflamatorne i metaboličke procese u patogenezi gojaznosti i povezanih poremećaja, uključujući insulinsku rezistenciju, dijabetes tipa 2 i NAFLD.

MIF se pokazao kao važan posrednik u gojaznosti, kao i potencijalni biomarker za gojaznost. Nekoliko kliničkih studija je pokazalo da je nivo proteina MIF povećan u plazmi gojaznih osoba, u poređenju sa mršavim osobama. Dodatno, uočeno je smanjenje njegove koncentracije nakon uspešnog gubitka težine (Dandona et al., 2004). Pored toga, pokazano je da je ekspresija iRNK za *MIF* kod gojaznih subjekata i životinjskih modela u pozitivnoj

korelaciji sa BMI i koncentracijom slobodnih masnih kiselina u plazmi (Finucane et al., 2012; Skurk et al., 2005; Veličković et al., 2013). Takođe, ustanovljeno je da veličina adipocita pozitivno koreliše sa infiltracijom ATM-a (Weisberg et al., 2003). Ove nalaze su podržali Koska i saradnici koji su dokumentovali pozitivnu korelaciju između MIF-a i prečnika adipocita, kao i negativnu korelaciju sa perifernim i hepatičkim delovanjem insulina u izolovanim ljudskim adipocitima i preadipocitima (Koska et al., 2009).

Jedna od najvažnijih komplikacija gojaznosti je hiperglikemija i izmenjen metabolizam glukoze. Mnoga istraživanja podržavaju ulogu MIF-a u insulinskoj rezistenciji i povezuju dijabetes tipa 2 sa povećanom koncentracijom MIF-a u cirkulaciji (Sánchez-Zamora and Rodriguez-Sosa, 2014). Kao što je već pomenuto, MIF reguliše fiziološku sekreciju insulina, dok produžena sistemska inflamacija remeti homeostazu glukoze izazivajući poremećaj glukozne tolerancije, što može dovesti do apoptoze pankreasnih ostrvaca (Atsumi et al., 2007; Stojanovic et al., 2012). Dodatno, studije na miševima su pokazale da MIF direktno doprinosi metaboličkim poremećajima u masnom tkivu izazivajući hroničnu inflamaciju koja je nezavisna od TNF signalnog puta, kao i da posreduje u razvoju insulinske rezistencije (Atsumi et al., 2007).

Osim što dovodi do razvoja insulinske rezistencije i dijabetesa tipa 2 kod gojaznosti, smatra se da metabolička inflamacija može da uzrokuje i razvoj NAFLD-a, pri čemu važnu ulogu ima MIF (Morrison and Kleemann, 2015). Studije na životinjskim modelima su pokazale da MIF ima ulogu u razvoju steatoze, inflamacije i fibroze jetre. Delujući na ekspresiju lipogenih gena, MIF ostvaruje štetne efekte na akumulaciju lipida u jetri nakon ishrane obogaćene mastima (eng. *high-fat diet*, HFD) (Finucane et al., 2014; Heinrichs et al., 2014). Kod hemijski izazvane fibroze jetre, MIF može imati zaštitne efekte, verovatno delujući na razrešenje fibroze. Međutim, rezultati kliničke studije kod pacijenata sa NAFLD-om ukazuju na suprotno, pokazujući da je povećana ekspresija MIF-a u jetri povezana sa povećanim rizikom od fibroze. Ovo neslaganje se može objasniti razlikama u etiologiji bolesti u hemijski izazvanom oštećenju jetre korišćenom u eksperimentalnim modelima bolesti, u poređenju sa metabolički indukovanim oštećenjem jetre koje je tipično za razvoj NAFLD-a kod ljudi (Morrison and Kleemann, 2015).

Dosadašnje studije na životinjama i ljudima ističu MIF kao potencijalnu terapijsku metu kod metaboličkih poremećaja. Da bi se u potpunosti razumeo doprinos MIF-a razvoju bolesti povezanih sa gojaznošću, potreban je rad na otkrivanju tkivno specifičnih efekata MIF-a, kao i komunikacije između organa koja je posredovana MIF-om u cirkulaciji. Dodatno, buduće studije koje ispituju složenu interakciju između metaboličke i inflamatorne ravnoteže bi trebalo da poboljšaju naše razumevanje razvoja bolesti povezanih sa gojaznošću i uloge MIF-a u njima.

1.4.1.1 Fiziološke posledice delecije gena *Mif*

Kao što je već pomenuto, MIF predstavlja važan medijator u procesima inflamacije i imunskog odgovora, ali takođe ima ulogu i u regulaciji energetskeg metabolizma i razvoju metaboličkih poremećaja, kao što su dijabetes i gojaznost (Grieb et al., 2010). Detaljno ispitivanje funkcija MIF-a omogućeno je 1999. godine, kada je napravljen soj miševa kod koga je deletiran gen *Mif* (*Mif*^{-/-}) (Bozza et al., 1999). Iako su *Mif*^{-/-} životinje bile zdrave, primećene su određene razlike u odnosu na njihove C57BL/6J parnjake "divljeg tipa" (eng. *wild type*, *wt*), a koje se tiču pojave gojaznosti, poremećaja inflamatornog statusa i insulinskog signalnog puta.

Ispitujući ulogu citokina MIF tokom sepsa, Bozza i saradnici su pokazali da su *Mif*^{-/-} miševi otporniji na smrtonosne efekte visokih doza bakterijskog LPS-a, ili *Staphylococcus aureus* enterotoksina B, u odnosu na "divlji tip" miševa (Bozza et al., 1999). U plazmi ovih

životinja je zabeležen niži nivo TNF, dok su nivoi interleukina IL-6 i IL-10 ostali nepromenjeni, u poređenju sa *wt* parnjacima. Dodatno, nakon stimulacije LPS-om i IFN- γ , makrofagi ovih *Mif*^{-/-} miševa ispoljavaju smanjenu proizvodnju TNF, normalnu proizvodnju IL-6 i IL-12 i povećanu proizvodnju azot-monoksida. Do sličnih otkrića su došli i *Roger* i saradnici (*Roger et al.*, 2001), koji su pokazali da *Mif*^{-/-} makrofagi slabo reaguju na LPS i Gram-negativne bakterije u poređenju sa ćelijama "divljeg tipa", usled smanjenja aktivnosti NF- κ B i proizvodnje TNF i IL-6. Ova hiporeaktivnost je posledica smanjene regulacije TLR4 molekula koji prenosi signal lipopolisaharidnog receptora. Ove studije identifikuju važnu ulogu MIF-a u urođenom imunitetu i pružaju molekularnu osnovu za otpornost *Mif*^{-/-} miševa na endotoksični šok.

Kada je u pitanju uloga MIF-a u održavanju homeostaze ugljenih hidrata i lipida u fiziološkom okruženju, ispitivanja su pokazala da su *Mif*^{-/-} miševi imali nižu telesnu masu od rođenja do 4. meseca starosti, u poređenju sa *wt* miševima. Međutim, *Mif*^{-/-} miševi su brže dobijali na težini tokom kasnijih meseci, što je rezultiralo većom telesnom masom u dobi od 12 meseci (*Serre-Beinier et al.*, 2010). Manja telesna masa kod mladih miševa je bila povezana sa većom potrošnjom energije, a veća masa kod starijih miševa sa povećanim unosom hrane i većom masom masnog tkiva. Nasuprot ovim saznanjima, *Verschuren* i saradnici su izvestili da je nedostatak gena *Mif* kod miševa sa deletiranim receptorom za LDL (*Ldlr*^{-/-}) imao efekte na infiltraciju i inflamaciju makrofaga, ali nije uticao na samu gojaznost i lipidni status miševa (*Verschuren et al.*, 2009). Oni su pokazali da je nedostatak proteina MIF doveo do smanjenja inflamacije u VAT-u i jetri, što je utvrđeno na osnovu nižih nivoa amiloida A i fibrinogena u serumu *Mif*^{-/-} životinja. Sa druge strane, nivo holesterola, triglicerida i slobodnih masnih kiselina je ostao nepromenjen u plazmi *Mif*^{-/-} miševa, u poređenju sa *wt* miševima, kao i koncentracije VLDL-a, LDL-a i HDL-a. Moguće objašnjenje za različita otkrića koja se tiču pojave gojaznosti u ove dve studije moglo bi da bude to što su *Verschuren* i saradnici koristili MIF i LDL miševe sa dvostrukim nokautom u svojim eksperimentima.

Kada je insulinski signalni put u pitanju, nekoliko studija na modelima genetski modifikovanih miševa kojima nedostaje gen *Mif* je imalo za cilj da otkrije ulogu MIF-a, kako u nepatološkoj homeostazi glukoze, tako i u stanju gojaznosti i/ili rezistenciji na insulin. U već pomenutoj studiji, *Serre-Beinier* i saradnici su pokazali da nedostatak MIF-a sa starenjem dovodi do povećanja nivoa insulina u krvi, poremećene tolerancije na glukozu, ali ne i do pojave insulinske rezistencije (*Serre-Beinier et al.*, 2010). Ovi rezultati su u skladu sa istraživanjima *Nikolic* i saradnika (*Nikolic et al.*, 2013; *Vujicic et al.*, 2014), koja su pokazala da miševi sa deletiranim genom *Mif* imaju oštećenu signalizaciju insulina u jetri i masnom tkivu. To se odrazilo na njihov odgovor na intraperitonealni test tolerancije na glukozu (eng. *Intraperitoneal glucose tolerance test*, IP-GTT), tokom kojeg su *Mif*^{-/-} miševi imali sličan insulinski odgovor kao *wt* miševi, ali su pokazali poremećaj u klirensu glukoze. Međutim, drugi autori su pokazali da *Mif*^{-/-} miševi imaju poboljšanu insulinsku osetljivost i toleranciju na glukozu, kao i da delecija gena *Mif* smanjuje sistemsku inflamaciju i štiti miševe od razvoja insulinske rezistencije (*Kleemann and Bucala*, 2010; *Verschuren et al.*, 2009).

1.4.1.2 MIF i glukokortikoidi u regulaciji inflamacije i energetskeg metabolizma

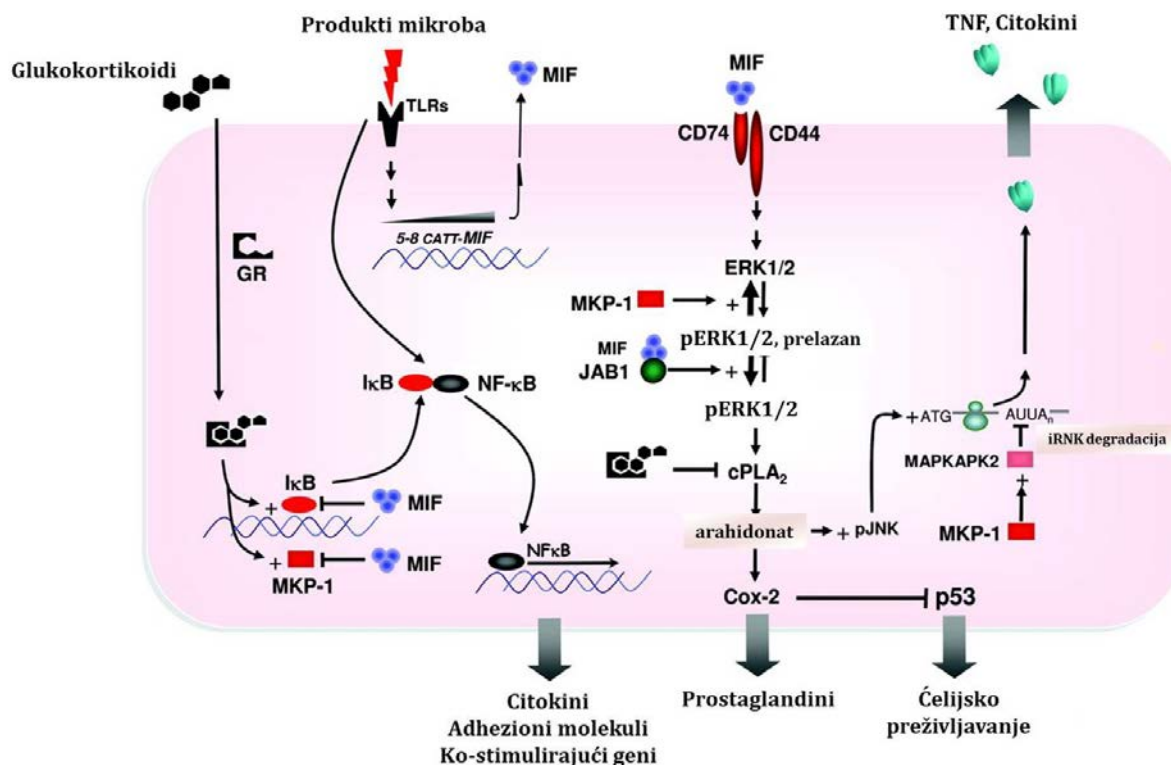
MIF je regulator imunskog odgovora i deluje antagonistički u odnosu na glukokortikoide, koji, kao što je već navedeno, inhibiraju proizvodnju citokina i transkripciju brojnih gena. Takođe, MIF utiče na transkripcionu regulaciju genske ekspresije, kao i na posttranskripcionu regulaciju gena za citokine. U tom smislu, iako ne postoji direktna interakcija između MIF-a i glukokortikoidnih hormona, ona se može ostvariti preko transkripcionih regulatora. Na taj način, MIF i glukokortikoidi imaju ključnu ulogu u kontroli inflamacije i imunskog odgovora domaćina (*Calandra and Bucala*, 2017).

Početa zapažanja *Bernhagena* i saradnika (Bernhagen et al., 1993) da se MIF sekretuje iz istog tipa ćelija hipofize koje luče i ACTH koji stimuliše lučenje glukokortikoida u nadbubrežnim žlezdama, dovelo je do studija koje su imale za cilj da razjasne funkcionalne interakcije između ovih medijatora imunskog odgovora. U daljim istraživanjima je primećeno da fiziološki nivo glukokortikoida stimuliše oslobađanje MIF-a iz monocita/makrofaga i T limfocita kod miševa (Bacher et al., 1996; Calandra et al., 1995). Kada se oslobodi, MIF prevazilazi inhibitorne efekte glukokortikoida na proizvodnju TNF, IL-1 β , IL-6 i IL-8 od strane monocita stimulisanih LPS-om *in vitro*, i inhibira zaštitne efekte steroida protiv smrtonosne endotoksemije *in vivo*. MIF takođe antagonizuje glukokortikoidnu inhibiciju proliferacije T ćelija u *in vitro* uslovima obnavljanjem proizvodnje IL-2 i IFN- γ (Bacher et al., 1996). Dodatna istraživanja su pokazala da primena visokih doza glukokortikoida povećava nivo proteina MIF u tkivima glodara i u serumu kod ljudi (Fingerle-Rowson and Bucala, 2001). U takvim uslovima, MIF i glukokortikoidi deluju lokalno sa ciljem kontrole imunosupresivnih efekata glukokortikoida, čija se koncentracija dodatno može povećati usled sistemskog odgovora na stres, teške traume ili infekcije opasne po život. Dakle, antagonistički efekti MIF-a na dejstvo glukokortikoidnih hormona predstavljaju mehanizam pomoću kojeg domaćin održava funkcionalni imunski odgovor tokom situacija visoke endogene proizvodnje glukokortikoida (Flaster et al., 2007). Nakon ovih otkrića, usledila su brojna istraživanja sa ciljem da se razjasni funkcionalna interakcija između MIF-a i glukokortikoida, ali molekularni mehanizmi kojima se MIF suprotstavlja delovanju glukokortikoida još uvek nisu u potpunosti rasvetljeni. Jedan od potencijalnih mehanizama odnosi se na sposobnost MIF-a da aktivira signalni put ERK1/2 (Mitchell et al., 1999). Aktivirani ERK fosforiliše niz citosolnih proteina i transkripcionih faktora, uključujući citosolnu fosfolipazu A2 (eng. *cytosolic phospholipase A2*, cPLA2), koja je važna komponenta pro-inflamatorne kaskade. Njen proizvod, arahidonska kiselina, predstavlja prekursor za sintezu prostaglandina i leukotriena. Arahidonska kiselina takođe aktivira signalni put JNK, koji je neophodna za efikasnu translaciju iRNK za *TNF* i druge citokine (Swanek et al., 1997). Pošto je cPLA2 važna meta za anti-inflamatorno dejstvo glukokortikoida, MIF aktivira cPLA2 u prisustvu imunosupresivnih koncentracija glukokortikoida, i na taj način nadjačava imunosupresiju posredovanu ovim hormonima.

Drugi mehanizam interakcije između proteina MIF i glukokortikoida predstavlja pro-inflamatorni signalni put NF- κ B. Aktiviran inflamatornim stimulusom, NF- κ B se oslobađa od inhibitornog proteina I κ B i prelazi iz citoplazme u jedro, gde aktivira transkripciju inflamatornih citokina, molekula adhezije, imunoreceptora i proteina akutne faze (Karin et al., 2004). Glukokortikoidni hormoni inhibiraju aktivaciju NF- κ B signalnog puta tako što povećavaju ekspresiju molekula I κ B, koji zatim održava NF- κ B u njegovom neaktivnom obliku i sprečava ekspresiju inflamatornih citokina (Auphan et al., 1995). U studiji objavljenoj 2000. godine, pokazano je da MIF sprečava povećanje nivoa citosolnog I κ B-a izazvanog glukokortikoidima (Daun and Cannon, 2000). Ovo omogućava prelazak NF- κ B u jedro, gde aktivira transkripciju ciljnih gena čak i u prisustvu glukokortikoidnih hormona. Međutim, s obzirom da se indukcija I κ B glukokortikoidnim hormonima javlja samo u nekoliko tipova ćelija, relevantnost ovog mehanizma glukokortikoidne imunosupresije u primarnim ćelijama i u fiziološkim uslovima ostaje nepoznata.

Sve veći broj dokaza ukazuje da je supresija mitogenom-aktivirane protein kinaze fosfataze-1 (eng. *mitogen-activated protein kinase phosphatase-1*, MKP-1) važan mehanizam kojim MIF inhibira delovanje glukokortikoida (Roger et al., 2005). Glukokortikoidni hormoni indukuju ekspresiju proteina MKP-1, koji inaktivira pro-inflamatorne ERK1/2, JNK i p38 puteve. Roger i saradnici su otkrili da MIF deluje na autokrini način kako bi prevazišao ekspresiju MKP-1 izazvanu glukokortikoidima i inhibiciju proizvodnje citokina (Roger et al., 2005). Na ovaj način je MKP-1 identifikovan kao značajna meta za delovanje MIF-a tokom posttranskripcione

regulacije proizvodnje citokina. Predloženi mehanizmi antagonističkog dejstva MIF-a na dejstvo glukokortikoida prikazani su šematski na **Slici 1.10** (Flaster et al., 2007).



Slika 1.10. Šematski prikaz imunosupresivnog dejstva MIF-a na glukokortikoide. Preuzeto i modifikovano iz (Flaster et al., 2007).

Iako su istraživanja tokom poslednjih godina dala nekoliko potencijalnih objašnjenja za antagonističko dejstvo MIF-a na glukokortikoide, potrebno je dodatno ispitati mehanizam interakcije citokina MIF i glukokortikoidnih hormona u *in vitro* i *in vivo* uslovima. Nova saznanja o ovoj interakciji mogu dovesti do razvoja terapije zasnovane na inhibiciji dejstva MIF-a kod inflamatornih stanja, koja bi dovela do smanjene upotrebe glukokortikoida, a samim tim i do smanjenja nuspojava koje se javljaju prilikom hronične upotrebe ovih lekova. Mnoge studije su ukazale na važnost MIF-a i glukokortikoida kada su glukozni metabolizam i signalni put insulina u pitanju. Međutim, njihova interakcija u metaboličkim poremećajima je manje jasna.

2. CILJ

Ishrana obogaćena fruktozom može doprineti poremećaju lipidnog metabolizma u visceralnom masnom tkivu i jetri, dovodeći do pojave inflamacije, gojaznosti i dijabetesa tipa 2. Pro-inflamatorni citokin MIF ima važnu ulogu u metaboličkoj inflamaciji kao glavni kontra-regulator dejstva glukokortikoidnih hormona, koji pored anti-inflamatornih efekata imaju ulogu i u regulaciji energetskeg metabolizma. Iako je poznato da MIF reguliše oslobađanje insulina i različite metaboličke procese, sam mehanizam metaboličkih efekata MIF-a je nedovoljno proučen.

Cilj ove doktorske disertacije je bio da se utvrdi da li MIF ostvaruje svoj uticaj na lipidni metabolizam u visceralnom masnom tkivu i jetri posredstvom glukokortikoidnih hormona u normalnim uslovima, kao i u uslovima energetskeg opterećenja izazvanog ishranom obogaćenom fruktozom. U tom cilju, ispitani su efekti nedostatka gena *Mif*, ishrane obogaćene fruktozom (20% rastvor fruktoze), kao i njihove kombinacije. U okviru ovog glavnog opšteg cilja, postavljeni su sledeći specifični ciljevi:

- ✓ Biohemijska analiza insulinske osetljivosti (određivanje koncentracije glukoze i insulina; tolerancija na glukozu i insulin) i lipidnog metabolizma (određivanje koncentracije triglicerida i slobodnih masnih kiselina u krvi), kao i karakterizacija morfoloških promena u visceralnom masnom tkivu i jetri MIF^{-/-} miševa nakon ishrane obogaćene fruktozom.
- ✓ Praćenje prereceptorskog metabolizma glukokortikoidnih hormona (ispitivanje koncentracije proteina 11 β HSD-1 i H6PDH, i nivoa tkivnog kortikosterona) i analiza glukokortikoidne signalizacije (ispitivanje koncentracije i unutarćelijska preraspodela GR-a).
- ✓ Ispitivanje ekspresije enzima uključenih u metabolizam lipida u visceralnom masnom tkivu i jetri (ispitivanje ekspresije gena za enzime lipogeneze (ACC, FAS i SCD1) u masnom tkivu i jetri i lipolize (ATGL i HSL) u masnom tkivu), koji su direktno ili indirektno regulisani GR-om.
- ✓ Ispitivanje ekspresije transkripcionih regulatora, koji su partneri GR-a u regulaciji lipidnog metabolizma (analiza koncentracije regulatora lipogeneze i adipogeneze u masnom tkivu (PPAR γ i SREBP1c), kao i regulatora lipogeneze (LXR α/β , SREBP1c i ChREBP) i β -oksidacije masnih kiselina (CPT1, PPAR α i PGC-1 α) u jetri).
- ✓ Praćenje metaboličke inflamacije u visceralnom masnom tkivu i jetri ispitivanjem ekspresije pro-inflamatornih citokina (TNF, IL-6 i IL-1 β).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

Hemikalije koje su korišćene u eksperimentima bile su *p.a.* stepena čistoće. Komercijalna hrana za miševe nabavljena je od Veterinarskog zavoda (Subotica, Srbija), dok je fruktoza proizvod firme API-Pek (Bečej, Srbija).

Od firme Sigma Aldrich (St. Louis, USA) nabavljene su sledeće hemikalije: fenilmetilsulfonil hlorid (PMSF), natrijum dodecil sulfat (eng. *sodium dodecyl sulphate*, SDS), Nonidet-P40, natrijum pirofosfat, etilendiamino tetrasirćetna kiselina (EDTA-Na₂), saharoza, HEPES (eng. *4-(2-hydroxyethyl)-1 piperazineethanesulfonic acid*), bromfenol plavo, agaroz, Folin-Ciocalteu reagens, albumin iz seruma govečeta (eng. *bovine serum albumin*, BSA), akrilamid, bisakrilamid, TEMED (eng. *tetramethylethylenediamine*), Tris baza, dietilpirokarbonat (DEPC), β-merkaptotanol i ditiotreitol (DTT). Sledeće hemikalije su nabavljene od firme SERVA electrophoresis (Heidelberg, Germany): *Ponceau S* boja, glicin i inhibitori proteaza i fosfataza. Od firme ZorkaPharm (Šabac, Srbija), nabavljeni su etanol, metanol, aceton, izopropanol, hloroform, natrijum hlorid (NaCl), glicerol, urea i ksilol. *TRIZOL*[®] reagens je kupljen od firme AmBion Life Technologies (Carlsbad, USA)

Esej za određivanje koncentracije leptina je proizvod firme R&D systems (Minneapolis, USA), dok je za određivanje koncentracije kortikosterona u visceralnom masnom tkivu i jetri korišćen esej nabavljen od firme Immunodiagnostic Systems Hld (East Boldon, UK).

Od firme Applied Biosystems (Massachusetts, USA) nabavljeni su esej za reakciju reverzne transkripcije, hemikalije korišćene za lančanu reakciju polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*; PCR) u realnom vremenu, kao i SYBR[®] Green prajmeri.

Karakteristike i proizvođači primarnih antitela, koja su korišćena u Western blot metodi, predstavljeni su u **Tabeli 3.1**. Sekundarna antitela su nabavljena od firme Abcam (Cambridge, UK). Luminol i *Tween*[®] 20 su proizvodi firme Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Marker za molekule mase je nabavljen od firme Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA).

Tabela 3.1. Karakteristike primarnih antitela koja su korišćena za detekciju proteina Western blot analizom

Primarno antitelo	Molekulska masa (kDa)	Razblaženje	Poreklo	Oznaka i proizvođač
11βHSD-1	34	1:1000	Kunić	ab393364 Abcam
H6PDH	89	1:1000	Kunić	sc-67394 Santa Cruz Biotechnology
GR	95	1:500	Kunić	sc-8992 Santa Cruz Biotechnology
PPARα	55	1:1000	Kunić	sc-9000 Santa Cruz Biotechnology
PPARγ	54/57	1:1000	Kunić	sc-7273 Santa Cruz Biotechnology
LXRα/β	50/56	1:500	Kunić	sc-271064 Santa Cruz Biotechnology
SREBP1c	68	1:500	Kunić	sc-366 Santa Cruz Biotechnology
ChREBP	95	1:2000	Kunić	NB400-135 Novus Biologicals
CD36	88	1:500	Kunić	sc-9154 Santa Cruz Biotechnology
ACC	280	1:1000	Kunić	#3676 Cell Signaling
CPT1	90	1:1000	Kunić	sc-98834 Santa Cruz Biotechnology
PGC-1α	90	1:500	Kunić	ab54481 Abcam
AMPK	63	1:1000	Kunić	sc-25792 Santa Cruz Biotechnology
p38α	38	1:500	Kunić	sc-535 Santa Cruz Biotechnology
p-p38 Tyr¹⁸²	38	1:750	Kunić	sc-7975-R Santa Cruz Biotechnology
β-aktin	42	1:10000	Miš	A5441 Sigma-Aldrich
β-aktin	42	1:10000	Kunić	ab8227 Abcam
TBP	38	1:1000	Kunić	ab51841 Abcam
Kalneksin	90	1:10000	Kunić	ab22595 Abcam

3.2. Metode

3.2.1 Gajenje i tretman eksperimentalnih životinja

U eksperimentima su korišćeni mužjaci miševa sa deletiranim genom *Mif* u homozigotnom stanju ($MIF^{-/-}$) i njihovi parnjaci "divljeg tipa" C57BL/6J (WT). Životinje su gajene u prostorijama Odgajališta za eksperimentalne životinje u Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u uslovima sa kontrolisanom temperaturom (22 ± 2 °C), konstantnom vlažnošću vazduha i sa pravilnom izmenom dnevno-noćnog režima u intervalima od 12 sati (svetla su uključivana u 07:00 h). Životinje su imale stalnu veterinarsku negu tokom celog trajanja eksperimenta.

Na početku eksperimenta, miševi starosti 2 meseca su bili nasumično podeljeni u četiri eksperimentalne grupe ($n = 12$ životinja po grupi) i gajeni su tokom devet nedelja u standardnim laboratorijskim kavezima u grupama po 4:

- **WT grupa** - C57BL/6J miševi "divljeg tipa" kojima su standardna komercijalna hrana i voda bili dostupni *ad libitum*
- **WT FrD grupa** - C57BL/6J miševi "divljeg tipa" koji su imali slobodan pristup standardnoj hrani i rastvoru fruktoze koncentracije 20% (umesto vode)
- **$MIF^{-/-}$ grupa** - C57BL/6J miševi kod kojih je genetički deletiran gen *Mif* i koji su imali slobodan pristup standardnoj hrani i vodi
- **$MIF^{-/-}$ FrD grupa** - $MIF^{-/-}$ miševi koji su imali *ad libitum* pristup standardnoj hrani i rastvoru fruktoze koncentracije 20%

Detaljan sastav standardne komercijalne hrane je dat u **Tabeli 3.2**.

Svi postupci sprovedeni na eksperimentalnim životinjama su bili u skladu sa direktivom Evropske komisije 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u eksperimentalne i druge naučne svrhe i odobreni su od strane Etičke komisije za upotrebu laboratorijskih životinja Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković " (No 2-20/10).

3.2.2 Analiza fizioloških parametara

Unos hrane i tečnosti je meren svakodnevno. Ukupni energetske unos za miševe na standardnoj ishrani je izračunat kao masa hrane (g) \times 11 kJ, dok je unos energije za miševe na ishrani obogaćenoj fruktozom izračunat kao zbir energije izražen u kJ poreklom od hrane i fruktoze (masa hrane (g) \times 11 kJ + unos fruktoze (ml) \times 3,44 kJ). Telesna masa eksperimentalnih životinja je merena nedeljno, dok su mase jetre i visceralnog masnog tkiva izmerene u trenutku žrtvovanja. Na kraju eksperimenta je izračunat i odnos mase organa (jetre i visceralnog masnog tkiva) i ukupne telesne mase.

Tabela 3.2. Sastav standardne komercijalne hrane korišćen u eksperimentu

Sastojci	g/kg
Totalni protein	200
Metionin + cistein	7.5
Ukupni ugljeni hidrati	626
Kukuruzni skrob	407.1
Celuloza	63.6
Ukupne masti	32
Vlažnost	81
Suva materija	62
Minerali	mg/kg
Kalcijum	10000
Fosfor	3500
Kalijum	9100
Sumpor	2300
Natrijum	1500
Hlor	2000
Magnezijum	2400
Gvožđe	120
Cink	100
Mangan	30
Bakar	20
Jod	0.50
Molibden	0.06
Selen	0.36
Fluor	0.20
Vitamini	U/kg
Nikotinska kiselina, mg	65.60
Pantotenska kiselina, mg	24.47
Piridoksin, mg	7.93
Tiamin, mg	9.07
Riboflavin, mg	4.46
Folna kiselina, mg	0.91
D-biotin, mg	0.58
Vitamin A, IU	10000
Vitamin D3, IU	1600
Vitamin E, IU	40
Vitamin K, mg	1.72
Vitamin B12, µg	57
Drugi sastojci	g/kg
Holin	1.97
Antioksidans	0.10

3.2.3 Priprema krvne plazme i određivanje biohemijskih parametara

Nakon tretmana koji je trajao 9 nedelja, životinje su žrtvovane brzom dekapitacijom pomoću makaza. Pre žrtvovanja, miševi su bili podvrgnuti prekonoćnom gladovanju i u tom periodu im je bila dostupna samo voda. Krv iz trupa je sakupljena u mikrotube obložene antikoagulansom, 6% etilen diamin tetra sirćetnom kiselinom (EDTA). Zatim je krv centrifugirana 10 min na 1600 g, nakon čega je izdvojena krvna plazma koja je čuvana na -20°C do dalje analize.

3.2.3.1 Karakterizacija sistemske insulinske osetljivosti

Sistemska insulinska osetljivost je bila procenjena pomoću IP-GTT testa i intraperitonealnog testa tolerancije na insulin (eng. *Intraperitoneal insulin tolerance test*, IP-ITT). IP-GTT test je urađen u 9. nedelji tretmana, pri čemu su životinje pre testa bile podvrgnute prekonoćnom gladovanju. Miševima je intraperitonealno injecirano 2 g glukoze po 1 kg telesne mase bez anestezije, kako bi se izbegao efekat anestetika na nivo i kinetiku uklanjanja glukoze. Koncentracija glukoze je izmerena iz krvi životinja zasecanjem repne vene neposredno pre injeciranja, kao i 15, 30, 60, 90 i 120 minuta nakon injeciranja. Za IP-ITT, nakon gladovanja od 4 h, miševima je injecirano intraperitonealno 0.75 IJ insulina po 1 kg telesne mase. Glukoza u krvi je merena 0, 15, 30, 60, 90 i 120 minuta nakon injekcije insulina. U oba testa koncentracija glukoze u krvi je merena *Accu-Chek Active®* trakama (*F. Hoffmann-La Roche AG*, Basel, Switzerland). Za određivanje stepena tolerancije na glukozu i insulin korišćen je matematički izveden parametar površine ispod krive nivoa glukoze u funkciji vremena (eng. *Area under the curve*, AUC).

3.2.3.2 Određivanje koncentracije glukoze, insulina, triglicerida i slobodnih masnih kiselina

Koncentracija glukoze u krvi miševa je merena automatskim analizatorom (*MultiCare* aparat) neposredno nakon žrtvovanja.

Koncentracija insulina u plazmi je komercijalno merena primenom radioimunološke metode (RIA-Insulin (PEG), #120, INEP, Beograd, Srbija) standardizovanom prema referentnom materijalu SZO 83/500. Osetljivost eseja je bila 0,6 mIU/l, dok su koeficijenti varijacije intra- i među testovima bili 2,5% i 7,7% respektivno.

Koncentracija triglicerida je merena u krvi prikupljenoj iz trupa neposredno nakon žrtvovanja *Accutrend®* trakama (*F. Hoffmann-La Roche AG*, Basel, Switzerland).

Koncentracija slobodnih masnih kiselina u plazmi određena je pomoću *Randox NEFA* (eng. *non-esterified fatty acid*, NEFA) eseja prema uputstvu proizvođača (FA115, *Randox Laboratories Ltd*, Crumlin, UK). Analiza je obavljena na Olympus AU400 hemijskom analizatoru (Olympus i Beckman Coulter, SAD) u komercijalnoj laboratoriji (VetLab, Beograd, Srbija).

3.2.3.3 Određivanje koncentracije leptina i kortikosterona

Za određivanje koncentracije leptina je korišćen ELISA (eng. *Enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) esej prema uputstvu proizvođača. Apsorbanca je merena pomoću spektrofotometra (*Multiskan Spectrum*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) na talasnoj dužini od 450 nm (korekciona talasna dužina je 570 nm). Koncentracija leptina je određena metodom zakrivljene regresione analize u *GraphPad* programu (*GraphPad Software*, San Diego, USA) i izražena je u pg/mL. Osetljivost testa je bila 22 pg/mL, dok su koeficijenti varijacije unutar i između grupa u eseju bili 3.8%, odnosno 5.0%.

Za merenje koncentracije kortikosterona u visceralnom masnom tkivu i jetri korišćen je visokoosetljivi EIA (eng. *Enzyme immunoassay*, EIA) esej prema uputstva proizvođača. Apsorbanca na 450 nm (korekciona talasna dužina je 650 nm) merena je spektrofotometrijski (*Multiskan Spectrum*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Koncentracija kortikosterona je bila određena upotrebom 4PL krive (eng. *4-parameter logistic curve*, 4PL) (*Prism*, GraphPad Software, San Diego, USA) i izražena kao ng/mg proteina. Osetljivost testa je bila 0.17 ng/mL, dok su koeficijenti varijacije intra-testa i inter-testa 5.9 i 8.9% respektivno.

3.2.3.4 Određivanje koncentracije ALT i AST

Koncentracija alanin aminotransferaze (ALT) u plazmi je određena ALT testom (OSR6107, Beckman Coulter, SAD), dok je koncentracija aspartat aminotransferaze (AST) u plazmi određena AST testom (OSR6109, Beckman Coulter, SAD) na Olympus AU400 hemijskom analizatoru (Olympus i Beckman Coulter, SAD) u komercijalnoj laboratoriji (VetLab, Beograd, Srbija). Opseg merenja ispitivanja je bio 5-7000 U/L, dok su koeficijenti varijacije unutar testova bili <1.3%.

3.2.4 Izolovanje visceralnog masnog tkiva i jetre

Nakon dekapitacije životinja, urađena je perfuzija jetre hladnim 0.9% fiziološkim rastvorom (NaCl). Zatim su jetra i visceralno masno tkivo (gonadni, perirenalni i retroperitonealni depoi belog masnog tkiva) pažljivo izolovani i izmereni. Delovi visceralnog masnog tkiva i jetre su fiksirani u 4% paraformaldehidu u trajanju od 24h radi dalje histološke analize, dok je ostatak tkiva trenutno zamrznut u tečnom azotu i čuvan u njemu do izolacije RNK i proteina.

3.2.5 Histološka analiza tkiva

Nakon fiksacije u paraformaldehidu, delovi visceralnog masnog tkiva i jetre su dehidratizovani u rastućem gradijentu alkohola etanola (30%, 50%, 70%, 96% i 100%), prosvetljeni u ksilolu i ukalupljeni u parafinske blokove. Tako pripremljeni blokovi visceralnog masnog tkiva su bili sečeni na preseke debljine 10 µm, dok su uzorci jetre sečeni na preseke debljine 5 µm. Nakon bojenja preparata hematoksilinom i eozinom, slike za histološku analizu masnog tkiva su dobijene pomoću mikroskopa (*Olympus*, BX-51, Tokyo, Japan) sa kamerom (*PixelINK*, Ottawa, Canada), kojim upravlja *newCAST* program (version 3.2.7.0, *Visiopharm Integrator System*, Visiopharm, Denmark). Mikrografije jetre su dobijene pomoću *DMRB Photomicroscope* (*Leica*, Wetzlar, Germany), koji je opremljen *Leica DFC 320 CCD* kamerom. Analiza slika preparata masnog tkiva je urađena korišćenjem *Adiposoft* programa (Galarraga et al., 2012), pri čemu su analizirane 3 nasumično odabrane slike po preseku (uvećanje 20x), 100 ćelija po preseku, 3 preseka po životinji i 5 životinja po grupi. Primenom morfometrijske analize utvrđeni su prosečna zapremina, prečnik i broj adipocita. Za utvrđivanje prisustva masnih kapi u jetri, kvalitativna analiza dobijenih preseka je bila urađena na 3 preseka po životinji i 3 životinje po grupi.

3.2.6 Izolovanje RNK

Ukupna RNK iz visceralnog masnog tkiva i jetre je izolovana korišćenjem *TRIzol*[®] reagensa prema uputstvu proizvođača. Tkivo je homogenizovano u *TRIzol*[®] reagensu u odnosu 1:10 (w/v) i sonifikovano 2-3 puta na ledu u trajanju od 10 s (Cycle, 30%) (*Hielscher Ultrasound Processor*, *Hielscher Ultrasonics*, Teltow, Germany). Nakon inkubacije uzoraka od

5 min na 15-30°C, dodat je hloroform i uzorci su centrifugirani 15 min na 12000 g i 4°C. Gornja vodena faza je pažljivo odvojena i u nju je dodat izopropanol, nakon čega je RNK u uzorcima taložena preko noći na -20°C. Uzorci su zatim centrifugirani na 14000 g (20 min, 4°C) i RNK u talogu je resuspendovana u 75% etanolu. Nakon ponovnog centrifugiranja uzoraka (14000 g, 10 min, 4°C), dobijeni talog je rastvoren u 0.1% DEPC vodi (eng. *Diethyl pyrocarbonate*, DEPC) i tako izolovani uzorci RNK su čuvani na -20°C do dalje analize.

Koncentracija izolovane RNK i njen kvalitet su određeni korišćenjem *NanoPhotometer*® aparata (*Implen GmbH*, Munchen, Germany). Odnos A_{260}/A_{280} koji je bio veći od 1.8 je ukazivao na dovoljnu čistoću uzorka i smatran je zadovoljavajućim. Dalja provera kvaliteta izolovane RNK je izvršena elektroforezom na 2% agaroznom gelu (30 min, konstantna voltaža od 100 V).

3.2.7 Reakcija reverzne transkripcije

Za reakciju reverzne transkripcije, koja podrazumeva prevođenje RNK u komplementarnu DNK (cDNK), korišćen je komercijalno dostupni komplet *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* prema uputstvima proizvođača. Izolovani RNK uzorci su pomešani sa reakcionom smešom u kojoj su se nalazila četiri tipa dezoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP), enzim reverzna transkriptaza i nasumični oligonukleotidni prajmeri. Temperaturni režim po kom se odvijala reakcija reverzne transkripcije izgledao je na sledeći način: 10 min inkubacije na 25°C, zatim inkubacija u trajanju od 120 min na 37°C, nakon čega je usledilo zaustavljanje reakcije zagrevanjem 5 min na 85°C. Dobijeni uzorci cDNK su čuvani na -80°C do upotrebe.

3.2.8 Reakcija lančane polimeraze u realnom vremenu

Analiza nivoa ekspresije gena je urađena metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu, poznate i pod nazivom kvantitativni PCR (qPCR). Određivanje relativnih nivoa iRNK pojedinih gena je urađeno pomoću *Quant Studio*® 3 *Real-Time PCR Systems* aparata (*Applied Biosystems*, Massachusetts, USA) korišćenjem *SYBR green*® tehnologije. U analizi su korišćeni 20 ng cDNK matrice sintetisane reverznom transkripcijom, *Power SYBR*® *Green PCR* master miks i smeša uzvodnih i nizvodnih prajmera. U **Tabeli 3.3**, date su sekvence komercijalno dostupnih uzvodnih i nizvodnih prajmera konstruisane za gene čija je ekspresija ispitivana.

Sve reakcije su izvedene u triplikatu u zapremini od 25 µl. Postavljeni termički uslovi PCR reakcije su bili sledeći: 2 min inkubacije na 50°C, 10 min inkubacije na 95°C, nakon čega je usledilo 60 ciklusa u trajanju od 15 s na 95°C i inkubacija u trajanju od 60 s na 60°C. Normalizacija cDNK u svakom uzorku je izvršena korišćenjem hipoksantin-guanin fosforibozil transferaze (eng. *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase*, Hprt) kao endogene kontrole. Analiza krive topljenja je vršena na kraju svakog eksperimenta da bi se ustanovilo da li je došlo do formiranja tzv. „dajmer prajmera“ ili kontaminacije uzoraka genomskom DNK. Relativna kvantifikacija ekspresije gena je izvršena komparativnom $\Delta\Delta Ct$ metodom (Livak and Schmittgen, 2001) prema kojoj su Ct vrednosti za gene od interesa normalizovane prema Ct vrednostima endogene kontrole i kalibratora. Rezultati su analizirani pomoću programa *QuantStudio*® *Design&Analysis Software v1.4.0* (*Applied Biosystems*, Waltham, USA) sa nivoom pouzdanosti od 95% ($p \leq 0,05$).

Tabela 3.3. Oznake gena i sekvence prajmera korišćenih za određivanje nivoa ekspresije gena qPCR metodom

Oznaka gena	Naziv gena	Uzvodni prajmer	Nizvodni prajmer
<i>Hsl</i>	Hormon senzitivna lipaza	F: 5'-GGC TCA CAG TTA CCA TCT CAC C-3'	R: 5'-GAG TAC CTT GCT GTC CTG TCC- 3'
<i>Atgl</i>	Lipaza triglicerida adipocita	F: 5'-AAC ACC AGC ATC CAG TTC AA-3'	R: 5'-GGT TCA GTA GGC CAT TCC TC-3'
<i>Pepck</i>	Fosfoenolpiruvatna karboksikinaza	F: 5'-AAC TGT TGG CTG GCT CTC-3'	R: 5'-GAA CCT GGC GTT GAA TGC-3'
<i>Lpl</i>	Lipoproteinska lipaza	F: 5'-TTC CAG CCA GGA TGC AAC A-3'	R: 5'-GGT CCA CGT CTC CGA GTC C-3'
<i>Fas</i>	Sintaza masnih kiselina	F: 5'-TTG CTG GCA CTA CAG AAT GC-3'	R: 5'-AAC AGC CTC AGA GCG ACA AT-3'
<i>Acc</i>	Acetil-CoA karboksilaza	F: 5'-GAG AGG GGT CAA GTC CTT CC-3'	R: 5'-CTG CTG CCG TCA TAA GAC AA-3'
<i>Scd1</i>	Steroil-CoA desaturaza-1	F: 5'-CTG TAC GGG ATC ATA CTG GTT C-3'	R: 5'-GCC GTG CCT TGT AAG TTC TG-3'
<i>Tnf</i>	Faktor nekroze tumora	F: 5'-CTC AGC CTC TTC TCA TTC CTG CT-3'	R: 5'-CTG ATG AGA GGG AGG CCA TT-3'
<i>Il-6</i>	Interleukin-6	F: 5'-GAG AAA GCC AGA GTC CTT CAG AGA G-3'	R: 5'-CTA GGT TTG CCG AGT AGA TCT C-3'
<i>Il-1β</i>	Interleukin-1 β	F: 5'-CAG GCT CCG AGA TGA ACA AC-3'	R: 5'-AGG CCA CAG GTA TTT TGT CG-3'
<i>Hprt</i>	Hipoksantin-guanin fosforibozil transferaza	F: 5'-TCC TCC TCA GAC CGC TTT T-3'	R: 5'-CCT GGT TCA TCA TCG CTA ATC- 3'

3.2.9 Priprema ćelijskih frakcija tkiva

Da bi se odredili nivoi različitih proteina u tkivima eksperimentalnih miševa, korišćeni su ukupni ćelijski ekstrakti visceralnog masnog tkiva i jetre, kao i citosolna, jedarna i mikrozomalna frakcije jetre.

3.2.9.1 Priprema ukupnog ćelijskog ekstrakta visceralnog masnog tkiva

Za pripremu ukupnog ćelijskog ekstrakta visceralnog masnog tkiva korišćen je *TRIzol*® reagens prema uputstvu proizvođača. Nakon odvajanja vodene faze za precipitaciju RNK, organskoj fazi je dodat etanol i uzorci su centrifugirani 5 min na 2000 g i 4°C. Proteinska

frakcija je taložena iz fenol-etanol supernatanta korišćenjem acetona i centrifugirana je na 12000 g tokom 10 min na 4°C. Talози su resuspendovani u 0.3 M guanidin hidrohloridu rastvorenom u 95% etanolu sa 2.5% glicerolom, sonifikacijom na ledu (Cycle, 30%) u trajanju od 10 s. Ovaj postupak je ponovljen 2 puta, a dobijeni talози su inkubirani 10 min na sobnoj temperaturi i proteini su istaloženi centrifugiranjem na 8000 g (5 min, 4°C). Nakon odlivanja alkohola i sušenja taloga na sobnoj temperaturi, proteinska frakcija je resuspendovana u puferu za lizu koji sadrži 2.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glicerol i 50 mM DTT. Svi uzorci su čuvani u zamrzivaču na -70°C do upotrebe.

3.2.9.2 Priprema ukupnog ćelijskog ekstrakta jetre

Za izolovanje ukupnog ćelijskog ekstrakta jetre, deo zamrznutog tkiva je homogenizovan u hladnom RIPA (eng. *Radioimmunoprecipitation assay*, RIPA) puferu (50 mM Tris-HCl (pH 7.2), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA-Na₂, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 2 mM DTT, 0.5% natrijum deoksiholat, inhibitori proteaza i fosfataza) korišćenjem stakleno-teflonskog homogenizera. Homogenati su potom sonifikovani tri puta po 5 s (1A, 50/60 Hz) i inkubirani 60 min na ledu uz često vorteksovanje. Uzorci su zatim centrifugirani na 16000 g u trajanju od 20 min na 4°C. Dobijeni supernatanti su korišćeni kao ukupni ćelijski ekstrakti jetre i čuvani u zamrzivaču na -70°C do upotrebe.

3.2.9.3 Priprema citosolne, jedarne i mikrozomalne frakcije jetre

Zamrznuto tkivo jetre je homogenizovano u hladnom puferu za homogenizaciju (20 mM Tris-HCl (pH 7.2), 50 mM NaCl, 10% glicerol, 1 mM EDTA-Na₂, 1 mM EGTA-Na₂, 20 mM Na₂MoO₄, 2 mM DTT, inhibitori proteaza i fosfataza) korišćenjem *Janke-Kunkel Ultra Turrax* homogenizera (IKA®, Staufen, Germany) pri brzini od 8000 obrtaja/min. Nakon filtriranja kroz gazu i centrifugiranja (2000 g, 15 min, 4°C), supernatanti su odvojeni za dalju obradu citosolne i mikrozomalne frakcije, dok su talози iskorišćeni za dobijanje jedarne frakcije jetre.

Za pripremu citosolne i mikrozomalne frakcije, supernatanti su centrifugirani na 10000 g tokom 30 min na 4°C (Sorvall centrifuge, SS-34 rotor, *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, USA), a zatim na 200000 g tokom 90 min na 4°C (Beckman ultracentrifuge L7-55, *Life Sciences*, Indianapolis, USA). Konačni supernatanti su korišćeni kao citosolne frakcije jetre i čuvani su na -70°C do upotrebe.

Kako bi se pripremile mikrozomalne frakcije, talози dobijeni nakon prvog centrifugiranja na 200000 g su resuspendovani u 100 mM natrijum pirofosfatu (pH 7.4), i ponovo centrifugirani na 200000 g tokom 60 min na 4°C (Beckman ultracentrifuga L7-55). Nakon resuspendovanja taloga u puferu za čuvanje mikrozoma (0.1 mM EDTA-Na₂, 50 mM KPO₄ (pH 7.4), 0.1 mM DTT i 10% glicerol), uzorci su sonifikovani 3x5 s sa pauzama od 30 s (1A, 50/60 Hz, 30% amplituda) i čuvani u zamrzivaču na -70°C.

Za pripremu jedarne frakcije, talози dobijeni nakon prvog centrifugiranja su isprani HEPES puferom (25 mM HEPES (pH 7.6), 50 mM NaCl, 10% glicerol, 1 mM EDTA-Na₂, 1 mM EGTA-Na₂, 2 mM DTT, inhibitori proteaza i fosfataza) i centrifugirani na 4000 g tokom 10 min na 4°C. Dobijeni talози su resuspendovani u NUN puferu (25 mM HEPES (pH 7.6), 300 mM NaCl, 1 M urea, 1% Nonidet P-40, inhibitori proteaza i fosfataza) i inkubirani na ledu u trajanju od 60 min uz često mešanje na vibracionoj mešalici. Nakon centrifugiranja na 20000 g tokom 30 min na 4°C, dobijeni supernatanti su korišćeni kao jedarna frakcija i zamrznuti su na -70°C do upotrebe.

3.2.9.4 Određivanje koncentracije proteina u ćelijskim frakcijama tkiva

Određivanje koncentracije proteina u ukupnim ćelijskim ekstraktima visceralnog masnog tkiva i jetre, kao i u citosolnoj, jedarnoj i mikrozomalnoj frakciji jetre je urađeno kolorimetrijskom metodom po Loriju (Lowry et al., 1951). Za potrebe određivanja koncentracije proteina, od svake ćelijske frakcije je odvojen mali deo uzorka koji je adekvatno razblažen destilovanom vodom. U uzorke i BSA standarde rastućih koncentracija dodat je Reagens C, koji predstavlja smešu A, B i C rastvora, gde je komponenta A 2% rastvor Na₂CO₃ u 0.1 M NaOH, rastvor B je 0.1% vodeni rastvor CuSO₄·5H₂O i rastvor C je 2% vodeni rastvor Na-tartarata. Nakon inkubacije i vorteksovanja u trajanju od 15 min na sobnoj temperaturi, uzorcima i standardima je dodat pet puta razblažen Folin-Ciocalteu reagens. Uzorci su inkubirani 30 min i povremeno vorteksovani na vibracionoj mešalici. Apsorbanca uzoraka i standarda je merena na talasnoj dužini od 670 nm na Multiskan Spektrum spektrofotometru (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, USA). Uzorci su nalivani u vidu triplikata i koncentracija proteina ćelijskih frakcija je dobijena na osnovu standardne krive za koncentraciju BSA.

3.2.10 Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu

Razdvajanje proteina na osnovu različitih molekulskih masa je izvršeno metodom elektroforeze na 7.5% poliakrilamidnim denaturišućim gelovima (7.5% akrilamid, 0.1% SDS, 375 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.033% TEMED i 0.05% amonijum persulfat). Uzorci proteina visceralnog masnog tkiva i jetre su pripremljeni dodavanjem jednake zapremine pufera za uzorke dvostuko veće koncentracije (125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 20% glicerol, 0.4% β-merkaptotanol i 1% Bromfenol plavo), a zatim su kuvani na 100°C u trajanju od 5 min. Nakon pripreme, uzorci su nanošeni na gel i razdvajani u puferu za elektroforezu (25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.1% SDS i 192 mM glicin) pri konstantnom naponu od 120 V u trajanju od 90 min korišćenjem *Mini Protean II Electrophoresis Cell* aparata (*Bio-Rad Laboratories*, Hercules, USA). Kao marker molekulskih masa korišćen je *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, koji ima opseg od 10 do 180 kDa.

3.2.11 Western blot metoda

Nakon elektroforeze, proteini su preneti sa gelova na PVDF (eng. *Polyvinylidene fluoride*) membrane (*Immobilon P*, *MilliporeSigma*, Burlington, USA) korišćenjem *Mini Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell* aparature (*Bio-Rad Laboratories*, Hercules, USA). Transfer proteina odvijao se tokom noći na 4°C i konstantnoj struji (200 mA) u puferu za transfer, koji sadrži 25 mM Tris (pH 8.3), 192 mM glicin i 20% metanol. Kako bi se proverilo da li je transfer bio uspešan, membrane su inkubirane sa 1% rastvorom *Ponceau S* boje u 5% sirćetnoj kiselini. Nespecifična mesta vezivanja proteina na membrani su blokirana inkubacijom 1 h u 5% rastvoru nemasnog humanog mleka u PBS (eng. *Phosphate-Buffered Saline*, PBS) puferu, koji sadrži 0.137 M NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄ i 6.5 mM Na₂HPO₄. Nakon inkubiranja membrana sa odgovarajućim primarnim antitelom na 4°C preko noći uz mešanje, membrane su ispirane četiri puta po 5 min sa 0.1% *Tween® 20* u PBS puferu.

Membrane su zatim inkubirane 90 min na sobnoj temperaturi sa sekundarnim anti-zečjim IgG antitelom (1:20000, ab6721) ili anti-mišjim IgG antitelom (1:20000, ab97046), koja su konjugovana sa enzimom peroksidaza rena. Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelom, membrane su ispirane četiri puta po 5 min sa 0.1% *Tween® 20* u PBS puferu. Rastvor luminola i 1% vodonik-peroksida je korišćen za aktivaciju peroksidaze rena, a signal je razvijen ECL metodom (eng. *Enhanced Chemiluminescence*, ECL). Imunopozitivne trake su vizuelizovane na rendgenskim filmovima (*Kodak*, Rochester, USA), i njihova

kvantitativna analiza je obavljena korišćenjem *Image J* programa (NIH, Bethesda, USA). Kao kontrola jednakog nanošenja proteina odgovarajućih ćelijskih frakcija na gel korišćena su sledeća antitela: monoklonsko mišje anti- β -aktin antitelo za ukupni ćelijski ekstrakt visceralnog masnog tkiva, zečje poliklonsko anti- β -aktin antitelo za citosolnu frakciju i ukupni ćelijski ekstrakt jetre, mišje monoklonsko anti-TBP antitelo za jedarnu frakciju jetre, dok je zečje anti-kalneksin antitelo korišćeno kao kontrola za mikrozomalnu frakciju jetre. Nakon vizuelizacije proteinskih traka, antitela su uklonjena inkubacijom membrane u 0.2 M NaOH u trajanju od 10 min, nakon čega je bilo moguće ponovo blokirati membrane i inkubirati ih sa sledećim primarnim antitelom.

3.2.12 Statistička analiza

Grafički prikaz dobijenih rezultata je urađen pomoću *Microsoft Office Excel* (Microsoft Corporation, Redmond USA) i *GraphPad Prism v6* (GraphPad Software, San Diego, USA) programa. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška (SEM). Statistička analiza rezultata je urađena korišćenjem *Statistica 10* programa (Stat Soft. Inc., Tulsa, USA). Za utvrđivanje efekata fruktozne dijeta i delecije gena *Mif*, kao i njihove interakcije, korišćena je dvostruka ANOVA praćena *post-hoc* Tukey testom. Nivo verovatnoće manji od 0.05 ($P < 0.05$) smatrao se statistički značajnim.

4. REZULTATI

4.1. Fiziološki i biohemijski parametri miševa nakon ishrane obogaćene fruktozom

4.1.1 Fiziološki parametri mužjaka miševa

Tokom 9 nedelja trajanja eksperimenta, svakodnevno je meren unos hrane i tečnosti. Rezultati su pokazali da su miševi koji su pili 20% rastvor fruktoze imali značajno smanjen unos hrane i povećan unos tečnosti (**Tabela 4.1**). Dvofaktorijalna analiza varijanse (ANOVA) pokazala je značajne efekte ishrane obogaćene fruktozom [$F_{(1,66)} = 131.85$; $P < 0.001$] i delecije gena *Mif* [$F_{(1,66)} = 4.63$; $P < 0.05$] na unos hrane. *Post-hoc* test je pokazao značajno smanjenje unosa hrane kod životinja hranjenih fruktozom ($***P < 0.001$, WT FrD u odnosu na WT; $***P < 0.001$, MIF^{-/-} FrD u odnosu na WT; $†††P < 0.001$, MIF^{-/-} FrD u odnosu na MIF^{-/-}). Takođe, kod istih životinja uočeni su efekti ishrane obogaćene fruktozom [$F_{(1,62)} = 55.81$; $P < 0.001$], delecije gena *Mif* [$F_{(1,62)} = 9.87$; $P < 0.01$], kao i njihove interakcije [$F_{(1,62)} = 7.11$; $P < 0.01$] na unos tečnosti (**Tabela 4.1**). Grupa WT FrD životinja je pila više 20% rastvora fruktoze u odnosu na WT životinje koje su pile vodu ($***P < 0.001$), dok je MIF^{-/-} FrD grupa unosila više tečnosti u poređenju sa svim ostalim grupama ($*P < 0.05$, u odnosu na WT; $###P < 0.001$, u odnosu na WT FrD; $†P < 0.05$, u odnosu na MIF^{-/-}). Značajan efekat fruktoze [$F_{(1,59)} = 38.08$; $P < 0.001$] ostvaren je i na energetski unos, što je dovelo do povećanja unosa energije kod svih životinja na ishrani obogaćenoj fruktozom, u poređenju sa životinjama koje su konzumirale standardnu hranu i vodu ($***P < 0.001$, WT FrD u odnosu na WT; $***P < 0.001$, MIF^{-/-} FrD u odnosu na WT; $†P < 0.05$, MIF^{-/-} FrD u odnosu na MIF^{-/-}) (**Tabela 4.1**).

Uprkos povećanom unosu energije, telesna masa miševa na ishrani obogaćenoj fruktozom se nije značajno razlikovala od miševa na standardnoj ishrani (**Tabela 4.1**). Međutim, dvofaktorijalna ANOVA je pokazala značajan efekat fruktoze na masu visceralnog masnog tkiva [$F_{(1,36)} = 10.51$; $P < 0.01$], kao i na odnos mase masnog tkiva i ukupne telesne mase [$F_{(1,40)} = 6.28$; $P < 0.001$]. Takođe, značajan efekat delecije gena *Mif* je ostvaren, kako na apsolutnu [$F_{(1,36)} = 20.97$; $P < 0.0001$], tako i na relativnu masu visceralnog masnog tkiva [$F_{(1,40)} = 14.22$; $P < 0.001$]. Naime, *post-hoc* test je ukazao na značajno povećanje mase visceralnog masnog tkiva kod MIF^{-/-} životinja u odnosu na WT miševе ($*P < 0.05$), kao i kod MIF^{-/-} životinja koje su pile fruktozu u odnosu na WT ($***P < 0.001$) i WT FrD grupu životinja ($###P < 0.01$). Međutim, relativna masa visceralnog masnog tkiva je bila povećana samo kod MIF^{-/-} grupe koja je konzumirala fruktozu, u odnosu na sve ostale grupe životinja ($***P < 0.001$, u odnosu na WT; $###P < 0.01$, u odnosu na WT FrD; $†P < 0.05$, u odnosu na MIF^{-/-}).

Dvofaktorijalna ANOVA je pokazala značajan efekat delecije gena *Mif* na masu jetre [$F_{(1,22)} = 20.38$; $P < 0.001$]. Rezultati *post-hoc* testa su ukazali na značajno nižu masu jetre kod MIF^{-/-} miševa hranjenih fruktozom, u poređenju sa WT životinjama nezavisno od načina ishrane (**Tabela 4.1**, $*P < 0.05$, MIF^{-/-} FrD vs. WT; $###P < 0.01$, MIF^{-/-} FrD vs. WT FrD). Takođe, detektovan je efekat delecije gena *Mif* [$F_{(1,22)} = 13.23$; $P < 0.01$] na odnos mase jetre i ukupne telesne mase kod MIF^{-/-} životinja na ishrani obogaćenoj fruktozom, u poređenju sa svim WT životinjama nezavisno od načina ishrane (**Tabela 4.1**, $*P < 0.05$, MIF^{-/-} FrD vs. WT; $\#P < 0.05$, MIF^{-/-} FrD vs. WT FrD).

Tabela 4.1. Fiziološki parametri: unos hrane i tečnosti, energetske unos, telesna masa, masa visceralnog masnog tkiva i jetre

	WT	WT FrD	MIF ^{-/-}	MIF ^{-/-} FrD
Unos hrane (g/dan/kavez)	15.96 ± 0.60	9.74 ± 0.45^{***}	16.69 ± 0.30	11.20 ± 0.18^{****††}
Unos tečnosti (ml/dan/kavez)	21.26 ± 0.83	30.32 ± 0.83^{***}	20.83 ± 0.40	25.13 ± 1.01^{####†}
Energetski unos (kJ/dan/kavez)	172.25 ± 5.75	216.40 ± 6.32^{***}	183.63 ± 3.30	209.88 ± 3.52^{****}
Masa tela (g)	28.19 ± 1.02	28.92 ± 0.91	28.93 ± 0.84	29.26 ± 0.53
Masa visceralnog masnog tkiva (g)	0.25 ± 0.02	0.38 ± 0.03	0.45 ± 0.05[*]	0.64 ± 0.06^{####}
Odnos mase visceralnog masnog tkiva i ukupne telesne mase (x1000)	8.88 ± 0.63	13.76 ± 1.22	16.94 ± 1.58	27.03 ± 1.80^{####†}
Masa jetre (g)	2.13 ± 0.06	2.29 ± 0.08	1.80 ± 0.15	1.57 ± 0.16^{##}
Odnos mase jetre i ukupne telesne mase (x1000)	69.69 ± 1.85	74.81 ± 1.46	61.27 ± 4.93	54.74 ± 6.69[#]

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM ($n = 3$ kaveza po grupi za unos hrane, tečnosti i energije; $n = 12$ životinja po grupi za masu tela, visceralnog masnog tkiva i jetre). Energetski unos je izražen po danu po kavezu. Značajnosti su predstavljene kao: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, promene u odnosu na WT; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, promene u odnosu WT FrD; † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$, ††† $P < 0.001$, promene u odnosu na MIF^{-/-}.

4.1.2. Biohemijski parametri insulinske osetljivosti

Nivo glukoze u krvi je određen pomoću automatskog analizatora sa tračicama, odmah nakon žrtvovanja životinja. Dvofaktorijalna ANOVA analiza je pokazala značajne efekte ishrane obogaćene fruktozom [$F_{(1,38)} = 4.34$; $P < 0.05$] i delecije gena *Mif* [$F_{(1,38)} = 18.24$; $P < 0.001$] na koncentraciju glukoze u krvi. Kao što je prikazano u **Tabeli 4.2**, nivo glukoze je bio značajno viši kod MIF^{-/-} životinja u odnosu na WT miševе (* $P < 0.05$), kao i kod MIF^{-/-} FrD životinja u poređenju sa WT FrD grupom (## $P < 0.01$).

Nivo insulina u plazmi miševa je ispitan RIA metodom i pronađeni su značajni efekti ishrane obogaćene fruktozom [$F_{(1,33)} = 4.84$; $P < 0.05$] i delecije gena *Mif* [$F_{(1,33)} = 10.06$; $P < 0.01$] na nivo ovog hormona (**Tabela 4.2**). *Post-hoc* test je pokazao značajno povećanje koncentracije insulina kod MIF^{-/-} životinja na standardnoj ishrani u odnosu na WT (* $P < 0.05$) grupu životinja, kao i kod MIF^{-/-} životinja na ishrani obogaćenoj fruktozom u odnosu na WT (** $P < 0.01$) i WT FrD grupe životinja (# $P < 0.05$).

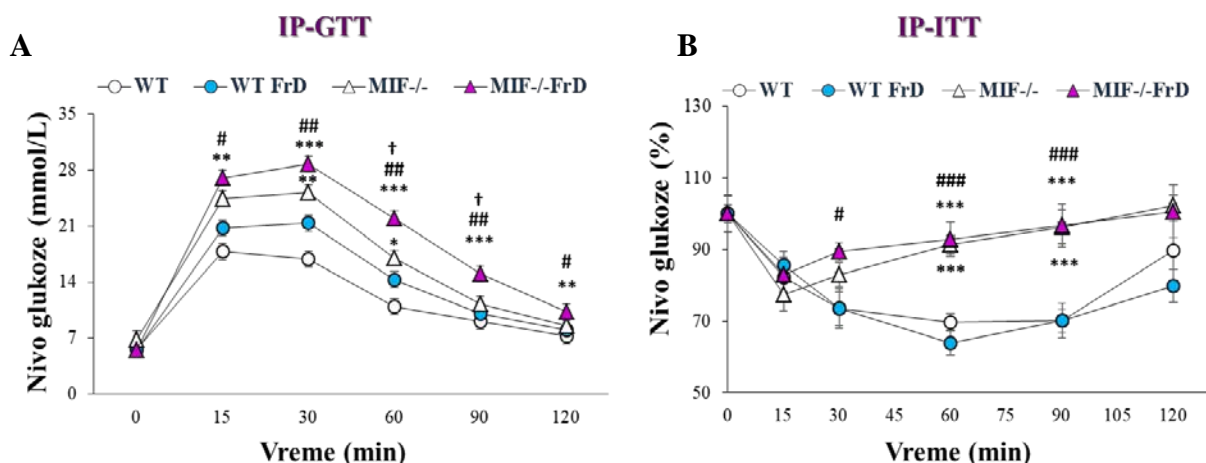
Insulinska osetljivost je procenjena IP-GTT i IP-ITT testovima. Rezultati su pokazali da ishrana obogaćena fruktozom i genetička delecija *Mif*-a doprinose poremećaju vrednosti pokazatelja osetljivosti na insulin i insulinske rezistencije na sistemskom nivou (**Tabela 4.2, Slika 4.1**).

Tabela 4.2. Parametri insulinske osetljivosti: glukoza, insulin, IP-GTT i IP-ITT

	WT	WT FrD	MIF ^{-/-}	MIF ^{-/-} FrD
Glukoza (mmol/l)	5.04 ± 0.24	4.53 ± 0.29	5.92 ± 0.13*	5.52 ± 0.19##
Insulin (mmol/l)	1.68 ± 0.16	2.94 ± 0.53	6.28 ± 0.76*	8.09 ± 3.38***
IP-GTT AUC	1603.1 ± 38.8	1906.3 ± 73.4	2199.0 ± 213.7***	2626.5 ± 72.9***##†
IP-ITT AUC	9182.4 ± 403.0	8899.6 ± 426.6	10945.3 ± 303.6*	11259.7 ± 586.1*###

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM ($n = 12$ životinja po grupi). Značajnosti su predstavljene kao: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, promene u odnosu na WT; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, promene u odnosu WT FrD; † $P < 0.05$, promene u odnosu na MIF^{-/-}.

Dvofaktorijalna ANOVA je pokazala efekte fruktoze [$F_{(1,13)} = 13.44$; $P < 0.01$] i delecije gena *Mif* [$F_{(1,13)} = 43.6$; $P < 0.001$] na vrednosti površine ispod krive (eng. *area under curve*, AUC) za glukozu (**Tabela 4.2, Slika 4.1A**), dok je *post-hoc* test otkrio značajan porast nivoa AUC vrednosti za glukozu u MIF^{-/-} grupi u poređenju sa WT životinjama (*** $P < 0.001$), kao i značajan porast nivoa AUC vrednosti za glukozu u MIF^{-/-} FrD grupi u poređenju sa svim ostalim eksperimentalnim grupama (*** $P < 0.001$, u odnosu na WT; ### $P < 0.001$, u odnosu na WT FrD; † $P < 0.05$, u odnosu na MIF^{-/-}). Takođe, pokazan je i statistički značajan efekat delecije gena *Mif* [$F_{(1,18)} = 65.33$; $P < 0.001$] na vrednost AUC za insulin (**Tabela 4.2, Slika 4.1B**). Slično nivou AUC za glukozu, dvofaktorijalna ANOVA praćena *post-hoc* testom je pokazala da su vrednosti AUC za insulin značajno povećane u MIF^{-/-} grupi u odnosu na WT životinje (* $P < 0.05$), i u MIF^{-/-} FrD grupi u odnosu na WT (* $P < 0.05$) i WT FrD (### $P < 0.001$) grupe.



Slika 4.1. Intra-peritonealni testovi tolerancije na glukozu i insulin (IP-GTT i IP-ITT). Nakon određivanja koncentracije glukoze u krvi natašte, životinjama je intraperitonealno injicirana glukoza (A) u koncentraciji 2g/kg telesne mase ili insulin (B) u koncentraciji 0.75 IJ/kg telesne mase. Nivo glukoze u krvi je meren 15, 30, 60, 90 i 120 min nakon injeciranja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM. Grupe: WT (miševi soja C57BL/6J na standardnoj ishrani), WT FrD (miševi soja C57BL/6J na ishrani obogaćenoj fruktozom), MIF^{-/-} (miševi sa deletiranim genom *Mif* na standardnoj ishrani) i MIF^{-/-} FrD (miševi sa deletiranim genom *Mif* na ishrani obogaćenoj fruktozom). Značajnosti su predstavljene kao: **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, promene u odnosu na WT; #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01, ###*P* < 0.001, promene u odnosu WT FrD; †*P* < 0.05, promene u odnosu MIF^{-/-}.

4.1.3 Biohemijski parametri lipidnog metabolizma

Koncentracija triglicerida je određena pomoću automatskog analizatora sa tračicama, dok su nivoi slobodnih masnih kiselina i leptina u plazmi izmereni korišćenjem komercijalnih ELISA testova.

Dobijeni rezultati su pokazali da su nivoi triglicerida i slobodnih masnih kiselina u krvi bili nepromenjeni u svim eksperimentalnim grupama (Tabela 4.3).

Značajan efekat delecije gena *Mif* [$F_{(1,25)} = 32.36$; $P < 0.001$] ostvaren je na nivo leptina u plazmi. Koncentracije leptina su bile veće u MIF^{-/-} životinjama nezavisno od načina ishrane u odnosu na WT grupe životinja (Tabela 4.3, **P* < 0.05, ****P* < 0.001, u odnosu na WT; #*P* < 0.05, u odnosu na WT FrD).

Tabela 4.3. Biohemijski parametri lipidnog metabolizma: trigliceridi, slobodne masne kiseline i leptin

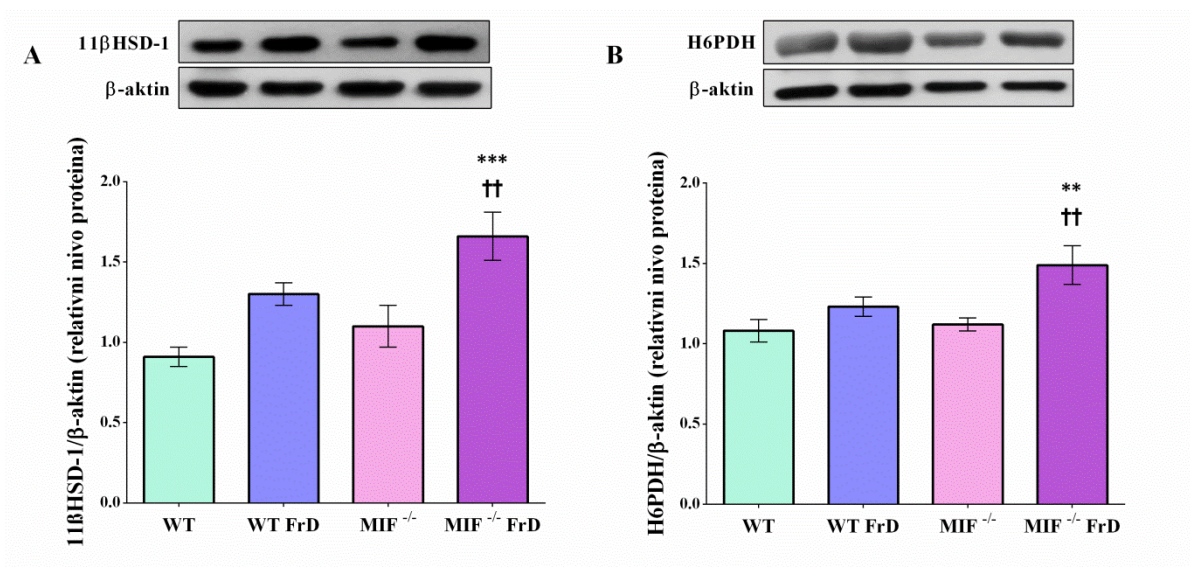
	WT	WT FrD	MIF ^{-/-}	MIF ^{-/-} FrD
Trigliceridi (mmol/l)	0.93 ± 0.04	1.16 ± 0.08	1.21 ± 0.09	1.24 ± 0.10
Slobodne masne kiseline (mmol/l)	1.83 ± 0.12	1.78 ± 0.11	2.03 ± 0.11	1.94 ± 0.11
Leptin (pg/ml)	320.44 ± 79.36	295.31 ± 44.99	2595.47 ± 482.88^{***}	1625.06 ± 443.41^{*#}

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM ($n = 8$ životinja po grupi). Značajnosti su predstavljene kao: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, promene u odnosu na WT; # $P < 0.05$, promene u odnosu WT FrD.

4.2. Visceralno masno tkivo

4.2.1. Prereceptorski metabolizam glukokortikoida u visceralnom masnom tkivu

Prereceptorski metabolizam glukokortikoida u visceralnom masnom tkivu je ispitan na nivou proteina 11 β HSD-1 i H6PDH, koji su uključeni u prevođenje neaktivne forme glukokortikoidnog hormona (dehidrokortikosteron kod glodara) u njegovu aktivnu formu (kortikosteron). Dvofaktorijalna ANOVA analiza je pokazala značajne efekte fruktozne ishrane [$F_{(1,17)} = 20.98$; $P < 0.001$] i delecije gena *Mif* [$F_{(1,17)} = 7.11$; $P < 0.05$] na nivo proteina 11 β HSD-1 (**Slika 4.2A**), kao i značajan efekat fruktozne ishrane [$F_{(1,26)} = 11.71$; $P < 0.01$] na nivo proteina H6PDH (**Slika 4.2B**). *Post-hoc* test je pokazao statistički značajan porast nivoa oba enzima samo kod MIF^{-/-} životinja na ishrani obogaćenoj fruktozom u odnosu na WT (** $P < 0.001$ za 11 β HSD-1; ** $P < 0.01$ za H6PDH) i MIF^{-/-} grupe na standardnoj ishrani (†† $P < 0.01$).

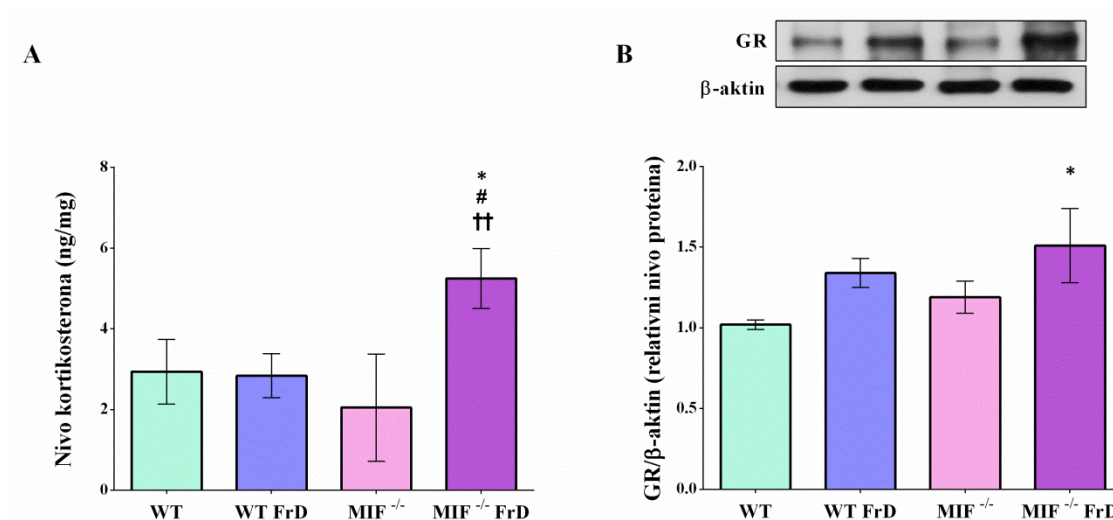


Slika 4.2. Nivo proteina 11βHSD-1 i H6PDH u visceralnom masnom tkivu. Relativne koncentracije proteina 11βHSD-1 (A) i H6PDH (B) u ukupnom ćelijskom ekstraktu su analizirane Western blot metodom. Kao kontrola jednakog nanošenja proteina na gel korišćen je β-aktin. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM. Grupe: WT (miševi soja C57BL/6J na standardnoj ishrani), WT FrD (miševi soja C57BL/6J na ishrani obogaćenoj fruktozom), MIF^{-/-} (miševi sa deletiranim genom *Mif* na standardnoj ishrani) i MIF^{-/-} FrD (miševi sa deletiranim genom *Mif* na ishrani obogaćenoj fruktozom). Značajnosti su predstavljene kao: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, promene u odnosu na WT; †† $P < 0.01$, promene u odnosu MIF^{-/-}.

4.2.2 Signalni put glukokortikoida u visceralnom masnom tkivu

Da bismo ispitali efekte ishrane obogaćene fruktozom i delecije gena *Mif* na signalni put glukokortikoida, analizirani su unutarćelijska koncentracije kortikosterona (Slika 4.3A) i nivo proteina GR-a (Slika 4.3B) u visceralnom masnom tkivu. Utvrđeni su značajani efekti ishrane obogaćene fruktozom [$F_{(1,11)} = 7.41$; $P < 0.05$] i interakcije između faktora [$F_{(1,11)} = 8.42$; $P < 0.05$] na nivo kortikosterona. Rezultat *post-hoc* testa je pokazao povećanje nivoa kortikosterona kod MIF^{-/-} FrD miševa u odnosu na sve ostale grupe životinja (Slika 4.3A, * $P < 0.05$, u odnosu na WT; # $P < 0.05$, u odnosu na WT FrD; †† $P < 0.01$, u odnosu na MIF^{-/-}).

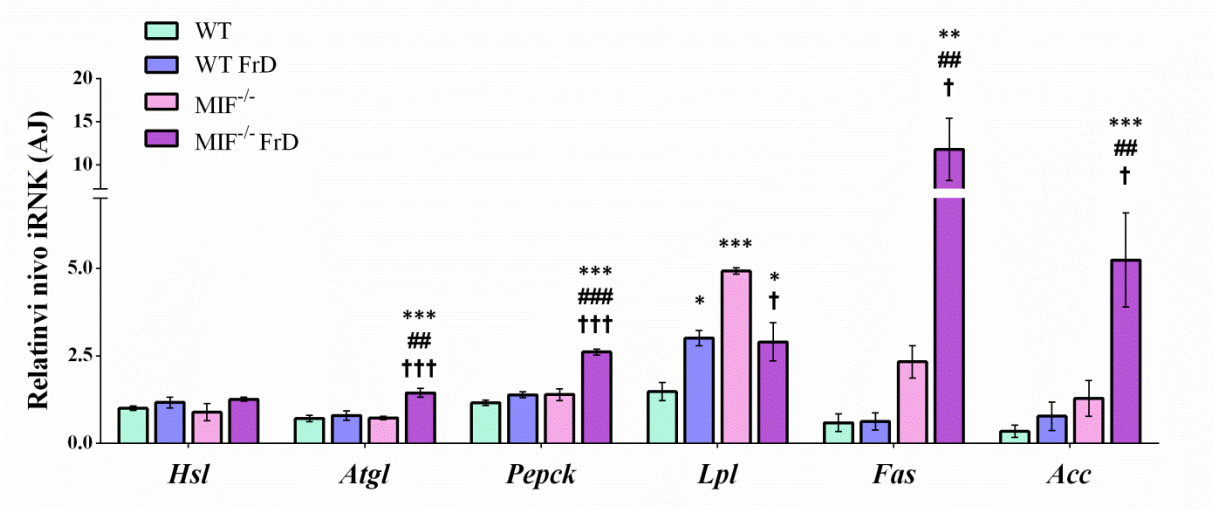
Dvofaktorijalna ANOVA je otkrila statistički značajan efekat fruktozne ishrane [$F_{(1,24)} = 8.57$; $P < 0.01$] na ukupan nivo proteina GR-a u visceralnom masnom tkivu (Slika 4.3B), dok je *post-hoc* test pokazao povećanje GR nivoa u MIF^{-/-} FrD grupi u poređenju sa WT grupom (* $P < 0.05$), što je u skladu sa povećanim nivoom kortikosterona i pojačanim prereceptorskim metabolizmom glukokortikoida samo u ovoj grupi.



Slika 4.3. Nivo kortikosterona i proteina GR-a u visceralnom masnom tkivu. Nivo kortikosterona (A) određen je ELISA metodom. Relativna koncentracija proteina GR-a (B) u ukupnom ćelijskom ekstraktu je analizirana Western blot metodom. Kao kontrola jednakog nanošenja proteina na gel korišćen je β -aktin. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. Grupe: WT (miševi soja C57BL/6J na standardnoj ishrani), WT FrD (miševi soja C57BL/6J na ishrani obogaćenoj fruktozom), MIF^{-/-} (miševi sa deletiranim genom *Mif* na standardnoj ishrani) i MIF^{-/-} FrD (miševi sa deletiranim genom *Mif* na ishrani obogaćenoj fruktozom). Značajnosti su predstavljene kao: * $P < 0.05$, promene u odnosu na WT; # $P < 0.05$, promene u odnosu WT FrD; †† $P < 0.01$, promene u odnosu MIF^{-/-}.

4.2.3 Ekspresija gena lipidnog metabolizma regulisanih glukokortikoidnim receptorom

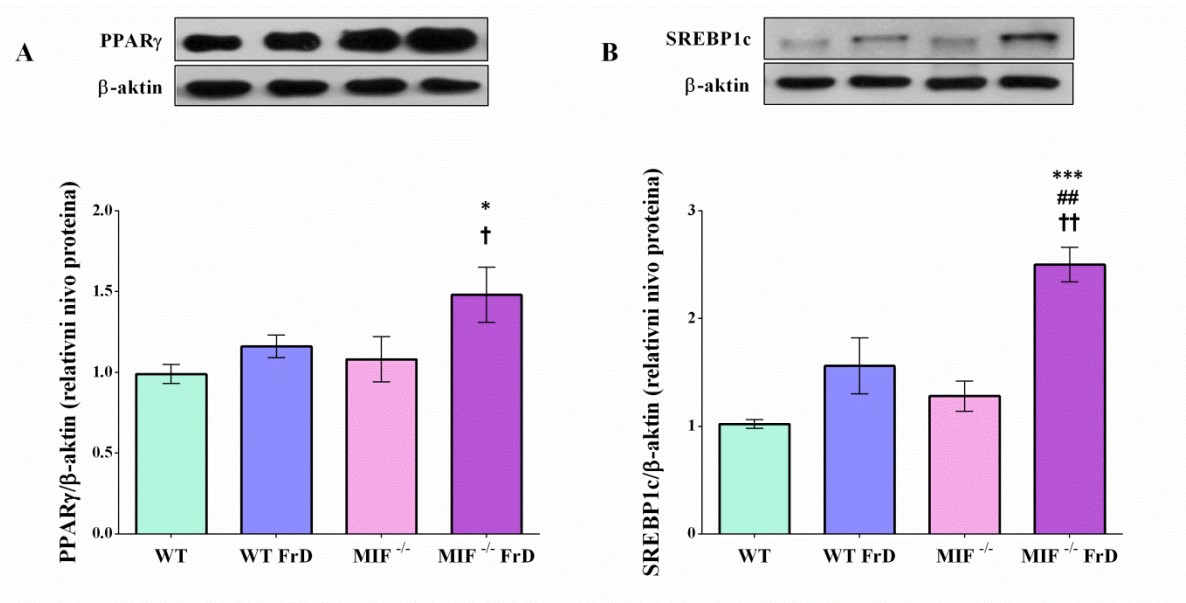
Da bismo utvrdili da li ishrana obogaćena fruktozom i genetička delecija *Mif*-a utiču na ekspresiju gena regulisanih GR-om, a koji kodiraju enzime uključene u procese lipolize i lipogeneze, relativni nivoi iRNK ispitani su qPCR metodom (Slika 4.4). Značajan efekat fruktozne ishrane je otkriven za sledeće gene: *Atgl* [$F_{(1,19)} = 15.43$; $P < 0.001$], *Pepck* [$F_{(1,28)} = 43.67$; $P < 0.001$], *Fas* [$F_{(1,19)} = 6.11$; $P < 0.05$] i *Acc* [$F_{(1,18)} = 7.15$; $P < 0.05$], dok je značajan efekat delecije gena *Mif* primećen za *Atgl* [$F_{(1,19)} = 10.18$; $P < 0.01$], *Pepck* [$F_{(1,28)} = 43.86$; $P < 0.001$], *Lpl* [$F_{(1,18)} = 23.27$; $P < 0.001$], kao i za *Fas* [$F_{(1,19)} = 11.26$; $P < 0.01$] i *Acc* [$F_{(1,18)} = 10.83$; $P < 0.01$]. Takođe, pronađena je značajna interakcija između faktora u slučaju *Atgl* [$F_{(1,19)} = 9.44$; $P < 0.01$], *Pepck* [$F_{(1,28)} = 20.35$; $P < 0.001$], *Lpl* [$F_{(1,18)} = 26.25$; $P < 0.001$], *Fas* [$F_{(1,19)} = 6.01$; $P < 0.05$] i *Acc* [$F_{(1,18)} = 4.61$; $P < 0.05$]. *Post-hoc* test je detektovao značajno povećanje nivoa iRNK za *Fas* kod MIF^{-/-} životinja na ishrani obogaćenoj fruktozom u odnosu na sve ostale eksperimentalne grupe (** $P < 0.01$, u odnosu na WT; ### $P < 0.01$, u odnosu na WT FrD; † $P < 0.05$, u odnosu na MIF^{-/-}). U istoj grupi životinja je primećeno povećanje nivoa iRNK za *Acc* u poređenju sa WT miševima (** $P < 0.001$), WT miševima hranjenih fruktozom (### $P < 0.01$) i normalno hranjenih MIF^{-/-} miševa († $P < 0.05$), kao i povećanje nivoa iRNK za *Pepck* u poređenju sa svim ostalim eksperimentalnim grupama ($P < 0.001$). Međutim, nivo iRNK za glavni lipolitički enzim *Atgl*, takođe je bio značajno veći kod MIF^{-/-} miševa hranjenih fruktozom u poređenju sa obe WT grupe (** $P < 0.001$, u odnosu na WT; ### $P < 0.01$, u odnosu na WT FrD), kao i u poređenju sa normalno hranjenim MIF^{-/-} miševima (††† $P < 0.001$). Pored toga, nivo iRNK za *Lpl* je bio povećan kod svih grupa u poređenju sa WT miševima na standardnoj ishrani (* $P < 0.05$, WT FrD u odnosu na WT; *** $P < 0.001$, MIF^{-/-} u odnosu na WT; * $P < 0.05$, MIF^{-/-} FrD u odnosu na WT), ali takođe i kod MIF^{-/-} miševa u poređenju sa MIF^{-/-} životinjama hranjenim fruktozom († $P < 0.01$). Razlike između grupa u nivou iRNK za *Hsl* nisu bile primećene (Slika 4.4).



Slika 4.4. Relativni nivo iRNK za gene koji učestvuju u metabolizmu lipida u visceralnom masnom tkivu. Relativna koncentracija iRNK za *Hsl*, *Atgl*, *Pepck*, *Lpl*, *Fas* i *Acc* su ispitane qPCR metodom. Kao endogena kontrola za normalizaciju nivoa iRNK korišćen je *Hprt*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. Svi uzorci su rađeni u triplikatu. Grupe: WT (miševi soja C57BL/6J na standardnoj ishrani), WT FrD (miševi soja C57BL/6J na ishrani obogaćenoj fruktozom), MIF^{-/-} (miševi sa deletiranim genom *Mif* na standardnoj ishrani) i MIF^{-/-} FrD (miševi sa deletiranim genom *Mif* na ishrani obogaćenoj fruktozom). Značajnosti su predstavljene kao: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ promene u odnosu na WT; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ promene u odnosu WT FrD; † $P < 0.05$, ††† $P < 0.001$ promene u odnosu MIF^{-/-}.

4.2.4 Proteinski nivo transkripcionih regulatora uključenih u lipidni metabolizam

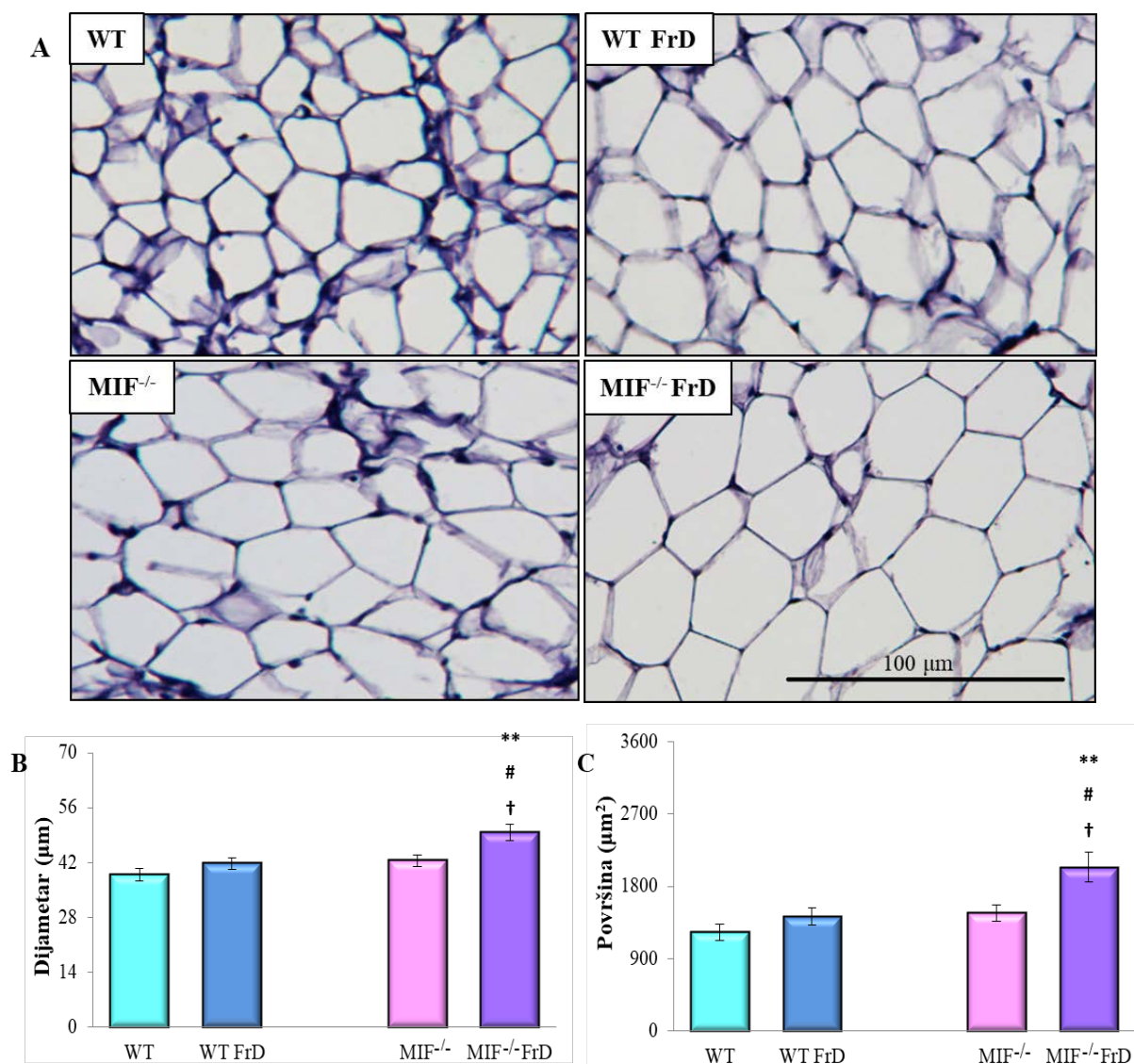
Koncentracije proteina PPAR γ i SREBP1c, ključnih transkripcionih regulatora uključenih u procese adipogeneze i lipogeneze, određene su u ukupnom ekstraktu proteina visceralnog masnog tkiva Western blot metodom (Slika 4.5). Dvofaktorijalna ANOVA je otkrila značajan efekat fruktozne ishrane [$F_{(1,28)} = 10.20$; $P < 0.01$] na nivo proteina PPAR γ , dok su statistički značajni efekti fruktozne ishrane [$F_{(1,17)} = 22.60$; $P < 0.001$] i delecije gena *Mif* [$F_{(1,17)} = 10.74$; $P < 0.01$] primećeni na nivou proteina SREBP1c. Rezultati *post-hoc* testa su pokazali povećanje koncentracije proteina PPAR γ u MIF^{-/-} FrD grupi u odnosu na WT (* $P < 0.05$) i MIF^{-/-} miševе († $P < 0.05$) (Slika 4.5A). Pored toga, ista grupa životinja je imala povišen nivo proteina SREBP1c u poređenju sa svim ostalim eksperimentalnim grupama (* $P < 0.001$ u odnosu na WT; ## $P < 0.01$ u odnosu na WT FrD; †† $P < 0.01$ u odnosu na MIF^{-/-}) (Slika 4.5B).



Slika 4.5. Nivo proteina PPAR γ i SREBP1c u visceralnom masnom tkivu. Relativne koncentracije proteina PPAR γ (A) i SREBP1c (B) u ukupnom ćelijskom ekstraktu su analizirane Western blot metodom. Kao kontrola jednakog nanošenja proteina na gel korišćen je β -aktin. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. Grupe: WT (miševi soja C57BL/6J na standardnoj ishrani), WT FrD (miševi soja C57BL/6J na ishrani obogaćenoj fruktozom), MIF^{-/-} (miševi sa deletiranim genom *Mif* na standardnoj ishrani) i MIF^{-/-} FrD (miševi sa deletiranim genom *Mif* na ishrani obogaćenoj fruktozom). Značajnosti su predstavljene kao: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, promene u odnosu na WT; ## $P < 0.01$, promene u odnosu WT FrD; † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$, promene u odnosu MIF^{-/-}.

4.2.5 Histološka i morfometrijska analiza visceralnog masnog tkiva

Histološka analiza visceralnog masnog tkiva je pokazala da je kombinacija ishrane bogate fruktozom i delecije gena *Mif* dovela do hipertrofije adipocita (Slika 4.6A). Dvofaktorijalna ANOVA je pokazala efekat ishrane bogate fruktozom na dijametar [$F_{(1,22)} = 8.73$; $P < 0.01$] i površinu adipocita [$F_{(1,22)} = 8.18$; $P < 0.01$]. Takođe, bili su prisutni efekti delecije gena *Mif* na dijametar [$F_{(1,22)} = 11.28$; $P < 0.01$] i površinu adipocita [$F_{(1,22)} = 10.1$; $P < 0.01$]. Morfometrijska analiza i *post-hoc* test su pokazali da su i dijametar (Slika 4.6B) i površina (Slika 4.6C) ćelija visceralnog masnog tkiva značajno povećani u MIF^{-/-} FrD grupi životinja u poređenju sa WT životinjama na standardnoj (** $P < 0.01$) i fruktoznoj ishrani (# $P < 0.05$), kao i u poređenju sa MIF^{-/-} miševima na standardnoj ishrani († $P < 0.05$).

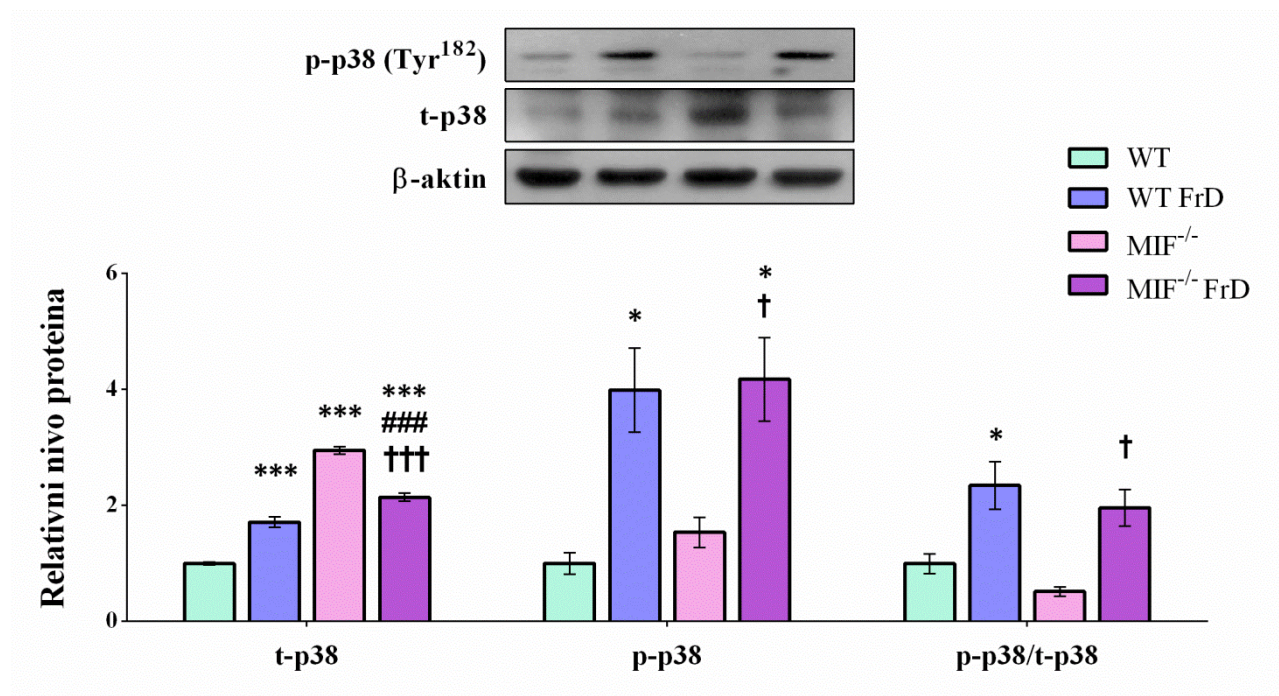


Slika 4.6. Histološka i morfometrijska analiza visceralnog masnog tkiva. (A) Reprerzentativne mikrofografije delova visceralnog masnog tkiva obojenih hematoksilin-eozinom. Rezultati morfometrijske analize za dijametar (B) i površinu (C) adipocita su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (sto adipocita po preseku, tri preseka po životinji i pet životinja po grupi; uvećanje 20x). Grupe: WT (miševi soja C57BL/6J na standardnoj ishrani), WT FrD (miševi soja C57BL/6J na ishrani obogaćenoj fruktozom), MIF^{-/-} (miševi sa deletiranim genom *Mif* na standardnoj ishrani) i MIF^{-/-} FrD (miševi sa deletiranim genom *Mif* na ishrani obogaćenoj fruktozom). Značajnosti su predstavljene kao: ** $P < 0.01$, promene u odnosu na WT; # $P < 0.05$, promene u odnosu WT FrD; † $P < 0.05$, promene u odnosu MIF^{-/-}.

4.2.6 Signalni put p38 MAP kinaze u visceralnom masnom tkivu

Da bi se ustanovilo da li ishrana obogaćena fruktozom i delecija gena *Mif* utiču na signalni put p38 MAP kinaze u visceralnom masnom tkivu, uzorci ukupnog ekstrakta proteina su ispitani Western blot metodom (Slika 4.7). Dvofaktorijalna ANOVA je potvrdila značajan efekat delecije gena *Mif* [$F_{(1,8)} = 315.67$; $P < 0.001$], kao i efekat njene interakcije sa fruktoznom ishranom [$F_{(1,8)} = 127.46$; $P < 0.001$] na ukupni nivo proteina p38. Sa druge strane, dvofaktorijalna ANOVA je pokazala značajne efekte fruktozne ishrane na fosforilaciju proteina p38 [$F_{(1,8)} = 27.70$; $P < 0.001$], kao i na odnos fosforilisanog i ukupnog nivoa ove kinaze [$F_{(1,8)} = 25.41$; $P < 0.01$]. Kao što je prikazano na Slici 4.7, *post-hoc* test je pokazao povećanje ukupnog nivoa proteina p38 u svim grupama u odnosu na WT grupu (** $P < 0.001$).

Takođe, MIF^{-/-} životinje na ishrani obogaćenoj fruktozom su imale povećan nivo proteina p38 u poređenju sa WT FrD životinjama (###*P* < 0.001), dok je on bio smanjen u poređenju sa MIF^{-/-} životinjama na standardnoj ishrani. Daljom *post-hoc* analizom je utvrđeno povećanje fosforilacije p38 na poziciji Tyr¹⁸² i odnosa fosforilacije i ukupnog nivoa proteina p38 u svim grupama na ishrani obogaćenoj fruktozom nezavisno od genotipa životinja (**P* < 0.05, u odnosu na WT; †*P* < 0.05, u odnosu na MIF^{-/-}).



Slika 4.7. Odnos između fosforilisane forme i ukupnog proteina p38 u visceralnom masnom tkivu. Relativne koncentracije ukupnog proteina p38 (t-p38) i njegove fosforilisane forme (p-p38) na poziciji Tyr¹⁸² u ukupnom ćelijskom ekstraktu analizirane su Western blot metodom. Kao kontrola jednakog nanošenja proteina na gel korišćen je β-aktin. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM. Grupe: WT (miševi soja C57BL/6J na standardnoj ishrani), WT FrD (miševi soja C57BL/6J na ishrani obogaćenoj fruktozom), MIF^{-/-} (miševi sa deletiranim genom *Mif* na standardnoj ishrani) i MIF^{-/-} FrD (miševi sa deletiranim genom *Mif* na ishrani obogaćenoj fruktozom). Značajnosti su predstavljene kao: **P* < 0.05, ****P* < 0.001, promene u odnosu na WT; ###*P* < 0.001, promene u odnosu WT FrD; †*P* < 0.05, †††*P* < 0.001, promene u odnosu MIF^{-/-}.

4.2.7 Markeri inflamacije u visceralnom masnom tkivu

Uzimajući u obzir da su metabolički poremećaji i gojaznost često praćeni lokalnom, hroničnom inflamacijom niskog intenziteta, inflamacija u visceralnom masnom tkivu je praćena ispitivanjem koncentracije iRNK za pro-inflamatorne citokine qPCR metodom. Dobijeni rezultati su pokazali da se nivoi iRNK za pro-inflamatorne citokine *Tnf*, *Il-6* i *Il-1β* u visceralnom masnom tkivu nisu razlikovali između eksperimentalnih grupa (**Tabela 4.4**).

Tabela 4.4. Relativna koncentracija iRNK za *Tnf*, *Il-6* i *Il-1 β* u visceralnom masnom tkivu miševa

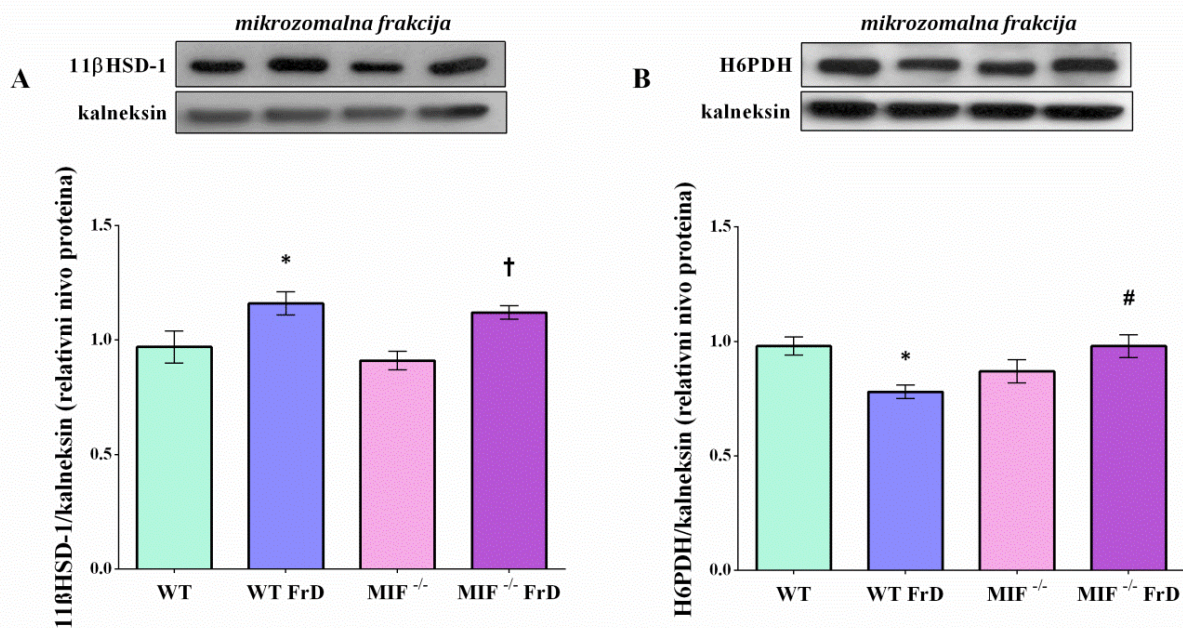
	WT	WT FrD	MIF ^{-/-}	MIF ^{-/-} FrD
<i>Tnf</i>	0.94 ± 0.18	0.53 ± 0.10	0.78 ± 0.22	0.90 ± 0.18
<i>Il-6</i>	1.32 ± 0.42	1.26 ± 0.69	0.29 ± 0.06	1.83 ± 0.42
<i>Il-1β</i>	0.62 ± 0.17	0.60 ± 0.17	1.20 ± 0.18	0.59 ± 0.19

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM ($n = 8$ životinja po grupi).

4.3 Jetra

4.3.1 Prereceptorski metabolizam glukokortikoida u jetri

Prereceptorski metabolizam glukokortikoida u jetri je ispitan analiziranjem koncentracije proteina 11 β HSD-1 i H6PDH u mikrozomalnoj frakciji Western blot metodom (**Slika 4.8**). Dvofaktorijalna ANOVA je pokazala značajan efekat fruktozne ishrane [$F_{(1,27)} = 17.02$; $P < 0.001$] na nivo proteina 11 β HSD-1, dok je *post-hoc* analiza pokazala da je ovaj protein povećan u jetri WT životinja na ishrani obogaćenoj fruktozom u odnosu na WT životinje ($*P < 0.05$), kao i kod MIF^{-/-} FrD miševa u odnosu na MIF^{-/-} miševe na standardnoj ishrani ($\dagger P < 0.05$) (**Slika 4.8A**). Dvofaktorijalna ANOVA je detektovala i značajan efekat interakcije između fruktozne ishrane i delecije gena *Mif* [$F_{(1,27)} = 10.12$; $P < 0.01$] na koncentraciju proteina H6PDH u mikrozomalnoj frakciji jetre. *Post-hoc* analiza je pokazala da je nivo proteina H6PDH smanjen u WT FrD eksperimentalnoj grupi u poređenju sa WT i MIF^{-/-} FrD grupama životinja (**Slika 4.8B**, $P < 0.05$).

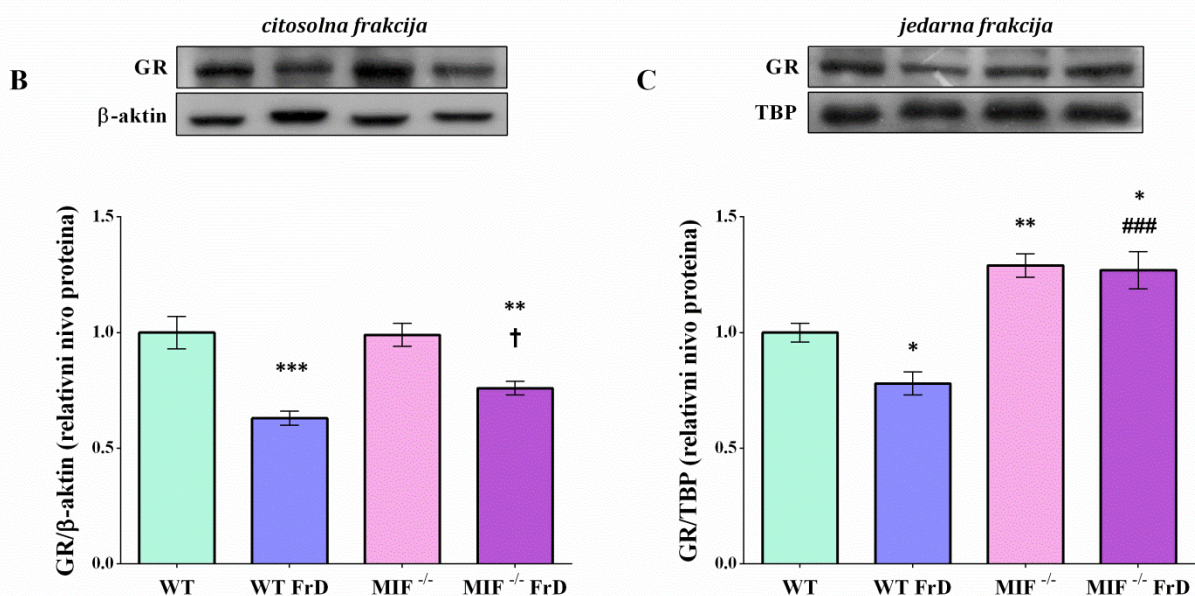
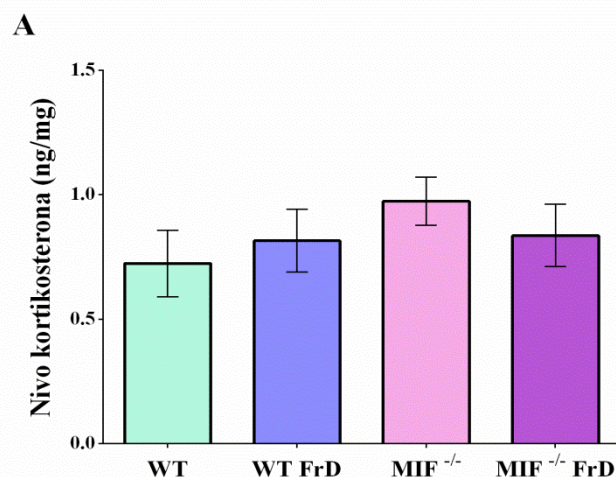


Slika 4.8. Nivo proteina 11βHSD-1 i H6PDH u jetri. Relativne koncentracije proteina 11βHSD-1 (A) i H6PDH (B) u mikrozoimalnoj frakciji jetre su analizirane Western blot metodom. Kao kontrola jednakog nanošenja proteina na gel korišćen je kalneksin. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM. Grupe: WT (miševi soja C57BL/6J na standardnoj ishrani), WT FrD (miševi soja C57BL/6J na ishrani obogaćenoj fruktozom), MIF^{-/-} (miševi sa deletiranim genom *Mif* na standardnoj ishrani) i MIF^{-/-} FrD (miševi sa deletiranim genom *Mif* na ishrani obogaćenoj fruktozom). Značajnosti su predstavljene kao: * $P < 0.05$, promene u odnosu na WT; # $P < 0.05$, promene u odnosu WT FrD; † $P < 0.05$, promene u odnosu MIF^{-/-}.

4.3.2 Signalni put glukokortikoida i unutarćelijska preraspodela glukokortikoidnog receptora

Da bi se ispitalo kako genetička delecija *Mif*-a i ishrana obogaćena fruktozom utiču na signalni put glukokortikoida i unutarćelijsku distribuciju proteina GR-a u jetri, unutarćelijska koncentracije kortikosterona je analizirana pomoću eseja, dok su uzorci citosolne i jedarne frakcije ispitani Western blot metodom. Iako nije bilo promena u koncentraciji kortikosterona u jetri životinjskih grupa (Slika 4.9A), dvofaktorijalna ANOVA je pokazala značajan efekat fruktozne ishrane [$F_{(1,28)} = 35.94$; $P < 0.001$] na nivo citoplazmatskog proteina GR. Kao što je prikazano na Slici 4.9B, *post-hoc* test je otkrio značajan pad nivoa proteina GR-a u citoplazmi kod WT FrD životinja u poređenju sa WT životinjama na standardnoj ishrani, kao i u MIF^{-/-} FrD u poređenju sa WT i MIF^{-/-} grupama na standardnom režimu ishrane (** $P < 0.001$, WT FrD u odnosu na WT, ** $P < 0.01$, MIF^{-/-} FrD u odnosu na WT; † $P < 0.05$, MIF^{-/-} FrD u odnosu na MIF^{-/-}).

Dvofaktorijalna ANOVA je detektovala i statistički značajne efekte ishrane obogaćene fruktozom [$F_{(1,28)} = 4.33$; $P < 0.05$] i nedostatka gena *Mif* [$F_{(1,28)} = 45.63$; $P < 0.001$] na proteinski nivo GR-a u jedru (Slika 4.9C). *Post-hoc* test je pokazao da je ova akumulacija jedarnog GR-a bila veća u jetri MIF^{-/-} životinja u poređenju sa WT miševima na standardnoj i ishrani obogaćenoj fruktozom (** $P < 0.01$, MIF^{-/-} u odnosu na WT; * $P < 0.05$, MIF^{-/-} FrD u odnosu na WT; ### $P < 0.001$, MIF^{-/-} FrD u odnosu na WT FrD). Pored toga, nivo proteina GR-a u jedru je bio smanjen kod WT FrD miševa u poređenju sa WT životinjama (* $P < 0.05$).

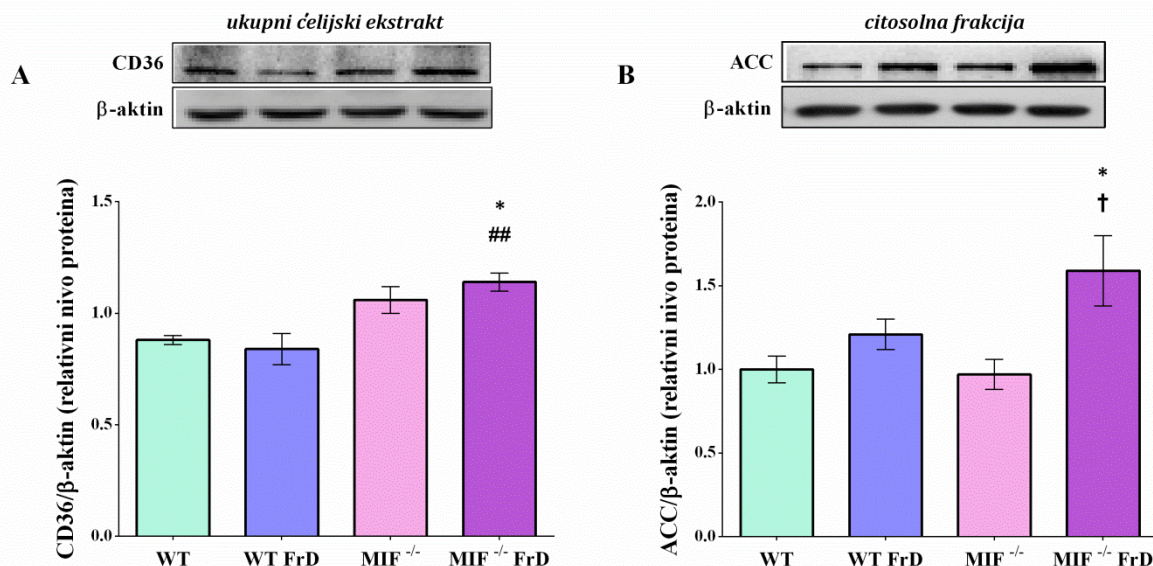


Slika 4.9. Koncentracija kortikosterona i unutarćelijska preraspodela proteina GR-a u jetri. Nivo kortikosterona (A) određen je ELISA metodom. Relativne koncentracije proteina GR-a u citosolnoj (B) i jedarnoj frakciji (C) analizirane su Western blot metodom. Kao kontrola jednakog nanošenja proteina na gel korišćen je β-aktin za citosolnu frakciju, dok je TBP bio korišćen kao kontrola za jedarnu frakciju. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM. Grupe: WT (miševi soja C57BL/6J na standardnoj ishrani), WT FrD (miševi soja C57BL/6J na ishrani obogaćenoj fruktozom), MIF^{-/-} (miševi sa deletiranim genom *Mif* na standardnoj ishrani) i MIF^{-/-} FrD (miševi sa deletiranim genom *Mif* na ishrani obogaćenoj fruktozom). Značajnosti su predstavljene kao: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ promene u odnosu na WT; ### $P < 0.001$, promene u odnosu WT FrD; † $P < 0.05$, promene u odnosu MIF^{-/-}.

4.3.3 Nivo enzima uključenih u transport lipida i *de novo* lipogenezu u jetri

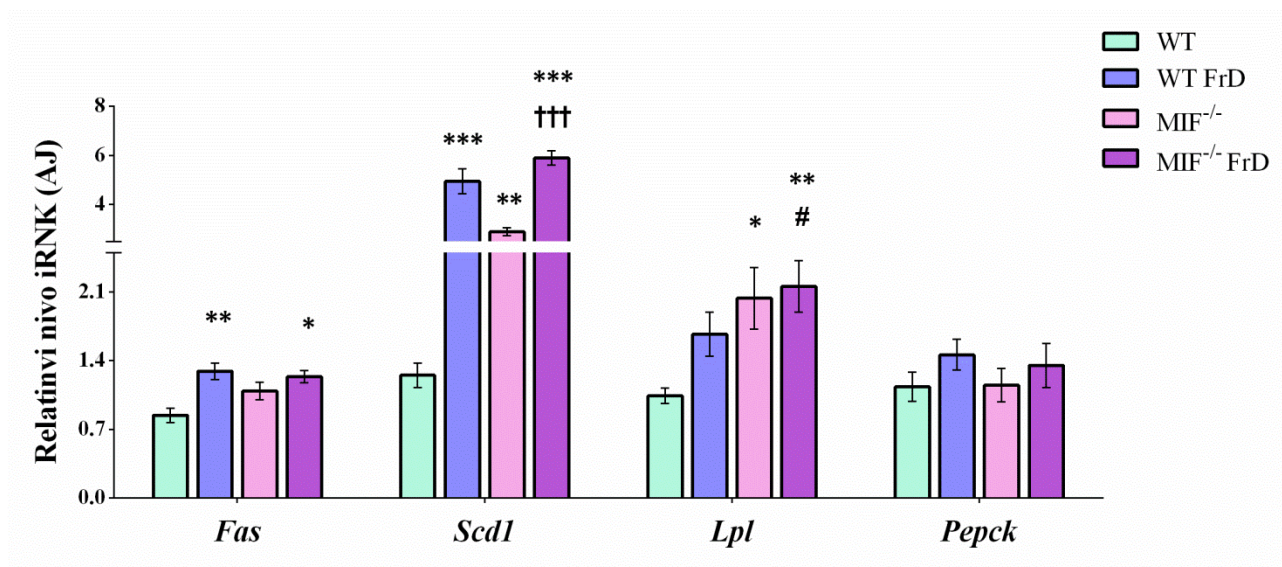
Da bi se utvrdilo da li ishrana obogaćena fruktozom i delecija gena *Mif* utiču na transport lipida i *de novo* lipogenezu u jetri, koncentracija proteina CD36 (Slika 4.10A) ispitana je u uzorcima ukupnog ćelijskog ekstrakta, dok je nivo proteina ACC (Slika 4.10B) ispitivan u uzorcima citosolne frakcije korišćenjem Western blot metode. Dvofaktorijalna ANOVA je pokazala značajan efekat delecije gena *Mif* [$F_{(1,23)} = 17.43$, $P < 0.001$] na nivo proteina CD36, dok je ishrana obogaćena fruktozom uticala na nivo proteina ACC [$F_{(1,26)} =$

9.30, $P < 0.01$]. *Post-hoc* test je otkrio značajno povećanu koncentraciju proteina CD36 kod MIF^{-/-} miševa hranjenih fruktozom u poređenju sa WT miševima na standardnoj i ishrani obogaćenoj fruktozom (Slika 4.10A, * $P < 0.05$, u odnosu na WT; ## $P < 0.01$, u odnosu na WT FrD). Kod istih životinja je uočen i viši nivo proteina ACC u poređenju sa WT i MIF^{-/-} životinjama na standardnoj ishrani (Slika 4.10B, * $P < 0.05$, MIF^{-/-} FrD u odnosu na WT; † $P < 0.05$, MIF^{-/-} FrD u odnosu na MIF^{-/-}).



Slika 4.10. Koncentracija proteina CD36 i ACC u jetri. Relativne koncentracije proteina CD36 u ukupnom ćelijskom ekstraktu (A) i proteina ACC (B) u citosolnoj frakciji su analizirane Western blot metodom. Kao kontrola jednakog nanošenja proteina na gel korišćen je β-aktin. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM. Grupe: WT (miševi soja C57BL/6J na standardnoj ishrani), WT FrD (miševi soja C57BL/6J na ishrani obogaćenoj fruktozom), MIF^{-/-} (miševi sa deletiranim genom *Mif* na standardnoj ishrani) i MIF^{-/-} FrD (miševi sa deletiranim genom *Mif* na ishrani obogaćenoj fruktozom). Značajnosti su predstavljene kao: * $P < 0.05$, promene u odnosu na WT; ## $P < 0.01$, promene u odnosu WT FrD; † $P < 0.05$, promene u odnosu MIF^{-/-}.

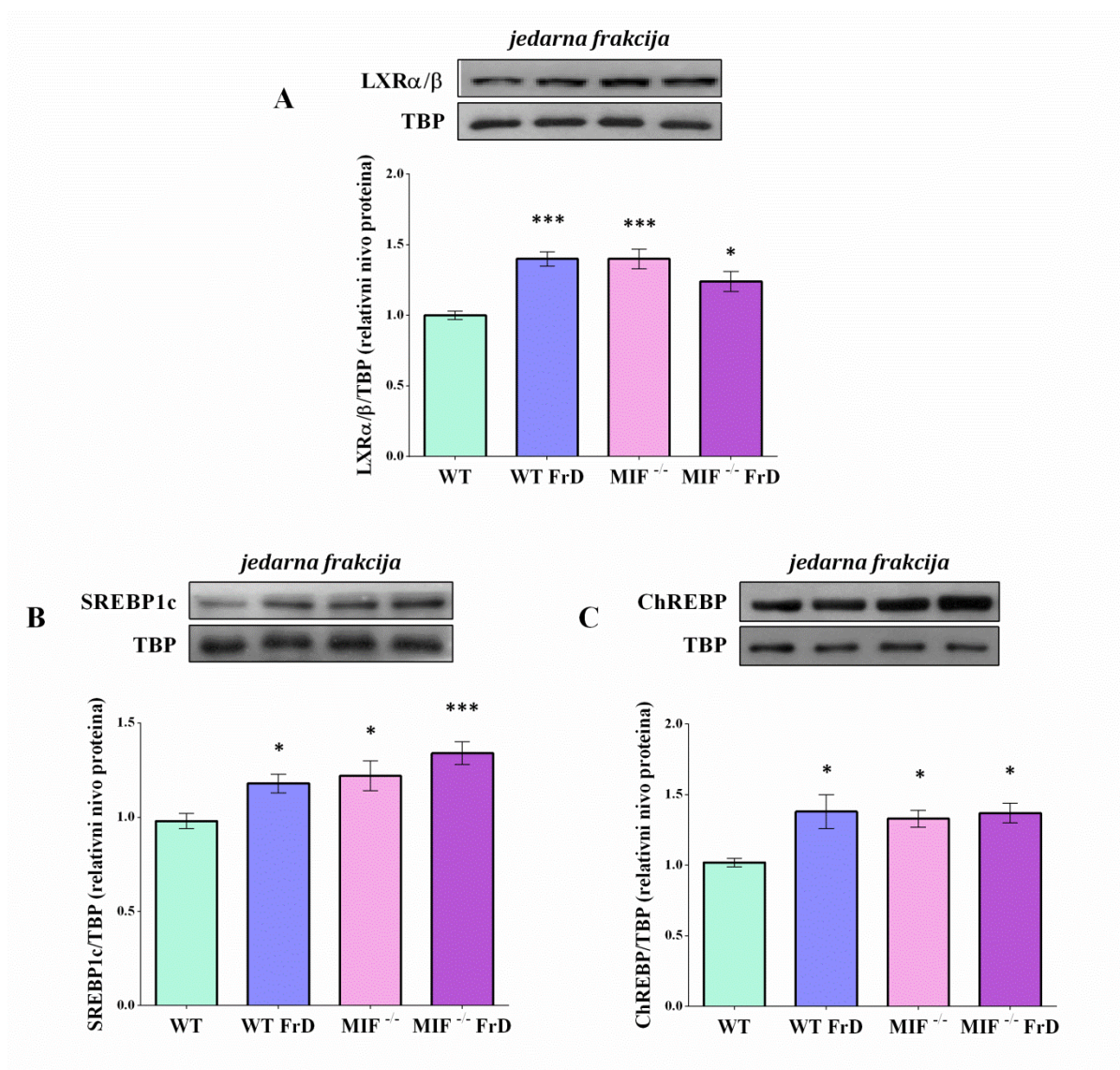
Ekspresija gena uključenih u regulaciju procesa lipogeneze u jetri, *Fas*, *Scd1* i *Lpl*, ispitana je qPCR metodom (Slika 4.11). Značajan efekat fruktozne ishrane detektovan je za gene *Fas* [$F_{(1,20)} = 12.36$, $P < 0.01$] i *Scd1* [$F_{(1,28)} = 113.70$, $P < 0.001$], dok je efekat nedostatka gena *Mif* zabeležen za gene *Scd1* [$F_{(1,28)} = 17.10$, $P < 0.001$] i *Lpl* [$F_{(1,28)} = 17.05$, $P < 0.001$]. *Post-hoc* analize su pokazale da je nivo iRNK za *Fas* povećan kod svih životinja hranjenih fruktozom u poređenju sa WT grupom miševa (** $P < 0.01$, WT FrD u odnosu na WT; * $P < 0.05$, MIF^{-/-} FrD u odnosu na WT). Sve eksperimentalne grupe su imale povišen nivo iRNK za *Scd1* u poređenju sa WT grupom (** $P < 0.001$, WT FrD vs. WT; ** $P < 0.01$, MIF^{-/-} vs. WT; *** $P < 0.001$, MIF^{-/-} FrD vs. WT), dok je nivo iRNK za *Scd1* u grupi MIF^{-/-} FrD bio povećan u poređenju sa MIF^{-/-} životinjama na standardnoj ishrani (††† $P < 0.001$). Kao što je prikazano na Slici 4.11, ekspresija gena *Lpl* je bila povećana kod svih MIF^{-/-} životinja u poređenju sa WT grupom (* $P < 0.05$, MIF^{-/-} u odnosu na WT; ** $P < 0.01$, MIF^{-/-} FrD u odnosu na WT), kao i kod MIF^{-/-} FrD životinja u poređenju sa WT FrD grupom (# $P < 0.05$, MIF^{-/-} FrD nasuprot WT FrD). Ekspresija gena *Pepck* nije bila promenjena ni u jednoj eksperimentalnoj grupi.



Slika 4.11. Relativni nivo iRNK za gene koji učestvuju u metabolizmu lipida u jetri. Relativna koncentracija iRNK za *Fas*, *Scd1*, *Lpl* i *Pepck* su ispitane qPCR metodom. Kao endogena kontrola za normalizaciju nivoa iRNK korišćen je *Hprt*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. Svi uzorci su rađeni u triplikatu. Grupe: WT (miševi soja C57BL/6J na standardnoj ishrani), WT FrD (miševi soja C57BL/6J na ishrani obogaćenoj fruktozom), MIF^{-/-} (miševi sa deletiranim genom *Mif* na standardnoj ishrani) i MIF^{-/-} FrD (miševi sa deletiranim genom *Mif* na ishrani obogaćenoj fruktozom). Značajnosti su predstavljene kao: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, promene u odnosu na WT; # $P < 0.05$, promene u odnosu WT FrD, ††† $P < 0.001$, promene u odnosu MIF^{-/-}.

4.3.4 Proteinski nivo transkripcionih regulatora uključenih u lipidni metabolizam u jetri

Proteinski nivo ključnih transkripcionih regulatora uključenih u proces lipogeneze u jetri, LXR α/β , SREBP1c i ChREBP, ispitan je u jedarnoj frakciji metodom Western blot. Semikvantitativna analiza intenziteta imunopozitivnih proteinskih traka i dvofaktorijalna ANOVA su otkrile značajan efekat fruktozne ishrane na nivo proteina LXR α/β [$F_{(1,26)} = 4.48$; $P < 0.05$] (Slika 4.12A), SREBP1c [$F_{(1,28)} = 8.05$; $P < 0.01$] (Slika 4.12B) i ChREBP [$F_{(1,16)} = 6.47$; $P < 0.05$] (Slika 4.12C). Značajan efekat delecije gena *Mif* je ostvaren na koncentraciju proteina LXR α/β [$F_{(1,26)} = 4.62$; $P < 0.05$] i proteina SREBP1c [$F_{(1,28)} = 11.60$; $P < 0.01$], dok je značajna interakcija između faktora utvrđena samo za nivo proteina LXR α/β [$F_{(1,26)} = 25.25$; $P < 0.001$]. Rezultati *post-hoc* testa su otkrili statistički značajno povećanje koncentracije proteina LXR α/β , SREBP1c i ChREBP u svim životinjskim grupama u poređenju sa WT grupom (Slika 4.12A-C, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$).

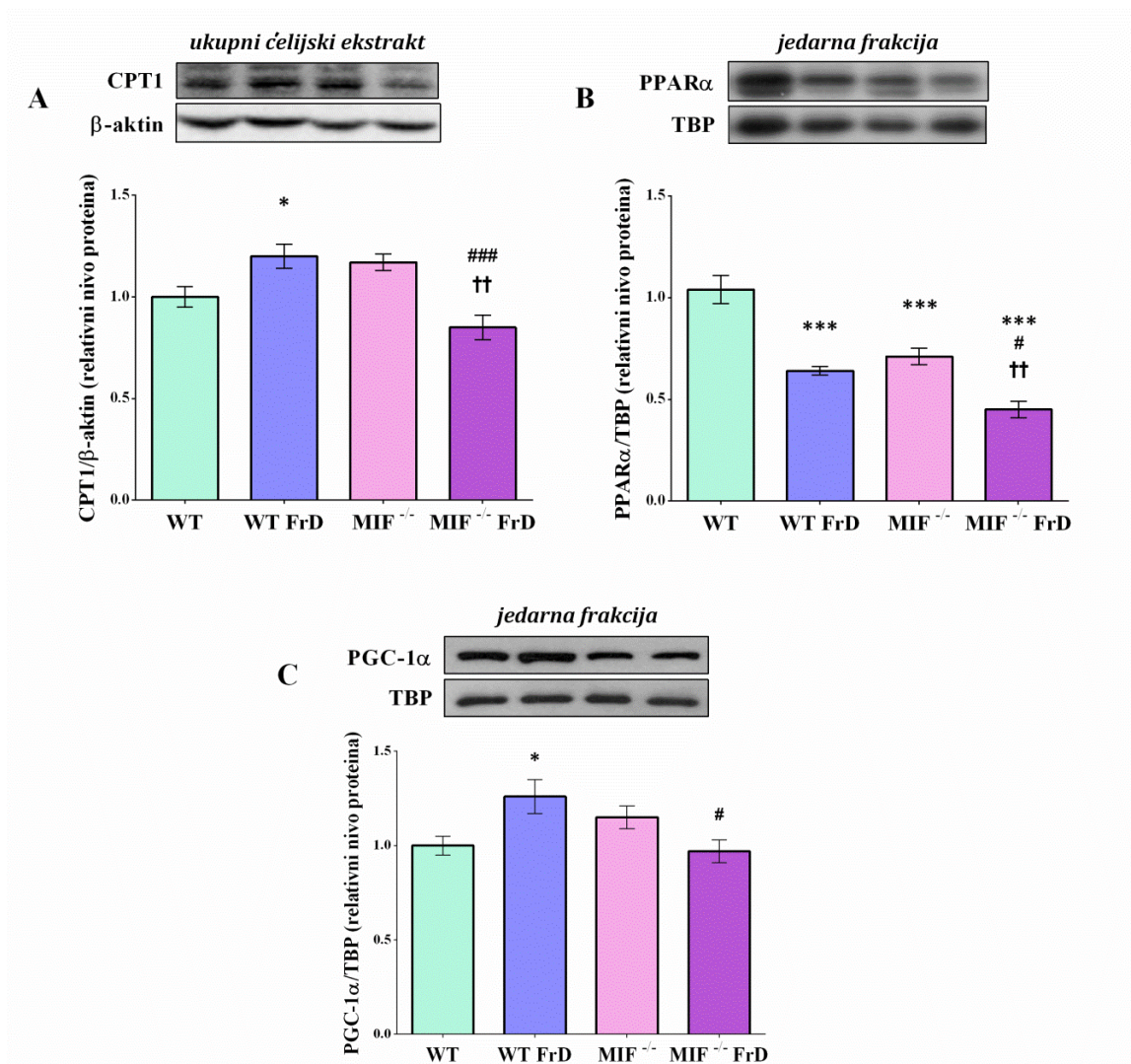


Slika 4.12. Koncentracija proteina LXR α/β , SREBP1c i ChREBP u jetri. Relativne koncentracije proteina LXR α/β (A), SREBP1c (B) i ChREBP (C) u jedarnoj frakciji su analizirane Western blot metodom. Kao kontrola jednakog nanošenja proteina na gel korišćen je TBP. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. Grupe: WT (miševi soja C57BL/6J na standardnoj ishrani), WT FrD (miševi soja C57BL/6J na ishrani obogaćenju fruktozom), MIF^{-/-} (miševi sa deletiranim genom *Mif* na standardnoj ishrani) i MIF^{-/-} FrD (miševi sa deletiranim genom *Mif* na ishrani obogaćenju fruktozom). Značajnosti su predstavljene kao: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, promene u odnosu na WT.

4.3.5 Nivo proteina uključenih u β -oksidaciju masnih kiselina

Kako bi se ispitalo da li ishrana obogaćena fruktozom i delecija gena *Mif* dovode do aktivacije β -oksidacije masnih kiselina, praćene su koncentracije specifičnog transportera CPT1, transkripcionog regulatora PPAR α i koaktivatora PGC-1 α (Slika 4.13). Dvofaktorijalna ANOVA je otkrila značajan efekat interakcije između ishrane obogaćene fruktozom i delecije gena *Mif* na nivo proteina CPT1 [$F_{(1,28)} = 24.87$; $P < 0.001$] u ukupnom ćelijskom ekstraktu jetre, kao i na nivo proteina PGC-1 α u jedarnoj frakciji [$F_{(1,27)} = 10.82$; $P < 0.01$]. Efekat ishrane obogaćene fruktozom [$F_{(1,28)} = 39.44$; $P < 0.001$] i delecije gena *Mif* [$F_{(1,28)} = 24.95$; $P < 0.001$] detektovan je za jedarni nivo proteina PPAR α . WT životinje na ishrani obogaćenju fruktozom su imale povećan nivo proteina CPT1 u poređenju sa WT miševima (* $P < 0.05$), dok su MIF^{-/-}

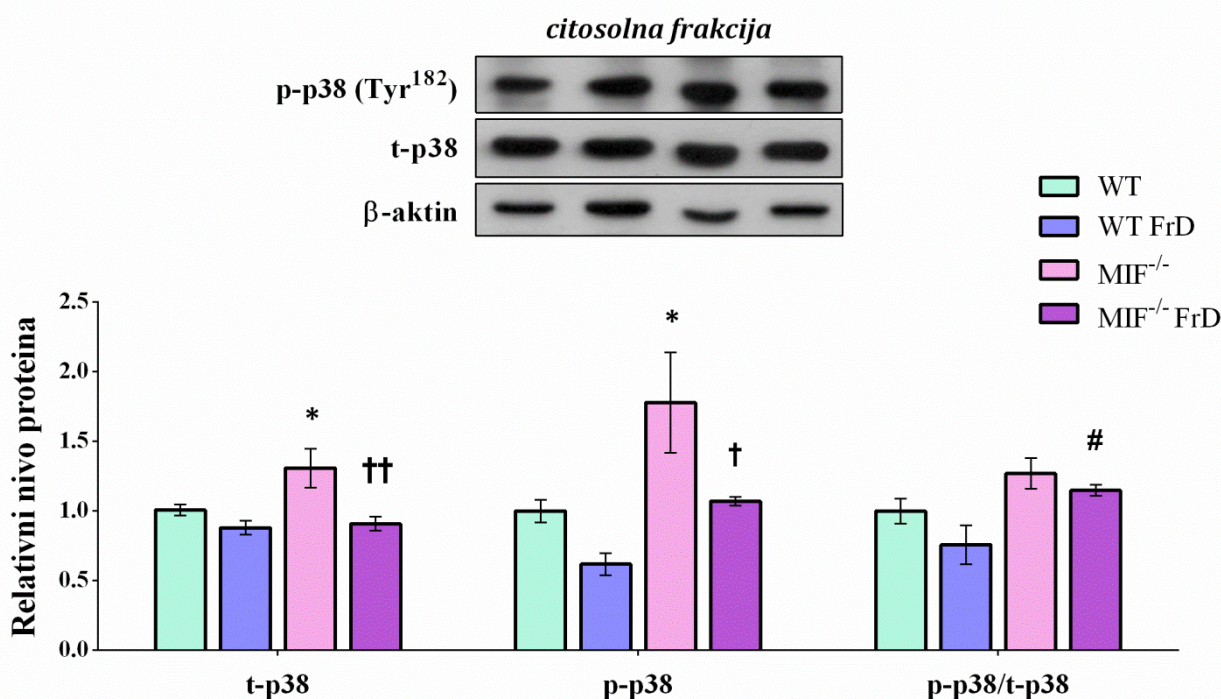
FrD životinje imale smanjen nivo proteina CPT1 u poređenju sa WT miševima na istom režimu ishrane i MIF^{-/-} miševima na standardnoj ishrani (Slika 4.13A, ###*P* < 0.001, MIF^{-/-} FrD nasuprot WT FrD; ††*P* < 0.01, MIF^{-/-} FrD nasuprot MIF^{-/-}). Nivo proteina PPARα je bio smanjen u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na WT životinje (Slika 4.13B, ****P* < 0.001), dok je koncentracija PPARα kod MIF^{-/-} FrD životinja bila smanjena i u odnosu na WT FrD i MIF^{-/-} grupe (#*P* < 0.05, MIF^{-/-} FrD u odnosu na WT FrD; ††*P* < 0.01, MIF^{-/-} FrD u odnosu na MIF^{-/-}). *Post-hoc* test je otkrio značajan porast nivoa proteina PGC-1α kod WT životinja na ishrani obogaćenoj fruktozom u poređenju sa WT i MIF^{-/-} FrD životinjama (Slika 4.13C, **P* < 0.05, WT FrD u odnosu na WT, #*P* < 0.05, MIF^{-/-} FrD u odnosu na WT FrD).



Slika 4.13. Koncentracija proteina CPT1, PPARα i PGC-1α u jetri. Relativna koncentracija proteina CPT1 (A) određena je u ukupnom ćelijskom ekstraktu Western blot metodom, dok su koncentracije proteina PPARα (B) i proteina PGC-1α (C) analizirane u jedarnoj frakciji jetre. Kao kontrola jednakog nanošenja proteina na gel korišćen je β-aktin za ukupni ćelijski ekstrakt, dok je TBP bio korišćen kao kontrola za jedarnu frakciju. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM. Grupe: WT (miševi soja C57BL/6J na standardnoj ishrani), WT FrD (miševi soja C57BL/6J na ishrani obogaćenoj fruktozom), MIF^{-/-} (miševi sa deletiranim genom *Mif* na standardnoj ishrani) i MIF^{-/-} FrD (miševi sa deletiranim genom *Mif* na ishrani obogaćenoj fruktozom). Značajnosti su predstavljene kao: **P* < 0.05, ****P* < 0.001, promene u odnosu na WT; #*P* < 0.05, ###*P* < 0.001, promene u odnosu WT FrD; ††*P* < 0.01, promene u odnosu MIF^{-/-}.

4.3.6 Signalni putevi p38 i AMPK kinaza

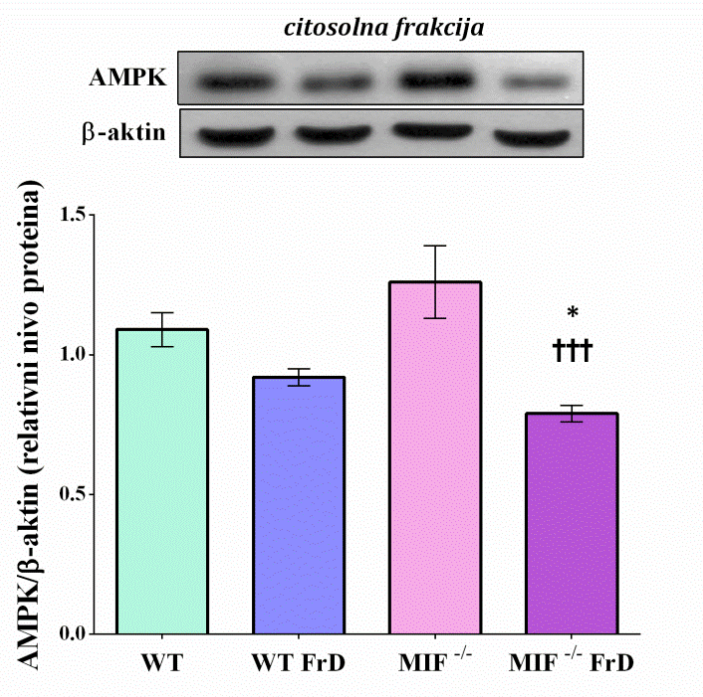
Da bi se ustanovilo da li ishrana obogaćena fruktozom i delecija gena *Mif* utiču na signalni put p38 MAP kinaze u jetri, uzorci citosolne frakcije su ispitani Western blot metodom (Slika 4.14). Značajan efekat ishrane obogaćene fruktozom je detektovan na nivou proteina p38 [$F_{(1,28)} = 13.16$, $P < 0.01$] i njegove fosforilacije na poziciji Tyr¹⁸² [$F_{(1,25)} = 9.03$, $P < 0.01$], dok je efekat delecije gena *Mif* otkriven za ukupni proteinski nivo p38 [$F_{(1,28)} = 5.07$, $P < 0.05$], njegovu fosforilaciju [$F_{(1,25)} = 11.34$, $P < 0.01$], kao i za odnos nivou fosforilisane forme p38 i ukupnog nivou ovog proteina [$F_{(1,25)} = 12.59$, $P < 0.01$]. *Post-hoc* test je otkrio povećanje ukupnog nivou p38 kod MIF^{-/-} životinja na standardnoj ishrani u odnosu na WT i MIF^{-/-} FrD grupe životinja (* $P < 0.05$, MIF^{-/-} u odnosu na WT; †† $P < 0.01$, MIF^{-/-} u odnosu na MIF^{-/-} FrD), kao i povećanje fosforilisane forme ovog proteina kod MIF^{-/-} grupe u odnosu na WT i MIF^{-/-} FrD (* $P < 0.05$, MIF^{-/-} u odnosu na WT; † $P < 0.05$, MIF^{-/-} u odnosu na MIF^{-/-} FrD). Ipak, odnos koncentracije fosforilisane forme p38 i ukupnog nivou proteina p38 je bio povećan samo kod MIF^{-/-} FrD u odnosu na WT životinje na ishrani obogaćenoj fruktozom (Slika 4.14, $P < 0.05$).



Slika 4.14. Odnos između fosforilisane forme i ukupnog proteina p38 u jetri. Relativne koncentracije ukupnog proteina p38 (t-p38) i njegove fosforilisane forme na poziciji Tyr¹⁸² (p-p38) u citosolnoj frakciji analizirane su Western blot metodom. Kao kontrola jednakog nanošenja proteina na gel korišćen je β-aktin. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM. Grupe: WT (miševi soja C57BL/6) na standardnoj ishrani), WT FrD (miševi soja C57BL/6) na ishrani obogaćenoj fruktozom), MIF^{-/-} (miševi sa deletiranim genom *Mif* na standardnoj ishrani) i MIF^{-/-} FrD (miševi sa deletiranim genom *Mif* na ishrani obogaćenoj fruktozom). Značajnosti su predstavljene kao: * $P < 0.05$, promene u odnosu na WT; # $P < 0.05$, promene u odnosu WT FrD; † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$, promene u odnosu MIF^{-/-}.

Koncentracija proteina AMPK, glavnog energetskog senzora, određena je analizom citosolne frakcije Western blot metodom (Slika 4.15). Dvofaktorijalna ANOVA je utvrdila postojanje značajne interakcije između ishrane obogaćene fruktozom i delecije gena *Mif* na nivo proteina AMPK [$F_{(1,27)} = 4.36$, $P < 0.05$], dok je *post-hoc* test pokazao statistički značajno

smanjenje koncentracije AMPK kod MIF^{-/-} FrD miševa u odnosu na WT i MIF^{-/-} miševe na standardnoj ishrani (**P* < 0.05, MIF^{-/-} FrD vs. WT; †††*P* < 0.001, MIF^{-/-} FrD vs. MIF^{-/-}).



Slika 4.15. Koncentracija proteina AMPK u jetri. Relativna koncentracija proteina AMPK u citosolnoj frakciji je analizirana Western blot metodom. Kao kontrola jednakog nanošenja proteina na gel korišćen je β-aktin. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM. Grupe: WT (miševi soja C57BL/6J na standardnoj ishrani), WT FrD (miševi soja C57BL/6J na ishrani obogaćenoj fruktozom), MIF^{-/-} (miševi sa deletiranim genom *Mif* na standardnoj ishrani) i MIF^{-/-} FrD (miševi sa deletiranim genom *Mif* na ishrani obogaćenoj fruktozom). Značajnosti su predstavljene kao: **P* < 0.05, promene u odnosu na WT; †††*P* < 0.001, promene u odnosu MIF^{-/-}.

4.3.7 Biohemijski markeri oštećenja jetre

Da bi se ispitalo da li ishrana obogaćena fruktozom i delecija gena *Mif* dovode do oštećenja jetre, koncentracije enzima ALT i AST su određene u plazmi eksperimentalnih životinja. Iako nivoi ALT i AST u krvi nisu bili promenjeni ni u jednoj eksperimentalnoj grupi, dvofaktorijalna ANOVA analiza je pokazala značajne efekte ishrane obogaćene fruktozom [$F_{(1,28)} = 5.26$; $P < 0.05$] na koncentraciju AST (**Tabela 4.5**).

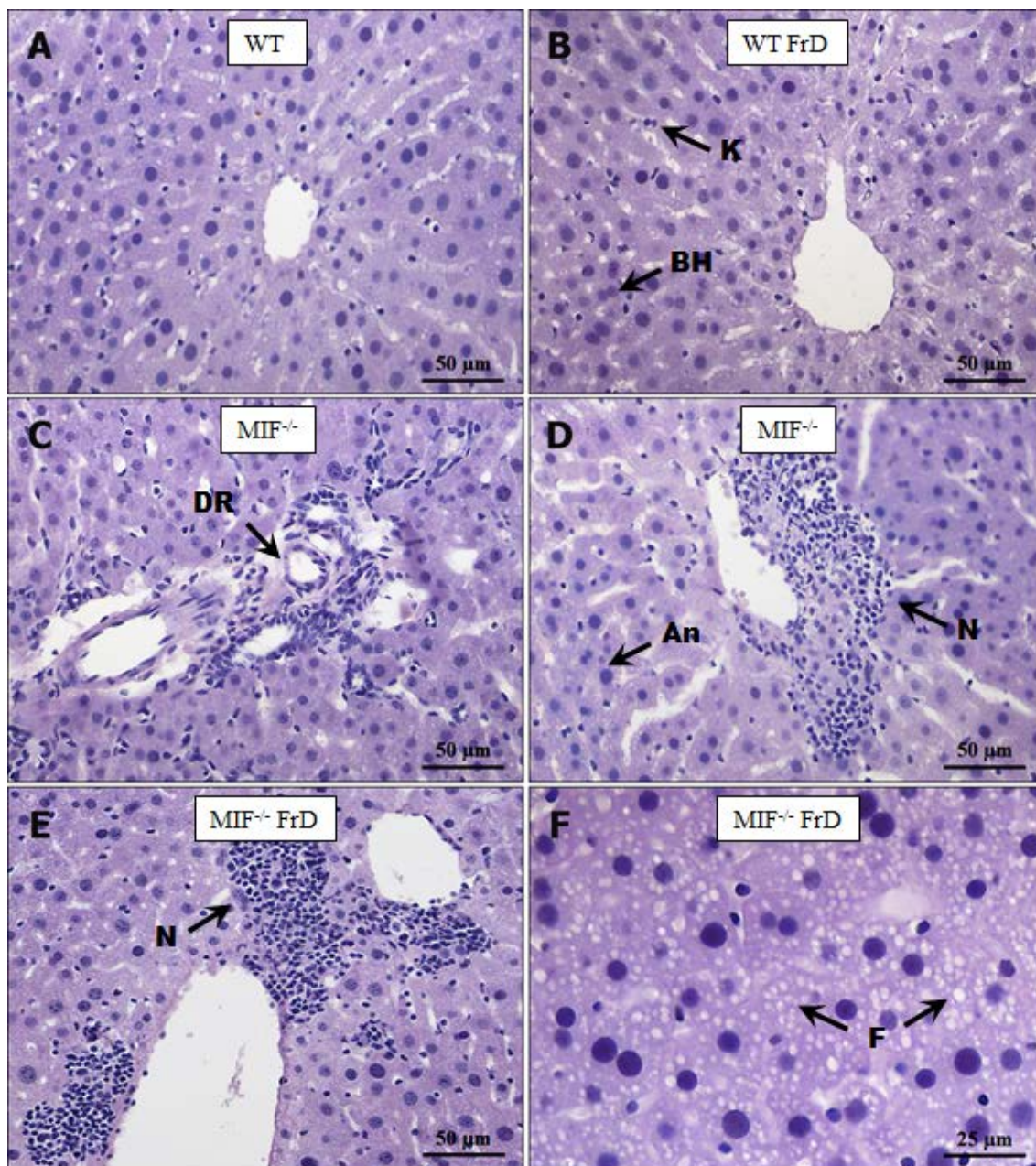
Tabela 4.5. Biohemijski parametri oštećenja jetre: ALT i AST

	WT	WT FrD	MIF ^{-/-}	MIF ^{-/-} FrD
ALT (U/l)	37.04 ± 1.75	33.33 ± 2.68	28.13 ± 2.95	34.26 ± 2.58
AST (U/l)	188.76 ± 14.88	220.90 ± 20.90	169.14 ± 20.98	232.54 ± 26.93

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM ($n = 8$ životinja po grupi).

4.3.8 Histološka analiza jetre

U WT grupi životinja je primećena uredna histoarhitektura i radijalna organizacija hepatocita bez histopatoloških promena (**Slika 4.16A**), dok su promene karakteristične za inflamatorne reakcije (uvećane Kupferove ćelije i regenerativne promene, poput binuklearnih hepatocita, anizocitoze i anizonukleoze) bile uočene u jetri drugih eksperimentalnih grupa (**Slika 4.16B-E, Tabela 4.6**). Daljom analizom je utvrđeno da su broj Kupferovih ćelija prisutnih u sinusoidima jetre kao i njihova veličina bili povećani u grupama na ishrani obogaćenoj fruktozom, dok su kod MIF^{-/-} životinja na standardnoj ishrani Kupferove ćelije bile prisutne, ali u manjem broju (**Slika 4.16B-E, Tabela 4.6**). Kongestija sinusoida je bila prisutna samo u MIF^{-/-} grupi životinja koja je konzumirala fruktozu (**Slika 4.16E**). Iako balonirajuće degeneracije, kao ni makrovezikularne masne promene hepatocita (velike kapljice) nisu primećene ni u jednoj grupi životinja, diskretne mikrovezikularne masne promene (male kapljice) bile su uočljive u jetri MIF^{-/-} miševa, dok su ove promene bile izraženije (umerene) u jetri MIF^{-/-} miševa na ishrani obogaćenoj fruktozom (**Slika 4.16F, Tabela 4.6**).



Slika 4.16. Histološka analiza jetre. Reprezentativne mikrografije delova jetre obojenih hematoksilin-eozinom (tri polja po preseku, tri preseka po životinji i tri životinje po grupi). **A** - WT grupa koja pokazuje urednu organizaciju i arhitekturu jetre, bez patoloških promena (20x). **B** - WT FrD grupa koja pokazuje diskretne degenerativne promene u hepatocitima (20x). **C-D** - MIF^{-/-} grupa koja pokazuje diskretne do umerene degenerativne promene u hepatocitima (20x). **E-F** - MIF^{-/-} FrD grupa koja pokazuje umerene degenerativne promene u hepatocitima (E: 20x; D: 40x). Uvećane Kupferove ćelije (K); binuklearni hepatociti (BH); anizonukleozna (An); duktularna reakcija (DR); nekroza (N); mikrovezikularne masne promene (F).

Tabela 4.6. Histopatološke promene u jetri miševa

	WT	WT FrD	MIF ^{-/-}	MIF ^{-/-} FrD
Regenerativne promene (anizocitoza, anizonukleoza, dvojedarni hepatociti)	-	++	++	++
Uvećane Kupferove ćelije	-	++	+	++
Baloniranje hepatocita	-	-	-	-
Makrovezikularne masne promene	-	-	-	-
Mikrovezikularne masne promene	-	-	+	++

Histološka analiza jetre je vršena korišćenjem tri polja po preseku, tri preseka po životinji i četiri životinje po grupi. Vrednosti za parametre su: - promene nisu prisutne; + promene su obično prisutne (diskretne promene); ++ promene su gotovo uvek prisutne (umerene promene).

Tabela 4.7. Inflamatorne reakcije u jetri miševa

	WT	WT FrD	MIF ^{-/-}	MIF ^{-/-} FrD
Periportalna i periseptalna "piecemeal" nekroza (interface hepatitis)	-	-	-	-
Konfluentna nekroza	-	-	+	++
Fokalna nekroza, apoptoza i fokalna inflamacija	-	+	++	++
Portalna inflamacija	-	-	-	-
Fibroza	-	-	-	-
Duktularna reakcija	-	-	+	++

Histološka analiza jetre je vršena korišćenjem tri polja po preseku, tri preseka po životinji i četiri životinje po grupi. Vrednosti za parametre su: - promene nisu prisutne; + promene su obično prisutne (diskretne promene); ++ promene su gotovo uvek prisutne (umerene promene).

Što se tiče nekrotičnih promena, konfluentna nekroza (pretežno u zoni 3, pericentralno) zabeležena je u jetri MIF^{-/-} i MIF^{-/-} FrD životinja, i ocenjena je kao diskretna (MIF^{-/-} grupa) odnosno umerena (MIF^{-/-} FrD grupa) (Slika 4.16C-E, Tabela 4.7). Umerena fokalna nekroza je zabeležena kod svih MIF^{-/-} životinja bez obzira na njihovu ishranu (Slika 4.16C-E, Tabela 4.7), dok je kod WT miševa na ishrani obogaćenoj fruktozom uočena diskretna fokalna nekroza (Slika 4.16B, Tabela 4.7). Iako portalna inflamacija i fibroza jetre nisu primećeni ni u jednoj eksperimentalnoj grupi, kod MIF^{-/-} i MIF^{-/-} FrD miševa je primećena diskretna do umerena duktularna reakcija u periportalnom prostoru (Slika 4.16C, Tabela 4.7).

4.3.9 Markeri inflamacije u jetri

Da bi se ispitao uticaj ishrane obogaćene fruktozom i delecije gena *Mif* na inflamaciju u jetri, analizirana je ekspresija gena za pro-inflamatorne citokine *Tnf*, *Il-6* i *Il-1β*, korišćenjem qPCR metode. Kao što je detektovala dvofaktorijalna ANOVA (Tabela 4.8), nivo iRNK za *Tnf* je bio nepromenjen u svim grupama, dok je značajan efekat delecije gena *Mif* ostvaren na nivou iRNK za *Il-6* [$F_{(1,21)} = 17.24$; $P < 0.001$]. Značajno povećanje koncentracije iRNK za *Il-6* je primećeno kod MIF^{-/-} miševa u poređenju sa WT životinjama (* $P < 0.05$), dok je povećanje nivoa iRNK za ovaj pro-inflamatorni citokin bilo izraženije kod MIF^{-/-} miševa na ishrani obogaćenoj fruktozom (** $P < 0.01$, MIF^{-/-} FrD u odnosu na WT; # $P < 0.05$, MIF^{-/-} FrD u odnosu na WT FrD). Dvofaktorijalna ANOVA je otkrila značajne efekte ishrane obogaćene fruktozom [$F_{(1,22)} = 31.98$; $P < 0.001$], delecije gena *Mif* [$F_{(1,22)} = 74.56$; $P < 0.0001$], kao i interakcije između ovih faktora [$F_{(1,22)} = 44.21$; $P < 0.0001$] na nivo iRNK za *Il-1β*. *Post-hoc* test je pokazao da je nivo iRNK za *Il-1β* povećan u MIF^{-/-} grupi u poređenju sa WT životinjama na standardnoj ishrani i MIF^{-/-} FrD životinjama (*** $P < 0.001$, MIF^{-/-} u odnosu na WT; ††† $P < 0.001$, MIF^{-/-} u odnosu na MIF^{-/-} FrD).

Tabela 4.8. Relativna koncentracija iRNK za *Tnf*, *Il-6* i *Il-1β* u jetri miševa

	WT	WT FrD	MIF ^{-/-}	MIF ^{-/-} FrD
<i>Tnf</i>	0.70 ± 0.12	0.71 ± 0.14	0.99 ± 0.15	0.99 ± 0.11
<i>Il-6</i>	1.21 ± 0.12	1.51 ± 0.20	2.49 ± 0.38*	3.05 ± 0.53**#
<i>Il-1β</i>	1.04 ± 1.07	1.29 ± 0.16	4.93 ± 0.37***	1.80 ± 0.30†††

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM ($n = 8$ životinja po grupi). Značajnosti su predstavljene kao: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, promene u odnosu na WT; # $P < 0.05$, promene u odnosu WT FrD; ††† $P < 0.001$, promene u odnosu na MIF^{-/-}.

5. DISKUSIJA

Veliki broj studija na životinjama i ljudima pokazao je da ishrana obogaćena fruktozom izaziva poremećaje u metaboličkim putevima u masnom tkivu i jetri, dovodeći do razvoja gojaznosti, inflamacije, dislipidemije i insulinske rezistencije (Stanhope and Havel, 2008; Tappy, 2018; Taskinen et al., 2019). Navedeni metabolički poremećaji predstavljaju vodeće faktore rizika za razvoj metaboličkog sindroma i dijabetesa tipa 2 (Monteiro and Azevedo, 2010; Tappy and Le, 2010). Prekomerni unos kalorija i smanjenje fizičke aktivnosti dovode do energetskeg disbalansa, koji doprinosi patogenezi ovih hroničnih metaboličkih oboljenja, pri čemu povećan unos fruktoze predstavlja jedan od vodećih etioloških faktora (Bray and Popkin, 2014; Tappy, 2018). Sve veća prevalencija gojaznosti i dijabetesa tipa 2 kod ljudi predstavlja veliki teret za zdravstvenu zaštitu, usled kardiovaskularnih komplikacija i povećanog morbiditeta i mortaliteta (Akram et al., 2000; Tamayo et al., 2010). Plejotropni citokin MIF reguliše metaboličku inflamaciju kao glavni regulator pro-inflamatornog odgovora i predstavlja jedan od primarnih antagonista anti-inflamatornog dejstva glukokortikoidnih hormona (Calandra and Bucala, 1997). MIF reguliše i oslobađanje insulina iz pankreasa (Kim et al., 2015), a miševi kod kojih je deletiran gen *Mif* se odlikuju izmenjenom osetljivošću na insulin i glukozu (Saksida et al., 2013). Pored toga, MIF reguliše i različite metaboličke procese, međutim sam mehanizam metaboličkih efekata MIF-a još uvek nije dovoljno razjašnjen. Kao jedan od mogućih posrednika u ovim procesima izdvaja se glukokortikoidni receptor, s obzirom na to da je poznato da se miševi sa deletiranim genom *Mif* odlikuju povećanjem koncentracije cirkulišućih glukokortikoida i povećanom ekspresijom glukokortikoidnog receptora u limfnim čvorovima, dok je ekspresija ovog receptora smanjena u masnom tkivu, jetri i pankreasnim ostrvcima (Kim et al., 2015; Nikolic et al., 2013). Glukokortikoidni hormoni utiču na metabolizam ugljenih hidrata i lipida u jetri i masnom tkivu, delujući na suprotan način od insulina (Geer et al., 2014). Važnu ulogu u delovanju ovih hormona imaju enzimi prereceptorskog metabolizma, 11 β HSD-1 i H6PDH, koji učestvuju u prevođenju glukokortikoida iz neaktivne u aktivnu formu. Glavni posrednik u delovanju ovih hormona je GR, transkripcioni regulator koji u masnom tkivu direktno reguliše gene uključene u procese lipolize i/ili lipogeneze, dok u jetri deluje kao modulator lipidnog profila (Peckett et al., 2011; Rahimi et al., 2020).

Uzimajući u obzir navedene podatke, postavljena je hipoteza da MIF ostvaruje uticaj na lipidni metabolizam u masnom tkivu i jetri posredstvom glukokortikoidnih hormona, važnih regulatora energetskeg metabolizma. Cilj ove doktorske teze je bio da se rasvetli doprinos glukokortikoidnih hormona u razvoju poremećaja lipidnog metabolizma u masnom tkivu i jetri kod MIF^{-/-} miševa u normalnim uslovima, kao i u uslovima energetskeg opterećenja izazvanog ishranom obogaćenom fruktozom. Analiziran je metabolički status ovih životinja (lipidni profil, osetljivost na insulin, glikemija), glukokortikoidna signalizacija (prereceptorski metabolizam glukokortikoida, koncentracija GR-a i njegova unutarćelijska preraspodela), kao i ekspresija enzima uključenih u metabolizam lipida, koji su direktno ili indirektno regulisani GR-om u visceralnom masnom tkivu i jetri. Posebna pažnja je posvećena ispitivanju ekspresije transkripcionih regulatora koji su partneri GR-a u regulaciji lipidnog metabolizma, u masnom tkivu (PPAR γ i SREBP1c) i jetri (LXR α/β , SREBP1c i ChREBP), kao i analizi markera inflamatornih procesa u oba pomenuta tkiva (TNF, IL-6 i IL-1 β).

5.1 Nedostatak gena *Mif* i ishrana obogaćena fruktozom pokreću razvoj sistemske insulinske rezistencije ne menjajući lipidni profil u krvi

Tokom poslednjih decenija, potrošnja fruktoze se značajno povećala u industrijalizovanim zemljama usled globalnih promene u ljudskoj ishrani, pre svega usled povećane konzumacije napitaka i prerađene hrane zaslađenih ovim šećerom (Marriott et al., 2009). Zbog lipogene prirode fruktoze, povećan unos ovog šećera povezan je sa većom prevalencijom metaboličkih bolesti, kao što su dislipidemija, insulinska rezistencija, visok krvni pritisak, steatoza jetre i NAFLD (Rizkalla, 2010; Stanhope et al., 2009; Tappy, 2018). Kod ljudi, uticaj ishrane obogaćene fruktozom na fiziološke i biohemijske parametre u velikoj meri zavisi od oblika u kojem se fruktoza konzumira, uzimajući u obzir da unos čvrstih i tečnih materija različito utiče na sastav mikrobiote, integritet creva i toksičnost na jetru (Mastrocola et al., 2018). Fruktoza koja se unosi oralnim putem stimuliše autonomne i endokrine odgovore, smanjujući proizvodnju insulina u pankreasu (Glendinning et al., 2017). Dodatno, konzumacija fruktoze, za razliku od glukoze, dovodi do povećanog unosa hrane, jer fruktoza smanjuje nivo leptina i povećava nivo grelina u serumu (Muriel et al., 2021). S obzirom na to da je procenjeno da kalorijski unos poreklom od fruktoze predstavlja oko 20% našeg dnevnog energetskeg unosa (Tappy, 2018), ova koncentracija fruktoze je i odabrana u ovoj doktorskoj disertaciji za ispitivanje metaboličkih promena u masnom tkivu i jetri WT i MIF^{-/-} miševa.

Rezultati ove doktorske studije su pokazali da je posle devet nedelja tretmana kod miševa koji su bili na režimu ishrane obogaćene fruktozom došlo do povećanja energetskeg unosa, u poređenju sa životinjama na standardnoj ishrani (**Tabela 4.1**). Uzimajući u obzir da su ove životinje imale smanjen unos hrane (**Tabela 4.1**), povećanje energetskeg unosa je najverovatnije posledica prekomernog unosa fruktoze. Ovi rezultati su u skladu sa nalazima da ishrana obogaćena fruktozom dovodi do povećanja ukupnog energetskeg unosa, nezavisno od koncentracije fruktoze (Sánchez-Lozada et al., 2007). Iako bi bilo očekivano da povećanje energetskeg unosa dovede do povećanja telesne mase, kod miševa na ishrani obogaćenoj fruktozom nije došlo do ovih promena (**Tabela 4.1**). U literaturi se mogu naći različiti podaci o uticaju ishrane obogaćene fruktozom na telesnu masu. Neke studije na životinjama su pokazale da ishrana obogaćena fruktozom dovodi do povećanja telesne mase (Jürgens et al., 2005; Kanarek and Orthen Gambill, 1982), dok su rezultati ove doktorske disertacije u skladu sa drugim studijama koje su pokazale da ishrana obogaćena fruktozom nema uticaj na ukupnu telesnu masu (Blakely et al., 1981; Bursać et al., 2014, 2013). Iako ishrana obogaćena fruktozom nije dovela do promene ukupne telesne mase, kombinacija nedostatka MIF-a i ishrane obogaćene fruktozom je dovela do povećanja mase visceralnog masnog tkiva, kao i odnosa mase masnog tkiva i ukupne telesne mase (**Tabela 4.1**). Nasuprot našim rezultatima, Verschuren i saradnici su pokazali da delecija gena *Mif* nije uticala na masu visceralnog masnog tkiva, ali su oni uglavnom koristili tzv. „dvostruke nokaut“ (eng. *double-knockout*) životinje kod kojih su bili deletirani geni *Mif* i *Ldlr* (Verschuren et al., 2009). Sa druge strane, Serre-Beinier i saradnici su pokazali da je kod MIF^{-/-} miševa telesna masa bila niža pri rođenju i u prvih nekoliko meseci života (Serre-Beinier et al., 2010). Međutim, nakon 4 meseca, nedostatak MIF-a je doveo do povećanja unosa hrane i posledičnog povećanja telesne mase i razvoja visceralne gojaznosti, u poređenju sa miševima „divljeg tipa“. Ovi nalazi su u skladu sa rezultatima ove doktorske disertacije, gde višak energetskeg unosa poreklom od fruktoze u odsustvu gena *Mif* dovodi do povećanja mase visceralnog masnog tkiva i razvoja visceralne gojaznosti.

Sve veći broj dokaza sugeriše da kod gojaznih osoba masno tkivo oslobađa MIF, kao i da je ovaj citokin uključen u inflamatorne i metaboličke procese koji su u osnovi razvoja dijabetesa tipa 2 (Kim et al., 2015; Morrison and Kleemann, 2015). Naime, već je pokazano da

MIF utiče na metabolizam glukoze na nekoliko nivoa, uključujući lučenje insulina iz pankreasa (Waeber et al., 1997), modulaciju glikolize u skeletnim mišićima i masnom tkivu, kao i da utiče na insulinsku rezistenciju adipocita koja je posredovana TNF signalnim putem (Toso et al., 2008). U ovoj doktorskoj disertaciji, sistemska insulinska rezistencija primećena je kod svih MIF^{-/-} miševa, bez obzira na režim ishrane i razvoj visceralne gojaznosti. Naime, svi miševi sa nedostatkom *Mif*-a su ispoljili hiperglikemiju, hiperinsulinemiju i poremećenu toleranciju na glukozu i insulin (**Tabela 4.1**). Međutim, u literaturi se mogu pronaći različiti podaci o ulozi MIF-a u regulaciji homeostaze glukoze. Kao što je već pomenuto, *Verschuren* i saradnici (*Verschuren et al.*, 2009) prijavili su odsustvo razvoja visceralne gojaznosti, ali i smanjen nivo insulina i glukoze natašte, kao i poboljšanu toleranciju na glukozu i osetljivost na insulin kod *Ldlr*^{-/-} miševa sa deletiranim genom *Mif*. U skladu sa ovim, *Finucane* i saradnici (*Finucane et al.*, 2014) pokazali su da su gojazni MIF^{-/-} miševi delimično zaštićeni od insulinske rezistencije izazvane ishranom sa visokim sadržajem masti, pošto su vrednosti GTT i ITT AUC bile značajno niže kod ovih miševa u poređenju sa WT životinjama. S druge strane, postoje studije koje sugerišu da MIF^{-/-} miševi imaju poremećenu homeostazu glukoze i ispoljavaju znake gojaznosti. *Serre-Beinier* i saradnici (*Serre-Beinier et al.*, 2010) su pokazali da je odsustvo MIF-a dovelo do poremećene tolerancije glukoze i hiperinsulinemije kod odraslih miševa, u poređenju sa WT životinjama. Sa druge strane, *Nikolić* i saradnici (*Nikolic et al.*, 2013) su prijavili da nedostatak *Mif*-a izaziva hiperglikemiju i smanjenu toleranciju na glukozu, ali su životinje imale normalni nivo insulina i dobro su reagovale na primenu egzogenog insulina. Pored toga, ista grupa autora otkrila je da se insulinska rezistencija javlja kod MIF^{-/-} miševa, ali nakon uvođenja ishrane sa visokim sadržajem masti (*Saksida et al.*, 2012). Ovi kontradiktorni rezultati studija ukazuju na složenu ulogu MIF-a u metabolizmu glukoze i energije, kao i na zavisnost ove regulacije od ishrane i starosti životinja. Takođe, studije na ljudima sugerišu da polimorfizam gena *Mif* doprinosi abdominalnoj gojaznosti na polno specifičan način, pošto je povezan sa većim rizikom od dijabetesa tipa 2 samo kod muškaraca (*Coban et al.*, 2015). Rezultati ove doktorske disertacije potvrdili su prisustvo intolerancije na glukozu kod MIF^{-/-} miševa, koje je dodatno bilo pogoršano ishranom obogaćenoj fruktozom (**Tabela 4.2, Slika 4.1A**). Osim toga, primećena je i smanjena osetljivost na insulin kod ovih životinja na koju ishrana obogaćena fruktozom nije dodatno uticala (**Tabela 4.2, Slika 4.1B**). Jedan od mogućih razloga za ovakvo odstupanje u rezultatima različitih studija mogao bi se naći u starosti oglednih životinja. Već je pokazano da su odrasli miševi, poput onih koji su korišćeni u ovoj doktorskoj studiji, skloniji insulinskoj rezistenciji i gojaznosti, u poređenju sa životinjama mlađe starosne dobi (*Serre-Beinier et al.*, 2010).

Kao što je već pomenuto, fruktoza predstavlja izrazito lipogeni šećer, čijim metabolisanjem u jetri dolazi do povećanja koncentracije triglicerida i slobodnih masnih kiselina u plazmi, kao i stimulacije *de novo* lipogeneze i povećane akumulacije triglicerida u masnom tkivu, jetri i mišićima (*Stanhope and Havel*, 2008). Na ovaj način, ishrana obogaćena fruktozom može dovesti do pojave visceralne gojaznosti, dislipidemije i insulinske rezistencije. Iako su brojne studije na ljudima i životinjama pokazale da ishrana obogaćena fruktozom dovodi do povećanja koncentracije triglicerida u cirkulaciji životinja (*Bursać et al.*, 2013; *Herman et al.*, 1970; *Lê et al.*, 2006), postoje i studije kod kojih različita koncentracija fruktoze u ishrani nije uticala na nivo triglicerida i slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji (*Bantle et al.*, 2000; *Huttunen et al.*, 1976; *Tillman et al.*, 2014). Dodatno, pokazano je da nedostatak MIF-a kod *Ldlr*^{-/-} miševa ne dovodi do promena koncentracija holesterola, triglicerida i slobodnih masnih kiselina u plazmi (*Verschuren et al.*, 2009). U skladu sa ovim studijama su i rezultati ove doktorske disertacije koji su pokazali da nije bilo promena u koncentraciji triglicerida i slobodnih masnih kiselina kod MIF^{-/-} miševa nakon ishrane obogaćene fruktozom (**Tabela 4.3**).

Pored toga što reguliše metabolizam glukoze, MIF može biti povezan sa poremećajima na nivou energetskeg metabolizma u uslovima energetskeg opterećenja (Finucane et al., 2014; Kim et al., 2015). Tako je studija iz 2014. godine pokazala da delecija gena *Mif* kod C57BL/6J miševa na ishrani sa visokim sadržajem masti ima štetne efekte na glukoznu toleranciju i podstiče povećanje telesne mase, dok je inflamacija u masnom tkivu smanjena u odsustvu proteina MIF (Heinrichs et al., 2014). Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali povećanu visceralnu gojaznost i hipertrofiju adipocita samo kod MIF^{-/-} miševa na ishrani obogaćenoj fruktozom (**Slika 4.6A**), što ukazuje na značaj proteina MIF u razvoju gojaznosti izazvane ishranom obogaćenom fruktozom. Mogući mehanizam koji leži u osnovi ovog nalaza mogao bi se naći u koncentraciji leptina u plazmi. Leptin je hormon dobijen iz adipocita, koji igra ključnu ulogu u energetskeg homeostazi i metabolizmu lipida. Ovaj plejotropni hormon je u direktnoj proporciji sa masom masnog tkiva i poznato je da je gojaznost uzrokovana prekomernom ishranom praćena hiperleptinemijom (Polyzos et al., 2011). Uzimajući u obzir da su u ovoj studiji miševi sa nedostatkom gena *Mif* imali veći nivo insulina (**Tabela 4.2**), a da povećani nivo insulina direktno korelira sa nivoima leptina u plazmi (Askari et al., 2010) i povećanjem mase masnog tkiva (Makki et al., 2013), moguće je da povećana visceralna gojaznost kod MIF^{-/-} životinja doprinosi povećanju nivoa leptina u cirkulaciji. Zaista, rezultati ove doktorske disertacije su potvrdili da miševi bez gena *Mif* na standardnoj i ishrani obogaćenoj fruktozom imaju povećan nivo leptina u plazmi, u poređenju sa WT životinjama (**Tabela 4.3**). Ovo zapažanje je u skladu sa studijom *Saksida* i saradnika. (Saksida et al., 2012), koji su takođe uočili povećan nivo leptina i povećanje telesne mase kod MIF^{-/-} miševa na ishrani sa visokim sadržajem masti u poređenju sa WT miševima.

Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da su se miševi sa deletiranim genom *Mif* odlikovali hiperglikemijom, hiperinsulinemijom i poremećenom sistemskom insulinskom osetljivošću. Iako je energetskeg unos bio povećan kod životinja hranjenih fruktozom, telesna masa je ostala neizmenjena. Sa druge strane, ishrana obogaćena fruktozom kod MIF^{-/-} miševa je dovela do povećanja mase visceralnog masnog tkiva, što zajedno sa povećanjem nivoa leptina i neizmenjenim nivoima triglicerida i slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji ukazuje na moguće promene u aktivnosti lipidnih metaboličkih puteva u masnom tkivu i jetri, koji su dalje bili ispitani u nastavku ove doktorske disertacije.

5.2 Lipogeneza i adipogeneza u visceralnom masnom tkivu MIF^{-/-} miševa nakon ishrane obogaćene fruktozom povezana je sa stimulisanom glukokortikoidnom signalizacijom

Glukokortikoidni hormoni imaju izražen efekat na metabolizam lipida i glukoze, zbog čega imaju značajnu ulogu u regulaciji energetske homeostaze. Povećana unutarćelijska proizvodnja glukokortikoida, posebno u masnom tkivu, značajno doprinosi razvoju visceralne gojaznosti i metaboličkog sindroma (Masuzaki et al., 2001; Tomlinson et al., 2008). Cirkulišući i lokalno proizvedeni glukokortikoidi (kortizol i kortikosteron) imaju ključnu ulogu u modulaciji funkcije adipocita, kao i u njihovoj proliferaciji i diferencijaciji (Lee et al., 2014; Staab and Maser, 2010). Rezultati ove doktorske studije su pokazali da je nivo kortikosterona u visceralnom masnom tkivu bio povišen kod MIF^{-/-} miševa na ishrani obogaćenoj fruktozom, najverovatnije kao rezultat pojačanog prereceptorskog metabolizma glukokortikoida. U skladu sa tim, nivoi proteina 11 β HSD-1 i H6PDH su bili povišeni u visceralnom masnom tkivu MIF^{-/-} miševa hranjenih fruktozom. Ovi rezultati su u skladu i sa drugim studijama koje pokazuju da fruktoza povećava ekspresiju gena *11 β HSD-1* u visceralnom masnom tkivu (London and Castonguay, 2011), što može imati štetne metaboličke efekte (Atsumi et al.,

2007; Nikolic et al., 2013; Walker, 2006). Dodatno, nedavni dokazi sugerišu da fruktoza stimuliše aktivaciju glukokortikoida posredovanu sa 11 β HSD-1 povećavajući dostupnost njenog kofaktora NADPH. Uočeno je da prekomerna ekspresija enzima 11 β HSD-1 u masnom tkivu miševa promoviše abdominalnu gojaznost, insulinsku rezistenciju, steatozu jetre i povećanje koncentracije slobodnih masnih kiselina i triglicerida u cirkulaciji (Masuzaki et al., 2001). Sa druge strane, *in vitro* studije su pokazale da inhibicija enzima 11 β HSD-1 smanjuje proces adipogeneze u humanim adipocitama (Bujalska et al., 2008). Kao što je bilo i očekivano, u ovoj doktorskoj studiji je kod MIF^{-/-} miševa hranjenih fruktozom uočeno povećanje koncentracije kortikosterona u visceralnom masnom tkivu (**Slika 4.3A**), koje je bilo praćeno aktivacijom prereceptorskog metabolizma glukokortikoida (**Slika 4.2A** i **Slika 4.2B**), kao i povišenim nivoom proteina GR (**Slika 4.3B**) (**Slika 5.1**). Suprotno od rezultata ove doktorske studije, *Nikolić* i saradnici (Nikolic et al., 2013) prijavili su nižu koncentraciju proteina GR u masnom tkivu i povišen nivo kortikosterona u plazmi, dok su *Conboy* i saradnici (Conboy et al., 2011) pokazali da je koncentracija kortikosterona u plazmi nepromenjena kod MIF^{-/-} miševa. Iako postoje dokazi da povišeni nivo glukokortikoida dovodi do poremećaja glukozne tolerancije i imunosupresije kod miševa sa nedostatkom gena *Mif* (Nikolic et al., 2013), njihovi efekti na metabolizam lipida u visceralnom masnom tkivu su uglavnom još uvek nepoznati.

Kao što je već pomenuto, glukokortikoidni hormoni imaju dvojaku ulogu u metabolizmu lipida u masnom tkivu jer mogu da stimulišu i proces lipolize i proces lipogeneze (Wang et al., 2012). Kakav će biti efekat glukokortikoida na skladištenje lipida prvenstveno zavisi od nutritivnih i/ili hormonskih uslova (Kleemann and Bucala, 2010; Peckett et al., 2011; Saksida et al., 2013). Naime, u uslovima povišenog nivoa insulina u plazmi, glukokortikoidi stimulišu ekspresiju gena uključenih u lipogenezu i akumulaciju lipida, delujući sinergistički sa insulinom (Campbell et al., 2011), dok u bazalnim uslovima ili uslovima gladovanja glukokortikoidi smanjuju lipogenezu i unos slobodnih masnih kiselina (Lee et al., 2014). U ovoj doktorskoj disertaciji najznačajniji rezultat kombinacije ishrane obogaćene fruktozom i nedostatka gena *Mif* bio je povećanje prečnika (**Slika 4.6B**) i površine adipocita (**Slika 4.6C**), što je dovelo do promene morfologije adipocita i hipertrofije masnog tkiva, i to samo kod MIF^{-/-} miševa na ishrani obogaćenoj fruktozom u poređenju sa ostalim grupama (**Slika 4.6A**). Regulacija mase masnog tkiva je složen proces, pri čemu povećanje masnog tkiva nastaje kao posledica i hiperplazije (povećanje broja masnih ćelija) i hipertrofije (povećanje veličine masnih ćelija) (Hausman et al., 2001). Hiperplazija uključuje proliferaciju pre-adipocita i njihovu diferencijaciju u zrele adipocite. Diferencijacija adipocita je strogo regulisan proces ekspresije ključnih transkripcionih faktora, koji rezultiraju promenama citoskeleta, kao i indukcijom ključnih gena uključenih u metabolizam lipida (lipogeneza, unos masnih kiselina, lipoliza i β -oksidacija). Povećana lipogeneza i uzimanje masnih kiselina pogoduju akumulaciji lipida unutar adipocita, dok lipoliza i β -oksidacija podstiču gubitak lipida (Gathercole et al., 2011). Rezultati ove doktorske studije su pokazali da je u visceralnom masnom tkivu MIF^{-/-} životinja na ishrani obogaćenoj fruktozom primećena i aktivacija enzima uključenih u *de novo* lipogenezu (**Slika 4.4**), iako je koncentracija slobodnih masnih kiselina i triglicerida u cirkulaciji ostala nepromenjena (**Tabela 4.3**). Ovi rezultati su u skladu sa nalazima studije koja je pokazala značajno povećanje nivoa iRNK za *Fas* i *Acc*, ključnih enzima *de novo* lipogeneze, samo u visceralnom masnom tkivu MIF^{-/-} miševa hranjenih fruktozom (**Slika 5.1**) (Strable and Ntambi, 2010). Pored toga, kod ovih životinja zapažena je i povećana ekspresija gena *Pepck*, ključnog enzima gliceroneogeneze u masnom tkivu (Gathercole and Stewart, 2010), koji povećava akumulaciju lipida u adipocitima i smanjuje oslobađanje slobodnih masnih kiselina u krvotok (Franckhauser et al., 2002). Enzimi *Fas* i *Acc* su direktno transkripciono kontrolisani od strane SREBP1c, čija je aktivnost regulisana dejstvom glukokortikoida i insulina (Ayala-Summano et al., 2013; Foretz et al., 1999; Kim et al., 1998).

Shodno tome, i u našim eksperimentima je nivo proteina SREBP1c (**Slika 4.5B**) bio značajno povećan u visceralnom masnom tkivu MIF^{-/-} miševa hranjenih fruktozom, što je u skladu i sa uočenim stanjem hipertrofije adipocita kod ovih životinja (**Slika 4.6A**). Pored SREBP1c, i drugi transkripcioni regulator adipogeneze, PPAR γ , takođe je bio značajno povećan u visceralnom masnom tkivu istih životinja (**Slika 4.5A**). Iako je poznato da glukokortikoidi stimulišu lipolizu u masnom tkivu, hronična izloženost visokim dozama glukokortikoidnim hormonima povećava centralnu gojaznost. Takođe je poznato da povećavaju veličinu visceralnih adipocita (hipertrofija) i da imaju efekte na adipogenezu promovišući diferencijaciju pre-adipocita u zrele adipocite (Campbell et al., 2011; Chimin et al., 2014). *In vitro* eksperimenti su otkrili sinergistički efekat insulina i kortikosteroida na indukciju ekspresije PPAR γ u izolovanim ljudskim adipocitima u kulturi (Vidal-Puig et al., 1997). Dodatno, studije koje su ispitivale ulogu MIF-a u adipogenezi pokazale su da adipociti iz MIF^{-/-} miševa imaju povišenu ekspresiju PPAR γ tokom diferencijacije adipocita (Atsumi et al., 2007). Međutim, rezultati ove doktorske teze su otkrili značajnu promenu nivoa proteina PPAR γ samo kada su MIF^{-/-} miševi hranjeni fruktozom, što implicira da ishrana obogaćena fruktozom dovodi do pojave adipogeneze i hipertrofije adipocita samo u odsustvu gena *Mif* i u prisustvu pojačane glukokortikoidne signalizacije (**Slika 5.1**). Pored lipogene aktivnosti, brojne *in vitro* studije su zabeležile i značajno lipolitičko dejstvo glukokortikoidnih hormona. Naime, pokazano je da u uslovima niske koncentracije insulina u plazmi kod pacijenata sa dijabetesom tipa 2 dolazi do oslobađanja slobodnih masnih kiselina iz masnog tkiva u cirkulaciju (Johnston et al., 1982; Lacasa et al., 1988). Pored *in vitro* studija, brojni *in vivo* eksperimenti sa infuzijom glukokortikoidnih hormona su takođe pokazali da akutna hiperkortizolemija dovodi do lipolize i sekrecije slobodnih masnih kiselina iz adipocita (Campbell et al., 2011; Xu et al., 2009), dok hronični višak glukokortikoida izaziva akumulaciju lipida u visceralnom masnom tkivu (Stimson et al., 2017). Ipak, u ovoj doktorskoj studiji nije primećena aktivacija lipolitičkih procesa posredovanih glukokortikoidima kod MIF^{-/-} miševa hranjenih fruktozom, verovatno usled toga što je ekspresija lipolitičkog gena *Hsl*, koji je pozitivno regulisan glukokortikoidima, ostala nepromenjena (**Slika 4.4**). Ovi rezultati mogu biti posledica antilipolitičke aktivnosti insulina, s obzirom da insulin inhibira aktivnost enzima HSL u masnom tkivu i smanjuje oslobađanje slobodnih masnih kiselina iz adipocita u cirkulaciju (Duncan et al., 2007). Takođe, iako je ekspresija gena *Atgl* bila povećana kod MIF^{-/-} miševa na ishrani obogaćenoj fruktozom (**Slika 4.4**), ona nije bila praćena povećanim oslobađanjem masnih kiselina u plazmu, verovatno zbog povećane ekspresije enzima PEPCCK i LPL (**Slika 4.4**). Za ove enzime je poznato da su uključeni u reesterifikaciju slobodnih masnih kiselina u masnom tkivu (Merkel et al., 2002), kao i da je ekspresija gena *Lpl* pozitivno regulisana insulinom i fruktozom (Semenkovich et al., 1989). Naime, pokazano je da su miševi sa izmenjenom ekspresijom gena *Lpl* u β -ćelijama pankreasa bili hiperglikemični tokom testa tolerancije na glukozu (Pappan et al., 2005), što je u skladu sa rezultatima ove doktorske disertacije da su MIF^{-/-} miševi sa povišenom ekspresijom gena *Lpl* takođe bili netolerantni na glukozu. **Ovi rezultati bacaju novo svetlo na ulogu MIF-a u gojaznosti izazvanoj ishranom, gde nedostatak gena *Mif* promoviše visceralnu gojaznost u uslovima energetskog preopterećenja.**

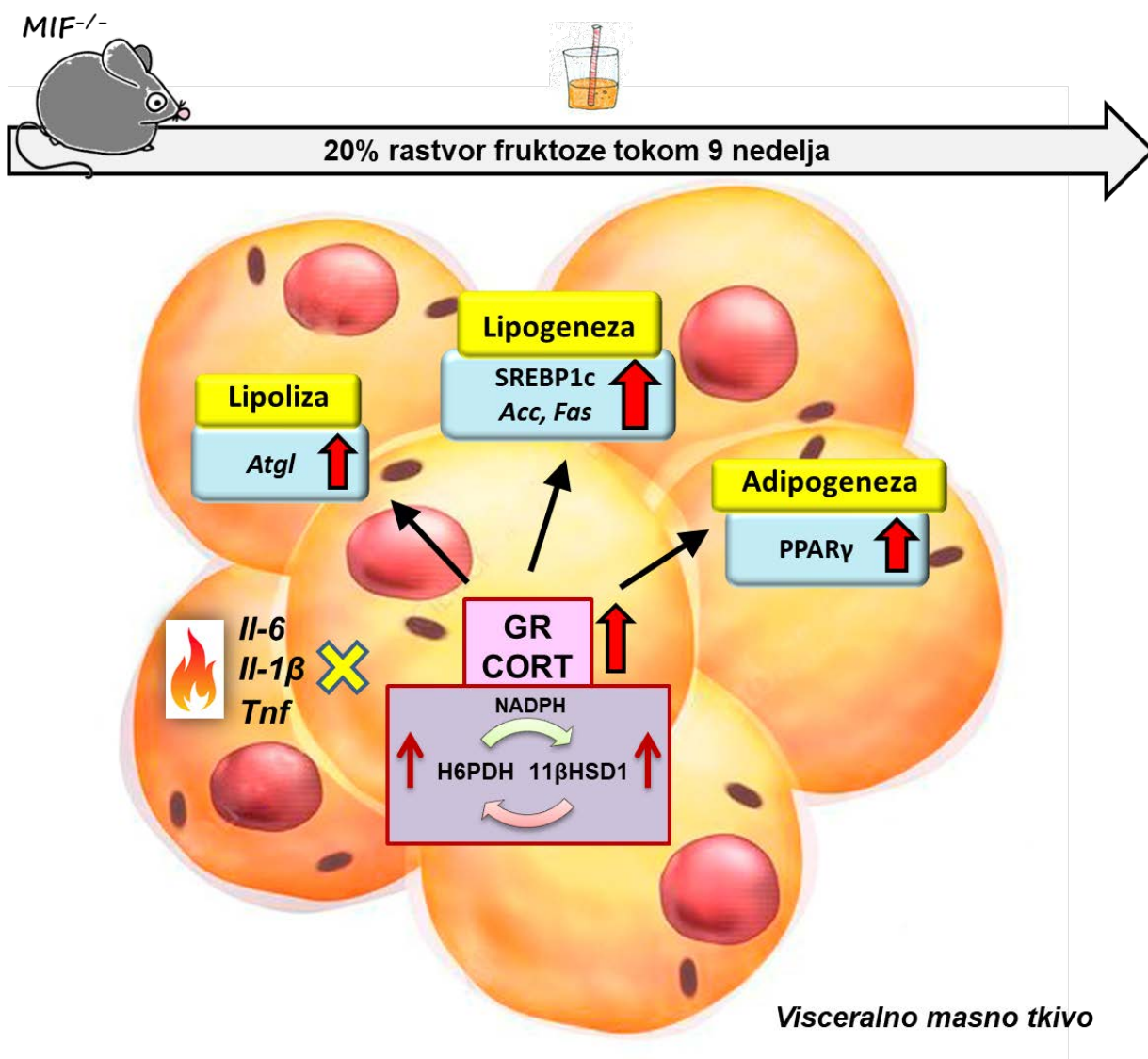
Ranije je utvrđeno da fiziološke koncentracije glukokortikoida mogu povećati ekspresiju i sekreciju MIF-a, ali postoje dokazi koji pokazuju i obrnuto. Naime, MIF može ograničiti efekte glukokortikoida, najverovatnije kroz fosforilaciju p38 MAP kinaze, dok je odsustvo endogenog MIF-a povezano sa povećanom osetljivošću na glukokortikoide kroz smanjenu fosforilaciju p38 MAP kinaze (D. Aeberli et al., 2006; Daniel Aeberli et al., 2006; Calandra et al., 1995). Mnogi inflamatorni signali se odvijaju kroz aktivaciju i fosforilaciju MAPK kaskade. Glukokortikoidi imaju važnu ulogu u regulaciji MAPK fosfataze 1 (eng. *MAPK phosphatase 1*), koja defosforiliše i inaktivira sve članove porodice proteina MAPK, uključujući

i p38 (Flaster et al., 2007). Pro-inflamatorna p38 kinaza se aktivira oksidativnim stresom i inflamacijom u 3T3-L1 ćelijama i ljudskim adipocitima (Cheng et al., 2017; Chuang et al., 2010; Merkel et al., 2002; Vazquez Prieto et al., 2015), a poznato je i da ishrana obogaćena fruktozom povećava proizvodnju pro-inflamatornih citokina i medijatora oksidativnog stresa u visceralnom masnom tkivu glodara (Kovačević et al., 2016; Pektas et al., 2016). Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da je ishrana obogaćena fruktozom zaista dovela do povećanja nivoa kako ukupnog tako i fosforilisanog proteina p38 kod WT i MIF^{-/-} miševa (**Slika 4.7**). Međutim, aktivnost proteina p38 (predstavljena kao odnos fosforilisane forme na poziciji Tyr¹⁸² prema ukupnom proteinu p38) povećana je samo kod miševa hranjenih fruktozom, što implicira da je povećanje aktivacije p38 nezavisno od nedostatka gena *Mif*.

Prekomerna konzumacija fruktoze izaziva metaboličke promene koje mogu dovesti do razvoja metaboličke inflamacije niskog stepena (Basciano et al., 2005). Nekoliko studija je pokazalo da povećana upotreba fruktoze u ishrani može dovesti do povećanja infiltracije makrofaga, oslobađanja hemokina i proizvodnje pro-inflamatornih citokina, kao što su TNF, IL-6 i IL-1 β , što dalje dovodi do regrutovanja novih imunskih ćelija i razvoja inflamacije (DiNicolantonio et al., 2018; Hotamisligil et al., 1993). Pro-inflamatorni citokin MIF ima značajnu ulogu u infiltraciji makrofaga i drugih imunskih ćelija na mesto inflamacije, kao i u stimulaciji proizvodnje TNF, IL-2 i IL-1 β (Bacher et al., 1996; Calandra and Roger, 2003; Roger et al., 2001). Makrofagi u masnom tkivu kod zdravih osoba ispoljavaju M2 markere (alternativno aktivirano stanje), dok gojaznost dovodi do regrutovanja i akumulacije M1, ili klasično aktiviranih makrofaga u masnom tkivu. Metabolički disfunkcionalno masno tkivo može biti povezano sa višim nivoima nekroze adipocita, a M1 makrofagi su raspoređeni oko ovih mrtvih ćelija u tzv. "strukturama nalik kruni" (Ouchi et al., 2011). Koristeći MIF^{-/-} miševe koji su bili na ishrani sa visokim sadržajem masti, *Finucane* i saradnici (Finucane et al., 2014) i *Verschuren* i saradnici (Verschuren et al., 2009) pokazali su smanjenu inflamaciju u masnom tkivu. Naime, oni su uočili smanjenu infiltraciju makrofaga koja je bila praćena slabijim formiranjem tzv. "strukture nalik kruni", kao i nižim odnosom M1/M2 makrofaga. U obe ove studije nedostatak *Mif*-a je rezultirao i poboljšanom insulinskom signalizacijom. Dok je u navedenim studijama korišćena ishrana obogaćena mastima sa umerenim sadržajem masti, dve studije koje su koristile ishranu sa visokim sadržajem masti (60 kcal%) dale su različita zapažanja. *Heinrichs* i saradnici (Heinrichs et al., 2014) izvestili su da je nedostatak gena *Mif* kod C57BL/6J miševa doveo do povećanja telesne mase, poremećaja tolerancije na glukozu i smanjene inflamacije masnog tkiva. Sa druge strane, studija koju su sproveli *Conine* i saradnici (Conine and Cross, 2014) nije zabeležila razlike u telesnoj masi i inflamaciji u masnom tkivu između MIF^{-/-} i WT miševa nakon 15 nedelja ishrane bogate mastima. Ovi nalazi su u skladu i sa rezultatima ove disertacije, koja je pokazala da ishrana obogaćena fruktozom i delecija gena *Mif* nisu doveli do pojave inflamacije u visceralnom masnom tkivu. Za razliku od studije *Conine* i saradnika gde nije bilo razlike u glukoznoj toleranciji i nivoima glukoze i insulina u krvi, rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da uočena insulinska rezistencija, hiperinsulinemija i hiperglikemija kod MIF^{-/-} životinja i MIF^{-/-} životinja hranjenih fruktozom (**Tabela 4.2**) nisu uticale na nivoe iRNK za pro-inflamatorne citokine *Tnf*, *Il-6* i *Il-1 β* u visceralnom masnom tkivu (**Tabela 4.4**) (**Slika 5.1**). Takođe, *Velickovic* i saradnici su pokazali da je ishrana obogaćena fruktozom kod pacova dovela do povećanja nivoa kortikosterona i MIF-a, ali je u masnom tkivu NF- κ B signalizacija bila smanjena, dok je ekspresija *Tnf* bila nepromenjena, što sugeriše da anti-inflamatorni efekti glukokortikoidnih hormona preovladavaju nad efektima MIF-a u masnom tkivu (Veličković et al., 2013).

Mnoge studije su ukazale na važnost MIF-a u homeostazi glukoze, međutim, njegova uloga u metaboličkim poremećajima je manje jasna. **Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da je metabolički stres, u obliku ishrane bogate fruktozom, kod MIF^{-/-} miševa rezultirao povećanom visceralnom gojaznošću, podstaknutom stimulisanim**

ekspresijom lipogenih gena i aktivacijom ključnih transkripcijskih regulatora adipogeneze i lipogeneze u visceralnom masnom tkivu. Na osnovu dobijenih rezultata, zaključeno je da ove metaboličke perturbacije kod MIF^{-/-} miševa nastaju kao rezultat pojačane signalizacije glukokortikoidnih hormona u hiperinsulinemičnom okruženju. Poremećaj regulacije glukokortikoidne signalizacije u odsustvu MIF-a je verovatno doprineo stimulaciji lipogenog programa u uslovima kalorijskog preopterećenja izazvanog ishranom obogaćenom fruktozom, što dalje može da uzrokuje razvoj *de novo* lipogeneze u jetri i pojavu insulinske rezistencije.



Slika 5.1. Šematski prikaz promena ekspresije gena i nivoa transkripcijskih regulatora uključenih u metabolizam lipida, koji su direktno regulisani glukokortikoidima u visceralnom masnom tkivu MIF^{-/-} miševa nakon ishrane obogaćene fruktozom. Preuzeto i modifikovano sa <https://www.sciencephoto.com/media/937828/view/adipose-tissue-illustration>.

5.3 Aktivacija lipogeneze i inhibicija β -oksidacije u jetri MIF^{-/-} miševa nakon ishrane obogaćene fruktozom nastaju kao posledica stimulisane glukokortikoidne signalizacije

Brojne studije su pokazale da ishrana obogaćena fruktozom utiče na metabolizam lipida u jetri putem razvoja hronične inflamacije niskog stepena (Liu et al., 2014). Plejotropni citokin MIF igra važnu ulogu u metaboličkoj inflamaciji, doprinoseći tako razvoju steatoze jetre i NASH-a (Morrison and Kleemann, 2015). Stoga je jedan od ciljeva ove doktorske disertacije bio i da se ispita osnovna uloga inflamatornog medijatora MIF-a u poremećajima metabolizma lipida u jetri, kao i ektopičnoj akumulaciji lipida izazvanoj ishranom sa visokim sadržajem fruktoze. *De novo* lipogeneza je sastavni deo komunikacije između masnog tkiva i jetre, koji održava metaboličku homeostazu. Disfunkcija ravnoteže u *de novo* lipogenezi između ova dva tkiva je uobičajena karakteristika bolesti povezanih sa metaboličkim sindromom i direktno doprinosi patogenezi i razvoju NAFLD-a (Wallace and Metallo, 2020). Iako mehanizmi koji dovode do razvoja NAFLD-a još uvek nisu poznati, ova bolest je povezana sa gojaznošću i insulinskom rezistencijom (Adams et al., 2005). Pokazano je da kod gojaznih osoba narušena signalizacija insulina u jetri dovodi do stimulacije glukoneogeneze i aktivacije *de novo* lipogeneze, i posledično do povećanja nivoa glukoze i triglicerida u cirkulaciji (McArdle et al., 2013).

U studiji koju su sprovedeli *Donnelli* i saradnici pokazano je da je kod pacijenata sa NAFLD-om najveća količina triglicerida u jetri poreklom od priliva masnih kiselina iz masnog tkiva, a u manjoj meri od *de novo* lipogeneze i hranljivih materija unetih ishranom (Donnelly et al., 2005). Povećani unos cirkulišućih lipida, posebno slobodnih masnih kiselina i lipoproteina u jetri je povezan sa povećanim nivoom proteina za transport lipida u plazma membrani, kao i sa povećanim nivoima hepatične lipaze i lipoprotein lipaze (Geng et al., 2021). To je potvrđeno i u ovoj doktorskoj studiji, gde je nivo proteina CD36 bio povišen kod MIF^{-/-} miševa hranjenih fruktozom (**Slika 4.10A**), dok su nivoi slobodnih masnih kiselina i triglicerida u plazmi svih životinja bili nepromenjeni (**Tabela 4.3**) (**Slika 5.2**). S obzirom na to da je protein CD36 odgovoran za transport masnih kiselina iz cirkulacije u jetru, može se pretpostaviti da je nepromenjena koncentracija slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji posledica njihovog povećnog priliva u jetru posredstvom proteina CD36. Ranije studije na životinjama su pokazale da je ekspresija gena *Cd36* u jetri normalno slaba, ali da je njegova ekspresija povećana kod glodara sa masnom jetrom (Inoue et al., 2005). Štaviše, nivo iRNK za *Cd36* se povećava istovremeno sa sadržajem triglicerida u jetri u različitim životinjskim modelima steatoze jetre (Buqué et al., 2010), dok je eksperimentalno utišavanje steatoze kod miševa praćeno smanjenom ekspresijom *Cd36* u jetri (Liu et al., 2007). Kod morbidno gojaznih pacijenata sa NAFLD-om pokazano je da je nivo iRNK za *CD36* pozitivno povezan sa sadržajem masti u jetri (Greco et al., 2008). Dodatno, *Bechmann* i saradnici su otkrili značajnu korelaciju između koncentracije iRNK za *CD36* i apoptoze hepatocita kod pacijenata sa nealkoholnim steatohepatitisom (Bechmann et al., 2010). Dalja istraživanja u ovoj doktorskoj studiji su pokazala i da je ekspresija gena *Lpl*, koji kodira enzim koji je uključen u transport i metabolizam lipida, takođe povećana kod miševa sa nedostatkom gena *Mif* na ishrani obogaćenoj fruktozom (**Slika 4.10B**). Iako je smatrano da se gen *Lpl* ne eksprimira u adultnoj jetri, postoje studije koje pokazuju da se ovaj gen eksprimira u neparenhivskim ćelijama, kao što su stelatne ćelije (Teratani et al., 2019). Ovaj enzim je uključen u fibrogenezu jetre i njegova prekomerna ekspresija dovodi do progresije NAFLD-a (Geng et al., 2021). Takođe, povećana aktivnost LPL/FABP4/CPT1 molekularne ose uključene u metabolizma masnih kiselina zabeležena je tokom nealkoholnog steatohepatitisa, dok inhibicija ove ose može efikasno sprečiti progresiju nealkoholnog steatohepatitisa u rak jetre (Yang et al., 2021).

Među važnim regulatorima *de novo* lipogeneze u jetri izdvajaju se transkripcioni faktori LXR α/β , SREBP1c i ChREBP. Dok su efekti insulina na ekspresiju lipogenih gena, *Acc*, *Fas* i *Scd1*, posredovani aktivnošću regulatora SREBP1c, glukoza deluje na ove enzime stimulišući ChREBP (Postic and Girard, 2008). Oba pomenuta transkripciona faktora sinergistički regulišu ekspresiju enzima uključenih u *de novo* lipogenezu kao odgovor na hiperinsulinemiju i hiperglikemiju (Dentin et al., 2005). Istraživanja su pokazala da su nivoi iRNK i aktivnog jedarnog proteina SREBP1c povećani u jetri *ob/ob* miševa sa deletiranim genom za leptin (*ob/ob* miševi), što ukazuje na to da prekomerna ekspresija SREBP1c može dovesti do steatoze jetre usled povećane lipogeneze (Browning and Horton, 2004; Reddy and Rao, 2006). Takođe, poremećaj u ekspresiji gena za ChREBP kod miša dovodi do smanjenja nivoa iRNK svih lipogenih gena u jetri (Browning and Horton, 2004). Dodatno, brojne studije su potvrdile da prekomerna konzumacija fruktoze povećava aktivnost ova dva regulatora *de novo* lipogeneze u jetri, kao i ekspresiju lipogenih enzima *Acc*, *Fas* i *Scd1* (Dekker et al., 2010; Nagai et al., 2002). Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da je ishrana obogaćena fruktozom dovela do aktivacije procesa lipogeneze u jetri, s obzirom da su nivoi proteina SREBP1c, ChREBP i LXR α/β , kao i ekspresija lipogenih enzima FAS i SCD1, bili povećani kod životinja hranjenih fruktozom u poređenju sa WT životinjama (**Slika 4.12** i **Slika 4.11**) (**Slika 5.2**). Ekspresija gena *Scd1*, a koji je uključen u elongaciju i desaturaciju masnih kiselina, takođe je bila povišena kod svih životinja u poređenju sa WT grupom (**Slika 4.11**), što je u saglasnosti sa studijama na miševima koje su pokazale da je ekspresija *Scd1* u jetri direktno ili indirektno regulisana količinom ugljenih hidrata u ishrani (Miyazaki et al., 2004). Dodatno, uočeno je da kod MIF^{-/-} miševa hranjenih fruktozom dolazi i do povećanja nivoa proteina ACC u poređenju sa WT i MIF^{-/-} životinjama na standardnoj ishrani (**Slika 4.10B**). Ovi rezultati su u skladu sa studijom koju su sproveli Heinrichs i saradnici (Heinrichs et al., 2014) u kojoj je pokazano da MIF^{-/-} miševi na ishrani bogatoj mastima imaju povećanu ekspresiju gena *Acc* i *Fas* u jetri. U ovoj doktorskoj studiji, uočena aktivacija *de novo* lipogeneze nakon ishrane obogaćene fruktozom može biti i rezultat smanjene β -oksidacije masnih kiselina, koja je regulisana od strane transkripcionog regulatora PPAR α (Alves-Bezerra and Cohen, 2018; Basciano et al., 2005). Međutim, to se nije odrazilo na akumulaciju lipida u jetri WT životinja, verovatno usled povećanja nivoa proteina CPT1 (**Slika 4.13A**) (**Slika 5.2**), glavnog enzima β -oksidacije. Masne kiseline, acil-CoA i nekoliko strukturno različitih sintetičkih jedinjenja poznatih kao proliferatori peroksizoma, koji aktiviraju PPAR α , regulišu nivo enzima CPT1 u jetri (Reddy and Hashimoto, 2001). Pored proteina CPT1, na regulaciju mitohondrijalne oksidacije utiču još i promene koncentracije karnitina i malonil-CoA (Reddy and Hashimoto, 2001). Poznato je da povećana proizvodnja malonil-CoA od strane ACC inhibira CPT1, koji reguliše transfer acil-CoA grupa u mitohondrije (Postic and Girard, 2008). Sa druge strane, PPAR α funkcioniše kao senzor lipida u jetri i reaguje na priliv masnih kiselina stimulišući transkripciju gena koji kodiraju mitohondrijalne, peroksizomalne i mikrozomalne oksidacione sisteme (Reddy and Hashimoto, 2001; Reddy and Rao, 2006). Miševi kod kojih je deletiran gen za *Ppara* (PPAR α ^{-/-}) ne uspevaju da regulišu sisteme oksidacije masnih kiselina i razvijaju tešku steatozu jetre (Ip et al., 2003). Rezultati ove doktorske disertacije su otkrili da je nivo proteina PPAR α smanjen kod svih životinja u poređenju sa WT grupom (**Slika 4.13B**), dok je nivo proteina CPT1 smanjen kod MIF^{-/-} životinja hranjenih fruktozom (**Slika 4.13A**), što je rezultiralo prelaskom sa oksidativnog puta na sintezu triglicerida. Primećeni efekti ishrane obogaćene fruktozom na metabolizam lipida u jetri su dodatno pogoršani nedostatkom gena *Mif*. Naime, histološka analiza jetre MIF^{-/-} miševa hranjenih fruktozom pokazala je mikrovezikularne masne promene (**Slika 4.16**), koje su praćene povišenim nivoima proteina CD36 i proteina ACC (**Slika 4.10**), kao i smanjenom ekspresijom regulatora β -oksidacije (CPT1, PPAR α i PGC-1 α) (**Slika 4.13**). Iako je kod ovih životinja primećeno smanjenje mase jetre, kao i odnosa mase jetre i ukupne telesne mase (**Tabela 4.1**), koncentracije markera oštećenja jetre, ALT i AST, bile su nepromenjene (**Tabela 4.5**). Promene u nivou ovih enzima

jetre korišćene su kao alat za dijagnostiku NAFLD-a. Brojni testovi za procenu steatoze jetre uključuju merenje nivoa AST, odnosa AST/ALT, serumskog nivoa insulina natašte, BMI, ali takođe, uzimaju u obzir i prisustvo ili odsustvo metaboličkog sindroma zajedno sa dijabetesom tipa 2 (Drescher et al., 2019). Mnoge studije su prijavile visok nivo AST i ALT kod pacijenata sa morbidnom gojaznošću sa NAFLD-om i NASH-om, međutim veza između nealkoholnog steatohepatitisa i odnosa AST/ALT nije pronađena (Dixon et al., 2001; Ong et al., 2005). Nasuprot tome, drugi autori nisu pronašli nivoe aminotransferaza izvan normalnog opsega kod osoba sa NAFLD-om koje nisu bile gojazne (Targher et al., 2008).

Ranije je objavljeno da MIF^{-/-} životinje na ishrani sa visokim sadržajem masti imaju povećanu ekspresiju gena *Acc* i *Fas* u jetri i posledično povećanu akumulaciju lipida, kao i da je ovaj efekat posredovan signalnim putem CD74/AMPK (Heinrichs et al., 2014). U jetri, aktivacija signalnog puta AMPK ima ulogu u inhibiciji glukoneogeneze i sinteze masnih kiselina i holesterola (Geer et al., 2014). Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da je nivo proteina AMPK bio značajno niži u jetri MIF^{-/-} miševa na ishrani obogaćenoj fruktozom (**Slika 4.15**), što je bilo praćeno sa već pomenutim povećanjem nivoa proteina ACC i smanjenjem nivoa proteina CPT1. Ovi rezultati ukazuju na stimulaciju sinteze i akumulacije triglicerida u jetri, naspram aktivacije β-oksidacije. Mehanizam koji se nalazi u osnovi ovih procesa bi mogao biti nedovoljan inhibitorski uticaj AMPK na ACC, što dovodi do povećane proizvodnje malonil-CoA, proizvoda *de novo* lipogeneze koji ograničava brzinu i inhibira ekspresiju CPT1, što na kraju dovodi do akumulacije lipida u jetri (Softic et al., 2019; Woods et al., 2017). Inhibicija signalnog puta AMPK povezuje i poremećaj lipidne homeostaze sa inflamacijom, povredom jetre i fibrozom kod NAFLD pacijenata (Zhao and Saltiel, 2020). Rezultati ove disertacije su u skladu sa studijom Heinrichs i saradnika (Heinrichs et al., 2014), koja je pokazala da MIF^{-/-} miševi na ishrani sa visokim sadržajem masti imaju steatozu jetre i povećanu ekspresiju lipogenih gena. Suprotno rezultatima ove studije, Finucane i saradnici (Finucane et al., 2014) pokazali su da miševi sa nedostatkom gena *Mif*, starosti 8 nedelja, imaju smanjenu akumulaciju lipida u jetri nakon ishrane sa visokim sadržajem masti, dok studija sprovedena na mužjacima MIF^{+/-} Balb/c miševa nije pokazala nikakve promene u akumulaciji lipida u jetri nakon dijeta sa visokim sadržajem masti (Conine and Cross, 2014). Svi navedeni nalazi ukazuju na veoma složenu ulogu MIF-a u metaboličkim poremećajima, a koja može zavisiti od ishrane, starosti i genetske osnove.

Prvobitne teorije za patogenezu NASH-a bile su zasnovane na „hipotezi sa dva pogodaka“. 'Prvi pogodak', akumulacija triglicerida u jetri, ili steatoza, povećava podložnost jetre povredama posredovanim tzv. 'sekundarnim ili drugim pogocima', kao što su mitohondrijalna disfunkcija, oksidativni stres i pro-inflamatorni citokini (TNF, IL-1β i IL-6), koji dovode do steatohepatitisa i/ili fibroze (Day and James, 1998; Dowman et al., 2009). Ovi citokini imaju važnu ulogu u poremećaju signalnih puteva koji regulišu metabolizam lipida i insulina. Novije teorije za patogenezu steatohepatitisa dodaju još jednu komponentu, tzv. 'treći pogodak', koji predstavlja neadekvatnu proliferaciju hepatocita (Jou et al., 2008). U zdravoj jetri, ćelijska smrt stimuliše replikaciju zrelih hepatocita, koji zamenjuju mrtve ćelije i obnavljaju normalnu funkciju tkiva. Međutim, oksidativni stres inhibira replikaciju zrelih hepatocita što rezultira ekspanzijom populacije hepatičnih progenitornih ćelija (Roskams et al., 2003). Prekomerna upotreba fruktoze u ishrani može dovesti do pojave lipotoksičnosti, oksidativnog stresa i prelaska steatoze u nealkoholni steatohepatitis usled podložnosti jetre tzv. 'drugim' i 'trećim pogocima' (Day and James, 1998; Dowman et al., 2009). Rezultati ove doktorske studije su u skladu sa ovom hipotezom, pošto MIF^{-/-} miševi, nezavisno od režima ishrane na kojem su bili, imaju aktivirano inflamatorno stanje u jetri koje se ogleda u povećanoj ekspresiji gena *Il-1β* i *Il-6* (**Tabela 4.8**) (**Slika 5.2**). Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji su u skladu sa rezultatima studije u kojoj je pokazana povećana ekspresija *Tnf*, *Il-1β* i *Il-6* u MIF^{-/-} mišjim NASH modelima (Heinrichs et al., 2014). Druga

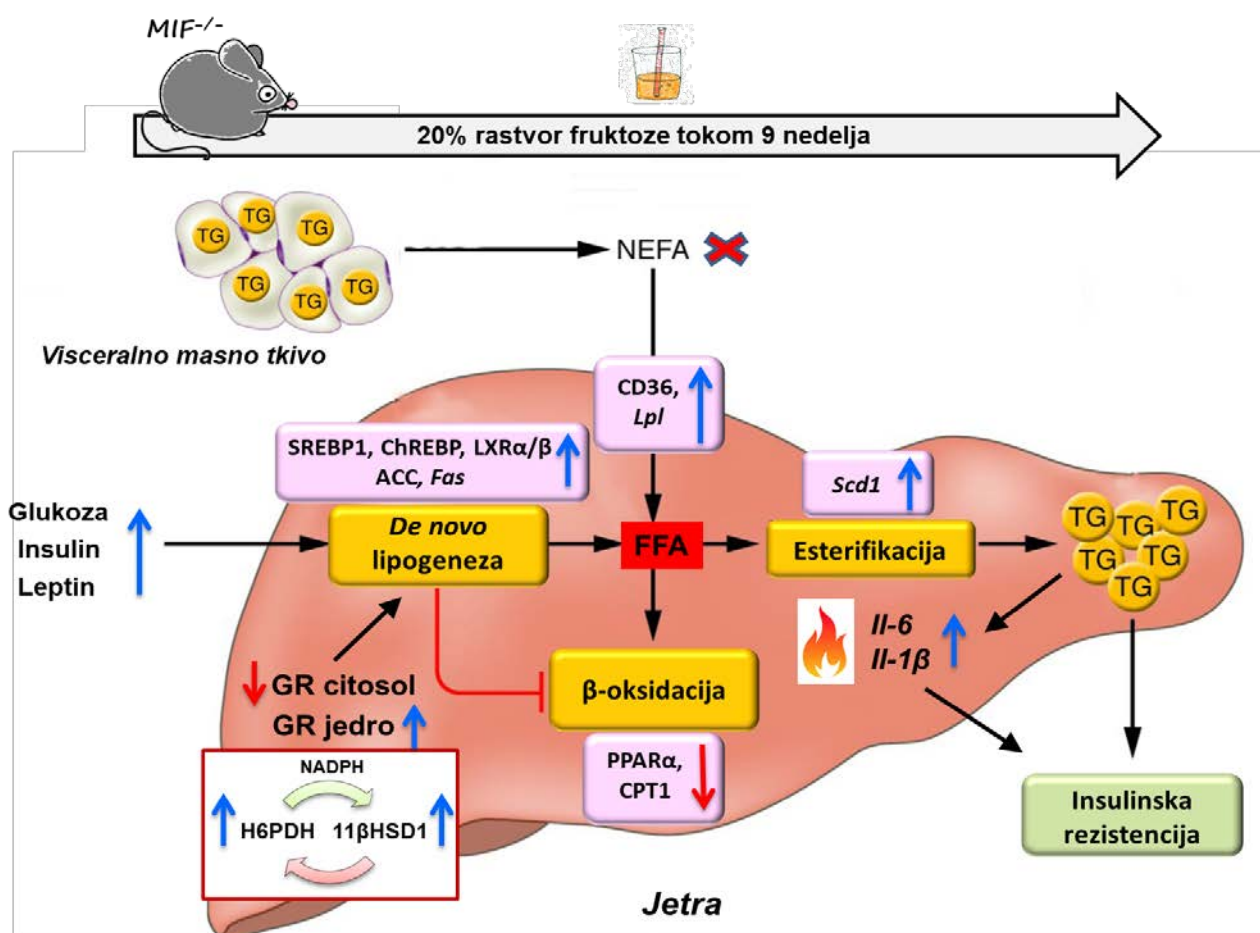
studija na životinjskom modelu NASH-a pokazala je da povećana ekspresija gena *Tnf* pozitivno koreliše sa povećanjem nivoa iRNK za *Srebp1*, što posledično dovodi do povećanja ekspresije enzima *Acc* i *Fas* (Endo et al., 2007). Štaviše, ranije je pokazano da je povećana koncentracija IL-1 β u korelaciji sa stimulisanim akumulacijom holesterola i triglicerida, što može dovesti do pojave steatoze i fibroze jetre, dok nedostatak IL-1 β ima hepatoprotektivne efekte kod miševa (Shi et al., 2019). Takođe, povećana proizvodnja TNF i IL-1 β je povezana sa disfunkcijom, apoptozom i nekrozom hepatocita (Tilg et al., 2016). Ovi podaci su potvrđeni i u ovoj doktorskoj disertaciji, gde je histološka analiza jetre otkrila prisustvo inflamatornih reakcija kod životinja sa deletiranim genom *Mif*. Kod akutne i hronične inflamacije, različite imunske i neimunske ćelije u jetri su uključene u procese koji rezultiraju regeneracijom ili fibrozom (Tanaka and Miyajima, 2016). Regeneracija jetre predstavlja složenu mrežu u kojoj različiti signalni putevi različitih tipova ćelija regulišu ekspresiju faktora transkripcije, koji su potrebni za oporavak jetre. U procesu regeneracije hepatocita, svi tipovi ćelija se aktiviraju, reaguju na faktore rasta i dolazi do povećanja broja proliferišućih (binuklearnih) hepatocita (Danilova et al., 2019; Delgado-Coello, 2021). Pored aktiviranih Kupferovih ćelija, koje oslobađaju pro-inflamatorne citokine TNF i IL-6 (Delgado-Coello, 2021), drugi znaci poboljšanog regenerativnog procesa jetre uključuju smanjen broj fokalnih nekroza, anizocitozu i anizonukleozu (Danilova et al., 2019). Rezultati ove doktorske studije su pokazali da je ishrana bogata fruktozom u jetri životinja sa delecijom gena *Mif* dovela do uvećanja Kupferovih ćelija, regenerativnih promena (binuklearni hepatociti, anizocitoza i anizonukleozu), fokalne nekroze i inflamacije (**Slika 4.16**, **Tabela 4.6** i **Tabela 4.7**). Fokalna nekroza je termin koji se koristi za opisivanje nekroze koja uključuje veće grupe hepatocita unutar lobusa. Sa težim povredama, nekroza može postati konfluentna kada uključuje više od jedne zone unutar lobusa i/ili se širi zonalno od jednog lobusa do susednog (Krishna, 2017). U ovoj doktorskoj studiji, konfluentna nekroza i mikrovezikularne masne promene su primećene samo kod MIF^{-/-} miševa (**Slika 4.16 C-D**, **Tabela 4.6**), ali su ove perturbacije bile izraženije kod životinja koje su konzumirale fruktozu i bile su praćene pojavom blage do umerene duktularne reakcije (**Slika 4.16 E-F**, **Tabela 4.7**). Duktularna reakcija je vrsta reparativnog odgovora na hepatocelularne povrede, koju karakterišu patološke promene matriksa, proliferacija i hiperplazija žučnih kanala i portalna inflamacija (Zheng et al., 2018). Ova reakcija se javlja kod svih vrsta akutnih i hroničnih hepatobilijarnih povreda, uključujući i nealkoholnu masnu bolest jetre, i igra važnu ulogu u regeneraciji jetre, nastanku i razvoju ciroze i hepatobilijarnih tumora (Zheng et al., 2018). Duktularna reakcija potiče od aktivacije i proliferacije holangiocita, hepatocita ili hepatičnih progenitornih ćelija, a povezani signalni putevi se razlikuju u zavisnosti od specifične povrede jetre ili životinjskih modela korišćenih u eksperimentima (Sato et al., 2019). Brojne studije su pokazale da viši stepen duktularne reakcije pozitivno koreliše sa većim stadijumom fibroze jetre kod pacijenata sa NASH-om i povezan je sa povećanom smrtnošću pacijenata (Gadd et al., 2014; Sato et al., 2019). Stoga, pojava inflamatornih reakcija i regenerativnih promena koje su bile praćene povećanom ekspresijom *Il-1 β* i *Il-6* i blagom do umerenom duktularnom reakcijom kod MIF^{-/-} životinja, ukazuje na zaštitnu ulogu MIF-a u razvoju steatoze jetre i steatohepatitisa izazvanog ishranom obogaćenom fruktozom.

Uloga MIF-a u metaboličkoj inflamaciji i energetsom metabolizmu je negativno regulisana od strane glukokortikoidnih hormona. Međutim, prilikom stresa ili pro-inflamatorne stimulacije, glukokortikoidi stimulišu produkciju MIF-a u makrofagama, čiji pro-inflamatorni efekti prevazilaze anti-inflamatorne efekte glukokortikoida (Calandra et al., 1995). U studiji gde su korišćeni makrofagi MIF-KO miševa, pokazano je da nedostatak proteina MIF povećava senzitivnost ćelija na glukokortikoide tj. niže koncentracije glukokortikoida su potrebne za inhibiciju oslobađanja TNF izazvanog LPS-om u ćelijama sa nedostatkom MIF-a u poređenju sa *wt* ćelijama (D. Aeberli et al., 2006). U skladu sa ovim, kod

MIF^{-/-} miševa na ishrani obogaćenoj fruktozom uočena je smanjena koncentracija citosolnog i povećan nivo jedarnog GR-a (**Slika 4.9**), što ukazuje na translokaciju receptora i aktivaciju glukokortikoidne signalizacije. Životinjski modeli sa povišenim nivoom glukokortikoida se karakterišu nizom poremećaja jetre, od steatoze do NASH-a, međutim fibroza i hepatocelularni karcinom nisu primećeni (Imajo et al., 2013). Iako je u ovoj doktorskoj studiji koncentracija kortikosterona u jetri bila ista u svim grupama (**Slika 4.9A**), prereceptorski metabolizam glukokortikoida je bio pojačan, što se može zaključiti na osnovu povećanog nivoa proteina 11 β HSD-1 kod životinja hranjenih fruktozom (**Slika 4.8A**) (**Slika 5.2**). Inhibicija 11 β HSD-1 kod miševa poboljšava delovanje insulina u jetri, smanjuje steatozu jetre i ekspresiju glukoneogenih enzima, PEPCK i glukozo-6-fosfataze, kao i nivo slobodnih masnih kiselina i triglicerida, što rezultira fenotipom koji je otporan na gojaznost i dijabetes izazvanih prekomernim unosom hrane (Alberts et al., 2002; Hermanowski-Vosatka et al., 2005). Kao i u masnom tkivu, i u jetri je prisustvo insulina neophodno za lipogenu aktivnost GR-a koja direktno ili indirektno reguliše transkripciju enzima uključenih u metabolizam triglicerida (de Guia and Herzig, 2015; Rahimi et al., 2020). Ispitivanja na životinjama i ljudima su pokazala da prevelike količine glukokortikoida izazivaju povećanje nivoa glukoze i insulina, što dovodi do indukovane ekspresije *Acc* i *Fas* stimulisanjem aktivnosti transkripcionih regulatora SREBP1c i ChREBP (Rahimi et al., 2020). Dodatno, glukokortikoidni hormoni inhibiraju β -oksidaciju inhibiranjem aktivnosti PPAR α , što dovodi do akumulacije lipida u jetri i lipotoksičnosti (Marino et al., 2016). Takođe, glukokortikoidi povećavaju lipolizu masnog tkiva i stimulišu unos slobodnih masnih kiselina u jetru tako što povećavaju ekspresiju proteina CD36 (D'souza et al., 2012). Uloga glukokortikoida u stimulaciji proizvodnje triglicerida u jetri je posebno važna kod prekomernog energetskog unosa (Mantha et al., 1999). Stoga, rezultati ove doktorske disertacije sugerišu da aktivirani GR u jetri može doprineti povećanoj lipogenezi i akumulaciji lipida koje su posredovane ishranom obogaćenom fruktozom kod MIF^{-/-} miševa putem aktivacije SREBP1c i ChREBP, ali i kroz olakšano preuzimanje slobodnih masnih kiselina iz cirkulacije od strane proteina CD36. Pored toga, iako je poznato da glukokortikoidi inhibiraju dejstvo insulina stimulišući transkripciju gena *Pepck* u jetri (Rahimi et al., 2020), dobijeni rezultati u ovoj disertaciji su pokazali da nije došlo do promene u nivou iRNK za ovaj glukoneogeni enzim. Dodatno, u studiji sa ćelijskom kulturom hepatocita, ispitan je efekat MIF-a na aktivnost PEPCK i pokazano je da MIF ne utiče na aktivnost ovog enzima. Štaviše, MIF je pojačao PEPCK aktivnost izazvanu glukokortikoidima, potvrđujući ideju da visoka koncentracija citokina MIF može da odvoji svoju imunološku funkciju od fizioloških efekata kortizola (Benigni et al., 2000; Flaster et al., 2007). Aktivnost PEPCK je dodatno regulisana i aktivnošću p38 MAP kinaze, koja povećava proizvodnju glukoze u jetri kroz modulatorne efekte na glukoneogenezu i sintezu glikogena u jetri (Liu and Cao, 2009). Pored uloge u metabolizmu glukoze u jetri, p38 MAPK takođe igra ključnu ulogu u metabolizmu lipida. Naime, p38 MAPK ima inhibitornu ulogu u lipogenezi jetre i nivou triglicerida u plazmi. Sadržaj lipida u jetri je dramatično veći kada je aktivnost p38 MAPK blokirana, usled povećanja transkripcije SREBP1c, kao i njegovog koaktivatora PGC-1 α (Liu and Cao, 2009; Xiong et al., 2007). Ovaj inhibitorni efekat p38 MAP kinaze na lipogenezu je u skladu sa njenim stimulativnim efektom na proizvodnju glukoze u jetri. Kako je glukoneogeneza neophodna za održavanje nivoa glukoze u plazmi tokom gladovanja, inhibicija lipogeneze obezbeđuje supstrate za sintezu glukoze (Liu and Cao, 2009). Rezultati ove doktorske teze su pokazali da je koncentracija, kako totalnog, tako i fosforilisanog proteina p38 u jetri povećana kod MIF^{-/-} životinja na standardnoj ishrani, dok je aktivnost proteina p38 povećana samo kod MIF^{-/-} životinja na ishrani obogaćenoj fruktozom (**Slika 4.14**).

Zaključno, rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da nedostatak gena *Mif* pojačava efekte ishrane obogaćene fruktozom na razvoj steatoze jetre. Povećani priliv slobodnih masnih kiselina iz cirkulacije u jetru posredovan proteinom CD36 i povećana

ekspresija enzima i transkripcionih faktora uključenih u lipogenezu, zajedno sa smanjenom β -oksidacijom masnih kiselina, doprineli su akumulaciji lipida uočenoj u jetri MIF^{-/-} miševa na ishrani obogaćenoj fruktozom. Ovi štetni efekti delecije gena *Mif* na promene morfologije i metabolizma lipida u jetri, a koje su indukovane fruktozom, najverovatnije su posredovane pojačanom inflamacijom i stimulisanom signalizacijom glukokortikoida, koje su posledice odsustva MIF-a. Konačno, čini se da ova narušena ravnoteža između inflamatornih medijatora i glukokortikoida u jetri doprinosi ektopičnoj akumulaciji lipida, koja je izazvana hroničnim unosom viška hranljivih materija. Jedan od faktora koji doprinosi narušavanju ove ravnoteže mogao bi biti i smanjenje ekspresije proteina AMPK, koje je praćeno povećanjem koncentracije proteina ACC i smanjenjem nivoa regulatora β -oksidacije (CPT1, PPAR α i PGC-1 α). Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na to da hronični unos viška hranljivih materija stimuliše sintezu i akumulaciju triglicerida, naspram aktivacije β -oksidacije u jetri MIF^{-/-} miševa usled aktivacije glukokortikoidnog signalnog puta i pojave inflamacije u jetri. Iako povećana aktivnost glukokortikoida kod MIF^{-/-} miševa može prvenstveno biti zaštitni mehanizam koji ograničava inflamaciju u jetri (Ahmed et al., 2012), to se dešava na račun akumulacije lipida u masnom tkivu. Ova komunikacija između visceralnog masnog tkiva i jetre u regulaciji lipidnog metabolizma dovodi do dalje deregulacije homeostaze glukoze i insulinske osetljivosti, što je i pokazano kod MIF^{-/-} miševa u ovoj doktorskoj studiji.



Slika 5.2. Šematski prikaz promena ekspresije gena i nivoa transkripcionih regulatora uključenih u metabolizam lipida u jetri MIF^{-/-} miševa nakon ishrane obogaćene fruktozom. Neesterifikovane masne kiseline (eng. *non-esterified fatty acid*, NEFA), slobodne masne kiseline (eng. *free fatty acid*, FFA), trigliceridi (eng. *triglycerides*, TG). Preuzeto i modifikovano iz (Postic and Girard, 2008).

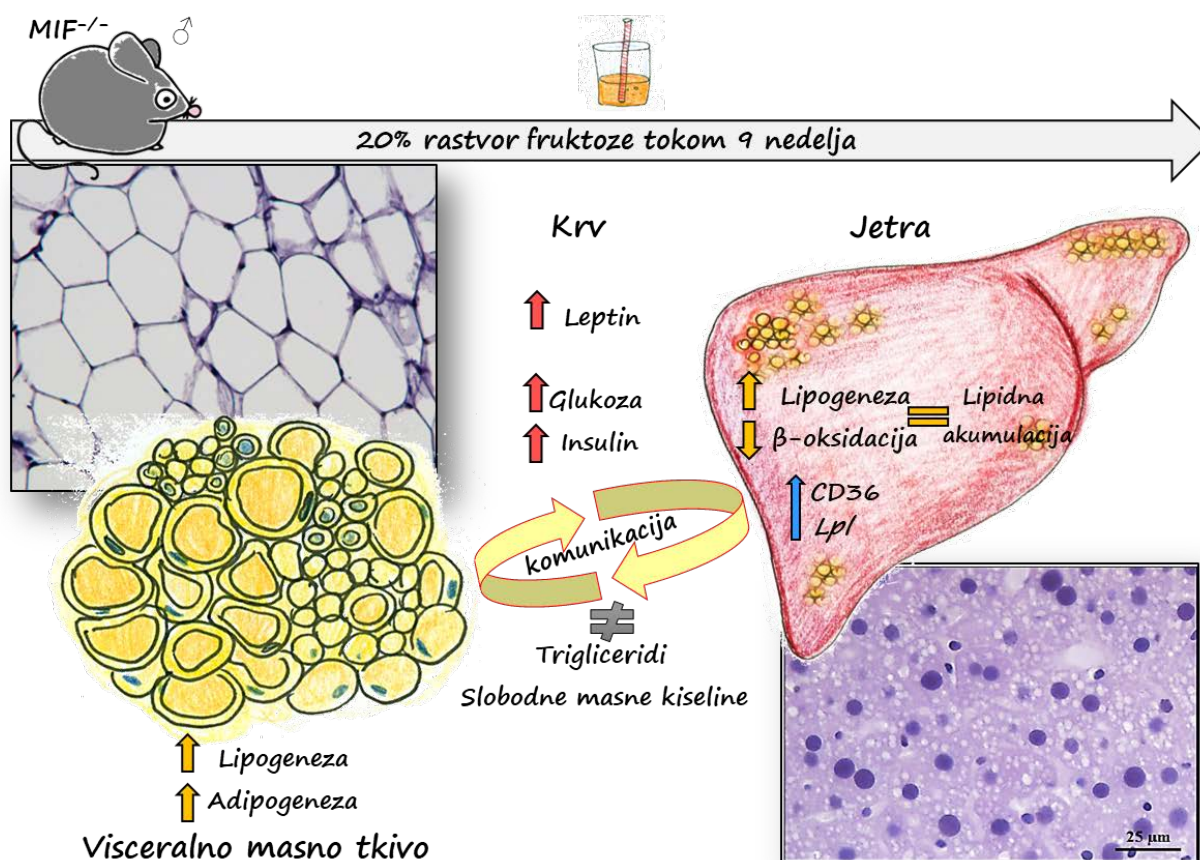
5.4 Komunikacija između visceralnog masnog tkiva i jetre u regulaciji metabolizma lipida kod MIF^{-/-} miševa hranjenih fruktozom

Jetra i masno tkivo su glavni metabolički organi odgovorni za korišćenje i skladištenje energije. Iako belo masno tkivo funkcioniše kao primarni rezervoar za akumulaciju triglicerida, jetra je, takođe, u stanju da skladišti značajne količine lipida u uslovima viška energije ili poremećenog metabolizma masnih kiselina, koji se manifestuje kao steatoza. Pored uloge u skladištenju triglicerida, masno tkivo predstavlja i endokrini organ koji reguliše sistemsku metaboličku homeostazu, reagujući na protok hranljivih materija kako bi podjednako odgovarao metaboličkim zahtevima pozitivnog ili negativnog energetskeg balansa. Sa sve većom učestalošću gojaznosti i dijabetesa tipa 2, lipotoksični efekti prekomerne ishrane, naročito ishrane obogaćene fruktozom, postali su meta brojnih istraživanja (Stern et al., 2016). Shodno tome, brojne studije su se fokusirale na otkrivanje novih signalnih molekula, koji regulišu metaboličku homeostazu sa nadom da će ograničiti gojaznost i smanjiti njene patofiziološke posledice. Faktori, poput leptina, adiponektina i masnih kiselina, dobijeni iz jetre i masnog tkiva, imaju plejotropne efekte na regulaciju metabolizma lipida i glukoze, i na taj način funkcionišu kao ključni posrednici u komunikaciji između ova dva metabolička aktivna organa (Ye et al., 2017). Proizvodnja i sekrecija gore navedenih faktora je regulisana gladovanjem i hranjenjem. Gladovanje akutno smanjuje cirkulišući leptin, dok povećava koncentraciju adiponektina u plazmi. Takođe, tokom gladovanja se povećava lipoliza u masnom tkivu, a samim tim i oslobađanje neesterifikovanih masnih kiselina i njihovo preuzimanje od strane jetre (Stern et al., 2016). Sa druge strane, povećanje telesne mase dovodi do ekspanzije masnog tkiva i regrutovanja makrofaga kroz oslobađanje različitih citokina i hemokina (Tilg and Moschen, 2006). Ovako "upaljeno" i disfunkcionalno masno tkivo aktivno sekretuje slobodne masne kiseline u krvotok, promoviše lipotoksičnost u jetri i doprinosi sistemskoj insulinskoj rezistenciji (Rosso et al., 2019).

Kao što je već pomenuto, rezultati ove doktorske studije su ukazali na pojavu visceralne gojaznosti kod MIF^{-/-} miševa usled povećanja ekspresije lipogenih gena i aktivacije transkripcionih regulatora adipogeneze u uslovima energetskeg preopterećenja. Takođe, pokazano je da je sistemska insulinska rezistencija prisutna kod svih MIF^{-/-} životinja, nezavisno od načina ishrane. Nakon devet nedelja tretmana, ove životinje su imale povećanu koncentraciju glukoze i insulina u krvi, kao i poremećenu osetljivost na glukozu i insulin (**Slika 5.3**). Poznato je da insulin modifikuje lipidni metabolizam u masnom tkivu, dok insulinska rezistencija uzrokuje disfunkciju adipocita i metaboličke poremećaje koji dovode do steatoze jetre (Jensen and Nielsen, 2007). U stanju insulinske rezistencije, sva tri glavna izvora za sintezu triglicerida u jetri su povećana: slobodne masne kiseline poreklom iz masnog tkiva, masne kiseline koje se metabolišu iz cirkulišućih hilomikrona i lipoproteina, i masne kiseline nastale procesom *de novo* lipogeneze (Choi and Ginsberg, 2011). Rezultati ove doktorske studije su pokazali da delecija gena *Mif* pojačava efekte ishrane obogaćene fruktozom na razvoj steatoze jetre. Iako nije bilo promena u nivou cirkulišućih triglicerida i slobodnih masnih kiselina, važnih faktora u komunikaciji između masnog tkiva i jetre, povećanje nivoa membranskog proteina za transport lipida (CD36), kao i nivoa lipoprotein lipaze mogu da ukažu na povećan unos cirkulišućih lipida u jetru (**Slika 5.3**). Još jedan važan medijator u komunikaciji između visceralnog masnog tkiva i jetre jeste leptin, hormon poreklom iz adipocita (Lee et al., 2001). Hiperleptinemija je uključena u patogenezu nealkoholne bolesti masne jetre i nealkoholnog steatohepatitisa, s obzirom na to da je pokazano da je povišena koncentracija leptina u krvi u pozitivnoj korelaciji sa stepenom steatoze jetre, koncentracijama insulina i glukoze u krvi, kao i sa pojavom inflamacije (Polyzos et al., 2011). Nalazi ovih studija su u skladu sa rezultatima ove doktorske disertacije, koji su

pokazali povećanje koncentracije leptina kod MIF^{-/-} miševa, kod kojih je istovremeno zapažena povećana lipogeneza i smanjena β-oksidacija masnih kiselina u jetri, kao i povišeni nivoi glukoze i insulina u cirkulaciji (Slika 5.3).

Zaključno, rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na postojanje veze između poremećenog metabolizma lipida u visceralnom masnom tkivu i razvoja steatoze jetre, prvenstveno usled povećanja unosa slobodnih masnih kiselina u jetru, kao i aktivacije hepatične *de novo* lipogeneze i smanjenja β-oksidacije. Ishrana obogaćena fruktozom kod MIF^{-/-} miševa povećava lipogenezu i adipogenezu u visceralnom masnom tkivu i akumulaciju lipida u jetri, kao odgovor na prelivanje slobodnih masnih kiselina, što posledično dovodi do razvoja sistemske insulinske rezistencije.



Slika 5.3. Šematski prikaz komunikacije između visceralnog masnog tkiva i jetre u regulaciji metabolizma lipida kod MIF^{-/-} miševa nakon ishrane obogaćene fruktozom (autor ilustracije Ana Đorđević).

6. ZAKLJUČCI

Polazna hipoteza ove doktorske disertacije bila je da plejotropni citokin MIF ostvaruje uticaj na lipidni metabolizam u visceralnom masnom tkivu i jetri posredstvom glukokortikoidnih hormona. Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju da ishrana obogaćena fruktozom uzrokuje poremećaj insulinske senzitivnosti i lipidnog metabolizma, koji mogu dovesti do razvoja gojaznosti i dijabetesa tipa 2, dok MIF ima protektivnu ulogu u visceralnoj gojaznosti i steatozi jetre. Kod MIF^{-/-} životinja u uslovima energetskog opterećenja izazvanog fruktozom dolazi do aktivacije glukokortikoidne signalizacije i posledičnih perturbacija u metabolizmu glukoze i lipida. Na ovo ukazuju sledeći zaključci:

- ✓ Nedostatak gena *Mif* i ishrana obogaćena fruktozom dovode do hiperglikemije, hiperinsulinemije, poremećaja sistemske insulinske osetljivosti i hiperleptinemije, što nije praćeno promenama u koncentraciji slobodnih masnih kiselina i triglicerida u krvi. Kod ovih životinja visceralna gojaznost i steatoza jetre su najverovatnije rezultat aktivacije enzima uključenih u proces lipogeneze u ovim tkivima.
- ✓ Metabolički stres, izazvan ishranom bogatom fruktozom kod MIF^{-/-} miševa, doveo je do aktivacije adipogeneze i lipogeneze u visceralnom masnom tkivu, dok je u jetri rezultirao stimulacijom *de novo* lipogeneze i inhibicijom β -oksidacije masnih kiselina, usled povećanja unosa slobodnih masnih kiselina iz cirkulacije.
- ✓ Metabolički efekti ishrane obogaćene fruktozom kod MIF^{-/-} miševa u visceralnom masnom tkivu i jetri najverovatnije su posledica aktivacije prereceptorskog metabolizma glukokortikoida i povećanja nivoa GR, o čemu govori i stimulacija ekspresije enzima i transkripcionih regulatora uključenih u lipidni metabolizam, koji su direktno ili indirektno regulisani GR-om.
- ✓ U masnom tkivu, ishrana obogaćena fruktozom nije dovela do povećane ekspresije citokina, dok je u jetri zabeležena povećana ekspresija pro-inflamatornih citokina i pojava fokalne i konfluentne nekroze kod MIF^{-/-} životinja. Metabolička inflamacija u jetri je najverovatnije posledica pojave mikrovezikularnih masnih promena uzrokovanih disfunkcijom mitohondrija i lipotoksičnošću usled priliva slobodnih masnih kiselina iz cirkulacije.
- ✓ Perturbacije u lipidnom metabolizmu jetre izazvane konzumiranjem fruktoze nisu dovele do pojave balonirajućih degeneracija i fibroze, ali su dovele do aktivacije regenerativnog mehanizma u jetri.

7. LITERATURA

- Adams, L.A., Angulo, P., Lindor, K.D., 2005. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ*. <https://doi.org/10.1503/cmaj.045232>
- Aeberli, D., Leech, M., Morand, E.F., 2006. Macrophage migration inhibitory factor and glucocorticoid sensitivity. *Rheumatology* 45, 937–943. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kel142>
- Aeberli, Daniel, Yang, Y., Mansell, A., Santos, L., Leech, M., Morand, E.F., 2006. Endogenous macrophage migration inhibitory factor modulates glucocorticoid sensitivity in macrophages via effects on MAP kinase phosphatase-1 and p38 MAP kinase. *FEBS Lett.* 580, 974–81. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.01.027>
- Ahmadian, M., Wang, Y., Sul, H.S., 2010. Lipolysis in adipocytes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 555–559. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2009.12.009>
- Ahmed, A., Rabbitt, E., Brady, T., Brown, C., Guest, P., Bujalska, I.J., Doig, C., Newsome, P.N., Hubscher, S., Elias, E., Adams, D.H., Tomlinson, J.W., Stewart, P.M., 2012. A switch in hepatic cortisol metabolism across the spectrum of non alcoholic fatty liver disease. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029531>
- Akalestou, E., Genser, L., Rutter, G.A., 2020. Glucocorticoid Metabolism in Obesity and Following Weight Loss. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 11, 59. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2020.00059/BIBTEX>
- Akram, D.S., Astrup, A. V., Atinmo, T., Boissin, J.L., Bray, G.A., Carroll, K., Chitson, P., Chunming, C., Dietz, W.H., Hill, J.O., Jéquier, E., Komodiki, C., Matsuzawa, Y., Mollentze, W.F., Moosa, K., Noor, M.I., Reddy, K.S., Seidell, J., Tanphaichitr, V., Uauy, R., Zimmet, P.Z., 2000. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* 343–354. <https://doi.org/10.2/JQUERY.MIN.JS>
- Alberts, P., Engblom, L., Edling, N., Forsgren, M., Klingstrom, G., Larsson, C., Ronquist-Nii, Y., Ohman, B., Abrahmsen, L., 2002. Selective inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 decreases blood glucose concentrations in hyperglycaemic mice. *Diabetologia* 45, 1528–1532. <https://doi.org/10.1007/S00125-002-0959-6>
- Ali, A.T., Hochfeld, W.E., Myburgh, R., Pepper, M.S., 2013. Adipocyte and adipogenesis. *Eur. J. Cell Biol.* 92, 229–236. <https://doi.org/10.1016/J.EJCB.2013.06.001>
- Alves-Bezerra, M., Cohen, D.E., 2018. Triglyceride metabolism in the liver. *Compr. Physiol.* 8, 1–22. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170012>
- Askari, H., Tykodi, G., Liu, J., Dagogo-Jack, S., 2010. Fasting Plasma Leptin Level Is a Surrogate Measure of Insulin Sensitivity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 3836–3843. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-0296>
- Asrih, M., Jornayvaz, F.R., 2013. Inflammation as a potential link between nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *J. Endocrinol.* <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0201>
- Atsumi, T., Cho, Y.-R., Leng, L., McDonald, C., Yu, T., Danton, C., Hong, E.-G., Mitchell, R.A., Metz, C., Niwa, H., Takeuchi, J., Onodera, S., Umino, T., Yoshioka, N., Koike, T., Kim, J.K., Bucala, R., 2007. The proinflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor regulates glucose metabolism during systemic inflammation. *J. Immunol.* 179, 5399–406. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.179.8.5399>

- Auphan, N., DiDonato, J.A., Rosette, C., Helmberg, A., Karin, M., 1995. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 270, 286–290. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.270.5234.286>
- Ayala-Sumuano, J.-T., Velez-delValle, C., Beltrán-Langarica, A., Marsch-Moreno, M., Hernandez-Mosqueira, C., Kuri-Harcuch, W., 2013. Glucocorticoid Paradoxically Recruits Adipose Progenitors and Impairs Lipid Homeostasis and Glucose Transport in Mature Adipocytes. *Sci. Rep.* 3, 2573. <https://doi.org/10.1038/srep02573>
- Bacher, M., Metz, C.N., Calandra, T., Mayer, K., Chesney, J., Lohoff, M., Gemsa, D., Donnelly, T., Bucala, R., 1996. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 7849. <https://doi.org/10.1073/PNAS.93.15.7849>
- Bantle, J.P., Raatz, S.K., Thomas, W., Georgopoulos, A., 2000. Effects of dietary fructose on plasma lipids in healthy subjects 1 – 3. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 1128–1134.
- Bargut, T.C.L., Souza-Mello, V., Aguila, M.B., Mandarim-De-Lacerda, C.A., 2017. Browning of white adipose tissue: Lessons from experimental models. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 31. https://doi.org/10.1515/HMBCI-2016-0051/ASSET/GRAPHIC/J_HMBCI-2016-0051_FIG_002.JPG
- Basciano, H., Federico, L., Adeli, K., 2005. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr. Metab.* <https://doi.org/10.1186/1743-7075-2-5>
- Bechmann, L.P., Gieseler, R.K., Sowa, J.P., Kahraman, A., Erhard, J., Wedemeyer, I., Emons, B., Jochum, C., Feldkamp, T., Gerken, G., Canbay, A., 2010. Apoptosis is associated with CD36/fatty acid translocase upregulation in non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int.* 30, 850–859. <https://doi.org/10.1111/J.1478-3231.2010.02248.X>
- Benigni, F., Atsumi, T., Calandra, T., Metz, C., Echtenacher, B., Peng, T., Bucala, R., 2000. The proinflammatory mediator macrophage migration inhibitory factor induces glucose catabolism in muscle. *J. Clin. Invest.* 106, 1291–1300. <https://doi.org/10.1172/JCI9900>
- Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Porrás, J.A., Auguet, T., 2014. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin. Exp. Gastroenterol.* 7, 221–239. <https://doi.org/10.2147/CEG.S62831>
- Bernhagen, J., Calandra, T., Mitchell, R.A., Martin, S.B., Tracey, K.J., Voelker, W., Manogue, K.R., Cerami, A., Bucala, R., 1993. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* 365, 756–759. <https://doi.org/10.1038/365756A0>
- Bhathena, S.J., 2000. Relationship between fatty acids and the endocrine system. *Biofactors* 13, 35–39. <https://doi.org/10.1002/BIOF.5520130107>
- Blakely, S.R., Hallfrisch, J., Reiser, S., Prather, E.S., 1981. Long-term effects of moderate fructose feeding on glucose tolerance parameters in rats. *J. Nutr.* 111, 307–314. <https://doi.org/10.1093/JN/111.2.307>
- Bledsoe, R.K., Montana, V.G., Stanley, T.B., Delves, C.J., Apolito, C.J., McKee, D.D., Consler, T.G., Parks, D.J., Stewart, E.L., Willson, T.M., Lambert, M.H., Moore, J.T., Pearce, K.H., Xu, H.E., 2002. Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell* 110, 93–105. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00817-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00817-6)
- Bloom, B.R., Bennett, B., 1966. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* 153, 80–82. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.153.3731.80>
- Boden, G., Shulman, G.I., 2002. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and β -cell dysfunction. *Eur. J. Clin. Invest.* 32, 14–23. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2362.32.S3.3.X>

- Boyko, E.J., Fujimoto, W.Y., Leonetti, D.L., Newell-Morris, L., 2000. Visceral adiposity and risk of type 2 diabetes: a prospective study among Japanese Americans. *Diabetes Care* 23, 465–471. <https://doi.org/10.2337/DIACARE.23.4.465>
- Bozza, M., Satoskar, A.R., Lin, G., Lu, B., Humbles, A.A., Gerard, C., David, J.R., 1999. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J. Exp. Med.* 189, 341–346. <https://doi.org/10.1084/JEM.189.2.341>
- Bray, G.A., Popkin, B.M., 2014. Dietary sugar and body weight: Have we reached a crisis in the epidemic of obesity and diabetes?: Health be damned! Pour on the sugar. *Diabetes Care.* <https://doi.org/10.2337/dc13-2085>
- Browning, J.D., Horton, J.D., 2004. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Invest.* 114, 147–152. <https://doi.org/10.1172/JCI22422>
- Bujalska, I.J., Gathercole, L.L., Tomlinson, J.W., Darimont, C., Ermolieff, J., Fanjul, A.N., Rejto, P.A., Stewart, P.M., 2008. A novel selective 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor prevents human adipogenesis. *J. Endocrinol.* 197, 297. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0050>
- Bujalska, I.J., Kumar, S., Stewart, P.M., 1997. Does central obesity reflect “Cushing’s disease of the omentum”? *Lancet* 349, 1210–1213. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)11222-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)11222-8)
- Buqué, X., Martínez, M.J., Cano, A., Miquilena-Colina, M.E., García-Monzón, C., Aspichueta, P., Ochoa, B., 2010. A subset of dysregulated metabolic and survival genes is associated with severity of hepatic steatosis in obese Zucker rats. *J. Lipid Res.* 51, 500–513. <https://doi.org/10.1194/JLR.M001966>
- Bursać, B.N., Djordjevic, A.D., Vasiljević, A.D., Milutinović, D.D.V., Veličković, N.A., Nestorović, N.M., Matić, G.M., 2013. Fructose consumption enhances glucocorticoid action in rat visceral adipose tissue. *J. Nutr. Biochem.* 24, 1166–1172. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.09.002>
- Bursać, B.N., Vasiljević, A.D., Nestorović, N.M., Veličković, N.A., Vojnović Milutinović, D.D., Matić, G.M., Djordjevic, A.D., 2014. High-fructose diet leads to visceral adiposity and hypothalamic leptin resistance in male rats — do glucocorticoids play a role? *J. Nutr. Biochem.* 25, 446–455. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2013.12.005>
- Busillo, J.M., Azzams, K.M., Cidlowski, J.A., 2011. Glucocorticoids Sensitize the Innate Immune System through Regulation of the NLRP3 Inflammasome. *J. Biol. Chem.* 286, 38703. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.275370>
- Busillo, J.M., Cidlowski, J.A., 2013. The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore. *Trends Endocrinol. Metab.* 24, 109. <https://doi.org/10.1016/J.TEM.2012.11.005>
- Byrne, C.D., Olufad, R., Bruce, K.D., Cagampang, F.R., Ahmed, M.H., 2009. Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin. Sci. (Lond).* 116, 539–564. <https://doi.org/10.1042/CS20080253>
- Calandra, T., Bernhagen, J., Metz, C.N., Spiegel, L.A., Bacher, M., Donnelly, T., Cerami, A., Bucala, R., 1995. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 377, 68–71. <https://doi.org/10.1038/377068a0>
- Calandra, T., Bucala, R., 2017. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): A glucocorticoid counter-regulator within the immune system. *Crit. Rev. Immunol.* 37, 359–370. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v37.i2-6.90>
- Calandra, T., Bucala, R., 1997. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a glucocorticoid counter-regulator within the immune system. *Crit. Rev. Immunol.* 17, 77–88.

- Calandra, T., Roger, T., 2003. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 791. <https://doi.org/10.1038/NRI1200>
- Campbell, J.E., Peckett, A.J., D'souza, A.M., Hawke, T.J., Riddell, M.C., 2011. Adipogenic and lipolytic effects of chronic glucocorticoid exposure. *Am. J. Physiol. Physiol.* 300, C198–C209. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00045.2010>
- Canbay, A., Bechmann, L., Gerken, G., 2007. Lipid metabolism in the liver. *Z. Gastroenterol.* 45, 35–41. <https://doi.org/10.1055/S-2006-927368>
- Castoldi, A., De Souza, C.N., Saraiva Câmara, N.O., Moraes-Vieira, P.M., 2015. The Macrophage Switch in Obesity Development. *Front. Immunol.* 6, 1. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2015.00637>
- Chen, Q., Shou, P., Zheng, C., Jiang, M., Cao, G., Yang, Q., Cao, J., Xie, N., Velletri, T., Zhang, X., Xu, C., Zhang, L., Yang, H., Hou, J., Wang, Y., Shi, Y., 2016. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell Death Differ.* 2016 237 23, 1128–1139. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.168>
- Cheng, P.-W., Lin, Y.-T., Ho, W.-Y., Lu, P.-J., Chen, H.-H., Lai, C.-C., Sun, G.-C., Yeh, T.-C., Hsiao, M., Tseng, C.-J., Liu, C.-P., 2017. Fructose induced neurogenic hypertension mediated by overactivation of p38 MAPK to impair insulin signaling transduction caused central insulin resistance. *Free Radic. Biol. Med.* 112, 298–307. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.07.022>
- Chimin, P., Farias, T.D.S.M., Torres-Leal, F.L., Bolsoni-Lopes, A., Campaña, A.B., Andreotti, S., Lima, F.B., 2014. Chronic glucocorticoid treatment enhances lipogenic activity in visceral adipocytes of male Wistar rats. *Acta Physiol.* 211, 409–420. <https://doi.org/10.1111/APHA.12226>
- Choe, S.S., Huh, J.Y., Hwang, I.J., Kim, J.I., Kim, J.B., 2016. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 7, 30. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2016.00030/BIBTEX>
- Choi, S.H., Ginsberg, H.N., 2011. Increased Very Low Density Lipoprotein Secretion, Hepatic Steatosis, and Insulin Resistance. *Trends Endocrinol. Metab.* 22, 353. <https://doi.org/10.1016/J.TEM.2011.04.007>
- Chrousos, G.P., Charmandari, E., Kino, T., 2004. Glucocorticoid action networks--an introduction to systems biology. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 563–564. <https://doi.org/10.1210/JC.2003-032026>
- Chuang, C.-C., Martinez, K., Xie, G., Kennedy, A., Bumrungpert, A., Overman, A., Jia, W., McIntosh, M.K., 2010. Quercetin is equally or more effective than resveratrol in attenuating tumor necrosis factor- α -mediated inflammation and insulin resistance in primary human adipocytes. *Am. J. Clin. Nutr.* 92, 1511–1521. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.29807>
- Coban, N., Onat, A., Yildirim, O., Can, G., Erginel-Unaltuna, N., 2015. Oxidative stress-mediated (sex-specific) loss of protection against type-2 diabetes by macrophage migration inhibitory factor (MIF)-173G/C polymorphism. *Clin. Chim. Acta* 438, 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2014.07.037>
- Cohen, D.E., Fisher, E.A., 2013. Lipoprotein metabolism, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease. *Semin. Liver Dis.* 33, 380–388. <https://doi.org/10.1055/S-0033-1358519>
- Coleman, R.A., Lee, D.P., 2004. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog. Lipid Res.* 43, 134–176. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(03\)00051-1](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(03)00051-1)

- Conboy, L., Varea, E., Castro, J.E., Sakouhi-Ouertatani, H., Calandra, T., Lashuel, H.A., Sandi, C., 2011. Macrophage migration inhibitory factor is critically involved in basal and fluoxetine-stimulated adult hippocampal cell proliferation and in anxiety, depression and memory-related behaviors. *Mol. Psychiatry* 16, 533–547. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.15>
- Conine, S.J., Cross, J. V., 2014. MIF deficiency does not alter glucose homeostasis or adipose tissue inflammatory cell infiltrates during diet-induced obesity. *Obesity* 22, 418–425. <https://doi.org/10.1002/oby.20555>
- Cruz-Topete, D., Cidlowski, J.A., 2015. One Hormone, Two Actions: Anti- and Pro-Inflammatory Effects of Glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation* 22, 20–32. <https://doi.org/10.1159/000362724>
- Cusi, K., 2012. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: Pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.02.003>
- D'souza, A.M., Beaudry, J.L., Szigiato, A.A., Trumble, S.J., Snook, L.A., Bonen, A., Giacca, A., Riddell, M.C., 2012. Consumption of a high-fat diet rapidly exacerbates the development of fatty liver disease that occurs with chronically elevated glucocorticoids. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 302, G850–G863. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00378.2011>
- Dagenais, G.R., Yi, Q., Mann, J.F.E., Bosch, J., Pogue, J., Yusuf, S., 2005. Prognostic impact of body weight and abdominal obesity in women and men with cardiovascular disease. *Am. Heart J.* 149, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.AHJ.2004.07.009>
- Dandona, P., Aljada, A., Ghanim, H., Mohanty, P., Tripathy, C., Hofmeyer, D., Chaudhuri, A., 2004. Increased plasma concentration of macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) and MIF mRNA in mononuclear cells in the obese and the suppressive action of metformin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 5043–5047. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0436>
- Danilova, I.G., Yushkov, B.G., Kazakova, I.A., Belousova, A. V., Minin, A.S., Abidov, M.T., 2019. Recruitment of macrophages and bone marrow stem cells to regenerating liver promoted by sodium phthalhydrazide in mice. *Biomed. Pharmacother.* 110, 594–601. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2018.07.086>
- Daun, J.M., Cannon, J.G., 2000. Macrophage migration inhibitory factor antagonizes hydrocortisone-induced increases in cytosolic I κ B α . *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.2000.279.3.R1043/ASSET/IMAGES/LARGE/H60900130008.JPEG>
- Day, C.P., James, O.F.W., 1998. Steatohepatitis: A tale of two “Hits”? *Gastroenterology*. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(98\)70599-2](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70599-2)
- de Guia, R.M., Herzig, S., 2015. How do glucocorticoids regulate lipid metabolism? *Adv. Exp. Med. Biol.* 872, 127–144. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2895-8_6
- De Luca, C., Kowalski, T.J., Zhang, Y., Elmquist, J.K., Lee, C., Kilimann, M.W., Ludwig, T., Liu, S.M., Chua, S.C., 2005. Complete rescue of obesity, diabetes, and infertility in db/db mice by neuron-specific LEPR-B transgenes. *J. Clin. Invest.* 115, 3484–3493. <https://doi.org/10.1172/JCI24059>
- Dekker, M.J., Su, Q., Baker, C., Rutledge, A.C., Adeli, K., 2010. Fructose: A highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00283.2010>

- Delgado-Coello, B., 2021. Liver regeneration observed across the different classes of vertebrates from an evolutionary perspective. *Heliyon* 7, e06449. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2021.E06449>
- Dentin, R., Girard, J., Postic, C., 2005. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): Two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver, in: *Biochimie*. Elsevier, pp. 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.11.008>
- DiMeglio, D.P., Mattes, R.D., 2000. Liquid versus solid carbohydrate: effects on food intake and body weight. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 24, 794–800. <https://doi.org/10.1038/SJ.IJO.0801229>
- DiNicolantonio, J.J., Mehta, V., Onkaramurthy, N., O’Keefe, J.H., 2018. Fructose-induced inflammation and increased cortisol: A new mechanism for how sugar induces visceral adiposity. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 61, 3–9. <https://doi.org/10.1016/J.PCAD.2017.12.001>
- Dixon, J.B., Bhathal, P.S., O’Brien, P.E., 2001. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* 121, 91–100. <https://doi.org/10.1053/GAST.2001.25540>
- Donnelly, K.L., Smith, C.I., Schwarzenberg, S.J., Jessurun, J., Boldt, M.D., Parks, E.J., 2005. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* 115, 1343–1351. <https://doi.org/10.1172/JCI23621>
- Dowman, J.K., Tomlinson, J.W., Newsome, P.N., 2009. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM*. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcp158>
- Draper, N., Stewart, P.M., 2005. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. *J. Endocrinol.* 186, 251–271. <https://doi.org/10.1677/JOE.1.06019>
- Drescher, H.K., Weiskirchen, S., Weiskirchen, R., 2019. Current Status in Testing for Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). *Cells* 8. <https://doi.org/10.3390/CELLS8080845>
- Duncan, R.E., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., Sul, H.S., 2007. Regulation of Lipolysis in Adipocytes. *Annu. Rev. Nutr.* 27, 79–101. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.27.061406.093734>
- Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P., Foufelle, F., 2004. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86, 839–848. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.09.018>
- Endo, M., Masaki, T., Seike, M., Yoshimatsu, H., 2007. TNF- α induces hepatic steatosis in mice by enhancing gene expression of sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c). *Exp. Biol. Med.* 232, 614–621. <https://doi.org/10.3181/00379727-232-2320614>
- Engelmann, M., Landgraf, R., Wotjak, C.T., 2004. The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front. Neuroendocrinol.* 25, 132–149. <https://doi.org/10.1016/J.YFRNE.2004.09.001>
- Engin, A., 2017. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. *Adv. Exp. Med. Biol.* 960, 1–17. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_1
- Enjoji, M., Kohjima, M., Nakamuta, M., 2016. Lipid Metabolism and the Liver. *Liver Syst. Dis.* 105–122. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55790-6_6
- Enriori, P.J., Evans, A.E., Sinnayah, P., Jobst, E.E., Tonelli-Lemos, L., Billes, S.K., Glavas, M.M., Grayson, B.E., Perello, M., Nillni, E.A., Grove, K.L., Cowley, M.A., 2007. Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell Metab.* 5, 181–194. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2007.02.004>

- Esteve Ràfols, M., 2014. Adipose tissue: Cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinol. y Nutr.* (English Ed. 61, 100–112. <https://doi.org/10.1016/J.ENDOEN.2014.02.001>
- Fabbrini, E., Sullivan, S., Klein, S., 2010. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* 51, 679–689. <https://doi.org/10.1002/HEP.23280>
- Farmer, S.R., 2006. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* 4, 263–273. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2006.07.001>
- Fingerle-Rowson, G.R., Bucala, R., 2001. Neuroendocrine properties of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Immunol. Cell Biol.* 79, 368–375. <https://doi.org/10.1046/J.1440-1711.2001.01024.X>
- Finucane, O.M., Reynolds, C.M., McGillicuddy, F.C., Harford, K.A., Morrison, M., Baugh, J., Roche, H.M., 2014. Macrophage migration inhibitory factor deficiency ameliorates high-fat diet induced insulin resistance in mice with reduced adipose inflammation and hepatic steatosis. *PLoS One* 9, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113369>
- Finucane, O.M., Reynolds, C.M., McGillicuddy, F.C., Roche, H.M., 2012. Insights into the role of macrophage migration inhibitory factor in obesity and insulin resistance. *Proc. Nutr. Soc.* 71, 622–33. <https://doi.org/10.1017/S0029665112000730>
- Flaster, H., Bernhagen, J., Calandra, T., Bucala, R., 2007. The macrophage migration inhibitory factor-glucocorticoid dyad: Regulation of inflammation and immunity. *Mol. Endocrinol.* <https://doi.org/10.1210/me.2007-0065>
- Foretz, M., Guichard, C., Ferré, P., Foufelle, F., 1999. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 12737–42.
- Franckhauser, S., Muñoz, S., Pujol, A., Casellas, A., Riu, E., Otaegui, P., Su, B., Bosch, F., 2002. Increased fatty acid re-esterification by PEPCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance. *Diabetes* 51, 624–30.
- Gadd, V.L., Skoien, R., Powell, E.E., Fagan, K.J., Winterford, C., Horsfall, L., Irvine, K., Clouston, A.D., 2014. The portal inflammatory infiltrate and ductular reaction in human nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 59, 1393–1405. <https://doi.org/10.1002/hep.26937>
- Galarraga, M., Campi3n, J., Mu3noz-Barrutia, A., Boqu3, N., Moreno, H., Mart3nez, J.A., Milagro, F., Ortiz-de-Sol3rzano, C., 2012. Adiposoft: automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. *J. Lipid Res.* 53, 2791–2796. <https://doi.org/10.1194/jlr.D023788>
- Gastaldelli, A., Cusi, K., Pettiti, M., Hardies, J., Miyazaki, Y., Berria, R., Buzzigoli, E., Sironi, A.M., Cersosimo, E., Ferrannini, E., DeFronzo, R.A., 2007. Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Gastroenterology* 133, 496–506. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2007.04.068>
- Gathercole, L.L., Morgan, S.A., Bujalska, I.J., Hauton, D., Stewart, P.M., Tomlinson, J.W., 2011. Regulation of Lipogenesis by Glucocorticoids and Insulin in Human Adipose Tissue. *PLoS One* 6, e26223. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0026223>
- Gathercole, L.L., Morgan, S.A., Tomlinson, J.W., 2013. Hormonal Regulation of Lipogenesis. *Vitam. Horm.* 91, 1–27. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407766-9.00001-8>
- Gathercole, L.L., Stewart, P.M., 2010. Targeting the pre-receptor metabolism of cortisol as a novel therapy in obesity and diabetes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 122, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.03.060>

- Geer, E.B., Islam, J., Buettner, C., 2014. Mechanisms of Glucocorticoid-Induced Insulin Resistance: Focus on Adipose Tissue Function and Lipid Metabolism. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 43, 75. <https://doi.org/10.1016/J.ECL.2013.10.005>
- Geisler, C.E., Renquist, B.J., 2017. Hepatic lipid accumulation: cause and consequence of dysregulated glucoregulatory hormones. *J. Endocrinol.* 234, R1–R21. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0513>
- Geng, Y., Faber, K.N., de Meijer, V.E., Blokzijl, H., Moshage, H., 2021. How does hepatic lipid accumulation lead to lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease? *Hepatol. Int.* 2021 151 15, 21–35. <https://doi.org/10.1007/S12072-020-10121-2>
- Glendinning, J.I., Frim, Y.G., Hochman, A., Lubitz, G.S., Basile, A.J., Sclafani, A., 2017. Obesity, Diabetes and Energy Homeostasis: Glucose elicits cephalic-phase insulin release in mice by activating KATP channels in taste cells. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 312, R597. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00433.2016>
- Gordon, D.A., Wetterau, J.R., Gregg, R.E., 1995. Microsomal triglyceride transfer protein: a protein complex required for the assembly of lipoprotein particles. *Trends Cell Biol.* 5, 317–321. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)89054-6](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)89054-6)
- Greco, D., Kotronen, A., Westerbacka, J., Puig, O., Arkkila, P., Kiviluoto, T., Laitinen, S., Kolak, M., Fisher, R.M., Hamsten, A., Auvinen, P., Yki-Järvinen, H., 2008. Gene expression in human NAFLD. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 294, 1281–1287. https://doi.org/10.1152/AJPGI.00074.2008/SUPPL_FILE/ST2C.PDF
- Grieb, G., Merk, M., Bernhagen, J., Bucala, R., 2010. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a promising biomarker. *Drug News Perspect.* 23, 257. <https://doi.org/10.1358/DNP.2010.23.4.1453629>
- Hammond, G.L., 2016. Plasma steroid-binding proteins: primary gatekeepers of steroid hormone action. *J. Endocrinol.* 230, R13–R25. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0070>
- Han, H.S., Kang, G., Kim, J.S., Choi, B.H., Koo, S.H., 2016. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Exp. Mol. Med.* 2016 483 48, e218–e218. <https://doi.org/10.1038/emm.2015.122>
- Hausman, D.B., DiGirolamo, M., Bartness, T.J., Hausman, G.J., Martin, R.J., 2001. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes. Rev.* 2, 239–254. <https://doi.org/10.1046/J.1467-789X.2001.00042.X>
- Havel, P.J., 2005. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr. Rev.* 63, 133–57.
- Heinrichs, D., Berres, M.-L., Coeuru, M., Knauel, M., Nellen, A., Fischer, P., Philippeit, C., Bucala, R., Trautwein, C., Wasmuth, H.E., Bernhagen, J., 2014. Protective role of macrophage migration inhibitory factor in nonalcoholic steatohepatitis. *FASEB J.* 28, 5136–5147. <https://doi.org/10.1096/fj.14-256776>
- Herman, R.H., Zakim, D., Stifel, F.B., 1970. Effect of diet on lipid metabolism in experimental animals and man. *Fed. Proc.* 29, 1302–7.
- Hermanowski-Vosatka, A., Balkovec, J.M., Cheng, K., Chen, H.Y., Hernandez, M., Koo, G.C., Le Grand, C.B., Li, Z., Metzger, J.M., Mundt, S.S., Noonan, H., Nunes, C.N., Olson, S.H., Pikounis, B., Ren, N., Robertson, N., Schaeffer, J.M., Shah, K., Springer, M.S., Strack, A.M., Strowski, M., Wu, K., Wu, T.J., Xiao, J., Zhang, B.B., Wright, S.D., Thieringer, R., 2005. 11 β -HSD1 inhibition ameliorates metabolic syndrome and prevents progression of atherosclerosis in mice. *J. Exp. Med.* 202, 517. <https://doi.org/10.1084/JEM.20050119>
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., Spiegelman, B.M., 1993. Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor- α : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. *Science (80-)*. 259, 87–91. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.7678183>

- Hu, E., Liang, P., Spiegelman, B.M., 1996. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J. Biol. Chem.* 271, 10697–10703. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.18.10697>
- Huttunen, J.K., Mäkinen, K.K., Scheinin, A., 1976. Turku sugar studies XI: Effects of sucrose, fructose and xylitol diets on glucose, lipid and urate metabolism. *Acta Odontol. Scand.* 34, 345–351. <https://doi.org/10.3109/00016357609004646>
- Imajo, K., Yoneda, M., Kessoku, T., Ogawa, Y., Maeda, S., Sumida, Y., Hyogo, H., Eguchi, Y., Wada, K., Nakajima, A., 2013. Rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms141121833>
- Inoue, M., Ohtake, T., Motomura, W., Takahashi, N., Hosoki, Y., Miyoshi, S., Suzuki, Y., Saito, H., Kohgo, Y., Okumura, T., 2005. Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 215–222. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2005.08.070>
- Ip, E., Farrell, G.C., Robertson, G., Hall, P., Kirsch, R., Leclercq, I., 2003. Central role of PPARalpha-dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology* 38, 123–132. <https://doi.org/10.1053/JHEP.2003.50307>
- Item, F., Konrad, D., 2012. Visceral fat and metabolic inflammation: the portal theory revisited. *Obes. Rev.* 13, 30–39. <https://doi.org/10.1111/J.1467-789X.2012.01035.X>
- Jenkins, B.D., Pullen, C.B., Darimont, B.D., 2001. Novel glucocorticoid receptor coactivator effector mechanisms. *Trends Endocrinol. Metab.* 12, 122–126. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(00\)00357-X](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(00)00357-X)
- Jensen, M.D., Nielsen, S., 2007. Insulin dose response analysis of free fatty acid kinetics. *Metabolism.* 56, 68–76. <https://doi.org/10.1016/J.METABOL.2006.08.022>
- Johnston, D.G., Gill, A., Ørskov, H., Batstone, G.F., Alberti, K.G.M.M., 1982. Metabolic effects of cortisol in man—Studies with somatostatin. *Metabolism* 31, 312–317. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(82\)90105-6](https://doi.org/10.1016/0026-0495(82)90105-6)
- Jou, J., Choi, S.S., Diehl, A.M., 2008. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin. Liver Dis.* 28, 370–379. <https://doi.org/10.1055/S-0028-1091981>
- Jürgens, H., Haass, W., Castañeda, T.R., Schürmann, A., Koebnick, C., Dombrowski, F., Otto, B., Nawrocki, A.R., Scherer, P.E., Spranger, J., Ristow, M., Joost, H.-G., Havel, P.J., Tschöp, M.H., 2005. Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice. *Obes. Res.* 13, 1146–1156. <https://doi.org/10.1038/oby.2005.136>
- Kadmiel, M., Cidlowski, J.A., 2013. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 518. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2013.07.003>
- Kahn, B.B., Flier, J.S., 2000. Obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106, 473. <https://doi.org/10.1172/JCI10842>
- Kahn, S.E., Hull, R.L., Utzschneider, K.M., 2006. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444, 840–846. <https://doi.org/10.1038/NATURE05482>
- Kanarek, R.B., Orthen Gambill, N., 1982. Differential effects of sucrose, fructose and glucose on carbohydrate-induced obesity in rats. *J. Nutr.* 112, 1546–1554. <https://doi.org/10.1093/JN/112.8.1546>
- Karin, M., Yamamoto, Y., Wang, Q.M., 2004. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 17–26. <https://doi.org/10.1038/NRD1279>
- Keim, N.L., Havel, P.J., 2013. Fructose: Absorption and Metabolism. *Encycl. Hum. Nutr.* 2–4, 361–365. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00128-8>
- Keim, N.L., Stanhope, K.L., Havel, P.J., 2016. Fructose and High-Fructose Corn Syrup. *Encycl. Food Heal.* 119–124. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00333-0>

- Kersten, S., 2014. Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1841, 919–933. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2014.03.013>
- Kim, B.-S., Pallua, N., Bernhagen, J., Bucala, R., 2015. The macrophage migration inhibitory factor protein superfamily in obesity and wound repair. *Exp. Mol. Med.* 47, e161. <https://doi.org/10.1038/emm.2015.26>
- Kim, J.B., Sarraf, P., Wright, M., Yao, K.M., Mueller, E., Solanes, G., Lowell, B.B., Spiegelman, B.M., 1998. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J. Clin. Invest.* 101, 1–9. <https://doi.org/10.1172/JCI1411>
- Kim, J.B., Spiegelman, B.M., 1996. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.* 10, 1096–1107. <https://doi.org/10.1101/GAD.10.9.1096>
- Kleemann, R., Bucala, R., 2010. Macrophage migration inhibitory factor: critical role in obesity, insulin resistance, and associated comorbidities. *Mediators Inflamm.* 2010, 610479. <https://doi.org/10.1155/2010/610479>
- Koska, J., Stefan, N., Dubois, S., Trinidad, C., Considine, R. V., Funahashi, T., Bunt, J.C., Ravussin, E., Permana, P.A., 2009. mRNA concentrations of MIF in subcutaneous abdominal adipose cells are associated with adipocyte size and insulin action. *Int. J. Obes. (Lond).* 33, 842–850. <https://doi.org/10.1038/IJO.2009.106>
- Kovačević, S., Nestorov, J., Matić, G., Elaković, I., 2016. Fructose and stress induce opposite effects on lipid metabolism in the visceral adipose tissue of adult female rats through glucocorticoid action. *Eur. J. Nutr.* 56, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1251-8>
- Krishna, M., 2017. Patterns of necrosis in liver disease. *Clin. Liver Dis.* 10, 53. <https://doi.org/10.1002/CLD.653>
- Kumar, R., Thompson, E.B., 2005. Gene regulation by the glucocorticoid receptor: Structure: function relationship. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 94, 383–394. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.12.046>
- Kuo, T., McQueen, A., Chen, T.C., Wang, J.C., 2015. Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids. *Adv. Exp. Med. Biol.* 872, 99–126. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2895-8_5
- Lacasa, D., Agli, B., Giudicelli, Y., 1988. Permissive action of glucocorticoids on catecholamine-induced lipolysis: Direct “in vitro” effects on the fat cell β -adrenoreceptor-coupled-adenylate cyclase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153, 489–497. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(88\)81121-5](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(88)81121-5)
- Lau, J.K.C., Zhang, X., Yu, J., 2017. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *J. Pathol.* 241, 36–44. <https://doi.org/10.1002/PATH.4829>
- Lavoie, J.M., Gauthier, M.S., 2006. Regulation of fat metabolism in the liver: link to non-alcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 1393–1409. <https://doi.org/10.1007/S00018-006-6600-Y>
- Lazar, A., Dinescu, S., Costache, M., 2018. Adipose tissue engineering and adipogenesis – a review. *Rev. Biol. Biomed. Sci.* 17–26. <https://doi.org/10.31178/RBBS.2018.1.1.3>
- Lê, K.-A., Faeh, D., Stettler, R., Ith, M., Kreis, R., Vermathen, P., Boesch, C., Ravussin, E., Tappy, L., 2006. A 4-wk high-fructose diet alters lipid metabolism without affecting insulin sensitivity or ectopic lipids in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 84, 1374–9.

- Lê, K.A., Ith, M., Kreis, R., Faeh, D., Bortolotti, M., Tran, C., Boesch, C., Tappy, L., 2009. Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. *Am. J. Clin. Nutr.* 89, 1760–1765. <https://doi.org/10.3945/AJCN.2008.27336>
- Lee, M.-J., Pramyothin, P., Karastergiou, K., Fried, S.K., 2014. Deconstructing the roles of glucocorticoids in adipose tissue biology and the development of central obesity. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 473–81. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.029>
- Lee, Y., Wang, M.Y., Kakuma, T., Wang, Z.W., Babcock, E., McCorkle, K., Higa, M., Zhou, Y.T., Unger, R.H., 2001. Liporegulation in diet-induced obesity. The antisteatotic role of hyperleptinemia. *J. Biol. Chem.* 276, 5629–5635. <https://doi.org/10.1074/JBC.M008553200>
- Lefterova, M.I., Lazar, M.A., 2009. New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* 20, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.TEM.2008.11.005>
- Lettéron, P., Brahimi-Bourouina, N., Robin, M.A., Moreau, A., Feldmann, G., Pessayre, D., 1997. Glucocorticoids inhibit mitochondrial matrix acyl-CoA dehydrogenases and fatty acid beta-oxidation. *Am. J. Physiol.* 272. <https://doi.org/10.1152/AJPGI.1997.272.5.G1141>
- Lin, J., Handschin, C., Spiegelman, B.M., 2005. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.* 1, 361–370. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2005.05.004>
- Lin, X., Li, H., 2021. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 12, 1070. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2021.706978/BIBTEX>
- Liu, L., Mei, M., Yang, S., Li, Q., 2014. Roles of chronic low-grade inflammation in the development of ectopic fat deposition. *Mediators Inflamm.* <https://doi.org/10.1155/2014/418185>
- Liu, L.F., Purushotham, A., Wendel, A.A., Belury, M.A., 2007. Combined effects of rosiglitazone and conjugated linoleic acid on adiposity, insulin sensitivity, and hepatic steatosis in high-fat-fed mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292. <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00523.2006>
- Liu, Y., Sun, W.L., Sun, Y., Hu, G., Ding, G.X., 2006. Role of 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in differentiation of 3T3-L1 cells and in rats with diet-induced obesity. *Acta Pharmacol. Sin.* 2006 275 27, 588–596. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2006.00316.x>
- Liu, Z., Cao, W., 2009. p38 mitogen-activated protein kinase: a critical node linking insulin resistance and cardiovascular diseases in type 2 diabetes mellitus. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 9, 38–46.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>
- London, E., Castonguay, T.W., 2011. High fructose diets increase 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in liver and visceral adipose in rats within 24-h exposure. *Obesity (Silver Spring)*. 19, 925–32. <https://doi.org/10.1038/oby.2010.284>
- Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., Parrillo, L., Formisano, P., Raciti, G.A., Beguinot, F., Miele, C., 2019. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/IJMS20092358>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.

- Lumeng, C.N., Bodzin, J.L., Saltiel, A.R., 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* 117, 175. <https://doi.org/10.1172/JCI29881>
- Luo, L., Liu, M., 2016. Adipose tissue in control of metabolism. *J. Endocrinol.* 231, R77–R99. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0211>
- Makki, K., Froguel, P., Wolowczuk, I., 2013. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm.* 2013, 139239. <https://doi.org/10.1155/2013/139239>
- Mandard, S., Müller, M., Kersten, S., 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. *Cell. Mol. Life Sci. C.* 2004 614 61, 393–416. <https://doi.org/10.1007/S00018-003-3216-3>
- Mantha, L., Palacios, E., Deshaies, Y., 1999. Modulation of triglyceride metabolism by glucocorticoids in diet-induced obesity. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 277. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.277.2.r455>
- Marino, J.S., Stechschulte, L.A., Stec, D.E., Nestor-Kalinoski, A., Coleman, S., Hinds, T.D., 2016. Glucocorticoid receptor β induces hepatic steatosis by augmenting inflammation and inhibition of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) α . *J. Biol. Chem.* 291, 25776–25788. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.752311>
- Marriott, B.P., Cole, N., Lee, E., 2009. National estimates of dietary fructose intake increased from 1977 to 2004 in the United States. *J. Nutr.* 139. <https://doi.org/10.3945/JN.108.098277>
- Mastrocola, R., Ferrocino, I., Liberto, E., Chiazza, F., Cento, A.S., Collotta, D., Querio, G., Nigro, D., Bitonto, V., Cutrin, J.C., Rantsiou, K., Durante, M., Masini, E., Aragno, M., Cordero, C., Cocolin, L., Collino, M., 2018. Fructose liquid and solid formulations differently affect gut integrity, microbiota composition and related liver toxicity: a comparative in vivo study. *J. Nutr. Biochem.* 55, 185–199. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2018.02.003>
- Masuzaki, H., Paterson, J., Shinyama, H., Morton, N.M., Mullins, J.J., Seckl, J.R., Flier, J.S., 2001. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 294, 2166–2170. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1066285>
- Mayes, P.A., 1993. Intermediary metabolism of fructose. *Am. J. Clin. Nutr.* 58, 754S–765S. <https://doi.org/10.1093/AJCN/58.5.754S>
- McArdle, M.A., Finucane, O.M., Connaughton, R.M., McMorrow, A.M., Roche, H.M., 2013. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: Insights into the emerging role of nutritional strategies. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00052>
- McGarry, J.D., Leatherman, G.F., Foster, D.W., 1978. Carnitine palmitoyltransferase I. The site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonyl-CoA. *J. Biol. Chem.* 253, 4128–4136. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)34693-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)34693-8)
- Merkel, M., Eckel, R.H., Goldberg, I.J., 2002. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J. Lipid Res.* 43, 1997–2006.
- Miquilena-Colina, M.E., Lima-Cabello, E., Sánchez-Campos, S., García-Mediavilla, M.V., Fernández-Bermejo, M., Lozano-Rodríguez, T., Vargas-Castrillón, J., Xabier Buqué, B.O., Aspichueta, P., González-Gallego, J., García-Monzón, C., 2011. Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut* 60, 1394–1402. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.222844>

- Mitchell, R.A., Metz, C.N., Peng, T., Bucala, R., 1999. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J. Biol. Chem.* 274, 18100–6.
- Miyazaki, M., Dobrzyn, A., Man, W.C., Chu, K., Sampath, H., Kim, H.-J., Ntambi, J.M., 2004. Stearoyl-CoA Desaturase 1 Gene Expression Is Necessary for Fructose-mediated Induction of Lipogenic Gene Expression by Sterol Regulatory Element-binding Protein-1c-dependent and -independent Mechanisms. *J. Biol. Chem.* 279, 25164–25171. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402781200>
- Monteiro, R., Azevedo, I., 2010. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators Inflamm.* 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/289645>
- Morrison, M.C., Kleemann, R., 2015. Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Obesity, Insulin Resistance, Type 2 Diabetes, and Associated Hepatic Co-Morbidities: A Comprehensive Review of Human and Rodent Studies. *Front. Immunol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00308>
- Moseti, D., Regassa, A., Kim, W.K., 2016. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. *Int. J. Mol. Sci.* 17. <https://doi.org/10.3390/IJMS17010124>
- Muriel, P., López-sánchez, P., Ramos-tovar, E., 2021. Fructose and the Liver. *Int. J. Mol. Sci.* 22. <https://doi.org/10.3390/IJMS22136969>
- Nagai, Y., Nishio, Y., Nakamura, T., Maegawa, H., Kikkawa, R., Kashiwagi, A., 2002. Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPAR α . *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 282. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00471.2001>
- Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Le Bloc'H, J., Siliart, B., Dumon, H., 2008. Liver lipid metabolism. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 92, 272–283. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0396.2007.00752.X>
- Nieman, L.K., Chanco Turner, M.L., 2006. Addison's disease. *Clin. Dermatol.* 24, 276–280. <https://doi.org/10.1016/J.CLINDERMATOL.2006.04.006>
- Nikolic, I., Vujicic, M., Saksida, T., Berki, T., Stosic-Grujicic, S., Stojanovic, I., 2013. The role of endogenous glucocorticoids in glucose metabolism and immune status of MIF-deficient mice. *Arch. Biol. Sci.* 714, 499–505. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.06.037>
- Nissen, R.M., Yamamoto, K.R., 2000. The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* 14, 2314–2329. <https://doi.org/10.1101/GAD.827900>
- Oakley, R.H., Cidlowski, J.A., 2013. The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 132, 1033–1044. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2013.09.007>
- Obesity and overweight [WWW Document], 2021. URL <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (accessed 2.9.22).
- Ong, J.M., Saffari, B., Simsolo, R.B., Kern, P.A., 1992. Epinephrine inhibits lipoprotein lipase gene expression in rat adipocytes through multiple steps in posttranscriptional processing. *Mol. Endocrinol.* 6, 61–69. <https://doi.org/10.1210/MEND.6.1.1738372>
- Ong, J.P., Elariny, H., Collantes, R., Younoszai, A., Chandhoke, V., Reines, H.D., Goodman, Z., Younossi, Z.M., 2005. Predictors of nonalcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis in morbidly obese patients. *Obes. Surg.* 15, 310–315. <https://doi.org/10.1381/0960892053576820>
- Ouchi, N., Parker, J.L., Lugus, J.J., Walsh, K., 2011. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 85. <https://doi.org/10.1038/NRI2921>

- Pappan, K.L., Pan, Z., Kwon, G., Marshall, C.A., Coleman, T., Goldberg, I.J., McDaniel, M.L., Semenkovich, C.F., 2005. Pancreatic beta-cell lipoprotein lipase independently regulates islet glucose metabolism and normal insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 280, 9023–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409706200>
- Parthasarathy, G., Revelo, X., Malhi, H., 2020. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: An Overview. *Hepatol. Commun.* 4, 478–492. <https://doi.org/10.1002/HEP4.1479>
- Paterson, J.M., Holmes, M.C., Kenyon, C.J., Carter, R., Mullins, J.J., Seckl, J.R., 2007. Liver-selective transgene rescue of hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1-deficient mice. *Endocrinology* 148, 961–966. <https://doi.org/10.1210/EN.2006-0603>
- Paterson, J.M., Morton, N.M., Fievet, C., Kenyon, C.J., Holmes, M.C., Staels, B., Seckl, J.R., Mullins, J.J., 2004. Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 7088–7093. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0305524101>
- Peckett, A.J., Wright, D.C., Riddell, M.C., 2011. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism* 60, 1500–1510. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2011.06.012>
- Pektas, M.B., Koca, H.B., Sadi, G., Akar, F., 2016. Dietary Fructose Activates Insulin Signaling and Inflammation in Adipose Tissue: Modulatory Role of Resveratrol. *Biomed Res. Int.* 2016, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2016/8014252>
- Polyzos, S.A., Kountouras, J., Zavos, C., Deretzi, G., 2011. The potential adverse role of leptin resistance in nonalcoholic fatty liver disease: A hypothesis based on critical review of the literature. *J. Clin. Gastroenterol.* 45, 50–54. <https://doi.org/10.1097/MCG.0B013E3181EC5C66>
- Popkin, B.M., Hawkes, C., 2016. Sweetening of the global diet, particularly beverages: patterns, trends, and policy responses. *lancet. Diabetes Endocrinol.* 4, 174–186. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(15\)00419-2](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(15)00419-2)
- Popkin, B.M., Nielsen, S.J., 2003. The sweetening of the world's diet. *Obes. Res.* 11, 1325–1332. <https://doi.org/10.1038/OBY.2003.179>
- Postic, C., Girard, J., 2008. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: Lessons from genetically engineered mice. *J. Clin. Invest.* <https://doi.org/10.1172/JCI34275>
- Pouliot, M.C., Després, J.P., Lemieux, S., Moorjani, S., Bouchard, C., Tremblay, A., Nadeau, A., Lupien, P.J., 1994. Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *Am. J. Cardiol.* 73, 460–468. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(94\)90676-9](https://doi.org/10.1016/0002-9149(94)90676-9)
- Pratt, W.B., Toft, D.O., 1997. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* 18, 306–360. <https://doi.org/10.1210/EDRV.18.3.0303>
- Qatanani, M., Lazar, M.A., 2007. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev.* 21, 1443–1455. <https://doi.org/10.1101/GAD.1550907>
- Rahimi, L., Rajpal, A., Ismail-Beigi, F., 2020. Glucocorticoid-induced fatty liver disease. *Diabetes, Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* <https://doi.org/10.2147/DMSO.S247379>
- Ramamoorthy, S., Cidlowski, J.A., 2016. Corticosteroids-Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 42, 15. <https://doi.org/10.1016/J.RDC.2015.08.002>

- Rask, E., Olsson, T., Söderberg, S., Andrew, R., Livingstone, D.E.W., Johnson, O., Walker, B.R., 2001. Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 1418–1421. <https://doi.org/10.1210/JCEM.86.3.7453>
- Reddy, J.K., Hashimoto, T., 2001. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu. Rev. Nutr.* 21, 193–230. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NUTR.21.1.193>
- Reddy, J.K., Rao, M.S., 2006. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 290, 852–858. <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00521.2005/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH3004064389002.JPG>
- Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C.M., Kalhan, S.C., Tilghman, S.M., Hanson, R.W., 2003. Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J. Biol. Chem.* 278, 30413–30416. <https://doi.org/10.1074/JBC.R300017200>
- Richard, A.J., White, U., Elks, C.M., Stephens, J.M., 2020. Adipose Tissue: Physiology to Metabolic Dysfunction. *Endotext*.
- Rippe, J.M., Angelopoulos, T.J., 2016. Added sugars and risk factors for obesity, diabetes and heart disease. *Int. J. Obes. (Lond)*. 40 Suppl 1, S22–S27. <https://doi.org/10.1038/IJO.2016.10>
- Rizkalla, S.W., 2010. Health implications of fructose consumption: A review of recent data. *Nutr. Metab. (Lond)*. 7, 82. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-82>
- Röder, P. V., Wu, B., Liu, Y., Han, W., 2016. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp. Mol. Med.* 48, e219. <https://doi.org/10.1038/EMM.2016.6>
- Roger, T., Chanson, A.L., Knaup-Reymond, M., Calandra, T., 2005. Macrophage migration inhibitory factor promotes innate immune responses by suppressing glucocorticoid-induced expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *Eur. J. Immunol.* 35, 3405–3413. <https://doi.org/10.1002/EJI.200535413>
- Roger, T., David, J., Glauser, M.P., Calandra, T., 2001. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature* 414, 920–924. <https://doi.org/10.1038/414920A>
- Ronald Kahn, C., 1978. Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. *Metabolism.* 27, 1893–1902. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(78\)80007-9](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(78)80007-9)
- Rosen, E.D., Walkey, C.J., Puigserver, P., Spiegelman, B.M., 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 14, 1293–1307. <https://doi.org/10.1101/GAD.14.11.1293>
- Roskams, T., Yang, S.Q., Koteish, A., Durnez, A., DeVos, R., Huang, X., Achten, R., Verslype, C., Diehl, A.M., 2003. Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Am. J. Pathol.* 163, 1301–1311. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63489-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63489-X)
- Rosso, C., Kazankov, K., Younes, R., Esmaili, S., Marietti, M., Sacco, M., Carli, F., Gaggini, M., Salomone, F., Møller, H.J., Abate, M.L., Vilstrup, H., Gastaldelli, A., George, J., Grønbæk, H., Bugianesi, E., 2019. Crosstalk between adipose tissue insulin resistance and liver macrophages in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 71, 1012–1021. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2019.06.031>
- Russo, S., Kwiatkowski, M., Govorukhina, N., Bischoff, R., Melgert, B.N., 2021. Meta-Inflammation and Metabolic Reprogramming of Macrophages in Diabetes and Obesity: The Importance of Metabolites. *Front. Immunol.* 12, 4656. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.746151/BIBTEX>

- Safaei, M., Sundararajan, E.A., Driss, M., Boulila, W., Shapi'i, A., 2021. A systematic literature review on obesity: Understanding the causes & consequences of obesity and reviewing various machine learning approaches used to predict obesity. *Comput. Biol. Med.* 136, 104754. <https://doi.org/10.1016/J.COMPBIOMED.2021.104754>
- Sakaue, S., Nishihira, J., Hirokawa, J., Yoshimura, H., Honda, T., Aoki, K., Tagami, S., Kawakami, Y., 1999. Regulation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression by glucose and insulin in adipocytes in vitro. 5. <https://doi.org/10.1007/bf03402125>
- Saksida, T., Stošić-Grujičić, S., Stojanović, I., 2013. The role of macrophage migration inhibitory factor in obesity-associated type 2 diabetes in mice. *Arch. Biol. Sci.* 65, 499–506. <https://doi.org/10.2298/ABS1302499S>
- Saksida, T., Stosic-Grujicic, S., Timotijevic, G., Sandler, S., Stojanovic, I., 2012. Macrophage migration inhibitory factor deficiency protects pancreatic islets from palmitic acid-induced apoptosis. *Immunol. Cell Biol.* 90, 688–698. <https://doi.org/10.1038/icb.2011.89>
- Sánchez-Lozada, L.G., Tapia, E., Jiménez, A., Bautista, P., Cristóbal, M., Nepomuceno, T., Soto, V., Ávila-Casado, C., Nakagawa, T., Johnson, R.J., Herrera-Acosta, J., Franco, M., 2007. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 292. <https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.00124.2006>
- Sánchez-Zamora, Y.I., Rodríguez-Sosa, M., 2014. The role of MIF in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J. Diabetes Res.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/804519>
- Sanders, F.W.B., Griffin, J.L., 2016. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 91, 452. <https://doi.org/10.1111/BRV.12178>
- Sangüesa, G., Roglans, N., Laguna, J.C., Alegret, M., 2019. Liquid fructose and liver insulin signaling: Molecular mechanisms controlling hepatic steatosis, in: *Molecular Nutrition: Carbohydrates*. Elsevier, pp. 149–172. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-849886-6.00004-5>
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munck, A.U., 2000. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. *Endocr. Rev.* 21, 55–89. <https://doi.org/10.1210/EDRV.21.1.0389>
- Saponaro, C., Gaggini, M., Carli, F., Gastaldelli, A., 2015. The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis. *Nutr.* 2015, Vol. 7, Pages 9453-9474 7, 9453–9474. <https://doi.org/10.3390/NU7115475>
- Sato, K., Marzioni, M., Meng, F., Francis, H., Glaser, S., Alpini, G., 2019. Ductular Reaction in Liver Diseases: Pathological Mechanisms and Translational Significances. *Hepatology* 69, 420–430. <https://doi.org/10.1002/hep.30150>
- Schaefer, E.J., Gleason, J.A., Dansinger, M.L., 2009. Dietary Fructose and Glucose Differentially Affect Lipid and Glucose Homeostasis. *J. Nutr.* 139, 1257S-1262S. <https://doi.org/10.3945/JN.108.098186>
- Seckl, J.R., 2004. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: changing glucocorticoid action. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4, 597–602. <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2004.09.001>
- Seckl, J.R., Morton, N.M., Chapman, K.E., Walker, B.R., 2004. Glucocorticoids and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in adipose tissue. *Recent Prog. Horm. Res.* 59, 359–93.
- Semenkovich, C.F., Wims, M., Noe, L., Etienne, J., Chan, L., 1989. Insulin Regulation of Lipoprotein Lipase Activity in 3T3-L1 Adipocytes is Mediated at Posttranscriptional and Posttranslational Levels. *J. Biol. Chem.* 264, 9030–9038. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)81898-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)81898-1)

- Serre-Beinier, V., Toso, C., Morel, P., Gonelle-Gispert, C., Veyrat-Durebex, C., Rohner-Jeanrenaud, F., Calandra, T., Roger, T., James, R.W., Montet, X., Bühler, L., Bosco, D., Berney, T., 2010. Macrophage migration inhibitory factor deficiency leads to age-dependent impairment of glucose homeostasis in mice. *J. Endocrinol.* 206, 297–306. <https://doi.org/10.1677/JOE-09-0342>
- Shen, Y., Roh, H.C., Kumari, M., Rosen, E.D., 2017. Adipocyte glucocorticoid receptor is important in lipolysis and insulin resistance due to exogenous steroids, but not insulin resistance caused by high fat feeding. *Mol. Metab.* 6, 1150–1160. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMET.2017.06.013>
- Shi, J., Fan, J., Su, Q., Yang, Z., 2019. Cytokines and Abnormal Glucose and Lipid Metabolism. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00703>
- Shibli-Rahhal, A., Van Beek, M., Schlechte, J.A., 2006. Cushing's syndrome. *Clin. Dermatol.* 24, 260–265. <https://doi.org/10.1016/J.CLINDERMATOL.2006.04.012>
- Shuster, A., Atlas, M., Pinthus, J.H., Mourtzakis, M., 2012. The clinical importance of visceral adiposity: a critical review of methods for visceral adipose tissue analysis. *Br. J. Radiol.* 85, 1. <https://doi.org/10.1259/BJR/38447238>
- Simons, D., Grieb, G., Hristov, M., Pallua, N., Weber, C., Bernhagen, J., Steffens, G., 2011. Hypoxia-induced endothelial secretion of macrophage migration inhibitory factor and role in endothelial progenitor cell recruitment. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 668–678. <https://doi.org/10.1111/J.1582-4934.2010.01041.X>
- Skurk, T., Herder, C., Kräfft, I., Müller-Scholze, S., Hauner, H., Kolb, H., 2005. Production and Release of Macrophage Migration Inhibitory Factor from Human Adipocytes. *Endocrinology* 146, 1006–1011. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0924>
- Softic, S., Meyer, J.G., Wang, G.X., Gupta, M.K., Batista, T.M., Lauritzen, H.P.M.M., Fujisaka, S., Serra, D., Herrero, L., Willoughby, J., Fitzgerald, K., Ilkayeva, O., Newgard, C.B., Gibson, B.W., Schilling, B., Cohen, D.E., Kahn, C.R., 2019. Dietary Sugars Alter Hepatic Fatty Acid Oxidation via Transcriptional and Post-translational Modifications of Mitochondrial Proteins. *Cell Metab.* 30, 735-753.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.09.003>
- Song, Z., Xiaoli, A.M., Yang, F., 2018. Regulation and Metabolic Significance of De Novo Lipogenesis in Adipose Tissues. *Nutrients* 10. <https://doi.org/10.3390/NU10101383>
- Staab, C.A., Maser, E., 2010. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is an important regulator at the interface of obesity and inflammation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 119, 56–72. <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2009.12.013>
- Stanhope, K.L., Havel, P.J., 2008. Fructose consumption: potential mechanisms for its effects to increase visceral adiposity and induce dyslipidemia and insulin resistance. *Curr. Opin. Lipidol.* 19, 16–24. <https://doi.org/10.1097/MOL.0B013E3282F2B24A>
- Stanhope, K.L., Schwarz, J.M., Keim, N.L., Griffen, S.C., Bremer, A.A., Graham, J.L., Hatcher, B., Cox, C.L., Dyachenko, A., Zhang, W., McGahan, J.P., Seibert, A., Krauss, R.M., Chiu, S., Schaefer, E.J., Ai, M., Otokoza, S., Nakajima, K., Nakano, T., Beysen, C., Hellerstein, M.K., Berglund, L., Havel, P.J., 2009. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J. Clin. Invest.* 119, 1322–1334. <https://doi.org/10.1172/JCI37385>
- Stern, J.H., Rutkowski, J.M., Scherer, P.E., 2016. Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis Through Adipose Tissue Crosstalk. *Cell Metab.* 23, 770. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2016.04.011>

- Stimson, R.H., Anderson, A.J., Ramage, L.E., Macfarlane, D.P., de Beaux, A.C., Mole, D.J., Andrew, R., Walker, B.R., 2017. Acute physiological effects of glucocorticoids on fuel metabolism in humans are permissive but not direct. *Diabetes. Obes. Metab.* 19, 883. <https://doi.org/10.1111/DOM.12899>
- Stojanovic, I., Saksida, T., Nikolic, I., Nicoletti, F., Stosic-Grujicic, S., 2012. Macrophage migration inhibitory factor deficiency protects pancreatic islets from cytokine-induced apoptosis in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* 169, 156–163. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2249.2012.04607.X>
- Strable, M.S., Ntambi, J.M., 2010. Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 45, 199–214. <https://doi.org/10.3109/10409231003667500>
- Sugimoto, H., Suzuki, M., Nakagawa, A., Tanaka, I., Nishihira, J., 1996. Crystal structure of macrophage migration inhibitory factor from human lymphocyte at 2.1 Å resolution. *FEBS Lett.* 389, 145–148. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00553-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00553-4)
- Suzuki, M., Sugimoto, H., Nakagawa, A., Tanaka, I., Nishihira, J., Sakai, M., 1996. Crystal structure of the macrophage migration inhibitory factor from rat liver. *Nat. Struct. Biol.* 1996 33 3, 259–266. <https://doi.org/10.1038/nsb0396-259>
- Swantek, J.L., Cobb, M.H., Geppert, T.D., 1997. Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6274–6282. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.11.6274>
- Tamayo, T., Christian, H., Rathmann, W., 2010. Impact of early psychosocial factors (childhood socioeconomic factors and adversities) on future risk of type 2 diabetes, metabolic disturbances and obesity: a systematic review. *BMC Public Health* 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-10-525>
- Tanaka, M., Miyajima, A., 2016. Liver regeneration and fibrosis after inflammation. *Inflamm. Regen.* 36, 1–6. <https://doi.org/10.1186/S41232-016-0025-2/FIGURES/2>
- Tappy, L., 2018. Fructose-containing caloric sweeteners as a cause of obesity and metabolic disorders. *J. Exp. Biol.* 121. <https://doi.org/10.1242/JEB.164202/33975>
- Tappy, L., Le, K.-A., 2010. Metabolic Effects of Fructose and the Worldwide Increase in Obesity. *Physiol. Rev.* 90, 23–46. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2009>
- Targher, G., Bertolini, L., Rodella, S., Zoppini, G., Lippi, G., Day, C., Muggeo, M., 2008. Non-alcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased prevalence of chronic kidney disease and proliferative/laser-treated retinopathy in type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 51, 444–450. <https://doi.org/10.1007/S00125-007-0897-4/TABLES/2>
- Taskinen, M.R., Packard, C.J., Borén, J., 2019. Dietary Fructose and the Metabolic Syndrome. *Nutrients* 11. <https://doi.org/10.3390/NU11091987>
- Tchernof, A., Després, J.P., 2013. Pathophysiology of human visceral obesity: An update. *Physiol. Rev.* 93, 359–404. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00033.2011/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0011326460008.JPEG>

- Teratani, T., Tomita, K., Furuhashi, H., Sugihara, N., Higashiyama, M., Nishikawa, M., Irie, R., Takajo, T., Wada, A., Horiuchi, K., Inaba, K., Hanawa, Y., Shibuya, N., Okada, Y., Kurihara, C., Nishii, S., Mizoguchi, A., Hozumi, H., Watanabe, C., Komoto, S., Nagao, S., Yamamoto, J., Miura, S., Hokari, R., Kanai, T., 2019. Lipoprotein Lipase Up-regulation in Hepatic Stellate Cells Exacerbates Liver Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice. *Hepatol. Commun.* 3, 1098–1112. <https://doi.org/10.1002/hep4.1383>
- Tilg, H., Moschen, A.R., 2008. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol. Med.* <https://doi.org/10.2119/2007-00119.Tilg>
- Tilg, H., Moschen, A.R., 2006. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2006 610 6, 772–783. <https://doi.org/10.1038/nri1937>
- Tilg, H., Moschen, A.R., Szabo, G., 2016. Interleukin-1 and inflammasomes in alcoholic liver disease/acute alcoholic hepatitis and nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* <https://doi.org/10.1002/hep.28456>
- Tillman, E.J., Morgan, D.A., Rahmouni, K., Swoap, S.J., Bray, G., Nielsen, S., Popkin, B., Bray, G., Duffey, K., Popkin, B., Tappy, L., Le, K., Havel, P., Denova-Gutierrez, E., Jimenez-Aguilar, A., Halley-Castillo, E., Huitron-Bravo, G., Talavera, J., Bremer, A., Auinger, P., Byrd, R., Ludwig, D., Peterson, K., Gortmaker, S., Stanhope, K., Schwarz, J., Keim, N., Griffen, S., Bremer, A., Bocarsly, M., Powell, E., Avena, N., Hoebel, B., Ma, X., Zubcevic, L., Ashcroft, F., Cha, S., Wolfgang, M., Tokutake, Y., Chohnan, S., Lane, M., Schaefer, E., Gleason, J., Dansinger, M., Page, K., Chan, O., Arora, J., Belfort-Deaguiar, R., Dzuira, J., Shapiro, A., Mu, W., Roncal, C., Cheng, K., Johnson, R., Balthasar, N., Coppari, R., McMinn, J., Liu, S., Lee, C., Cowley, M., Smart, J., Rubinstein, M., Cerdan, M., Diano, S., Sahu, A., Friedman, J., Halaas, J., Erickson, J., Hollopeter, G., Palmiter, R., Ernst, M., Wunderlich, C., Hess, S., Paehler, M., Mesaros, A., El-Haschimi, K., Pierroz, D., Hileman, S., Bjorbaek, C., Flier, J., Lin, S., Thomas, T., Storlien, L., Huang, X., VanHeek, M., Compton, D., France, C., Tedesco, R., Fawzi, A., Zhang, Y., Scarpace, P., Huang, B., Chiang, M., Yao, H., Chiang, W., Shapiro, A., Tumer, N., Gao, Y., Cheng, K., Scarpace, P., Cummings, B., Stanhope, K., Graham, J., Evans, J., Baskin, D., D'Angelo, G., Elmarakby, A., Pollock, D., Stepp, D., Haring, S., Harris, R., Meyer, C., Elvert, R., Scherag, A., Ehrhardt, N., Gailus-Durner, V., Rikke, B., Yerg, J., Battaglia, M., Nagy, T., Allison, D., Bryant, C., Zhang, N., Sokoloff, G., Fanselow, M., Ennes, H., Chang, H.-Y., Mitzner, W., Watson, J., Müller, C., Gröticke, I., Hoffmann, K., Schughart, K., Löscher, W., Juergens, H., Haass, W., Thoene-Reineke, C., Castaneda, T., Spranger, J., Shafrir, E., Michaelis, O., Ellwood, K., Judge, J., Schoene, N., Hansen, C., Schemmel, R., Teague, R., Bray, G., Ushio, M., Nishio, Y., Sekine, O., Nagai, Y., Maeno, Y., Harrington, S., Le, K., Faeh, D., Stettler, R., Ith, M., Kreis, R., Ishimoto, T., Lanaspá, M., Le, M., Garcia, G., Diggle, C., Jurgens, H., Haass, W., Castaneda, TR, Schurmann, A., Koebnick, C., Lane, M., Cha, S., Welle, S., Lilavivat, U., Campbell, R., Gordon, C., Banks, W., Coon, A., Robinson, S., Moinuddin, A., Shultz, J., Attig, L., Gabory, A., Junien, C., DeBosch, B., Chen, Z., Finck, B., Chi, M., Moley, K., 2014. Three Months of High-Fructose Feeding Fails to Induce Excessive Weight Gain or Leptin Resistance in Mice. *PLoS One* 9, e107206. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107206>
- Timmermans, S., Souffriau, J., Libert, C., 2019. A general introduction to glucocorticoid biology. *Front. Immunol.* 10, 1545. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.01545/BIBTEX>
- Toh, M.-L., Aeberli, D., Lacey, D., Yang, Y., Santos, L.L., Clarkson, M., Sharma, L., Clyne, C., Morand, E.F., 2006. Regulation of IL-1 and TNF receptor expression and function by endogenous macrophage migration inhibitory factor. *J. Immunol.* 177, 4818–4825. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.177.7.4818>

- Tomlinson, J.J., Boudreau, A., Wu, D., Atlas, E., Haché, R.J.G., 2006. Modulation of Early Human Preadipocyte Differentiation by Glucocorticoids. *Endocrinology* 147, 5284–5293. <https://doi.org/10.1210/EN.2006-0267>
- Tomlinson, J.W., Finney, J., Gay, C., Hughes, B.A., Hughes, S. V., Stewart, P.M., 2008. Impaired glucose tolerance and insulin resistance are associated with increased adipose 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and elevated hepatic 5alpha-reductase activity. *Diabetes* 57, 2652–2660. <https://doi.org/10.2337/DB08-0495>
- Toso, C., Emamaullee, J.A., Merani, S., Shapiro, A.M.J., 2008. The role of macrophage migration inhibitory factor on glucose metabolism and diabetes. *Diabetologia* 51, 1937–1946. <https://doi.org/10.1007/S00125-008-1063-3>
- Trites, M.J., Clugston, R.D., 2019. The role of adipose triglyceride lipase in lipid and glucose homeostasis: Lessons from transgenic mice. *Lipids Health Dis.* 18, 1–9. <https://doi.org/10.1186/S12944-019-1151-Z/TABLES/2>
- Vazquez Prieto, M.A., Bettaieb, A., Rodriguez Lanzi, C., Soto, V.C., Perdicaro, D.J., Galmarini, C.R., Haj, F.G., Miatello, R.M., Oteiza, P.I., 2015. Catechin and quercetin attenuate adipose inflammation in fructose-fed rats and 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 622–33. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400631>
- Vega, R.B., Huss, J.M., Kelly, D.P., 2000. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1868–1876. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.5.1868-1876.2000>
- Vegiopoulos, A., Herzig, S., 2007. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol. Cell. Endocrinol.* 275, 43–61. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2007.05.015>
- Veličković, N., Djordjevic, A., Vasiljević, A., Bursać, B., Milutinović, D.V., Matić, G., 2013. Tissue-specific regulation of inflammation by macrophage migration inhibitory factor and glucocorticoids in fructose-fed Wistar rats. *Br. J. Nutr.* 110, 456–465. <https://doi.org/10.1017/S0007114512005193>
- Verschuren, L., Kooistra, T., Bernhagen, J., Voshol, P.J., Ouwens, D.M., van Erk, M., de Vries-van der Weij, J., Leng, L., van Bockel, J.H., van Dijk, K.W., Fingerle-Rowson, G., Bucala, R., Kleemann, R., 2009. MIF deficiency reduces chronic inflammation in white adipose tissue and impairs the development of insulin resistance, glucose intolerance, and associated atherosclerotic disease. *Circ. Res.* 105, 99–107. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.199166>
- Vidal-Puig, A.J., Considine, R. V., Jimenez-Liñan, M., Werman, A., Pories, W.J., Caro, J.F., Flier, J.S., 1997. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J. Clin. Invest.* 99, 2416. <https://doi.org/10.1172/JCI119424>
- Vujicic, M., Senerovic, L., Nikolic, I., Saksida, T., Stosic-Grujicic, S., Stojanovic, I., 2014. The critical role of macrophage migration inhibitory factor in insulin activity. *Cytokine* 69, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.05.013>
- Waeber, G., Calandra, T., Roduit, R., Haefliger, J.A., Bonny, C., Thompson, N., Thorens, B., Temler, E., Meinhardt, A., Bacher, M., Metz, C.N., Nicod, P., Bucala, R., 1997. Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4782–7.
- Walker, B.R., 2006. Cortisol?cause and cure for metabolic syndrome? *Diabet. Med.* 23, 1281–1288. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2006.01998.x>

- Walker, E.A., Stewart, P.M., 2003. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: unexpected connections. *Trends Endocrinol. Metab.* 14, 334–339. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(03\)00134-6](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(03)00134-6)
- Wallace, M., Metallo, C.M., 2020. Tracing insights into de novo lipogenesis in liver and adipose tissues. *Semin. Cell Dev. Biol.* 108, 65–71. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2020.02.012>
- Wang, M., 2005. The role of glucocorticoid action in the pathophysiology of the Metabolic Syndrome. *Nutr. Metab. (Lond)*. 2, 3. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-2-3>
- Wang, Y., Davidow, L., Arvanites, A.C., Blanchard, J., Lam, K., Xu, K., Oza, V., Yoo, J.W., Ng, J.M.Y., Curran, T., Rubin, L.L., McMahon, A.P., 2012. Glucocorticoid compounds modify smoothed localization and hedgehog pathway activity. *Chem. Biol.* 19, 972–82. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.06.012>
- Wang, Y., Viscarra, J., Kim, S.J., Sul, H.S., 2015. Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2015 1611 16, 678–689. <https://doi.org/10.1038/nrm4074>
- Weikum, E.R., Knuesel, M.T., Ortlund, E.A., Yamamoto, K.R., 2017. Glucocorticoid receptor control of transcription: precision and plasticity via allostery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017 183 18, 159–174. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.152>
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., Ferrante, A.W., 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112, 1796–1808. <https://doi.org/10.1172/JCI19246>
- Weiser, W.Y., Temple, P.A., Witek-Giannotti, J.S., Remold, H.G., Clark, S.C., David, J.R., 1989. Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 7522–7526. <https://doi.org/10.1073/PNAS.86.19.7522>
- Wilcox, G., 2005. Insulin and Insulin Resistance. *Clin. Biochem. Rev.* 26, 19.
- Woods, A., Williams, J.R., Muckett, P.J., Mayer, F. V., Liljevald, M., Bohlooly-Y, M., Carling, D., 2017. Liver-Specific Activation of AMPK Prevents Steatosis on a High-Fructose Diet. *Cell Rep.* 18, 3043–3051. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.011>
- Xiong, J., 2018. Fatty Acid Oxidation in Cell Fate Determination. *Trends Biochem. Sci.* 43, 854–857. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2018.04.006>
- Xiong, Y., Collins, Q.F., An, J., Lupo, E., Liu, H.Y., Liu, D., Robidoux, J., Liu, Z., Cao, W., 2007. p38 mitogen-activated protein kinase plays an inhibitory role in hepatic lipogenesis. *J. Biol. Chem.* 282, 4975–4982. <https://doi.org/10.1074/JBC.M606742200>
- Xu, C., He, J., Jiang, H., Zu, L., Zhai, W., Pu, S., Xu, G., 2009. Direct Effect of Glucocorticoids on Lipolysis in Adipocytes. *Mol. Endocrinol.* 23, 1161. <https://doi.org/10.1210/ME.2008-0464>
- Yang-Yen, H.F., Chambard, J.C., Sun, Y.L., Smeal, T., Schmidt, T.J., Drouin, J., Karin, M., 1990. Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62, 1205–1215. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90396-V](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90396-V)
- Yang, H., Deng, Q., Ni, T., Liu, Y., Lu, L., Dai, H., Wang, H., Yang, W., 2021. Targeted Inhibition of LPL/FABP4/CPT1 fatty acid metabolic axis can effectively prevent the progression of nonalcoholic steatohepatitis to liver cancer. *Int. J. Biol. Sci.* 17, 4207. <https://doi.org/10.7150/IJBS.64714>
- Ye, D. wei, Rong, X. lu, Xu, A. min, Guo, J., 2017. Liver-adipose tissue crosstalk: A key player in the pathogenesis of glucolipid metabolic disease. *Chinese J. Integr. Med.* 2017 236 23, 410–414. <https://doi.org/10.1007/S11655-017-2810-4>

- Ye, J., 2013. Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Front. Med.* 7, 14. <https://doi.org/10.1007/S11684-013-0262-6>
- Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, T.O., Kohlwein, S.D., Haemmerle, G., Lass, A., Madeo, F., 2012. FAT SIGNALS - Lipases and Lipolysis in Lipid Metabolism and Signaling. *Cell Metab.* 15, 279. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2011.12.018>
- Zhao, P., Saltiel, A.R., 2020. From overnutrition to liver injury: AMP-activated protein kinase in nonalcoholic fatty liver diseases. *J. Biol. Chem.* 295, 12279–12289. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.011356>
- Zheng, Y.J., Pan, M.X., Wang, Y., 2018. [Clinical significance and correlation of ductular reaction in hepatobiliary diseases]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 26, 637–640. <https://doi.org/10.3760/CMA.J.ISSN.1007-3418.2018.08.017>

8. PRILOZI

Biografija autora

Ljupka (Nikola) Gligorovska je rođena 01. juna 1985. godine u Beogradu, Republika Srbija. Osnovnu školu je završila u Lajkovcu, dok je 2004. godine završila V beogradsku gimnaziju kao dobitnik Vukove diplome. Iste godine je upisala studije na smeru Molekularna biologija i fiziologija na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Studije je završila 2014. godine sa prosečnom ocenom 9.1. Diplomski rad iz oblasti Imunologije pod nazivom „Imunomodulatorni efekti etil-piruvata na makrofage izolovane iz kostne srži“ uradila je na Odeljenju za imunologiju na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, pod mentorstvom dr Đorđa Miljkovića. Iste godine je započela doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na modulu Molekularna biologija eukariota. Od 2015. godine je zaposlena na Odeljenju za biohemiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Doktorsku tezu je radila pod rukovodstvom dr Ane Đorđević, u okviru projekta „Uloga steroidnih hormona u neuroendokrinoj adaptaciji na stres i patofiziologiji metaboličkog sindroma - molekularni mehanizmi i kliničke implikacije“, koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Zvanje istraživač saradnik je stekla 2017. godine.

Dobitnica je stipendije *European Society of Endocrinology* za učešće na Programu za mlade naučnike u okviru 27. FAOBMB i 44. MSBMB konferencije, koja se održala 2019. godine u Kuala Lumpuru u Maleziji. Dodatno, 2020. godine dobila je nagradu za najbolji poster prezentovan na NutRedOx COST akciji održanoj u Beogradu u Srbiji.

Ljupka Gligorovska je u dosadašnjem radu objavila 8 radova u časopisima međunarodnog značaja, od kojih 2 kao prvi autor. Autor/koautor je brojnih saopštenja sa domaćih i međunarodnih skupova.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: **Љупка Глигоровска**

Број индекса: **М3012/2014**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

„Метаболизам липида и сигнални пут глукокортикоида у висцералном масном ткиву и јетри *Mif* ^{-/-} мишева на режиму исхране обогаћене фруктозом“

- 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, _____

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора: **Љупка Глигоровска**

Број индекса: **M3012/2014**

Студијски програм: **Молекуларна биологија (модул Молекуларна биологија еукариота)**

Наслов рада: **„Метаболизам липида и сигнални пут глукокортикоида у висцералном масном ткиву и јетри *Mif*^{-/-} мишева на режиму исхране обогаћене фруктозом“**

Ментор: **др Ана Ђорђевић, научни саветник**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму 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, _____

Изјава о коришћењу

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

„Метаболизам липида и сигнални пут глукокортикоида у висцералном масном ткиву и јетри *Mif* ^{-/-} мишева на режиму исхране обогаћене фруктозом“

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве)

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. **Ауторство** - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство - некомерцијално** – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство - некомерцијално** – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прераде.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство - делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.