

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Milica M. Vučetić

**MOLEKULSKI MEHANIZMI
METABOLIČKE REGULACIJE U
HIBERNACIJI I TOKOM AKLIMACIJE
NA HLADNOĆU KOD TEKUNICE
(*Spermophilus citellus*)**

doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Milica M. Vučetić

**MOLECULAR MECHANISMS
OF METABOLIC REGULATION
IN HIBERNATION AND DURING COLD-
ACCLIMATION IN
EUROPEAN GROUND SQUIRREL
(*Spermophilus citellus*)**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE:

MENTORI:

dr Bato Korać

vanredni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu

dr Biljana Buzadžić

naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Aleksandra Korać

redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Vesna Otašević

viši naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu

dr Kenneth B. Storey

redovni profesor, Odeljenje za biologiju i hemiju, Karlton Univerzitet, Otava

DATUM ODBRANE:

*Šta je čovjek, a mora biti čovjek!
Tvarca jedna te je zemlja vara,
a za njega, vidi, nije zemlja.
Je li javje od sna smućenije?
Ime česno zasluži li na njoj,
on je ima rašta polaziti;
a bez njega - u šta tada spada?*

P.P. Njegoš

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija urađena je u Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta #173055 „Belo ili/i mrko: značaj masnog tkiva u održanju ukupne redoks zavisne metaboličke kontrole u fiziološkim adaptacijama i metaboličkim poremećajima“, koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Ovom prilikom želim da se zahvalim:

Prof. dr Batu Koraću, mentoru, na ukazanom povjerenju, savjetima, pruženoj pomoći i podršci tokom izrade i pisanja doktorske disertacije. Hvala na pruženim uslovima i obezbjeđenim sredstvima bez kojih ne bi bilo ove teze. Posebnu zahvalnost dugujem za naučeno tokom predavanja iz Biohemije i Fiziologije na osnovnim studijama.

Dr Biljani Buzadžić na prenesenom iskustvu, pomoći, sugestijama i savjetima tokom izrade doktorske disertacije, kao i na brojnim životnim savjetima.

Prof. dr Aleksandri Korać na nesebičnoj pomoći i savjetima, kao i na konstruktivnim smjernicama tokom izrade i uobličavanja ove teze.

Dr Vesni Otašević na kritičkoj analizi i ocjeni ove teze, a posebno na prijateljstvu i ogromnoj pomoći, podršci i razumijevanju na samom početku mog istraživačkog rada, kada mi je to bilo najpotrebnije. Hvala i za sve ono što je uslijedilo nakon toga.

Prof. dr Kenneth Storey na saradnji, korisnim savjetima i pomoći tokom pisanja ove teze.

Dr Ani Stančić i Dr Aleksandri Janković na svemu... Pomoći tokom eksperimentalnog rada, pisanja radova, prijateljstvu, razumijevanju, strpljenju i svemu drugom što čini život. Da vas nema, ništa ne bi bilo isto.

Dr Milici Markelić i Dr Kseniji Veličković na svesrdnoj i nesebičnoj pomoći i ljudskoj riječi tokom svih ovih godina.

Igoru, Maji i Aniti na pomoći tokom izrade eksperimentalnog dijela teze.

Mariji i Jeleni... što postojite. Danijeli na uvijek iskrenom prijateljstvu i razumijevanju.

I što bi englezi rekli „last, but not least“, beskrajnu zahvalnost dugujem BRATU i RODITELJIMA... „Uvijek postoji neko ko nas čeka na kraju puta, na kraju dana, na kraju svega... uvijek. Uvijek postoji neko ko nas voli baš takve kakvi jesmo.“

MOLEKULSKI MEHANIZMI METABOLIČKE REGULACIJE U HIBERNACIJI I TOKOM AKLIMACIJE NA HLADNOĆU KOD TEKUNICE (*Spermophilus citellus*)

REZIME

Fenomen hibernacije predstavlja fascinantan primer plastičnosti kod sisara. Hibernirajući sisari podliježu složenom nizu biohemijskih, fizioloških i bihevioralnih promjena u odgovoru na senzorske energetski-zahtijevne periode kuplovane sa redukovanom dostupnošću hrane. Cilj disertacije je da se ispituju promjene ćelijskog metabolizma u tkivima i organima tekunica, ključnim za održanje ukupne energetske homeostaze - mrko i bijelo masno tkivo (*engl.* brown adipose tissue, BAT i white adipose tissue, WAT), mišići i jetra, tokom perioda aklimacije na nisku temperaturu, kao i u fazi hibernacije.

Efekat aklimacije/hibernacije na metaboličko remodeliranje u tkivima i organima tekunica praćen je određivanjem: mitohondrijalnog kapaciteta (genska i/ili proteinska ekspresije komponenti respiratornog lanca i ATP sintaze); termogenog kapaciteta (ekspresija dekaplirajućeg proteina 1); ekspresionih profila enzima ključnih metaboličkih puteva: glikolize, β -oksidacije, Krebsovog ciklusa, metabolizama triacilglicerola i glikogena. Ispitivani su i transkripcioni faktori uključeni u metaboličku regulaciju, kao i enzimi antioksidativne odbrane. Takođe, ispitivane su promjene u BAT i depozima WAT na strukturnom i ultrastrukturnom nivou.

Mušjaci evropske tekunice *Spermophilus citellus* su početkom septembra podijeljeni u dvije grupe: kontrolnu, koja je boravila na sobnoj temperaturi (22 ± 1 °C) i grupu aklimiranu na nisku temperaturu (4 ± 1 °C). Aktivne, euterične tekunice, koje nisu ušle u duboku hibernaciju tokom aklimacije, žrtvovane su nakon 1, 3, 7, 12, odnosno 21 dan. Tekunice koje su ušle u hibernaciju žrtvovane su nakon 2-5 dana trajanja hibernacije (kontinuirana rektalna temperatura 4 °C). BAT, subkutano, retroperitonealno i epididimalno WAT (sWAT, rWAT i eWAT), skeletni mišić (*musculus quadriceps*) i jetra su uzorkovani odmah po žrtvovanju. Kako bi se ispitali mehanizmi metaboličke regulacije u BAT, specifični za hibernatore, paralelno je rađena komparativna studija aklimacije pacova na nisku temperaturu.

Rezultati pokazuju da je, prilikom izlaganja hibernirajućih životinja niskoj temperaturi, ćelijski metabolizam u svim ispitivanim tkivima/organima inicijalno podređen održanju eutermije, tj. termogenom procesu koji se odvija u skeletnim mišićima i BAT. U ranom periodu izlaganja hladnoći, u skeletnim mišićima i BAT, dolazi do indukcije termogeneze (drhteće i nedrhteće), koja je metabolički podržana razlaganjem šećera. Međutim, produkcija toplote u oba termogena organa asocirana je sa energetske disbalansom, koji je tokom produžene aklimacije najvjerovatnije odgovoran za supresiju puteva potrošnje energije (primarno termogeneze) i pripremu tkunika za ulazak u stanje hipotermije/hipometabolizma. Najveći dio goriva za termogenezu, u ranoj fazi aklimacije, obezbijeduje se iz visceralnih depoa WAT (posebno eWAT), u kojima je detektovano smanjenje površine adipocitnog profila, usled intenzivne lipolize. Kasnije tokom izlaganja hladnoći, kada se termogeni kapacitet BAT suprimira, u sva tri ispitivana depoa WAT indukovana je aktivnost AMP-aktivirane protein kinase (AMPK), „blokirana” lipoliza i putevi potrošnje energije, a stimulisan oksidativni metabolizam. Jetra tokom aklimacije ima centralno mjesto koordinacije lipidnog i ugljenohidratnog metabolizma.

Rezultati disertacije pokazuju da je u fazi duboke hibernacije termogeni kapacitet BAT i skeletnih mišića značajno suprimiran. Takođe, hipoksija-inducibilni factor-1 (HIF-1) ima centralnu ulogu u metaboličkom remodeliranju termogenih organa u fazi hibernacije. Osim suprimiranja energetske zahtijevnih termogenih procesa, HIF-1 u uslovima hipometabolizma ima ulogu i u regulaciji, tj. indukciji glikolitičkog puta, važne komponente energetske homeostaze tokom hibernacije. Slično reprogramiranje metabolizma dešava se i u visceralnim depoima WAT. Jetra u hibernaciji ostvaruje veoma sličnu metaboličku strategiju kao pri uslovima gladovanja: indukcija katabolizma lipida i supresija razlaganja glukoze, uz istovremenu indukciju glukoneogeneze.

Rezultati disertacije ukazuju da je u hibernaciji kapacitet za oksidaciju lipida povećan u svim ispitivanim tkivima/organima, osim u visceralnim depoima WAT. U BAT, intenziviranje puteva oksidacije masnih kiselina primarno služi održanju neophodnog nivoa termogeneze, dok je u skeletnim mišićima i jetri povezano sa adaptacijom na hipotermične/hipometaboličke uslove hibernacije. Uočljiv manji stepen interorganske komunikacije kada je lipidni metabolizam u pitanju, sugerise da se tokom hibernacije uspostavlja određeni stepen tkivne autonomnosti.

Generalno se može zaključiti da karakteristično tkivno-zavisno remodelovanje energetskeg metabolizma predstavlja centralnu osovinu i uslov fiziološke plastičnosti

hibernatora koja im omogućava brojne prednosti u odnosu na nehibernirajuće srodnike i preživljavanje u nepovoljnim uslovima sredine, bilo da su aktivni i eutermični ili letargični i hipotemični.

KLJUČNE RIJEČI: tekunica, hibernacija, energetski metabolizam, aklimacija na hladnoću, transkripciona regulacija, antioksidativna odbrana

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Animalna i humana fiziologija

UDK BROJ: 57.052:[591.133.2+591.128]:599.322.2(043.3)

MOLECULAR MECHANISMS OF METABOLIC REGULATION IN HIBERNATION AND DURING COLD-ACCLIMATION IN EUROPEAN GROUND SQUIRREL (*Spermophilus citellus*)

ABSTRACT

The phenomenon of hibernation is a fascinating example of plasticity in mammals. Hibernating mammals are subjected to a complex series of biochemical, physiological and behavioral changes in response to seasonal energy-demanding periods coupled with reduced food availability. The aim of the thesis was to investigate metabolic changes in the key tissues and organs of the ground squirrel, responsible for maintaining overall energy homeostasis - brown and white adipose tissue (BAT and WAT), skeletal muscle and liver, during the acclimation to low temperature, as well as in the hibernation.

Effects of acclimation/hibernation on metabolic remodeling in the tissues and organs of the ground squirrel were determined by: mitochondrial capacity (gene and/or protein expression of the components of the respiratory chain and ATP synthase); thermogenic capacity (uncoupling protein 1 content), the expression profile of the key metabolic enzymes involved in: glycolysis, β -oxidation, Krebs cycle, glycogen and triglycerides metabolism. Furthermore, transcription factors involved in the metabolic regulation, as well as antioxidant enzymes, were examined. In parallel, we examined the changes in BAT and WAT depots on the structural and ultrastructural level.

Males of the European ground squirrel *Spermophilus citellus* were divided into two groups in early September: the control group, kept at room temperature (22 ± 1 °C) and a group acclimated to low temperature (4 ± 1 °C). Active, euthermic ground squirrels, which did not enter into deep hibernation during acclimation, were sacrificed after 1, 3, 7, 12, or 21 days. Ground squirrels that entered hibernation were sacrificed after 2-5 days of hibernation (continuous rectal temperature of 4 °C). BAT, subcutaneous, retroperitoneal and epididimal WAT (sWAT, rWAT and eWAT), skeletal muscle (*musculus quadriceps*) and liver were sampled. Parallel, in order to examine the mechanisms of metabolic regulation in the BAT specific for hibernation, comparative study with rats acclimated to low temperatures, was made.

Results show that, when hibernating animals are exposed to low temperature, the cellular metabolism in all examined tissues/organs is initially subordinated to maintaining

euthermia, i.e. thermogenic process. In the early period of the cold-exposure, shivering and nonshivering thermogenesis is induced in the muscle and BAT, respectively. Although these processes are metabolically supported by the breakdown of glucose, the production of heat in both thermogenic organs is associated with energy imbalance. This is likely responsible for suppression of energy consumption pathways (primarily thermogenesis) during the extended acclimation period, and for preparation of ground squirrel to a state of hypothermia/hypometabolism. In the early period of acclimation, the fuel for thermogenesis is preferentially provided from visceral WAT depots (particularly eWAT), wherein decreased adipocyte surface profile, a result of intensive lipolysis, is observed. Later, during exposure to cold, when the thermogenic capacity in BAT is suppressed, activity of AMP-activated protein kinase is induced in all three WAT depots, lipolysis and energy-consuming pathways are "blocked" and oxidative metabolism is stimulated. Liver is central coordinator of the lipid and carbohydrate metabolism during cold acclimation.

In the deep hibernation, thermogenic capacity of BAT and skeletal muscle is significantly suppressed. It seems that hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) plays a central role in the metabolic remodeling of the thermogenic organs in hibernation, by both suppressing the energy-demanding, thermogenic processes, and also, by inducing glycolytic pathway, an important component of energy homeostasis in hypometabolic conditions. Similar metabolic reprogramming occurs in the visceral WAT depots. In hibernation, liver shows analogous metabolic strategy as in fasting conditions: induction of lipid catabolism and suppression of glucose degradation, with the simultaneous induction of gluconeogenesis.

Results indicate that capacity for lipid oxidation is increased in all tested tissues/organs, except in visceral WAT depots, during hibernation. In BAT, the intensification of fatty acid oxidation pathways primarily serves to maintain the necessary level of thermogenesis, whereas in skeletal muscle and liver this is associated with adaptation to hypothermic/hypometabolic conditions of hibernation. Noticeable lower level of interorgan communication, when it comes to lipid metabolism, suggests that tissues establish a certain degree of autonomy during hibernation.

In general, it can be concluded that characteristic tissue-dependent remodeling of the energy metabolism is the central axis and the precause of physiological plasticity of hibernators that provides them many advantages over the nonhibernating counterparts, and

the survival under adverse environmental conditions, whether they are active and euthermic or lethargic and hypothermic.

KEY WORDS: ground squirrel, hibernation, energy metabolism, cold acclimation, transcription regulation, antioxidant defense

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SPECIAL TOPICS: Animal and human physiology

UDC NUMBER: 57.052:[591.133.2+591.128]:599.322.2(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Mehanizmi endotermije	1
1.1.1. Drhteća termogeneza	2
1.1.2. Nedrhteća termogeneza	3
1.2. Energetski metabolizam	4
1.3. Uključenost pojedinačnih organa u energetski metabolizam	9
1.3.1. Jetra	9
1.3.2. Skeletni mišići	10
1.3.3. Mrko masno tkivo.....	12
1.3.4. Bijelo masno tkivo	13
1.3.4.1. Depoi WAT.....	14
1.4. Antioksidativna odbrana u odgovoru na metaboličko remodeliranje	15
1.4.1. NFE2L2.....	16
1.5. Regulacija energetskog metabolizma	17
1.5.1. AMP-aktivirana protein kinaza	18
1.5.2. Hipoksija-inducibilni faktor-1	19
1.5.3. PPAR	22
1.5.4. Nukleusni respiratorni faktori.....	24
1.6. PGC-1α	25
1.7. Hibernacija kod sisara	26
1.7.1. Supresija metabolizma tokom hibernacije i izmjene u korišćenju energetskih goriva.....	28
1.7.2. Supresija transkripcije i translacije	28
1.8. Primjena strategija hibernacije u biomedicinske svrhe - perspektive	30
2. CILJ	32
3. MATERIJAL I METODE	34
3.1. Plan eksperimenta sa tekunicama i uzorkovanje tkiva	34
3.2. Plan eksperimenti sa pacovima i uzorkovanje tkiva	34
3.3. Priprema tkiva za analize	35
3.3.1. Priprema tkiva za Western blot analizu	35
3.3.2. Priprema BAT pacova za određivanje aktivnosti laktat dehidrogenaza (LDH) ..	36
3.3.3. Priprema BAT tekunica za RT-PCR analizu	36
3.3.4. Kalupljenje tkiva u parafinu.....	36
3.3.5. Kalupljenje tkiva u smoli.....	37
3.4. Određivanje količine proteina	37
3.5. SDS-PAGE i Western blot	37
3.6. Detekcija proteina nakon Western blot	38
3.7. Određivanje aktivnosti LDH	41
3.8. RT-PCR (engl. reverse-transcriptase polymerase chain reaction)	41
3.9. Morfometrijska i stereološka analiza tkiva	44
3.9.1. Određivanje volumenske gustine krvnih sudova	44
3.9.2. Određivanje volumenske gustine adipocita	45
3.9.3. Određivanje volumenske gustine intersticijuma	45
3.10. Ultrastrukturalna analiza tkiva	45

3.11. Bodijanov metod za bojenje nervnih vlakana.....	45
3.12. Bojenje rezervi glikogena PAS metodom	46
3.13. Statistička analiza.....	46
4. REZULTATI	47
4.1. Mrko masno tkivo tekunica	47
4.1.1. Western blot analiza.....	47
4.1.1.1. Proteinska ekspresija komponenti elektron-transportnog lanca	47
4.1.1.2. Proteinska ekspresija ATP sintaze i UCP1	47
4.1.1.3. Proteinska ekspresija glikolitičkog enzima GAPDH.....	48
4.1.1.4. Proteinska ekspresija PDH, PDK4 i M/H subjedinica LDH.....	49
4.1.1.5. Proteinska ekspresija enzima β-oksidacije - ACADM i enzima Krebsovog ciklusa - SCAS	50
4.1.1.6. Proteinska ekspresija enzima uključenih u sintezu/ razgradnju glikogenskih i lipidnih rezervi	51
4.1.1.7. Proteinska ekspresija VEGF i eNOS	51
4.1.1.8. Proteinska ekspresija HIF-1a i fosfo-AMPKa.....	52
4.1.1.9. Proteinska ekspresija mitofuzina 1 i PGC-1a.....	53
4.1.1.10. Proteinska ekspresija Nr1f i NFE2L2	54
4.1.1.11. Proteinska ekspresija izoformi PPAR	54
4.1.1.12. Proteinska ekspresija antioksidativnih enzima	56
4.1.2. RT-PCR analiza.....	57
4.1.2.1. Genska ekspresija komponenti OXPHOS	57
4.1.2.2. Genska ekspresija Ucp1 i Ucp2	57
4.1.2.3. Genska ekspresija glikolitičkih enzima	57
4.1.2.4. Genska ekspresija Pdh, Pdk4 i Ldh H.....	59
4.1.2.5. Genska ekspresija a subjedinice Hif-1.....	60
4.1.2.6. Genska ekspresija enzima β-oksidacije.....	61
4.1.2.7. Genska ekspresija enzima Krebsovog ciklusa.....	61
4.1.2.8. Genska ekspresija enzima glukoneogeneze	62
4.1.2.9. Genska ekspresija enzima uključenih u sintezu/ razgradnju lipidnih i glukoznih rezervi.....	62
4.1.2.10. Genska ekspresija antioksidativnih enzima.....	63
4.1.3. Morfometrijska i stereološka analiza.....	65
4.1.3.1. Volumenska gustina adipocita, krvnih sudova i intersticijuma u BAT tekunica.....	65
4.1.3.2. Površina adipocitnog profila	65
4.1.4. Svjetlosna i elektronska mikroskopija.....	67
4.1.4.1. BAT - opšta slika, prokrvljenost.....	67
4.1.4.2. Inervacija BAT.....	67
4.1.4.3. PAS bojenje rezervi glikogena	71
4.1.4.4. Nukleusi mrkih adipocita.....	71
4.1.4.5. Apoptoza u BAT.....	71
4.2. Mrko masno tkivo pacova	76
4.2.1. Western blot analiza.....	76
4.2.1.1. Proteinska ekspresija enzima uključenih u katabolizam glukoze.....	76
4.2.1.2. Proteinska ekspresija a subjedinice HIF-1	76
4.2.1.3. Proteinska ekspresija enzima uključenih u lipidni metabolizam.....	76

4.2.2. Enzimaska aktivnost.....	76
4.2.2.1. Enzimaska aktivnost LDH	76
4.2.3. Svijetlosna i elektronska mikroskopija.....	76
4.2.3.1. PAS bojenje rezervi glikogena	76
4.2.3.2. Lipidne rezerve.....	80
4.3. Skeletni mišići.....	81
4.3.1. Western blot analiza.....	81
4.3.1.1. Proteinska ekspresija komponenti elektron-transportnog lanca	81
4.3.1.2. Proteinska ekspresija ATP sintaze i UCP3	81
4.3.1.3. Proteinska ekspresija enzima uključenih u katabolizam glukoze.....	81
4.3.1.4. Proteinska ekspresija ACADM (enzim β -oksidacije) i SCAS (enzim Krebsovog ciklusa)	83
4.3.1.5. Proteinska ekspresija enzima ključnih za sintezu/razgradnju glikogena.....	83
4.3.1.6. Proteinska ekspresija ključnog faktora neovaskularizacije.....	83
4.3.1.7. Proteinska ekspresija fosfo-AMPKa, HIF-1a i ERK1/2.....	86
4.3.1.8. Proteinska ekspresija SERCA1.....	87
4.3.1.9. Proteinska ekspresija Nrf1, NFE2L2 i PGC-1a	87
4.3.1.10. Proteinska ekspresija PPAR transkripcionih faktora	87
4.3.1.11. Proteinska ekspresija enzima antioksidativne odbrane.....	87
4.4. Retroperitonealno bijelo masno tkivo.....	90
4.4.1. Western blot analiza.....	90
4.4.1.1. Proteinska ekspresija komponenti OXPHOS.....	90
4.4.1.2. Proteinska ekspresija enzima uključenih u katabolizam glukoze.....	90
4.4.1.3. Proteinska ekspresija enzima uključenih u katabolizam lipida	91
4.4.1.4. Proteinska ekspresija enzima uključenih u anabolizam lipida.....	93
4.4.1.5. Proteinska ekspresija VEGF.....	93
4.4.1.6. Proteinska ekspresija fosfo-AMPKa i HIF-1a.....	93
4.4.1.7. Proteinska ekspresija mitofuzina 1 i PGC-1a.....	93
4.4.1.8. Proteinska ekspresija Nrf1 i NFE2L2	95
4.4.1.9. Proteinska ekspresija izoformi PPAR.....	96
4.4.1.10. Proteinska ekspresija enzima antioksidativne odbrane.....	97
4.4.2. Morfometrijska i stereološka analiza.....	98
4.4.2.1. Volumenska gustina adipocita, krvnih sudova i intersticijuma u rWAT	98
4.4.2.2. Površina adipocitnog profila	98
4.4.3. Svijetlosna mikroskopija	98
4.4.3.1. Opšta slika („browning“ efekat).....	98
4.4.3.2. Inervacija rWAT.....	102
4.4.3.3. PAS bojenje glikogena	102
4.5. Epididimalno bijelo masno tkivo.....	105
4.5.1. Western blot analiza.....	105
4.5.1.1. Proteinska ekspresija komponenti OXPHOS.....	105
4.5.1.2. Proteinska ekspresija enzima uključenih u katabolizam glukoze.....	105
4.5.1.3. Proteinska ekspresija enzima uključenih u katabolizam lipida	105
4.5.1.4. Proteinska ekspresija enzima uključenih u anabolizam lipida.....	108
4.5.1.5. Proteinska ekspresija VEGF.....	108
4.5.1.6. Proteinska ekspresija fosfo-AMPKa i HIF-1a.....	108

4.5.1.7. Proteinska ekspresija Nrf1 i NFE2L2	109
4.5.1.8. Proteinska ekspresija PPAR izoformi.....	110
4.5.1.9. Proteinska ekspresija enzima antioksidativne odbrane	110
4.5.2. Morfometrijska i stereološka analiza.....	112
4.5.2.1. Volumenska gustina adipocita, krvnih sudova i intersticijuma u eWAT	112
4.5.2.2. Površina adipocitnog profila.....	112
4.5.3. Svjetlosna mikroskopija	112
4.5.3.1. Opšta slika („browning“ efekat).....	112
4.5.3.2. Inervacija eWAT.....	112
4.5.3.3. PAS bojenje glikogena	112
4.6. Subkutano (potkožno) bijelo masno tkivo	114
4.6.1. Western blot analiza.....	114
4.6.1.1. Proteinska ekspresija komponenti OXPHOS.....	114
4.6.1.2. Proteinska ekspresija enzima uključenih u katabolizam glukoze.....	114
4.6.1.3. Proteinska ekspresija enzima uključenih u katabolizam lipida	114
4.6.1.4. Proteinska ekspresija enzima uključenih u anabolizam lipida.....	117
4.6.1.5. Proteinska ekspresija VEGF.....	117
4.6.1.6. Proteinska ekspresija fosfo-AMPKa i HIF-1a.....	118
4.6.1.7. Proteinska ekspresija mitofuzina 1 i PGC-1a.....	118
4.6.1.8. Proteinska ekspresija Nrf1 i NFE2L2	119
4.6.1.9. Proteinska ekspresija PPAR izoformi.....	119
4.6.1.10. Proteinska ekspresija enzima antioksidativne odbrane.....	121
4.6.2. Morfometrijska i stereološka analiza.....	122
4.6.2.1. Volumenska gustina adipocita, krvnih sudova i intersticijuma u sWAT	122
4.6.2.2. Površina adipocitnog profila.....	122
4.6.3. Svjetlosna mikroskopija	122
4.6.3.1. Opšta slika („browning“ efekat).....	122
4.6.3.2. Inervacija sWAT.....	122
4.6.3.3. PAS bojenje glikogena	122
4.7. Jetra.....	124
4.7.1. Western blot analiza.....	124
4.7.1.1. Proteinska ekspresija komponenti OXPHOS.....	124
4.7.1.2. Proteinska ekspresija proteina uključenih u unos i katabolizam šećera.....	124
4.7.1.3. Proteinska ekspresija enzima uključenih u anabolizam šećera.....	124
4.7.1.4. Proteinska ekspresija enzima uključenih u katabolizam lipida	127
4.7.1.5. Proteinska ekspresija enzima uključenih u anabolizam lipida.....	127
4.7.1.6. Proteinska ekspresija VEGF.....	128
4.7.1.7. Proteinska ekspresija fosfo-AMPKa i HIF-1a.....	128
4.7.1.8. Proteinska ekspresija mitofuzina 1 i PGC-1a.....	130
4.7.1.9. Proteinska ekspresija Nrf1 i NFE2L2	130
4.7.1.10. Proteinska ekspresija PPAR izoformi	130
4.7.1.11. Proteinska ekspresija enzima antioksidativne odbrane.....	130
5. DISKUSIJA.....	133
5.1. Molekulsko remodeliranje BAT tokom aklimacije na nisku temperaturu i u fazi hibernacije.....	133
5.1.1. Termogeni program BAT tekunica tokom izlaganja niskoj temperaturi i u	

fazi duboke hibernacije	134
5.1.2. Metaboličko remodeliranje BAT pacova tokom aklimacije na nisku temperaturu.....	137
5.1.3. Metaboličko remodeliranje BAT tekunica tokom aklimacije na nisku temperaturu.....	138
5.1.4. Metaboličko remodeliranje BAT tekunica u fazi hibernacije	141
5.1.5. Antioksidativna odbrana u BAT hibernatora tokom izlaganja hladnoći i u fazi hibernacije.....	145
5.1.6. Transkripciona kontrola termogenog i metaboličkog odgovora BAT hibernatora tokom izlaganja hladnoći i u fazi hibernacije	146
5.2. Molekulsko remodeliranje skeletnih mišića tokom aklimacije na nisku temperature i u fazi hibernacije.....	148
5.2.1. Metaboličko remodeliranje skeletnih mišića hibernatora u toku aklimacije na nisku temperaturu	149
5.2.2. Metaboličko remodeliranje skeletnih mišića hibernatora tokom faze duboke hibernacije	151
5.2.3. PPARs i Nrf1 u transkripcionoj kontroli metaboličkog remodeliranja skeletnih mišića hibernatora.....	153
5.2.4. Antioksidativna odbrana u skeletnim mišićima hibernatora tokom izlaganja hladnoći i tokom faze duboke hibernacije	154
5.3. Molekulsko remodeliranje depoa WAT tokom aklimacije na nisku temperaturu i u fazi hibernacije.....	155
5.3.1. Uloga pojedinačnih depoa WAT u ukupnoj energetske homeostazi tokom aklimacije na nisku temperaturu	156
5.3.2. Energetski metabolizam depoa WAT tokom aklimacije na hladnoću.....	157
5.3.3. Transkripciona regulacija metaboličkog remodeliranja WAT depoa tokom aklimacije na hladnoću	160
5.3.4. Uloga pojedinačnih WAT depoa u ukupnoj energetske homeostazi tokom faze duboke hibernacije	161
5.3.5. Energetski metabolizam i njegova transkripciona regulacija u WAT depoima tokom torpora	162
5.3.6. Antioksidativna odbrana depoa WAT tokom izlaganja hladnoći i torpora ..	163
5.4. Molekulsko remodeliranje jetre tokom aklimacije na nisku temperaturu i u fazi hibernacije.....	163
5.4.1. Energetski metabolizam u jetri i njeno učešće u ukupnoj energetske homeostazi tokom perioda izlaganja niskoj temperaturi	164
5.4.2. Molekulsko remodeliranje hepatocita tokom faze duboke hibernacije	166
5.4.3. Antioksidativna odbrana u jetri tokom izlaganja hladnoći i tokom faze duboke hibernacije	168
6. ZAKLJUČCI	170
7. LITERATURA.....	175

1. Uvod

Sisari su homeotermni organizmi koji održavaju tjelesnu temperaturu relativno konstantnom u opsegu od približno 30-39 °C, a najčešće 37 ± 2 °C, nezavisno od ambijentalne temperature (Ladd Prosser, 1991). Temperaturna homeostaza se održava zahvaljujući brojnim fiziološkim i bihevioralnim adaptacijama. Jedinствен izuzetak vidljiv je kod sisara koji podliježu hibernaciji, tokom koje dolazi do značajne supresije tjelesne temperature i bazalnog metabolizma. Tako se postiže ušteda energije od oko 90% u nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine. Superioran fenotip hibernatora, koji im obezbijeduje toleranciju na prateću hipotermiju, ishemiju/reperfuziju, dugotrajnu imobilnost i afagiju, ostvaruje se metaboličkim, strukturnim i endokrinim remodeliranjem tokom torpora. Zato je istraživanje strategija hibernacije značajno za biomedicinu, posebno transplantacionu, liječenje gojaznosti, prevenciju mišićne atrofije, ispitivanje procesa insulinske rezistencije, patogeneze kardiovaskularnih oboljenja itd. Mehanizmi koji leže u osnovi pomenute metaboličke supresije (remodeliranja) tokom hibernacije još uvek nisu potpuno razjašnjeni.

1.1. Mehanizmi endotermije

U bazalnim uslovima, ključni izvor toplote kod endotermnih životinja jeste toplota koja nastaje kao produkt metaboličkih reakcija. Smatra se da je svega 25% entalpije sadržane u hrani konzervirano u procesu oksidativne fosforilacije (OXPHOS) u formi potencijalne hemijske energije (ATP), dok se ostatak oslobađa kao toplota neophodna za održanje normotermije (Hochachka i Somero, 1984).

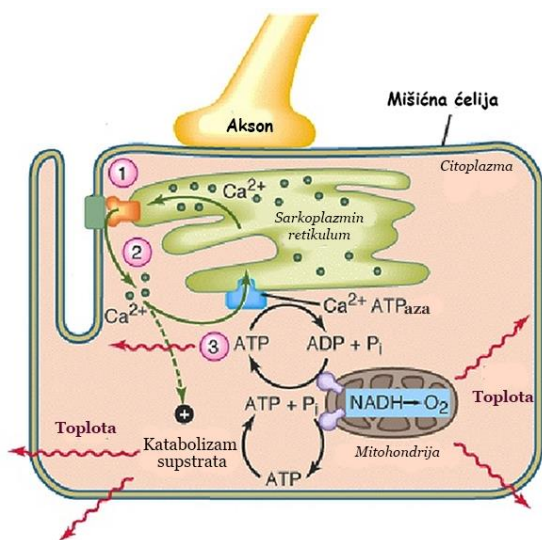
U uslovima kompromitovane tjelesne temperature, sisari i ptice koriste brojne bihevioralne adaptacije (poput lokomotornih aktivnosti) kako bi očuvali temperaturnu homeostazu u uskom opsegu od nekoliko stepeni. Takođe, ovi organizmi imaju dobru izolaciju tijela (poput depoa potkožnog masnog tkiva, krzna, perja...), koja im omogućava smanjeno rasipanje toplote u okolnu sredinu. Sisari imaju i dobro razvijene fiziološke mehanizme čuvanja i rasipanja toplote (vazomotorni odgovor perifernih krvnih sudova i sudomotorni odgovor), kao i mehanizme povećanog generisanja toplote: drhteća i nedrhteća termogeneza.

1.1.1. Drhteća termogeneza

Mišićna aktivnost već dugo vremena je prepoznata kao glavni izvor toplote kod sisara (Needham, 1971). U bazalnim uslovima, tonus mišića i kontinuirana srčana aktivnost doprinose održanju bazalnog metaboličkog nivoa (*engl.* basal metabolic rate, BMR), dok vježbanje i drhtanje mogu doprinijeti intenziviranju metabolizma i do nekoliko puta iznad BMR.

Drhteća termogeneza je proces nevoljnog tremora skeletnih mišića u cilju povećanja produkcije metaboličke toplote. Mehanizmi ovog tipa ćelijske termogeneze uključuju stimulaciju mišića preko motornih nerava i posledično oslobađanje Ca^{2+} iz unutarćelijskih depoa (Slika 1). Rezultat je aktivacija mišićne kontrakcije, uz hidrolizu ATP (Needham, 1971). Nastali ADP dodatno stimuliše mitohondrijalnu OXPHOS i sagorijevanje metaboličkih goriva.

Drugi proces koji doprinosi (mada u manjoj mjeri) produkciji toplote tokom mišićne aktivnosti uključuje jonske pumpe (Himms-Hagen, 1976). Nakon aktivacije mišićnih vlakana, vraćanje sarkoleme u normalno polarizovano stanje zahtijeva rad Na^+K^+ -



ATPaze, kao i Ca^{2+} -ATPaze, koja uklanja Ca^{2+} iz citoplazme u sarkoplazmin retikulum. ADP generisan u oba ova procesa dodatno stimuliše respiraciju.

Kapacitet mišića za produkciju toplote nije konstantan, već zavisi od funkcionalnog stanja. Tako utrenirani mišići, koji pokazuju veći respiratorni kapacitet i crvenih i bijelih mišićnih vlakana, imaju veći kapacitet za produkciju toplote drhtanjem (Stromme i Hammel, 1967).

Slika 1. Ca^{2+} -zavisni mehanizam produkcije toplote u mišićima (adaptirano sa http://www.bio.miami.edu/tom/courses/bil265/bil265goods/04_thermal2.html).

Drhteća termogeneza je najintenzivnija u ranom periodu aklimacije na toplotu (1-7. dana) (Jansky i Hart, 1968), dok kasnije dolazi do smanjenja mišićne aktivnosti, ali ne i potrošnje kiseonika u skeletnim mišićima (Sellers i sar., 1954; Depocas i sar., 1956a; 1956b; Griggio, 1982). Takođe, pokazano je i da sama drhteća termogeneza nije efikasna u

održanju konstantne rektalne temperature (Griggio, 1982), vjerovatno usled toga što vodi paralelnom povećanju konvektivnog gubitka toplote (Hensel, 1973).

1.1.2. Nedrhteća termogeneza

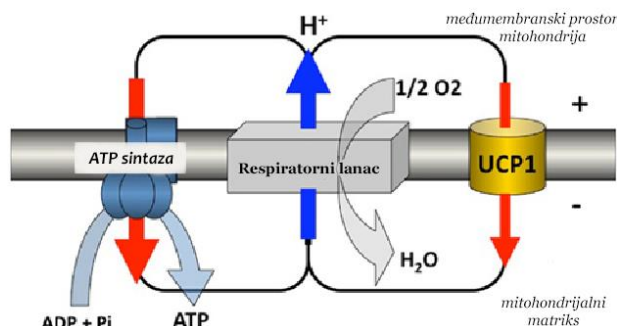
Nedrhteća termogeneza je izvorno definisana kao hladnoćom indukovano povećanje produkcije toplote koje nije povezano sa mišićnom aktivnošću (drhtanjem) (Sellers i sar., 1954; Cottle i Carlson, 1956; Depocas i sar., 1956a; 1956b; Hsieh i sar., 1957). Brzo potom se došlo do rezultata koji su ukazali da je nedrhteća termogeneza posledica povećanja BMR u odgovoru na noradrenalin (Depocas, 1960), ali je mjesto (tkivo) njenog odigravanja duže vreme ostalo nepoznato (Himms-Hagen, 1972; 1976; Jansky, 1973).

Mrko masno tkivo (*engl.* brown adipose tissue, BAT) je prvi put opisao švajcarski prirodnjak Konrad Gesner (1551) i to upravo kod hibernirajuće vrste - mrmota, zbog čega je ovo tkivo dugo vremena (netačno) nazivano "hibernirajućom žlijezdom". Nakon otkrića njegove funkcije (Johansson, 1959; Smith i Hock, 1963; Silverman i sar., 1964; Smalley i Smalley, 1967), započeta je „termogena era” BAT.

I pored toga što je prvobitno opisano kod hibernirajuće vrste i što je dugo smatrano žlijezdom koja je odgovorna za fenomen hibernacije, BAT i njegovo molekularno remodeliranje upravo kod ovih vrsta je, u poređenju sa nehibernirajućim životinjama, manje izučavano.

Brojni su radovi koji su pokazali da izlaganje nehibernirajućih životinja (pacova u prvom redu) hladnoći indukuje simpatičku inervaciju i posledičnu aktivaciju BAT, koja obuhvata kompleksan niz precizno definisanih događaja na molekularnom, morfološkom i funkcionalnom planu (Himms-Hagen, 1986; Jansky i sar., 2008; Petrović i sar., 2010). Ove promjene obuhvataju: diferencijaciju i proliferaciju mrkih adipocita, povećanu angiogenezu, mitohondriogenezu, biogenezu peroksizoma, povećanu sintezu proteina i DNK, kao i smanjenu stopu apoptoze (Suter, 1969a; 1969b; 1969c; Bukowiecki i sar., 1986; Himms-Hagen, 1986; 1990; Lindquist i Rehnmark, 1998; Klingespor, 2003; Petrović i sar., 2005; 2008; 2010; Korać i sar., 2008). Ključni molekularni marker termogeneze u BAT je dekoplujući protein 1 (*engl.* uncoupling protein 1, UCP1), integralni protein unutrašnje mitohondrijalne membrane (Nicholls i Locke, 1984; Cannon i Nedergaard, 1985; Nicholls i sar., 1986). UCP1, kao pora za protone, obezbjeđuje alternativni put za njihovo vraćanje iz međumembranskog prostora u matriks mitohondrija, omogućavajući da se dio energije

elektrohemijskog potencijala koristi za produkciju toplote. Drugim riječima, ovaj protein omogućava razdvajanje (dekuplovanje) procesa respiracije od fosforilacije, tj. sinteze ATP (Slika 2).



Slika 2. Shematski prikaz korišćenja proton pokretačke sile za sintezu ATP i/ili generisanje toplote (adaptirano iz Ricquier, 2011).

1.2. Energetski metabolizam

Održanje energetske homeostaze je *conditio sine qua non* za sve žive sisteme (organizme). I ako se produkcija toplote u bazalnim uslovima može posmatrati kao termodinamička nesavršenost metaboličkih procesa (reakcija) i u ćeliji ne može biti iskorišćena kao izvor energije, za homeoterme je ona uslov održanja života. Energija koju ćelije koriste za sve funkcije, rast i diobu je hemijska energija u formi ATP, koju autotrofi produkuju u procesu fotosinteze, a heterotrofi primarno u procesu OXPHOS „sagorijevanjem“ hrane. Za većinu živih organizama ključni izvori energije su lipidi i ugljeni hidrati, dok se proteini u ovu svrhu koriste u mnogo manjoj mjeri i to prvenstveno tokom perioda gladovanja.

Složena mreža procesa uključenih u energetski metabolizam je kompartmentalizovana i koordinisana (regulisana) kako unutar pojedinačnih ćelija, tako i pojedinih tkiva i organa u organizmu. Ključni putevi energetskog metabolizma shematski su prikazani na Slici 3.

Razlaganje glukoze do dva molekula piruvata u ćelijama (citoplazmi) se odvija u seriji reakcija glikolize, univerzalnom kataboličkom putu anaerobnih i aerobnih organizama. Glikoliza je centralno mjesto katabolizma i drugih šećera: fruktoze, galaktoze, manoze. Pored piruvata, u glikolitičkom putu nastaju i po dva molekula ATP i NADH. Podjednako značajno kao i produkcija energije jeste i to što se intermedijeri glikolitičkog puta (kao i

Krebsovog ciklusa) koriste za sintezu brojnih biomolekula. Nastali piruvat ima dvije sudbine. Može biti redukovano, uglavnom do laktata (sve životinje, bakterije) ili etanola (bakterije) i tada su oni finalni produkti glikolize. Redukcija piruvata obezbeđuje NAD^+ za kontinuiranu razgradnju glukoze glikolizom i produkciju ATP, kako kod anaerobnih tako i aerobnih organizama, u ćelijama (eritrociti) i tkivima (mišići) kada je dostupnost kiseonika limitirana. Ugljenici glukoze, preko piruvata mogu biti i potpuno oksidovani do CO_2 i H_2O . Piruvat se u prvom koraku, u mitohondrijama, oksiduje i dekarboksiluje piruvat dehidrogenaznim (PDH) kompleksom do acetyl-CoA. Glikoliza je regulisana na tri mjesta gdje se odigravaju ireverzibilne reakcije: heksokinazna, piruvat kinazna, a posebno fosfofruktokinazna. Fosfofruktokinaza (PFK) alosterično aktiviraju ADP i AMP, a inhibiraju ATP i citrat. Takođe, fruktozo-2,6-bisfosfat, čija koncentracija je regulisana nivoom glukagona, adrenalina i noradrenalina, aktivira PFK (Voet i Voet, 2004). Ključno regulatorno mjesto potpune oksidacije glukoze je PDH kompleks. Naime, PDH je alosterno inhibiran produktima, NADH i acetyl-CoA i kovalentno, fosforilacijom/defosforilacijom. Specifična kinaza piruvat dehidrogenaze (PDK) koja je dio PDH kompleksa fosforiliše i inaktivira kompleks, na taj način sprečavajući ulazak ugljenika piruvata nastalog iz glukoze u Krebsov ciklus. PDH kompleks je uz acetyl-CoA alosterno inhibiran i masnim kiselinama, omogućavajući ćelijama da njih koriste kao gorivo, uz suprimiranje glikolize (Brooks i Storey, 1992; Andrews i sar., 1998; Berger i Moller, 2002).

Sinteza glukoze *de novo*, glukoneogeneza, primarno se odvija u jetri i bubrezima. Sisari mogu da sintetišu glukozu iz raznih neheksoznih prekursora: piruvata, laktata, glicerola i glukogenih amino kiselina (ali ne i iz masnih kiselina). Većina prekursora se inicijalno u mitohondrijama konvertuje u oksalacetat, pa u fosfoenolpiruvat (PEP), a zatim kroz seriju reakcija u citoplazmi, koje su u velikoj mjeri reverzibilni put glikolize, u glukozu. Ireverzibilne glikolitičke reakcije koje katalizuju heksokinaza i PFK, u procesu glukoneogeneze su zaobiđene hidrolitičkim reakcijama katalizovanim glukozo-6-fosfatazom, odnosno fruktozo-1,6-bisfosfatazom (FBPaza). PFK i FBPaza su inverzno regulisani fruktozo-2,6-bisfosfatom i mjesta su recipročne regulacije glikolize i glukoneogeneze. Fosfoenolpiruvat karboksikinazna (PCK) reakcija je treći ireverzibilni korak glikolize, koji je zaobiđen u procesu glukoneogeneze reakcijom koju katalizuje piruvat kinaza. Ovaj enzim katalizuje reakciju sinteze oksalacetata iz piruvata i predstavlja centralno mjesto regulacije glukoneogeneze. Piruvat karboksilaza je aktivna samo u

prisustvu acetil-CoA kao produkta β -oksidacije masnih kiselina. Oksidacija masnih kiselina direktno ne doprinosi glukoneogenezi, jer se produkuje samo acetil-CoA, ali doprinosi indirektno, obezbijavajući ATP (Nelson i Cox, 2005).

Razgradnja i sinteza glikogena se najviše odvijaju u jetri i mišićima. U mišićima, rezerve glikogena se koriste za mišićnu kontrakciju, a u jetri kao izvor glukoze za sva ekstrahepatična tkiva. U procesu razgradnje glikogena, glukozne rezidue se oslobađaju u formi glukozo-1-fosfata, u reakciji katalizovanoj enzimom glikogen fosforilazom (PYG). Sinteza glikogena je katalizovana enzimom glikogen sintazom (GS). Ova dva enzima su recipročno regulisana fosforilacijom, specifičnim djelovanjem kinaze glikogen fosforilaze, odnosno kinaze glikogen sintaze (GSK) i defosforilacijom koja je posredovana (zajedničkom) fosfoprotein fosfatazom. Na ovaj način, u ćelijama (hepatociti, miociti) uvek će biti aktivan samo jedan put glikogena, katabolički ili anabolički (kada je PYG fosforilisana i aktivna, GS će biti fosforilisana i neaktivna). Enzimi razgradnje i sinteze glikogena su subjekti tkivno-specifične alosterne kontrole, dok je kovalentna modifikacija fosforilacijom-defosforilacijom pod strogom hormonskom kontrolom, prevashodno insulina i glukagona (npr. insulin posredstvom inhibicije GSK indukuje sintezu glikogena, favorizujući nefosforilisanu, aktivnu formu GS) (Voet i Voet, 2004).

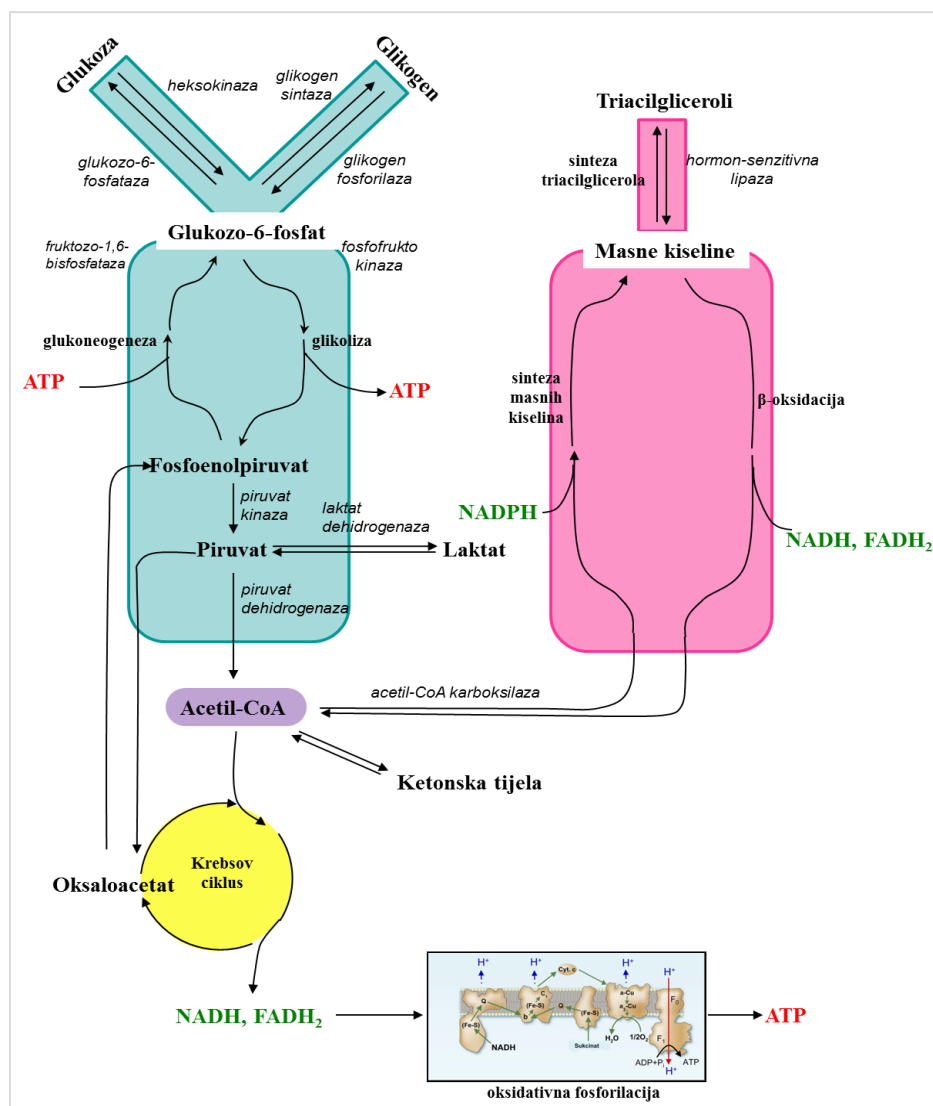
Razgradnja i sinteza masnih kiselina se u različitom stepenu odvijaju u svim tkivima i metabolizam lipida zahtijeva aktivnu interorgansku kooperaciju, posebno jetre koja je centralno mjesto sinteze lipida i bijelog masnog tkiva, depoa masnih kiselina. Razlaganje masnih kiselina se odvija u mitohondrijama targetnih ćelija u procesu nazvanom β -oksidacija. Kroz četiri reakcije jednog ciklusa β -oksidacije masnih kiselina oslobađaju se dvouglenične jedinice u formi acetil-CoA. Samom β -oksidacijom i daljim razlaganjem acetil-CoA u Krebsovom ciklusu, masne kiseline snažno doprinose sintezi ATP. Mobilizacija masnih kiselina iz bijelog masnog tkiva je pod hormonalnom kontrolom, inicirana glukagonom i adrenalinom i zavisi od aktuelnih potreba za energijom. Sinteza masnih kiselina koja se dominantno odigrava u jetri (citoplazma hepatocita), katalizovana je enzimskim kompleksom sintaza masnih kiselina (*engl.* fatty acid synthase, FAS). Sinteza principijelno predstavlja reverzni mod četiri reakcije β -oksidacije, ali suštinski se potpuno razlikuje. Između ostalog, dvouglenične jedinice kojima se produžava rastući acil-lanac u svakom ciklusu potiču od malonil-CoA, a ne od acetil-CoA. Malonil-CoA nastaje u reakciji katalizovanoj acetil-CoA karboksilazom (ACC), karboksilacijom acetil-CoA. Izvor ugljenika

za sintezu masnih kiselina nije acetyl-CoA nastao β -oksidacijom masnih kiselina, već citrat nastao od šećera i amino kiselina. Šta više, malonil-CoA inhibira β -oksidaciju masnih kiselina sprečavajući da se u istoj ćeliji oba procesa odigravaju istovremeno. ACC je alosterno aktivirana citratom, a kovalentno insulin-zavisnom defosforilacijom. Palmitoil-CoA i cAMP- i AMP-zavisna fosforilacija vode ka inhibiciji ACC. Takođe, karnitin palmitoil-transferaza I (CPT-I), komponenta sistema za transport masnih kiselina u mitohondrije radi oksidacije, inhibirana je malonil-CoA, ključnim intermedijerom biosinteze masnih kiselina u većini tkiva (Voet i Voet, 2004).

Krebsov ciklus (ciklus limunske kiseline) se odvija u mitohondrijalnom matriksu. Predstavlja centralno mjesto gdje se ukrštaju katabolički i anabolički putevi. U njemu se, do CO_2 i H_2O , oksiduje acetyl-CoA nastao od glukoze, masnih kiselina, amino kiselina, kao i ketonskih tijela. Energija oksidacije je konzervirana u redukovanim koenzimima, NADH i FADH_2 , koji nose potencijalnu energiju oksidovanih goriva. Ovaj univerzalni metabolički put je alosterno regulisan dostupnošću supstrata (posebno oksalacetata) i povratnom inhibicijom intermedijerima ciklusa, NADH i ATP (Voet i Voet, 2004). Krebsov ciklus je regulatorno sinhronizovan i sa glavnim kataboličkim putevima u ćeliji, posebno glikolitičkim putem i β -oksidacijom masnih kiselina.

Mitohondrijalna OXPHOS je centralno mjesto produkcije ATP. Svi katabolički, oksidativni putevi šećera, masnih kiselina i amino kiselina, konvergiraju ka OXPHOS. Naime, oksidacijom NADH i FADH_2 do NAD^+ i FAD, energija konzervirana iz oksidativnih reakcija se preko elektrohemijskog potencijala konvertuje u hemijsku formu energije, ATP. Dva procesa se tada istovremeno dešavaju, egzogeni protok elektrona duž respiratornog lanca unutrašnje mitohondrijalne membrane do kiseonika i na račun njega endogeno „pumpanje“ protona iz mitohondrijalnog matriksa u međumembranski prostor. Četiri kompleksa respiratornog lanca uključena su u oksidaciju redukovanih koenzima i transport elektrona preko nosača uz finalnu redukciju kiseonika do vode (NADH dehidrogenaza - kompleks I, sukcinat dehidrogenaza - kompleks II, ubihinon citohrom *c* oksidoreduktaza - kompleks III i citohrom *c* oksidaza (COX) - kompleks IV). Elektroni duž respiratornog lanca putuju preko svojih nosača, u redosledu: NADH, koenzim Q, citohrom *b*, citohrom *c*₁, citohrom *c*, citohrom *a*+*a*₃, kiseonik. Kompleksi I, II i IV su i protonske pumpe, koje izmještaju 10 protona (4+4+2) po paru elektrona u međumembranski prostor. Konzervirana energija elektrohemijskog potencijala (proton

pokretačka snaga), pretače se u ATP kada se protoni preko Fo porcije ATP sintaze vraćaju u matriks (Fo porcija ATP sintaze je integralni protein unutrašnje mitohondrijalne membrane, a F₁ subjedinicu odgovorna za sintezu ATP se proteže ka matriksu). Tako je proces respiracije (protok elektrona) čvrsto kuplovan sa fosforilacijom (sinteza ATP). Dekuplovanjem ovog procesa u ćelijama (UCP1 u mrkim adipocitima), energija elektrohemijskog potencijala se konvertuje (rasipa) u toplotu. Smatra se da pored ostalih regulatornih mehanizama (koncentracija ATP, ADP i Pi, kao i O₂) umjereno dekuplovanje ima ulogu u regulaciji produkcije ATP. Takođe, OXPHOS je snažno kuplovana sa fluksom kroz glikolizu, β-oksidaciju i Krebsov ciklus, objedinjujući ove procese na regulatornom nivou (Nelson i Cox, 2005).



Slika 3. Ključni putevi energetskeg metabolizma (adaptirano iz Voet i Voet, 2004).

1.3. Uključenost pojedinačnih organa u energetske metabolizam

Sva tkiva i organi našeg organizma imaju specijalizovane funkcije. Njihov metabolički kapacitet je usklađen sa sopstvenim i potrebama cijelog organizma. Međuorganska kooperacija je neophodna za održanje ukupne homeostaze organizma, pa i energetske. Metabolička aktivnost, struktura i anatomija pojedinih tkiva imaju visok adaptivni kapacitet na promjene unutrašnjih i spoljašnjih uslova. U osnovi fascinantnih promjena metaboličkog profila tkiva, organa i samog organizma, nalaze se brojne promjene na molekulskom nivou. Hibernacija je jedno od tih stanja. Shematski prikaz metaboličkog profila pojedinačnih organa u bazalnom stanju prikazan je na Slici 4.

1.3.1. JETRA

Ključna uloga jetre je u održanju ukupne energetske homeostaze organizma. Jetra funkcioniše kao distributivni centar sa ciljem da se održi bazalni nivo nutrijenata u krvi koji su potrebni mozgu, mišićima i drugim tkivima. Na taj način se ne dozvoljavaju velike oscilacije u metabolizmu uzrokovane ishranom.

Jetra ima ključnu ulogu u održavanju konstantne koncentracije glukoze u krvi (4 do 5 mM). Naime, jetra preuzima ili oslobađa glukozu prvenstveno u odgovoru na glukagon i insulin. Ovaj odgovor diktiran je koncentracijom glukoze u krvi. Nakon jela, kada se nivo glukoze poveća, jetra preuzima glukozu i konvertuje je u glukozo-6-fosfat. Ovaj korak je katalizovan heksokinazom IV, izoenzimom koji se razlikuje od heksokinaza u drugim tkivima po regulatornim principima (ne inhibira je glukozo-6-fosfat) i visokom K_m za glukozu (10 mM), što omogućava njenu direktnu regulaciju visokim nivoom glukoze u krvi. Efikasni glukozni transporter (GLUT2) u hepatocitima veoma brzo ekvilibriše koncentraciju glukoze u citoplazmi i krvi.

Produkovani glukozo-6-fosfat ima važnu ulogu u metabolizmu šećera. Pored toga što je intermedijer glikolitičkog puta, ima još nekoliko važnih metaboličkih sudbina:

- ✓ u glukoneogenezi, dejstvom enzima glukozo-6-fosfataze može biti konvertovan u glukozu, koja potom krvotokom biva dopremljena do ekstrahepatičnih organa;
- ✓ može biti konvertovan u glikogen ako su potrebe organizma za glukozom male;
- ✓ može biti konvertovan u acetyl-CoA, koji se većinom koristi za sintezu masnih kiselina, fosfolipida i holesterola, ali i soli žučne kiseline;

- ✓ može biti kanalisiran ka pentozofosfatnom putu, koji generiše NADPH (potreban za sintezu masnih kiselina i drugih biomolekula) i ribozo-5-fosfat (potreban za sintezu nukleotida).

Masne kiseline takođe imaju različite metaboličke sudbine u jetri. Najčešće, masne kiseline su primarno metaboličko gorivo u jetri. Tako, kada su potrebe za energijom povećane, masne kiseline se potpuno oksiduju za potrebe sinteze ATP u samim hepatocitima, ili preko acetil-CoA koriste za sintezu ketonskih tijela, koja se eksportuju krvlju do mozga i ostalih ekstrahepatičnih tkiva kada je nedostupna glukoza (gladovanje, dijabetes i sl.). Ketonska tijela su tada jedini (glavni) izvor energije, posebno za mozak. Kada su energetske potrebe organizma zadovoljene, masne kiseline se koriste za sintezu triacilglicerola, koji se zajedno sa ostalim lipidima sintetisanim u jetri „pakuju“ u lipoproteine veoma male gustine (*engl.* very low density lipoproteins, VLDL) i krvlju dopremaju do masnog tkiva i ostalih organa. Takođe, tada se ceo „metabolički višak“ šećera i amino kiselina konvertuje do masnih kiselina i skladišti u formi triacilglicerola. Kvantitativno, jetra je centralno mjesto biosinteze lipida u organizmu sa oko 95% udela.

Generalno, „*futile cycle*“ tj. paralelna oksidacija i sinteza masnih kiselina u jetri je spriječena ćelijskom kompartmentalizacijom i inverznom regulacijom ova dva procesa. Međutim, pokazano je da neka tkiva u specifičnim uslovima odstupaju od ovog generalnog metaboličkog principa (BAT). I u jetri pacova je pokazana paralelna indukcija sinteze i razgradnje masnih kiselina tokom perioda aklimacije na hladnoću (Bedu i sar., 2001; Hauton i sar., 2006) ili pak nakon tretmana PPAR α (*engl.* peroxisome proliferator-activated receptor α) agonistima (Knight i sar., 2005).

Osim navedenog, jetra ima centralnu ulogu i u katabolizmu amino kiselina, produkciji uree, sintezi proteina krvne plazme, degradaciji porfirina i baza nukleinskih kiselina, skladištenju gvožđa i detoksikaciji ksenobiotika. Otuda nije iznenađujuće što se često naziva i „laboratorijom života“.

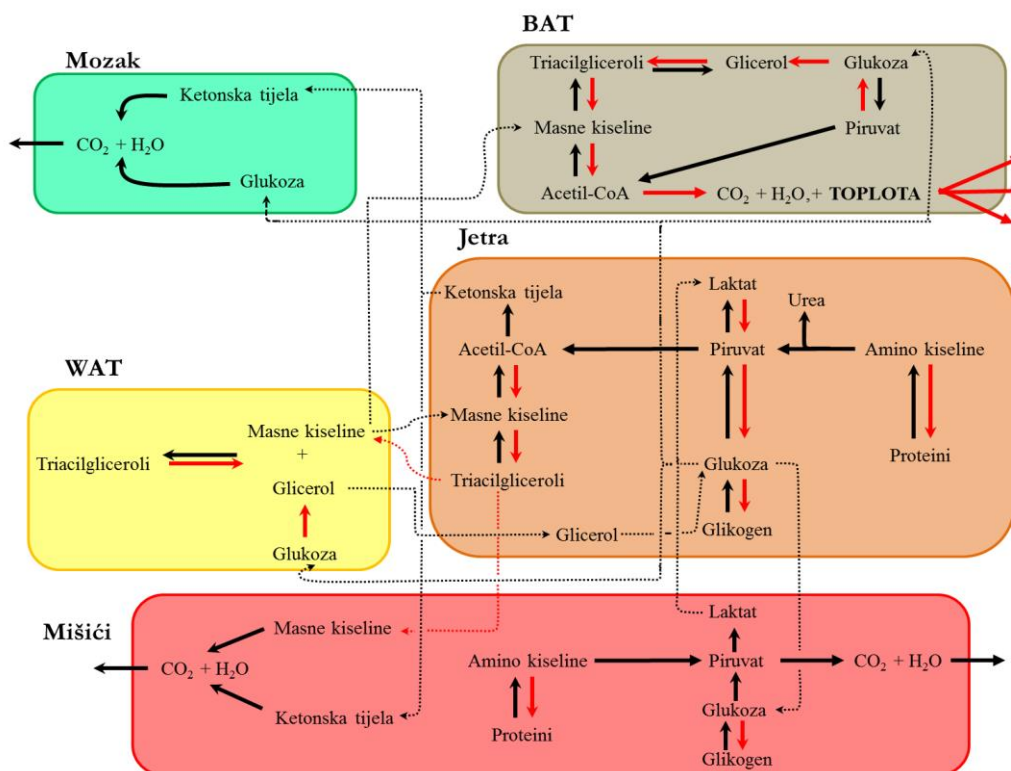
1.3.2. SKELETNI MIŠIĆI

Mišići koriste glukozu, masne kiseline i ketonska tijela kao energetske gorivo. U bazalnim uslovima u mišićima se glukoza skladišti u formi glikogena, koji može činiti 1-2% ukupne mase mišića. Ove rezerve glikogena u mišićima služe kao depo goriva, koji se lako konvertuje u glukozo-6-fosfat i ulazi u glikolizu, kada je to potrebno. Nasuprot jetri, mišići

ne mogu da eksportuju glukozu usled nedostatka enzima glukozo-6-fosfataze. Zato se u mišićima ne odvija glukoneogeneza. Adrenalin i insulin u miocitima primarno su odgovorni za regulaciju razgradnje i sinteze glikogena. Miociti posjeduju adrenergične receptore (β -AR), kojima posredstvom cAMP-zavisnog signalnog puta regulišu razgradnju glikogena. Na sličan način se u jetri, preko glukagona, kontroliše metabolički protok kroz glikolizu i glukoneogenezu. Tako, povećanje cAMP u jetri stimuliše razgradnju glikogena i glukoneogenezu, rezultujući u oslobađanju glukoze u krv, dok u mišićima povećanje nivoa cAMP aktivira razgradnju glikogena i glikolizu, što rezultira potrošnjom glukoze.

Mišićne kontrakcije zavise od energije koja se oslobodi hidrolizom ATP. U mirovanju skeletni mišići koriste oko 30% od ukupne potrošnje O_2 (Voet i Voet, 2004). Pri intenzivnom mišićnom radu, respiracija u miocitima može da se poveća i 25 puta i biva podržana još većom hidrolizom ATP. U mišićima koji se odmaraju primarno gorivo su masne kiseline iz masnog tkiva i ketonska tela iz jetre, a umereno aktivni mišići koriste i glukozu iz krvi. Pri pojačanoj mišićnoj aktivnosti prvo se mobilišu rezerve fosfokreatina za produkciju ATP. U uslovima maksimalnog napora (npr. tokom sprinta), rezerve fosfokreatina su dovoljne za svega 4 s rada. Tada mišići prelaze na glikolitičku produkciju ATP, jer su pri maksimalnoj aktivnosti potrebe za ATP toliko velike da prevazilaze cirkulatorni kapacitet da dopremi dovoljno brzo adekvatne količine kiseonika i goriva. Nastali laktat se krvlju transportuje do jetre (Kori ciklus), gdje se iz njega sintetiše glukozu u procesu glukoneogeneze. To se dešava u fazi oporavka od intenzivnog mišićnog rada, kada masne kiseline obezbjeđuju potrebni ATP za glukoneogenezu, oksidativnom fosforilacijom. To je razlog detektovane „odložene“ povećane potrošnje kiseonika.

Tokom drhteće termogeneze pokazano je da mišići koriste i glukozu i lipide kao izvor energije, što se može postići regrutacijom različitih populacija mišićnih vlakana koja su specijalizovana za korišćenje različitih metaboličkih goriva ili mobilizacijom različitih metaboličkih puteva u okviru istih vlakana (Meigal, 2002; Haman i sar., 2005). Štaviše pokazano je da je metabolizam ugljenih hidrata snažno stimulisan na samom početku procesa termogeneze, ali da ubrzo potom lipidi preuzimaju centralnu ulogu u energetske metabolizmu mišića (Vaillancourt i sar., 2009; Stančić i sar., 2013).



Slika 4. Metabolička i funkcionalna specijalizacija glavnih organa odgovornih za održanje energetske homeostaze (crvene strelice ukazuju na dominantne metaboličke puteve u bazalnim uslovima). BAT - *engl.* brown adipose tissue; WAT - *engl.* white adipose tissue (adaptirano iz Voet i Voet, 2004).

1.3.3. MRKO MASNO TKIVO

BAT ima visok kapacitet za preuzimanje glukoze, koja služi primarno kao lipogeni supstrat u ovom tkivu, a ne kao direktni supstrat za termogenezu (Cawthorne, 1989). Preuzimanje glukoze od strane BAT je stimulirano insulinom i noradrenalinom (Cawthorne, 1989), a odvija se prvenstveno preko insulin-osjetljivog GLUT4 (James i sar., 1989). Međutim, studije su pokazale da preuzimanje glukoze može biti i insulin nezavisno (Cooney i sar., 1985; Ma i Foster, 1986; Ferre i sar., 1986).

BAT ima veliki kapacitet za *de novo* sintezu masnih kiselina, koji može varirati u zavisnosti od aklimacione temperature tj. što je temperatura spoljašnje sredine niža to je veća brzina lipogeneze (Trayhurn, 1981). Kod miševa aklimiranih na nisku temperaturu, BAT može biti odgovoran za čak trećinu ukupne lipogeneze, što je veliki doprinos u odnosu i na jetru (Trayhurn, 1981). Visoka stopa lipogeneze odlikava potrebu BAT za masnim kiselinama kao osnovnim gorivom termogeneze. Takođe, mrki adipociti mogu obezbijediti masne kiseline i iz cirkulacije, bilo direktno ili u formi triacilglicerola. Prisutnost

lipoprotein lipaze u BAT omogućava korišćenje masnih kiselina iz triacilglicerola (Carneheim i sar., 1984).

FABP (*engl.* fatty acid-binding protein) iz BAT je izolovan i okarakterisan (Dutta-Roy i sar., 1993). FABP spada u familiju proteina koji su odgovorni za unutarćelijski transport i metabolizam masnih kiselina (Kaikaus i sar., 1990). S obzirom da su masne kiseline glavno metaboličko gorivo BAT, a uz to služe i kao unutarćelijski signal za aktivaciju translokacije protona, lipidni metabolizam u ovom tkivu je jako intenzivan. Ovo ukazuje da FABP igra važnu ulogu u procesu termogeneze BAT.

Intenziviranje β -oksidacije masnih kiselina, uz istovremeno dekuplovanje procesa respiracije i fosforilacije u BAT tokom neodrhteće termogeneze, spregnuto je sa povećanjem respiratornog kapaciteta ovog tkiva, što se ogleda u većem broju aktivnih mitohondrija sa paralelnim, pravilno postavljenim kristama i povećanju proteinske ekspresije komponenti OXPHOS (Suter, 1969a; 1969b; 1969c; Petrović i sar., 2010; Vučetić i sar., 2011).

1.3.4. BIJELO MASNO TKIVO

Ključna funkcija bijelog masnog tkiva (*engl.* white adipose tissue, WAT) je da skladišti i oslobađa masne kiseline u zavisnosti od energetske potrebe organizma.

Masno tkivo normalno-uhranjenog čovjeka od 70 kg sadrži približno 15 kg masti (590 000 kJ energija), što je dovoljno za održanje života oko 3 mjeseca (Voet i Voet, 2004). Najveći dio masnih kiselina WAT obezbijeduje iz cirkulišućih lipoproteina, formiranih u intestinumu (hilomikroni) ili jetri (VLDL partikule). Preuzete masne kiseline se konvertuju (aktiviraju) u odgovarajuće tioestre masnih kiselina (u reakciji sa acetyl-CoA), a potom se esterifikuju glicerol-3-fosfatom do triacilglicerola. Glicerol-3-fosfat u WAT nastaje u procesu gliceroneogeneze, skraćenoj verziji glukoneogeneze od piruvata do dihidroksiaceton fosfata.

Ukoliko je to organizmu potrebno, triacilgliceroli u adipocitima se hidrolizuju do slobodnih masnih kiselina i glicerola sinhronizovanom akcijom tri enzima: triacilglicerol lipaze, hormon senzitivne lipaze (HSL) i monoacilglicerol lipaze. Najveći dio slobodnih masnih kiselina (75%) se reesterifikuje u samim adipocitima do triacilglicerola, dok se ostatak oslobađa u cirkulaciju. Kod zdravih, odraslih ljudi nakon noćnog gladovanja pokazano je da se 20-30% oslobođenih masnih kiselina re-esterifikuje i ponovo vraća u lipidne rezerve (Reshef i sar., 2003).

1.3.4.1. Depoi WAT

WAT je distribuirano širom tijela, ali se pretežno nalazi ispod kože, subkutano WAT (sWAT) i u abdominalnoj duplji, visceralno WAT. Ova dva tipa masnog tkiva se značajno razlikuju po tipu adipocita, endokrinnoj funkciji, lipolitičkoj aktivnosti, odgovoru na insulin i druge hormone (Wajchenberg, 2000). Venska krv iz visceralnog WAT, zbog njegove anatomske lokalizacije, drenira se direktno u jetru preko portne vene. Portna drenaža visceralnog WAT obezbijuje direktan pristup slobodnih masnih kiselina jetri i adipokinima sekretovanim u visceralnim adipocitima.

WAT se sastoji od adipocita, drugih neadipocitnih ćelija, vezivnog matriksa, krvnih sudova i nervnih vlakana. Adipociti, koji čine najveći dio WAT, imaju primarnu ulogu u skladištenju energije u formi triacilglicerola. Novi, sitni adipociti služe kao moćni pufer koji vrlo efikasno apsorbuje slobodne masne kiseline i triacilglicerole u postprandijalnoj fazi, onemogućavajući njihovu depoziciju u neadipoznim tkivima, a takođe su i jako insulin-osjetljivi. Međutim, sa porastom, adipociti postepeno postaju disfunkcionalni. Tako je pokazano da su krupni adipociti hiperlipolitični i insulin-rezistentni, posebno na anti-lipolitičko dejstvo insulina. Pokazano je da visceralno WAT sadrži veći broj izrazito krupnih adipocita u odnosu na subkutani depo, koji se karakteriše većim prisustvom znatno sitnijih ćelija (Marin i sar., 1992; Misra i Vikram, 2003).

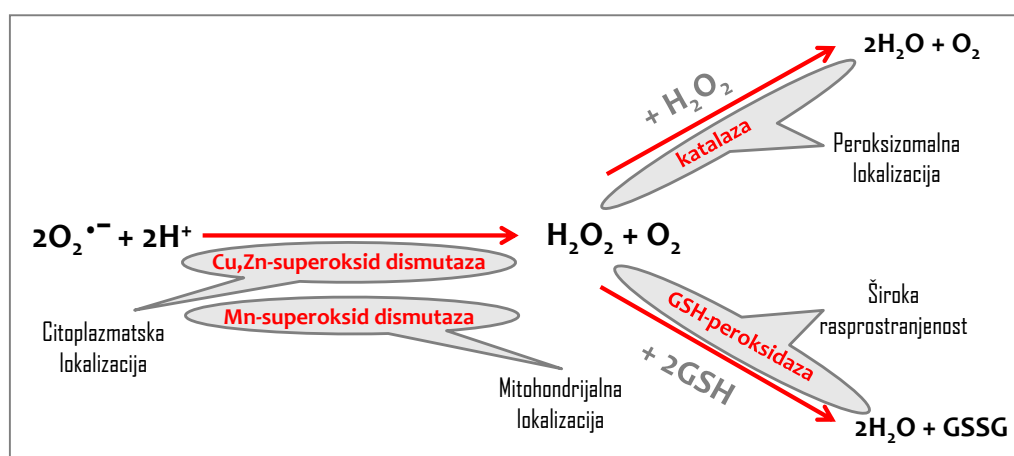
Osim toga, visceralni i subkutani depoi WAT značajno se razlikuju i po vaskularizaciji i inervaciji. Naime, visceralni depoi WAT se karakterišu većom vaskularizacijom, inervacijom i gustom glukokortikoidnih (Rebuffe-Scrive i sar., 1985), adrenergičnih (Krief i sar., 1993; Imbeault i sar., 2000) i androgenih (Freedland, 2004) receptora od sWAT, koji posjeduje veći kapacitet jedino za vezivanje estrogena (Pedersen i sar., 1996).

Visceralni adipociti su metabolički aktivniji i pokazuju veći lipolitički potencijal (Lemieux i Despres, 1994; Arner, 1995), a takođe i veći stepen insulin-zavisnog preuzimanja glukoze od adipocita sWAT, što je u vezi sa intenzivnijim metaboličkim obrtom masnih kiselina (lipoliza/reesterifikacij).

Osim toga, pokazano je da razlike postoje i između pojedinačnih depoa visceralnog WAT. Naime, pokazano je da se „pravi“ visceralni depoi WAT smješteni intraperitonealno – omentalno (oWAT), mezenterično (mWAT) i gonadalno (gWAT) tj. epididimalno (eWAT), razlikuju od depoa koji su smješteni izvan trbušne maramice – retroperitonealno

WAT (rWAT). Tako je kod ljudi pokazano da rWAT ima drugačiji noradrenalinom-stimulisan lipolitički odgovor u poređenju sa intraperitonealnim depovima, koji je sličan odgovoru sWAT (Rebuffe-Scrive i sar., 1989). Takođe, skorašnje studije su potvrdile i da je rWAT podložniji „browning“ efektu, tj. pojavi „brite/beidge“ adipocita prilikom aklimacije na nisku temperaturu od drugih visceralnih depova poput eWAT (Walden i sar., 2012). Time je rWAT po mnogim metaboličkim karakteristikama negdje „između“ visceralnih i potkožnih depova.

Očigledno je da metaboličke i endokrine karakteristike različitih depova WAT određuju njihovu specifičnu ulogu u održanju ukupne energetske homeostaze.



Slika 5. Shematski prikaz prve linije antioksidativne odbrane i njena unutarćelijska kompartmentalizacija.

1.4. Antioksidativna odbrana u odgovoru na metaboličko remodeliranje

Oksidativni metabolizam je kuplovan sa produkcijom reaktivnih vrsta kiseonika (*engl.* reactive oxygen species, ROS). Održanje ćelijske redoks homeostaze u uslovima povećane produkcije ROS postiže se proporcionalnom aktivacijom endogene antioksidativne odbrane (*engl.* antioxidant defense, AD) (Halliwell i Gutteridge, 1990; Halliwell i sar., 1992; Johnson, 2002). Ćelijska AD obuhvata širok spektar enzimskih i neenzimskih komponenti (Aruoma, 1996). Prvu liniju AD čine CuZn i Mn superoksid dismutaza (*engl.* superoxide simutases, SODs, EC 1.15.1.1), glutation peroksidaza (GSH-Px, EC 1.11.1.19) i katalaza (EC 1.11.1.6).

Kompartimentalizacija metaboličkih procesa unutar ćelije uslovlila je i subćelijski-specifičan odgovor komponenti AD (Halliwell i Gutteridge, 1990; Mates, 2000) (Slika 5). Tako se u mitohondrijama nalazi MnSOD izoforma, koja uklanja superoksid anjon radikal

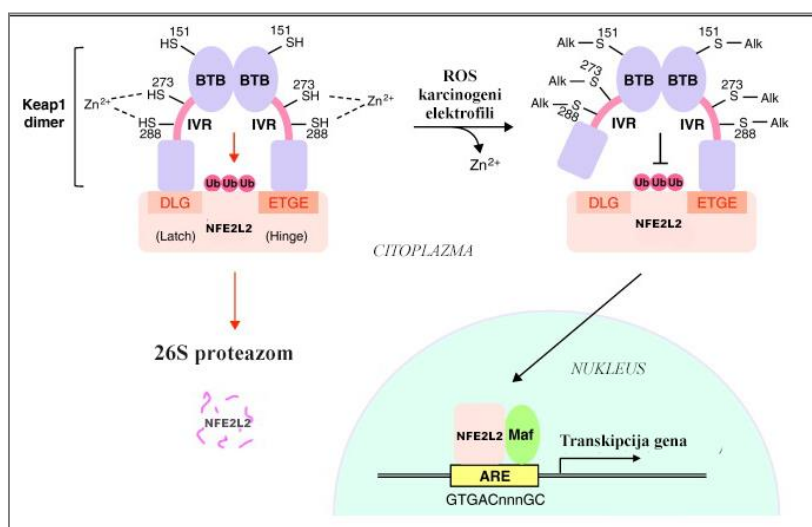
(O_2^{\bullet}) nastao primarno tokom respiracije ili β -oksidacije u ovom kompartmentu (Guan i sar., 1998; Majima i sar., 1998). Istu funkciju u citoplazmi obavlja druga SOD izoforma - CuZnSOD (Majima i sar., 1998). Obje izoforme SOD katalizuju istu reakciju, dismutaciju O_2^{\bullet} uz sukcesivnu oksidaciju i redukciju jona prelaznog metala u aktivnom mjestu prema ping-pong mehanizmu (Hsieh i sar., 1998). U ovoj reakciji nastaje vodonik peroksid (H_2O_2), koji nije radikal, ali je jako reaktivan, te se brzo uklanja uglavnom GSH-Px i katalazom. GSH-Px je široko rasprostranjena. Nalazi se u mitohondrijama, citoplazmi, jedru, membranskoj frakciji i ekstraćelijskom prostoru (Freeman i Meredith, 1988). GSH-Px redukuje perokside masnih kiselina i H_2O_2 do vode, koristeći GSH kao donor elektrona. Peroksizomi su mjesto najveće produkcije H_2O_2 (Reddy i Hashimoto, 2001). Naime, u peroksizomima se takođe odigrava β -oksidacija masnih kiselina. Ona se razlikuje od mitohondrijalne β -oksidacije po tome što se u prvoj reakciji elektroni predaju direktno kiseoniku uz produkciju H_2O_2 . Glavni enzim koji uklanja H_2O_2 u peroksizomima je katalaza (Chance i sar., 1979).

1.4.1. NFE2L2

Transkripcioni faktor NFE2L2 (*engl.* nuclear factor (erythroid-derived-2)-related factor 2) ima vitalnu ulogu u citoprotektivnom odgovoru na endogeni ili egzogeni stres izazvan ROS ili elektrofilima (Kansanen i sar., 2012). NFE2L2 se zajedno sa malim Maf proteinima vezuje za ARE (*engl.* antioxidant response elements) sekvence u regulatornim regionima targetnih gena, regulišući njihovu ekspresiju (Kansanen i sar., 2013). Među genima koji posjeduju ARE sekvencu u regulatornom regionu su geni čiji produkti imaju protektivnu ulogu (hem oksigenaza 1), uklanjanju ROS (CuZnSOD i katalaza), učestvuju u detoksifikaciji ksenobiotika (glutation S-transferaza, NAD(P)H:hinon oksidoreduktaza 1) i sintezi GSH (γ -glutamilcistein sintetaza) (Kensler i sar., 2007; Kensler i Wakabayashi, 2010).

U bazalnim uslovima NFE2L2 se nalazi u citoplazmi vezan za represorni protein Keap1 (*engl.* Kelch ECH associating protein 1), koji stimuliše njegovu degradaciju kroz proteazomalni put (Kansanen i sar., 2013), tako da je polu-život NRF2L2 u bazalnim uslovima oko 20 minuta (Kobayashi i sar., 2004). Keap1 je veoma bogat cisteinima, koji se u *in vitro* uslovima lako modifikuju oksidantima i elektrofilima (Kansanen i sar., 2009). Pokazano je da oksidacija tri cisteina - C151, C273 i C288 ima presudnu ulogu u promjeni konformacije Keap1, što za posledicu ima disocijaciju i translokaciju NFE2L2 u nukleus

(Taguchi i sar., 2011). Prema “šarka-reza” (*engl.* „hinge and latch”, Slika 6) modelu, jedan molekul NFE2L2 se vezuje za dva molekula Keap1 različitim afinitetom. Modifikacija Cys ostataka u Keap1 vodi raskidanju slabije interakcije („reza”), dok jača interakcija ostaje netaknuta („šarka”) (Tong i sar., 2006). Tako je, u prisustvu ARE-inducera, NFE2L2 vezan za Keap1 na način koji sprečava njegovu ubikvitinaciju i degradaciju. Kada akumulacija NFE2L2 u citoplazmi prevaziđe kapacitete vezivanja Keap1, višak NFE2L2 se translocira u nucleus, gdje zajedno sa Maf proteinima stimuliše transkripciju specifičnih gena (Kobayashi i Yamamoto, 2006; Kensler i Wakabayashi, 2010).



Slika 6. Aktivacioni mehanizam NFE2L2-ARE puta - „šarka i reza“ („hinge and latch“) model (adaptirano iz Hur i Gray, 2011).

1.5. Regulacija energetskeg metabolizma

Regulacija energetske homeostaze je fundamentalan proces za svaki organizam. U ćelijama se koncentracija ATP održava na relativno visokom nivou (obično 10 puta iznad koncentracije ADP).

Danas je prihvaćeno gledište da se regulacija metabolizma u složenim sistemima zasniva na tri glavna tipa kontrole: 1) alosterna kontrola ključnih enzima metaboličkih puteva; 2) kovalentne modifikacije enzima; 3) transkripciona regulacija. Prva dva mehanizma regulacije podrazumijevaju promjenu konformacije ciljnog enzima, što često

rezultuje promjenom protein-protein interakcija. Na osnovu dosadašnjeg znanja, jasno je da se kontrola metabolizma najčešće ostvaruje koordinisanom aktivnošću više mehanizama.

1.5.1. AMP-aktivirana protein kinaza

Neophodnost održanja energetske homeostaze tokom evolucije uslovlila je razvoj brojnih mehanizma koji „osjećaju“ i veoma brzo reaguju na najmanje promjene u energetskom statusu. Sistem koji se pojavljuje kao ključni faktor regulacije ukupne energetske homeostaze je AMP-aktivirana protein kinazna (AMPK) kaskada.

AMPK se aktivira veoma brzo u odgovoru na depleciju ATP (Hardie i sar., 1998; 2003), koja vodi posledičnom povećanju odnosa AMP:ATP (Corton i sar., 1994). Kada se jednom aktivira, ova kinaza fosforiliše brojne enzime, a posledica ovog je „gašenje“ puteva potrošnje ATP, poput sinteze masnih kiselina i aktiviranje puteva produkcije ATP, kao što je oksidacija masnih kiselina (Hardie i sar., 1998; Kemp i sar., 1999). Pored akutnog uticaja na energetski metabolizam, AMPK pokazuje i dugoročne efekte, koje ostvaruje uticajem na proces genske i proteinske ekspresije (Foretz i sar., 1998; Winder i sar., 2000). Ključni efekti aktivacije AMPK na glukozni i lipidni metabolizam u jetri, skeletnim mišićima, WAT i srčanom mišiću prikazani su shematski na Slici 7.

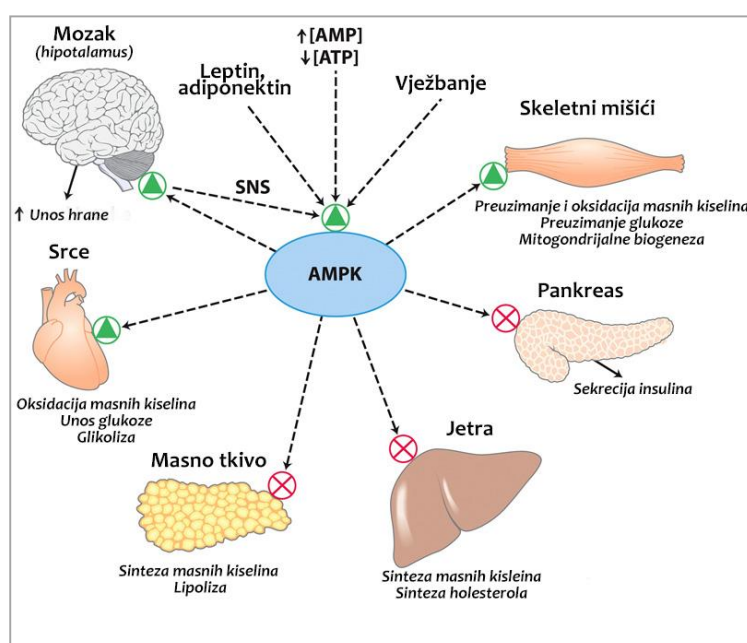
Jedan od proteina koji je pod kontrolom AMPK jeste bifunkcionalni enzim PFK-2/FBPaza-2 (inducibilna i izoforma prisutna u srcu). Fosforilacijom ovog enzima aktivira se njena PFK-2 aktivnost i time koncentracija fruktozo-2,6-bisfosfata, aktivatora PFK-1 i glikolize. U slučajevima limitirane dostupnosti O₂ za OXPHOS i pada koncentracije ATP, aktivacija AMPK vodi intenziviranju glikolitičke produkcije ATP.

U jetri, aktivacija AMPK vodi fosforilaciji i inhibiciji nekih enzima kao što je ACC, koja katalizuje prvi korak sinteze masnih kiselina i hidrosimetilglutaril-CoA reduktaze,, koja katalizuje ključni korak sinteze holesterola. Sa druge strane AMPK inhibira glukoneogenezu. Naime, ona fosforiliše i time inhibira transkripcioni faktor TORC2 (*engl.* transducer of regulated CREB protein 2), koji u saradnji sa transkripcionim aktivatorom CREB (*engl.* cAMP response element-binding protein) vodi indukciji genske ekspresije *Pck*. Drugim riječima, deplecija ATP i posledična inaktivacija AMPK vodi inhibiciji svih biosintetskih puteva u jetri (Voet i Voet, 2004).

Posledica aktivacije AMPK u skeletnim mišićima jeste intenzivirana β-oksidacija i povećano preuzimanje glukoze od strane miocita. Naime, kao i u jetri, u skeletnim mišićima

AMPK fosforiliše i inaktivira ACC, što za posledicu ima oslobađanje CPT I od inhibicije malonil-CoA i posledičnu translokaciju masnih kiselina u mitohondrije radi oksidacije. Takođe, AMPK indukuje ekspresiju i translokaciju GLUT4 receptora u membranu miocita, čime olakšava ulazak glukoze u ove ćelije, a vodi i supresiji sinteze glikogena preko inhibicije GS.

U WAT, AMPK inhibira sintezu masnih kiselina fosforilacijom ACC. Međutim, ovaj energetska senzor u adipocitima vodi inhibiciji i lipolize, fosforilacijom i inhibicijom HSL, što, imajući u vidu da slobodne masne kiseline značajno doprinose održanju energetska balansa u ćeliji, može delovati paradoksalno.



Slika 7. Ključni efekti aktivacije AMPK na glukozni i lipidni metabolizam u jetri, skeletnim mišićima, WAT i srčanom mišiću (adaptirano iz Nelson i Cox, 2005).

1.5.2. Hipoksija inducibilni faktor-1

Oksidativni metabolizam predstavlja centralno mjesto energetska metabolizma. Sredinom XIX vijeka, Luj Paster je pokazao da se ukoliko se kvasac gaji u anaerobnim uslovima, potrošnja glukoze i produkcija etanola povećava (Pasterov efekat). Slično se dešava i u mišićima sisara. Koncentracija laktata dramatično opada kada ćelije pređu na aerobni metabolizam.

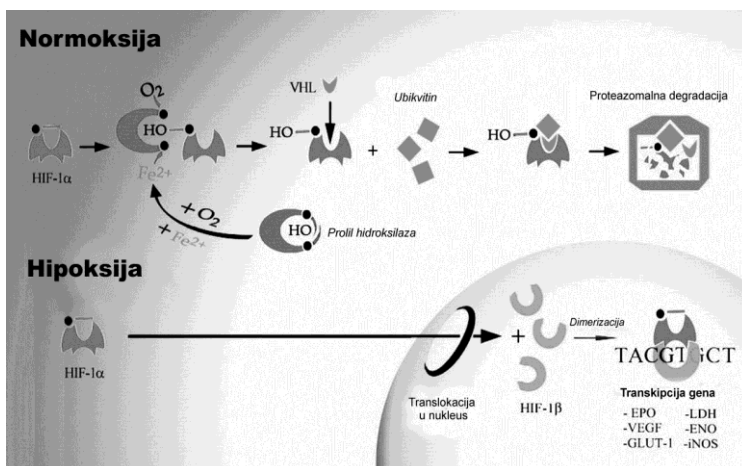
Hipoksija se definiše kao redukcija količine kiseonika ili njegove dostupnosti ćelijama, tkivima ili organizmu. Može biti kontinuirana (visoka nadmorska visina), akutna

(prolazni odgovor posredovan post-translacionim modifikacijama postojećih proteina), hronična (posredovan genskom transkripcijom i sintezom proteina). Hipoksija može biti i sistemska (boravak na planini) ili lokalna (infarkt miokarda).

Normoksija i hipoksija su relativni pojmovi. Normalna koncentracija kiseonika kojem su izložene pojedine ćelije u našem tijelu varira od 21% (gornji disajni putevi) do 1% (granica između korteksa i medule u bubrezima). To odgovara parcijalnom pritisku kiseonika od 150 mmHg do 7 mmHg. Biolozi normoksičnom smatraju koncentraciju kiseonika od 20%, kako i gaje ćelijske kulture, bez obzira što je aktuelna koncentracija kiseonika u ćelijama mnogo manja. Hipoksično stanje je još relativnije u odnosu na smanjenje koncentracije kiseonika, sa najvećim odgovorom pri koncentracijama od 1%.

U normoksičnim uslovima, ATP se najvećim dijelom obezbijuje OXPHOS, dok u uslovima limitirane dostupnosti O₂ glikoliza obezbijuje neophodni ATP. Ključni regulator energetskeg metabolizma u hipoksičnim uslovima je hipoksija inducibilni faktor-1 (*engl.* hypoxia-inducible factor 1, HIF-1). Otkriven je 1991. godine kao protein potreban za indukciju transkripcije humanog gena za eritropoetin u hipoksičnim stanjima (Semenza i sar., 1991).

HIF-1 je transkripcioni faktor odgovoran za indukciju gena koji omogućavaju adaptaciju i preživljavanje ćelija i čitavog organizma u uslovima smanjene koncentracije O₂, a posebno hipoksičnim (Wang i sar., 1995; Semenza, 1998). HIF-1 je heterodimerni protein izgrađen od konstitutivno eksprimirane β subjedinice i O₂-regulisane HIF-1α subjedinice (Wang i sar., 1995). Nivo HIF-1α subjedinice je određen relativnim odnosom njene sinteze i razgradnje. Pod normoksičnim uslovima, HIF-1 se promptno razgrađuje (polu-život ~5 min) (Wang i sar., 1995; Salceda i Caro, 1997). Sa druge strane, u uslovima smanjene dostupnosti kiseonika, HIF-1α postaje stabilizovan, nakon čega se translocira iz citoplazme u nukleus, gdje se dimerizuje sa HIF-1β. Ovakav HIF-1 kompleks je transkripciono aktivan (Huang i sar., 1996; Kallio i sar., 1997) (Slika 8). Eksperimenti na HeLa ćelijama izlaganih precizno definisanim koncentracijama O₂ pokazali su da smanjenje koncentracije sa 20% na 6% rezultira povećanjem ekspresije HIF-1α proteina od dva puta. Pri koncentraciji kiseonika od 0.5% indukcija je deset puta veća, sa srednjim vrednostima pri koncentraciji od 1,5-2%. Precizna regulacija stabilizacije i transkripcione funkcije HIF-1α, nalazi se prvenstveno pod kontrolom je posttranslacionih modifikacija poput hidroksilacije, ubikvitinacije, acetilacije i fosforilacije (Brahimi-Horn i sar., 2005).



Slika 8. HIF-1 α u normoksičnim uslovima biva brzo degradovan kroz ubikvitin-proteazomalni put, dok u uslovima limitirane dostupnosti O₂ dolazi do njegove stabilizacije, translokacije u nukleus, dimerizacije sa HIF-1 β i posledične aktivacije transkripcije (adaptirano iz La Manna i sar., 2004).

HIF-1 aktivira transkripciju gena vezujući se za 50 baznih parova dugu HRE (*engl.* hypoxia response element) sekvencu, koja se nalazi u enhenseru i promotorskim regionima targetnih gena (Semenza i sar., 1991). Do danas je poznato više od 100 gena koji se nalaze pod regulacijom HIF-1 (Ke i Costa, 2006):

- Eritropoeza/metabolizam gvožđa - U odgovoru na hipoksiju, kapacitet eritrocita da transportuju O₂ je stimulisan ekspresijom gena eritropoeze i metabolizma gvožđa. Na ovaj način se povećava dopremanje O₂ do tkiva i njihova oksigenacija (Semenza i sar., 1991; Rolfs i sar., 1997; Bianchi i sar., 1999; Lok i Ponka, 1999; Tacchini i sar., 1999).
- Angiogeneza - Pokazano je da se ekspresija velikog broja gena, čiji su proteinski produkti uključeni u različite stupnjeve angiogeneze, povećava u odgovoru na hipoksiju (Levy i sar., 1995; Bunn i Poyton, 1996; Berra i sar., 2000; Giordano i Johnson, 2001; Semenza, 2002). Među njima vaskularni endotelijalni faktor rasta (VEGF) je najpotentniji mitogen specifičan za endotel, koji direktno učestvuje u angiogenezi tako što mobilizuje endotelske ćelije u hipoksičnoj i avaskularnoj oblasti, stimulišući njihovu proliferaciju (Neufeld i sar., 1999; Josko i sar., 2000; Conway i sar., 2001). Na ovaj način HIF-1 vodi povećanju vaskularizacije i smanjuje difuzionu distancu za kiseonik. Takođe, HIF-1 reguliše i gene čiji proteinski produkti kontrolišu vaskularni tonus, poput inducibilne azot oksid sintaze (iNOS) (Melillo i sar., 1995), hem oksigenaze 1 (Lee i sar., 1997), endotelina 1 (Hu i sar., 1998) i α_{1B} -AR, kao i i gene uključene u remodeliranje matriksa i

sazrijevanje krvnih sudova (Kietzmann i sar., 1999; Takahashi i sar., 2000; Ben-Yosef i sar., 2002).

- Metabolizam glukoze - U uslovima limitirane količine O₂, ćelije prelaze na O₂-nezavisni put produkcije ATP - glikolizu (Dang i Semenza, 1999; Seagroves i sar., 2001). Ključnu ulogu u ovom metaboličkom reprogramiranju ima HIF-1, koji stimuliše ekspresiju enzima glikolitičkog puta, kao i transportere za ulazak glukoze (GLUT 1 i 3) (Chen i sar., 2001). Čak je pokazano da glikolitički metabolički produkti - laktat i piruvat indukuju akumulaciju HIF-1 α u normoksičnim uslovima, na taj način ostvarujući pozitivnu *feedback* petlju (Lu i sar., 2002).

Osim pomenutog, HIF-1 utiče i na povećano preživljavanje ćelija (Feldser i sar., 1999; Krishnamachary i sar., 2003), adipogenezu (Yun i sar., 2002), formiranje karotidnih tjelašca (Kline i sar., 2002) i razvoj B limfocita (Kojima i sar., 2002).

1.5.3. PPAR

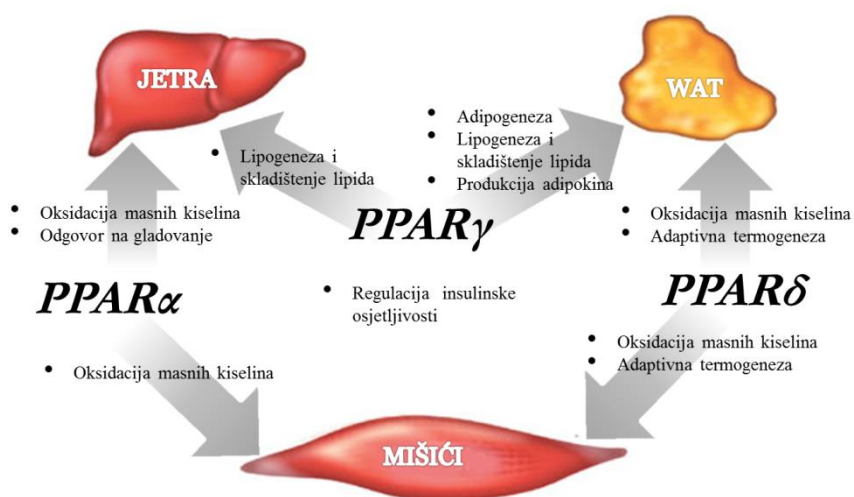
Prvi genski senzor lipida identifikovan je 1990. godine i označen je kao PPAR, zbog sposobnosti da vezuje ligande koje indukuju proliferaciju peroksizoma (Issemann i Green, 1990). Kasnije studije su identifikovale dva srodna receptora poznata kao PPAR β/δ i PPAR γ (Dreyer i sar., 1992). Članovi ove superfamilije nukleusnih receptora (PPARs) kontrolišu složenu mrežu gena i time čine transkripcione temelje metabolizma (Chawla i sar., 2001). S obzirom da mogu biti aktivirani dijetarnim masnim kiselinama ili njihovim metaboličkim derivatima, PPARs služe kao lipidni senzori. Tri člana PPAR familije imaju različitu tkivnu distribuciju, a nekada i suprotne funkcije (Slika 9). Tako su PPAR α i PPAR γ primarno prisutni u jetri i masnom tkivu, dok je PPAR δ široko rasprostranjen u organizmu.

PPAR γ je glavni regulator adipogeneze i lipogeneze (Rosen i Spiegelman, 2000). Do danas je detektovano svega nekoliko gena u WAT čija ekspresija nije pod kontrolom PPAR γ . To su između ostalih geni za: FABP, acetil-CoA sintetaza i Pck (Kersten i sar., 2000; Yoon i sar., 2000). Osim toga, PPAR γ vodi i sistemske insulinske senzitivizaciji (Forman i sar., 1995; Lehmann i sar., 1995). Mehanizam koji vodi ka povećanju insulinske osjetljivosti još uvijek je nepoznat, ali vjerovatno uključuje stimulaciju adipogenog potencijala masnog tkiva, čime se smanjuje lipotoksičnost u mišićima i jetri (Yamauchi i sar., 2001; Guan i sar., 2002) i/ili modulaciju endokrine funkcije masnog tkiva, tj. lučenja

faktora poput rezistina i adiponektina (Combs i sar., 2001; Stepan i sar., 2001; Yamauchi i sar., 2001; Rajala i sar., 2003).

PPAR α je prvenstveno eksprimiran u jetri i u manjoj mjeri u srcu i mišićima, i ima ključnu ulogu u kontroli oksidacije masnih kiselina (Reddy i Hashimoto, 2001). Tokom noćnog ili dugotrajnog gladovanja, masne kiseline se oslobađaju iz WAT i transportuju u jetru, gdje je ekspresija PPAR α stimulirana (Kersten i sar., 1999). Aktivacija PPAR α , dalje, stimuliše oksidaciju masnih kiselina u jetri, čime se generišu ketonska tijela kao energetski izvor za periferna tkiva. Ova indukcija katabolizma lipida ostvaruje se preko indukcije genske ekspresije niza enzima uključenih u mitohondrijalnu i peroksizomalnu β -oksidaciju, preuzimanje i transport masnih kiselina, formiranje i transport lipoproteina (Aoyama i sar., 1998; Motojima i sar., 1998).

PPAR δ je bio dugo vremena bio zanemaren u poređenju sa preostala dva člana PPAR superfamilije kako zbog svoje široke rasprostranjenosti, tako i zbog ne postojanja selektivnog liganda. Međutim, genomske studije i novo-sintetisani agonisti PPAR δ ukazali su na značaj PPAR δ u regulaciji katabolizma masnih kiselina i održanju energetske homeostaze (Peters i sar., 2000; Barak i sar., 2002). Tako je pokazano da se pod transkripcionom kontrolom PPAR δ nalaze geni uključeni u oksidaciju masnih kiselina i adaptivnu termogenezu (Wang i sar., 2003), što ukazuje na ključnu ulogu PPAR δ u sagorijevanju masti, slično PPAR α , a suprotno od lipogene funkcije PPAR γ (Wang i sar., 2003).



Slika 9. Metabolička integracija PPARs. Tri izoforme PPAR koordinovanom aktivnošću regulišu homeostazu lipida i glukoze u jetri, mišićima i WAT (adaptirano iz Evans i Barish, 2004).

1.5.4. Nukleusni respiratorni faktori

Mitochondrije su centralno mjesto oksidativnog metabolizma (oksidacija piruvata, β -oksidacija masnih kiselina, oksidacija amino kiselina i OXPHOS), te i mjesto najveće produkcije hemijske energije, ATP, u ćeliji. Mitochondrije posjeduju sopstveni genom, cirkularni dvolančani DNK (mtDNK) molekul. Svaka od stotina, hiljada mitochondrija (ili oko 200 000 mitochondrija u jajnim ćelijama) ima 2 do 5 kopija ovog genoma. Humani mitochondrijalni hromozom ima 37 gena koji kodiraju 13 subjedinica proteina respiratornog lanca (kompleksa I, III, IV i ATP sintaze), 22 tRNK i 2 rRNK (Wallace, 2005; Bonawitz i sar., 2006). Ostale komponente sistema OXPHOS, kao i geni za više od hiljadu drugih mitochondrijalnih proteina (enzima) kodirani su nukleusnim genomom.

U sisarskim ćelijama dvije klase regulatornih proteina su odgovorne za koordinaciju transkripcije gena između mitochondrija i nukleusa. Prvu klasu čine transkripcioni faktori koji se vezuju za promotorske sekvence nukleusnih i mitochondrijalnih gena i koji funkcionišu u saradnji sa mitochondrijalnom RNK polimerazom (Gaspari i sar., 2004; Bonawitz i sar., 2006). Drugu grupu čine transkripcioni faktori koji regulišu ekspresiju nukleusnih gena čiji su proteinski produkti esencijalni za ekspresiju komponenti respiratornog lanca i biološku funkciju mitochondrija vezanu za OXPHOS (Scarpulla, 2006). Nukleusni respiratorni faktori (*engl.* nuclear respiratory factors, Nrfs) spadaju u ovu drugu grupu koordinatora ekspresije mitochondrijalnih proteina.

Nrf1 posjeduje jedinstven DNK-vezujući domen za koji se vezuje u formi homodimera i djeluje kao pozitivni regulator transkripcije nukleus-kodiranih subjedinica svih pet kompleksa OXPHOS (Virbasius i sar., 1993, Scarpulla, 2002a; 2002b; Kelly i Scarpulla, 2004). Štaviše, Nrf1 djeluje na brojne nukleusne gene koji su indirektno odgovorni za respiratornu funkciju mitochondrija. Tu spadaju geni koji kodiraju enzime biosintetskog puta hema (Braidotti i sar., 1993; Aizencang i sar., 2000) i faktore odgovorne za konformaciju kompleksa COX (Takahashi i sar., 2002). Takođe, studije su pokazale da Nrf1 ima veoma važnu ulogu u mitochondrijalnoj biogenezi *in vivo* (Kelly i Scarpulla, 2004; Scarpulla, 2006).

Transkripcioni faktor Nrf2 se sastoji od 5 subjedinica: α , β_1 , β_2 , γ_1 i γ_2 , od koji se α subjedinica vezuje za mjesto na DNK koje sadrži karakteristični ponavljajući GGAA motiv. Ostale subjedinice asociraju sa Nrf2 α formirajući heterodimerne i heterotetramerne komplekse (Virbasius i sar., 1993). Nrf2 je inicijalno detektovan kao faktor koji stimuliše

ekspresiju COXIV i COXVb (Virbasius i Scarpulla, 1991; Carter i sar., 1992; Virbasius i sar., 1993; Sucharov i sar., 1995), međutim danas se zna da je njegova uloga esencijalna za ekspresiju svih 10 nukleusno-kodiranih subjedinića COX (Ongwijitwat i Wong-Riley, 2005), tri od četiri subjediniće kompleksa II (Au i Scheffler, 1998; Elbehti-Green i sar., 1998; Hirawake i sar., 1999), kao i mitohondrijalnih transkripcionih faktora (Virbasius i Scarpulla, 1994).

1.6. PGC-1 α

PPAR γ koaktivator-1 (PGC-1) predstavlja centralno mjesto integracije aktivnosti brojnih transkripcionih faktora. Naime, PGC-1 se direktno ne vezuje za DNK, ali interaguje sa velikim brojem transkripcionih faktora, među kojima su Nrf, PPAR i Tcf, aktivirajući ih. α izoforma PGC-1 je u velikoj mjeri eksprimirana u tkivima koja se karakterišu intenzivnim oksidativnim metabolizmom, poput BAT, srca, skeletnih mišića i bubrega. Takođe, u uslovima povećanih energetskehtkih zahtijeva (izlaganje hladnoći, vježbanje i gladovanje) ekspresija PGC-1 α biva značajno stimulirana.

Mitohondrijalna biogeneza zahtijeva učesće nekoliko transkripcionih faktora, kao što su Nrf, PPAR i EER (*engl.* estrogen-related receptors), koji aktiviraju ekspresiju gena čiji su proteinski produkti uključeni u oksidaciju masnih kiselina, OXPHOS i AD. PGC-1 α , ko-aktivirajući i kontrolišući ekspresiju ove mreže transkripcionih faktora, predstavlja centralno mjesto usklađivanja spoljnih fizioloških stimulusa i regulacije mitohondriogeneze (Ventura-Clapier i sar., 2008).

PGC-1 α -zavisna koordinacija transkripcione aktivnosti se najbolje vidi na primeru PPAR γ . Naime, PPAR γ *per se* igra važnu ulogu u razvoju adipogenog fenotipa kako u WAT, tako i u BAT (Barak i sar., 1999). Međutim, tokom aklimacije na hladnoću, PPAR γ u saradnji sa PGC-1 α indukuje BAT-specifični program, povećanjem ekspresije UCP1 i biogeneze/aktivnosti mitohondrija (Puigserver i sar., 1998; Seale i sar., 2007; Kajimura i sar., 2009; Petrović i sar., 2010). PGC-1 α interaguje i sa drugim nukleusnim hormonskim receptorima poput PPAR α , receptorom retinoične kiseline i tireoidnim receptorom, indukujući ekspresiju UCP1 (Liu i Lin, 2011). U saradnji sa PPAR α , PGC-1 α reguliše ekspresiju enzima ključnih za transport i oksidaciju masnih kiselina, koordinišući aktivnost puta β -oksidacije masnih kiselina i biogeneze mitohondrija (Vega i sar., 2000).

U skeletnim mišićima PGC-1 α je visoko eksprimiran i indukovano, npr. tokom vježbanja (Goto i sar., 2000; Baar i sar., 2002). Signalizacija preko kalcineurina i Ca²⁺-zavisnih protein kinaza ima važnu ulogu u indukciji PGC-1 α (Wu i sar., 2002; Akimoto i sar., 2005). Interesantno je da povećana ekspresija PGC-1 α u brzo-grčecim (glikolitičkim) mišićima indukuje njihovu konverziju u sporo-grčecim (oksidativne) mišićima, koji se karakterišu povećanom mitohondrijalnom biogenezi i aktivnošću (Lin i sar., 2002).

PGC-1 α ima veoma važnu ulogu u metaboličkom remodeliranju jetre tokom perioda gladovanja. Naime, tokom perioda smanjenog unosa hrane PGC-1 α koordiniše aktivnost niza transkripcionih faktora, na taj način indukujući između ostalog glukoneogenezu, β -oksidaciju masnih kiselina i ketogenezu (Yoon i sar., 2002; Lin i sar., 2005).

1.7. Hibernacija kod sisara

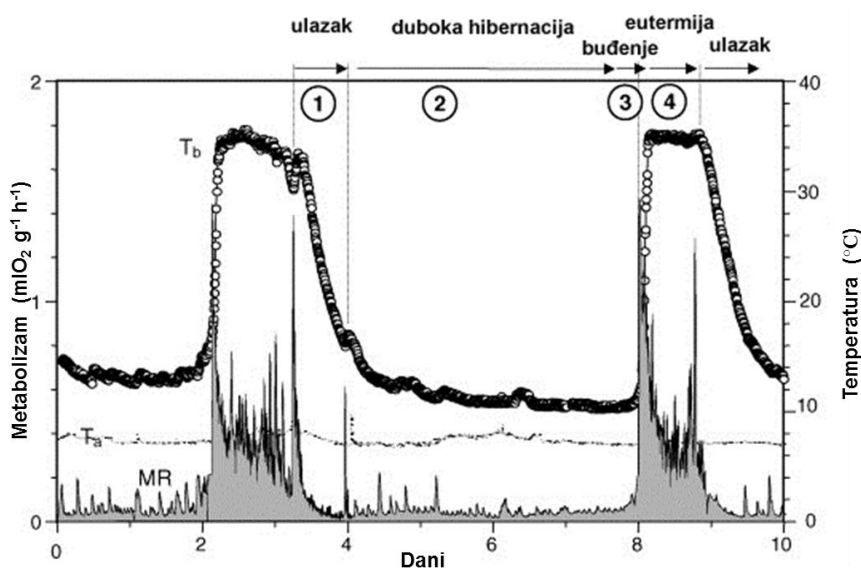
Kao što je već naznačeno sisari spadaju u grupu homeotermnih organizama, koji održavaju svoju tjelesnu temperaturu konstantnom na ~ 37 °C. Međutim, gotovo svi sisari pokazuju bar manje fluktuacije tjelesne temperature npr. tokom buđenja ili sna. Takođe, mnogi podliježu značajnom smanjenju tjelesne temperature tokom dnevnog torpora, čime se postiže ušteda energije tokom nekoliko sati neaktivnosti. Posebno interesantan vid heterotermije kod homeotermnih sisara jeste sezonska hibernacija.

Do danas je fenomen hibernacije opisan kod osam različitih grupa sisara: monotremata, torbara, glodara, slijepih miševa, ročica, insektivora, primata (neki lemuri) i mesoždera (medvjed) (Geiser, 2004). Ipak najveća rasprostranjenost ovog fenomena je među glodarima i slijepim miševima, koji su zbog toga i najviše ispitivani.

Tokom dugih zimskih mjeseci koji se karakterišu niskom ambijentalnom temperaturom i nedostatkom hrane, neki sisari ulaze u fazu hibernacije, koja se sastoji od niza torpidnih (hipotermično-hipometaboličkih) perioda koji traju nekoliko dana, a međusobno su ispresjecani periodima budnosti i eutermije koji traju obično do 24h (Slika 10, revija Carey i sar., 2003). Tokom torpora tjelesna temperatura životinja se snižava na svega nekoliko stepeni od ambijentalne, dok je brzina metabolizma obično suprimirana na svega 5% od vrijednosti koja je zabilježena pri bazalnim, eutermičnim uslovima (Carey i sar., 2003). Takođe, brojne fiziološke funkcije su obustavljene, dok druge nastavljaju da se dešavaju ali znatno manjom brzinom. Tako je pokazano da se brzina rada srca u fazi

duboke hibernacije suprimira sa 200-300 na 3-5 otkucaja/min (Zatzman, 1984), respiracija sa 100-200 na 4-6 udaha/min, često uz duge periode apnee (McArthur i Milsom, 1991), dok je renalna funkcija smanjena ili potpuno ugašena (Zatzman, 1984). Na ovaj način, hibernirajuća životinja uspijeva da „uštedi“ i do 90% energije, koja bi joj inače bila potrebna da održi eutermiju u datim uslovima (Wang i sar., 1988).

Priprema za hibernaciju počinje krajem ljeta, kada životinja prolazi kroz period hiperfagije i posledičnog povećanja lipidnih rezervi (uglavnom uskladištenih u vidu triacilglicerola u WAT) i mase tijela (Dark, 2005). Sam ulazak u fazu duboke hibernacije vodi aktivnoj supresiji brzine metabolizma, kuplovanjoj sa sniženjem hipotalamičke „*set point*“, koja suprimira termogenezu i vodi postepenom sniženju tjelesne temperature (Heldmaier i Ruf, 1992). Iako se poređenjem brzine metabolizma tokom eutermije i hibernacije, često dobija Q_{10} vrijednost od 2-3, ideja o primarnom uticaju niske temperature na brzinu metabolizma je gotovo potpuno napuštena (Geiser, 1988). Štaviše, činjenice pokazuju da se upravo dešava suprotno, tj. da primarno dolazi do smanjenja brzine metabolizma, koje je potom praćeno sniženjem tjelesne temperature usled smanjene produkcije toplote (Heldmaier i Ruf, 1992).



Slika 10. Vremenski-zavisne promjene tjelesne temperature i BMR hibernatora tokom ulaska u hibernaciju, faze duboke hibernacije, buđenja iz hibernacije i eutermičnih perioda (adaptirano iz Heldmaier i sar., 2004).

1.7.1. Supresija metabolizma tokom hibernacije i izmjene u korišćenju energetskih goriva

Pored značajnog smanjenja tjelesne temperature, najupadljivija karakteristika hibernacije jeste globalna supresija metabolizma, koja zahtijeva regulisanu i koordinisanu redukciju brzine svih metaboličkih procesa. Studije rađene na različitim animalnim modelima hipometabolizma pokazale su da je reverzibilna fosforilacija proteina (*engl.* reversible protein phosphorylation, RPP) ključni mehanizam odgovoran za globalnu supresiju metabolizma (Storey i Storey, 2004; 2007). Na ovaj način se postiže koordinisanost (jedna kinaza/fosfataza reguliše aktivnost više enzima i drugih proteina), brzina (faza ulaska u hibernaciju traje svega nekoliko časova) i reverzibilnost procesa aktivne supresije metabolizma (što je od značaja zbog povremenih buđenja iz hibernacije). Posebno važni targeti globalne kontrole su katabolički putevi koji regulišu dostupnost ATP, a time i glavne ATP-potrošačke funkcije u ćeliji.

Takođe, RPP ima presudni uticaj i na prelaz sa glukoznog na lipidni metabolizam. Naime, respiratorni koeficijent (*engl.* respiratory quotient, RQ) od 0,7, ukazuje da su lipidi glavni supstrat energetskog metabolizma tokom hibernacije (Brooks i Storey, 1992; Andrews i sar., 1998; Buck i sar., 2002; Macdonald i Storey, 2005). Mehaničistička kontrola metaboličkog reprogramiranja nije u potpunosti jasna, međutim jako liči na remodeliranje metabolizma tokom kalorijske restrikcije (Lee i sar., 2002), gladovanja (Pilegaard i sar., 2003) i dijabetesa (Wu i sar., 1999; Kim i sar., 2006). Zajednička karakteristika ovih stanja jeste indukcija mitohondrijalnog enzima PDK4. PDK4 fosforiliše i inaktivira PDH i na taj način blokira konverziju piruvata u acetil-CoA. Inhibicija PDH kompleksa vodi nagomilavanju glikolitičkih intermedijera i posledičnoj supresiji glikolitičkog fluksa.

1.7.2. Supresija transkripcije i translacije

Snažna supresija procesa transkripcije i translacije je druga važna karakteristika hibernacije (Osborne i sar., 2004; Christian i sar., 2008). Do danas je otkriveno nekoliko mehanizama koji kontrolišu ove izuzetno energetski „skupe“ ćelijske funkcije u toku hibernacije. Tako je pokazano da u toku hibernacije u mozgu, jetri i bubrezima tekunica dolazi do konjugacije transkripcionih faktora sa SUMO (*engl.* small ubiquitin-related modifier) proteinima, što vodi inhibiciji njihove aktivnosti (Lee i sar., 2007). Ova inhibicija je reverzibilan proces, koji se veoma brzo otklanja prilikom buđenja životinje iz hibernacije. Ovaj vid regulacije transkripcije je viđen i u ćelijskom odgovoru na hipoksiju/ishemiju,

oksidativni, osmotski i genotoksični stres (Tempe i sar., 2008). Kontrola transkripcione aktivnosti se dešava i na nivou hromatina, gdje se brojnim post-translacionim modifikacijama histonskih proteina mijenja hromatinska struktura i onemogućava pristup transkripcione mašinerije DNK molekulu (Morin i Storey, 2006).

Ukoliko se transkripcija i privede kraju, nastali genski transkripti prolaze niz kontrola koje određuju da li će i kada oni biti translirani. Tokom hibernacije je pokazano da se transkripcioni i faktori obrade genskih transkripata nalaze u nukleusnim tjelašcima zajedno sa pre-iRNK molekulima. Na ovaj način se postiže stabilizacija i skladištenje transkripata tokom torpora, ali i njihova dostupnost za brzo korišćenje, tj. sintezu proteina prilikom buđenja životinje iz hibernacije (Malatesta i sar., 2008).

Pokazano je da se ukupni nivo iRNK tokom hibernacije/eutermija ciklusa ne mijenja (Osborne i sar., 2004; Brauch i sar., 2005), ali da njihov translacioni status značajno varira. Ovome takođe doprinosi nekoliko mehanizama. Jedan od mehanizama koji predstavlja trenutni „*hot-spot*“ metaboličke regulacije jeste kontrola mRNA ekspresije malim nekodirajućim transkriptima - mikroRNK (miRNK). Savršeno prepoznavanje sekvenci miRNK i ciljne mRNA vodi usmjeravanju te iRNK u degradacioni put. Međutim, nesavršeno prepoznavanje ovih sekvenci za posledicu ima inhibiciju translacije iRNK i njeno skladištenje u tzv. citoplazmatska P-tjelašca (Gammell, 2007). Drugi mehanizam kontrole se nalazi na nivou ribozoma. Studije su pokazale da u toku hibernacije dolazi do disocijacije polizoma i posledičnog povećanja iRNK transkripata u monozomalnoj i frakciji ribonukleoproteina (Storey i Storey, 2004). Sinteza proteina je takođe direktno inhibirana RPP (Storey i Storey, 2004).

Izuzetak od ove generalne supresije transkripcije i translacije su geni i transkripti koji se aktivno prevode u iRNK, odnosno proteine, čak i tokom torpora. Veliki broj relativno skorašnjih genomskih i proteomskih studija (Storey i Storey, 2004; Brauch i sar., 2005; Williams i sar., 2005; Crawford i sar., 2007; Yan i sar., 2008) umnogome je doprinio rasvijetljavanju brojnih puteva esencijalnih za hibernaciju. Tako je pokazano da dolazi do indukcije ekspresije gena/proteina uključenih u lipidni energetskei metabolizam, antioksidativnu odbranu, obradu proteina, inhibiciju koagulacije krvi itd.

1.8. Primjena strategija hibernacije u biomedicinske svrhe - perspektive

Identifikacija efektorskih molekula, poput AMP, vodonik sulfid, 3-jodotironamina i grelina, koji mogu da uvedu organizam u stanje slično hibernaciji (Scanlan i sar., 2004; Blackstone i sar., 2005; Gluck i sar., 2006; Zhang i sar., 2006; Pietsch i sar., 2007), podstaknula je spekulacije o indukovanju ovakvog stanja nalik hibernaciji i/ili hipotermije kod ljudi (Roth i Nystul, 2005). Dugo vremena je upravo ovo predlagano kao način konzerviranja energije tokom putovanja u svemir. Međutim, za sada je ipak mnogo izglednija primjena strategija hibernacije u cilju poboljšanja fizioloških i/ili patofizioloških stanja kod ljudi.

Razvoj hipotermičkih prezervacionih tehnika napravio je revoluciju na polju transplantacije organa i značajno povećao kvalitet graftova, uključujući i jetru (Southard i Belzer, 1995). Međutim i pored ovih prednosti, prezervaciono vrijeme jetre je i dalje limitirano i u velikom broju slučajeva određuje stepen prihvatanja kalema od strane domaćina (Glanemann i sar., 2003). Tako je pokazano i da je kvalitet graftova obrnuto proporcionalan vremenu kojem je organ bio izložen ishemiji na hladnoći (Furukawa i sar., 1991; Ploeg i sar., 1993; Porte i sar., 1998). Nasuprot ovome, studije su pokazale da „hibernirajući fenotip“ obezbijeduje superiornu rezistenciju jetre na povrede uzrokovane promjenama u perfuziji tokom prelaza iz eutermije u hibernaciju i *vice versa*, iz hibernacije u eutermiju (Churchill i sar., 1994; Green, 2000; Lindell i sar., 2005). Kao ključni faktor koji određuje ovu nevjerojatnu prednost jetre hibernatora navodi se „*switch*“ sa manje rezistentnog (ljetnjeg) fenotipa na super-rezistentni (zimski) fenotip (Lindell i sar., 2005), međutim; karakteristike ovog „rezistentnog fenotipa“ jetre do danas su ostale nerazjašnjene i pune kontradikcije.

Dalje, pokazano je da skeletni mišići sisara podliježu značajnom gubitku kontraktilnih proteina i miofibrilarnog integriteta tokom produžene neaktivnosti (Fitts i sar., 2001; Choi i sar., 2005). Kod ljudi je zabilježeno značajno smanjenje performansi skeletnih mišića nakon perioda neaktivnosti (Tavassoli, 1986), što je posledica mišićne atrofije i smanjenja metaboličkog kapaciteta (Rifenberick i sar., 1973; 1974). Suprotno, većina hibernatora pokazuje samo blagi gubitak mišićne mase i kontraktilnosti tokom 4-7 mjeseci hibernacije (Yacoe and Dawson, 1983; Lohuis i sar., 2007; Hershey i sar., 2008). Iako molekularni mehanizmi ove retencije mišićne mase i aktivnosti kod hibernatora nakon produžene neaktivnosti do danas nisu potpuno razjašnjeni, izgleda da važnu ulogu u ovome

ima održanje ili čak povećanje oksidativnog kapaciteta u skeletnim mišićima tokom faze hibernacije (Wickler i sar., 1991).

U periodu pripreme za hibernaciju, hibernatori podliježu obligatornoj hiperfagiji kako bi povećali svoje lipidne rezerve, koje će se kasnije koristiti kao metaboličko gorivo u fazi torpora. Tokom ovog perioda, indukcija insulinske rezistencije ima važnu ulogu u razvoju stanja nalik gojznosti (Buck i sar., 2002), dok je primarni faktor koji omogućava hiperfagiju smanjenje nivoa leptina (Ormseth i sar., 1996). S obzirom da WAT sintetiše leptin kako bi „informisao“ više centre o količini energetske rezervi, strateška supresija nivoa leptina ukazuje na to da je metaboličko remodeliranje u WAT koordinisan proces. Iako leptinska rezistencija može imati ulogu u uspostavljanju insulinske neosjetljivosti, razvoj gojznosti u dijabetesu je najčešće rezultat defekta u metabolizmu WAT, koji rezultuje nekontrolisanim oslobađanjem masnih kiselina, hormona i citokina iz WAT (Shoelson i sar., 2006). Moguće je da gojznost i u hibernaciji i u dijabetesu predstavlja posledicu hiperinsulinemije ili *vice versa*, ali u svakom slučaju mehanizmi koje hibernatori koriste za regulaciju metabolizma u WAT mogu rasvijetliti osnovu reverzibilnosti insulinske rezistencije.

Poznavanje molekularnih mehanizama fenomena hibernacije je višestruko značajno. Tako, razumijevanje načina na koji srce funkcioniše pod fiziološki ekstremnim uslovima tokom hibernacije može ukazati na strategije prevencije i liječenja kardiovaskularnih oboljenja. Sličnost metaboličke supresije/remodeliranja u hibernaciji sa „*anti-aging*“ mehanizmima asociranim sa kalorijskom restrikcijom, ukazuje da ispitivanje molekularnog reprogramiranja u hibernaciji može pojasniti mehanizme uključene u proces starenja sa ciljem poboljšanja kvaliteta života (Lyman i sar., 1981).

2. Cilj

Jedinstvena prilagodljivost metaboličkog fenotipa hibernirajućih organizama obezbijuje im prednost preživljavanja ekstremno nepovoljnih uslova sredine. Ispitivanje biohemijskih i molekularno-bioloških aspekata fenomena hibernacije i mehanizama koji koordinišu torpor i krioprotekciju tokom duboke hibernacije, značajni su i zbog primjene u biomedicini.

Centralna tačka biohemijske, strukturne i funkcione plastičnosti tokom fizioloških promjena i patofizioloških stanja je energetskei metabolizam. Upravo iz tog razloga su ispitivani molekularni mehanizmi regulacije energetskei metabolizma u tkivima i organima (BAT, WAT, mišići i jetra) tekunice (*Spermophilus citellus*), odgovornim za energetskei balans čitavog organizma. Nihovo poznavanje je od vitalnog značaja za razumijevanje prilagodljivosti organizma hibernatora na dramatične promjene kako u spoljašnjoj sredini, tako i u samom organizmu.

Zbog svega toga, ciljevi ove disertacije su:

- [1] Da se ispituju promjene koje se dešavaju na nivou genske i proteinske ekspresije ključnih enzima metabolizma (biosinteze i razgradnje) glukoze i lipida tokom perioda izlaganja hladnoći (kada raste potreba za produkcijom energije kod svih eutermnih životinja pa i hibernatora) i tokom faze duboke hibernacije (kada je produkcija ali i potrošnja ATP značajno suprimirana).
- [2] Da se, pored ovog direktnog ispitivanja molekularnih osnova metaboličkog remodeliranja, ispituju i mehanizmi regulacije, kako na transkripcionom, tako i na translacionom i post-translacionom nivou.
- [3] Da se ispita strukturno remodeliranje depoa masnog tkiva (BAT, sWAT, rWAT i eWAT) koje predstavlja posledicu i/ili uzrok promjena na nivou metabolizma.
- [4] Da se u komparativnoj studiji na nehibernirajućim životinjama (pacovi) ispituju mehanizmi metaboličke regulacije i reprogramiranja metabolizma u BAT i uporede sa regulatornim principima specifičnim za hibernatore (tekunica).
- [5] Da se ispituju promjene na nivou genske/proteinske ekspresije ključnih komponenti antioksidativne odbrane i pokuša rasvijetliti njihova veza sa promjenama na nivou metabolizma.

Za ispitivanje metaboličkog reprogramiranja i njegove transkripcione, translacione i post-translacione regulacije odabrana su tkiva ključna za održanje ukupne energetske homeostaze organizma:

- ✓ Mrko masno tkivo – endokrini organ sa primarno termogenom funkcijom tj. produkcijom toplote tokom izlaganja eutermnih životinja hladnoći;
 - ✓ Skeletni mišići (*musculus quadriceps*) - koji, pored BAT imaju važnu ulogu u održanju eutermije, konvertujući hemijsku energiju ATP u mišićni rad, pri čemu se dio energije oslobađa u vidu toplote u procesu drhteće termogeneze;
 - ✓ Specifični depoi bijelog masnog tkiva: subkutano, retroperitonealno i epididimalno - imajući u vidu ne samo njihovu ulogu u održanju ukupne metaboličke homeostaze organizma, već depo-specifičnu metaboličku organizaciju i energetske funkciju;
 - ✓ Jetra - koja ima centralnu ulogu u održanju ukupne metaboličke i energetske homeostaze organizma.
- Svi ovi aspekti strukturnog i metaboličkog remodeliranja kod tekunica su praćeni:
- Tokom vremenski-zavisnog izlaganja niskoj temperaturi, kada dolazi do indukcije termogenih procesa kod eutermnih životinja;
 - U periodu duboke hibernacije, koja se karakteriše supresijom svih fizioloških funkcija i procesa.

3. Materijal i Metode

3.1. Plan eksperimenta sa tekunicama i uzorkovanje tkiva

Mušjaci evropske tekunice (*Spermophilus citellus*) su ulovljeni sredinom jula u Deliblatskoj peščari (jugoistočna Vojvodina, Srbija), a potom preneseni u vivarijum Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Beograd, Srbija. Životinje su čuvane individualno u plastičnim kavezima na sobnoj temperaturi i hranjene standardnom briketiranom hranom za glodare, svježim šargarepama i jabukama *ad libitum* do početka septembra, kada su životinje podijeljene u dvije grupe: prva, kontrolna, koja je boravila na sobnoj temperaturi (22 ± 1 °C) tokom trajanja eksperimenta; i druga, koja je prenesena u hladnu sobu na 4 ± 1 °C. Obijema grupama životinja hrana i voda su bile dostupne *ad libitum* tokom trajanja eksperimenta. Aktivne, eutermične tekunice, koje nisu ušle u duboku hibernaciju u uslovima niske temperature, žrtvovane su nakon 1, 3, 7, 12, odnosno 21 dan. Sa druge strane, tekunice koje su ušle u torpor žrtvovane su nakon 2-5 dana trajanja hibernacije (kontinuirana rektalna temperatura ~ 4 °C). Kontrolne životinje su žrtvovane istog dana kada i hibernirajuće. Sve životinje su žrtvovane dekapitacijom između 8 i 10 časova, kako bi se izbjegao uticaj cirkadijalnih varijacija na rezultate studije. Prosječne dnevne promjene tjelesne mase tekunica kako tokom perioda adaptacije na laboratorijske uslove, tako i tokom eksperimentalnog perioda prikazane su u Tabeli 1.

Tkiva (interskapularno BAT, jetra, skeletni mišić (*musculus quadriceps*), retroperitonealno, epididimalno i subkutano WAT) su uzorkovana tokom ~ 3 minuta. S obzirom na značajnu prokrvljenost, kako bi se izbjegao uticaj krvne komponente, jetra je perfundovana ohlađenim fiziološkim rastvorom. Sva tkiva su usitnjena i temeljno isprana fiziološkim rastvorom kako bi se uklonili svi tragovi krvi.

3.2. Plan eksperimenta sa pacovima i uzorkovanje tkiva

U eksperimentu su korišćeni pacovi Mill Hill soja, starosti 60 dana, sa tjelesnom masom na početku eksperimenta 200 ± 10 g. U toku eksperimenta životinje su hranjene briketiranom hranom i vodom *ad libitum* uz pravilan dnevno noćni ritam. Životinje su podijeljene u dve eksperimentalne grupe, pri čemu je jedna tokom trajanja eksperimenta boravila na sobnoj (22 ± 1 °C), a druga na niskoj (4 ± 1 °C) temperaturi. Životinje su žrtvovane dekapitacijom u isto vrijeme (između 8-10 časova), nakon 1, 3, 7, 12, 21, odnosno 45 dana aklimacije na nisku temperaturu. Grupa životinja koja je boravila na sobnoj temperaturi 45 dana označena je kao kontrolna. Interskapularno BAT je uzeto od

svih životinja, macerirano i temeljno isprano u fiziološkom rastvoru, kako bi se uklonili svi tragovi krvi.

Tabela 1. *Prosječne dnevne promjene tjelesne mase tekunica kako tokom perioda adaptacije na laboratorijske uslove, tako i tokom eksperimentalnog perioda.*

Životinje	Prosječna promjena tjelesne mase (g/dan)
Prije početka eksperimenta	+ (1,6 ± 2,2)
1 dan na hladnoći	- (17,7 ± 0,7)
3 dana na hladnoći	- (8,2 ± 1,6)
7 dana na hladnoći	- (5,2 ± 2,3)
12 dana na hladnoći	- (2,9 ± 1,0)
21 dana na hladnoći	- (2,2 ± 0,8)
Hibernacija	- (3,5 ± 1,8)

Sve procedure na životinjama (tekunicama i pacovima) su urađene u skladu sa EEC Direktivom (86/609/EEC) o zaštiti životinja koje se koriste u eksperimentalne i druge naučne svrhe, a odobreni su od strane Etičkog komiteta za upotrebu laboratorijskih životinja Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu.

3.3. Priprema tkiva za analize

3.3.1. Priprema tkiva za *Western blot* analizu

Tkiva (sva ispitivana tkiva tekunica i BAT pacova) su macerirana, a zatim homogenizovana u RIPA puferu (radio-imuno precipitation pufer) (2 M NaCl, 10% Triton X-100, 0,5 M TRIS, 10% SDS, pH 7,5) sa proteaznim inhibitorima (Roche), tri puta po deset sekundi sa deset sekundi pauze. Sonifikacija uzoraka je vršena na jačini od 10 kHz, tri puta po petnaest sekundi sa po petnaest sekundi pauze. Potom je sonifikat cenrifugiran u Beckman ultracentrifugi, 90 min na 38000 g. Dobijeni supernatanti su korišćeni za Western blot analizu.

3.3.2. Priprema BAT pacova za određivanje aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH)

Uzorci tkiva BAT pacova su homogenizovani na 0-4 °C (Janke i Kunkel Ka/Werke Ultra/Turrax homogenizeru) u saharoznom puferu (0,25 M saharoza, 0,1 mM EDTA i 50 mM Tris, pH 7,4), potom sonifikovani i korišćeni za određivanje aktivnosti LDH.

3.3.3. Priprema BAT tekunica za RT-PCR analizu

Priprema tkiva za RT-PCR podrazumijeva izolovanje RNK, DNKazni tretman i sintezu cDNK. Izolovanje RNK je započeto homogenizovanjem mrkog masnog tkiva u TRIzol reagensu (Invitrogen), monofaznom rastvoru fenola i guanidin-izotiocijanata, koji razara ćelije ne remeteći integritet RNK. Zatim je homogenat inkubiran sa hloroformom na sobnoj temperaturi 2-3 min, pa centrifugiran na 10000 g, 15 min, na 4 °C, pri čemu se postiže razdvajanje homogenata u tri faze. Gornjem vodenom sloju supernatanta je dodat izopropil alkohol u cilju precipitacije RNK (preko noći na -80 °C). Talog dobijen nakon centrifugiranja na 12000 g, 10 min, 4 °C, ispran je 75% etanolom za odstranjivanje tragova fenola. Po centrifugiranju na 7500 g, 5 min, na 4 °C, u talogu je dobijena RNK koja je rastvarana u DEPC (dietilpirokarbonat, ICN) vodi.

Nakon izolacije ukupne RNK, vršeno je njeno prečišćavanje DNKaznim tretmanom komercijalnim DNA-freeTM kitom (Fermentas), po uputstvu proizvođača. Jednolančana cDNK je sintetisana iz 1 µg RNK i 0,5 µg oligo(dT) prajmera (Fermentas) korišćenjem 1U M-MLV reverzne transkriptaze (Fermentas).

3.3.4. Kalupljenje tkiva u parafinu

~1/4 BAT (tekunica i pacova), retroperitonealnog, epididimalnog, odnosno subkutanog WAT (tekunica), odmah po izolovanju je prenesena u neutralni, puferisani 10% rastvor formaldehida u cilju fiksacije. Nakon 72 časa, tkivo je preko noći isprano u česmenskoj vodi, a potom dehidratirano kroz seriju etanola rastućih koncentracija, prosvijetljeno u ksilolu i ukalupljeno u parafin. Parafinski kalupi tkiva su potom sječeni na rotacionom mikrotomu (Reichert) na presjeke debljine 5 µm i prenijeti na superfrost mikroskopske pločice.

3.3.5. Kalupljenje tkiva u smoli

Tkivni isječki BAT (tekunica i pacova) i tri depoa WAT (tekunica), veličine oko 1 mm³ fiksirani su u 2,5% rastvoru glutaraldehida, rastvorenog u fosfatnom puferu (0,1 M, pH 7,2) u trajanju od 4 časa. Nakon ispiranja u fosfatnom puferu, izvršena je četvoročasovna post-fiksacija u 2% rastvoru osmijum tetroksida (OsO₄) koji je rastvoren u istom puferu. Potom su uzorci dehidratirani serijom etanola rastućih koncentracija, prosvijetljeni u propilen oksidu i ukalupljeni u epoksidnoj Araldit smoli (Fluka) na temperaturi od 50 °C, u trajanju od 72 časa.

3.4. Određivanje količine proteina

Količina proteina je određivana po metodi Lowry i saradnika (1951). Metoda se zasniva na reakciji peptidnih veza i Cu²⁺ jona u alkalnoj sredini i reakciji fosfo-molibdensko fosfo-volframovog reagensa sa aromatičnim aminokiselinama (triptofan i tirozin) u polipeptidnim lancima. Nastalo kompleksno jedinjenje plave boje ima maksimum apsorpcije na 500 nm. Intenzitet boje je proporcionalan koncentraciji proteina, koja se očitava sa standardne krive, konstruisane merenjem apsorbanace rastvora albumina poznate koncentracije na 500 nm. Koncentracija proteina se izražava u mg/ml.

3.5. SDS-PAGE i *Western blot*

Proteini su razdvajani po molekulskim masama Na⁺-dodecil sulfat-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) u BioRad Mini-PROTEAN III sistemu. Korišćeni gelovi za razdvajanje bili su različite procentnosti (pH 8,8), zavisno od molekulske mase traženog proteina, a gelovi za koncentrovanje 5% (5% akrilamid/bisakrilamid; 0,1% SDS; 0,125 M Tris; pH 6,8). Polimerizacija gelova je omogućena dodavanjem 0,05% amonijum persulfata (APS) i 0,033% N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED). Pufer za rezervoare se sastojao od 0,192 M glicina; 0,1% SDS i 0,025 M Tris; pH 8,3. U određenu zapreminu proteinskog rastvora (količina proteina - 10 µg) dodata je jednaka zapremina pufera za uzorke (4% SDS; 20% glicerol; 10% β-merkaptotanol; 0,125 M Tris; pH 6,8; 0,025% brom fenol plavo), a zatim su uzorci kuvani 5 min. Na gelove je nanošen i proteinski marker u cilju određivanja molekulskih masa (Fermentas). Elektroforeza je trajala 90 min pri konstantnom naponu od 120 V.

Nakon elektroforeze je vršen transfer proteina sa gelova na PVDF (poliviniliden fluorid) membrane (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech). Membrane su aktivirane u 100% metanolu (10 sekundi). Membrane i gelovi su pakovani i premješteni u rezervoare sa transfer puferom (0,192 M glicin, 20% metanol i 0,025 M Tris, pH 8,3). Prenos proteina sa gelova na membrane odvijao se pri konstantnom naponu od 100 V, 60 min. Uspiješnost transfera je provjeravana 5% Ponceau S bojom rastvorenom u sirćetnoj kiselini. Zatim su membrane inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi u serumu za blokiranje slobodnih mesta na membrani - 5% BSA (*engl.* bovine serum albumine) u TBS-T (0,05% Tween20 u 1,5 M NaCl, 0,2 M Tris, pH 7,4).

3.6. Detekcija proteina nakon *Western blot*

Western blot je rađen na kvantitativan. Po blokiranju, membrane su inkubirane sa odgovarajućim primarnim antitijelima rastvorenim u 5% BSA, preko noći, na 4 °C. Primarna antitijela korišćena u studiji navedena su u Tabeli 2. Nakon inkubacije i ispiranja viška primarnog antitijela, membrane su inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitijelima kuplovanim sa peroksidazom iz rena (*engl.* horseradish peroxidase, HRP); dobijenim imunizacijom kože na IgG zeca (Abcam, ab6721, korišćeno razblaženje 1:3000 = Ab:5% BSA), odnosno miša (Abcam, ab6789, korišćeno razblaženje 1:2000 = Ab:5% BSA), 2 sata, na sobnoj temperaturi. Po inkubaciji, membrane su ispirane TBS-T rastvorom, 60 minuta na sobnoj temperaturi. Za vizuelizaciju proteina, membrane su inkubirane u hemiluminiscentnom supstratu, luminolu, uz dodatak H₂O₂ (3 min). Nakon toga, rentgen filmovi (Hyperfilm, Amersham Pharmacia Biotech) su izlagani ekscitovanom luminolu sa membrana (0,5-2 min). Filmovi su razvijani, pa skenirani i korišćeni za kvantifikaciju proteinskih traka.

Alternativno, membrane su inkubirane u rastvoru 4-hloro- α -naftola uz dodatak H₂O₂ do pojave traka (2-10 min), reakcija je prekidana ispiranjem membrane u destilovanoj H₂O, a membrane su potom skenirane za kompjutersku kvantifikaciju.

Kvantifikacija je rađena pomoću softverskog paketa ImageQuant. Rezultati izraženi putem integracije volumena predstavljaju sumu vrijednosti svih piksela pobuđenih signalom (1 piksel=0.007744 mm²) unutar označenog objekta, u našem slučaju trake, vizuelizovane na prethodno objašnjen način. Ova vrijednost, umanjena za *background* tj. fon pozadine, predstavlja *volume* (tj. intenzitet zatamnjenja na cijeloj površini trake).

Tabela 2. Primarna antitijela korišćena za Western blot

Antitijelo	Proizvođač, kat. broj	Porijeklo	Razblaženje ($\mu\text{g/ml}$ ili v/v)
Kompleks I OXPHOS	Abcam, ab55521	mišje, mAb	2,5
Kompleks II OXPHOS	Abcam, ab14715	mišje, mAb	0,1
Kompleks III OXPHOS	Abcam, ab14745	mišje, mAb	0,5
Kompleks IV OXPHOS	Abcam, ab14744	mišje, mAb	0,1
Citohrom <i>c</i>	Abcam, ab18738	zečje, pAb	1,0
ATP sintaza	Abcam, ab14730	mišje, mAb	0,8
UCP1	Abcam, ab10983	zečje, pAb	1/1000
UCP3	Abcam, ab10985	zečje, pAb	1/1000
GLUT2	Abcam, ab54460	zečje, pAb	5,0
heksokinaza	Abcam, ab78259	zečje, pAb	1/5000
GAPDH	Abcam, ab8245	mišje, mAb	1/2000
PDH	Abcam, ab84588	zečje, pAb	1,0
PDK4	Abcam, ab89295	zečje, pAb	1/500
LDH A (M subjedinica)	Abcam, ab47010	zečje, pAb	1,0
LDH B (H subjedinica)	Abcam, ab85319	mišje, mAb	1/5000
GSK3 ($\alpha+\beta$)	Abcam, ab90366	mišje, mAb	1/1000
PYG B/L/M	Santa Cruz Biotech, sc-66913	zečje, pAb	1/200
ACADM	Abcam, ab92461	zečje, mAb	1/10000
SCAS	Abcam, ab96172	zečje, pAb	1/1000
FAS	Cell Signaling Tech, C20G5	zečje, mAb	1/1000
ACC	Abcam, ab45174	zečje, pAb	1/2000
fosfo-AMPK α	Millipore, 07-681	zečje, pAb	2,0
HIF-1 α	Abcam, ab51608	zečje, mAb	1/5000

Nastavak Tabele 2.¹

Antitijelo	Proizvođač, kat. broj	Porijeklo	Razblaženje ($\mu\text{g/ml}$ ili v/v)
VEGF	Abcam, ab68334	mišje, mAb	5,0
eNOS	Abcam, ab66127	zečje, pAb	1,0
SERCA1	Abcam, ab109899	mišje, mAb	1,0
CuZnSOD	Abcam, ab13498	zečje, pAb	0,2
MnSOD	Abcam, ab13533	zečje, pAb	1/5000
katalaza	Abcam, ab1877	zečje, pAb	1/1000
GSH-Px	Abcam, ab16798	zečje, pAb	1/2000
Nrf1	Abcam, ab86516	zečje, pAb	1,0
NFE2L2	Abcam, ab31163	zečje, pAb	1/1000
PPAR α	Abcam, ab8934	zečje, pAb	1/1000
PPAR δ	Abcam, ab23673	zečje, pAb	2,0
PPAR γ	Abcam, ab19481	zečje, pAb	1/400
PGC-1 α	Abcam, ab54481	zečje, pAb	1/1000
mitofuzin 1	Abcam, ab57602	mišje, mAb	2,5
β -aktin	Abcam, ab8226	mišje, mAb	1/1000
ERK1 + ERK2	Abcam, ab79853	zečje, pAb	1/5000

¹ Skraćenice korišćene u tabeli 2: OXPHOS – oksidativna fosforilacija; UCP1/3 – dekaplajući protein 1/3; GLUT2 – glukozni transporter 2; GAPDH – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza; PDH – piruvat dehidrogenaza; PDK4 – kinaza piruvat dehidrogenaze 4; LDH A – M subjedinica laktat dehidrogenaze; LDH B – H subjedinica laktat dehidrogenaze; GSK3 – kinaza glikogen sintaze 3; PYG B/L/M – glikogen fosforilaza (izoforna u mozgu, jetri, mišićima); ACADM – acil-CoA dehidrogenaza masnih kiselina srednjeg lanca; SCAS – sukcinil-CoA sintetaza; FAS – sintaza masnih kiselina; ACC – acetil-CoA karboksilaza; fosfo-AMPKa – AMP-aktivirana protein kinaza sa fosforilacijom na T172 i T183; HIF-1 α – α subjedinica hipoksija inducibilnog faktora-1; eNOS – endotelijalna azot oksid sintaza; SERCA 1 – sarkoplazmina Ca^{2+} -ATPaza 1; CuZn/Mn SOD – CuZn/Mn superoksid dismutaza; GSH-Px – glutation peroksidaza; Nrf – nukleusni respiratorni faktor 1; NFE2L2 – engl. nuclear factor (erythroid 2-related)-like 2; PPAR $\alpha/\delta/\gamma$ – peroksisomalnim proliferatorom aktivirani receptor $\alpha/\delta/\gamma$; PGC-1 α – PPAR γ koaktivator 1 α ; ERK 1/2 – vanćeljskim signalima regulisana kinaza 1/2; VEGF – vaskularni endotelijalni faktor rasta.

3.7. Određivanje aktivnosti LDH

LDH aktivnost je određivana u uzorcima BAT pacova prema metodi Borgmann i saradnika (1974) i izražena u U/mg proteina. Brzina reakcije je određena na osnovu smanjenja apsorpcije na 340 nm, koje je rezultat oksidacije NADH. Za jednu jedinicu aktivnosti enzima uzima se ona količina enzima koja uzrokuje oksidaciju 1 μmol NADH po minuti na 25 °C i pH 7,4.

3.8. RT-PCR (*engl. reverse-transcriptase polymerase chain reaction*)

Za određivanje promjena na nivou iRNK u BAT tekunica korišćen je metod RT-PCR u realnom vremenu. Relativna ekspresija je određena direktnim poređenjem dobijenih Ct vrijednosti, koje su normalizovane prema endogenoj kontroli. Ct se definiše kao tačka u kojoj amplifikaciona kriva siječe „*threshold*“ (*threshold cycle*) vrijednost i predstavlja broj ciklusa u kom amplifikacija ulazi u eksponencijalnu fazu. Pri određivanju nivoa ekspresije ciljnog gena urađeni su validacioni eksperimenti koji su pokazali približno jednako variranje promjene Ct vrijednosti odgovarajućeg ciljnog gena i endogene kontrole za niz serijskih dilucija cDNK. U našim uzorcima se kao adekvatna endogena kontrola pokazala 18S rRNK (komponenta male eukariotske ribozomalne subjedinice - 40S; F: 5'- CAT TCG AAC GTC TGC CCT ATC -3', R: 5'- CCT GCT GCC TTC CTT GGA -3'). Nakon toga urađena je RT-PCR detekcija.

U RT-PCR je korišćen FastStart Essential DNA Green Master (Roche), koji sadrži: *ready-to-use* PCR smješu (FastStart Taq DNK polimeraza, reakcioni pufer, smješu dNTP, SYBER Green I i MgCl_2) i H_2O PCR-čistoće. Sekvence prajmera su preuzete iz rada Yan i saradnika (2008), a za 18S iz rada Savdovici i saradnici (2004) i prikazane su, zajedno sa uslovima RT-PCR reakcije, u Tabeli 3. RT-PCR reakcija je izvedena u 20 μl reakcione zapremine. Svaka reakciona smješa sastojala se od: 10 μl Master Mix, 2x, po 0,4 μl svakog od prajmera finalne koncentracije 200 nM, 0,4 μl ROX (Invitrogen, USA) i H_2O do 18 μl ukupne zapremine. Po 18 μl reakcione smješe i 2 μl cDNK (5 ng iRNK prevedeno u cDNK) sipano je u odgovarajuće mjesto na optičku ploču za RT-PCR. Za svaki set prajmera uključena je i negativna kontrola (umjesto cDNK stavljena je ista zapremina *nuclease-free* vode), da bi verifikovali odsustvo nespecifične amplifikacije (dimere prajmera ili kontaminaciju). Sve reakcije su izvedene na aparatu ABI Prism 7000 Sequence Detection System, pod uslovima koji su dati u Tabeli 3.

Tabla 3. *Sekvence prajmera korišćenih u RT-PCR i uslovi reakcije.*

Gen	Sekvenca prajmera i uslovi RT-PCR reakcije	Broj ciklusa
<i>Ndufa6</i>	5'- GGT ACA CGC CGG ATG AAA AA -3' 5'- GCC TCA GCT CTC GCA ACT G -3' 15" na 95°, 30" na 53°, 30" na 72°	40
<i>Cox5b</i>	5'- AGT CCC ATC CAT CAC CAA CAA -3' 5'- TCC TCT TCA CAA ATG CAA CCC -3' 15" na 95°, 30" na 53°, 30" na 72°	40
<i>ATP5a1</i>	5'- TGG ACA GAT CTT CTT GGA AAC AGA -3' 5'- GCA GGG CGG ATA CCT TTA TAG A -3' 15" na 95°, 30" na 55°, 30" na 72°	40
<i>Ucp1</i>	5'- GCA AAA TCT CAG CCG GAC TC -3' 5'- GCC CAA TGA ACA CTG CCA CT -3' 15" na 95°, 30" na 55°, 30" na 72°	40
<i>Ucp2</i>	5'- GGG ACT GTG GAA AGG GAC CT -3' 5'- TTG ACA ATG GCA TTA CGA GCA -3' 15" na 95°, 30" na 51°, 30" na 72°	40
<i>Heksokinaza</i>	5'- GGA GAT TTC ATC GCC CTG G -3' 5'- CCG CAG AAT TCG AAA GGA AG -3' 10" na 95°, 45" na 52°, 30" na 72°	40
<i>Gapdh</i>	5'- GAC CAC AGT CCA TGC CAT CA -3' 5'- CAC GCC ACA GTT TCC CAG A -3' 10" na 95°, 45" na 52°, 30" na 72°	40
<i>Pfk m</i>	5'- TAC CAC TGA CTT CAT CTT CAA CCT G -3' 5'- AAG ATG CCC TTC CCC TCC T -3' 15" na 95°, 30" na 54°, 30" na 72°	40
<i>Pdh B</i>	5'- GAG ATG GGC TTT GCT GGA ATT -3' 5'- TCG CAA ACC AGC CAT AGC T -3' 10" na 95°, 45" na 52°, 30" na 72°	40
<i>Pdk4</i>	5'- GAG CTT TTC TCC CGC TAC AG -3' 5'- CGA TCA GGG AGG ACA TCA AT -3' 10" na 95°, 30" na 52°, 30" na 72°	40
<i>Ldh B</i>	5'- AGG GGG AGA GTC GTC TCA AT -3' 5'- CTG GGA TGA ATG CCA AGT TT -3' 10" na 95°, 30" na 52°, 30" na 72°	40
<i>Hif-1A</i>	5'-TGC TCA TCA GTT GCC ACT TC -3' 5'- GCA GTT CAT CTG TGC CTT CA -3' 10" na 95°, 45" na 52°, 30" na 72°	40
<i>Acadm</i>	5'- GGA GGA TGA CTG AGG AGC CA -3' 5'- CTG GTT CTG TTA CAC AGT AAG CAC AC -3' 10" na 95°, 30" na 56°, 30" na 72°	40

Nastavak Tabele 3.²

Gen	Sekvenca prajmera i uslovi RT-PCR reakcije	Broj ciklusa
<i>Cs</i>	5'- GCA TGA GAG GCA TGA AGG GA -3' 5'- CGG GAT CAA GAA CTG ACG TTT C -3' 15" na 95°, 30" na 55°, 30" na 72°	40
<i>Mdb2</i>	5'- TGA CCA GCT GCC AGA CTG TC -3' 5'- GCT GGA ATC ACC ACC ACG TC -3' 15" na 95°, 30" na 55°, 30" na 72°	40
<i>Scas</i>	5'- TGC TGG AGG AAA AGG TGG AG -3' 5'- GCA CTC TGA AGG GCA GCA AT -3' 15" na 95°, 30" na 56°, 30" na 72°	40
<i>Pck1</i>	5'- CCT TTG GGA GTG GGT ACG G -3' 5'- CAA AGC ACT TCT TCC CCA GC -3' 15" na 95°, 30" na 54°, 30" na 72°	40
<i>Gsk3</i>	5'- CTC TGT GAT TTT GGC AGT GCA -3' 5'- AAC ATT GGG CTC CCC CC -3' 15" na 95°, 30" na 56°, 30" na 72°	40
<i>Gpd1</i>	5'- TGT CAA ATA CCT GCC AGG GC -3' 5'- GGT ACA GCC ACC ACG TTT GG -3' 15" na 95°, 30" na 56°, 30" na 72°	40
<i>Fabp4</i>	5'-AAC TGG GCC AGG AAT TTG AT -3' 5'- GTG GAA GTG ACG CCT TTC AT -3' 15" na 95°, 45" na 51°, 30" na 72°	40
<i>Hsl</i>	5'- TTG CGC GAG TAT GTC ACA CTG -3' 5'- CAA GCA GCG GCC ATA GAA AC -3' 15" na 95°, 30" na 56°, 30" na 72°	40
<i>Katalaza</i>	5'- AGG GCA TCA AAA ACC TTC CT -3' 5'- CCA ACA GGG ATG AGA GGG TA -3' 15" na 95°, 30" na 51°, 30" na 72°	40
<i>GSH-Px</i>	5'- GCT TCT CTT TGA GGC ACC A -3' 5'- GGA ATG CGA AGA GTG GAT GT -3' 15" na 95°, 30" na 51°, 30" na 72°	40

² Skraćenice korišćene u tabeli 3: *Ndufa 6* – subjedinica kompleksa I oksidativne fosforilacije; *Cox5b* – subjedinica kompleksa IV oksidativne fosforilacije; *ATP5a1* – subjedinica ATP sintaze; *Ucp 1/2* – dekuplujući protein 1/2; *Gapdh* – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza; *Pfk m* – fosfofruktokinaza (izoforna u mišićima); *Pdh* – piruvat dehidrogenaza; *Pdk4* – kinaza piruvat dehidrogenaze 4; *Ldb B - H* subjedinica laktat dehidrogenaze; *HIF-1A* – hipoksija inducibilni factor-1a; *Acadm* – acil-CoA dehidrogenaza masnih kiselina srednjeg lanca; *Cs* – citrate sintaza; *Mdb2* – malat dehidrogenaza 2; *Scas* – sukcinil-CoA sintetaza; *Pck1* – fosfoenolpiruvat karboksikinaza 1; *Gsk3* – kinaza glikogen sintaze 3; *Gpd1* – glycerol-3-fosfat dehidrogenaza 1; *Fabp4* – engl. fatty-acid binding protein 4; *Hsl* – bormon-osjetljiva lipaza; *GSH-Px* – glutation peroksidaza.

Svaki uzorak je rađen u triplicatu, a srednja vrijednost je uzeta za dalja izračunavanja. U svaku analizu je bila uključena endogena kontrola, zbog korekcije internih razlika u efikasnosti amplifikacije, a svaki uzorak je normalizovan na nivo ekspresije svoje endogene kontrole.

Kvantifikacija je urađena komparativnom Ct metodom. Količina ciljnog gena, normalizovanog na nivo ekspresije svoje endogene kontrole i izražena relativno u odnosu na kalibrator, data je formulom:

$$2^{-\Delta Ct}$$

Formula 1. *Količina ciljnog gena, normalizovanog na nivo ekspresije svoje endogene kontrole i izražena relativno u odnosu na kalibrator pri čemu je*

$$\Delta Ct = Ct_{(ciljnog\ gena)} - Ct_{(endogene\ kontrole)}$$

Rezultati su izraženi kao procenat u odnosu na adekvatnu kontrolu (grupa eutermnih životinja koja je tokom trajanja eksperimenta boravila na sobnoj temperaturi), kojoj je dodjeljena vrijednost od 100%.

3.9. Morfometrijska i stereološka analiza tkiva

3.9.1. Određivanje volumenske gustine krvnih sudova

U svrhu određivanja volumenske gustine (V_v , zapreminskog udjela) krvnih sudova u BAT i depoiima WAT tekunica, korišćeni su polu-tanki presjeci tkiva (debljine 1 μm) ukalupljenog u smoli, prethodno obojenih 1% rastvorom toluidin plavog u 1% tetraboraksu (natrijum tetraborat). Isti presjeci su korišćeni za ispitivanje opšte slike tkiva. Bojenje je vršeno nakapavanjem jednakih količina toluidin plavog i tetraboraksa na presjeke, uz zagrijavanje na grejnoj ploči 2-3 minuta, nakon čega su presjeci isprani u česmenskoj vodi. V_v krvnih sudova u tkivima određena je Vajblovom metodom (Weibel, 1962), na po 10 nasumično odabranih polja od svake životinje iz svih grupa. Analiza je vršena pri uveličanju od 100x, na svijetlosnom mikroskopu DMLB (Leica Microsystems), snimanjem digitalnih mikrografija i njihovom morfometrijskom analizom u programu Image J (National Institute of Health) brojanjem tačaka projektovane mjerne mrežice koje padaju na krvne sudove (80 tačaka po mrežici). Odnosom zbira svih tačaka koje padaju na krvne sudove i ukupnog broja tačaka koje padaju na tkivo određena je V_v krvnih sudova za svaku mikrografiju (Formula 1), a potom i srednja vrijednost za svaku grupu ponaosob.

$$Vv = \frac{Ts}{Tu}$$

Formula 2. Volumenska gustina (Vv) strukture u tkivu jednaka je odnosu broja tačaka Vajbllove mrežice koje padaju na datu strukturu (Ts) i ukupnog broja tačaka koje padaju na tkivo (Tu)

3.9.2. Određivanje volumenske gustine adipocita

Vv adipocita određena je na identičan način kao i Vv krvnih sudova, brojanjem tačaka merne mrežice koje padaju na adipocite i ukupnog broja tačaka koje padaju na tkivo na mikrografijama polu-tankih presjeka. Odnosom ovih vrijednosti dobijene su Vv adipocita za svaku mikrografiju, a potom i srednja vrijednost za svaku grupu.

3.9.3. Određivanje volumenske gustine intersticijuma

Vv intersticijuma je određen na sličan način kao i Vv krvnih sudova i adipocita, s tom razlikom što je broj tačaka koje padaju na intersticijum dobijen oduzimanjem zbira tačaka koje padaju na krvne sudove i adipocite od ukupnog broja tačaka koje padaju na tkivo. Po dobijanju vrijednosti za svaku mikrografiju, određene su srednje vrijednosti Vv intersticijuma za svaku grupu.

3.10. Ultrastrukturna analiza tkiva

Za transmisionu elektron-mikroskopsku analizu (TEM), aralditski kalupi BAT tekunica i pacova su istrimovani i isječeni dijamantskim nožem (Diatome) na tanke presjeke debljine 70 nm, na UC6 ultramikrotomu (Leica Microsystems). Presjeci su montirani na bakarne ili bakar-paladijumske mrežice, kontrastirani uranil-aceatom i olovo citratom u EM Stain aparatu (Leica Microsystems), a potom posmatrani na CM12 transmisionom elektronskom mikroskopu (Philips/FEI).

3.11. Bodijanov metod za bojenje nervnih vlakana

Intenzitet inervacije je praćen vizuelizacijom bojenjem nerava Bodijan metodom. Parafinski presjeci (BAT i tri depoa WAT tekunica) su nakon deparafinizacije i rehidratacije, inkubirani u rastvoru protargola, kojem je dodata bakarna žica (5-6 g bakarne žice na 100 ml rastvora, 48 h na 37 °C). Nakon tog vremena, presjeci su ispirani u destilovanoj vodi, pa redukovani u redukcionom rastvoru (10 min). Po inkubaciji i ispiranju

presjeci su stavljeni u 1% zlato hlorid (10 min), ispirani u destilovanoj vodi, pa inkubirani u 2% oksalnoj kiselini, dok ne posive, a nervna vlakna postanu vidljiva (3-5 min). Nakon toga, presjeci su još jednom ispirani u destilovanoj vodi pa inkubirani u 5% rastvoru natrijum tiosulfata, 5 min. Po isteku tog vremena, presjeci su ispirani u destilovanoj vodi. Ovim je procedura bojenja završena, a presjeci dehidratirani kroz seriju etanola rastućih koncentracija (95%, 100%), ksilol i montirani u DPX. Digitalne slike su dobijene na DMLB svjetlosnom mikroskopu (Leica Microsystems).

3.12. Bojenje rezervi glikogena PAS metodom

Parafinski presjeci debljine 4-6 μm (BAT tekunica i pacova i tri depoa WAT tekunica) su deparafinisani, rehidratirani i obojeni Šifovim reagensom sa periodnom kiselinom (*engl.* Period-Acid-Shiff, PAS) uz kontrabojenje hematoksilinom. Duplicirani presjeci, pretretirani diastazom (Sigma Chemical Co) prije PAS bojenja, kako bi se digestovale glikogenske rezerve do glukoze, služili su kao negativne kontrole. Digitalne slike su dobijene na DMLB svjetlosnom mikroskopu (Leica Microsystems).

3.13. Statistička analiza

Statistička značajnost svih kvantitativnih rezultata testirana je GraphPad Prism 5 programom. Normalnost raspodjele testirana je Kolmogorov-Smirnov testom (sa Dallal-Wilkinson-Lilliefors p vrijednošću). Ukoliko je test pokazao normalnu raspodijelu, za provjeru statistički značajne razlike među grupama korišćena je jednosmjerna (*engl.* one-way) ANOVA, a zatim Tuckey *post-hoc* test kako bi se utvrdilo između kojih parova grupa se nalazi detektovana značajnost. U slučaju neparametrijske raspodjele, prvo je urađen Kruskal-Wallis test, a potom Dunn's *post-hoc* test. Za najniži stepen značajnosti uzeta je vrijednost vjerovatnoće od $p < 0,05$.

4. Rezultati

4.1. MRKO MASNO TKIVO TEKUNICA

4.1.1. Western blot analiza

4.1.1.1. Proteinska ekspresija komponenti elektron-transportnog lanca

Na Figuri 1 prikazane su promjene proteinske ekspresije komponenti elektron-transportnog lanca tokom izlaganja životinja hladnoći i u toku faze hibernacije. U poređenju sa kontrolom, jedno-, odnosno tro-dnevna aklimacija na nisku temperaturu indukovala je supresiju (~20%) proteinske ekspresije kompleksa I i kompleksa II, respektivno ($p < 0,05$). Nasuprot ovome, u poređenju sa kontrolnom grupom proteinski nivo kompleksa III je bio povećan 3. dana izlaganja hladnoći ($p < 0,05$), nakon čega je do kraja ispitivanog perioda (21 dan) zabilježen statistički značajan pad u ekspresiji ovog proteina od ~60-70% ($p < 0,001$). Izlaganje životinja niskoj temperaturi imalo je suprotan efekat na ekspresiju preostale dvije komponente elektron-transportnog lanca. Naime, proteinska količina kompleksa IV bila je povećana u periodu od 1-12. dana aklimacije na hladnoću, nakon čega je vraćena na kontrolni nivo; dok se nivo citohroma *c* nije mijenjao do 12. dana aklimacije, nakon čega je zabilježeno njegovo povećanje (1,8 puta 12. dana, odnosno 1,2 puta 21. dana).

Suprotno aklimaciji na hladnoću, hibernacija je, u poređenju sa kontrolnom grupom životinja, indukovala supresiju proteinske ekspresije kompleksa II ($p < 0,05$), kompleksa III i citohroma *c* ($p < 0,001$), od 18%, 64%, odnosno 39%, respektivno; dok je proteinska količina kompleksa I i IV bila na kontrolnom nivou.

4.1.1.2. Proteinska ekspresija ATP sintaze i UCP1

Promjene proteinske ekspresije ATP sintaze i UCP1 tokom vremenski-zavisnog izlaganja niskoj temperaturi, odnosno u fazi duboke hibernacije prikazane su grafički na Figuri 2. Aklimacija na hladnoću gotovo da nije imala efekta na proteinsku ekspresiju ATP sintaze, osim 12. dana kada je zabilježen pad od ~30% u odnosu na kontrolu ($p < 0,01$). Sa druge strane, izlaganje životinja hladnoći snažno je indukovalo povećanje količine UCP1 proteina u periodu od 3-12. dana aklimacije na nisku temperaturu. Ovo povećanje je bilo najznačajnije 3. dana kada je zabilježena dva puta veća količina UCP1 ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolu; dok je nakon toga primjećena tendencija vraćanja količine ovog proteina na kontrolni nivo, koji je i zabilježen 21. dana aklimacije na hladnoću.

Nasuprot različitim efektima hladnoće na proteinsku ekspresiju ATP sintaze i UCP1, hibernacija je indukovala snažnu supresiju ekspresije oba proteina ($p < 0,001$).

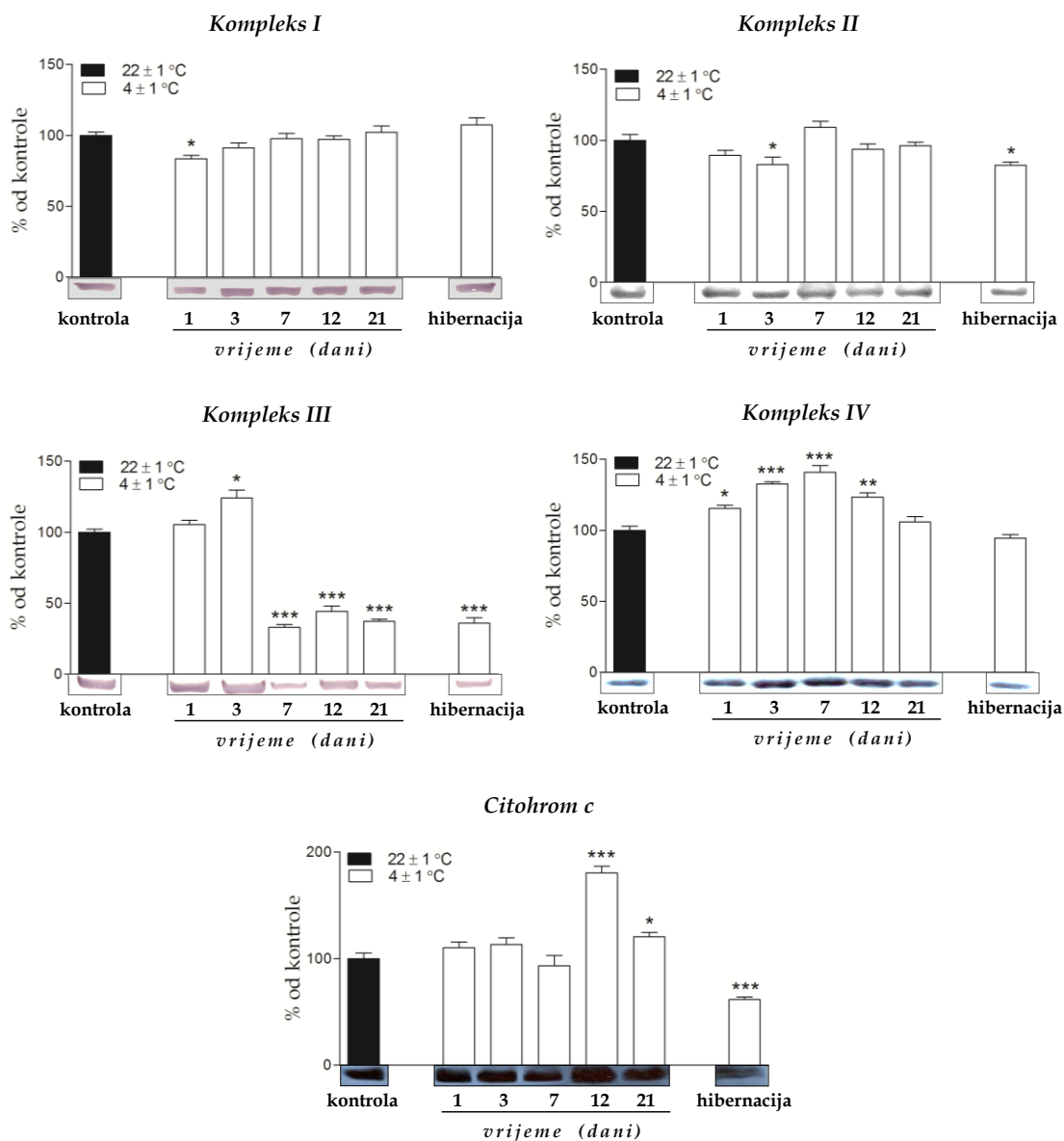


Figura 1. Promjene proteinske ekspresije komponenti OXPHOS (kompleks I, II, III, IV i citohroma c) u BAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.1.1.3. Proteinska ekspresija glikolitičkog enzima GAPDH

Kao što se vidi na Figuri 3, izuzev statistički značajnog pada od ~55% 12. dana aklimacije na hladnoću ($p < 0,01$), proteinska količina GAPDH nije bila bitno promjenjena ni kod eutermnih životinja u uslovima niske temperature, niti kod hibernirajućih životinja, u poređenju sa količinom ovog enzima detektovanom kod kontrolnih životinja.

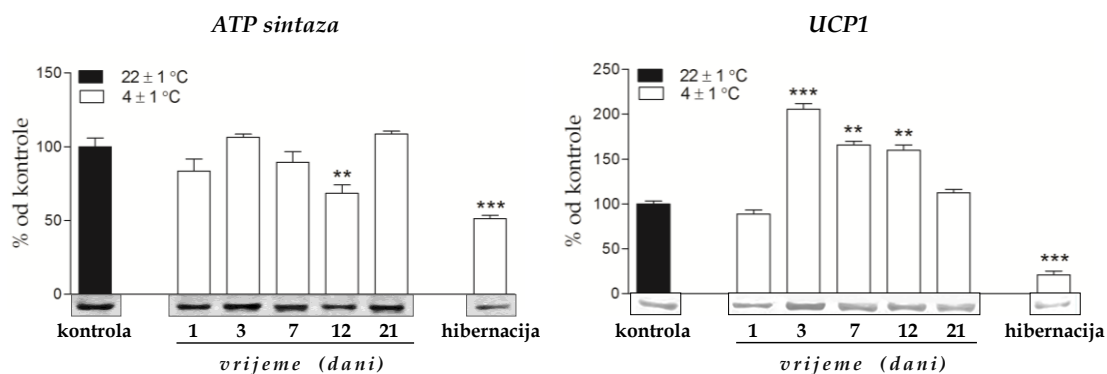


Figura 2. Promjene proteinske ekspresije ATP sintaze i dekapljujućeg proteina 1 (UCP1) u BAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

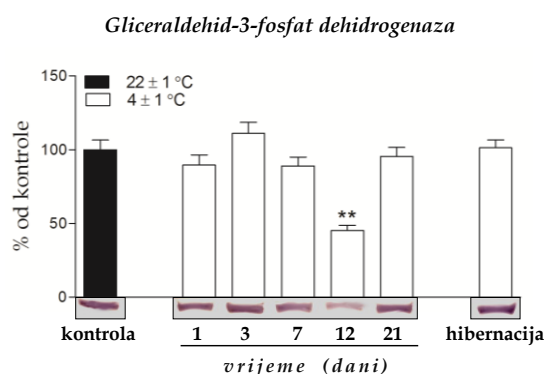


Figura 3. Promjene proteinske ekspresije glicer aldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH) u BAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; ** $p < 0,01$.

4.1.1.4. Proteinska ekspresija PDH, PDK4 i M/H subjedinica LDH

U odnosu na kontrolu, aklimacija na nisku temperaturu indukovala je statistički značajno povećanje proteinske ekspresije PDH tokom čitavog ispitivanog perioda (Figura 4). Slično tome, povećanje je detektovano i u slučaju njegovog regulatornog enzima PDK4 3, 7. i 21. dana aklimacije ($p < 0,001$). Ipak, u slučaju PDK4 jednodnevno izlaganje hladnoći nije imalo uticaja na njegovu proteinsku ekspresiju, dok je 12. dana aklimacije na nisku temperaturu zabilježen pad od čak ~60% u količini PDK4 u poređenju sa kontrolom ($p < 0,001$). Kod eutermnih životinja, niska temperatura je indukovala povećanje proteinske ekspresije M subjedinice LDH u periodu od 1-12. dana aklimacije, nakon čega je količina ovog proteina čak bila 30% niža nego kod kontrolnih životinja ($p < 0,05$). Isti

stimulus gotovo da nije imao efekta na ekspresiju druge subjedinice LDH, osim 7. dana kada je zabilježen blagi pad od ~28% u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

Kod hibernirajućih životinja proteinska ekspresija PDH i M subjedinice LDH je bila identična kao kod kontrolnih životinja. Suprotno tome, kod hibernirajućih životinja zabilježen je rast količine PDK4 ($p < 0,05$) i H subjedinice LDH ($p < 0,001$) proteina u poređenju sa kontrolom (Figuri 4).

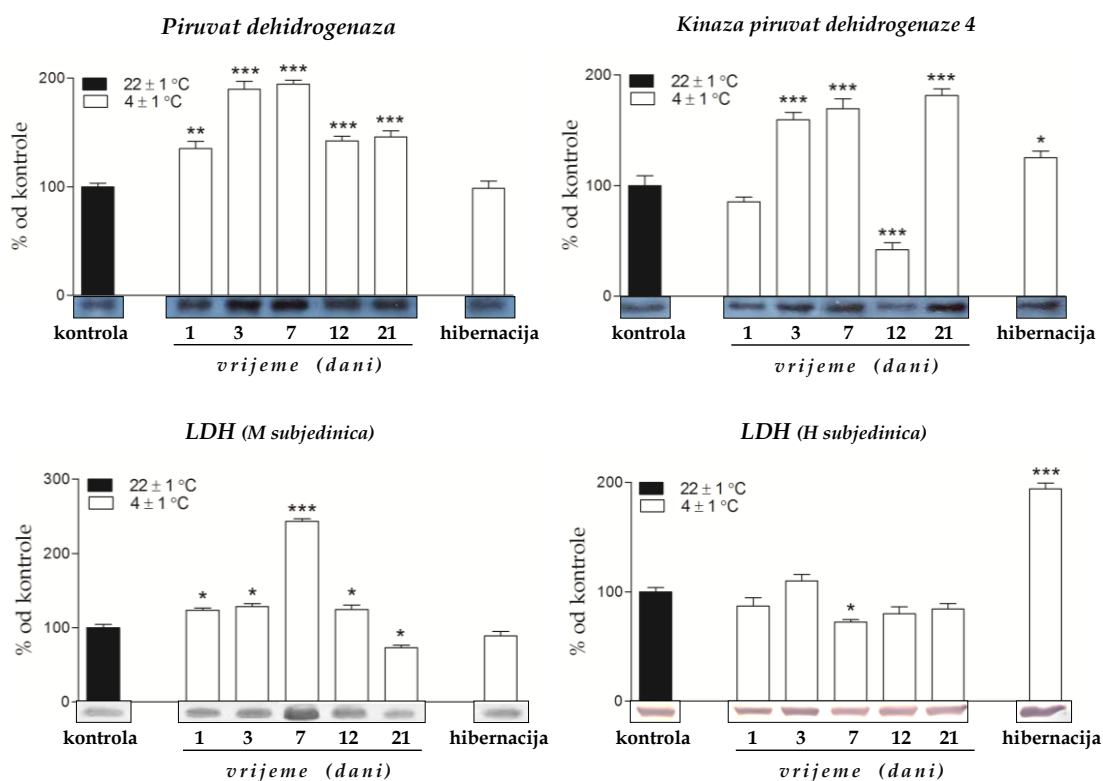


Figura 4. Promjene proteinske ekspresije piruvat dehidrogenaze (PDH), kinaze piruvat dehidrogenaze 4 (PDK4), M i H subjedinice laktat dehidrogenaze (LDH) u BAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.1.1.5. Proteinska ekspresija enzima β -oksidacije - ACADM i enzima Krebsovog ciklusa - SCAS

Kao što Figura X5 prikazuje, aklimacija na hladnoću nije statistički značajno afektovala proteinsku ekspresiju ACADM i SCAS, osim smanjenja detektovanog 12. odnosno 21. dana izlaganja hladnoći u poređenju sa kontrolom.

Kod životinja u hibernaciji zabilježeno je smanjenje nivoa ACADM od ~45% ($p < 0,01$) i SCAS od ~70% ($p < 0,001$), u poređenju sa kontrolnom grupom.

4.1.1.6. Proteinska ekspresija enzima uključenih u sintezu/razgradnju glikogenskih i lipidnih rezervi

U poređenju sa kontrolom, aklimacija na nisku temperaturu indukovala je povećanje proteinske ekspresije GSK, PYG i FAS skoro tokom čitavog ispitivanog perioda (Figura 6). Izuzetak za GSK i PYG je bio 12. dan izlaganja niskoj temperaturi, kada je zabilježeno vraćanje do (GSK) ili ispod (PYG; $p < 0,05$) kontrolnog nivoa ovih proteina. Što se tiče FAS, njegova proteinska ekspresija je pratila tendenciju porasta od 1,3 do 3,5 puta tokom prvih 12 dana aklimacije na hladnoću; nakon čega je detektovano smanjenje njegove količine na 70% kontrolne vrijednosti ($p < 0,05$).

Za razliku od proteinske ekspresije GSK i PYG koje se nisu mijenjale, proteinska ekspresija FAS kod životinja u hibernaciji je bila 3 puta veća u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$).

4.1.1.7. Proteinska ekspresija VEGF i eNOS

Promjene proteinske ekspresije VEGF i eNOS tokom aklimacije na nisku temperaturu i hebernacije su prikazane na Figuri 7. Tokom prvih nedelju dana izlaganja hladnoći nivo eNOS je bio nepromjenjen, dok je nivo VEGF proteina u poređenju sa kontrolom bio povećan trećeg, a smanjen 7. dana izlaganja hladnoći. Nasuprot tome, tokom dužeg izlaganja niskoj temperaturi (od 12. dana), kao i u hibernaciji zabilježeno je značajno smanjenje proteinske količine oba enzima u poređenju sa kontrolom ($p < 0,001$).

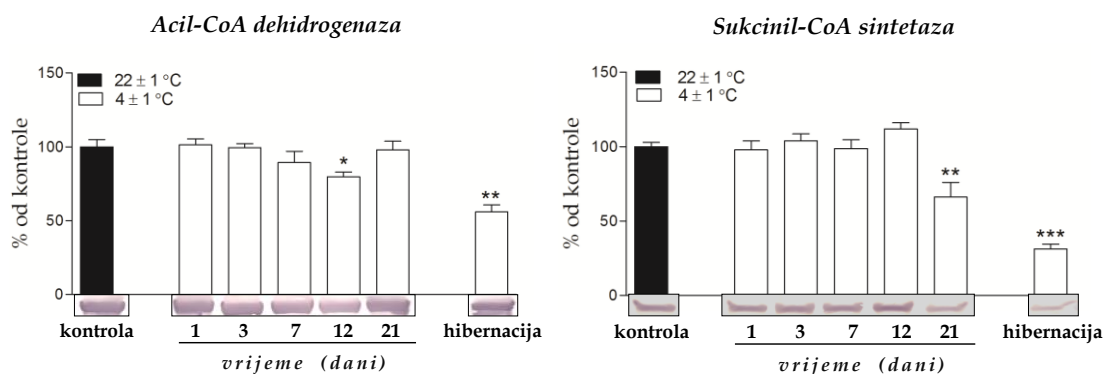


Figura 5. Promjene proteinske ekspresije acil-CoA dehidrogenaze (ACADM) i sukcinil-CoA sintetaze (SCAS) u BAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

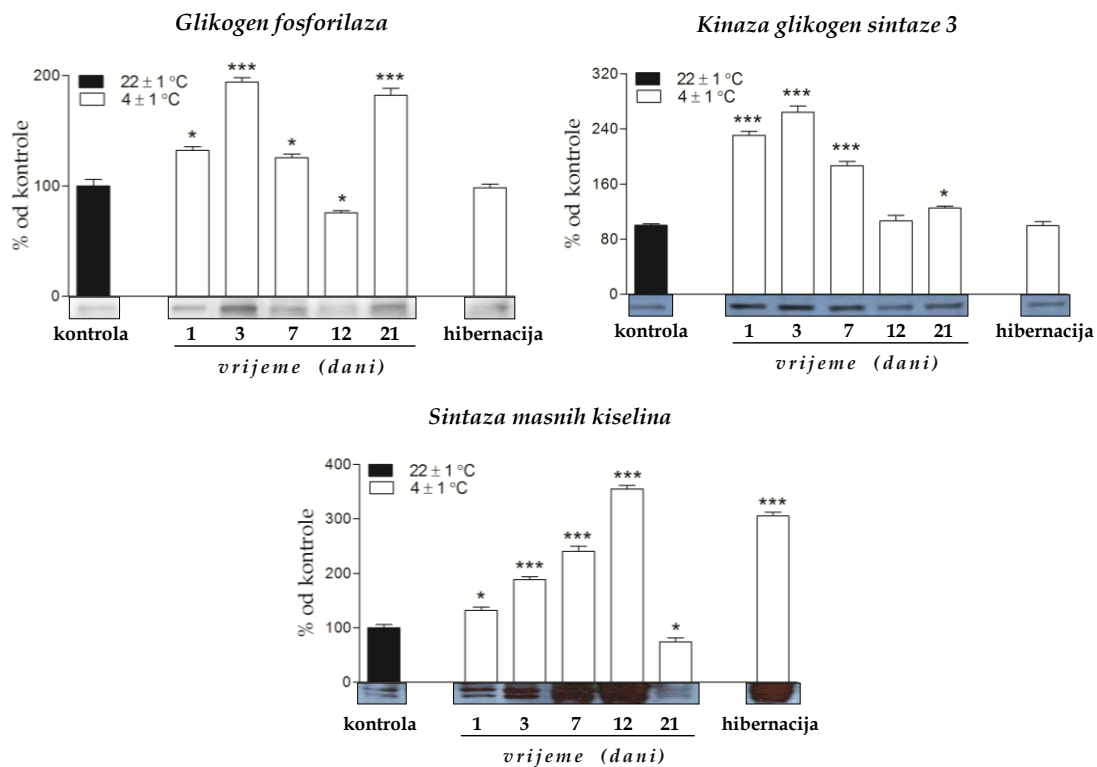


Figura 6. Promjene proteinske ekspresije glikogen fosforilaze (PYG), kinaze glikogen sintaze 3 (GSK3) i sintaze masnih kiselina (FAS) u BAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.1.1.8. Proteinska ekspresija HIF-1 α i fosfo-AMPK α

Kao što se vidi na Figuri 8 proteinski nivoi HIF-1 α i fosfo-AMPK α pokazuju suprotne promjene kako tokom izlaganja hladnoći, tako i u fazi hibernacije. Naime, tokom aklimacije na nisku temperaturu zabilježena je povećana količina fosfo-AMPK α u periodu od 1-12. dana ($p < 0,001$), dok je nakon toga, 21. dana, detektovano smanjenje količine ovog energetskog-senzora na 40% od kontrolne vrijednosti ($p < 0,001$), koje se zadržava u fazi hibernacije ($p < 0,01$).

Nasuprot opisanim promjenama za fosfo-AMPK α , nivo HIF-1 α proteina je bio na kontrolnom 1, 3. i 12. dana izlaganja hladnoći; dok je 21. dana aklimacije i u fazi hibernacije zabilježena povećana količina HIF-1 α u poređenju sa kontrolom ($p < 0,001$).

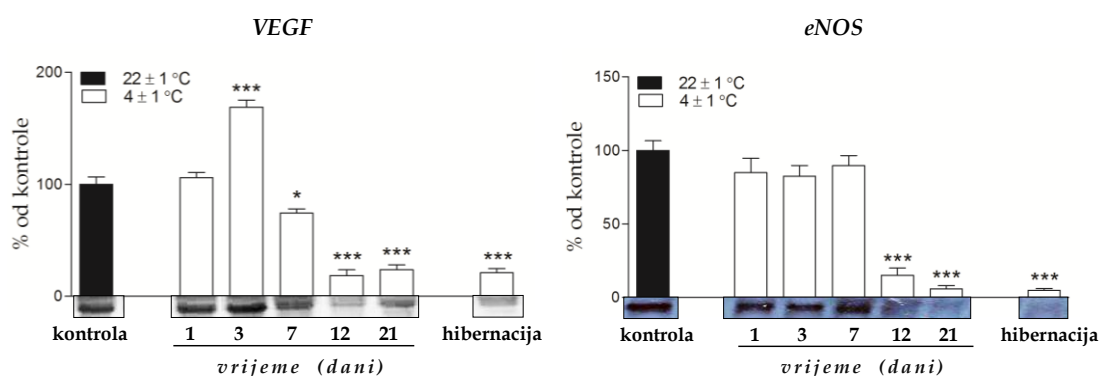


Figura 7. Promjene proteinske ekspresije vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF) i endotelijalne azot oksid sintaze (eNOS) u BAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

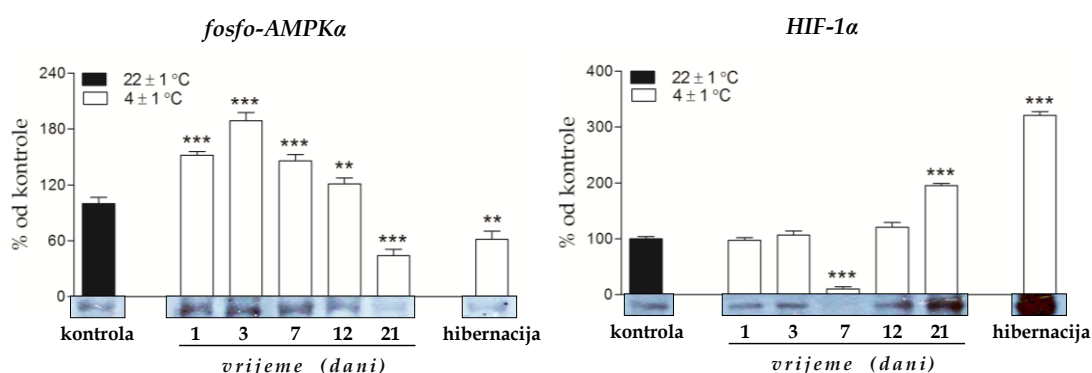


Figura 8. Promjene proteinske količine fosfo-AMP-aktivirane protein kinaze a (fosfo-AMPKa) i hipoksija-inducibilnog faktora-1a (HIF-1a) u BAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.1.1.9. Proteinska ekspresija mitofuzina 1 i PGC-1 α

Aklimacija na nisku temperaturu, indukovala je povećanje proteinske ekspresije mitofuzina od ~3 puta u poređenju sa kontrolnim uzorcima ($p < 0,001$). Potpuno suprotne promjene su detektovane u fazi hibernacije, gdje je proteinski nivo mitofuzina suprimiran na svega 10% od kontrolne vrijednosti ($p < 0,001$).

U poređenju sa kontrolom, proteinska ekspresija PGC-1 α je bila povećana ~1,4 puta nakon 3 dana aklimacije na nisku temperaturu, dok je 12. i 21. dana zabilježen pad u količini ovog proteina na ~50% kontrolne vrijednosti ($p < 0,01$). U fazi hibernacije, zabilježeno je još drastičnije smanjenje proteinske ekspresije PGC-1 α u poređenju sa

kontrolom (11% kontrolne vrijednosti; $p < 0,001$). Ovde opisane promjene su prikazane grafički na Figuri 9.

4.1.1.10. Proteinska ekspresija Nrf1 i NFE2L2

Tokom čitavog perioda aklimacije na nisku temperaturu zabilježen je povećan nivo Nrf1 i NFE2L2 proteina; dok u fazi hibernacije dolazi do restitucije količine ovih proteina na kontrolni nivo (Figura 10).

4.1.1.11. Proteinska ekspresija izoformi PPAR

Promjene proteinske ekspresije PPAR izoformi tokom aklimacije na nisku temperaturu i u fazi hibernacije prikazane su grafički na Figuri 11. Tokom aklimacije na hladnoću nivo PPAR α se ne mijenja tokom prvih 7 dana, nakon čega dolazi do supresije njegove transkripcije u poređenju sa kontrolom (12-21. dan; $p < 0,001$). Isti uslovi gotovo da nemaju efekta na proteinsku ekspresiju PPAR γ ; osim 12. dana kada je zabilježen pad njegove količine na svega 10% od kontrolne vrijednosti ($p < 0,001$). Proteinski nivo PPAR δ je nakon 3. dana aklimacije bio statistički viši ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolu. Međutim, 12. i 21. dana izlaganja hladnoći nivo PPAR δ je bio smanjen na 72%, odnosno 12% od kontrolne vrijednosti.

U poređenju sa kontrolom, proteinska ekspresija PPAR α i PPAR δ u fazi hibernacije je bila statistički značajno manja ($p < 0,001$); dok je proteinski nivo PPAR γ bio na nivou kontrole.

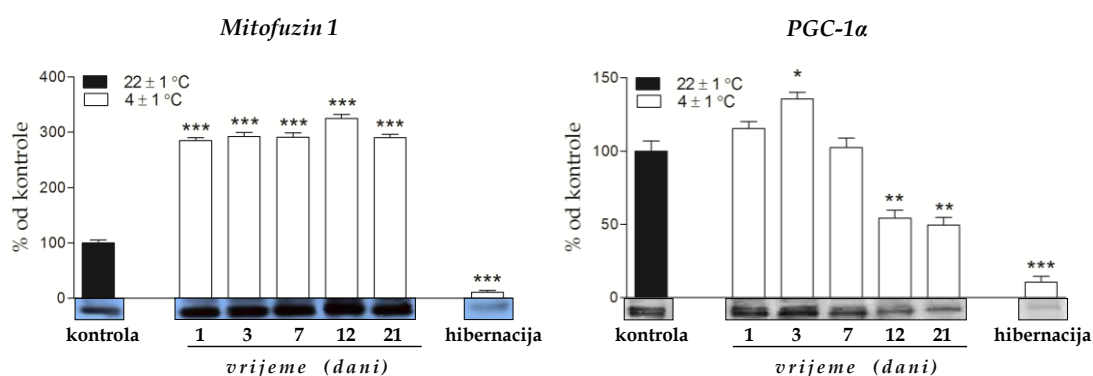


Figura 9. Promjene proteinske ekspresije mitofuzina 1 i PGC-1 α transkripcionog ko-aktivatora u BAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

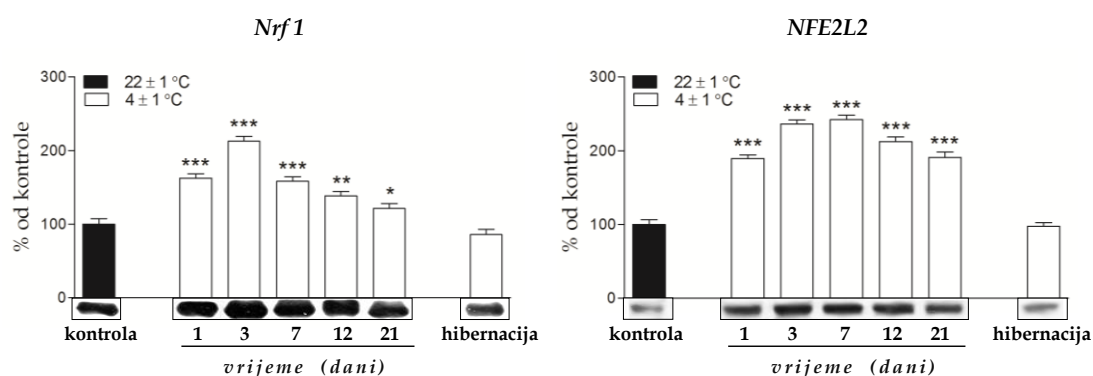


Figura 10. Promjene proteinske ekspresije *Nrf1* i *NFE2L2* transkripcionih faktora u BAT tekunica tokom vremenski- \dot{z} avisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

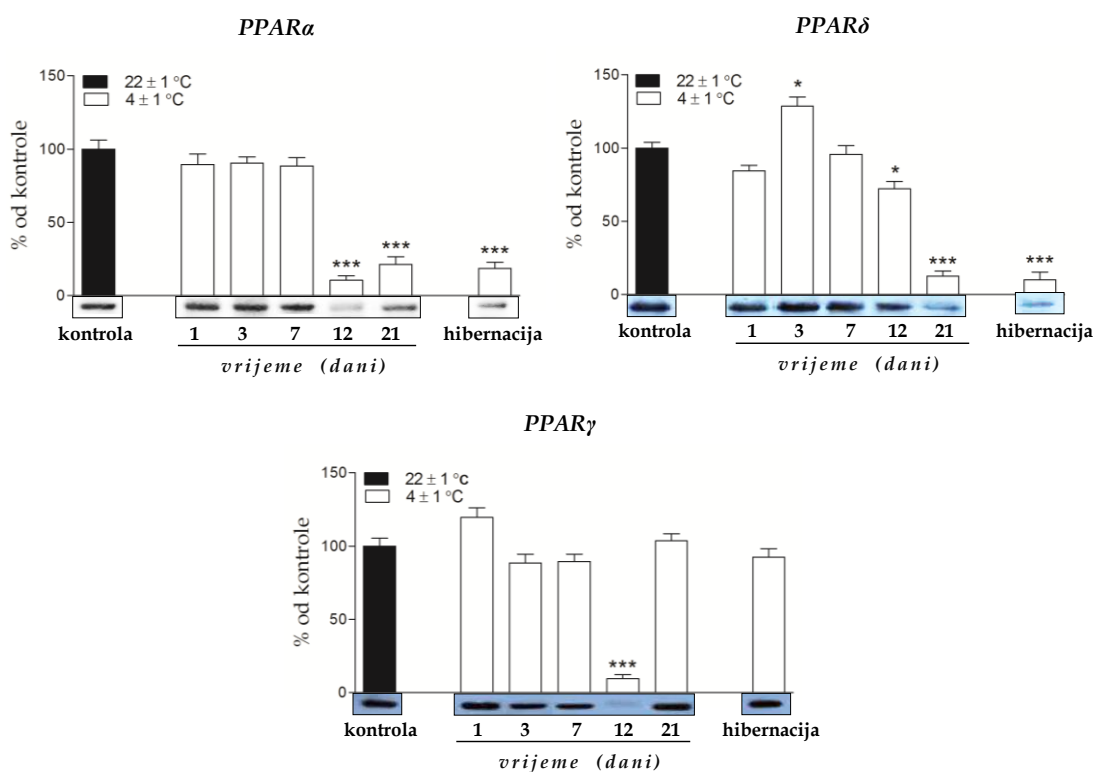


Figura 11. Promjene proteinske ekspresije *PPAR α* , *PPAR δ* i *PPAR γ* izoformi u BAT tekunica tokom vremenski- \dot{z} avisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.1.1.12. Proteinska ekspresija antioksidativnih enzima

Figura 12 pokazuje proteinsku ekspresiju ključnih AD enzima tokom aklimacije na hladnoću i u fazi hibernacije. Jedine promjene proteinskog nivoa katalaze i GSH-Px detektovane su 1. dana aklimacije kada je nivo katalaze bio povećan za ~25% u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$); kao i 12. dana kada je zabilježeno smanjenje nivoa GSH-Px proteina na 70% kontrolne vrijednosti ($p < 0,01$). U poređenju sa kontrolom, proteinska ekspresija CuZnSOD je bila manja ($p < 0,001$) prvog dana, odnosno veća 12. i 21. dana izlaganja hladnoći. Suprotno ostalim AD enzimima, nivo MnSOD proteina je bio veći u poređenju sa kontrolnom grupom, tokom čitavog perioda aklimacije na hladnoću ($p < 0,001$).

U fazi hibernacije detektovano je povećanje ($p < 0,001$) proteinskog nivoa katalaze (1,5 puta), CuZnSOD (2,1 puta) i MnSOD (1,9 puta) u poređenju sa kontrolnim, eutermičnim životinjama koje su boravile na sobnoj temperaturi. Suprotno, proteinska ekspresija GSH-Px je bila statistički značajno niža ($p < 0,001$) kod hibernirajućih životinja u poređenju sa kontrolnim.

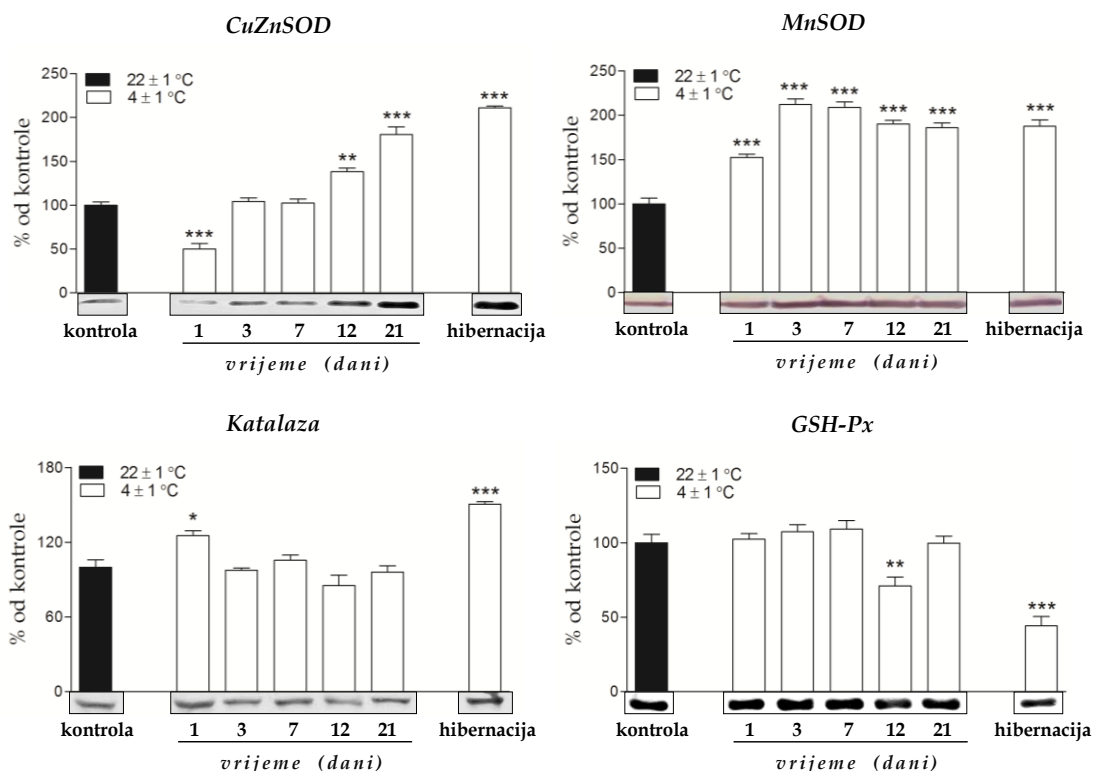


Figura 12. Promjene proteinske ekspresije Cu,Zn i Mn superoksid dismutaze (CuZnSOD i MnSOD), katalaze i glutation peroksidaže (GSH-Px) u BAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.1.2. RT-PCR analiza

4.1.2.1. Genska ekspresija komponenti OXPHOS

Figura 13 pokazuje da je u poređenju sa kontrolom genska ekspresija *kompleksa I* bila povećana od 1-12. dana aklimacije na nisku temperaturu ($p < 0,001$), a 21. dana restituisana na kontrolni nivo. Slično tome, iRNK nivo za *kompleks IV* je bio povećan u poređenju sa kontrolom u periodu od 3-12. dana; nakon čega (21. dan) je i u ovom slučaju zabilježena normalizacija količine iRNK. Što se tiče *ATP sintaze*, njena ekspresija je bila veća u odnosu na kontrolu 1, 3. i 12. dana izlaganja hladnoći, dok je 21. dana zabilježen statistički značajan pad količine iRNK za ovaj enzim na ~15% od kontrolne vrijednosti ($p < 0,001$).

U fazi hibernacije, a u poređenju sa kontrolom, genska ekspresija *kompleksa I* je bila veća ($p < 0,001$), *kompleksa IV* na nivou kontrole, dok je iRNK za *ATP sintazu* bila manja od one viđene u kontrolnim uzorcima ($p < 0,01$).

4.1.2.2. Genska ekspresija *Ucp1* i *Ucp2*

U poređenju sa kontrolom, genska ekspresija *Ucp1* je bila povećana od 1-12. dana aklimacije na nisku temperaturu, dok je 21. dana restituisana na kontrolni nivo (Figura 14). Suprotno tome, nivo iRNK za *Ucp2* je bio nepromjenjen 3, 7. i 21. dana aklimacije na hladnoću; dok je 1. dana primjećen pad od oko 65%; a 12. dana rast od ~1,3 puta u poređenju sa kontrolom.

U fazi hibernacije detektovano je povećanje količine iRNK i za *Ucp1* (~5 puta; $p < 0,001$) i za *Ucp2* (1,3 puta; $p < 0,05$) u poređenju sa kontrolom.

4.1.2.3. Genska ekspresija glikolitičkih enzima

Kao što se vidi na Figuri 15, aklimacija na hladnoću nije imala efekta na gensku ekspresiju *heksokinaze*; dok je u fazi hibernacije količina iRNK za ovaj enzim bila veća 2,1 puta u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$). Sa druge strane, u oba fiziološka stanja nivo iRNK za *Gapdh* je bila statistički značajno niža u poređenju sa kontrolom. U odnosu na kontrolnu grupu, genska ekspresija trećeg ispitivanog glikolitičkog enzima - *Pfk*, je bila veća u grupama životinja koje su bile izložene 3 ($p < 0,001$), odnosno 12 dana ($p < 0,01$) hladnoći, kao i u grupi hibernirajućih životinja ($p < 0,05$).

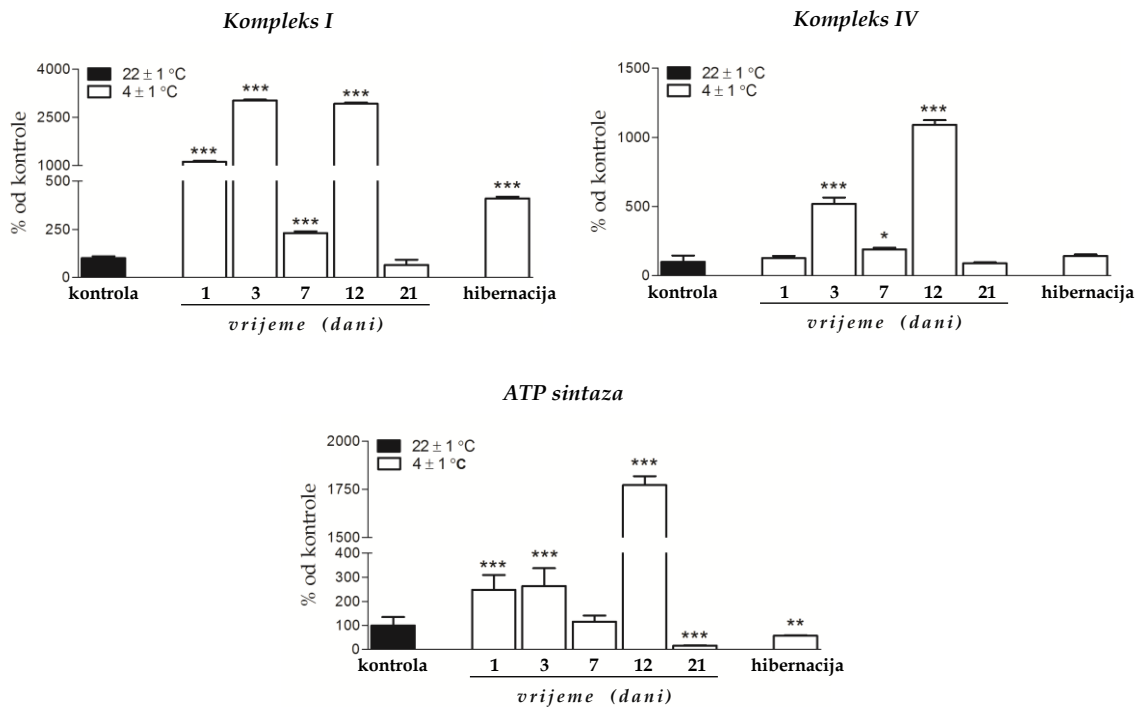


Figura 13. Promjena količine iRNK za kompleks I, kompleks IV i ATP sintazu OXPHOS u BAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

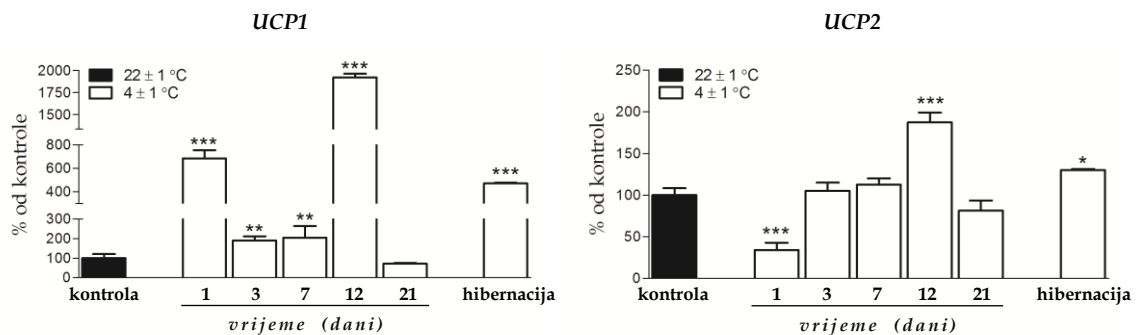


Figura 14. Promjena količine iRNK za dekaplajući protein 1 (Ucp1) i dekaplajući protein 2 (Ucp2) u BAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

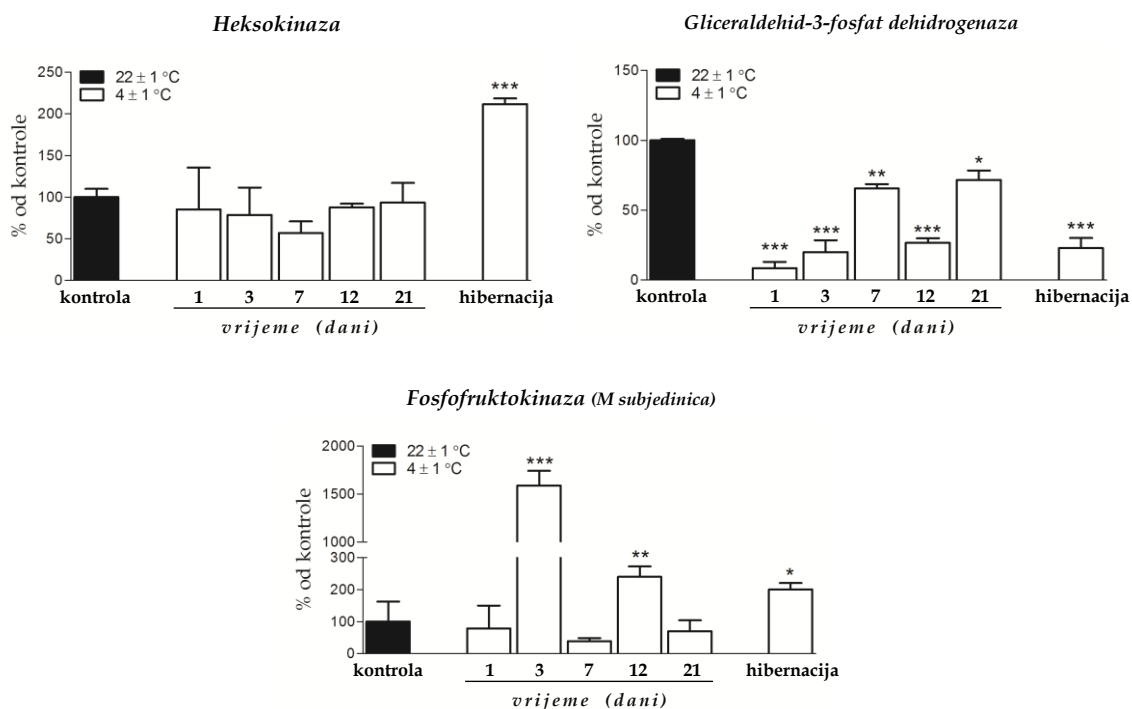


Figura 15. Promjena količine iRNK za heksokinazu, glicerinaldehyd-3-fosfat dehidrogenazu (*Gapdh*) i fosfofruktokinazu (*Pfk*) u BAT tkunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.1.2.4. Genska ekspresija *Pdh*, *Pdk4* i *Ldh H*

Prvih 12 dana aklimacije na hladnoću, genska ekspresija *Pdh* i njegovog regulatornog enzima *Pdk4* bila je povećana u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$), međutim 21. dana izlaganja niskoj temperaturi genska ekspresija *Pdh* se održala na višem nivou u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); dok se nivo *Pdk4* smanjio na svega ~8% od kontrolne vrijednosti ($p < 0,001$). U toku hibernacije zabilježeno je značajno smanjenje iRNK količine za oba proteina (za 66% u slučaju *Pdh* ($p < 0,01$), odnosno 88% u slučaju *Pdk4* ($p < 0,001$)).

Što se tiče *Ldh H*, njena genska ekspresija, u poređenju sa kontrolom, je bila značajno smanjena tokom gotovo čitavog perioda aklimacije na hladnoću, kao i u fazi hibernacije. Izuzetak je bio 12. dan izlaganja niskoj temperaturi, kada je detektovana 9,6 puta veća količina iRNK za *Ldh H* u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$).

Sve opisane promjene u genskoj ekspresiji *Pdh*, *Pdk4* i *Ldh H* su prikazane grafički na Figuri 16.

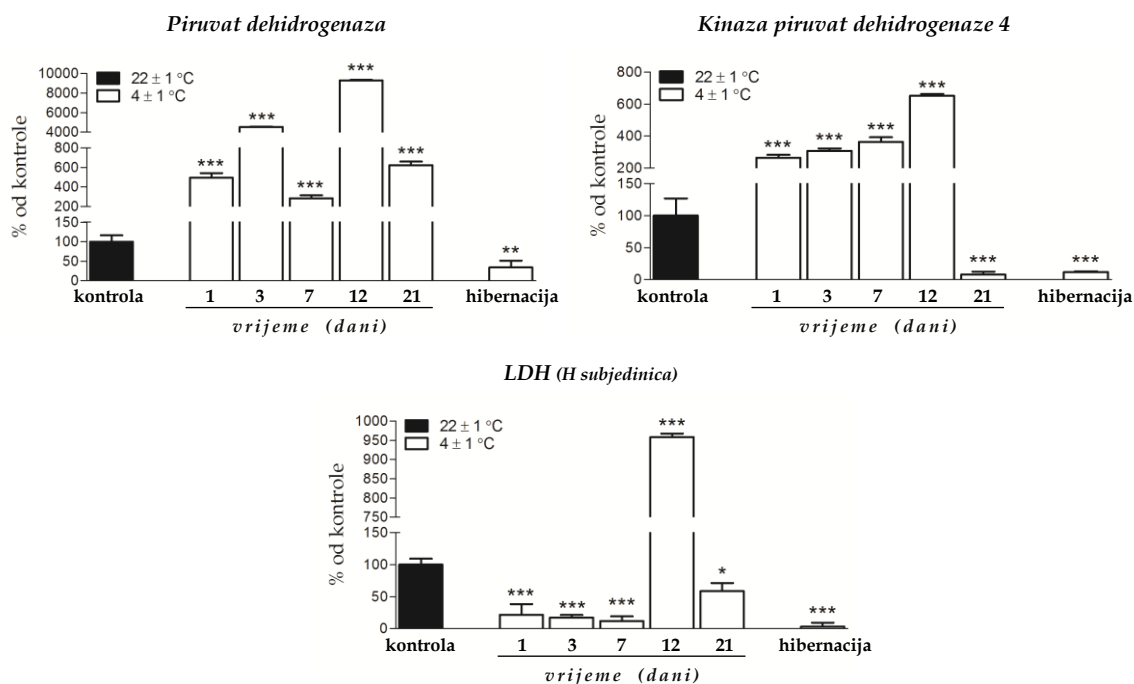


Figura 16. Promjena količine iRNK za piruvat dehidrogenazu (*Pdh*), kinazu piruvat dehidrogenaze 4 (*Pdk4*) i H subjedinicu laktat dehidrogenaze (*Ldh*) u BAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.1.2.5. Genska ekspresija α subjedinice *Hif-1*

U poređenju sa kontrolom, genska ekspresija *Hif-1a* je bila povećana 3, 12. i 21. dana aklimacije na hladnoću ($p < 0,001$); a smanjena 1. dana izlaganja životinje niskoj temperaturi i u fazi duboke hibernacije ($p < 0,001$) (Figura 17).

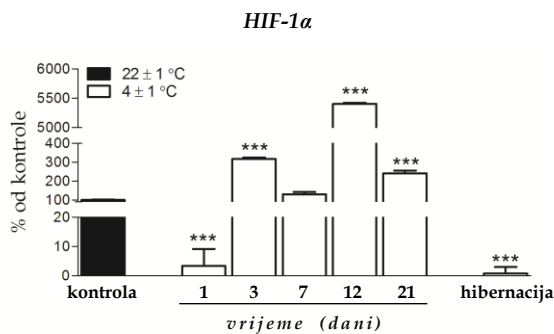


Figura 17. Promjena količine iRNK hipoksija-inducibilnog faktora-1a (*Hif-1a*) u BAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; *** $p < 0,001$.

4.1.2.6. Genska ekspresija enzima β -oksidacije

Kao što je predstavljeno na Figuri 18, genska ekspresija *Acadm* je, u poređenju sa kontrolom, bila značajno niža tokom skoro čitavog perioda izlaganja hladnoći, kao i u fazi hibernacije. Izuzetak je bio samo 7. dan aklimacije na uslove niske temperature, kada je količina iRNK za *Acadm* bila na kontrolnom nivou.

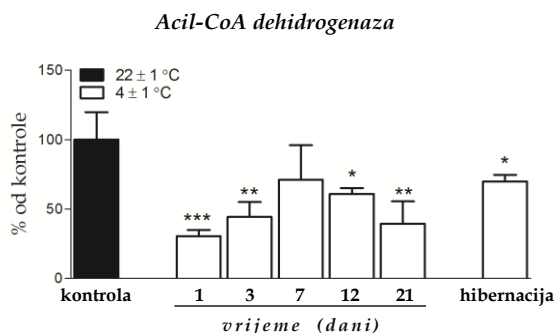


Figura 18. Promjena količine iRNK acil-CoA dehidrogenaze (*Acadm*) u BAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.1.2.7. Genska ekspresija enzima Krebsovog ciklusa

Promjene genske ekspresije *Cs*, *Mdb2* i *Scas*, tokom izlaganja životinja hladnoći i u fazi hibernacije, prikazane su na Figuri 19. U poređenju sa kontrolnim uzorcima, genska ekspresija *Cs* je bila značajno niža tokom čitavog perioda izlaganja hladnoći, dok je nivo iRNK za *Scas* bio manji od kontrolnog samo tokom prvih nedelju dana aklimacije. Nasuprot ovim promjenama, genska ekspresija mitohondrijalne izoforme *Mdb* je bila od 4-10 puta veća od kontrole, 1, 3. i 12. dana aklimacije i u fazi hibernacije ($p < 0,001$), dok je 7. i 21. dana bila ispod kontrolnog nivoa.

U fazi hibernacije, količina iRNK za *Scas* je bila na kontrolnom nivou; dok su nivoi iRNK za *Cs* i *Mdb2* bili veći 1,4 ($p < 0,05$); odnosno ~4 puta ($p < 0,001$), u odnosu na kontrolu.

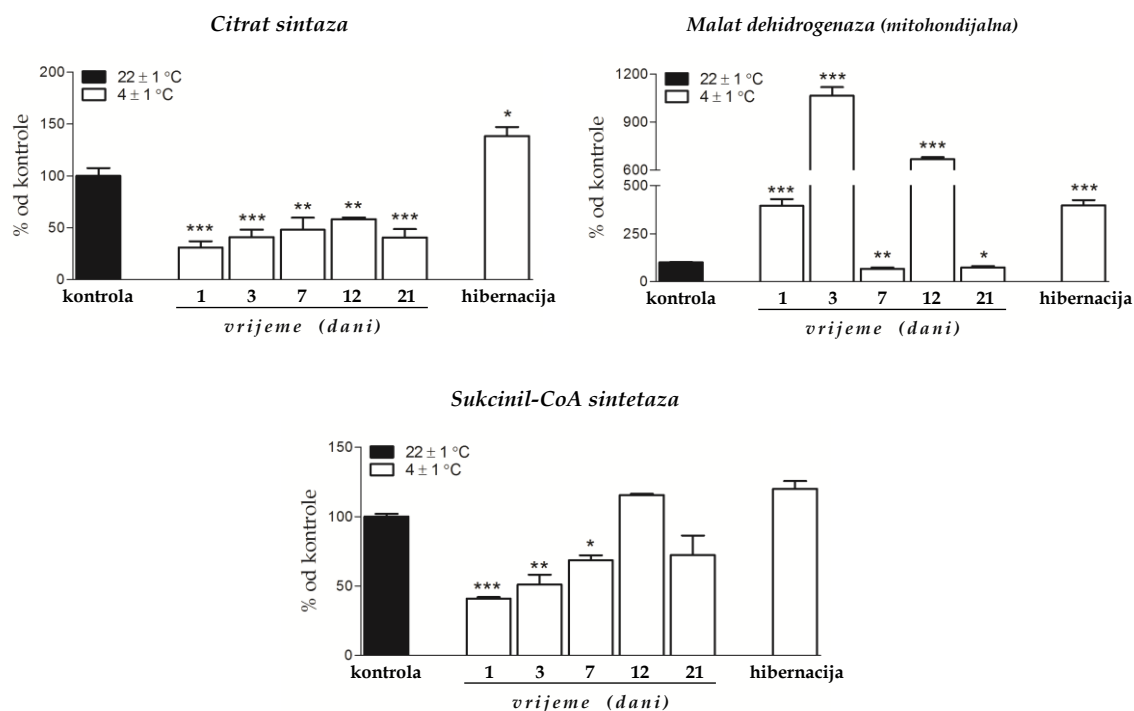


Figura 19. Promjena količine iRNK za citrat sintazu (*Cs*), malat dehidrogenazu (*Mdh*) i sukcinil-CoA sintazu (*Scas*) u BAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.1.2.8. Genska ekspresija enzima glukoneogeneze

Tokom čitavog perioda aklimacije na nisku temperaturu genska ekspresija *Pck1* je bila veća od kontrole (1. dan $p < 0,05$; odnosno 3-21. dan $p < 0,001$), kao i u fazi torpora ($p < 0,001$) (Figuri 20).

4.1.2.9. Genska ekspresija enzima uključenih u sintezu/razgradnju lipidnih i glukoznih rezervi

Genska ekspresija *Gsk3* i *Hsl* je bila nepromjenjena tokom čitavog perioda aklimacije na hladnoću; osim 1. dana kada je, u poređenju sa kontrolom, zabilježen pad od ~50% u količini iRNK za *Gsk3* (Figura 21). Nasuprot tome, genska ekspresija za *Gpd1* je bila manja od kontrole 1, 3, 7. i 21. dana aklimacije na nisku temperaturu; slično kao i genska ekspresija *Fabp4* (1, 3, 12. i 21. dan izlaganja hladnoći).

U fazi hibernacije detektovana je povećana količina iRNK za *Gpd1* i *Hsl* u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); dok je u istim uslovima genska ekspresija *Gsk3* bila nepromjenjena, a *Fabp4* smanjena na ~70% kontrolne vrijednosti ($p < 0,05$).

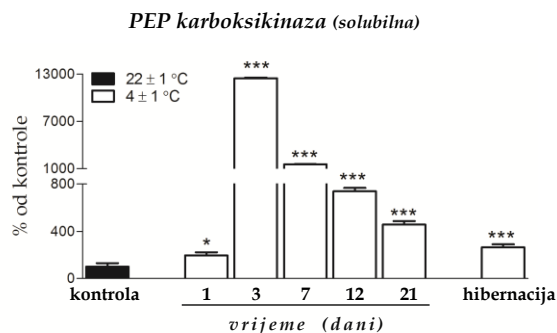


Figura 20. Promjena količine iRNK za fosfoenolpiruvat karboksikinazu (*Pck*) u BAT tkunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.1.2.10. Genska ekspresija antioksidativnih enzima

U poređenju sa kontrolom, genska ekspresija *katalaze* i *GSH-Px* je bila smanjena gotovo tokom čitavog perioda aklimacije na nisku temperaturu (Figura 22). Izuzetak je bio 7. dan; odnosno 7. i 12. dan, kada je količina iRNK za *GSH-Px* i *katalazu* bila na kontrolnom nivou.

U fazi hibernacije nivo genske ekspresije za *katalazu* i *GSH-Px* je bio smanjen za ~40; odnosno 50% od kontrolne vrijednosti.

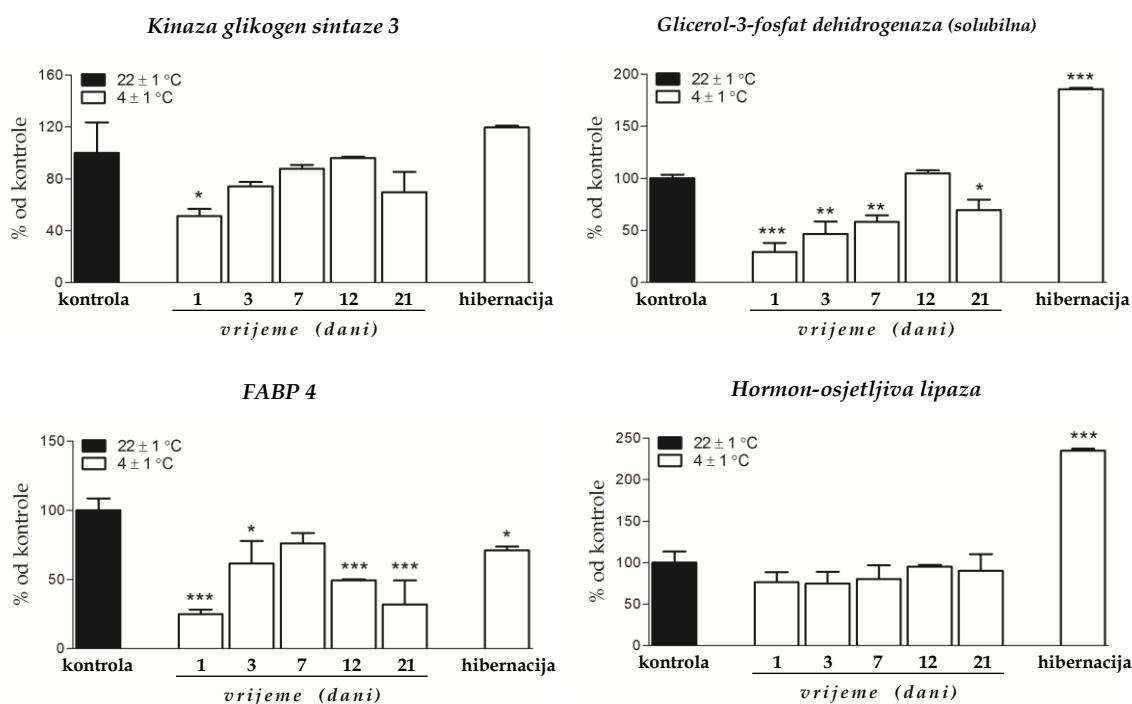


Figura 21. Promjena količine iRNK za kinazu glikogen sintaze 3 (*Gsk3*), glicerol-3-fosfat dehidrogenazu (*Gpd*), fatty-acid binding protein 4 (*Fabp4*) i hormon-osjetljivu lipazu (*Hsl*) u BAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

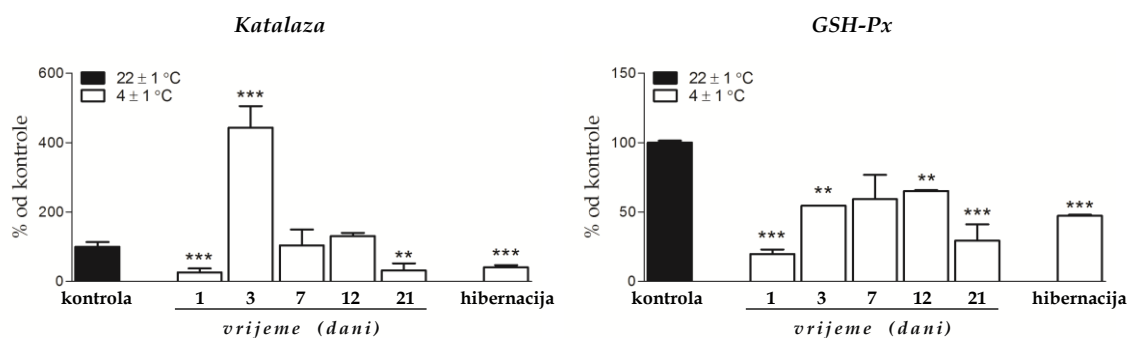


Figura 22. Promjena količine iRNK za katalazu i glutacion peroksidazu (*GSH-Px*) u BAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.1.3. Morfometrijska i stereološka analiza

4.1.3.1. Volumenska gustina adipocita, krvnih sudova i intersticijuma u BAT tekunica

Grupni histogram prikazan na Figuri 23 pokazuje da je volumenska gustina adipocita bila povećana u odnosu na kontrolu 12. i 21. dana aklimacije na hladnoću ($p < 0,001$). Nasuprot tome, udio kapilara u BAT je tokom prvih dana izlaganja niskoj temperaturi (1. i 7. dan) bio statistički značajno veći nego u kontrolnim uzorcima; dok je u istom periodu kada je zabilježena povećana volumenska gustina adipocita (12. i 21. dan), detektovano smanjenje zapreminskog udjela ove tkivne komponente. Što se tiče volumenske zastupljenosti intersticijuma, ona je bila smanjena tokom prvih 12 dana izlaganja hladnoći ($p < 0,001$), nakon čega se restituše na kontrolni nivo.

U poređenju sa kontrolom, u hibernaciji nema promjena volumenske gustine adipocita, krvnih sudova i intersticijuma.

4.1.3.2. Površina adipocitnog profila

U poređenju sa kontrolnom grupom, površina profila mrkih adipocita je bio statistički značajno veći u svim grupama životinja izlaganih niskoj temperaturi, kao i u grupi hibernirajućih životinja (Figura 24).

Volumenske gustine tkivnih komponenti

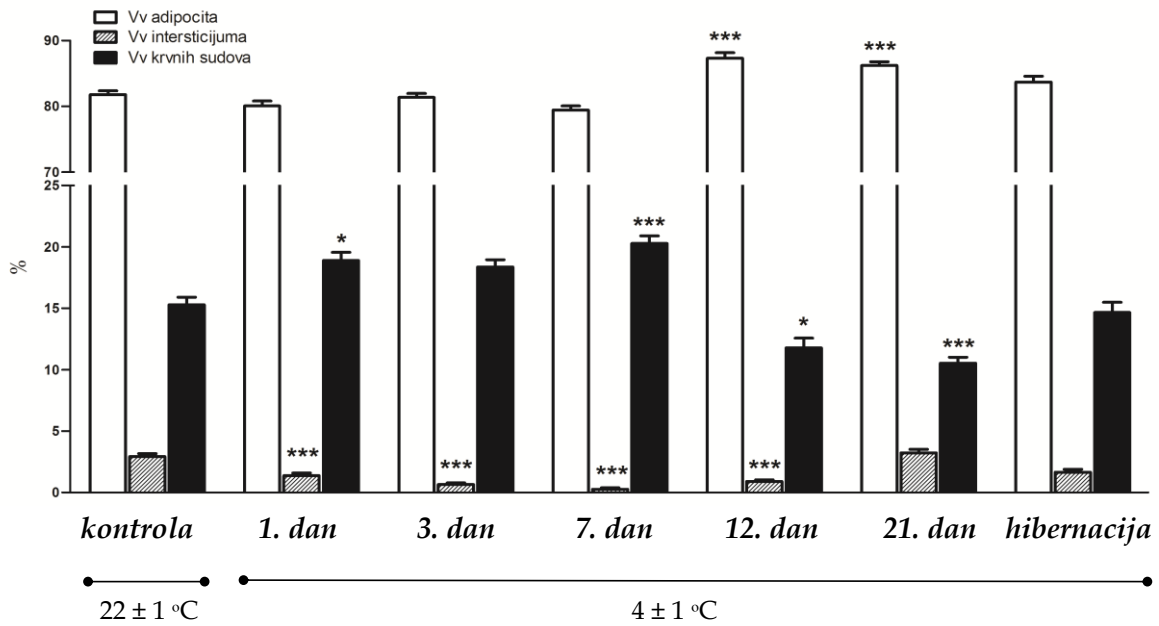


Figura 23. Grupni histogram volumenske gustine adipocita (bijeli stubići), intersticijuma (sivi stubići) i krvnih sudova (crni stubići) u BAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na gladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

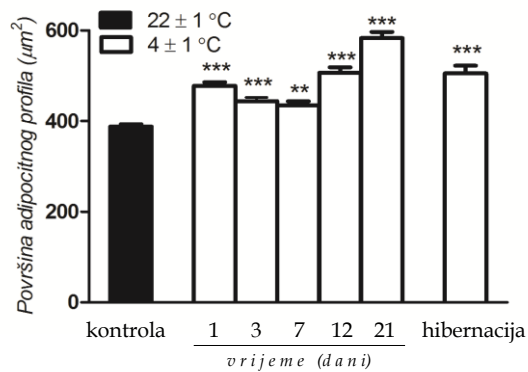


Figura 24. Promjene površine adipocitnog profila u BAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na gladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.1.4. Svjetlosna i elektronska mikroskopija

4.1.4.1. BAT - opšta slika, prokrvljenost

Svjetlosna mikroskopija (Slika 11) je pokazala da mrki adipociti prilikom izlaganja životinja hladnoći podliježu hipertrofiji (posebno od 12. dana). Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima morfometrijske i stereološke analize; koji govore u prilog povećanom zapreminskom udjelu adipocita u tkivu, kao i povećanju površine njihovog profila. Takođe, osim što dolazi do povećanja veličine adipocita, zapaža se i (prividni) gubitak granica među susjednim ćelijama, pri čemu se nukleusi adipocita (inače centralno pozicionirani) pomjeraju ka periferiji, te se stvara neka vrsta sincicijuma, koja može ukazivati na metaboličku i/ili funkcionalnu bliskost i koodinaciju ovih ćelija (formiranje „metaboličkih jedinica“). U hibernaciji se zadržava povećana veličina adipocita, kao i periferno postavljeni nukleusi; ali se granice među ćelijama jasno uočavaju.

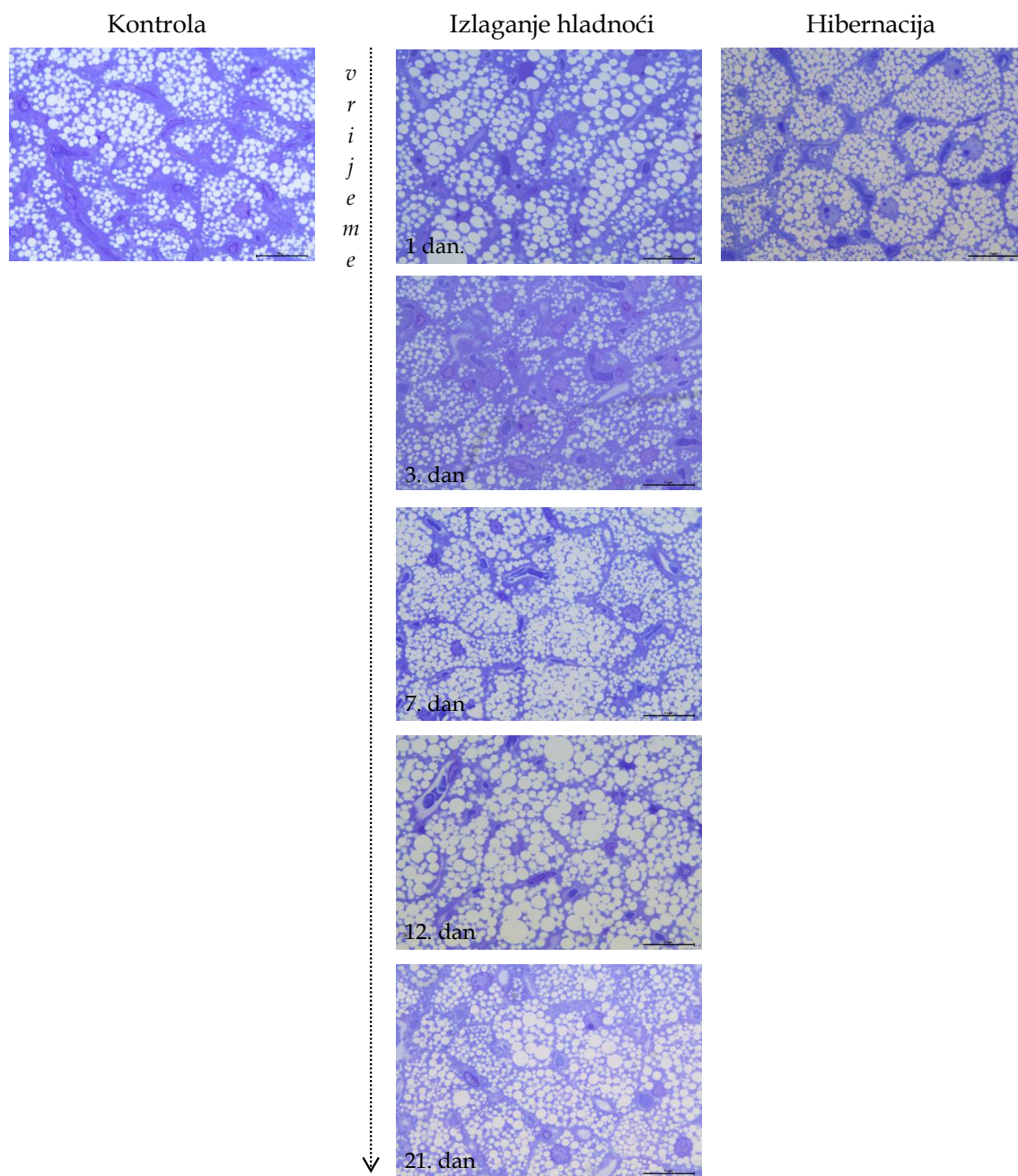
Takođe, rezultati svjetlosne i elektronske mikroskopije pokazuju da trećeg i sedmog dana izlaganja hladnoći, kao i u fazi hibernacije u citoplazmi mrkih adipocita dolazi do usitnjavanja lipidnih kapi. Međutim, na elektronskim mikrografijama (Slika 12) se vidi da 21-dnevno izlaganje hladnoći ne afektuje značajno veličinu lipidnih kapi, ali vodi povećanju veličine mitohondrija; te se u ovom periodu uočava prisustvo uvećanih mitohondrija u poređenju sa kontrolnom grupom.

I rezultati volumenske gustine kapilara jasno se mogu vidjeti na svjetlosnim mikrografijama BAT (Slika 13). Naime, tokom prvih nedelju dana aklimacije na hladnoću uočava se povećanje kontaktne površine između pojedinačnih adipocita i kapilara, koja dostiže maksimum 7. dana. Trećeg i sedmog dana izlaganja hladnoći u tkivu se uočava izrazita dilatiranost krvnih sudova, koja vjerovatno doprinosi povećanju volumenske gustine ove komponente u tkivu (rezultati stereološke analize). Nakon, ovog inicijalnog povećanja prokrvljenosti, 12. i 21. dana aklimacije na hladnoću, kao i u fazi hibernacije jasno se uočava smanjenje kontaktne površine kapilara i adipocita; koja je čini se manja nego u kontrolnim presjecima.

4.1.4.2. Inervacija BAT

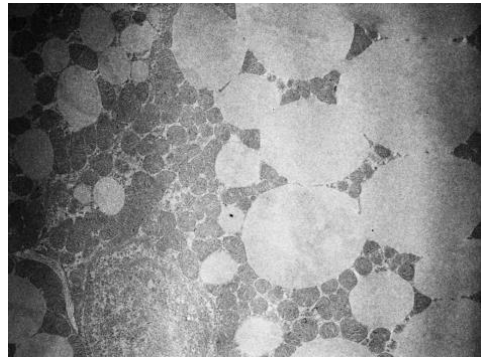
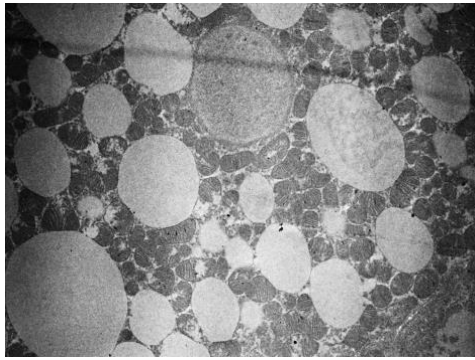
Promjene u inervaciji BAT prikazane su na Slici 14. Interesantno je da je u kontrolnim uzorcima primjećen visok stepen inervacije BAT, tj. veliki broj nervnih vlakana oko kapilara. Tokom prvih nekoliko dana (do 7 dana) jasno se uočava povećanje inervacije BAT oko krvnih sudova, kao i povećanje brojnosti tzv. „*en passant*“ sinapsi koje nervna

vlakna uspostavljaju direktno sa mrkim adipocitima. Međutim, sa mikrografija se jasno vidi da već od 12. dana izlaganja niskoj temperaturi dolazi do smanjenog nervnog „napajanja“ BAT, što se održava do kraja ispitivanog perioda. Takođe i u hibernaciji je primjećen manji broj nervnih vlakana, kako oko mrkih adipocita tako i oko kapilara.

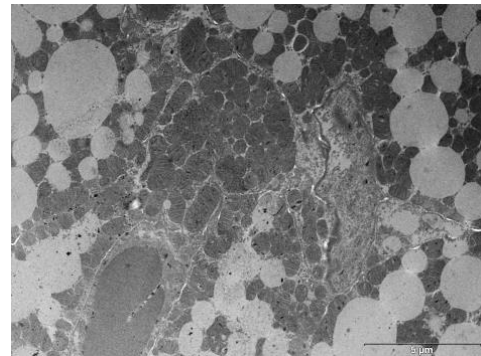
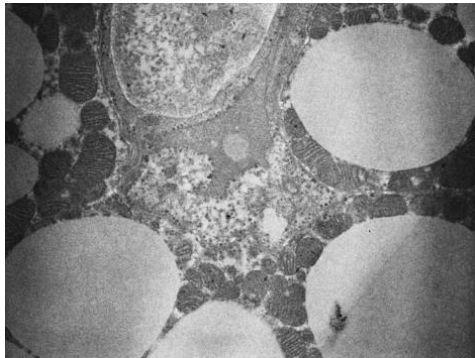


Slika 11. Opšta slika BAT tekunica kontrolne grupe, tokom vremenski-zavisnog izlaganja niskoj temperaturi (1, 3, 7, 12, odnosno 21 dan) i u hibernaciji. Orig. uveličanje - 100x.

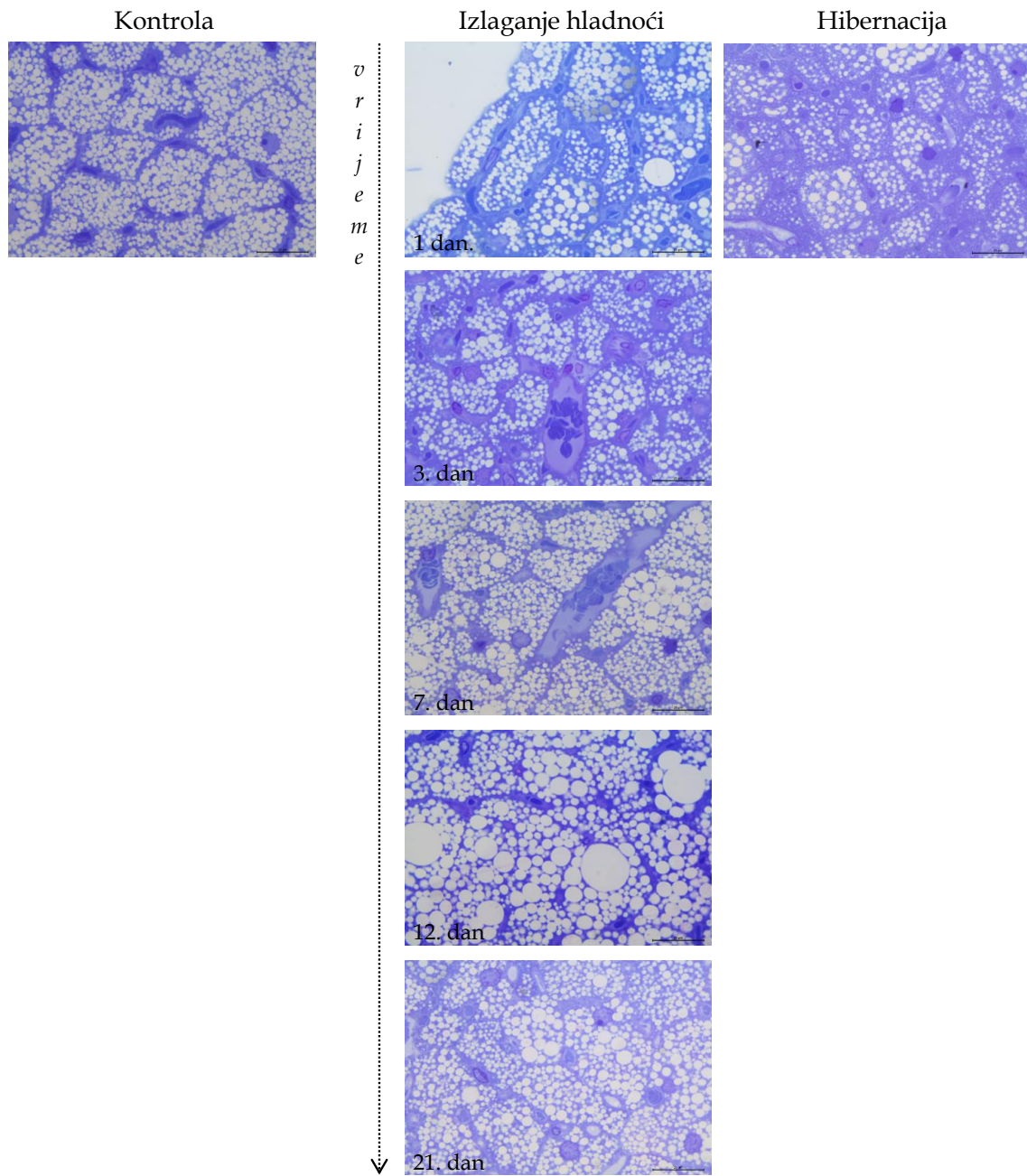
K



21d



***Slika 12.** Mrki adipociti tekunica kontrolne grupe (slike gore) i grupe izlagane bladnoći 21 dan (slike dolje). Scale bar 10 μ m.*



Slika 13. Prokrvljenost BAT tekunica kontrolne grupe, tokom vremenski-zavisnog izlaganja niskoj temperaturi (1, 3, 7, 12, odnosno 21 dan) i u hibernaciji. Orig. uveličanje - 100x.

4.1.4.3. PAS bojenje rezervi glikogena

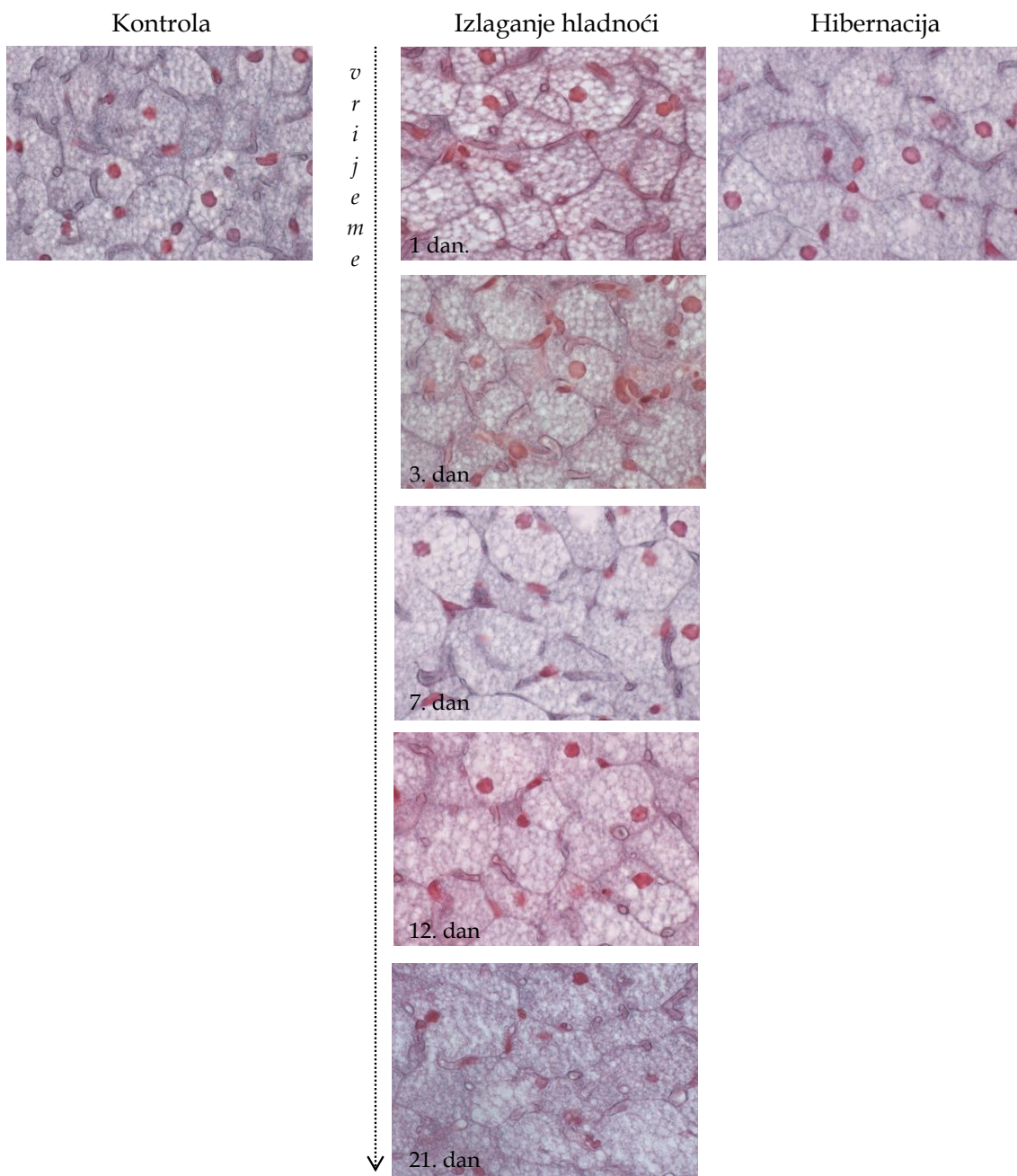
Rezerve glikogena u citoplazmi se jako boje Šifovim reagensom, što je primjetno već u kontrolnim uzorcima (Slika 15). Međutim, odmah po izlaganju hladnoći (1. dan) primjećeno je smanjenje rezervi glikogena; koje se nakon nedelju dana izlaganja hladnoći restituišu. Takođe histološki nije primjećena promjena u količini glikogena tokom faze hibernacije u poređenju sa kontrolom.

4.1.4.4. Nukleusi mrkih adipocita

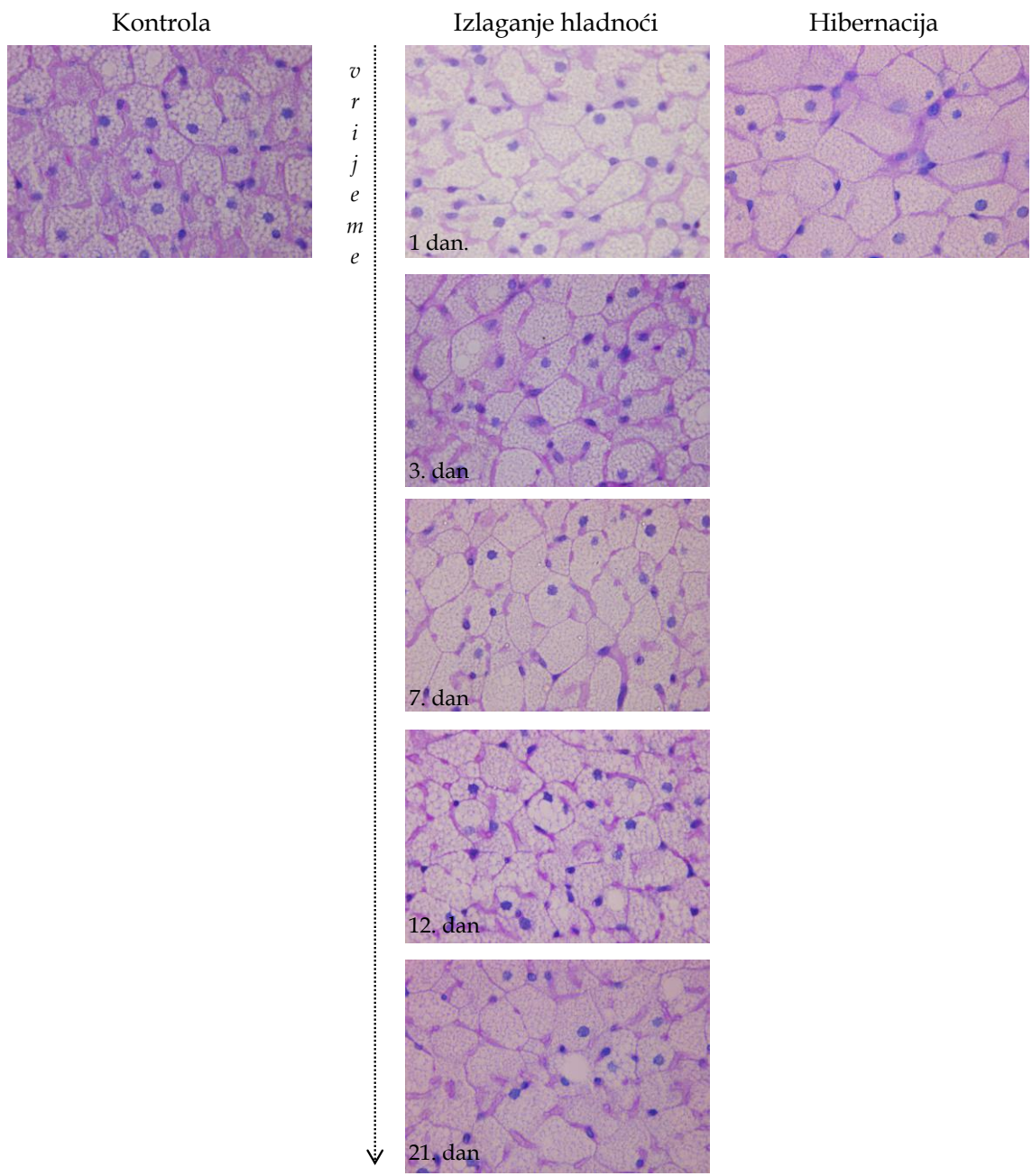
Nukleusi mrkih adipocita kontrolne grupe životinja su heterogeni, zastupljena su dva tipa podjednake brojnosti: heterohromatski, poligonalni i euhromatski, okrugli. Heterogenost se zadržava i 1. dana, ali se broj euhromatskih nukleusa povećava, dok su u ostalim grupama prisutni krupni, okrugli, euhromatski nukleusi sa jednim ili dva nukleolusa – transkripciono aktivna forma (Slika 16). Takođe, na *semi-fine* presjecima se jasno uočava da nukleusi mrkih adipocita 7. i 12. dana izlaganja hladnoći i u hibernaciji sadrže lipidna tela; a primjećeni su i binukleusni adipociti 7. dana izlaganja niskoj temperaturi (Slika 17).

4.1.4.5. Apoptoza u BAT

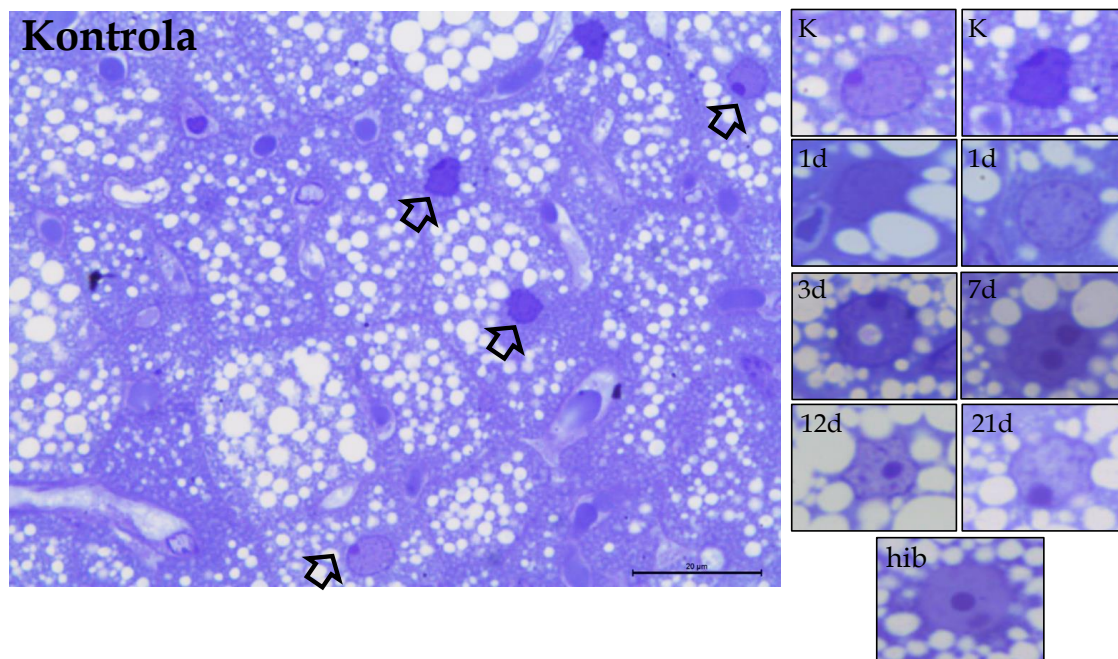
Na parafinskim presjecima je primjećeno apoptotsko odstranjivanje mrkih adipocita 21. dana izlaganja hladnoći (Slika 18). Takođe na *semi-fine* presjecima se jasno vidi formiranje apoptotskih tijela i njihovo uklanjanje makrofagima. Interesantno je međutim da su u kod iste grupe životinja detektovane nestin-imunopozitivne ćelije (parafinski presjeci), što vjerovatno ukazuje na paralelnu, balansiranu indukciju odstranjivanja mrkih adipocita i njihove proliferacije.



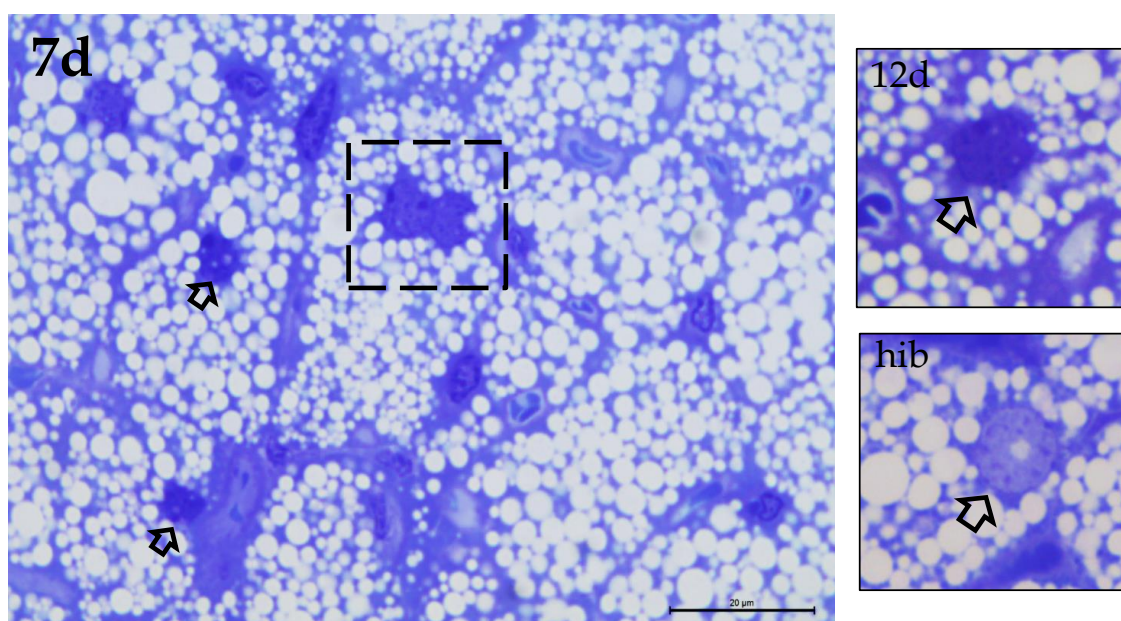
Slika 14. Inervacija BAT tekunica kontrolne grupe, tokom vremenski-zavisnog izlaganja niskoj temperaturi (1, 3, 7, 12, odnosno 21 dan) i u hibernaciji. Orig. uveličanje - 63x.



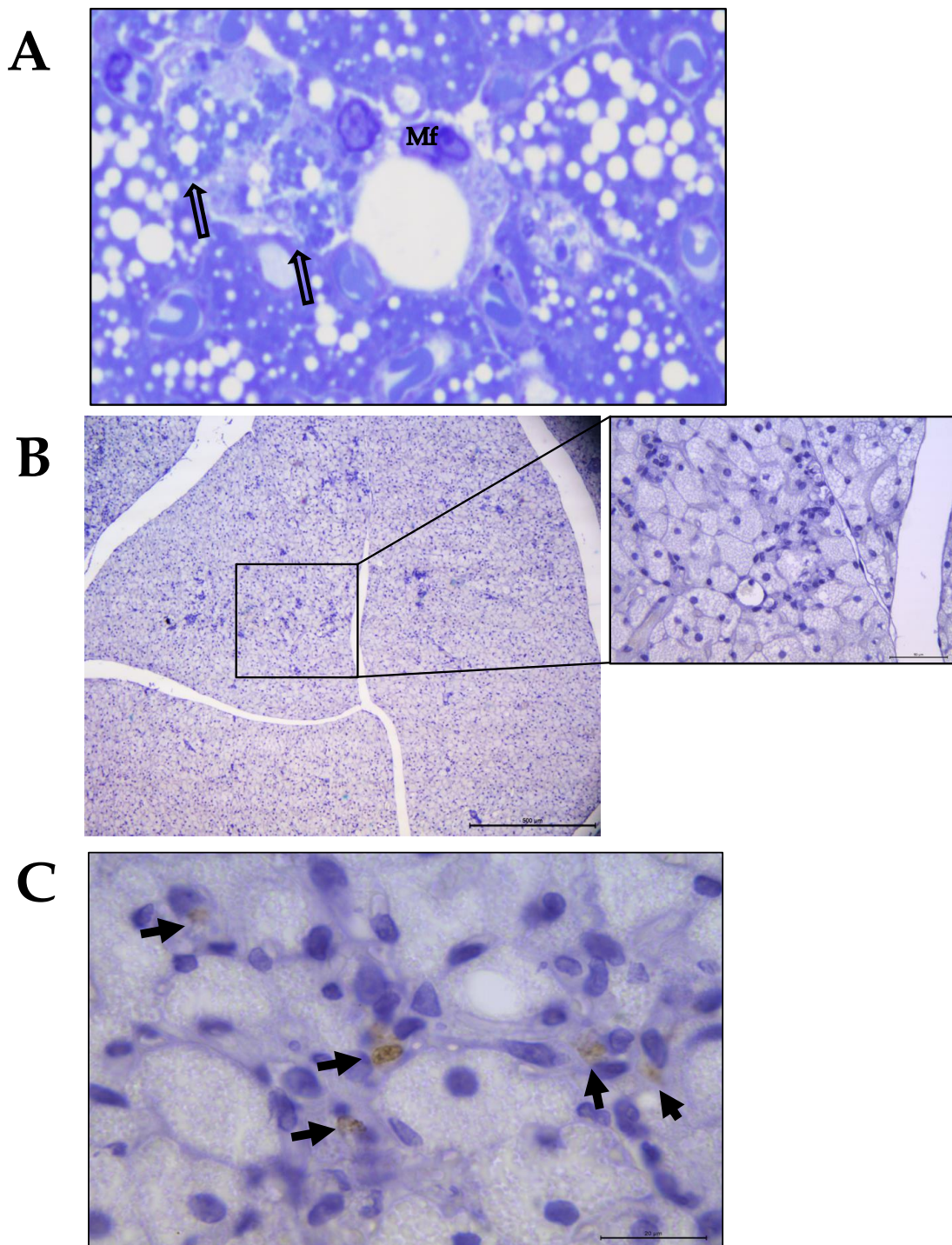
Slika 15. Rezerve glikogena u BAT tekunica kontrolne grupe, tokom vremenski-zavisnog izlaganja niskoj temperaturi (1, 3, 7, 12, odnosno 21 dan) i u hibernaciji. Orig. uveličanje - 40x.



Slika 16. Nukleusi mrkih adipocita kontrolne grupe, tokom vremenski-zavisnog izlaganja niskoj temperaturi (1, 3, 7, 12, odnosno 21 dan) i u hibernaciji. Kontrola, orig. uveličanje - 100 \times . (lijevo). Sve grupe, orig. uveličanje - 100 \times (desno).



Slika 17. Binukleusni mrki adipociti u BAT tekunica izlaganih 7 dana niskoj temperaturi. Orig. uveličanje - 100 \times (lijevo). Prisustvo lipidnih kapi u nukleusima mrkih adipocita u BAT tekunica izlaganih hladnoći 12 dana i u hibernaciji. Orig. uveličanje - 100 \times (desno).



Slika 18. Apoptotsko odstranjivanje mrkih adipocita i prisustvo nestin-imunopozitivnih ćelija u BAT tekunica izlaganih hladnoći 21 dan. A) semi-fine presjek, orig. uveličanje - 100x . B) parafinski presjek, orig. uveličanje - 5x, insert, orig. uveličanje - 10x; C) parafinski presjek, orig. uveličanje 20x. Mf - makrofagi; bijela strelica - apoptoza; crna strelica - nestin-imunopozitivna ćelija.

4.2. MRKO MASNO TKIVO PACOVA

4.2.1. Western blot analiza

4.2.1.1. Proteinska ekspresija enzima uključenih u katabolizam glukoze

Figura 25 pokazuje da se tokom rane faze aklimacije na hladnoću (1-7 dana) proteinski nivo heksokinaze, GAPDH i PDH značajno smanjuje u poređenju sa kontrolom ($p < 0,001$). Ovo smanjenje je nastavljeno tokom čitavog ispitivanog perioda za PDH ($p < 0,001$), za heksokinazu do 21. dana, a za GAPDH do 12. dana ($p < 0,01$) izlaganja hladnoći.

4.2.1.2. Proteinska ekspresija α subjedinice HIF-1

Tokom prvih nedelju dana izlaganja niskoj temperaturi detektovana je povećana akumulacija α subjedinice HIF-1 u poređenju sa kontrolom ($p < 0,001$), dok je nakon toga do kraja ispitivanog perioda (21 dan) zabilježen pad od 75-90% u nivou HIF-1 α proteina ($p < 0,001$) (Figura 26).

4.2.1.3. Proteinska ekspresija enzima uključenih u lipidni metabolizam

Kao što je pokazano na Figuri 27, hladnoća je indukovala značajno smanjenje proteinskog nivoa ACADM tokom ranog perioda aklimacije ($p < 0,001$). Nasuprot tome, proteinska količina SCAS i FAS je bila povećana u odnosu na kontrolu, tokom čitavog perioda izlaganja hladnoći, osim 1. dana kada je zabilježen pad proteinske količine i SCAS i FAS od 15%, odnosno 80% u odnosu na kontrolu.

4.2.2. Enzimska aktivnost

4.2.2.1. Enzimska aktivnost laktat dehidrogenaze

U poređenju sa kontrolom, aktivnost LDH je bila značajno povećana od 3. dana aklimacije na hladnoću, pa sve do kraja ispitivanog perioda ($p < 0,001$) (Figura 28).

4.2.3. Svjetlosna i elektronska mikroskopija

4.2.3.1. PAS bojenje rezervi glikogena

Jednodnevno izlaganje životinja hladnoći indukovalo je brzo smanjenje glikogenskih rezervi. Međutim, već od 3. dana aklimacije na nisku temperaturu primjećeno je deponovanje glikogena (Slika 19, lijevi panel).

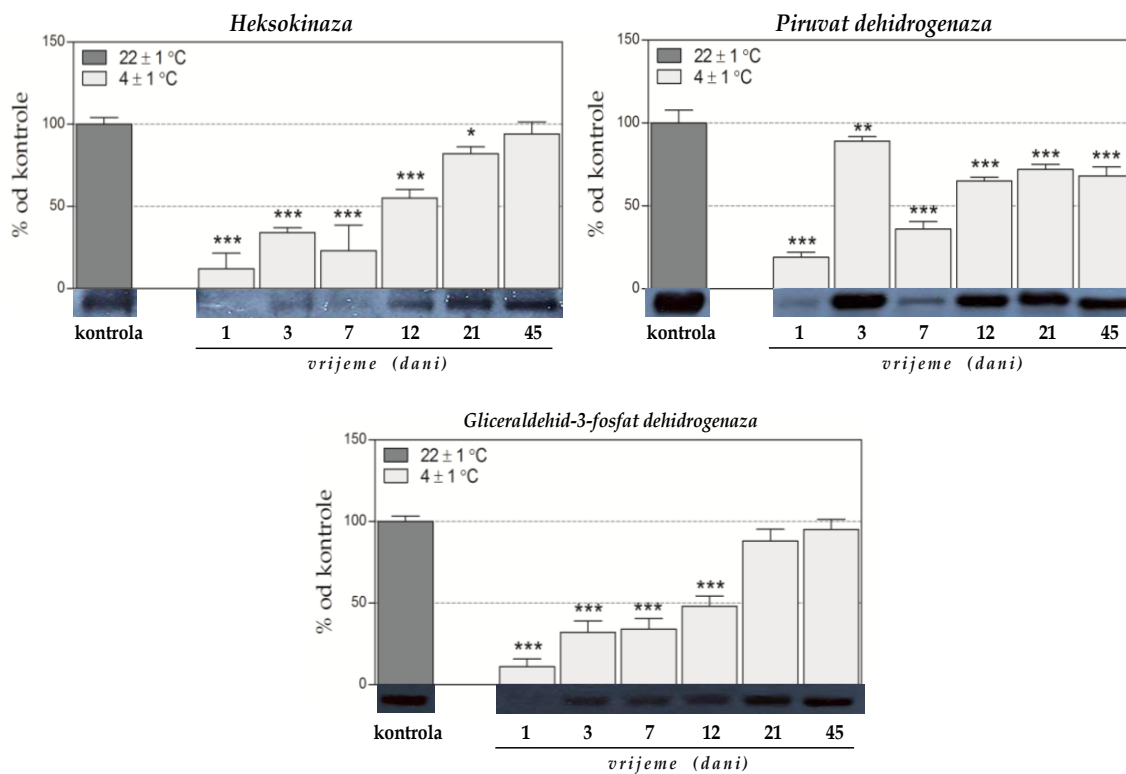


Figura 25. Promjene proteinske ekspresije heksokinaze, piruvat dehidrogenaze (PDH) i gliceralehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH) u BAT pacova tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

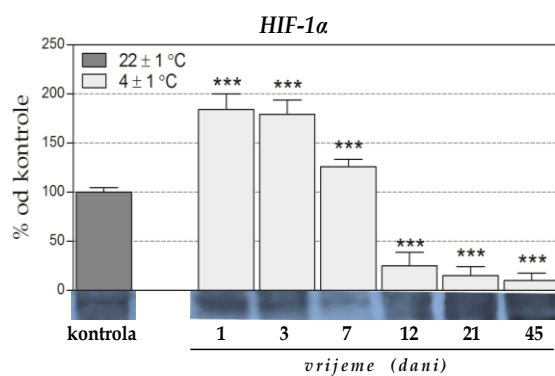


Figura 26. Promjene proteinske ekspresije bipoksija-inducibilnog faktora-1a (HIF-1α) u BAT pacova tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću. *poređenje sa kontrolnom grupom; *** $p < 0,001$.

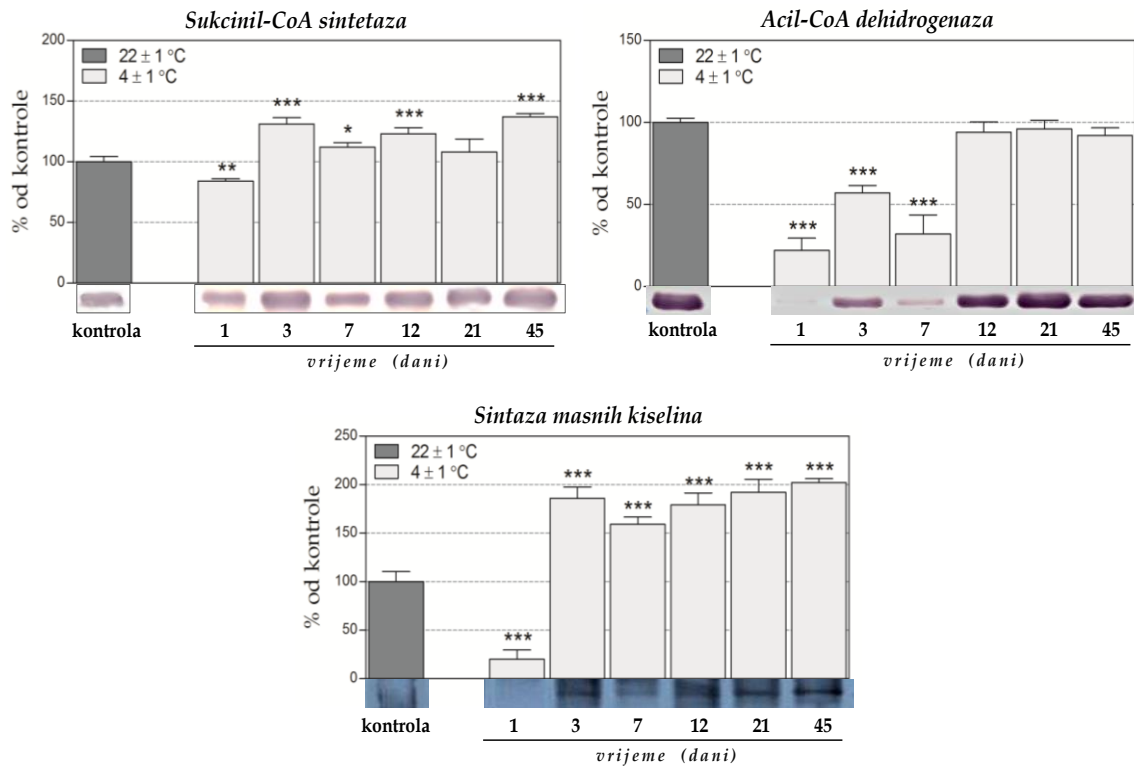


Figura 27. Promjene proteinske ekspresije sukcinil-CoA sintetaze (SCAS), acil-CoA dehidrogenaze (ACADM) i sintaze masnih kiselina (FAS) u BAT pacova tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

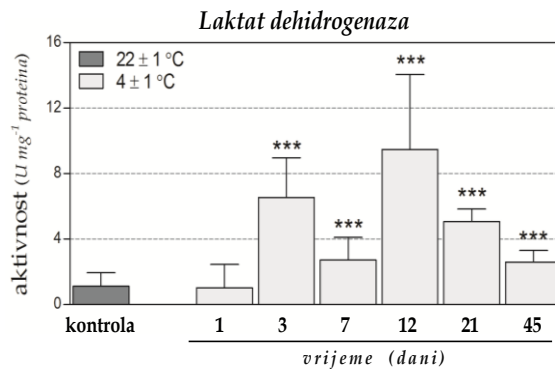
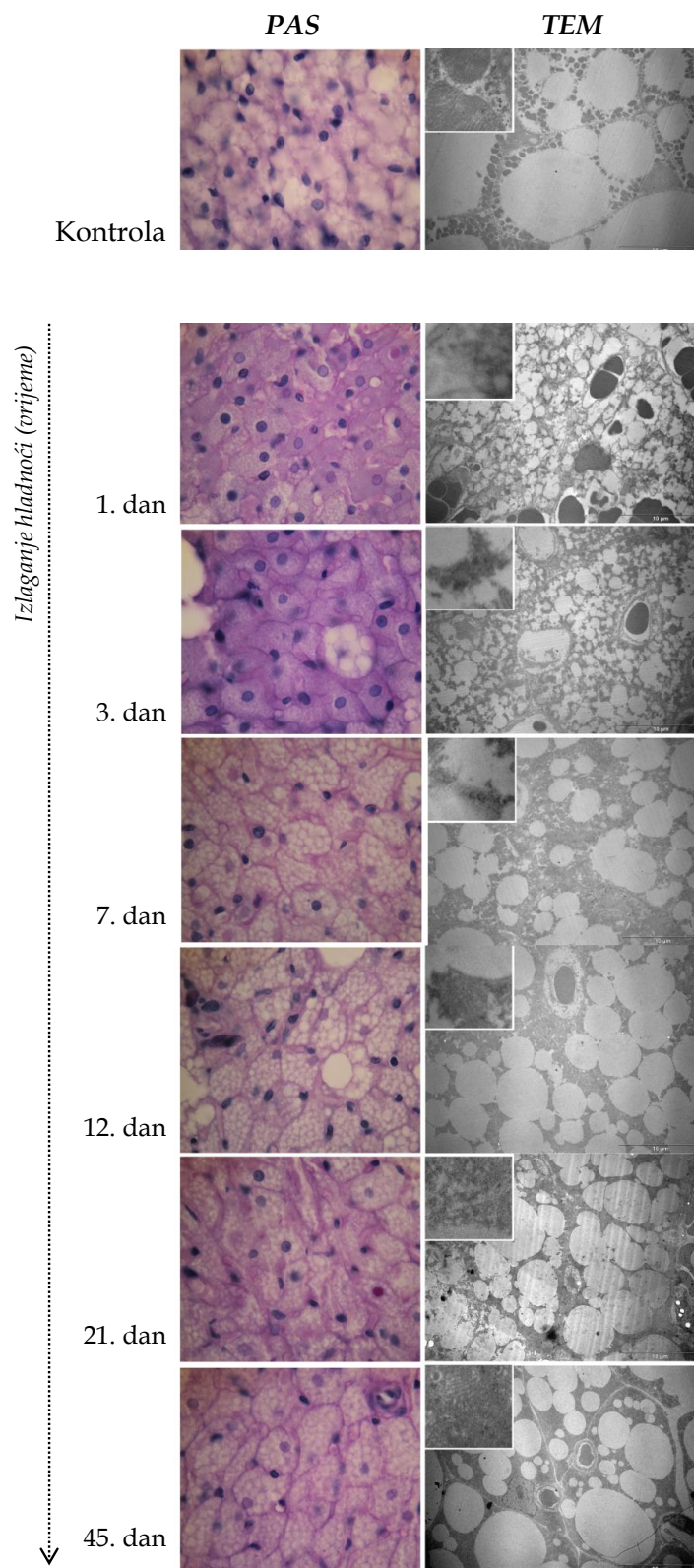


Figura 28. Promjene aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH) u BAT pacova tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću. *poređenje sa kontrolnom grupom; *** $p < 0,001$.



Slika 19. Rezerve glikogena (lijevi panel) i lipidne kapi (desni panel) u BAT pacova kontrolne grupe i tokom vremenski-zavisnog izlaganja niskoj temperaturi (1, 3, 7, 12, 21, odnosno 45 dana). SM - Orig. uveličanje - 40x, TEM - scale bar 10 μ m.

4.2.3.2. Lipidne rezerve

Elektronske mikrografije pokazuju promjene u količini lipidnih rezervi tokom izlaganja pacova hladnoći (Slika 19, desni panel). Ove promjene veličine lipidnih rezervi bile su vrlo slične promjenama rezervi šećera. Naime i ovde je primjećeno smanjenje lipidnih depozicija u mrkim adipocitima već prvog dana izlaganja hladnoći; dok je sinteza i ponovno popunjavanje ovih energetske rezervi primjećeno u periodu od 3 - 45. dana aklimacije na nisku temperaturu.

4.3. SKELETNI MIŠIĆI

4.3.1. Western blot analiza

4.3.1.1. Proteinska ekspresija komponenti elektron-transportnog lanca

Aklimacija na nisku temperaturu nije imala efekta na proteinsku ekspresiju kompleksa I. U poređenju sa kontrolom proteinska količina kompleksa III 3. i 12. dana, kompleksa IV 1. i 12. dana i citohroma *c* 3, 7. i 21. dana je bila statistički značajno manja. Nasuprot tome, nivo kompleksa II 1. i 7. dana; kao i kompleksa IV 3. i 7. dana je bio veći nego u kontrolnim uzorcima.

Suprotno navedenim promjenama, tokom hibernacije proteinska ekspresija kompleksa I i IV nije bila promjenjena, dok je nivo kompleksa II, III i citohroma *c* bio značajno manji od kontrole ($p < 0,001$).

Opisane promjene u nivou proteina elektron-transportnog lanca prikazane su na Figuri 29.

4.3.1.2. Proteinska ekspresija ATP sintaze i UCP3

Kao što se vidi na Figuri 30, nivo UCP3 proteina nije se mijenjao tokom izlaganja životinja niskoj temperaturi niti u hibernaciji.

U poređenju sa kontrolom, proteinska količina ATP sintaze je bila manja od 45-82% u periodu od 3-21. dana izlaganja niskoj temperaturi; dok u fazi hibernacije nije zabilježena promjena u proteinskoj ekspresiji ovog proteina.

4.3.1.3. Proteinska ekspresija enzima uključenih u katabolizam glukoze

Na Figuri 31 su prikazane promjene proteinske ekspresije GAPDH, PDH, PDK4 i dvije subjedinice LDH. U toku prve nedelje aklimacije na nisku temperaturu zabilježena je 1,5-2 puta veća količina PDK4 proteina u poređenju sa kontrolom ($p < 0,001$). Takođe, 1. dana je detektovana veća količina obje LDH subjedinice u poređenju sa kontrolom; pri čemu je veća količina H subjedinice detekovana 1. i 7. dana aklimacije na hladnoću. Nakon ovog inicijalnog izlaganja niskoj temperaturi, od 12-21. dana nivoi GAPDH i H subjedinice LDH su bili smanjeni u poređenju sa kontrolom; a količine PDK4 i M subjedinice LDH na nivou kontrole. 21-dnevna aklimacija na hladnoću indukovala je povećanje od ~40% proteinske ekspresije PDH ($p < 0,001$).

U hibernaciji, proteinska ekspresija GAPDH ($p < 0,001$), PDH ($p < 0,001$) i PDK4 ($p < 0,01$) je bila statistički značajno niža u poređenju sa kontrolom. Suprotno, količina H subjedinice LDH je bila ~ 2 puta veća nego u kontroli ($p < 0,001$).

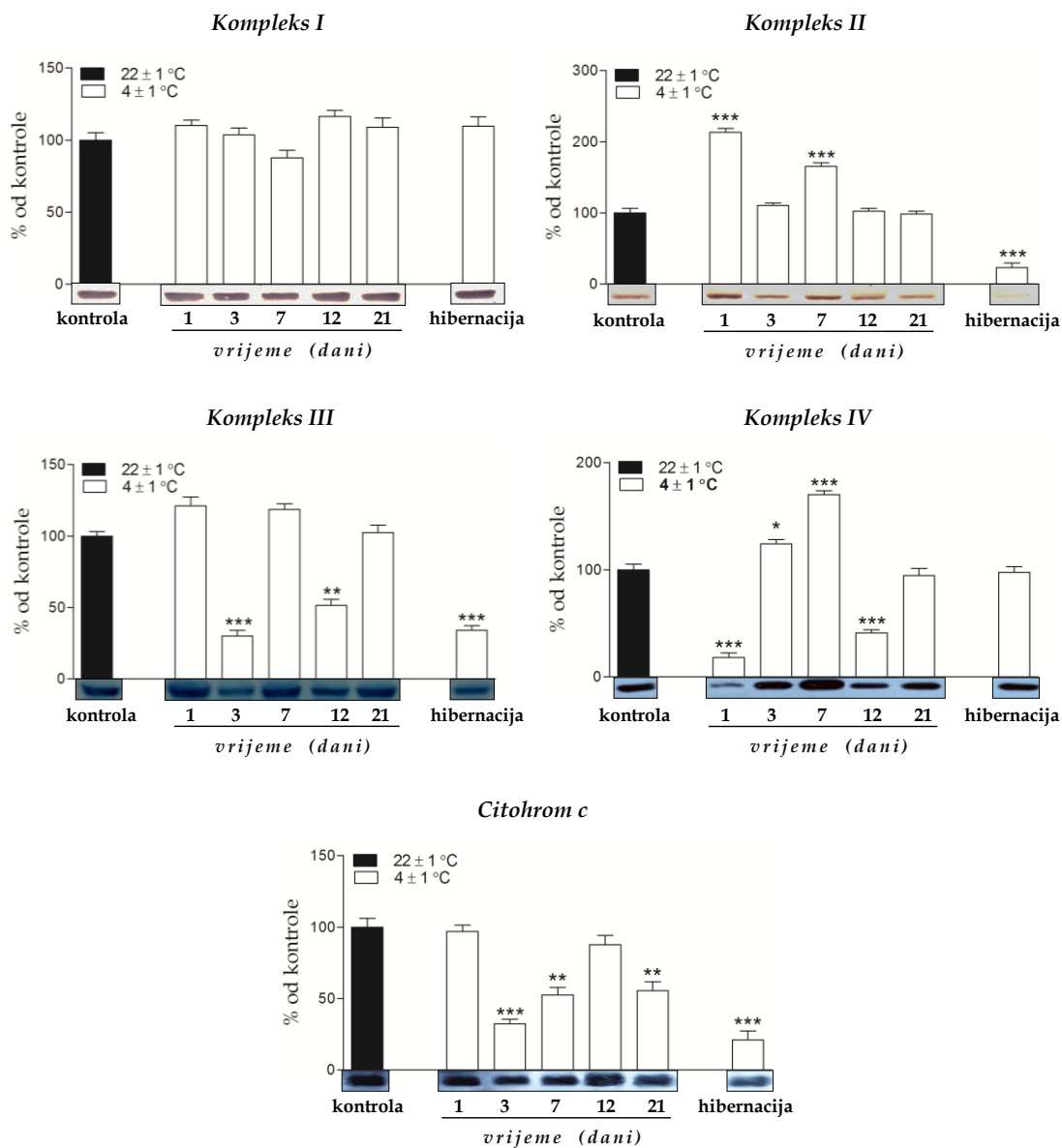


Figura 29. Promjene proteinske ekspresije komponenti OXPHOS (kompleks I, II, III, IV i citobroma c) u skeletnim mišićima tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

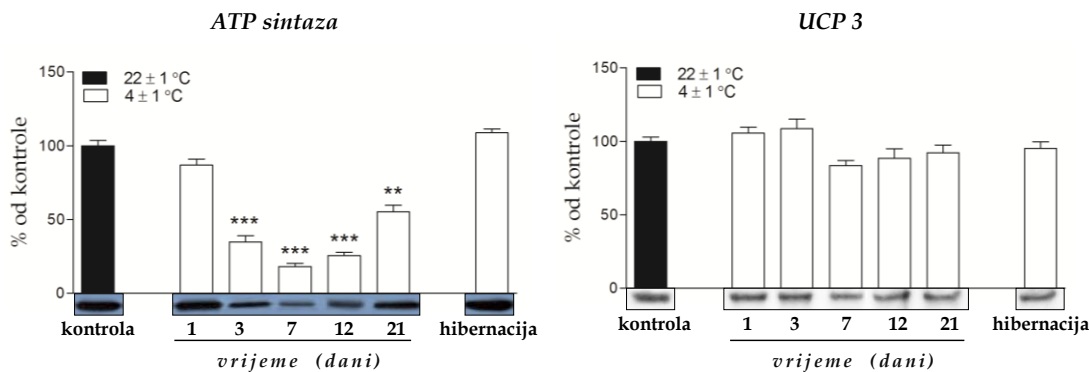


Figura 30. Promjene proteinske ekspresije ATP sintaze i dekupljujućeg proteina 3 (UCP3) u skeletnim mišićima tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.3.1.4. Proteinska ekspresija ACADM (enzim β -oksidacije) i SCAS (enzim Krebsovog ciklusa)

Aklamacija na nisku temperaturu u periodu od 3-21. dana indukovala je smanjenje proteinske ekspresije ACADM u poređenju sa kontrolom, dok je u tom istom periodu nivo SCAS bio značajno veći od kontrole (Figura 32). U hibernaciji nivo SCAS proteina je bio veći za ~50% od kontrolne vrijednosti ($p < 0,01$), dok je količina ACADM bila na kontrolnom nivou.

4.3.1.5. Proteinska ekspresija enzima ključnih za sintezu/razgradnju glikogena

Kao što se vidi na Figuri 33, izlaganje niskoj temperaturi nije imalo bitnog uticaja na ekspresiju GSK3 proteina, osim 7. dana kada je zabilježen pad od ~40% od kontrolne vrijednosti ($p < 0,01$). Sa druge strane, jednodnevno izlaganje hladnoći indukovalo je 1,9 puta veću ekspresiju PYG od one u kontrolnoj grupi ($p < 0,001$); dok je u periodu od 7-21. dana zabilježen smanjen nivo količine ovog proteina u poređenju sa kontrolom.

U uslovima hibernacije, nivo oba enzima ključna za sintezu/razgradnju glikogena bila se manja za čak 90-95% od kontrolne vrijednosti ($p < 0,001$).

4.3.1.6. Proteinska ekspresija ključnog faktora neovaskularizacije

Tokom jedno- i tro-dnevnog boravka životinja na hladnoći, proteinska ekspresija VEGF (Figura 34) je bila povećana u odnosu na kontrolu (~1,4 puta; $p < 0,05$). Međutim, u periodu od 12-21. dana aklimacije na hladnoću količina ovog proteina je bila smanjena na

~35% kontrolne vrijednosti ($p < 0,01$). Ovaj trend smanjenja je zadržan i u fazi hibernacije (~12% kontrolne vrijednosti, $p < 0,001$).

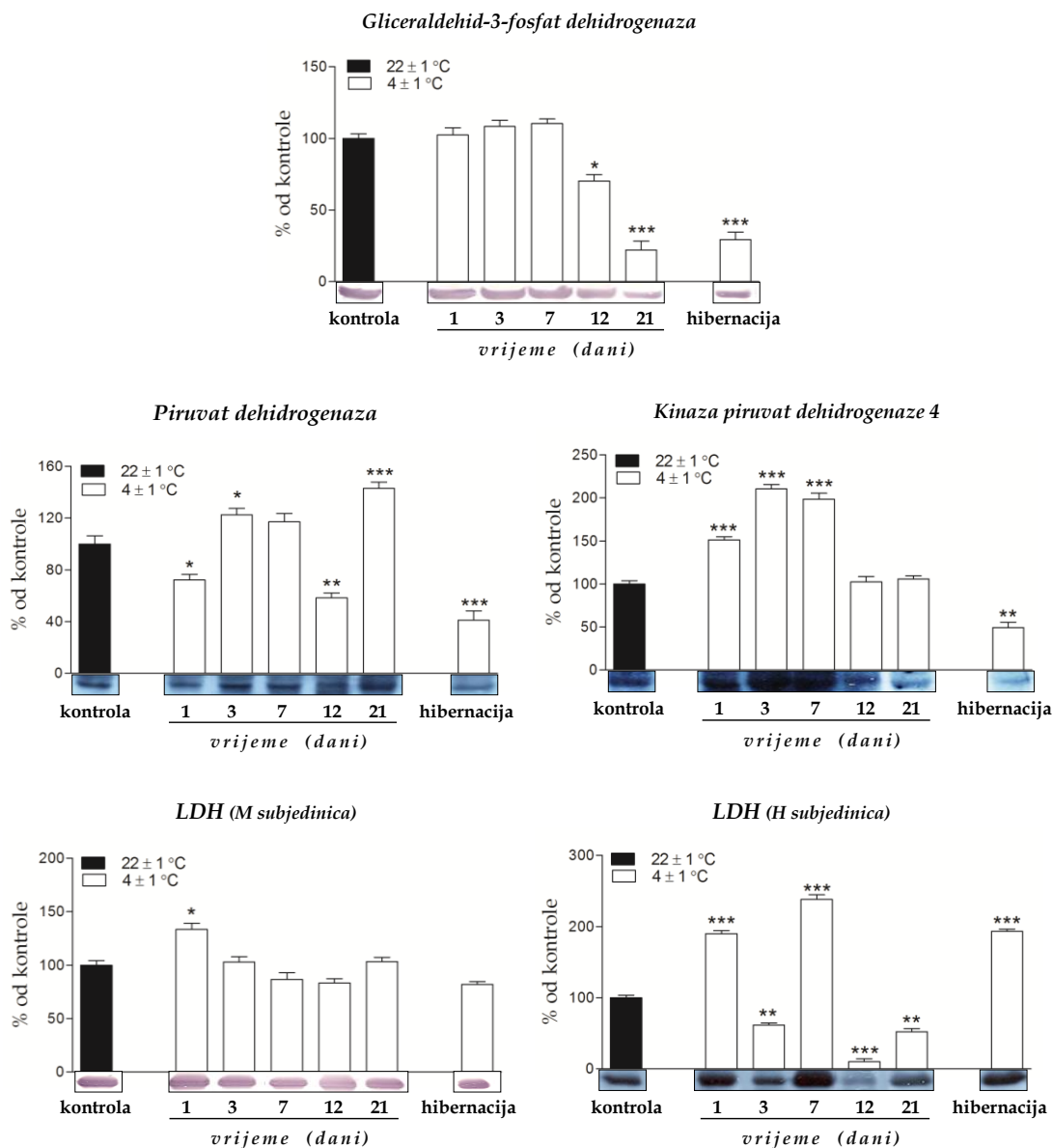


Figura 31. Promjene proteinske ekspresije gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH), piruvat dehidrogenaze (PDH), kinaze piruvat dehidrogenaze 4 (PDK4), M i H subjedinice laktat dehidrogenaze (LDH) u skeletnim mišićima tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

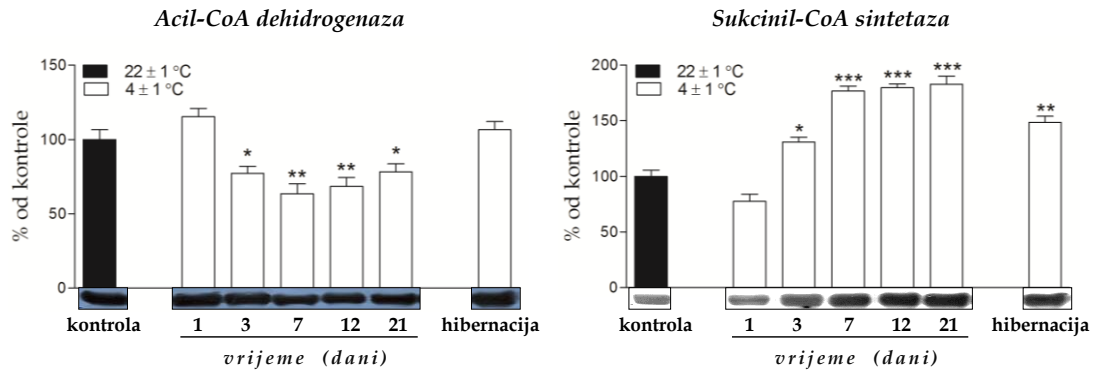


Figura 32. Promjene proteinske ekspresije acil-CoA dehidrogenaze (ACADM) i sukcinil-CoA sintetaze (SCAS) u skeletnim mišićima tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na bladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

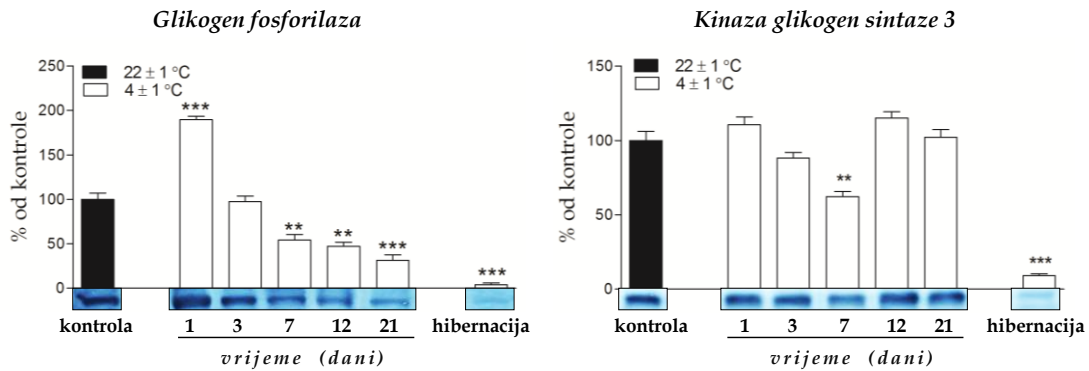


Figura 33. Promjene proteinske ekspresije glikogen fosforilaze (PYG) i kinaze glikogen sintaze 3 (GSK3) u skeletnim mišićima tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na bladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

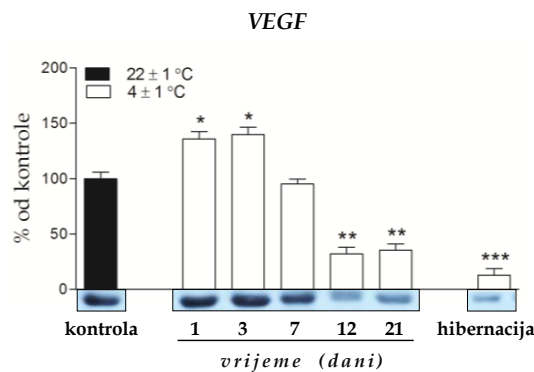


Figura 34. Promjene proteinske ekspresije vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF) u skeletnim mišićima tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na bladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.3.1.7. Proteinska ekspresija fosfo-AMPK α , HIF-1 α i ERK1/2

Promjene proteinske količine ovih proteina prikazane su grafički na Figuri 35. Prvi dan aklimacije na hladnoću indukovao je rast HIF-1 α (~1,2 puta; $p < 0,05$), a pad fosfo-AMPK α (~50%; $p < 0,01$) proteinske ekspresije. Nasuprot ovom, u poređenju sa kontrolom proteinska količina fosfo-AMPK α je bila indukovana 7. i 12. dana aklimacije na hladnoću. Takođe, od 7. dana izlaganja hladnoći, pa do kraja ispitivanog perioda, ekspresija HIF-1 α i ERK1/2 je bila povećana u odnosu na kontrolu. Međutim, povećan nivo HIF-1 α je u ovom periodu pokazivao tendenciju restitucije na kontrolni nivo (povećanje od 2,3 puta do 1,3 puta); dok je povećanje ERK1/2 imalo suprotan smjer (povećanje od 1,3-1,8 puta).

U toku faze hibernacije, proteinske količine sva tri proteina su bile povećane u odnosu na kontrolu, i to: fosfo-AMPK α 1,3 puta ($p < 0,05$); HIF-1 α 1,7 puta ($p < 0,001$), a ERK1/2 1,5 puta ($p < 0,01$).

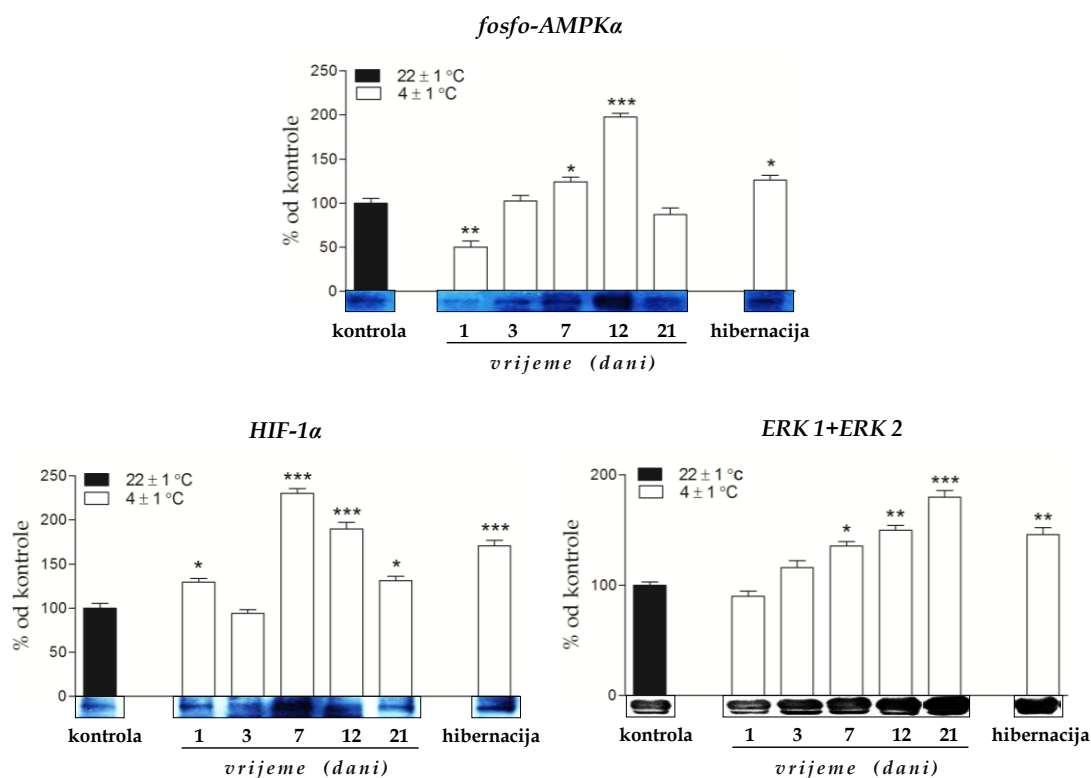


Figura 35. Promjene proteinske ekspresije fosfo-AMP-aktivirane protein kinaze α (fosfo-AMPK α), hipoksija-inducibilnog faktora-1 α (HIF-1 α) i vanćelijskim signalima-regulisanih kinaza 1 i 2 (ERK 1 + ERK 2) u skeletnim mišićima tekunica tokom vremenski- α avisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.3.1.8. Proteinska ekspresija SERCA1

Kao što se vidi sa Figure 36, proteinska ekspresija ovog Ca^{2+} kanala je bila snažno indukovana u poređenju sa kontrolom tokom čitavog perioda aklimacije na hladnoću ($p < 0,001$); dok je u fazi hibernacije smanjena na svega 14% od kontrolne vrijednosti ($p < 0,001$).

4.3.1.9. Proteinska ekspresija Nrf1, NFE2L2 i PGC-1 α

U poređenju sa kontrolom, proteinska ekspresija Nrf1 i PGC-1 α je bila statistički značajno veća tokom čitavog perioda izlaganja hladnoći; sa izuzetkom 45. dana kada je proteinski nivo Nrf1 vraćen na kontrolu (Figura 37). Nasuprot ovome, proteinska količina NFE2L2 je bila povećana samo tokom prva tri dana aklimacije na hladnoću ($p < 0,05$); dok je nakon toga zabilježeno smanjenje ekspresije ovog transkripcionog faktora.

Suprotno promjenama tokom aklimacije na hladnoću, u fazi hibernacije proteinska količina sva tri transkripciona (ko)aktivatora je bila smanjena: Nrf1 na ~75% ($p < 0,05$); NFE2L2 na ~50% ($p < 0,01$) i PGC-1 α na ~35% kontrolne vrijednosti ($p < 0,001$).

4.3.1.10. Proteinska ekspresija PPAR transkripcionih faktora

Proteinska količina ključne PPAR izoforme (δ) u mišićima gotovo da se nije mijenjala ni u uslovima niske temperature ni u uslovima hibernacije. Jedini izuzetak je bio 12. dana izlaganja hladnoći, kada je detektovan pad njegove proteinske količine od ~25% u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$). Suprotno ovome, proteinska količina ostale dvije PPAR izoforme je bila statistički značajno veća od kontrole u periodu od 3-21. dana. Međutim, u fazi hibernacije detektovana je redukovana količina PPAR α i PPAR γ na ~72% ($p < 0,05$), odnosno ~32% ($p < 0,01$) kontrolne vrijednosti. Opisane promjene u proteinskoj ekspresiji PPAR izoformi tokom izlaganja niskoj temperaturi i u fazi hibernacije prikazane su grafički na Figuri 38.

4.3.1.11. Proteinska ekspresija enzima antioksidativne odbrane

Rezultati *Western blot* analize, prikazani na Figuri 39, su pokazali da, u poređenju sa kontrolom, jednodnevno izlaganje životinja hladnoći indukuje povećanje proteinske ekspresije MnSOD ($p < 0,01$), a smanjenje proteinskog nivoa katalaze ($p < 0,05$) i CuZnSOD ($p < 0,01$). Tokom produžene aklimacije na nisku temperaturu (od 7-21. dana), detektovan je povećan nivo katalaze i CuZnSOD proteina u odnosu na kontrolu; dok je

nivo GSH-Px bio smanjen na ~50% od kontrolne vrijednosti ($p < 0,01$) 12. i 21. dana aklimacije. U fazi hibernacije nivo katalaze, GSH-Px i CuZnSOD su bili ~2 puta veći nego u kontrolnim uzorcima ($p < 0,001$), dok je proteinska količina druge SOD izoforme bila smanjena na svega 30% kontrolne vrijednosti ($p < 0,001$).

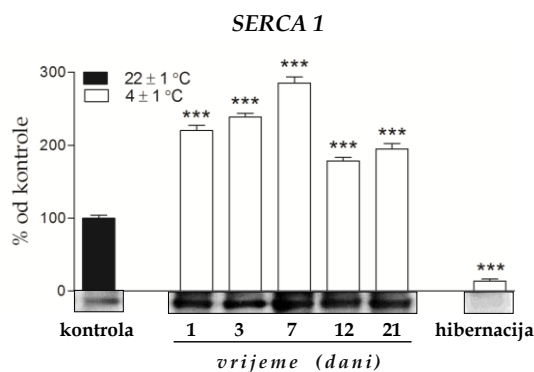


Figura 36. Promjene proteinske ekspresije sarkoplazmne Ca^{2+} -ATPaze 1 (SERCA1) u skeletnim mišićima tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; *** $p < 0,001$.

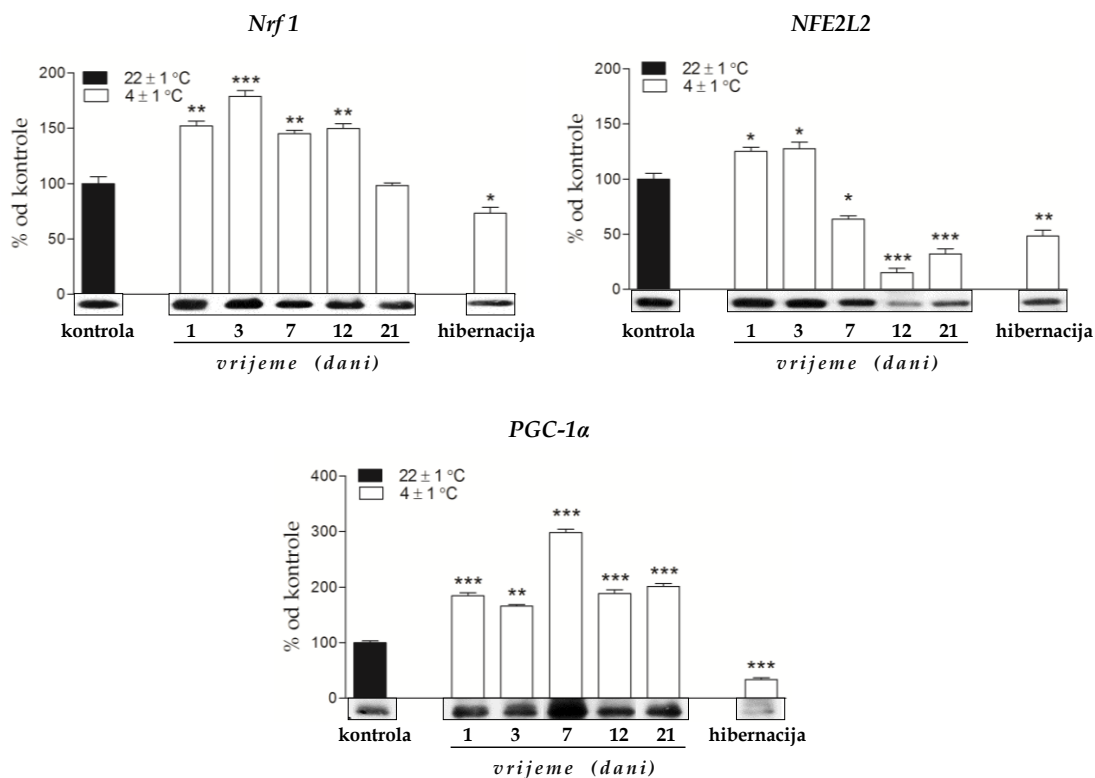


Figura 37. Promjene proteinske ekspresije transkripcijskih faktora Nrf1 i NFE2L2, kao i transkripcijskog ko-aktivatora PGC-1α u skeletnim mišićima tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

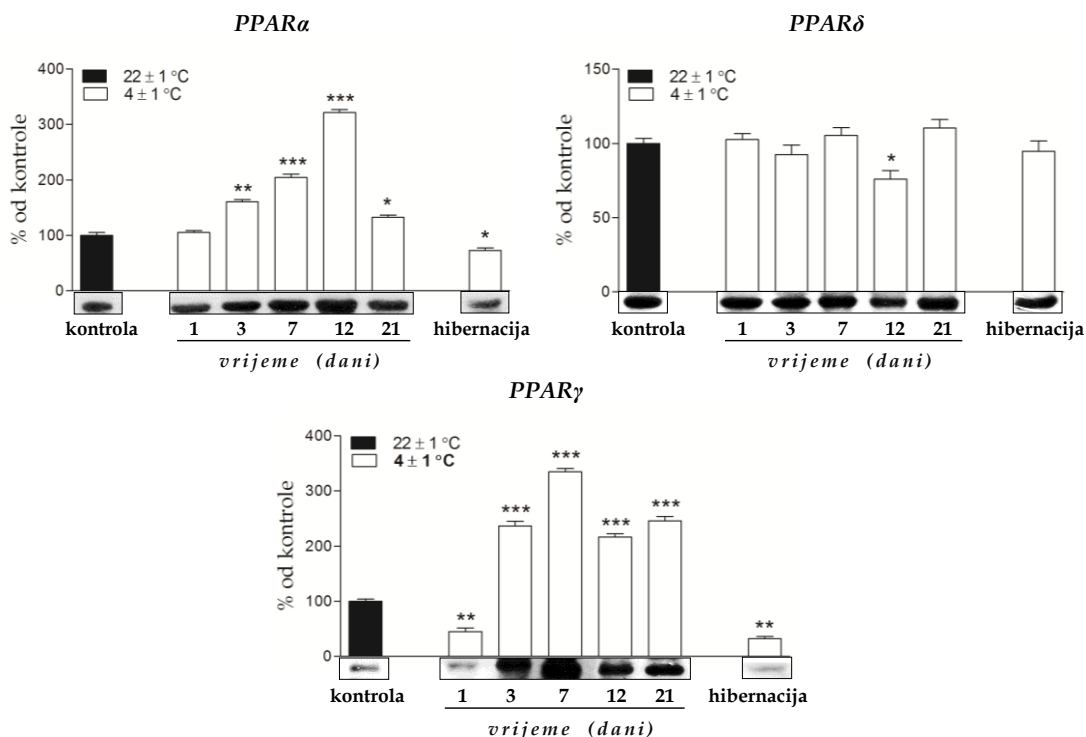


Figura 38. Promjene proteinske ekspresije PPAR α , PPAR δ i PPAR γ izoformi u skeletnim mišićima tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

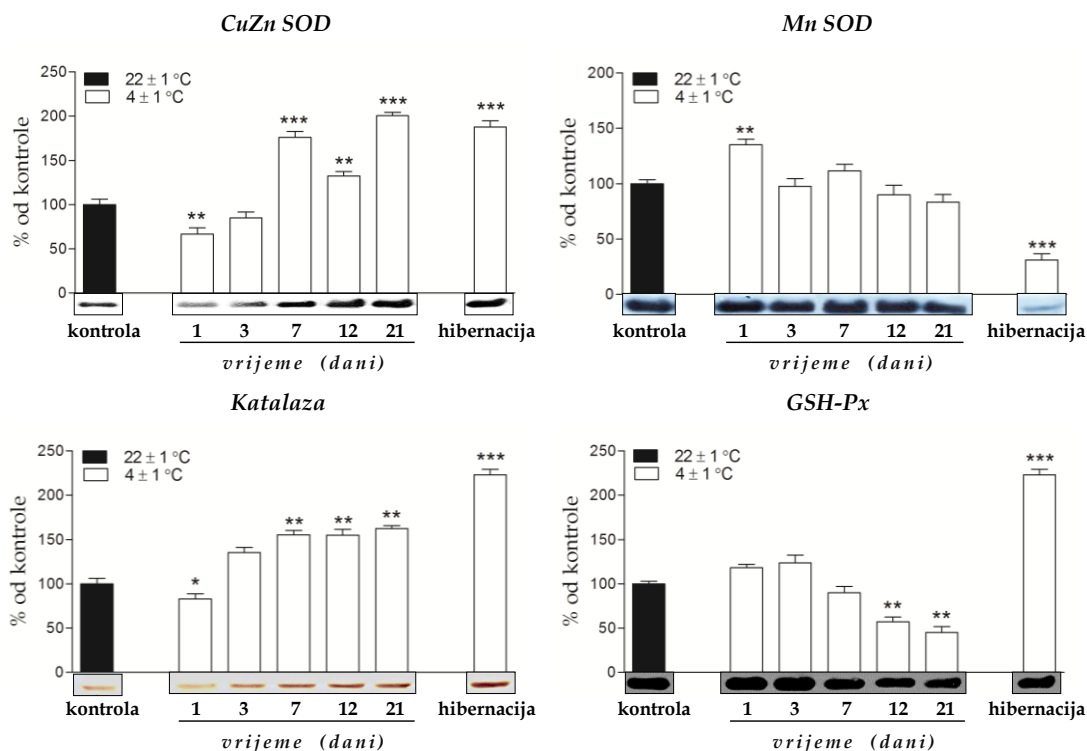


Figura 39. Promjene proteinske ekspresije Cu,Zn i Mn superoksid dismutaza (CuZn i Mn SOD), katalaze i glutation peroksidaže (GSH-Px) u skeletnim mišićima tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.4. RETROPERITONEALNO BIJELO MASNO TKIVO

4.4.1. Western blot analiza

4.4.1.1. Proteinska ekspresija komponenti OXPHOS

U poređenju sa kontrolom, tokom aklimacije na hladnoću proteinska ekspresija kompleksa I, II, III i ATP sintaze je bila smanjena (Figura 40), i to: u periodu od 7-21. dana za kompleks I, 7. dana za kompleks II ($p < 0,01$), 1. i 3. dana za kompleks III i u periodu od 3-21. dana za ATP sintazu ($p < 0,05$). Nasuprot ovim rezultatima, proteinska količina kompleksa IV je bila povećana od 2,5-4,1 puta tokom čitavog perioda izlaganja hladnoći ($p < 0,001$); kao i proteinska količina citohroma c u periodu od 7-21. dana aklimacije ($p < 0,001$). Takođe, 7. i 12. dana zabilježeno je povećanje proteinske ekspresije kompleksa III ($p < 0,001$) od 1,7 i 3,3 puta u poređenju sa kontrolom.

U fazi hibernacije ekspresija gotovo svih komponenti OXPHOS je bila suprimirana u odnosu na kontrolu (kompleks I, II, III i citohrom c). Izuzetak je bio kompleks IV čija količina je bila veća ~2,5 puta u odnosu na kontrolu i u fazi hibernacije ($p < 0,001$).

4.4.1.2. Proteinska ekspresija enzima uključenih u katabolizam glukoze

Kao što je pokazano i grafički na Figuri 41, proteinska količina GAPDH, PDH i obje subjedinice LDH je bila povećana tokom gotovo čitavog perioda aklimacije na hladnoću. Naime, količina GAPDH je bila veća 1,5-1,8 puta u odnosu na kontrolu u svim ispitivanim tačkama aklimacije na hladnoću ($p < 0,001$). Takođe, nivo PDH i H subjedinice LDH je bio povećan u periodu od 3-21. dana aklimacije na nisku temperaturu; dok je proteinski nivo druge LDH subjedinice bio povećan u odnosu na kontrolnu grupu 1. ($p < 0,05$), 7, 12. ($p < 0,001$) i 21. ($p < 0,05$) dana izlaganja hladnoći.

Suprotno povećanju detektovanom u fazi aklimacije na nisku temperaturu, količina PDH enzima je bila smanjena na 72% od kontrolne vrijednosti u fazi hibernacije ($p < 0,05$); dok je proteinska ekspresija preostalih enzima bila povećana, kao i tokom aklimacije na hladnoću, i to ~1,2 puta u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$).

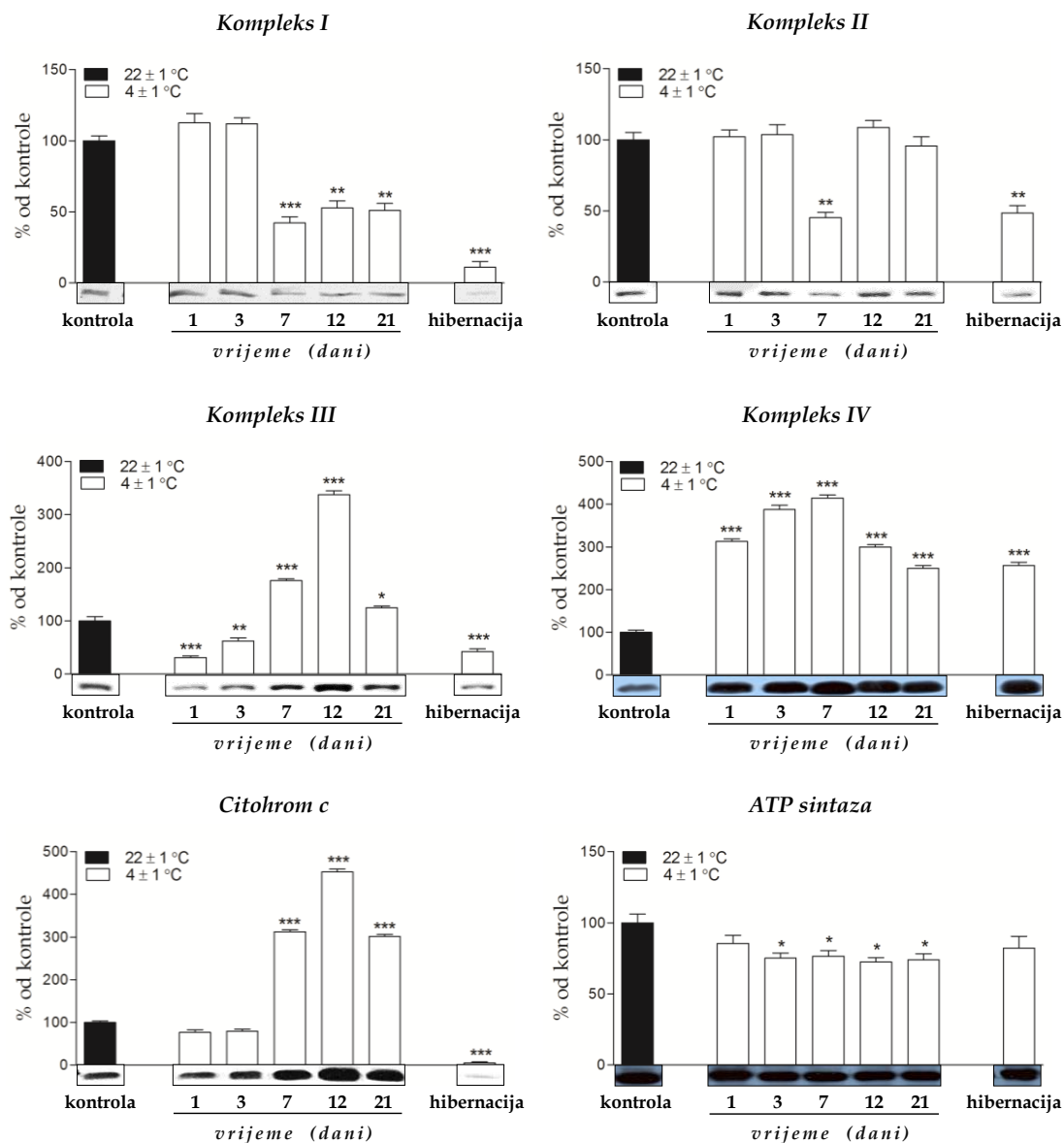


Figura 40. Promjene proteinske ekspresije komponenti OXPHOS (kompleks I, II, III, IV, citohroma c i ATP sintaze) u rWAT tekunica tokom vremenski- \dot{z} avisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.4.1.3. Proteinska ekspresija enzima uključenih u katabolizam lipida

Ni izlaganje hladnoći, ni hibernacija nisu imali uticaja na proteinsku ekspresiju enzima β -oksidacije – ACADM. Nasuprot tome, nivo SCAS proteina u periodu od 1-12. dana aklimacije je bio veći 1,5-2 puta u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); dok je u fazi hibernacije detektovano smanjenje nivoa ovog proteina na svega 20% od kontrolne vrijednosti ($p < 0,001$). Ove promjene su prikazane grafički na Figuri 42.

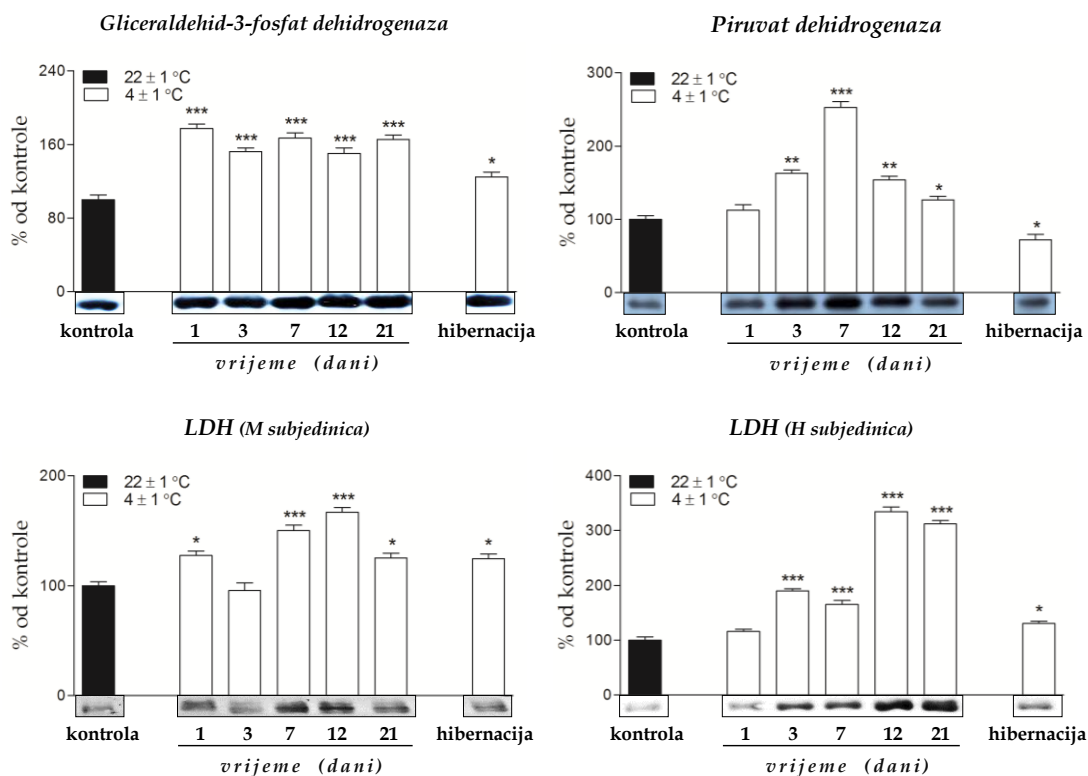


Figura 41. Promjene proteinske ekspresije gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH), piruvat dehidrogenaze (PDH), M i H subjedinice laktat dehidrogenaze (LDH) u rWAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

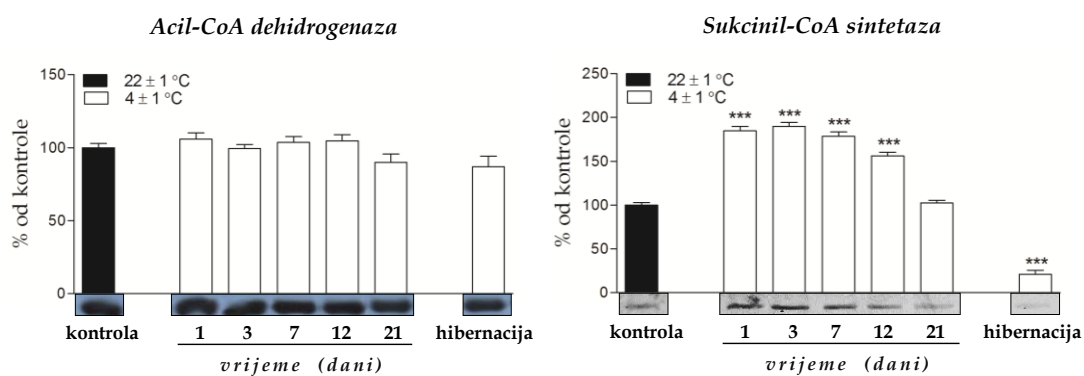


Figura 42. Promjene proteinske ekspresije acil-CoA dehidrogenaze (ACADM) i sukcinil-CoA sintetaze (SCAS) u rWAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; *** $p < 0,001$.

4.4.1.4. Proteinska ekspresija enzima uključenih u anabolizam lipida

Kao što se vidi na Figuri 43, gdje su rezultati prikazani grafički, proteinska ekspresija i FAS i ACC je bila veća u svim ispitivanim tačkama aklimacije na nisku temperaturu.

Iako se pokazalo da hladnoća kod eutermnih životinja ima isti efekat na ekspresiju FAS i ACC u skeletnim mišićima, u fazi hibernacije to nije bio slučaj. Naime, nivo FAS je bio ~3,5 puta veći nego u kontroli ($p < 0,001$); dok je količina ACC gotovo prepolovljena u ovim uslovima ($p < 0,01$).

4.4.1.5. Proteinska ekspresija VEGF

Tokom prvih 12 dana aklimacije proteinska količina VEGF je bila ~2,5 puta veća nego u kontroli ($p < 0,001$); dok je 21. dana takođe detektovano povećanje ali od svega ~30% ($p < 0,01$). Trend smanjenja je nastavljen i u fazi hibernacije, gdje je količina ovog proteina smanjena 55% u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$) (Figuri 44).

4.4.1.6. Proteinska ekspresija fosfo-AMPK α i HIF-1 α

Prvog dana aklimacije na hladnoću detektovana je smanjena količina i HIF-1 α i fosfo-AMPK α u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$; Figura 45). Nasuprot tome, tokom produženog boravka životinja na hladnoći (od 7-21. dana) zabilježena je povećana količina fosfo-AMPK α . Ovo povećanje je, međutim, pokazivalo tendenciju vraćanja na kontrolni nivo, jer je 7. dana nivo fosfo-AMPK α bio veći 3,1 puta od kontrole ($p < 0,001$); 12. dana 2,3 puta ($p < 0,001$); a 21. svega 1,3 puta ($p < 0,05$). Nivo HIF-1 α bio je veći od kontrole samo 12. dana izlaganja hladnoći ($p < 0,001$).

U fazi hibernacije, proteinski nivoi oba faktora su bili statistički manji od kontrole i to za 44% u slučaju fosfo-AMPK α ($p < 0,01$), odnosno za 58% u slučaju HIF-1 α ($p < 0,001$).

4.4.1.7. Proteinska ekspresija mitofuzina 1 i PGC-1 α

Kao što je grafički prikazano na Figuri 46, u odnosu na kontrolu, proteinski nivo PGC-1 α je bio statistički značajno veći tokom čitavog perioda izlaganja hladnoći, dok je to bio slučaj i kod mitofuzina 1 u periodu od 3-21. dana aklimacije ($p < 0,001$). Međutim, u fazi hibernacije količina PGC-1 α je smanjena na svega 2% kontrolne vrijednosti ($p < 0,001$); a mitofuzina 1 na 20% od kontrole ($p < 0,001$).

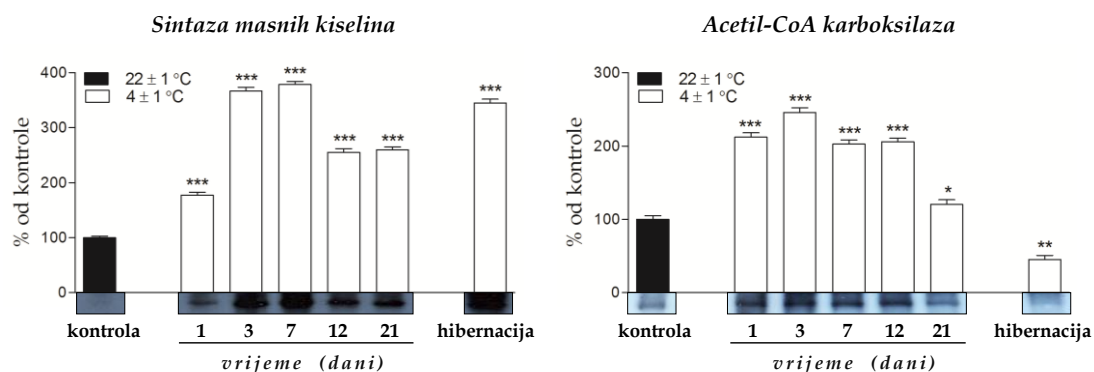


Figura 43. Promjene proteinske ekspresije sintaze masnih kiselina (FAS) i acetil-CoA karboksilaze (ACC) u rWAT tekunica tokom vremenski- ζ avisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

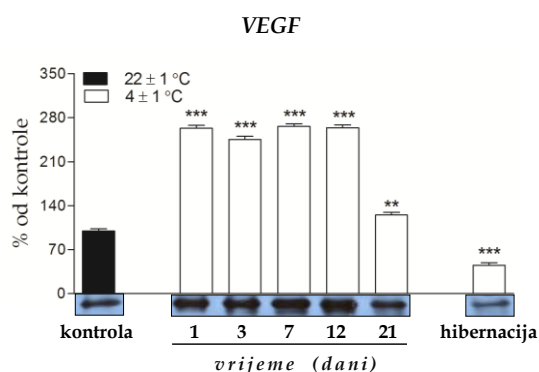


Figura 44. Promjene proteinske ekspresije vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF) u rWAT tekunica tokom vremenski- ζ avisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

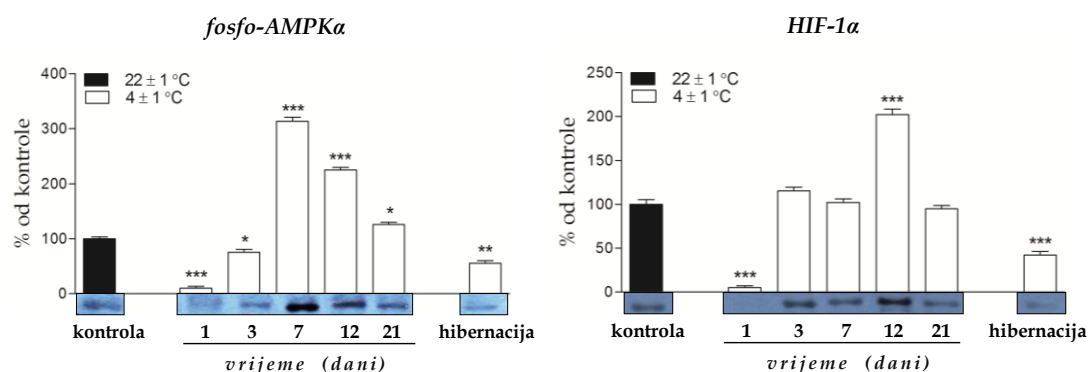


Figura 45. Promjene proteinske ekspresije fosfo-AMP-aktivirane protein kinaze a (fosfo-AMPKa) i hipoksija-inducibilnog faktora-1a (HIF-1a) u rWAT tekunica tokom vremenski- ζ avisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

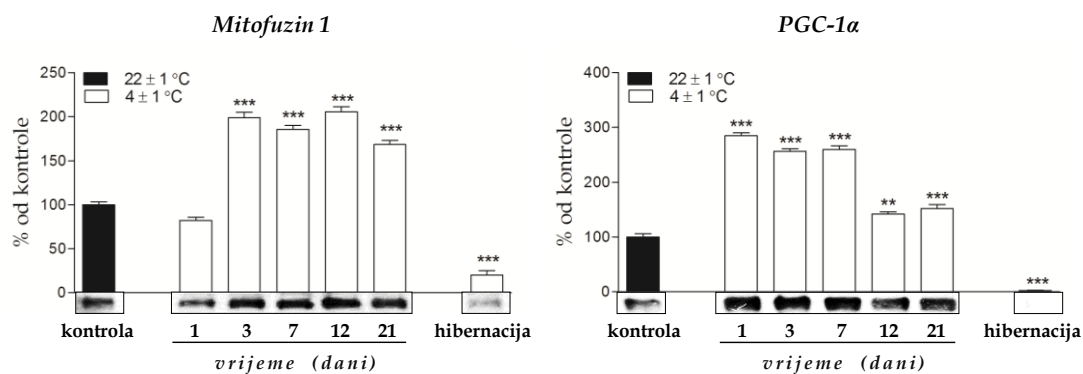


Figura 46. Promjene proteinske ekspresije mitofuzina 1 i transkripcionog ko-aktivatora PGC-1α u rWAT tekunica tokom vremenski-žavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.4.1.8. Proteinska ekspresija Nrf1 i NFE2L2

Proteinska ekspresija Nrf1 nije bila afektovana ni niskom temperaturom kod eutermnih životinja, niti u uslovima hibernacije (Figura 47). Sa druge strane, količina NFE2L2 proteina je bila 2,3 puta, odnosno 1,3 puta veća od kontrole 7. i 12. dana aklimacije na hladnoću, dok je 21. dana zabilježen pad njegove količine od oko 27% u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$). Takođe, u toku torpora detektovano je svega 3% kontrolne količine NFE2L2 ($p < 0,001$).

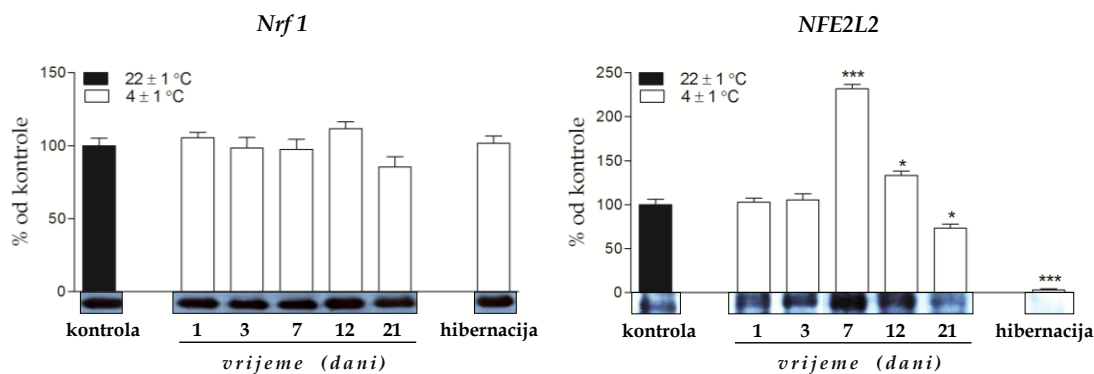


Figura 47. Promjene proteinske ekspresije transkripcionih faktora Nrf1 i NFE2L2 u rWAT tekunica tokom vremenski-žavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.4.1.9. Proteinska ekspresija izoformi PPAR

U periodu od 3-21. dana izlaganja životinja hladnoći detektovano je smanjenje proteinske ekspresije PPAR α u poređenju sa kontrolom. Nivo PPAR γ proteina je bio smanjen u odnosu na kontrolu 1. ($p < 0,01$) i 21. dana ($p < 0,05$) aklimacije na nisku temperaturu. Što se tiče PPAR δ izoforme, njena ekspresija je bila ~ 2 puta veća nego u kontroli 3. i 7. dana izlaganja hladnoći ($p < 0,001$).

U fazi hibernacije, proteinska ekspresija sve tri izoforme je bila suprimirana, ali u različitoj mjeri. Tako je nivo PPAR δ bio smanjen na 75% kontrolne vrijednosti ($p < 0,05$); PPAR γ na 50% ($p < 0,01$); a najveća supresija je viđena kod PPAR α izoforme - na svega 13% kontrolne vrijednosti ($p < 0,001$).

Opisane promjene su grafički prikazane na Figuri 48.

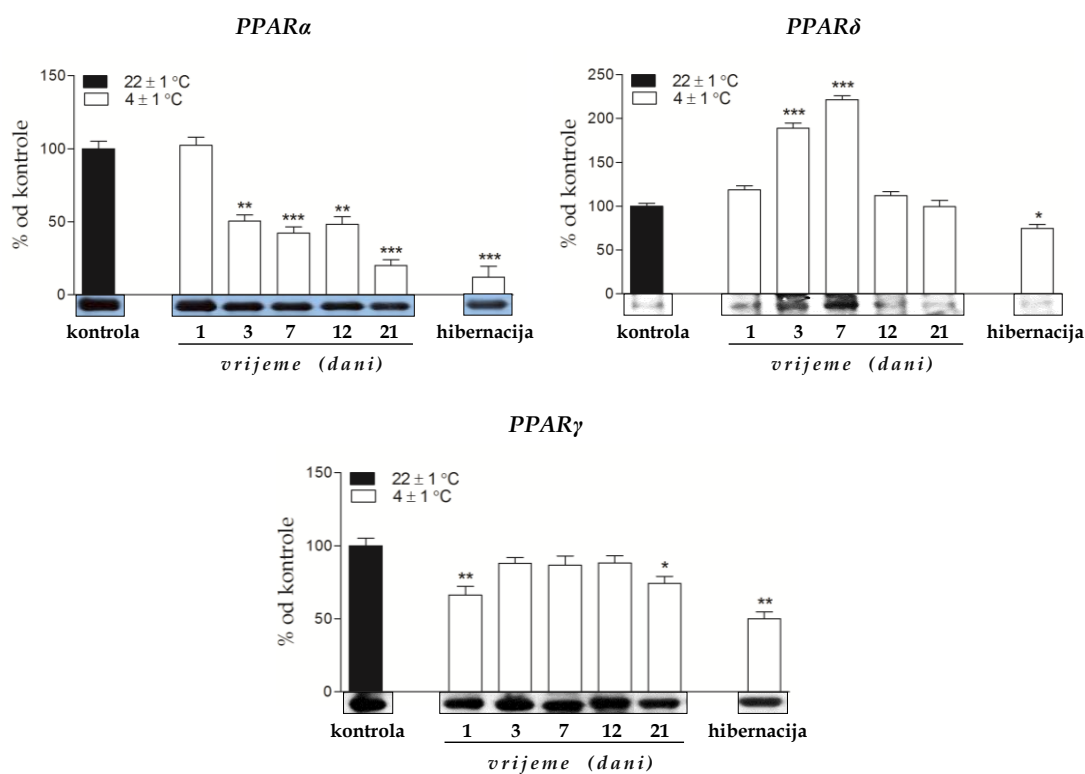


Figura 48. Promjene proteinske ekspresije PPAR α , PPAR δ i PPAR γ izoformi u rWAT tkunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.4.1.10. Proteinska ekspresija enzima antioksidativne odbrane

Kao što je grafički prikazano na Figuri 49, aklimacija na nisku temperaturu nije uticala na proteinski nivo katalaze, dok je snažno indukovala povećanje količine GSH-Px proteina. Nasuprot tome, proteinska ekspresija SODs je u ovim uslovima pokazala faznu-zavisnost odgovora; pa je količina MnSOD bila veća nego u kontroli 3. i 7. dana ($p < 0,001$) aklimacije na hladnoću, a CuZnSOD 12. i 21. dana ($p < 0,01$).

Proteinska ekspresija citoplazmatske izoforme SOD, koja je „odgovorila“ povećanjem kasnije tokom aklimacije na hladnoću, zadržala je povećanje od 1,4 puta i u fazi hibernacije ($p < 0,01$). Suprotno, nivo MnSOD i GSH-Px proteina je bio u ovim uslovima značajno manji nego u kontroli ($p < 0,01$). Kao i u slučaju izlaganja hladnoći, ni hibernacija nije afektovala proteinsku količinu katalaze.

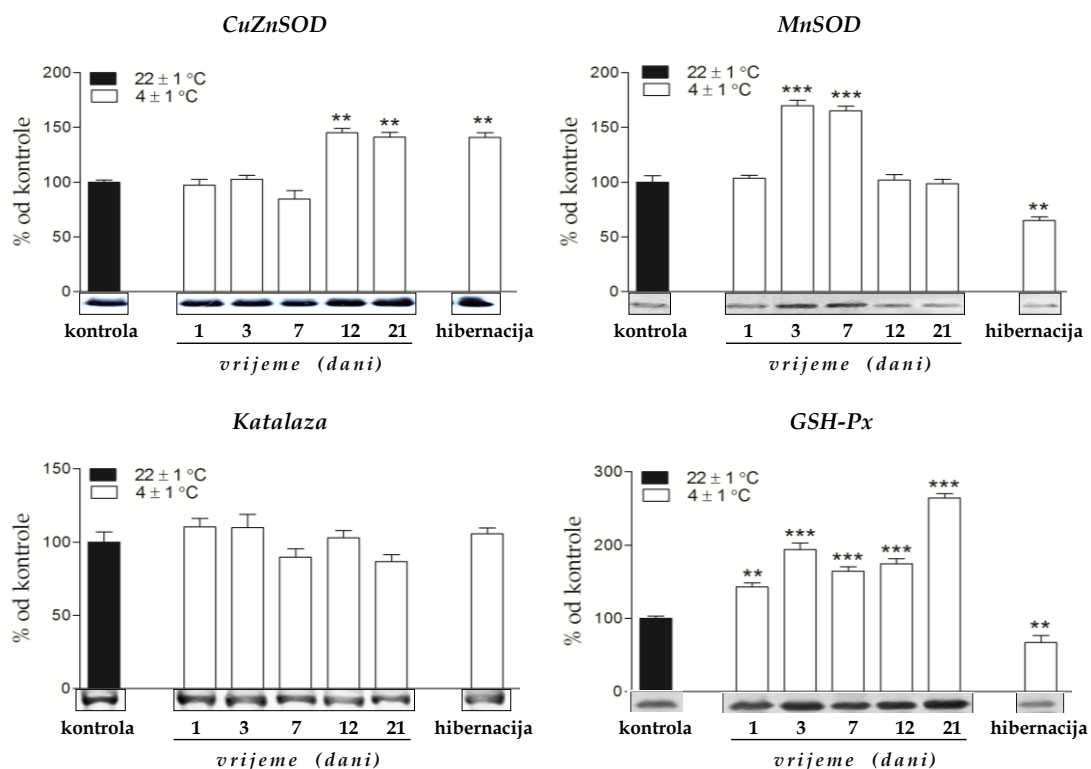


Figura 49. Promjene proteinske ekspresije Cu,Zn i Mn superoksida dismutaze (CuZnSOD i MnSOD), katalaze i glutation peroksidaže (GSH-Px) u rWAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.4.2. Morfometrijska i stereološka analiza

4.4.2.1. Volumenska gustina adipocita, krvnih sudova i intersticijuma u rWAT

Stereološka analiza rWAT je pokazala da se volumenski udio pojedinačnih komponenti tkiva ne mijenja niti tokom izlaganja životinja hladnoći, niti u fazi hibernacije, sa izuzetkom 7. dana aklimacije na hladnoću kada je primjećen blagi porast intersticijumskog udjela. Međutim, ukoliko se pogleda grafički prikaz rezultata (Figura 50), jasno se može primjetiti da volumenski udio kapilara ima tendenciju porasta već od 7. dana izlaganja hladnoći, kao i da se ovaj trend održava i u hibernaciji.

4.4.2.2. Površina adipocitnog profila

Ono što je svakako najupadljivija promjena prilikom razmatranja površine profila adipocita jeste njihova veličina koja se (u sva tri depoa) kreće u opsegu od 5000-12500 μm^2 ; što ih svakako svrstava u grupu jako krupnih adipocita (Figura 51). Naši rezultati su, takođe, pokazali da se tokom produženog boravka na hladnoći (12-21. dan), kao i u fazi hibernacije, površina profila adipocita ovog depoa značajno smanjuje ($p < 0,001$).

4.4.3. Svjetlosna mikroskopija

4.4.3.1. Opšta slika („*browning*“ efekat)

Rezultati svjetlosne mikroskopije (Slika 20, lijevi panel) su u saglasnosti sa rezultatima morfometrijske analize. Naime, na ovim mikrografijama se jasno vidi da se veličina adipocita u rWAT depou smanjuje upravo od 12. dana aklimacije kada je prvi put i zabilježen statistički pad u površini adipocitnog profila; kao i da su ovi „sitniji“ adipociti prisutni kako do kraja ispitivanog perioda aklimacije na hladnoću, tako i u fazi hibernacije.

Osim toga, detaljnim pregledanjem presjeka, primjećeno je da se u rWAT depou već od 3. dana izlaganja hladnoći pojavljuju ćelije mnogo više nalik mrkim nego klasičnim bijelim adipocitima (Slika 21). Naime, ove ćelije su „umetnute“ između bijelih adipocita i imaju multilokusnu strukturu tipičnu za mrke adipocite. Pojava ovih „*brite/beige*“ adipocita je primjećena i 7. dana aklimacije na hladnoću.

Volumenske gustine tkivnih komponenti

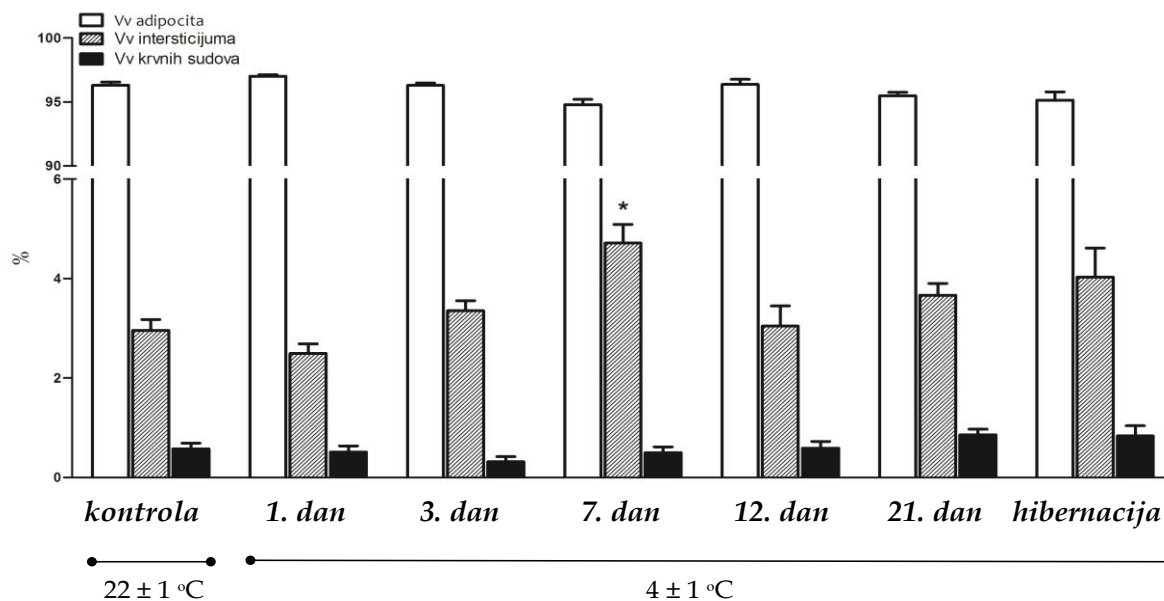


Figura 50. Grupni histogram volumenske gustine adipocita (bijeli stubići), intersticijuma (sivi stubići) i krvnih sudova (crni stubići) u rWAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$.

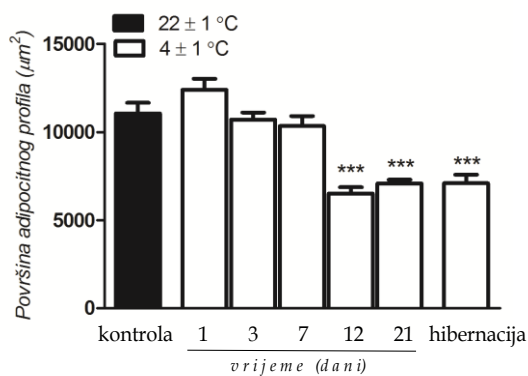
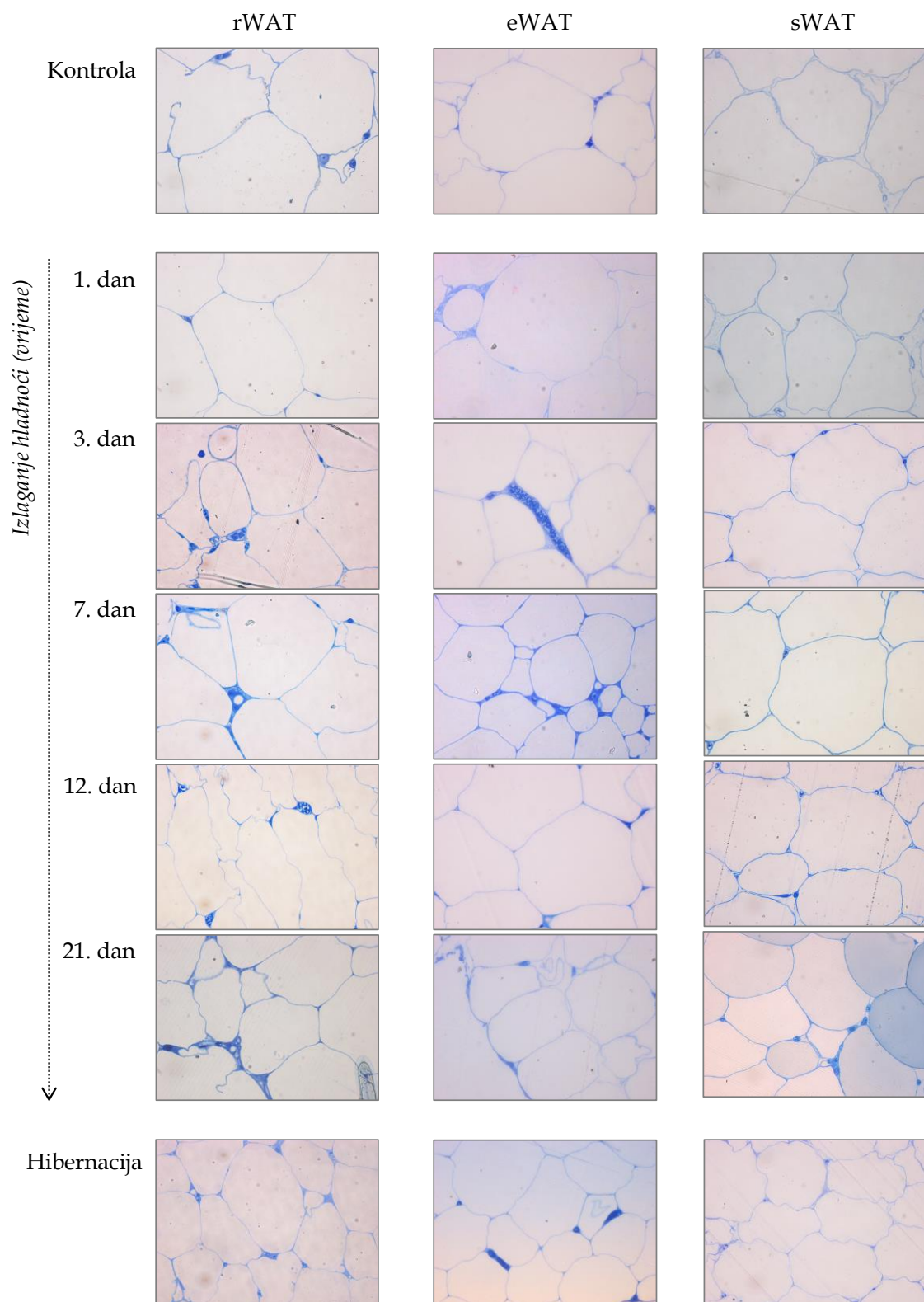
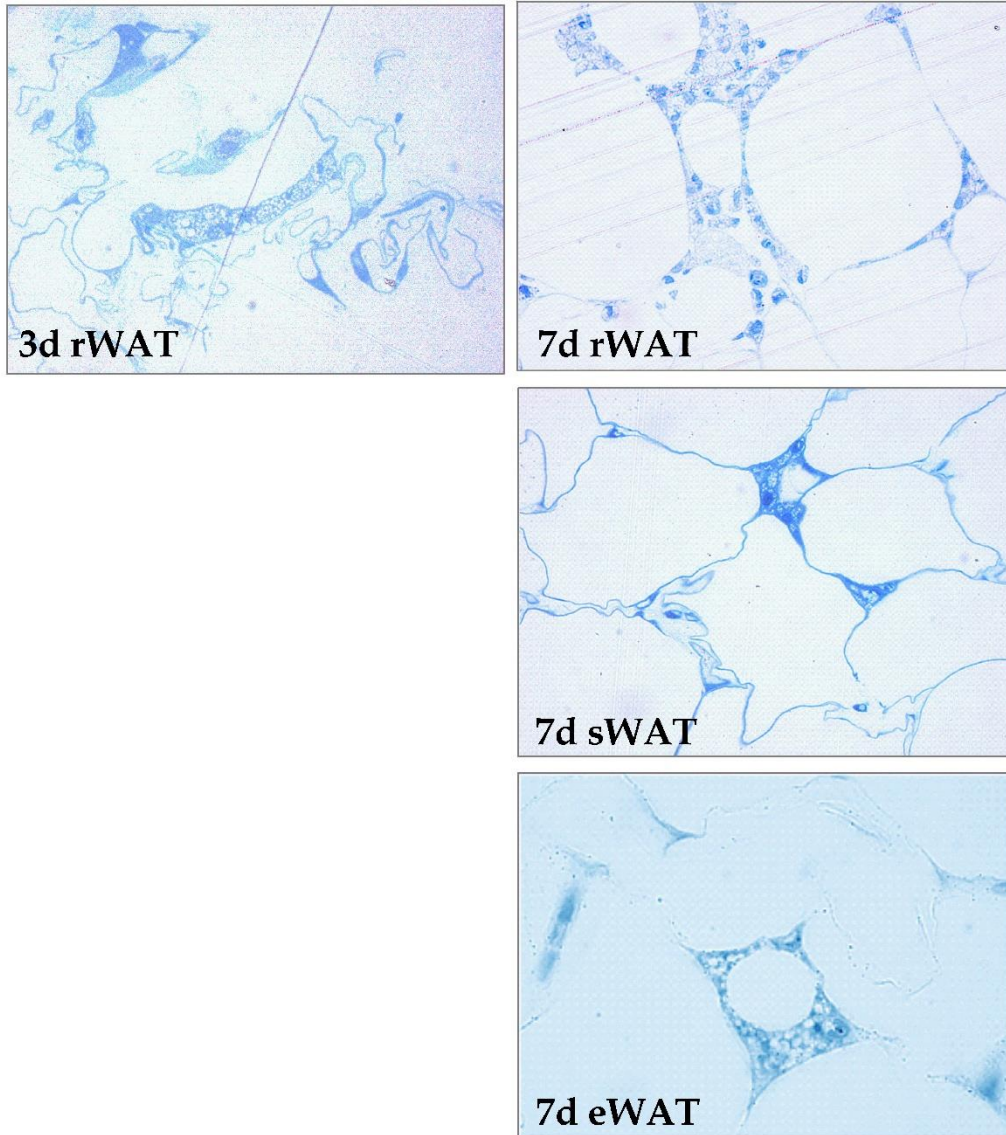


Figura 51. Promjene površine adipocitnog profila u rWAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. ***poređenje sa kontrolnom grupom; *** $p < 0,001$.



Slika 20. Opšta slika rWAT (lijevi panel), eWAT (srednji panel) i sWAT (desni panel) tekunica kontrolne grupe, tokom vremenski-zavisnog izlaganja niskoj temperaturi (1, 3, 7, 12, odnosno 21 dan) i u hibernaciji. Orig. uveličanje - 40x.



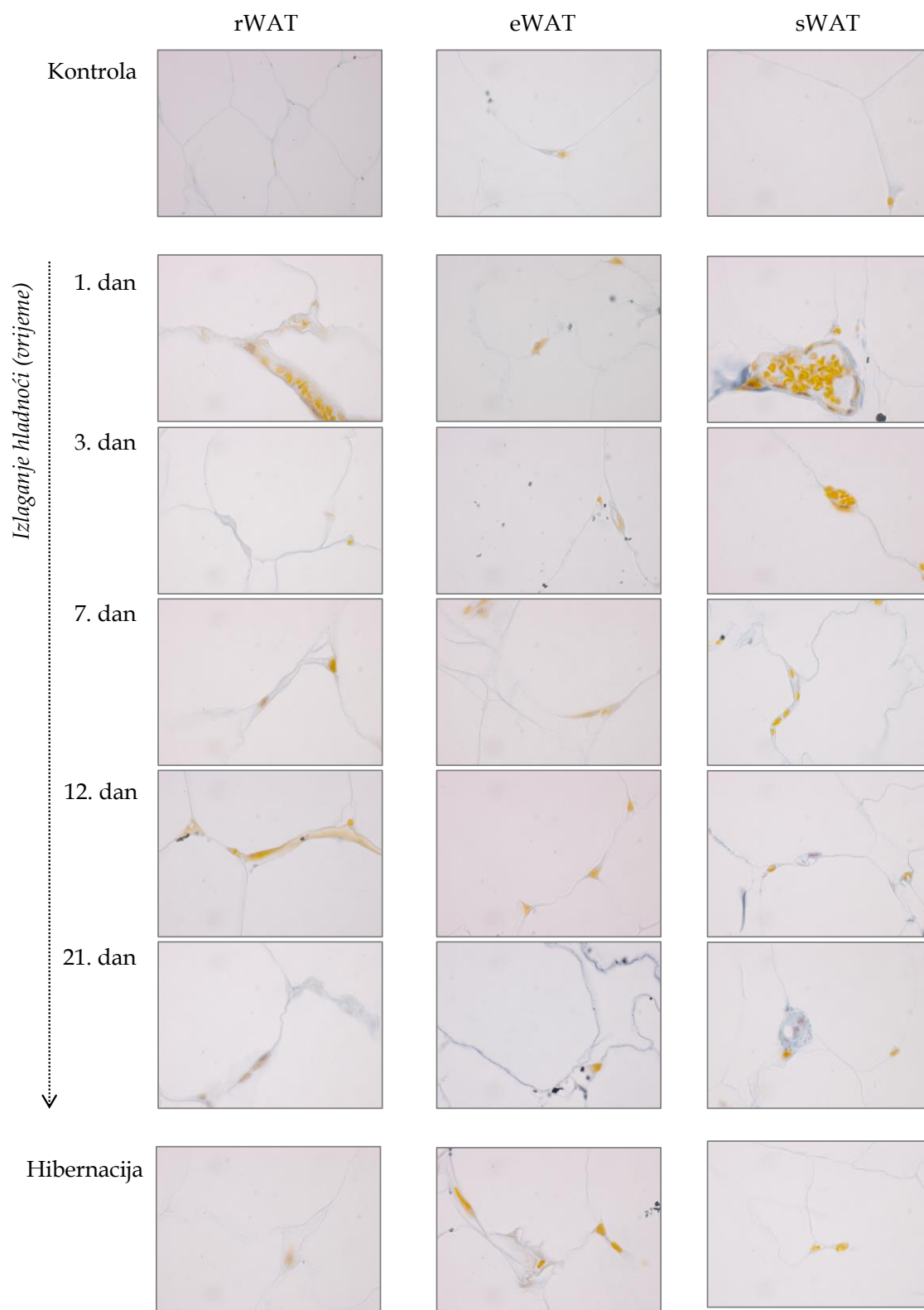
Slika 21. „Browning“ efekat - pojava multilokulusnih adipocita u rWAT (gore), eWAT (u sredini) i sWAT (dolje) tekunica nakon 3, odnosno 7 dana aklimacije na nisku temperaturu. Orig. uveličanje - 60x.

4.4.3.2. Inervacija rWAT

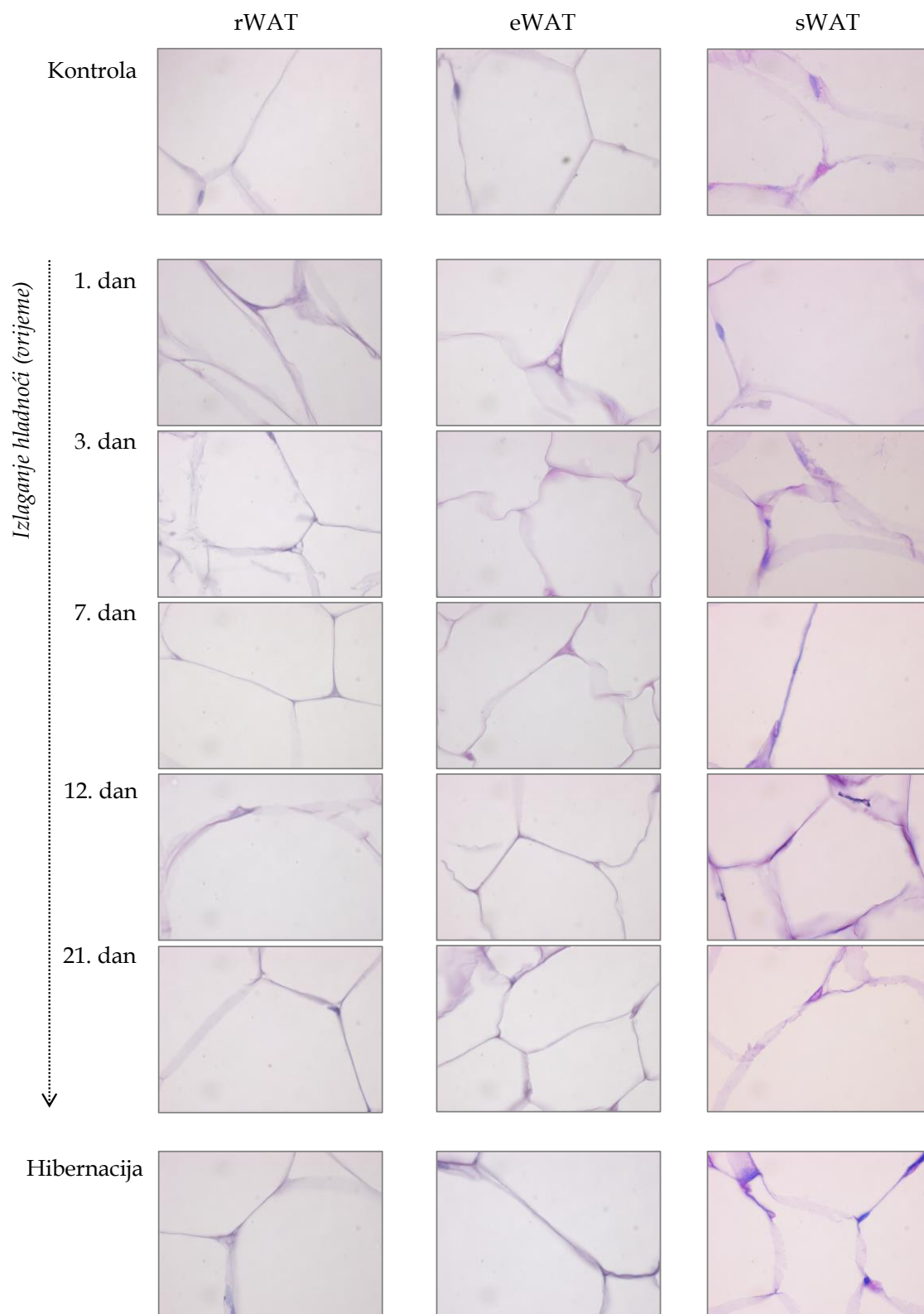
Blago povećana inervacija rWAT, prvenstveno oko nevelikog broja krvnih sudova, je primjećena tokom čitavog perioda izlaganja životinja hladnoći (Slika 22, lijevi panel). Nasuprot tome, u fazi hibernacije se jasno vidi smanjen broj nervnih sinapsi i/ili vlakana.

4.4.3.3. PAS bojenje glikogena

Jako slaba reakcija glikogena u adipocitima na Šifov reagens je očekivana shodno maloj količini glikogenskih zaliha, koje postoje u ovim ćelijama; ali takođe i zbog jako uskog citoplazmatskog kompartmenta adipocita koji je, krupnom lipidom kapi, potisnut na periferiju, zajedno sa ostalim organelama. Upravo iz pomenutih razloga ne uočavaju se promjene u količini glikogena među eksperimentalnim grupama (Slika 23, lijevi panel).



Slika 22. Inervacija rWAT (lijevi panel), eWAT (srednji panel) i sWAT (desni panel) tekunica kontrolne grupe, tokom vremenski-zavisnog izlaganja niskoj temperaturi (1, 3, 7, 12, odnosno 21 dan) i u hibernaciji. Orig. uveličanje - 100x.



Slika 23. Rezerve glikogena u rWAT (lijevi panel), eWAT (srednji panel) i sWAT (desni panel) tekunica kontrolne grupe, tokom vremenski-zavisnog izlaganja niskoj temperaturi (1, 3, 7, 12, odnosno 21 dan) i u hibernaciji. Orig. uveličanje - 100x.

4.5. EPIDIDIMALNO BIJELO MASNO TKIVO

4.5.1. Western blot analiza

4.5.1.1. Proteinska ekspresija komponenti OXPHOS

Tokom čitavog perioda aklimacije na nisku temperaturu (21 dan) proteinska količina kompleksa III i ATP sintaze je bila veća od one zabilježene u kontrolnoj grupi. Slično je detektovano i za proteinsku ekspresiju kompleksa IV, s tim što je u poređenju sa kontrolom značajno povećanje zabilježeno od 3. dana izlaganja hladnoći. Takođe 3, 7. i 21. dana izlaganja hladnoći detektovan je i blagi rast od ~30% iznad kontrolne vrijednosti proteinskog nivoa kompleksa II ($p < 0,05$); dok je ekspresija citohroma *c* 12. i 21. dana aklimacije na hladnoću bila čak 1,8 puta veća od kontrolne vrijednosti ($p < 0,001$). Nasuprot ostalim komponentama, proteinska količina kompleksa I je bila statistički značajno manja od kontrole 1 ($p < 0,01$), 12. i 21. dana ($p < 0,001$) izlaganja niskoj temperaturi.

U fazi hibernacije, detektovano je značajno povećanje proteinske količine kompleksa III i to 1,7 puta ($p < 0,001$), kompleksa IV - 1,5 puta ($p < 0,01$) i ATP sintaze - 1,9 puta ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolu. Suprotno, nivoi kompleksa I, II i citohroma *c* bili su manji za 28-44% u odnosu na kontrolu u uslovima hibernacije (Figura 52).

4.5.1.2. Proteinska ekspresija enzima uključenih u katabolizam glukoze

Kao što se vidi sa grafičkog prikaza rezultata na Figuri 53, količina svih ispitivanih enzima uključenih u katabolizam glukoze (GAPDH, PDH i obje subjedinice LDH) je bio statistički značajno veći od kontrole u periodu od 3-21. dana aklimacije na nisku temperaturu. Slično tome, proteinska količina GAPDH i dvije LDH subjedinice je bila povećana i u fazi duboke hibernacije ($p < 0,001$), dok je nivo PDH u ovim uslovima bio smanjen na ~74% od kontrolne vrijednosti ($p < 0,05$).

4.5.1.3. Proteinska ekspresija enzima uključenih u katabolizam lipida

Niti jedan od ispitivanih fizioloških uslova nije imao statistički značajnog efekta na ekspresiju ACADM proteina u eWAT (Figura 54). Suprotno ovom, nivo SCAS proteina je bio statistički značajno veći od kontrole (~1,4 puta; $p < 0,01$) u periodu od 3-12. dana aklimacije na hladnoću. Međutim, 21-dnevno izlaganje niskoj temperaturi, kao i hibernacija indukovali su smanjenje proteinske ekspresije SCAS u poređenju sa kontrolom.

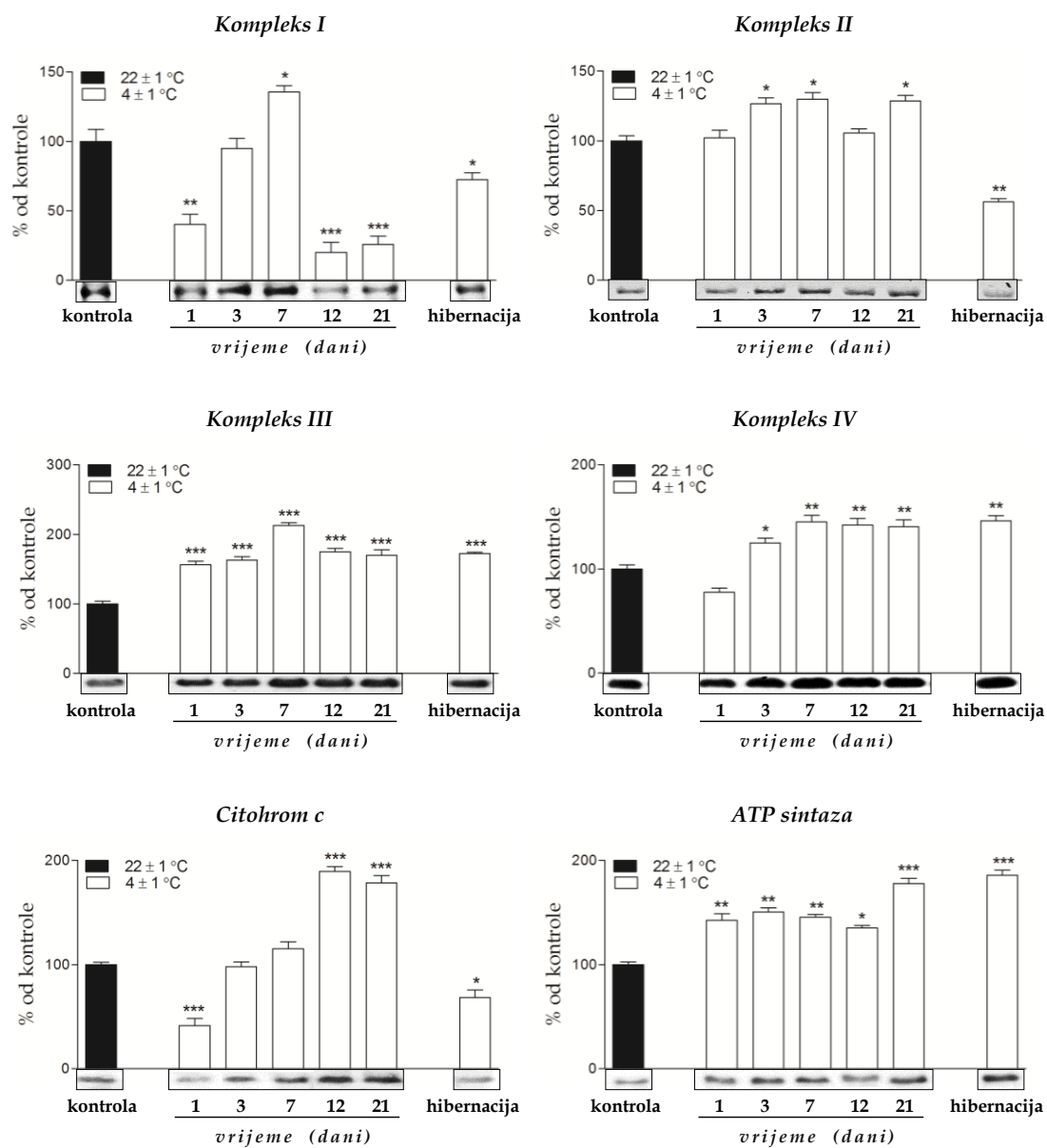


Figura 52. Promjene proteinske ekspresije komponenti OXPHOS (kompleks I, II, III, IV, citohroma c i ATP sintaze) u eWAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

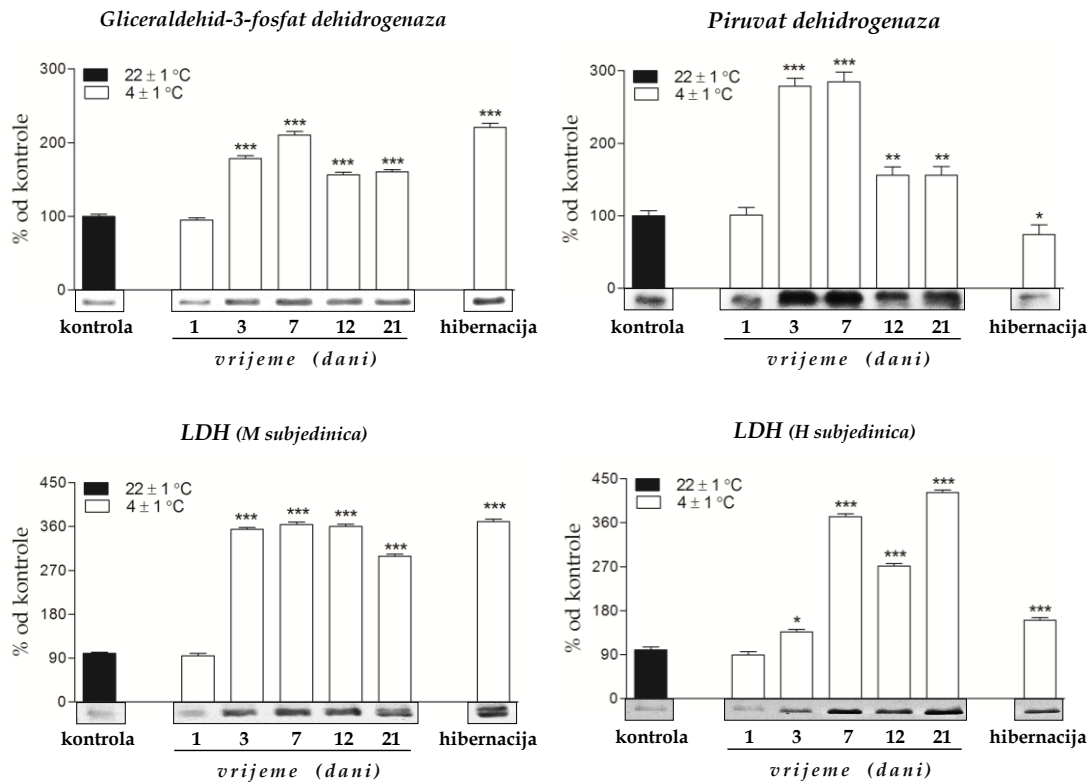


Figura 53. Promjene proteinske ekspresije glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH), piruvat dehidrogenaze (PDH), M i H subjedinice laktat dehidrogenaze (LDH) u eWAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

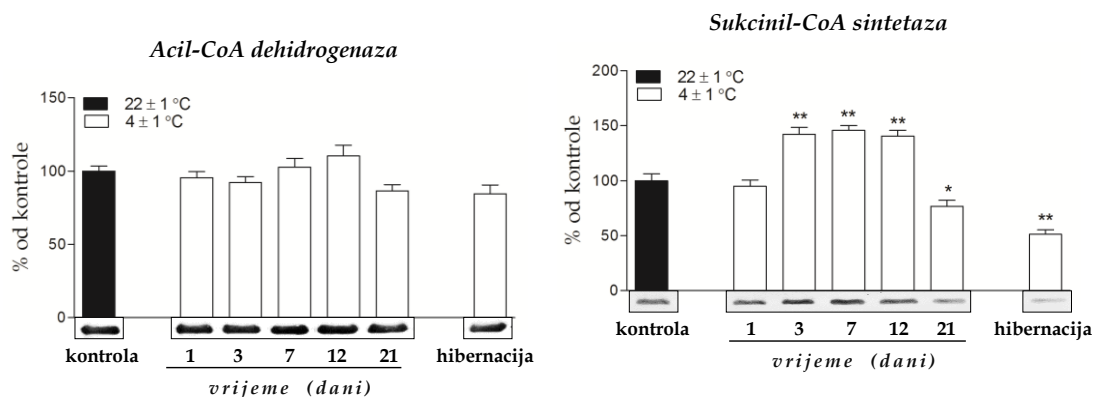


Figura 54. Promjene proteinske ekspresije acil-CoA dehidrogenaze (ACADM) i sukcinil-CoA sintetaze (SCAS) u eWAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.5.1.4. Proteinska ekspresija enzima uključenih u anabolizam lipida

Tokom faze aklimacije na hladnoću, proteinska količina FAS je bila, nakon inicijalnog pada od ~60% ($p < 0,01$) 1. dana aklimacije; statistički značajno veća od kontrole. Takođe, nivo ACC proteina je bio veći od kontrolne vrijednosti u periodu od 1-7. dana izlaganja hladnoći ($p < 0,001$), nakon čega (12. dan) je usledio pad (od ~25% u odnosu na kontrolu; $p < 0,05$); a potom i restitucija na kontrolni nivo količine ovog proteina (21. dan).

U hibernaciji proteinski nivo ACC nije afektovan, ali je detektovano značajno povećanje ekspresije FAS proteina od 40% iznad kontrolne vrijednosti ($p < 0,01$). Sve opisane promjene FAS i ACADM proteina prikazane su na Figuri 55.

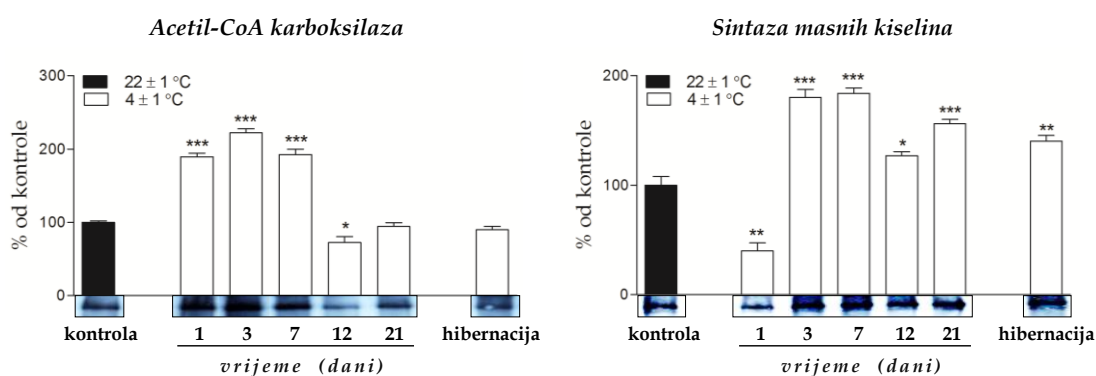


Figura 55. Promjene proteinske ekspresije acetil-CoA karboksilaze (ACC) i sintaze masnih kiselina (FAS) u eWAT tkunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.5.1.5. Proteinska ekspresija VEGF

Promjena proteinske ekspresije VEGF primjećena je samo 1. i 3. dana aklimacije na nisku temperaturu, kada je zabilježen pad u količini ovog proteina na ~50, odnosno 60% vrijednosti detektovane u kontrolnoj grupi ($p < 0,01$; Figura 56).

4.5.1.6. Proteinska ekspresija fosfo-AMPK α i HIF-1 α

Western blot analiza je pokazala (Figura 57) da dolazi do povećane akumulacije α subjedinice HIF-1, i to kako u toku aklimacije na hladnoću ($p < 0,001$); tako i u fazi hibernacije ($p < 0,01$). Slično je detektovano i u slučaju fosfo-AMPK α u periodu od 7-21. dana aklimacije na hladnoću kao i u fazi hibernacije. Međutim, povećanje količine fosfo-

AMPK α u sledu 7-12-21. dan aklimacije, pokazuje trend vraćanja na kontrolni nivo (povećanje od 2,9-2,3-1,4 puta u odnosu na kontrolu, respektivno).

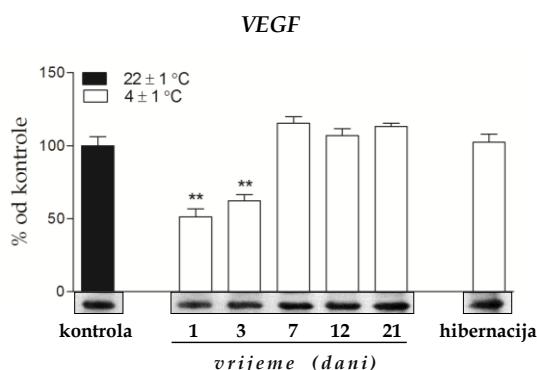


Figura 56. Promjene proteinske ekspresije vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF) u eWAT tekunica tokom vremenski- ζ avisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; ** $p < 0,01$.

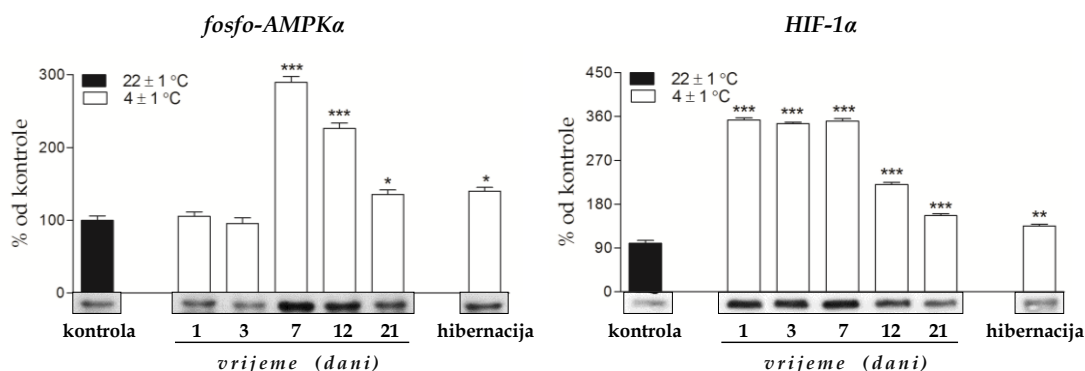


Figura 57. Promjene proteinske ekspresije fosfo-AMP-aktivirane protein kinaze a (fosfo-AMPKa) i hipoksija-inducibilnog faktora-1a (HIF-1a) u eWAT tekunica tokom vremenski- ζ avisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.5.1.7. Proteinska ekspresija Nrfl i NFE2L2

Nasuprot proteinskoj ekspresiji Nrfl, koja je bila blago povećana u odnosu na kontrolu samo 12. dana aklimacije na hladnoću i u fazi hibernacije ($p < 0,05$); u slučaju NFE2L2 detektovano je statistički značajno povećanje količine ovog faktora u periodu od 7-21. dana izlaganja hladnoći, kao i u fazi hibernacije ($p < 0,001$) (Figura 58).

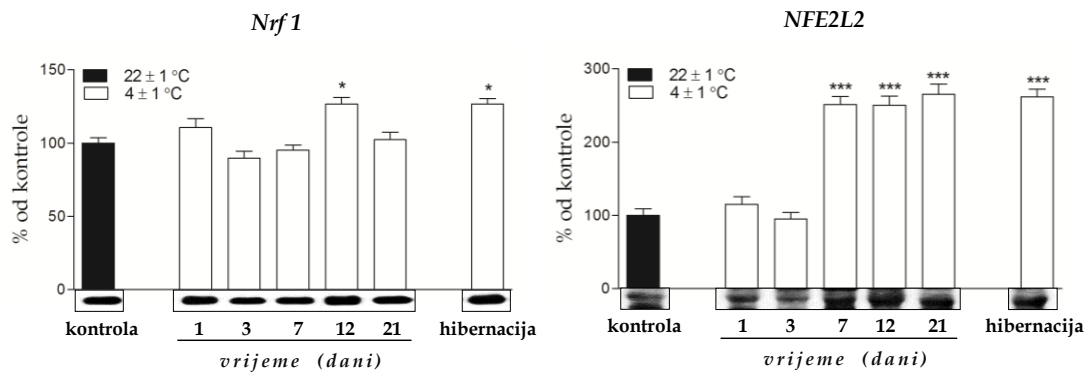


Figura 58. Promjene proteinske ekspresije transkripcijskih faktora *Nrf1* i *NFE2L2* u *eWAT* tkunice tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.5.1.8. Proteinska ekspresija PPAR izoformi

U periodu od 3-21. dana aklimacije na nisku temperaturu detektovana je značajno niža ekspresija PPAR α i PPAR γ (Figura 59). Slično tome i u fazi hibernacije zabilježen je pad u količini ovih transkripcijskih faktora, od ~90-95% kontrolne vrijednosti ($p < 0,001$).

Suprotno rezultatima dobijenim za dvije pomenute PPAR izoforme, u slučaju PPAR δ detektovano je povećanje njegove proteinske količine u periodu od 7-21. dana izlaganja hladnoći, kao i u fazi hibernacije ($p < 0,001$; osim 7. dana aklimacije, gdje je $p < 0,05$).

4.5.1.9. Proteinska ekspresija enzima antioksidativne odbrane

Kao što Figura 60 pokazuje da se proteinska ekspresija MnSOD i katalaze nije bila značajno mjenjala tokom aklimacije na hladnoću, kao ni u hibernaciji. Sa druge strane količina CuZnSOD proteina je tokom čitavog perioda izlaganja hladnoći bila smanjena, dok je 1, 3. i 21. dana aklimacije zabilježeno povećanje proteinske ekspresije GSH-Px. U hibernaciji je detektovana promjena količine samo GSH-Px, koja je bila statistički značajno veća od kontrole ($p < 0,001$).

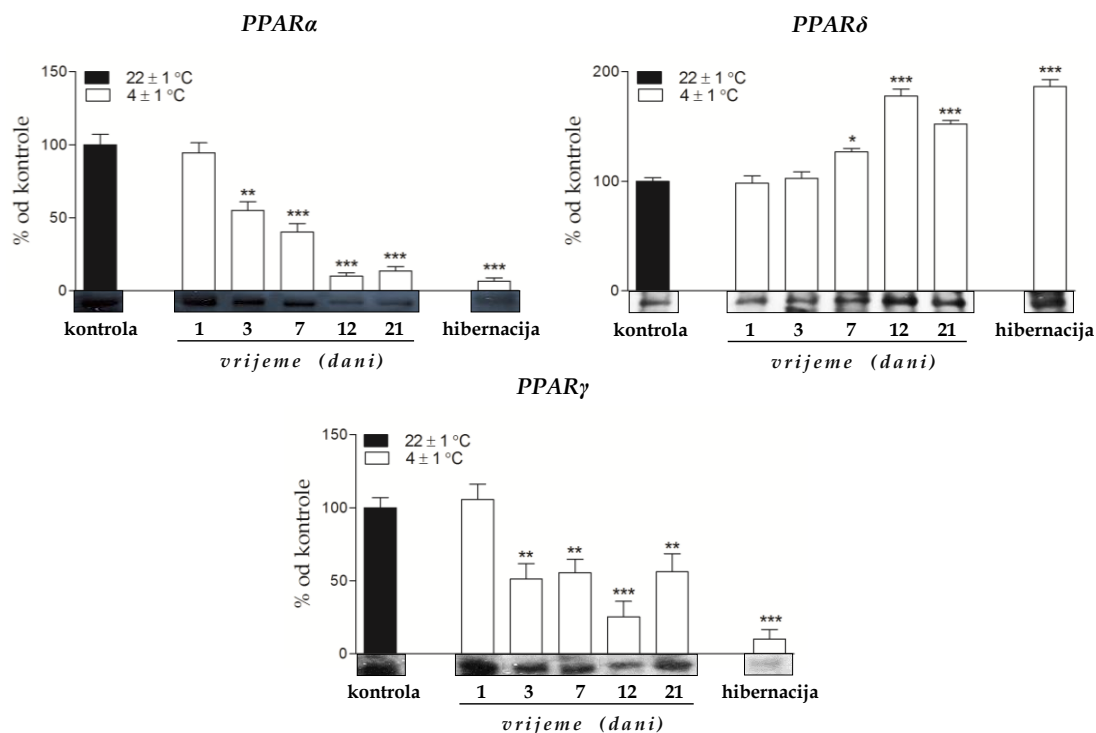


Figura 59. Promjene proteinske ekspresije PPAR α , PPAR δ i PPAR γ izoformi u eWAT tekunica tokom vremenski- \mathbb{Z} avisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

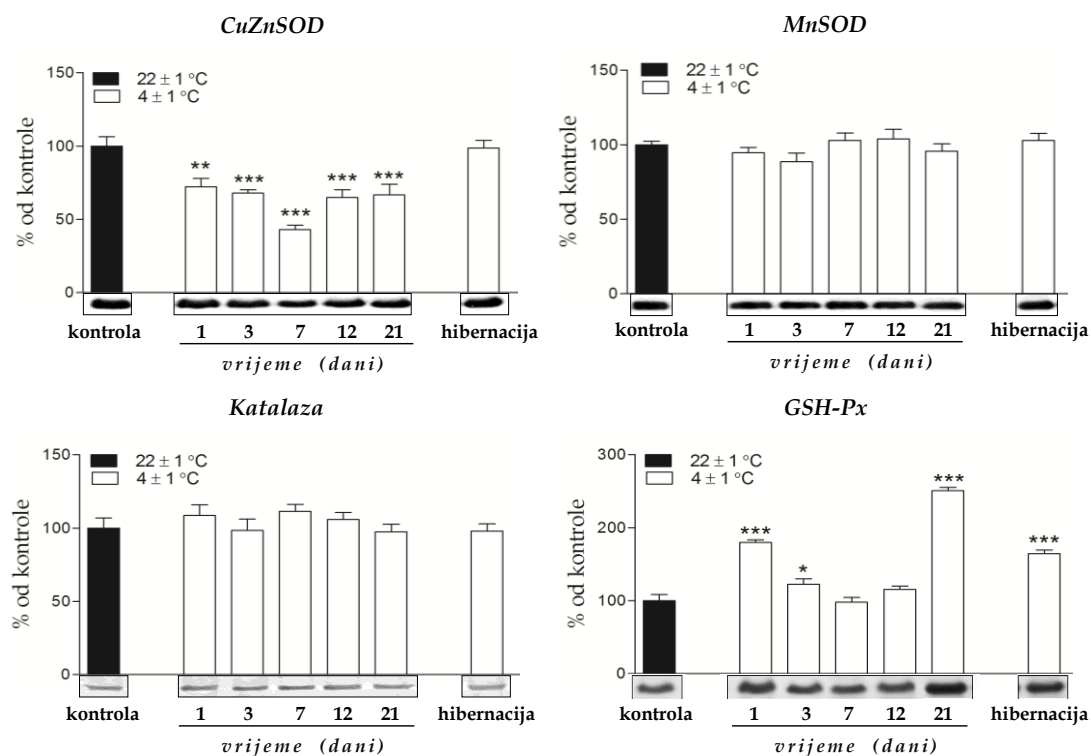


Figura 60. Promjene proteinske ekspresije Cu, Zn i Mn superoksid dismutaze (CuZnSOD i MnSOD), katalaze i glutation peroksidaze (GSH-Px) u eWAT tekunica tokom vremenski- \mathbb{Z} avisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.5.2. Morfometrijska i stereološka analiza

4.5.2.1. Volumenska gustina adipocita, krvnih sudova i intersticijuma u eWAT

Kao i u slučaju rWAT, ni ovde stereološka analiza nije pokazala statistički značajne promjene u volumenskoj zastupljenosti pojedinačnih tkivnih komponenti (Figura 61); ali se i ovde primjećuje tendencija rasta udjela kapilara u ukupnoj tkivnoj zapremini, pri čemu je u slučaju eWAT, ovo vidljivo tek od 21. dana aklimacije na nisku temperaturu, kao i u fazi hibernacije.

4.5.2.2. Površina adipocitnog profila

Morfometrijska ispitivanja eWAT (Figura 62), jasno su pokazala da hladnoća indukuje momentalno (već od 1. dana) smanjenje površine profila adipocita u ovom depou ($p < 0,001$). Takođe, ovo smanjenje je bilo vidljivo gotovo tokom čitavog perioda izlaganja hladnoći, kao i u fazi hibernacije ($p < 0,001$).

4.5.3. Svjetlosna mikroskopija

4.5.3.1. Opšta slika („browning“ efekat)

Rezultati svjetlosne mikroskopije eWAT potvrdili su rezultate morfometrijske analize, s obzirom da je i ovde vidljivo smanjenje veličine adipocita, koje je najizraženije od 3. dana aklimacije na nisku temperaturu (Slika 20, srednji panel). Takođe, jasno se vidi i da su u fazi hibernacije zastupljeni najsitniji adipociti; a primjećena je i pojava ćelija nalik mrkim adipocitima 7. dana aklimacije na hladnoću (Slika 21).

4.5.3.2. Inervacija eWAT

Kao i u slučaju rWAT i ovde je primjećen blagi porast inervacije adipocita tokom izlaganja životinja hladnoći i to prvenstveno oko krvnih sudova. U uslovima hibernacije, vidno je smanjenje broja nervnih vlakana/sinapsi, međutim, čini se da ovaj depo ostaje ipak najinervisaniji u poređenju sa ostala dva depoa WAT (Slika 22, srednji panel).

4.5.3.3. PAS bojenje glikogena

Bojenje glikogena u adipocitima Šifovim reagensom nije pokazalo značajne razlike između eksperimentalnih grupa (Slika 23, sredni panel).

Volumenske gustine tkivnih komponenti

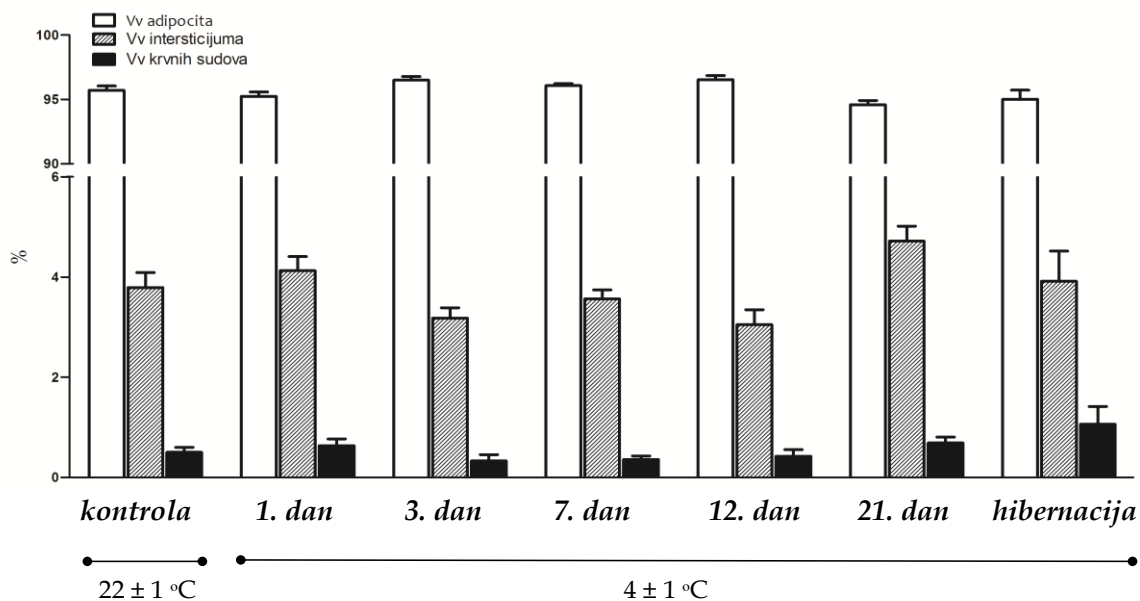


Figura 61. Grupni histogram volumenske gustine adipocita (bijeli stubići), intersticijuma (sivi stubići) i krvnih sudova (crni stubići) u eWAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji.

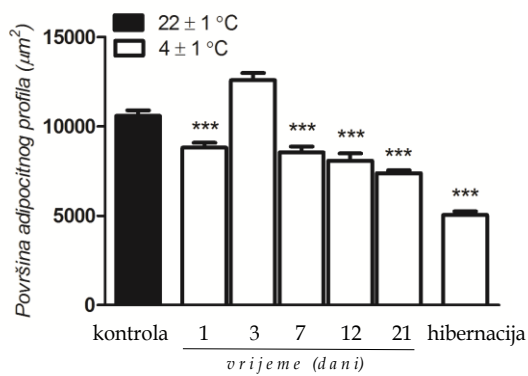


Figura 62. Promjene površine adipocitnog profila u eWAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; *** $p < 0,001$.

4.6. SUBKUTANO (POTKOŽNO) BIJELO MASNO TKIVO

4.6.1. Western blot analiza

4.6.1.1. Proteinska ekspresija komponenti OXPHOS

Prvog dana aklimacije na nisku temperaturu zabilježen je pad proteinske količine svih ispitivanih komponenti OXPHOS u poređenju sa kontrolom (Figura 63). Dalje u toku aklimacije, ovakav trend je zadržan u slučaju kompleksa III, citohroma *c* i ATP sintaze. Suprotno tome, proteinska ekspresija kompleksa I i kompleksa IV je bila povećana u odnosu na kontrolu 3. i 7. dana, odnosno u periodu 3-21. dana izlaganja hladnoći.

U fazi hibernacije proteinska količina kompleksa I, citohroma *c* i ATP sintaze je bila na kontrolnom nivou. Sa druge strane, nivo kompleksa II i IV, u ovim uslovima, bio je 1,5-2 puta veći nego u kontrolnim uzorcima ($p < 0,001$), dok je nivo kompleksa III bio smanjen na svega ~20% kontrolne vrijednosti ($p < 0,001$).

4.6.1.2. Proteinska ekspresija enzima uključenih u katabolizam glukoze

Kao i u slučaju komponenti OXPHOS i ovde je primjećeno smanjenje količine enzima ključnih za katabolizam glukoze 1. dana aklimacije na nisku temperaturu, u poređenju sa kontrolom ($p < 0,001$; Figura 64). Međutim u ovom slučaju, ovakav trend se održao samo kod M subjedinice LDH tokom gotovo čitavog perioda aklimacije na hladnoću (7. dana je zabilježen kontrolni nivo ovog proteina; a ostalih dana $p < 0,001$). Nasuprot tome, nivo GAPDH proteina je bio čak veći nego u kontroli 3. ($p < 0,01$) i 7. ($p < 0,05$) dana aklimacije, LDH H 7. i 12. dana ($p < 0,01$); a PDH u periodu od 7-21. dana izlaganja hladnoći ($p < 0,001$).

Hibernacija je, sa druge strane, indukovala promjenu samo proteinskog nivoa GAPDH i PDH. Naime, u ovim uslovima detektovana je ~2,5 puta veća količina pomenutih proteina u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$).

4.6.1.3. Proteinska ekspresija enzima uključenih u katabolizam lipida

1, 3. i 21. dana izlaganja niskoj temperaturi zabilježena je manja količina ACADM proteina nego u kontrolnim uzorcima ($p < 0,05$). Takođe, 3. dana aklimacije na hladnoću i količina SCAS je bila manja od kontrolne ($p < 0,05$); ali već nakon toga (7. i 12. dana) došlo je do povećanja ekspresije ovog proteina iznad kontrolnog nivoa ($p < 0,01$).

U fazi hibernacije količina ACADM proteina je bila na kontrolnom nivou, dok je proteinska ekspresija SCAS bila suprimirana na ~10% od kontrolne vrijednosti ($p < 0,001$). Opisane promjene su prikazane na Figuri 65.

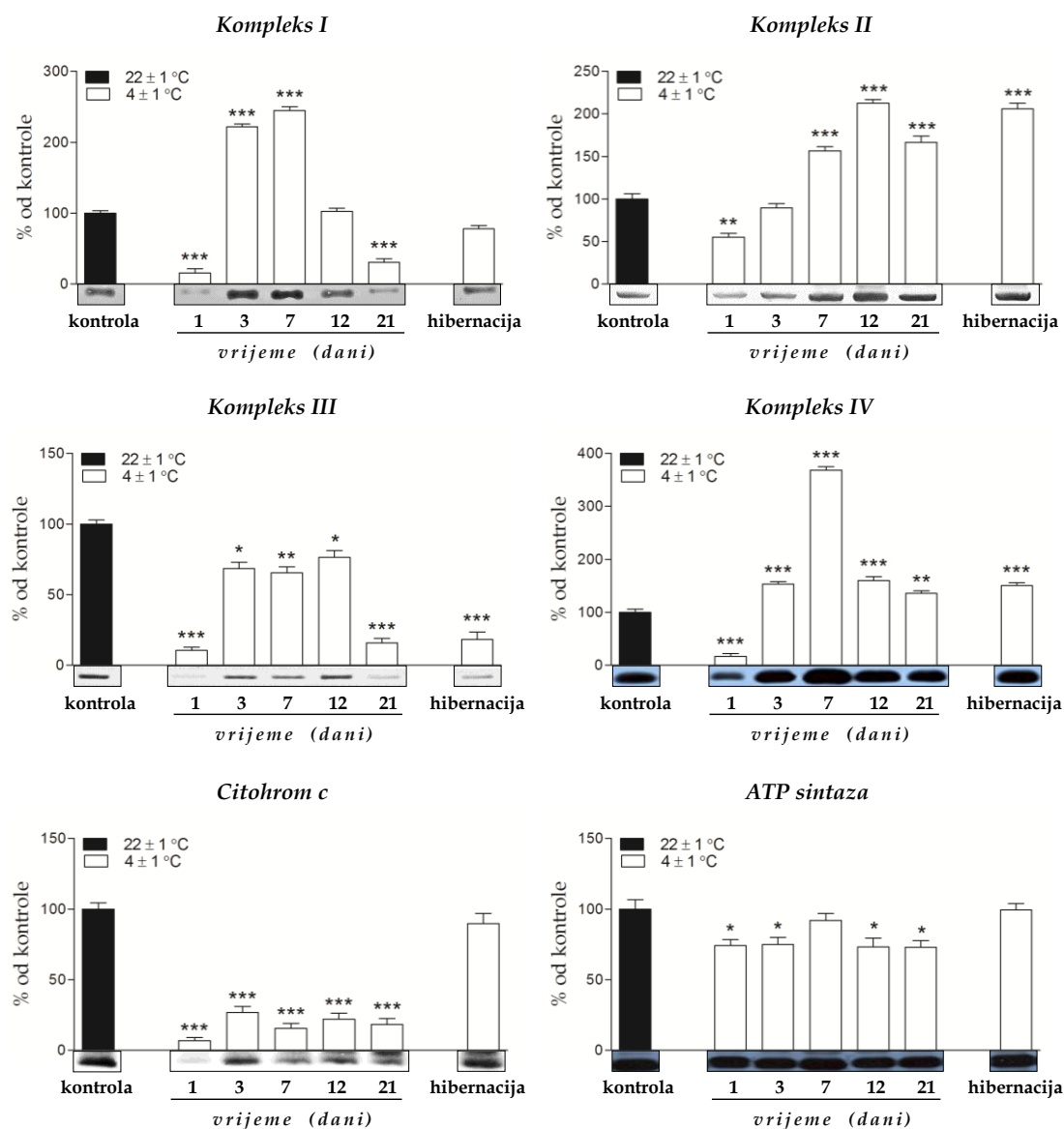


Figura 63. Promjene proteinske ekspresije komponenti OXPHOS (kompleks I, II, III, IV, citobroma c i ATP sintaze) u sWAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

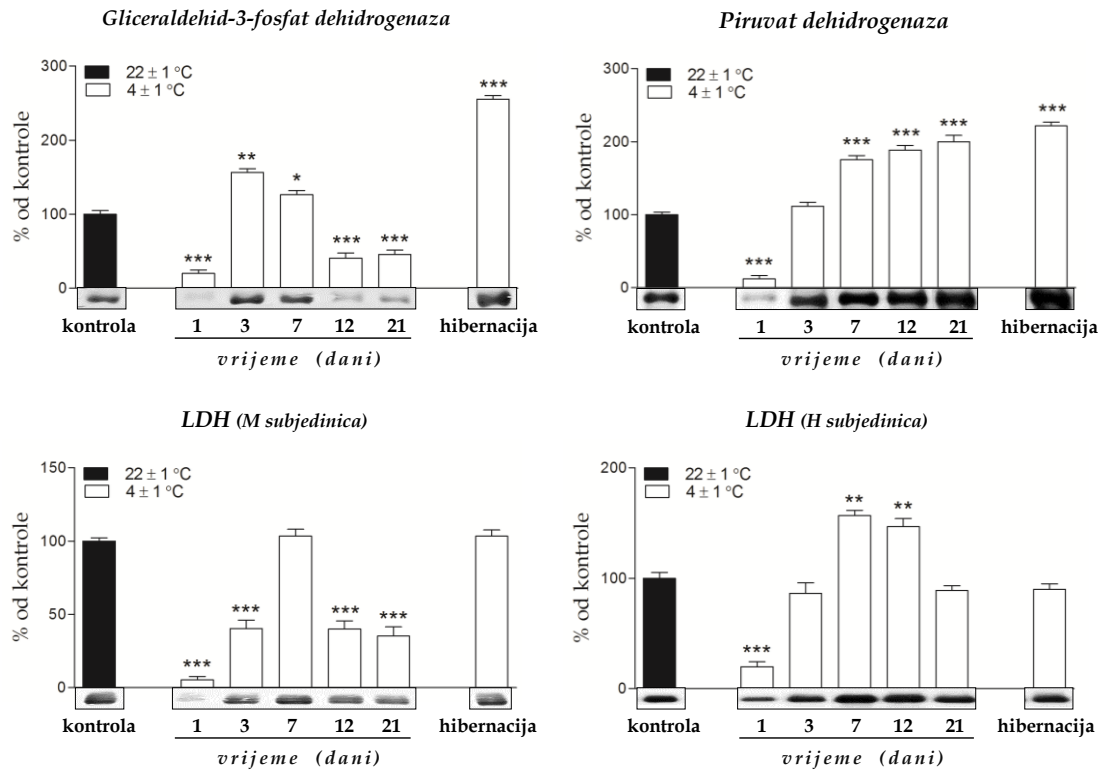


Figura 64. Promjene proteinske ekspresije gliceralehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH), piruvat dehidrogenaze (PDH), M i H subjedinice laktat dehidrogenaze (LDH) u sWAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

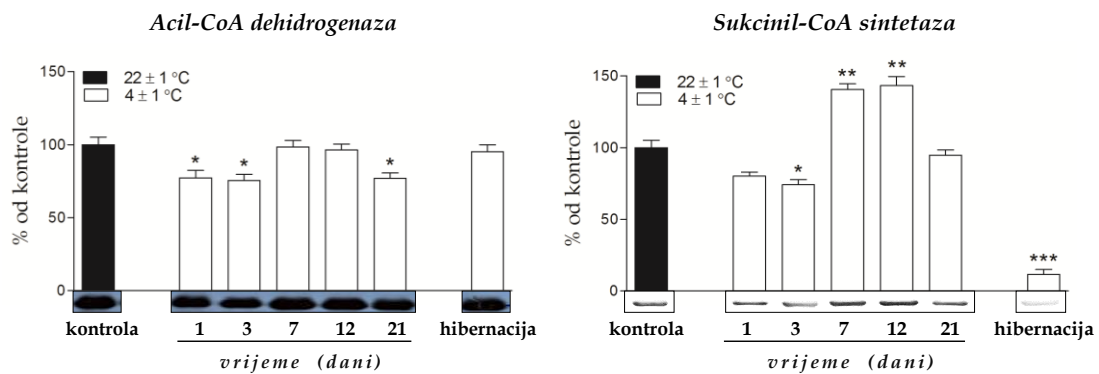


Figura 65. Promjene proteinske ekspresije acil-CoA dehidrogenaze (ACADM) i sukcinil-CoA sintetaze (SCAS) u sWAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.6.1.4. Proteinska ekspresija enzima uključenih u anabolizam lipida

Kao što se vidi na Figuri 66, u poređenju sa kontrolom proteinska ekspresija FAS je bila povećana, i to kako u periodu od 7-21. dana izlaganja hladnoći, tako i u fazi hibernacije ($p < 0,001$). Suprotno tome, nivo ACC je bio u odnosu na kontrolu smanjen 1. 3. ($p < 0,001$) i 21. dana ($p < 0,01$) aklimacije na nisku temperaturu, kao i u fazi duboke hibernacije ($p < 0,05$).

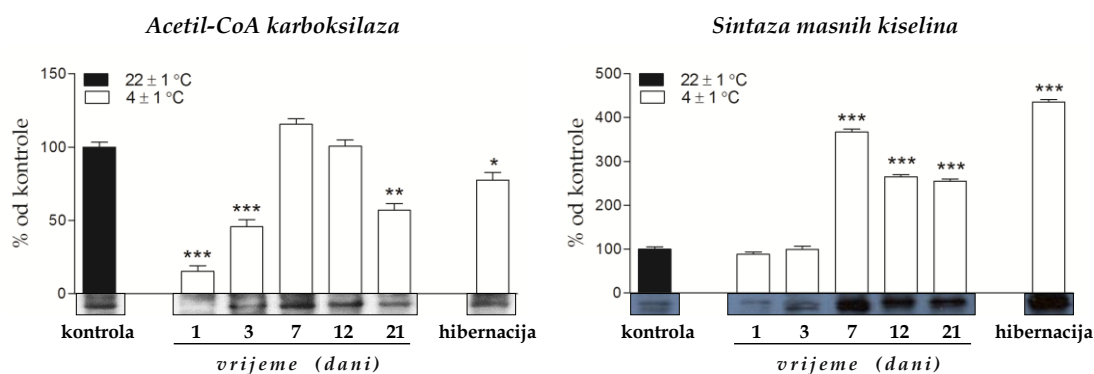


Figura 66. Promjene proteinske ekspresije acetil-CoA karboksilaze (ACC) i sintaze masnih kiselina (FAS) u sWAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.6.1.5. Proteinska ekspresija VEGF

Nakon inicijalnog pada (1. dan) proteinske količine VEGF ($p < 0,001$); hladnoća je u periodu od 7-21. dana indukovala značajno povećanje proteinske ekspresije ovog proteina (Figura 67). Slično, u hibernaciji došlo je do povećanja količine VEGF proteina 3,7 puta u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$).

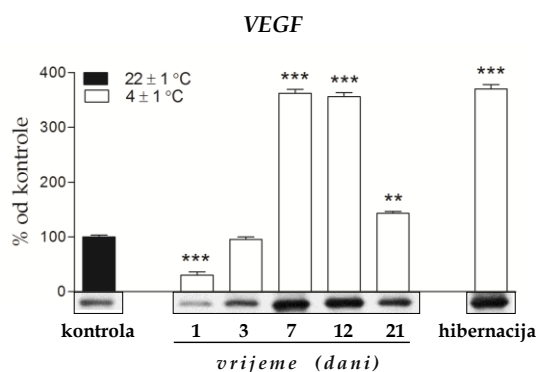


Figura 67. Promjene proteinske ekspresije vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF) u sWAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.6.1.6. Proteinska ekspresija fosfo-AMPK α i HIF-1 α

Proteinska ekspresija HIF-1 α bila je statistički značajno niža nego u kontroli 1, 12. i 21. dana izlaganja niskoj temperaturi, kao i u fazi hibernacije ($p < 0,001$), dok je 3. dana aklimacije zabilježen blagi rast od oko 30% iznad kontrolne vrijednosti ($p < 0,05$).

Što se tiče fosfo-AMPK α , njegova proteinska ekspresija je bila manja u odnosu na kontrolu 1. dana izlaganja hladnoći ($p < 0,001$). Slično kao i kod ostalih WAT depoa primjećen je porast količine ove kinaze 7. i 12. dana aklimacije, samo što je u ovom slučaju 21. dana izlaganja hladnoći njegova proteinska količina na kontrolnom nivou. Ipak, u fazi hibernacije, detektovano je povećanje proteinskog nivoa fosfo-AMPK α od 3,2 puta u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$).

Opisane promjene proteinske ekspresije HIF-1 α i fosfo-AMPK α u toku izlaganja hladnoći i u fazi hibernacije prikazane su grafički na Figuri 68.

4.6.1.7. Proteinska ekspresija mitofuzina 1 i PGC-1 α

Jedno- i tro-dnevno izlaganje životinja hladnoći indukovalo je supresiju proteinske ekspresije mitofuzina 1 u poređenju sa kontrolom; nakon čega je 7. dana došlo do prolaznog povećanja količine ovog proteina ($p < 0,001$). Sa druge strane, proteinska količina PGC-1 α bila je povećana u odnosu na kontrolu u periodu od 3-21. dana aklimacije na nisku temperaturu ($p < 0,001$). Hibernacija nije afektovala proteinsku količinu PGC-1 α ; dok je u slučaju mitofuzina 1 zabilježen blagi rast od 27% u odnosu na kontrolu u datim uslovima ($p < 0,05$) (Figura 69).

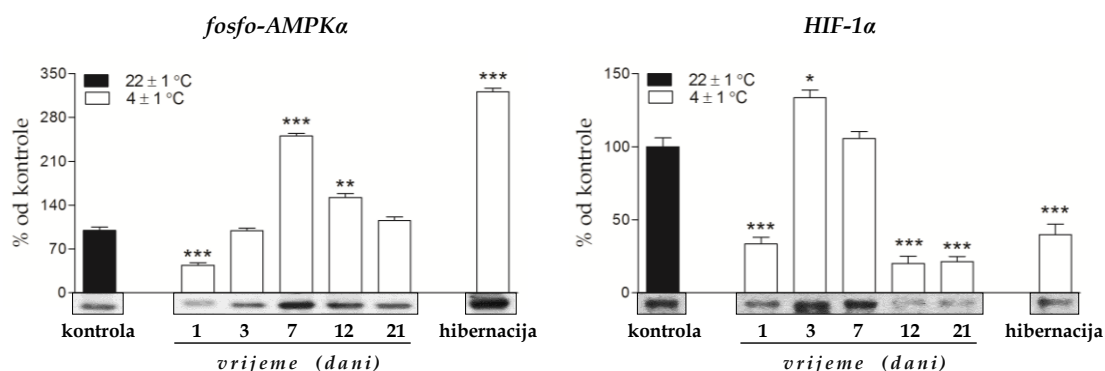


Figura 68. Promjene proteinske ekspresije fosfo-AMP-aktivirane protein kinaze α (fosfo-AMPK α) i hipoksija-inducibilnog faktora-1a (HIF-1 α) u sWAT tkivima tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

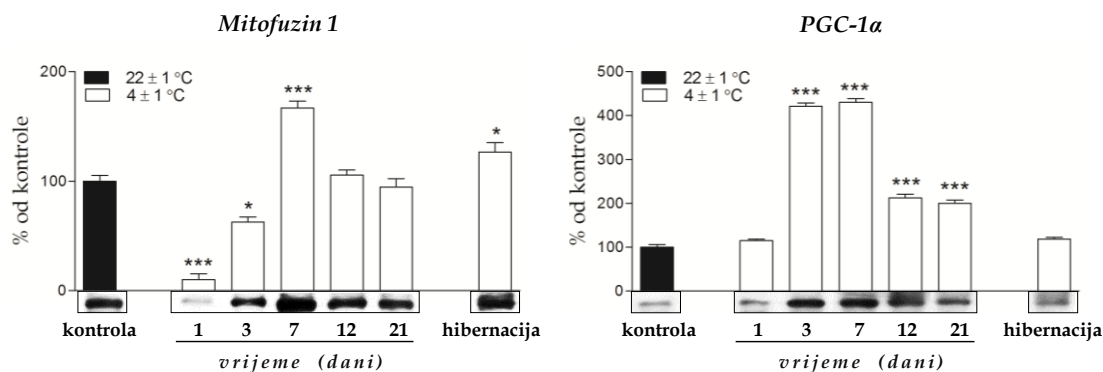


Figura 69. Promjene proteinske ekspresije mitofuzina 1 i transkripcionog ko-aktivatora PGC-1α u sWAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.6.1.8. Proteinska ekspresija Nrf1 i NFE2L2

Tokom produženog boravka tekunica na hladnoći (12. i 21. dana) detektovana je smanjena količina i Nrf1 i NFE2L2 (Figura 70). Ovakav trend je zabilježen i u fazi hibernacije u slučaju Nrf1 ($p < 0,001$), dok je količina NFE2L2 u ovim uslovima bila na kontrolnom nivou.

4.6.1.9. Proteinska ekspresija PPAR izoformi

Proteinska ekspresija γ i δ izoforme PPAR pokazuju suprotne promjene u dva ispitivana fiziološka stanja (Figura 71). Naime, proteinska ekspresija PPAR γ je bila gotovo nepromjenjena tokom aklimacije na hladnoću (osim 7. dana kad je primjećen blagi rast količine ovog proteina; $p < 0,05$); dok je u ovim uslovima tokom čitavog ispitivanog perioda proteinska količina PPAR δ bila smanjena u poređenju sa kontrolom ($p < 0,001$). Suprotno, u fazi hibernacije proteinska količina PPAR δ je bila na nivou kontrole, dok je ekspresija PPAR γ proteina bila suprimirana na svega 21% kontrolne vrijednosti ($p < 0,001$).

Suprotno navedenim promjenama, proteinska količina treće izoforme PPAR transkripcionog faktora - PPAR α , bila je statistički veća od kontrole u periodu od 3-21. dana izlaganja hladnoći, kao i u fazi hibernacije ($p < 0,001$).

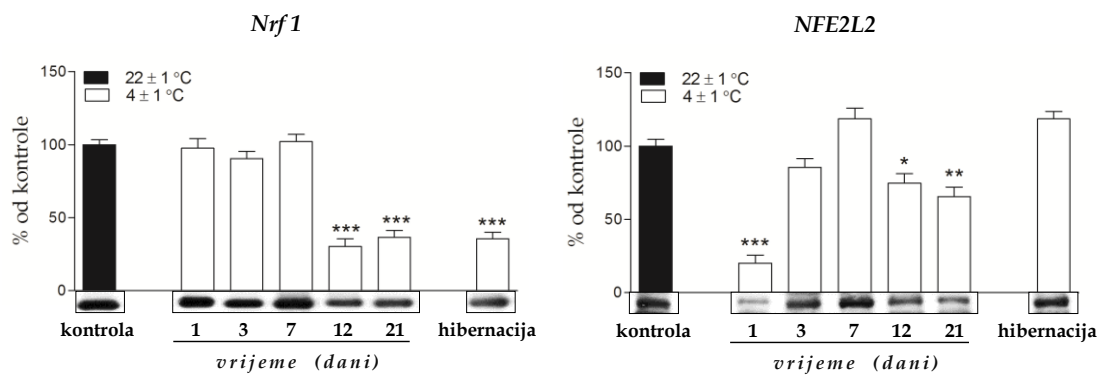


Figura 70. Promjene proteinske ekspresije transkripcijskih faktora *Nrf1* i *NFE2L2* u *sWAT* tkunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

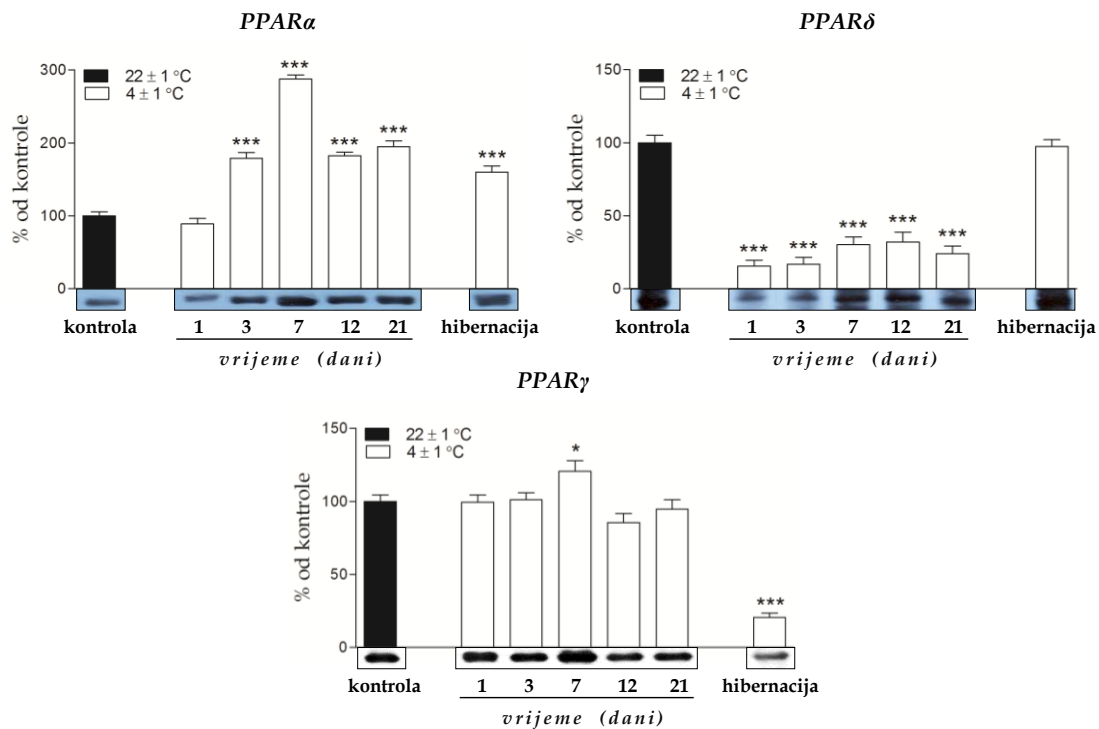


Figura 71. Promjene proteinske ekspresije *PPARα*, *PPARδ* i *PPARγ* izoformi u *sWAT* tkunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.6.1.10. Proteinska ekspresija enzima antioksidativne odbrane

Kao što Figura 72 pokazuje, proteinska ekspresija GSH-Px ($p < 0,001$), CuZnSOD ($p < 0,001$, osim 3. dana gdje je $p < 0,05$) i MnSOD (gdje je $p < 0,001$ 1. i 21. dana; a $p < 0,01$ 3, 7. i 12. dana) bila je statistički značajno manja od kontrole tokom čitavog perioda aklimacije na hladnoću. Suprotno tome, proteinska količina katalaze bila je značajno veća od kontrole u periodu od 3-21. dana izlaganja hladnoći.

Tokom faze hibernacije zabilježen je pad od 82% ($p < 0,001$), odnosno 20% ($p < 0,05$) od kontrolne vrijednosti u slučaju GSH-Px i MnSOD. Kao i u fazi aklimacije na hladnoću, proteinska količina katalaze je i ovde bila veća od kontrole (~1,4 puta; $p < 0,01$).

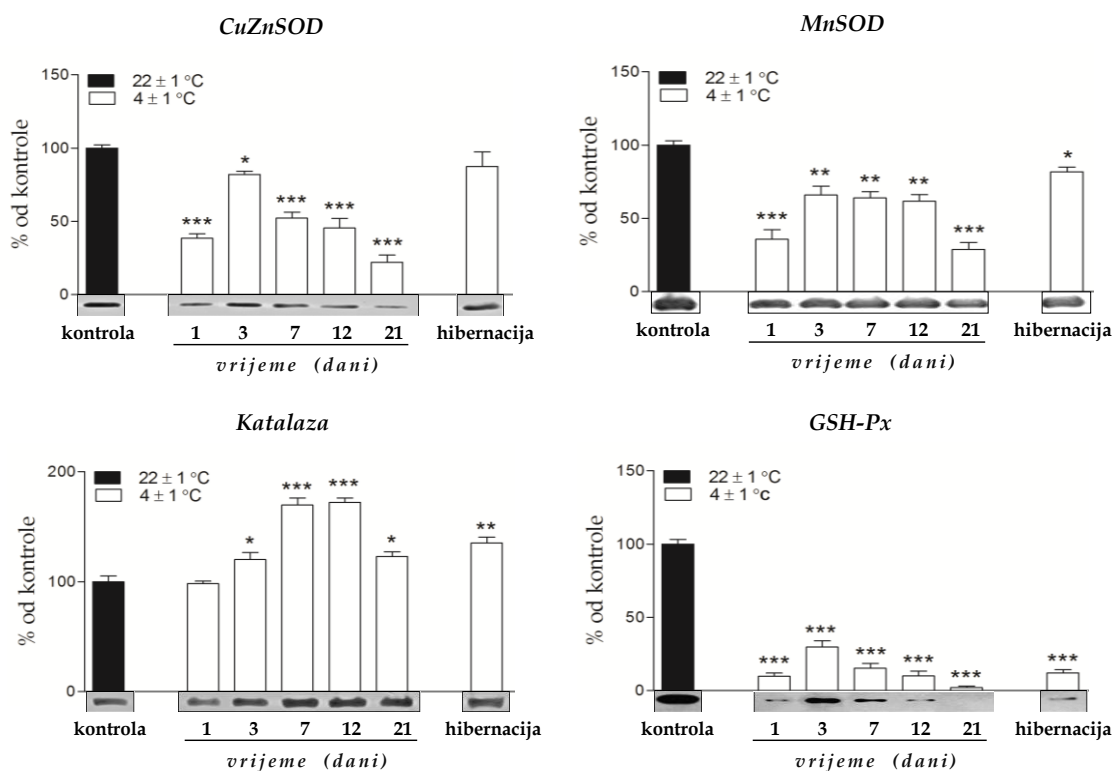


Figura 72. Promjene proteinske ekspresije Cu,Zn i Mn superoksid dismutaze (CuZnSOD i MnSOD), katalaze i glutatjon peroksidaze (GSH-Px) u sWAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.6.2. Morfometrijska i stereološka analiza

4.6.2.1. Volumenska gustina adipocita, krvnih sudova i intersticijuma u sWAT

Kao što se vidi na Figuri 73, u potkožnom depou WAT je zabilježena tendencija porasta udjela kapilara već od 1. dana aklimacije na nisku temperaturu. Ovo povećanje je čak i dostiglo statističku značajnost 21. dana izlaganja hladnoći ($p < 0,001$). U ovoj vremenskoj tački zabilježen je i pad volumenskog udjela adipocita ($p < 0,01$).

4.6.2.2. Površina adipocitnog profila

Suprotno dešavanjima u preostala dva WAT depoa, u sWAT je detektovano povećanje površine profila adipocita 1. ($p < 0,001$) i 3. ($p < 0,05$) dana izlaganja hladnoći (Figura 74), dok je smanjenje detektovano samo 12. dana aklimacije na nisku temperaturu ($p < 0,05$) i u fazi hibernacije ($p < 0,001$).

4.6.3. Svjetlosna mikroskopija

4.6.3.1. Opšta slika („*browning*“ efekat)

Kao i do sad, rezultati svjetlosne mikroskopije slikovito su potvrdili rezultate morfometrijske analize (Slika 20, desni panel). Naime, sa mikrografija se jasno vidi da tokom prvih nedelju dana izlaganja hladnoći dolazi do povećanja veličine adipocita u sWAT, što je posebno vidljivo 3. i 7. dana; dok je već od 12. dana primjetno vraćanje veličine adipocita na kontrolni nivo, te i da su u fazi hibernacije prisutne najsitnije ćelije ovog depoa. Sedmi dan aklimacije na hladnoću i u slučaju ovog WAT depoa indukovao je pojavu multilokulusnih ćelija koje podsjećaju na mrke adipocite (Slika 21).

4.6.3.2. Inervacija sWAT

Svjetlosna mikroskopija je jasno pokazala da je potkožni depo WAT jedan od najmanje inervisanih depoa, kao i da tokom aklimacije na hladnoću gotovo da ne dolazi do povećanja broja nervnih vlakana (Slika 22, desni panel).

4.6.3.3. PAS bojenje glikogena

Bojenje glikogena Šifovim reagensom nije pokazalo vidljivije razlike u količini ove energetske rezerve u adipocitima, kako tokom aklimacije na hladnoću, tako i u hibernaciji (Slika 23, desni panel).

Volumenske gustine tkivnih komponenti

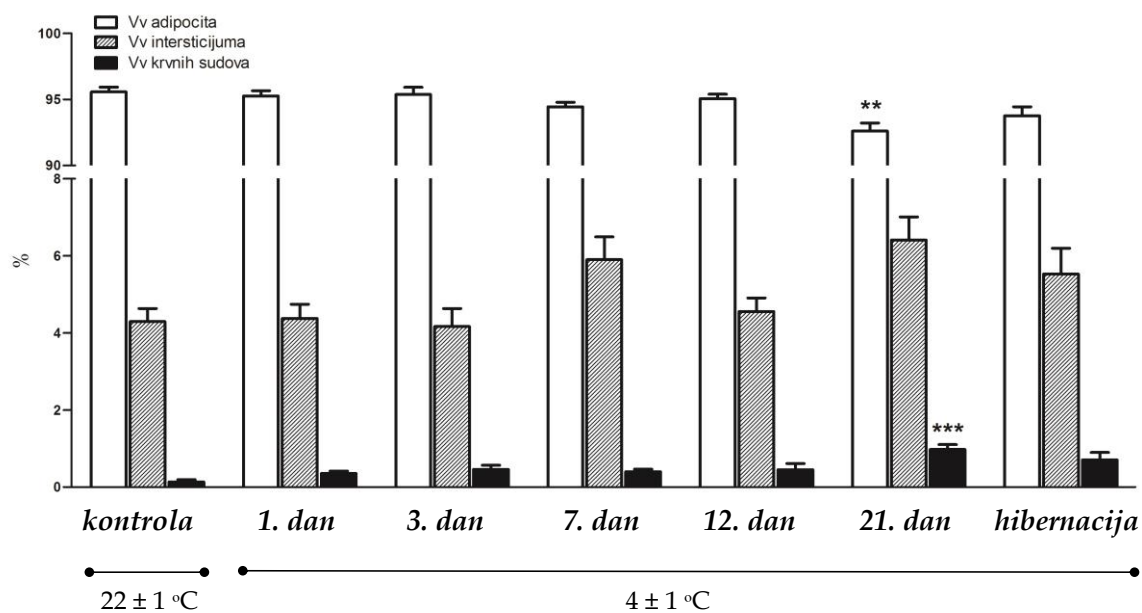


Figura 73. Grupni histogram volumenske gustine adipocita (bijeli stubići), intersticijuma (sivi stubići) i krvnih sudova (crni stubići) u sWAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

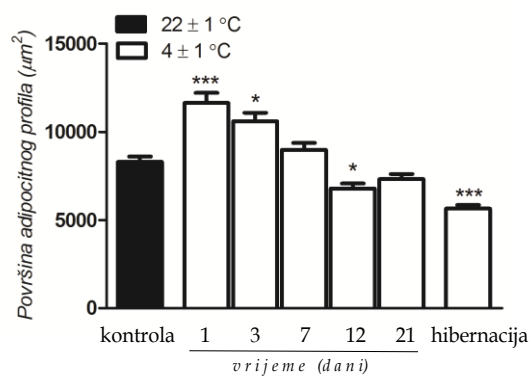


Figura 74. Promjene površine adipocitnog profila u sWAT tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.7. JETRA

4.7.1. Western blot analiza

4.7.1.1. Proteinska ekspresija komponenti OXPHOS

Ni izlaganje niskoj temperaturi, ni hibernacija nisu afektovale proteinsku ekspresiju kompleksa I, II i III (Figura 75). Sa druge strane, proteinska ekspresija ostalih OXPHOS komponenti u fazi aklimacije na hladnoću bila je suprimirana, i to: kompleksa IV tokom čitavog ispitivanog perioda (21 dan), citohroma *c* u periodu od 7-21. dana ($p < 0,001$), a ATP sintaze u periodu od 3-12. dana ($p < 0,05$).

U fazi hibernacije detektovana je promjena proteinske količine kompleksa IV i citohroma *c*. Naime, proteinska količina kompleksa IV je bila veća 1,3 puta u odnosu na kontrolu ($p < 0,01$); dok je količina citohroma *c* smanjena na svega 27% od kontrolne vrijednosti ($p < 0,001$).

4.7.1.2. Proteinska ekspresija proteina uključenih u unos i katabolizam šećera

Proteinska ekspresija GLUT2 i PDH bila je manja nego u kontroli tokom skoro čitavog perioda aklimacije na hladnoću i u fazi hibernacije (Figura 76). Jedni izuzetak je bio 1. dan aklimacije na nisku temperaturu, kada je količina GLUT2 bila na kontrolnom nivou. Suprotno, tokom čitavog perioda izlaganja hladnoći i u fazi hibernacije detektovana je veća količina GAPDH proteina nego u kontroli ($p < 0,001$, osim 1. dana gdje je $p < 0,01$).

Što se tiče subjedinica LDH (Figura 76), u odnosu na kontrolu zabilježena je povećana količina M subjedinice 1. dana ($p < 0,01$), a H subjedinice 7. dana aklimacije na hladnoću ($p < 0,001$). Sa druge strane, proteinska ekspresija LDH M i LDH H je bila suprimirana 12. i 21. dana ($p < 0,01$); odnosno 3. izlaganja hladnoći ($p < 0,001$) i u hibernaciji ($p < 0,05$).

4.7.1.3. Proteinska ekspresija enzima uključenih u anabolizam šećera

U periodu od 3-21. dana izlaganja hladnoći proteinska ekspresija GSK3 bila je manja nego u kontroli ($p < 0,01$), dok je u periodu od 1-12. dana zabilježena povećana količina PYG enzima (Figura 77). U hibernaciji, detektovan je blagi pad u količini GSK3 proteina u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

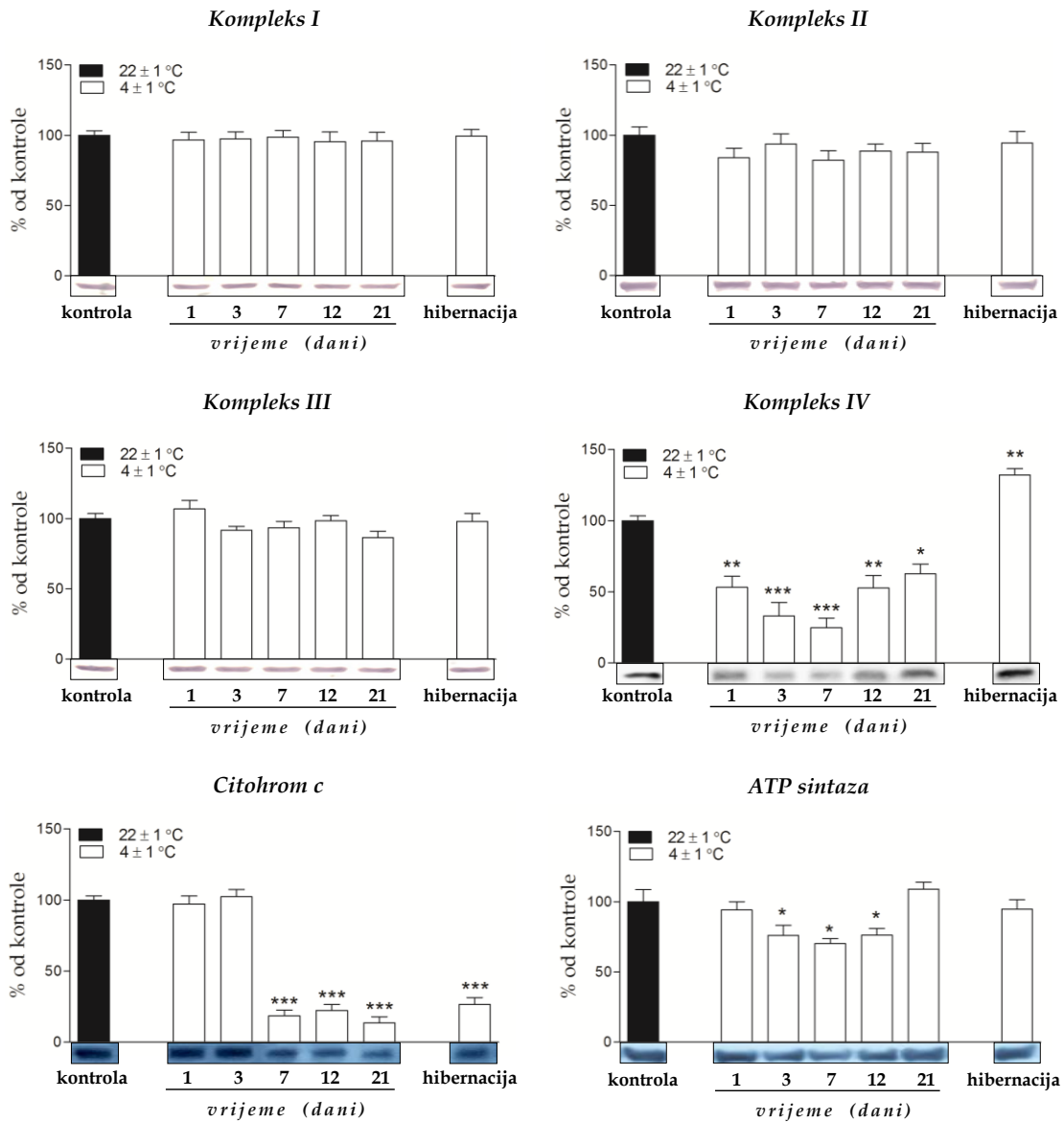
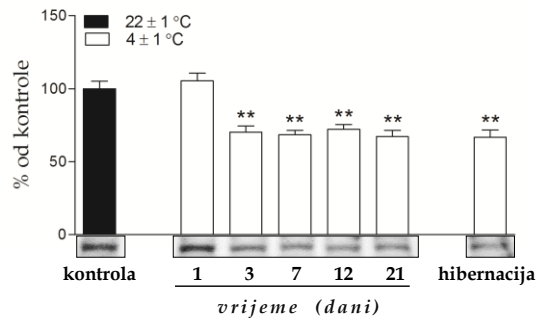
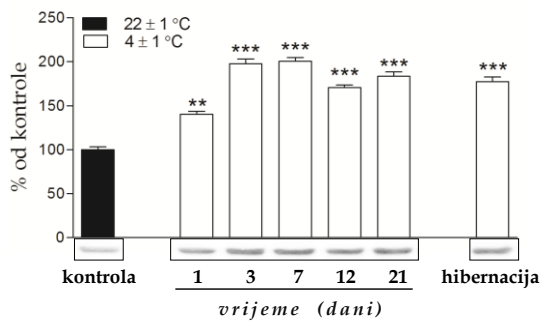


Figura 75. Promjene proteinske ekspresije komponenti OXPHOS (kompleks I, II, III, IV, citobroma c i ATP sintaze) u jetri tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na bladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

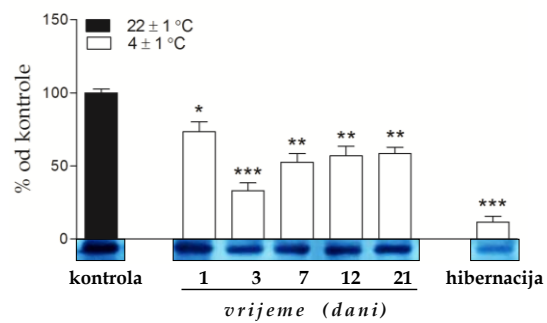
GLUT 2



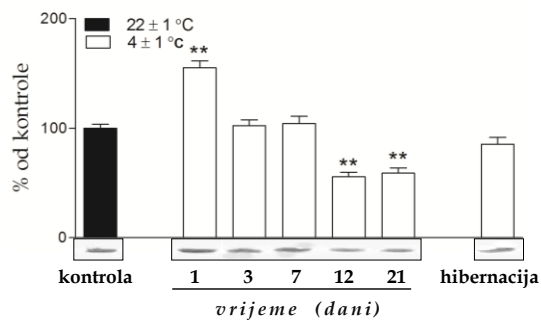
Gliceralehid-3-fosfat dehidrogenaza



Piruvat dehidrogenaza



LDH (M subjedinicica)



LDH (H subjedinicica)

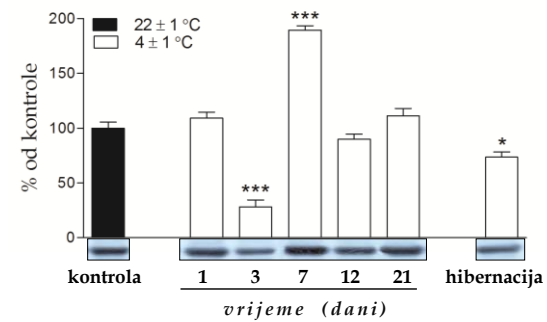


Figura 76. Promjene proteinske ekspresije glukoznog transportera 2 (GLUT2), gliceralehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH), piruvat dehidrogenaze (PDH), M i H subjedinicice laktat dehidrogenaze (LDH) u jetri tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

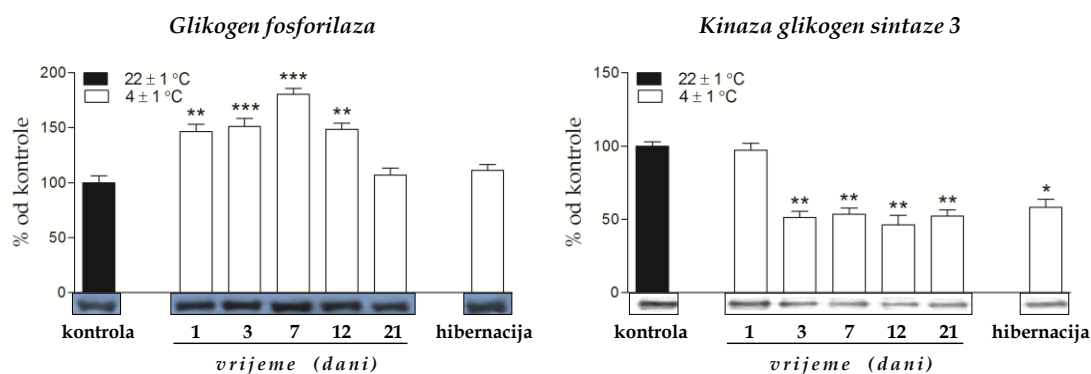


Figura 77. Promjene proteinske ekspresije glikogen fosforilaze (PYG) i kinaze glikogen sintaze 3 (GSK3) u jetri tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.7.1.4. Proteinska ekspresija enzima uključenih u katabolizam lipida

Kao što se vidi sa grafičkog prikaza rezultata (Figura 78), proteinska ekspresija ACADM je bila manja u odnosu na kontrolu u periodu od 3-12. dana izlaganja hladnoći ($p < 0,01$).

Suprotno tome, 12. i 21. dana aklimacije na nisku temperaturu ($p < 0,001$), kao i u fazi hibernacije ($p < 0,01$) zabilježena je veća količina SCAS proteina.

4.7.1.5. Proteinska ekspresija enzima uključenih u anabolizam lipida

Prvog dana izlaganja hladnoći zabilježena je ~3 puta veća proteinska ekspresija ACC u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$), dok je već od 3. dana došlo do restitucije njegovog proteinskog nivoa (što se održalo do kraja ispitivanog perioda). Sa druge strane, količina FAS proteina bila je manja u odnosu na kontrolu 3. i 7. dana aklimacije na nisku temperaturu; ali i ovde je nadalje tokom ispitivanog perioda proteinska količina restituisana na kontrolu.

U fazi hibernacije proteinska ekspresija oba pomenuta proteina bila je značajno suprimirana, te je detektovano svega ~5% kontrolne količine ovih proteina ($p < 0,001$), što je prikazano na Figuri 79.

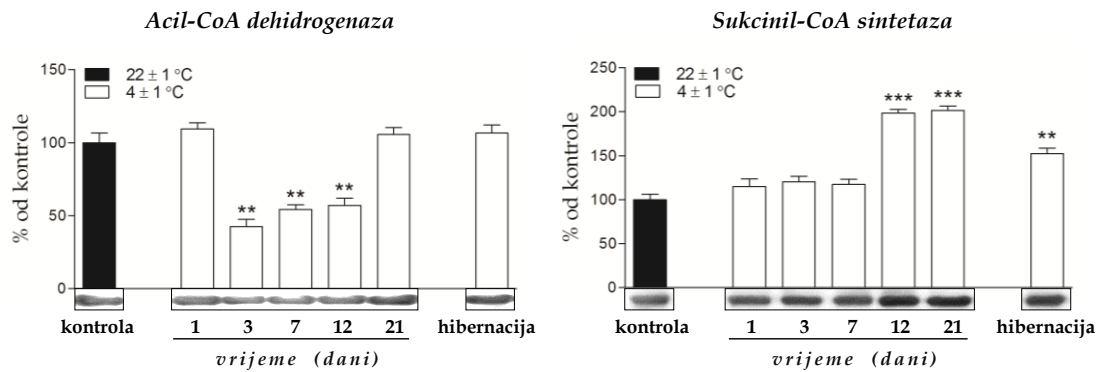


Figura 78. Promjene proteinske ekspresije acil-CoA dehidrogenaze (ACADM) i sukcinil-CoA sintetaze (SCAS) u jetri tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

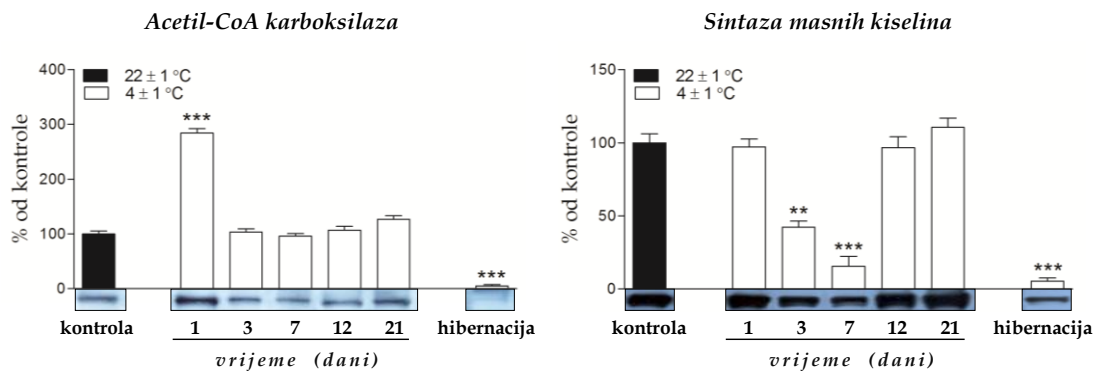


Figura 79. Promjene proteinske ekspresije acetil-CoA karboksilaze (ACC) i sintaze masnih kiselina (FAS) u jetri tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.7.1.6. Proteinska ekspresija VEGF

U odnosu na kontrolu, nivo proteina za VEGF nije pokazao značajne promjene tokom aklimacije na hladnoću kao ni u hibernaciji (Figura 80).

4.7.1.7. Proteinska ekspresija fosfo-AMPK α i HIF-1 α

Prilikom izlaganja niskoj temperaturi detektovano je povećanje proteinske količine fosfo-AMPK α 1. dana ($p < 0,05$), odnosno HIF-1 α 1. i 3. dana aklimacije ($p < 0,05$). Suprotno tome, u periodu od 3. do 21. dana zabilježena je statistički značajno manja proteinska ekspresija fosfo-AMPK α u odnosu na kontrolu. Takođe, smanjenje proteinske količine ispod kontrolnog nivoa zabilježeno je i u slučaju HIF-1 α 21. dana aklimacije na hladnoću ($p < 0,001$).

Hibernacija je indukovala smanjenje nivoa fosfo-AMPK α na 13% od kontrolne vrijednosti ($p < 0,001$), dok ovi uslovi nisu afektovali proteinsku ekspresiju HIF-1 α (Figura 81).

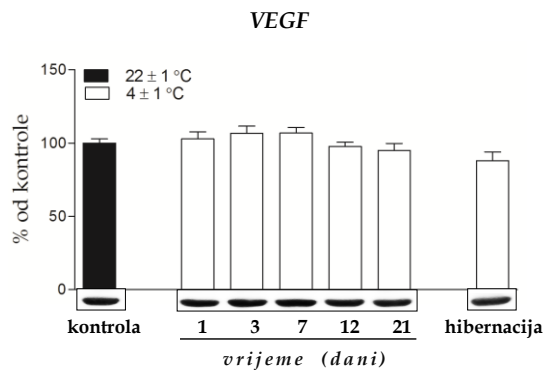


Figura 80. Promjene proteinske ekspresije vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF) u jetri tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji.

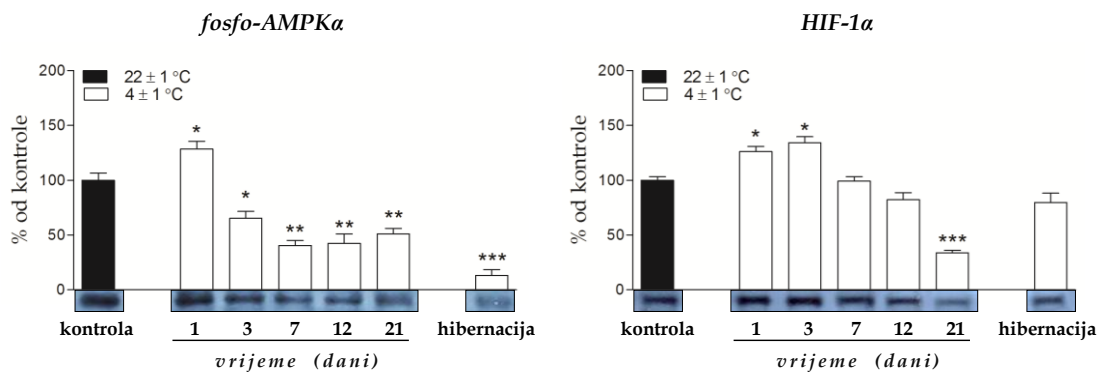


Figura 81. Promjene proteinske ekspresije fosfo-AMP-aktivirane protein kinaze a (fosfo-AMPKa) i hipoksija-inducibilnog faktora-1a (HIF-1 α) u jetri tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.7.1.8. Proteinska ekspresija mitofuzina 1 i PGC-1 α

Izlaganje životinja hladnoći 21 dan nije imalo uticaja na proteinsku ekspresiju mitofuzina 1 i PGC-1 α (Figura 82). Sa druge strane, u fazi hibernacije proteinska količina ovih proteina je bila smanjena na ~30% kontrolne vrijednosti ($p < 0,001$).

4.7.1.9. Proteinska ekspresija Nrf1 i NFE2L2

Tokom čitavog perioda izlaganja niskoj temperaturi, kao i u fazi hibernacije proteinska količina NFE2L2 je bila statistički značajno niža nego u kontroli ($p < 0,001$). Sa druge strane, u periodu od 7-21. dana aklimacije na hladnoću zabilježeno je povećanje količine Nrf1 proteina ($p < 0,001$). Sve opisano je prikazano grafički na Figuri 83.

4.7.1.10. Proteinska ekspresija PPAR izoformi

U toku aklimacije na nisku temperaturu proteinski nivo PPAR α je bio statistički značajno veći nego u kontroli 3. i 7. dana ($p < 0,001$); dok je 21. dana zabilježen pad u ekspresiji ovog proteina ($p < 0,05$). U istim uslovima ali u periodu od 3-21. dana, proteinska količina PPAR γ je bila povećana iznad kontrolnog nivoa. Što se tiče PPAR δ , njegova proteinska količina je bila manja nego u kontroli 7. i 12. dana izlaganja hladnoći ($p < 0,05$).

U fazi hibernacije proteinska količina PPAR α je bila manja ($p < 0,001$), PPAR δ - veća ($p < 0,05$), a u slučaju PPAR γ - na nivou kontrole (Figura 84).

4.7.1.11. Proteinska ekspresija enzima antioksidativne odbrane

Od svih ispitivanih komponenti antioksidativne odbrane, tokom aklimacije na hladnoću detektovano je samo blago smanjenje količine CuZnSOD tokom čitavog ispitivanog perioda ($p < 0,05$, osim 21. dana gdje je $p < 0,01$). Takođe, hibernacija je indukovala smanjenje ekspresije CuZnSOD ($p < 0,001$) i katalaze ($p < 0,05$) ispod kontrolnog nivoa, te je u ovim uzorcima detektovano 15%, odnosno 74% kontrolne količine ovih proteina. Promjene su prikazane na Figuri 85.

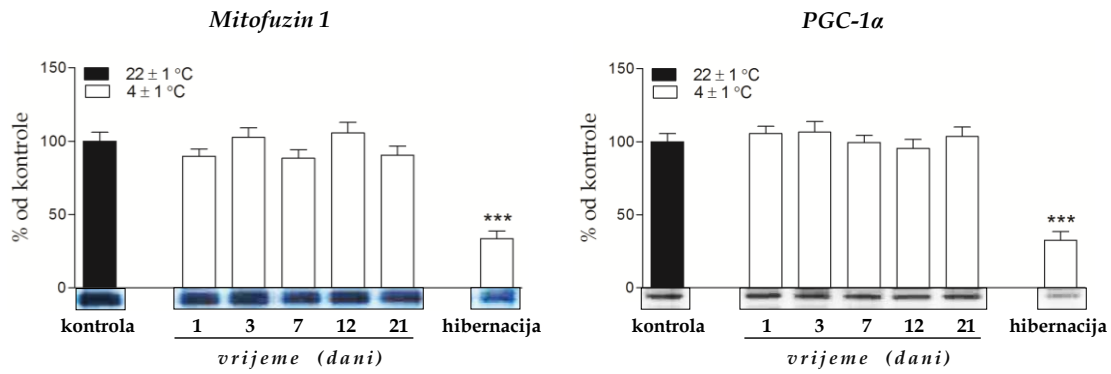


Figura 82. Promjene proteinske ekspresije mitofuzina 1 i transkripcionog ko-aktivatora PGC-1α u jetri tekunica tokom vremenski- ζ avisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; *** $p < 0,001$.

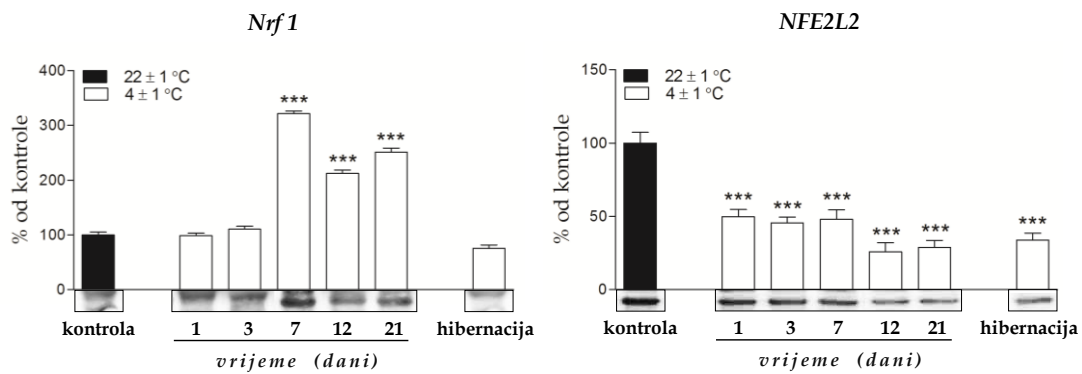


Figura 83. Promjene proteinske ekspresije transkripcionih faktora Nrf1 i NFE2L2 u jetri tekunica tokom vremenski- ζ avisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; *** $p < 0,001$.

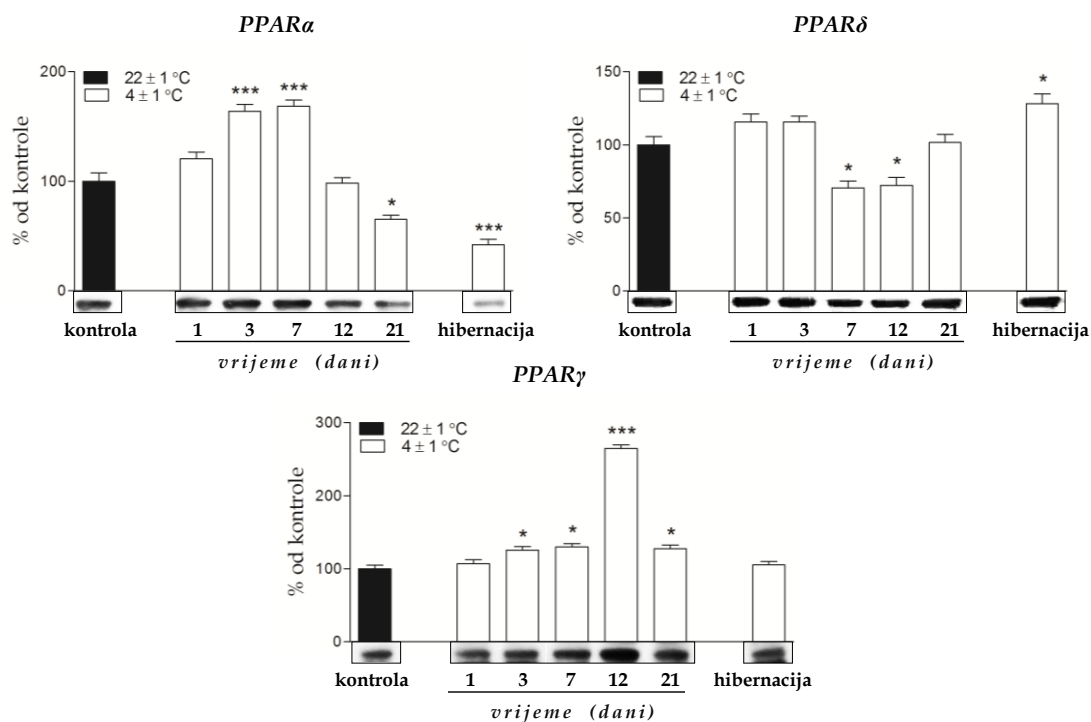


Figura 84. Promjene proteinske ekspresije PPAR α , PPAR δ i PPAR γ izoformi u jetri tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

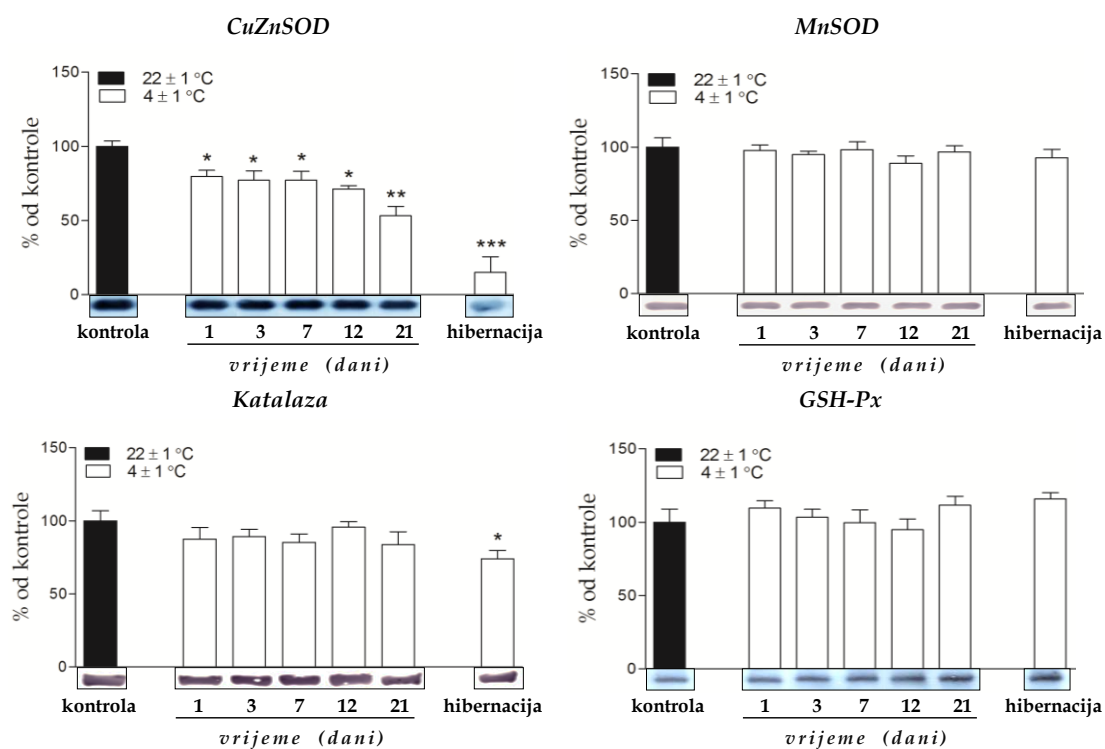


Figura 85. Promjene proteinske ekspresije Cu,Zn i Mn superoksid dismutaze (CuZnSODi MnSOD), katalaze i glutation peroksidaze (GSH-Px) u jetri tekunica tokom vremenski-zavisne aklimacije na hladnoću i u hibernaciji. *poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5. Diskusija

Izlaganje sisara niskim temperaturama aktivira brojne bihevioralne i fiziološke termoregulatorne mehanizme. U izuzetno nepovoljnim uslovima sredine (niska temperatura, smanjena dostupnost hrane...) neke vrste sisara, uključujući i tekunice, odstupaju od homeotermnog stanja, ulazeći u fazu duboke hibernacije koja se karakteriše značajnom supresijom tjelesne temperature i bazalnog metabolizma.

U disertaciji je istipivana molekulska osnova fizioloških (adaptacionih) promjena tokom aklimacije tekunica na nisku temperaturu i u fazi hibernacije u tkivima ključnim za održanje ukupne energetske homeostaze. Rezultati pokazuju da aklimacija na hladnoću vodi karakterističnoj indukciji termogenog programa u BAT i skeletnim mišićima, koji je energetski podržan primarno lipolitičkim dejstvom noradrenalina na visceralne depoe WAT, ali i intenziviranom sintezom lipida u jetri. Hibernacija se karakteriše tkivnom autonomnošću metabolizma, čime je omogućeno normalno funkcionisanje tkiva/organa, a time i organizma u cjelosti, u uslovima smanjene interorganske komunikacije (usled suprimiranja srčanog rada, disanja i perfuzije organa...).

Detektovane molekulske promjene u BAT, skeletnim mišićima, depoima WAT i jetri, kao i uključenost ključnih transkripcionih faktora u metaboličko remodeliranje tokom aklimacije na nisku temperaturu i u fazi hibernacije, biće diskutovani detaljnije u daljem tekstu.

5.1. Molekulsko remodeliranje BAT tokom aklimacije na nisku temperaturu i u fazi hibernacije

Poznato je da izlaganje eutermnih životinja hladnoći (kao i buđenje iz hibernacije) indukuje povećanu produkciju toplote, prvenstveno aktiviranjem nedrhteće termogeneze u BAT (Himms-Hagen, 1976). Međutim, kod hibernirajućih vrsta ostaje otvoreno pitanje da li niska temperatura vodi identičnom regrutovanju i aktiviranju termogene mašinerije u mrkim adipocitima, kao kod nehibernatora, ili pak aktiviranju već postojeće mašinerije koja je regrutovana cirkaanualnim promjenama, s obzirom da mnogi radovi govore u prilog hipotezi da je BAT hibernatora konstantno pripremljen za termogenezu (Turner i sar., 1989; Dicker i sar., 1995; Cannon i sar., 1996). U ovoj disertaciji ispitivani su termogeni i metabolički odgovor BAT kod hibernirajuće vrste *Spermophilus citellus* tokom perioda intenzivne produkcije toplote (aklimacija na hladnoću), kao i u uslovima suprimiranog termogenog programa (hibernacija). Dalje u tekstu biće detaljnije diskutovani funkcioni aspekti odgovora BAT na pomenute uslove.

5.1.1. Termogeni program BAT tekunica tokom izlaganja niskoj temperaturi i u fazi duboke hibernacije

Dobijeni rezultati pokazuju da tokom izlaganja životinja hladnoći dolazi do povećanja *de novo* sinteze ključnog medijatora termogenog odgovora – UCP1, i to kako na nivou ekspresije gena (1-12. dana izlaganja hladnoći) tako i na nivou ekspresije proteina (3-12. dana). Ovo je u saglasnosti sa rezultatima Liu i saradnika (2001) dobijenim na vrsti *Spermophilus dauricus*. Naime, u oba slučaja nije detektovana promjena proteinske ekspresije UCP1 nakon 24h izlaganja hladnoći, dok je u tom periodu njegova genska ekspresija bila značajno povećana. Interesantno je, međutim, da su pomenuti autori pronašli povećanje koncentracije UCP1 (mjereno indirektno, titracijom njegovim specifičnim ligandom [³H]-GTP) kao i održanje povećane genske ekspresije ovog proteina nakon 4 nedelje aklimacije na nisku temperaturu, dok su naši rezultati pokazali da se i proteinska i genska ekspresija UCP1 restituiše na kontrolni nivo 21. dana aklimacije. Ovo može biti posledica promjena koje se dešavaju u BAT tokom perioda pripreme za hibernaciju, a koje se razlikuju od vrste do vrste. Naime, moguće je da restitucija količine UCP1 proteina na kontrolni nivo 21. dana izlaganja hladnoći predstavlja uvod u hipotermiju, tj. hibernaciju. Potvrda tome je detektovano, dodatno smanjenje (ispod kontrolnog nivoa) količine UCP1 proteina u samoj hibernaciji. Međutim, nasuprot proteinskom nivou, interesantno je da se nivo genske ekspresije UCP1 u hibernaciji povećava, što je u saglasnosti sa genomskom studijom Yan i saradnika (2006). Moguće je da se BAT na ovaj način u fazi hibernacije održava u “*stand-by*” modu, kako bi bio spreman da za najkraće moguće vrijeme pokrene termoregulatorne mehanizme i obezbijedi organizmu toplotu neophodnu za buđenje iz hibernacije.

Morfološke promjene, koje se nalaze u osnovi aktiviranja BAT nehibernatora prilikom izlaganja hladnoći uključuju snažnu proliferaciju mrkih adipocita, povećanu vaskularizaciju tkiva i povećanje broja mitohondrija sa pravilno-organizovanim i gusto-pakovanim kristama (Suter, 1969a; 1969b; 1969c; Korać i sar., 2008; Petrović i sar., 2010). Rezultati morfometrijske analize, dobijeni u ovoj studiji, ukazuju da mrki adipociti hibernirajuće vrste *Spermophilus citellus* podliježu specifičnim promjenama, prije hipertrofiji nego hiperplaziji, s obzirom da se tokom aklimacije volumenski udio intersticijuma, u kome se nalaze i preadipociti, smanjuje. U prilog tome ide i činjenica da je detektovano apoptotsko odstranjivanje mrkih adipocita 21. dana izlaganja hladnoći, uz istovremenu detekciju nestin-imunopozitivnih ćelija. Ovo jasno sugerše da je kod BAT tekunica uspostavljen balans između apoptoze i proliferacije mrkih adipocita, u cilju održanja funkcionog kapaciteta bez promjene broja ćelija. Nasuprot ovim promjenama kod

hibernatora, u BAT nehibernirajućih pacova situacija je drugačija. Literaturni podaci pokazuju da tokom izlaganja niskoj temperaturi BAT pacova podliježe intenzivnoj proliferaciji, koja uz suprimirano odstranjivanje ćelija apoptozom, rezultuje značajnim povećanjem broja mrkih adipocita (Suter, 1969a; 1969b; 1969c; Bukowiecki i sar., 1986; Himms-Hagen, 1990; Lindquist i Rehnmark, 1998; Petrović i sar., 2005; 2010). Dakle, izgleda da povećanje mase BAT detektovano kod hibernatora (Liu i sar., 2001) i nehibernatora (Petrović i sar., 2010) predstavlja rezultat različitih morfoloških promjena mrkih adipocita: hipertrofije kod tekunica, odnosno hiperplazije kod pacova. Rezultati u disertaciji ukazuju na još jedan karakterističan odgovor BAT hibernatora (tekunica), a to je približavanje nukleusa periferiji ćelije uz (prividni) gubitak granica među ćelijama, što morfološki izgleda kao „sincicijum“. Moguće je da na taj način mrki adipociti tekunice ostvaruju visoko-koordinisanu metaboličku aktivnost, tj. uspostavljaju neku vrstu „metaboličkih jedinica“. Iako površina profila diferenciranih mrkih adipocita značajno raste već od prvog dana aklimacije na hladnoću, ipak se hipertrofija mrkih adipocita sa aspekta volumenskog udjela u tkivu uočava tek od 12. dana aklimacije na nisku temperaturu. U prilog ovome ide i činjenica da Liu i saradnici (2001) nisu detektovali povećanje mase BAT kod tekunica nakon akutnog izlaganja hladnoći (24h), već tek nakon 4 nedelje aklimacije na nisku temperaturu.

Rezultati ove studije pokazuju da hipertrofija mrkih adipocita tokom produženog izlaganja životinja niskoj temperaturi nije praćena adekvatnom angiogenezom. Ovo može biti specifičan odgovor tekunice prilikom pripreme za fazu hipotermije. Naime, morfometrijska analiza je pokazala da volumenska gustina kapilara raste u ranom periodu (1. i 7. dana) izlaganja hladnoći (povećanje kontaktne površine između ćelija i kapilara, kao i značajna vazodilatacija krvnih sudova sa velikim brojem eritrocita). Međutim, nakon ovog (prolaznog) povećanja prokrvljenosti BAT, dolazi do značajnog smanjenja volumenskog udjela kapilara od 12. dana izlaganja hladnoći, što sa sobom povlači smanjen protok krvi. U saglasnosti sa morfometrijskom studijom su i rezultati proteinske ekspresije VEGF i eNOS, koji pokazuju značajno smanjenje nivoa ovih proteina u periodu kada je volumenska gustina kapilara smanjena (7-21. dan). Nasuprot ovome, u BAT pacova VEGF ekspresija je povećana tokom prve dvije nedelje aklimacije na nisku temperaturu (Petrović i sar., 2010). Sve ovo ukazuje da je vaskularizacija, a time i oksigenacija BAT kod nehibernatora, već nakon nedelju dana po izlaganju niskoj temperaturi, kompromitovana.

Nadalje, ispitivanjem ultrastrukture mitohondrija tokom ciklusa hibernacije jasno je pokazano da su ove organele neobično velike u BAT životinja tokom hibernacije u odnosu na mitohondrije životinja u toku aktivne (ljetnje) sezone (Grodums, 1977; Malatesta i sar., 2001). Snažna indukcija proteinske ekspresije mitofuzina 1 tokom čitavog perioda izlaganja životinja hladnoći, zabilježena u našoj studiji, ukazuje da zapravo u periodu pripreme za hibernaciju dolazi do indukcije ovakvog mitohondrijalnog profila i da je jedan od osnovnih (mada ne i jedini) stimulusa upravo niska temperatura. Suprotno aklimaciji, u hibernaciji dolazi do potpunog gašenja proteinske ekspresije mitofuzina 1, što potvrđuje odavno poznat fenomen (Grodums, 1977) da je nemoguće detektovati proces fuzije mitohondrija u BAT u hibernaciji. Dakle, na osnovu svega izgleda da do fuzije mitohondrija dolazi ranije, u fazi pre-hibernacije. Prisustvo megamitohondrija tokom aklimacije na nisku temperaturu potvrđeno je u ovom radu transmissionom elektronskom mikroskopijom.

Na osnovu navedenog, može se zaključiti da hladnoća indukuje specifične molekulske i morfološke promjene u BAT tekunica (ekspresija UCP1, hipertrofija mrkih adipocita, fuzija mitohondrija). Ove promjene se umnogome razlikuju od pokazanih kod nehibernirajućih vrsta. Moguće je da ovakav sled događaja ne predstavlja put ka potpunom uspostavljanju novog homeostatskog stanja u kom je tkivo adaptirano na nisku temperaturu (što je slučaj kod pacova), već ima za cilj da obezbjedi održanje eutermije do momenta sticanja uslova za ulazak u hibernaciju. U prilog ovoj pretpostavci idu i rezultati ispitivanja inervacije u BAT tokom izlaganja tekunica hladnoći. Naime, poznato je da hladnoća aktivira simpatičku inervaciju BAT, čime se pokreće njegov termogeni odgovor (Suter, 1969a; 1969b; 1969c; Bukowiecki i sar., 1986; Himms-Hagen, 1990; Lindquist i Rehnmark, 1998; Petrović i sar., 2010). Naši rezultati su, međutim, pokazali da značajan nivo inervacije mrkih adipocita već postoji u kontrolnoj grupi tekunica, da se blago povećava u ranom periodu aklimacije, a potom vraća na kontrolni nivo. Vizuelno povećanje inervacije se ogleda prvenstveno u detekciji većeg broja direktnih „*en passant*“ konekcija nervnih vlakana sa mrkim adipocitima 1-3. dana aklimacije, dok je indirektna inervacija ovih ćelija preko krvnih sudova vidljiva kod svih grupa, uključujući i kontrolnu. Naši rezultati su u saglasnosti sa studijama koje govore o konstantnoj (Turner i sar., 1989; Dicker i sar., 1995; Cannon i sar., 1996) ili bar cirkaanualno-vođenoj aktivaciji BAT. Očigledno je da se molekulske i morfološke promjene pokazane u BAT tekunica, mogu posmatrati i kao evolutivno konzerviran odgovor termoregulatornog organa na nisku temperaturu.

5.1.2. Metaboličko remodeliranje BAT pacova tokom aklimacije na nisku temperaturu

Inicijacija neodrhteće termogeneze kod nehibernirajućih životinja koincidira sa nepotpunom regrutacijom komponenti elektron-transportnog lanca, uz istovremeni pad proteinskog sadržaja ATP sintaze, što za posledicu ima kompromitovan energetska balans u ćeliji rezultujući u adaptivnoj aktivaciji AMPK. Ovaj disbalans ne traje dugo i već posle 1. dana izlaganja hladnoći nivo aktivne forme AMPK se vraća na kontrolni nivo (Vučetić i sar., 2011), što ukazuje da je ovaj ključni senzor energetskog balansa u ćeliji aktivirao puteve produkcije energije koji nadomješćuju trenutni energetski deficit (Fogarty i Hardie, 2010). I zaista, naši rezultati su pokazali smanjenje lipidnih rezervi u BAT već prvog dana izlaganja hladnoći. U saglasnosti sa tim su i rezultati Cameron i Smith (1964) koji su takođe detektovali brzo pražnjenje lipidnih rezervi BAT (za manje od 24h od momenta izlaganja hladnoći). Nasuprot tome, pretpostavka o korišćenju šećera kao izvora energije čini se da je u neslaganju sa našim rezultatima ekspresije enzima glikolitičkog puta (heksokinaza i GAPDH), koji su značajno smanjeni 1. dana izlaganja hladnoći. Međutim, ovo svakako ne mora da znači i smanjenje fluksa kroz glikolitički put. Naime, smanjenje nivoa heksokinaze se može pripisati korišćenju glukoze porijeklom iz rezervi glikogena (u formi glukozo-1-fosfata), čime se ostvaruje *bypass* heksokinazne reakcije. U prilog tome idu i rezultati smanjenja glikogenskih rezervi u BAT tokom ovog ranog perioda aklimacije na hladnoću. Takođe, detektovano smanjenje nivoa GAPDH, ključnog enzima za produkciju lipogenih supstrata tokom glikolize (Cameron i Smith, 1964; Spiegelman i Green, 1980; Rolland i sar., 1995), zapravo može ukazivati na smanjenu stopu konverzije glukoze u lipide. Ovo je u saglasnosti sa funkcijom AMPK u inhibiciji svih puteva potrošnje ATP, uključujući lipogenezu (Fogarty i Hardie, 2010).

Prvog dana izlaganja pacova niskoj temperaturi, pored aktivacije AMPK (Vučetić i sar., 2011), dolazi i do povećanja količine HIF-1 α proteina, koja ostaje povišena tokom rane faze aklimacije (7 dana). Ovo može djelovati iznenađujuće s obzirom na ranije pokazanu indukciju ekspresije VEGF u BAT pacova (Petrović i sar., 2010). Međutim, raniji radovi su pokazali da u BAT noradrenalin indukuje povećanu gensku ekspresiju HIF-1 α (Nikami i sar., 2005), što može voditi prividno povećanoj akumulaciji HIF-1 α i u normoksičnim uslovima. Ovaj transkripcioni faktor, kao i AMPK prvenstveno indukuje puteve produkcije energije, u prvom redu glikolizu (Brahimi-Horn i sar., 2011), međutim, indukuje i sintezu glikogena i lipida, ali samo u uslovima značajne dostupnosti glukoze, tj. uslovima koji ne aktiviraju AMPK (Krishnan i sar., 2009; Pescador i sar., 2010). Na osnovu toga se može

zaključiti da u periodu restituisanog nivoa AMPK i povećanog nivoa HIF-1 α dolazi do usklađivanja metaboličke funkcije BAT i restitucije njegovih energetske rezervi. Ovo je potvrđeno povećanjem proteinskog nivoa FAS, kao i restitucijom nivoa lipida i glikogena počevši od 3. dana izlaganja hladnoći. Sa druge strane, u prilog HIF-vođenoj „glikolitičkoj strategiji” ide snažna indukcija aktivnosti LDH tokom čitavog perioda aklimacije na nisku temperaturu.

Nakon ranog perioda aklimacije (od 12. dana), dolazi do restitucije HIF-1 α nivoa u BAT pacova, što koincidira sa uspostavljanjem homeostatskog nivoa metaboličkih enzima, koji se ne mijenja značajno do kraja ispitivanog perioda. Ovde je važno naglasiti da naši rezultati sugerišu simultanu aktivnost β -oksidacije i lipogeneze tokom produženog perioda na hladnoći, što je u saglasnosti sa ranijim studijama koje su ukazale na mogućnost paralelnog odvijanja ova dva fiziološki suprotna procesa u BAT pacova (Buckley i Rath, 1987; Yu i sar., 2002). Glukoza se smatra glavnim prekursorom za sintezu masnih kiselina u WAT (Hems i sar., 1975; McCormack, 1982), a to može biti slučaj i u BAT. U prilog ovom stanovištu govore i prethodne studije koje su pokazale insulin-zavisno i/ili insulin-nezavisno povećanje preuzimanja glukoze od strane BAT (Cooney i sar., 1985; Ferre i sar., 1986; Ma i Foster, 1986). Povećanje GAPDH zabilježeno u ovoj studiji, kao i povećana količina lipidnih rezervi detektovana elektronskom mikroskopijom, ukazuju da se lipidne rezerve zaista obnavljaju u kasnoj fazi aklimacije na hladnoću.

Može se zaključiti da energetske metabolizam BAT, kod nehibernirajućih vrsta, u ranom periodu izlaganja hladnoći (prva nedelja) prolazi kroz turbulentnu fazu, koja je strogo regulisana i pažljivo vođena vremenski-zavisnim promjenama u aktivnosti AMPK i HIF-1. Ove promjene obezbijavaju postepenu indukciju termogene mašinerije i održanje novo-uspostavljene strukture i funkcije BAT tokom produženog izlaganja pacova hladnoći.

5.1.3. Metaboličko remodeliranje BAT tekunica tokom aklimacije na nisku temperaturu

Malo je studija koje su ispitivale energetske ili metabolizam uopšte u BAT kod hibernirajućih vrsta tokom izlaganja niskoj temperaturi. Problem je utoliko kompleksniji jer metabolički odgovor nije isti kod različitih vrsta hibernatora.

Naši rezultati ispitivanja proteinske ekspresije ključnih metaboličkih enzima BAT tekunica *Spermophilus citellus*, uopšteno, pokazuju iznenađujuću indiferentnost na promjene temperaturnih uslova sredine. Naime i pored značajnog povećanja ekspresije UCP1 (3, 7. i 12. dana) – glavnog faktora rasipanja energije u BAT; ekspresija enzima ključnih puteva

produkcije energije: β -oksidacije, Krebsovog ciklusa i OXPHOS; generalno je nepromjenjena. Ovi rezultati koincidiraju sa značajnim povećanjem aktivnosti AMPK zaključno sa 12. danom izlaganja hladnoći. Sve ovo ukazuje da mrki adipociti kod hibernirajućih vrsta i pored povećane potrebe za energijom tokom izlaganja hladnoći, ne aktiviraju kompenzatorne mehanizme kako bi se izborili sa energetske deficitom; kao što to, nasuprot njima, čine mrki adipociti nehibernirajućih životinja (Vučetić i sar., 2011). Slično ovome, ranije studije su pokazale da izlaganje hibernirajućih životinja hladnoći i pored značajnog povećanja UCP1 sadržaja (Sundin i sar., 1987; Dicker i sar., 1995; Liu i sar., 2001), gotovo da nema efekta na promjene u bazalnom metabolizmu životinje (Pohl, 1965; Hissa i Hirsimaki, 1971; Tomasi i Horwitz, 1987; Dicker i sar., 1995). Čak i u slučajevima kada je zabilježeno intenziviranje metabolizma, naglašeno je da se radi o povećanju male magnitude (Dicker i sar., 1995). I pored svega ovoga, svakako se ne smije potpuno izostaviti mogućnost povećanja fluksa kroz respiratorni lanac, bez obzira što se njegov kapacitet, sudeći prema našim rezultatima, ne mijenja.

Ranije studije su pokazale da u BAT tokom izlaganja hladnoći dolazi do snažne (~85%) supresije aktivnosti enzima oksidacije masnih kiselina i to kako one u mitohondrijama (ACADM), tako i u peroksizomima (acil-CoA oksidaza, AOX) (Kabine i sar., 2003). U prilog ovome govore i naši rezultati nepromjenjene proteinske i suprimirane genske ekspresije ACADM tokom čitavog ispitivanog perioda aklimacije na nisku temperaturu. Takođe, nepromjenjena genska ekspresija *Hsl* i suprimirana genska ekspresija *Fabp4*, odgovornog za transport masnih kiselina između unutarćelijskih kompartmenata (Hotamisligil i sar., 1996; Coe i sar., 1999), sugerišu očuvanje lipidnih rezervi u mrkim adipocitima. Ovakvi rezultati bi mogli izgledati kontradiktorno, ukoliko se uzme u obzir da su masne kiseline glavni izvor elektrona za elektron-transportni lanac, a time i elektro-hemijski gradijent koji UCP1 koristi za produkciju toplote. Jedno od objašnjenja koje se logično nameće i koje je ranije predloženo (Kabine i sar., 2003) jeste da se na ovakav način obezbijeduje čuvanje lipidnih rezervi za kasnije korišćenje u hibernaciji ili pak za podršku termogenog odgovora tokom buđenja životinje iz hibernacije. Ovdje se ogleda možda jedna od ključnih razlika između termogenog odgovora mrkih adipocita tokom aklimacije na hladnoću, kod hibernirajućih i nehibernirajućih vrsta. Naime, prethodne studije (Nedergaard i sar., 1980) su pokazale značajno intenziviranje oksidacije masnih kiselina kod pacova, koja im, pored ostalog, omogućava i održanje energetskeg balansa, što se vidi iz rezultata normalizacije nivoa fosfo-AMPK u BAT pacova na kontrolni ili čak smanjenja

ispod kontrolnog nivoa već posle jednog dana izlaganja hladnoći (Vučetić i sar., 2011). Nasuprot tome, naši rezultati su pokazali da kod tekunica nivo fosfo-AMPK ostaje povišen tokom prve dvije nedelje izlaganja hladnoći, jasno sugerišući da mrki adipociti u tom periodu egzistiraju u uslovima energetske deficita, vjerovatno usled „ustupanja“ najvećeg dijela proton-pokretačke sile UCP1, odnosno produkciji toplote.

Interesantno je, međutim, da su neke studije, rađene prvenstveno na hrčcima pokazale povećanje mitohondrijalnog udjela u ukupnom metabolizmu BAT tokom izlaganja hladnoći (Pospisilova i Jansky, 1976; Ricquier i sar., 1985; Trayhurn i sar., 1983; Klingenspor i sar., 1996). Međutim, one su se prvenstveno bazirale na aktivnosti i ekspresiji citohrom *c* oksidazne komponente elektron-transportnog lanca, čija se ekspresija prema našim rezultatima zaista statistički značajno povećava tokom prve dvije nedelje aklimacije na nisku temperaturu. Međutim, ovakav profil promjena nije primjećen ni kod jedne druge komponente OXPHOS, uključujući i ATP sintazu. Stoga se teško može govoriti o povećanju kapaciteta mitohondrija BAT za produkciju energije tokom izlaganja tekunica niskoj temperaturi. U prilog tome govori i nepromjenjen nivo SCAS – enzima Krebsovog ciklusa, ali i snažno indukovana proteinska i genska ekspresija PDK4, enzima koji fosforiliše i inaktivira PDH kompleks, zaustavljajući dalju oksidaciju piruvata nastalog iz glukoze, tj. onemogućavajući njenu kompletnu oksidaciju u mitohondrijama do CO₂ i H₂O.

Nasuprot tome, rezultati su pokazali da niska temperatura kod eutermnih tekunica indukuje proteinsku ekspresiju M subjedinice LDH, kao i enzima koji promovišu razgradnju glikogena: PYG i GSK, dok proteinska ekspresija GAPDH i LDH H i genska ekspersija *heksokinaze*, *Pfk* i *Ldb B* ostaju nepromjenjene ili pak blago smanjene. Povećanje količine M subjedinice LDH bi se moglo posmatrati sa aspekta kompenzatornog odgovora na energetske izazove u mrkim adipocitima tokom aklimacije na hladnoću. Sa druge strane, Buck i saradnici (2002) su pokazali da u toku perioda pre-hibernacije (septembar-oktobar) nivo insulina u serumu tekunica raste i do ~4 puta. Poznato je da je povećanje bazalnog nivoa insulina od ~2 puta često asocirano sa insulinskom rezistencijom, što implicira da dramatično povećanje serumskog insulina kod tekunica jeste asocirano sa smanjenom insulinskom senzitivnošću adipocita u preparativnoj fazi za hibernaciju, što opet u krajnjoj instanci može biti faktor koji omogućava hiperfagiju životinje u ovoj fazi pripreme za hibernaciju (Wu i sar., 2013). U prilog ovoj hipotezi govore i rezultati studije na hibernirajućim ježevima, čiji adipociti pokazuju rezistentnost na insulin pri niskim temperaturama (Hoo-Paris i sar., 1978). U skladu sa tim povećanje proteinske ekspresije

GSK i PYG, zabilježeno u ovom radu, ide u prilog stanovištu da se životinja u ovoj fazi ciklusa hibernacije nalazi u stanju insulinske neosjetljivosti, te da i pored kontinuiranog unosa hrane i normalne raspoloživosti glukoze, u insulin-zavisnom BAT dolazi do povlačenja glikogenskih rezervi. I ne samo to, u ovoj studiji je zabilježeno da je tokom čitavog perioda izlaganja hladnoći nivo mRNA za *Pck* snažno povećan, što ukazuje da se glukoza neprestano regeneriše i ponovo koristi kao glavni izvor energije, vjerovatno kao fiziološki način da se masne kiseline u BAT sačuvaju za kasnije korišćenje tokom hibernacije i prilikom buđenja iz hibernacije.

Već je diskutovano o rezultatima koji ukazuju da mrki adipociti podliježu hipertrofiji, koja nije praćena adekvatnom angiogenezom u periodu od 12-21. dana aklimacije, što gotovo savršeno koincidira sa smanjenjem proteinske ekspresije ključnih faktora vaskularizacije – VEGF i eNOS. Ukazano je i da ove promjene mogu voditi ka kompromitovanoj vaskularizaciji, a time i oksigenaciji tkiva. Naši rezultati su potvrdili da upravo u ovom periodu (21. dan) dolazi do indukcije HIF-1 α , ključnog senzora oksigenacije tkiva. Štaviše, u ovom periodu dolazi i do suprimiranja genske ekspresije komponenti OXPHOS koje su ranije tokom aklimacije bile povećane: *kompleks I*, *kompleks IV* i *ATP sintaza*; ali i proteinske ekspresije kompleksa IV i enzima Krebsovog ciklusa – SCAS. Sve ovo je u saglasnosti sa smanjenim oksidativnim kapacitetom BAT tokom produženog boravka tekunica na niskoj temperaturi. Posebno je interesantno da 21. dana izlaganja hladnoći dolazi do ponovnog uspostavljanja energetske homeostaze (AMPK nivo je ispod kontrolnog), paralelno sa vraćanjem nivoa UCP1 proteina na kontrolni nivo. Logično se nameće pitanje – da li ovakav metabolički obrazac ukazuje na molekulske pripreme BAT za hipotermiju/hipometabolizam, tj. fazu hibernacije?

5.1.4. Metaboličko remodeliranje BAT tekunica u fazi hibernacije

Rezultati naše studije su pokazali da u toku faze hibernacije dolazi do smanjenja kapaciteta mitohondrija kako za produkciju toplote, tako i za sintezu ATP. Naime, pored smanjenja proteinske ekspresije UCP1, detektovano je i smanjenje proteinske ekspresije gotovo svih komponenti OXPHOS (kompleks II, III, citohrom *c* i ATP sintaze). Čak i nivo citohrom *c* oksidaze, koji je tokom gotovo čitavog perioda aklimacije bio povećan, u fazi hibernacije je na kontrolnom nivou. Rezultati su u saglasnosti sa ranije detektovanim smanjenjem potrošnje kiseonika u BAT tekunica tokom faze hibernacije (Liu i sar., 1969). Takođe, ispitivanjem mitohondrija na ultrastrukturnom nivou, Grodums (1977) je

detektovao krupne mitohondrije kod hibernirajuće vrste *Spermophilus lateralis*, ističući da je njihova unutrašnja struktura kompleksna, sa tubularnim kristama koje formiraju spirale, petlje i brojne interkonekcije, dajući privid kontinualne mreže. Ovakva ultrastruktura mitohondrija se razlikuje od strukture aktivnih mitohondrija BAT kod nehibernirajućih pacova, koje imaju gusto pakovane i pravilno, paralelno postavljene kriste (Suter, 1969a; 1969b; 1969c; Petrović i sar., 2010).

Osim komponenti OXPHOS, u toku hibernacije značajna supresija je detektovana i na nivou protinske ekspresije enzima Krebsovog ciklusa – SCAS, enzima β -oksidacije – ACADM, dok je proteinska ekspresija PDK4 značajno povećana. Zajedno, ovi rezultati ukazuju da u mrkim adipocitima vrste *Spermophilus citellus* tokom faze duboke hibernacije dolazi do supresije ukupnog oksidativnog metabolizma. Jedan od mogućih razloga za to može biti (još uvijek) nedovoljna oksigenacija tkiva. Naime i pored toga što rezultati pokazuju da se volumenska gustina mrkih adipocita i kapilara u ovoj fazi vraća na kontrolni nivo, održanje povećanog nivoa α subjedinice HIF-1 ukazuje na kompromitovanu oksigenaciju ćelija BAT. Identičan rezultat je dobijen i na vrsti *Spermophilus tridecemlineatus* (Morin i Storey, 2005). Takođe, s obzirom da u oba slučaja nije detektovana povećana genska ekspresija *Hif-1a*, očigledno je da se ne može govoriti o prividnom povećanju količine ovog proteina usled stimulacije njegove genske ekspresije, kao što je to slučaj kod pacova pri aklimaciji na hladnoću (Nikami i sar., 2005). Dakle, može se reći da se mrki adipociti u toku hibernacije nalaze u stanju hipoksije. Sudeći prema adipocitnom profilu vidi se da su mrki adipociti znatno krupniji od onih u BAT kontrolne grupe. I pored toga što se volumenska zastupljenost mrkih adipocita i kapilara vraća na kontrolni nivo, ipak ovim znatno krupnijim ćelijama izgleda da je smanjena dostupnost kiseoniku; kako zbog veličine, tako i karakteristične supresije vitalnih funkcija u hibernaciji: perfuzije organa, rada srca i disanja uz duge periode apnee (Storey, 2010). Ovo korelira i sa rezultatima smanjene ekspresije VEGF i eNOS, ključnih regulatora povećanja dotoka krvi do tkiva putem angiogeneze i/ili vazodilatacije.

Kao transkripcioni faktor, HIF-1 odgovara na smanjenu dostupnost kiseonika prvenstveno stimulacijom ekspresije gena čiji su proteinski produkti uključeni u produkciju ATP glikolizom (LaManna i sar., 2004). U saglasnosti sa tim je i u ovoj studiji detektovano povećanje proteinske ekspresije H subjedinice LDH i PDK4, kao i genske ekspresije *heksokinaze* i *Pfk*. Takođe, treba napomenuti da se u ovim uslovima proteinska ekspresija GSK3 i PYG vraća na kontrolni nivo, što može ukazivati na korišćenje cirkulišuće glukoze,

a ne uskladištenih glikogenskih rezervi. U skladu sa tim je i nepromjenjena količina glikogena u BAT tokom faze torpora (Galster i Morison, 1970). Iako do danas gotovo da ne postoje studije o glukoznom transportnom sistemu kod hibernirajućih tekunica, Buck i saradnici (2002) su pokazali da u toku faze duboke hibernacije dolazi do reverzibilnih promjena koje vode ponovnom uspostavljanju insulinske senzitivnosti, što je praćeno normalizacijom nivoa insulina u serumu. Ovo jasno ukazuje da detektovano povećanje GSK i PYG tokom aklimacije na hladnoću može predstavljati kompenzatorni mehanizam mrkih adipocita na smanjenu dostupnost cirkulišuće glukoze, kako bi opstali u uslovima insulinske rezistencije. Sa druge strane, u fazi duboke hibernacije kada se nivo insulina vraća na kontrolni, tj. kada se ponovo uspostavlja insulinska senzitivnost, potrebe za povećanim kapacitetom korišćenja glikogenih rezervi se smanjuju, time vodeći restituciji nivoa GSK i PYBG.

Ovakve promjene ukazuju na glikolitičku strategiju u BAT hibernirajućih životinja, što može biti iznenađujuće imajući u vidu da literaturni podaci govore o principijelnom korišćenju masnih kiselina kao goriva u većini tkiva hibernirajućih životinja tokom faze duboke hibernacije (revija Carey i sar., 2003). Međutim i pored velikog broja opsežnih genomskih studija (Fahlman i sar., 2000; Hittel i Storey, 2002; Williams i sar., 2005; 2011; Eddy i sar., 2006; Yan i sar., 2006; 2008; Morin i Storey, 2009) na BAT tekunica i drugih hibernirajućih vrsta, rezultati su u velikoj mjeri nekonzistentni. Takođe, čak i autori koji su dobili slaganje mRNA nivoa metaboličkih enzima sa hipotezom o prelazu sa glukoznog na lipidni metabolizam, jasno su se ogradili od stava da ti rezultati ukazuju da je energetska metabolizam BAT tokom hibernacije primarno (i jedino) zasnovan na lipidima (Williams i sar., 2011), s obzirom da nivo mRNA objašnjava svega ~40% varijacija u nivou proteinske ekspresije (Shao i sar., 2010). U prilog toj činjenici govore i naši rezultati genske i proteinske ekspresije brojnih enzima (npr. H subjedinična LDH i PDK4), koji u najvećem broju slučajeva pokazuju neslaganje tokom faze hibernacije. Imajući u vidu važnost očuvanja energetskog balansa u uslovima globalne metaboličke supresije, kao i činjenicu da je translacija izuzetno energetski „skup“ proces (troši čak 3 puta više ćelijskog ATP od transkripcije; Rolfe i Brown, 1997); može se reći da proteinski nivo pojedinačnih metaboličkih enzima vjerodostojnije odražava potrebe ćelije u fazi duboke hibernacije od njihove genske ekspresije. Takođe, rezultati disertacije su pokazali da se indukcija glikolitičke strategije u fazi hibernacije može posmatrati i sa aspekta obezbjeđivanja

lipogenih supstrata, s obzirom na detektovano povećanje proteinske ekspresije FAS u uslovima hibernacije.

Glukozni metabolizam mrkih adipocita u fazi hibernacije ima opšti i metabolički značaj, a njegova regulacija je spregnuta sa ekspresijom HIF-1 α . HIF-1 jeste ključni regulator ćelijske adaptacije i preživljavanja u uslovima u kojima se nivo O₂ kreće od normoksičnih (~21%) do hipoksičnih (~1%) vrijednosti (Wang i sar., 1995; Semenza, 1998). Međutim, njegova indukcija ne mora da znači dramatično smanjenje ćelijskog nivoa O₂, već ga i manje promjene koncentracije O₂ mogu aktivirati. Tako su Chavez i LaManna (2002) detektovali povećanje akumulacije HIF-1 α već pri koncentracijama O₂ od ~15%. Njegova aktivacija svakako vodi supresiji ćelijske potrošnje kiseonika, tj. oksidativnog metabolizma, što je u skladu sa našim rezultatima smanjenog kapaciteta OXPHOS u BAT u fazi hibernacije. Sa druge strane, literaturni podaci ukazuju da se aktivnost ključnih enzima oksidacije masnih kiselina u mitohondrijama i peroksizomima (ACADM i AOX) BAT kod vrste *Jaculus orientalis* povećava u hibernaciji (Kabine i sar., 2003; 2004). Rezultati naše studije, međutim, nisu pokazali slaganje sa ovim nalazima s obzirom da je detektovano smanjenje proteinske ekspresije ACADM i OXPHOS komponenti. Međutim, to neophodno ne mora da znači i da je fluks oksidacije masnih kiselina suprimiran (koji je glavni „snadbijevač“ elektron-transportnog lanca). U prilog hipotezi da kod hibernirajućih tekunica u BAT dolazi do korišćenja lipidnih rezervi svjedoči rezultat povećane genske ekspresije *Hsl*. Do istog rezultata su došli i Yan i saradnici (2006). Takođe, kod tekunica u hibernaciji dolazi do snažne indukcije ekspresije transportnog proteina - *Fabp4*, koji je odgovoran za unutarćelijski transport masnih kiselina, prvenstveno od mjesta njihovog skladištenja do mjesta njihove oksidacije (Hittel i Storey, 2001). Osim toga, povećana je i proteinska ekspresija karnitin acil-transferaze-1 β , enzima od koga zavisi brzina β -oksidacije (Eddy i sar., 2006). U prilog povećanoj, ali nekompletnoj, oksidaciji masnih kiselina tokom hibernacije govori i studija Bernson i Nicholls (1974) koji su na izolovanim mrkim adipocitima hrčka došli do rezultata da je acetat dominantan produkt oksidacije masnih kiselina pri niskim temperaturama (koje odgovaraju temperaturi tijela hibernatora u toku faze letargije). Ovi autori ističu visoku temperaturnu osjetljivost enzima Krebsovog ciklusa (protok se smanjuje 10 puta sa sniženjem temperature sa 37 na 10 °C). Moguće fiziološko objašnjenje za ovaj fenomen još uvijek nije jasno, ali može ukazivati na važnost produkcije acetata uz smanjeno (ali kontinuirano) snabdijevanje elektron-transportnog lanca gorivom (jer je smanjena i potreba za produkcijom toplote). Iako bi, na prvi pogled, moglo da djeluje

kontradiktorno simultano odvijanje razgradnje i sinteze lipida, ovakva metabolička strategija je karakteristična za mrke adipocite prilikom izlaganja životinja hladnoći (Buckley i Rath, 1987; Yu i sar., 2002; Vučetić i sar., 2010).

5.1.5. Antioksidativna odbrana u BAT hibernatora tokom izlaganja hladnoći i u fazi hibernacije

Povećanje proteinske ekspresije mitohondrijalne izoforme SOD (MnSOD) tokom čitavog perioda izlaganja hladnoći ukazuje na mogućnost povećanja fluksa kroz respiratorni lanac i pored nepromjenjene ekspresije njegovih komponenti (Williamson, 1970). Ipak, drastično povećanje proteinske ekspresije MnSOD u BAT tekunica tokom energetski-zahtijevnog perioda, može ukazivati i na potrebu mrkih adipocita da zaštite svoje biomolekule od eventualnih oštećenja prije ulaska životinje u fazu duboke hibernacije. Sa druge strane, indukcija proteinske ekspresije CuZnSOD od 12. dana aklimacije na hladnoću interesantna je sa aspekta već pokazanog dvofaznog termogenog i metaboličkog odgovora BAT tokom izlaganja životinje hladnoći. Tako i ovo povećanje citoplazmatske izoforme SOD može biti jedan od molekulskih markera pripreme životinja za ulazak u hibernaciju. Takođe, jedan od mogućih razloga indukcije SODs leži i u činjenici da je u ovom periodu u BAT snažno indukovana ekspresija NFE2L2. Naime ovaj transkripcioni faktor ima važnu ulogu i u regulaciji antioksidativne odbrane. Dobro poznati geni koji odgovaraju na NFE2L2-indukciju između ostalih su upravo i SODs (Park i Rho, 2002).

Naši rezultati su pokazali da u hibernaciji mrki adipociti povećavaju proteinsku ekspresiju obje izoforme SOD, ali i katalaze, dok se proteinski nivo i mRNA sadržaj GSH-Px blago smanjuje. Ovo je u saglasnosti sa našim ranijim rezultatima koji se odnose na aktivnost ovih enzima (Buzadžić i sar., 1990). Održanje ekspresije/aktivnosti obje izoforme SOD, kao što je to slučaj i pri (produženom) izlaganju niskoj temperaturi potvrđuje hipotezu o pripremi životinja za uslove hipotermije na molekulskom nivou. Takođe, povećana ekspresija/aktivnost SOD2 i katalaze u saglasnosti je i sa ranije istaknutim povećanjem mitohondrijalne, odnosno peroksizomalne oksidacije masnih kiselina (Kabine i sar., 2003; Eddy i sar., 2006), kao i našim rezultatima mobilizacije lipidnih rezervi (povećana genska ekspresija *Hsl* i transportnog proteina – *Fabp4*). Ono što iznenađuje jeste suprimiran odgovor GSH-Px, koja ima prvenstveno ulogu u uklanjanju H₂O₂. Međutim, skorašnja studija Morin i saradnika (2008) je pokazala da u mrkim adipocitima hibernirajućih tekunica dolazi do snažne indukcije genske i proteinske ekspresije peroksiredoksina, grupe antioksidanata koji uklanjaju širok spektar hidroperoksida, koristeći tioredoksin kao donor

elektrona (Hofmann i sar., 2002; Rhee i sar., 2005). Stoga, moguće je da peroksiredoksini preuzimaju ulogu GSH-Px.

Aklimacija na nisku temperaturu, vjerovatno preko NFE2L2 transkripcionog regulatora, vodi indukciji ekspresije enzima antioksidativne odbrane, prvenstveno radi zaštite svojih biomolekula od oštećenja pred nastupajuću fazu hibernacije, ali isto tako i kao vid molekulske pripreme za ovu hipotermično-hipometaboličku fazu. U prilog tome ide i održavanje većeg proteinskog sadržaja/aktivnosti ovih enzima i tokom hibernacije. Njihova povećana ekspresija je spregnuta kako sa metaboličkim remodeliranjem tkiva, tako i sa neophodnošću prevencije oksidativnih oštećenja, čiji energetska zahtijevni mehanizmi reparacije nisu poželjni u uslovima globalne metaboličke supresije.

5.1.6. Transkripciona kontrola termogenog i metaboličkog odgovora BAT hibernatora tokom izlaganja hladnoći i u fazi hibernacije

Do sada je jasno pokazano da PPAR γ ima značajnu ulogu u transkripcionoj regulaciji termogenog odgovora nehibernatora (Puigserver i sar., 1998; Seale i sar., 2007; Kajimura i sar., 2009; Petrović i sar., 2010). Ovaj transkripcioni faktor, *per se*, ima ulogu u generisanju adipogenog fenotipa koji je karakterističan i za BAT i za WAT (Barak i sar., 1999). Međutim u saradnji sa transkripcionim ko-regulatorima, poput PGC-1 α , PPAR γ indukuje BAT-specifični program, povećanjem ekspresije UCP1 i biogeneze mitohondrija (Puigserver i sar., 1998; Seale i sar., 2007; Kajimura i sar., 2009; Petrović i sar., 2010). S obzirom da smo u studiji detektovali značajno povećanje genske i proteinske ekspresije UCP1 u periodu do 12. dana aklimacije, logično je očekivati sličan ekspresioni profil i ovih transkripcionih faktora. Međutim, proteinska količina PPAR γ i PGC-1 α je bila gotovo nepromjenjena tokom ovog ranog perioda izlaganja niskoj temperaturi. Ovakvi rezultati su ponovo nametnuli pitanje sa početka – da li su hibernirajuće životinje konstantno (ili cirkaanualno) pripremljene za hibernaciju, te niska temperatura samo aktivira već postojeće mehanizme? Rezultati do kojih smo došli podrška su takvom stanovištu, s obzirom da već od 12. dana izlaganja niskoj temperaturi kada se nivo PGC-1 α smanjuje ispod kontrolnog, genska i proteinska ekspresija UCP1 opada, prateći ovaj trend.

Osim značajne kontrolne uloge PPARs u termogenom odgovoru BAT, pokazano je da ovi transkripcioni aktivatori imaju uticaj i na metaboličko remodeliranje BAT, koje prati njegove energetske zahtjeve (Puigserver i sar., 1998; Scarpulla, 2008). Međutim, pored PPARs, značajnu ulogu u kontroli metabolizma imaju i Nrf transkripcioni regulatori. Ključnu funkciju u orkestriranju aktivnosti pomenutih transkripcionih regulatora ima PGC

familija transkripcionih koaktivatora (revija Ventura-Clapier i sar., 2008). U prilog tome govore i naši rezultati, koji su pokazali potpuno poklapanje proteinske ekspresije PGC-1 α sa PPAR α , PPAR δ , ali i Nrf1. Izuzetak je bio PPAR γ , čiji se proteinski sadržaj nije umnogome mijenjao, što može biti posledica kontinuirane pripremljenosti BAT hibernatora na temperaturni izazov. Nasuprot tome, izgleda da ostali faktori koji su uključeni u transkripcionu regulaciju metaboličkog odgovora tkiva, prate onaj isti šablon promjena, pokazan kod metaboličkih enzima. Tako je u prve dvije nedelje aklimacije na nisku temperaturu, proteinska ekspresija PPAR α , PPAR δ i PGC-1 α nepromjenjena, nakon čega dolazi do njihove sinhronizovane supresije, što se održava i u hibernaciji. Kod Nrf1 je situacija malo drugačija, te je njihov proteinski nivo povećan tokom čitavog perioda aklimacije na hladnoću, a suprimira se tek po ulasku životinje u fazu duboke hibernacije.

Imajući u vidu da PPARs aktivno stimulišu proces oksidacije masnih kiselina, aktivirajući ekspresiju proteina koji ih transportuju i enzima β -oksidacije (Finck i Kelly, 2007), razumljivo je što genska/proteinska ekspresija ACADM i *Fabp4*, detektovana u ovoj studiji prati sličan obrazac promjena, kao i PPARs. Na ovaj način se vjerovatno mrki adipociti „štite” od prekomjerne oksidacije masnih kiselina u periodu izlaganja hladnoći. Sa druge strane, efekat Nrf na metabolički program se ogleda prvenstveno u stimulaciji mitohondrijalne respiracije i biogeneze. Interesantno je da povećana ekspresija ovih transkripcionih regulatora u toku čitavog perioda izlaganja hladnoći, korelira sa povećanom ekspresijom mitofuzina 1 i genskom ekspresijom nukleusno kodiranih komponenti OXPHOS, ali ne i sa njihovom proteinskom ekspresijom. Kako je već naznačeno, BAT u periodu izlaganja niskoj temperaturi teži da sačuva svoje lipidne rezerve održavajući nivo respiracije na kontrolnom ili blago povišenom nivou, ali tom prilikom postajući podložan energetskom disbalansu usled kontinuiranog rasipanja energije od strane UCP1. Dakle, povećanje ekspresije Nrf1 bi se u svakom slučaju moglo posmatrati kao kompenzatorni odgovor BAT na energetske depleciju. U prilog tome idu i radovi koji su pokazali da dugotrajna aktivacija AMPK vodi indukciji mitohondrijalne biogeneze upravo preko PGC-1 α i Nrf (Bergeron i sar., 2001). Međutim, ostaje nejasno koji mehanizmi ovaj stimulatorni efekat Nrf na mitohondrijalnu respiraciju i biogenezu blokiraju, onemogućavajući time diobu mitohondrija. Sa druge strane, povećanje ekspresije mitofuzina 1 u toku aklimacije na hladnoću ukazuje da se intenzivira drugi proces – fuzija mitohondrija. To potvrđuju i megamitohondrije detektovane u BAT u fazi hibernacije (Grodums, 1977). Sve ovo može sugerisati da energetska deplecija BAT, sa jedne strane; i težnja organizma da sačuva lipidne

rezerve u toku aklimacije na nisku temperaturu, sa druge strane; vode oprečnim promjenama na nivou mitohondrija BAT koje rezultiraju prije fuziji nego biogenezi (fisiji) mitohondrija.

Nasuprot ovim dešavanjima, koja prate izlaganje životinja niskoj temperaturi, u toku faze duboke hibernacije, situacija je jasnija. Supresija proteinske ekspresije Nrf1, PPAR α , PPAR δ , kao i njihovog koaktivatora – PGC-1 α , u saglasnosti je sa smanjenom ekspresijom komponenti respiratornog lanca, kao i proteina (i odgovarajućih gena) ključnih za transport i oksidaciju masnih kiselina – ACADM i *Fabp4*.

Može se zaključiti da rezultati ukazuju na uključenost transkripcionih faktora (PPAR γ /PGC-1 α) u termogenom odgovoru BAT hibernatora prilikom izlaganja niskoj temperaturi. Međutim, nasuprot termogenom, metabolički odgovor tkiva nije tako jasno regulisan. Naime, čini se da pored ispitivanih transkripcionih aktivatora, postoje i neki drugi (supresori vjerovatno) koji regulišu (mitohondrijalni) metabolizam u BAT tekunica tokom izlaganja hladnoći. Na taj način se mrki adipociti nalaze na nekoj vrsti „klackalice“ između potrebe za povećanom produkcijom energije i čuvanja energetske rezervi, koje su im neophodne kasnije prvenstveno za brzo postizanje eutermije nakon višednevnog boravka u hibernaciji. Na osnovu prikazanog, izgleda da transkripciona kontrola u toku hibernacije igra sporednu ulogu u metaboličkom funkcionisanju mrkih adipocita, dok je glavna uloga ipak na translacionoj i post-translacionoj regulaciji metaboličkih puteva.

5.2. Molekulsko remodeliranje skeletnih mišića tokom aklimacije na nisku temperaturu i u fazi hibernacije

Pored BAT, veoma važnu ulogu u održanju eutermije ima i drhteća termogeneza u skeletnim mišićima (Foster i Frydman, 1979). Termogena funkcija i metaboličko reprogramiranje skeletnih mišića tokom izlaganja niskoj temperaturi, daleko je više ispitivana kod nehibernirajućih vrsta. Tako je pokazano da drhteća termogeneza ima primarnu ulogu u održanju konstantne tjelesne temperature tokom prvih nekoliko dana izlaganja životinja hladnoći (do nedelju dana) i da tu ulogu zatim preuzima BAT (nedrhteća termogeneza) (Jansky i Hart, 1968; Foster i Frydman, 1979; Griggio, 1982). Ovakav sled događaja kod nehibernirajućih životinja tokom aklimacije na hladnoću ima reperkusije, kako na metaboličko remodeliranje BAT (Vučetić i sar., 2011), tako i na metaboličke promjene u skeletnim mišićima. Pokazano je da se rani period aklimacije karakteriše

indukcijom glikolize, a kasnije (kada se termogena funkcija BAT kompletno razvije) skeletni mišići prelaze na intenzivnu oksidaciju masnih kiselina (Stančić i sar., 2013).

5.2.1. Metaboličko remodeliranje skeletnih mišića hibernatora u toku aklimacije na nisku temperaturu

Metaboličko reprogramiranje skeletnih mišića hibernirajuće vrste *Spermophilus citellus*, donekle pokazuje slaganje sa promjenama kod (nehibernirajućih) pacova. Naime, do 7. dana izlaganja hladnoći detektovano je značajno povećanje proteinske ekspresije PDK4 i obje subjedinice LDH, kao i enzima odgovornog za mobilizaciju rezervi glikogena - PYG (1. dana), što ukazuje da se mišići oslanjaju na glikolizu. Da je metabolizam glukoze esencijalan za drhteću termogenezu u mišićima tekunica potvrđuje i podatak da je 100 puta povećana koncentracija cirkulišućeg laktata u plazmi tokom buđenja životinje iz hibernacije, kada se takođe snažno aktivira termogeni program (Galster i Morrison, 1975). Nasuprot tome, supresija komponenti elektron-transportnog lanca (kompleksa II i citohroma c), kao i same ATP sintaze ukazuje na smanjen oksidativni kapacitet skeletnih mišića tokom perioda ranog izlaganja niskoj temperaturi. Iako su ove promjene slične onim zabilježenim kod tkiva u toku hipoksije (LaManna i sar., 2004), pogrešno bi bilo zaključiti da se i ovde radi o uslovima smanjene dostupnosti kiseonika. Naime, ranije je kod vrste *Mesocricetus auratus* pokazano da hladnoća indukuje angiogenezu i to upravo kod brzo-grčućih mišića, onih koji se oslanjaju na glikolitičku produkciju ATP (Deveci i Egginton, 2003). U saglasnosti sa tim je i, u ovoj studiji, detektovano povećanje ekspresije VEGF, proteina koji stimuliše vaskularizaciju i angiogenezu (Ferrara i Henzel, 1989; Gospodarowicz i Lau, 1989), u periodu 1-3. dana izlaganja hladnoći. Ovakvo povećanje prokrvljenosti skeletnih mišića tokom prve nedelje aklimacije na nisku temperaturu obezbjeđuje intenzivirani „transport“ toplote (generisane mišićnim kontrakcijama) kroz organizam.

Nasuprot ovome, nakon nedelju dana hladnoće, naši rezultati (smanjena ekspresija GAPDH i LDH H) su pokazali da dolazi do supresije glikolitičkog kapaciteta za produkciju energije, kao i njegovog ponovnog „kuplovanja“ sa Krebsovim ciklusom (vraćanje proteinskog nivoa PDK4 na kontrolni i povećana ekspresija SCAS). Jedan od mogućih razloga ove supresije može biti i smanjena dostupnost glukoze u ovom periodu. Naime, već je pomenuto da hibernatori razvijaju insulin rezistetan odgovor tokom perioda prehibernacije (Buck i sar., 2002). Pored toga, tokom kontinuiranog mišićnog rada u periodu intenzivne drhteće termogenezе, troše se rezerve glikogena u mišićima. Potvrda tome je i povećana proteinska ekspresija PYG 1. dana izlaganja hladnoći, dok se njen nivo skoro

potpuno gasi od 7. dana boravka na niskoj temperaturi. Sveukupno rezultati ukazuju da je smanjena dostupnost glukoze tokom produženog izlaganja hladnoći.

Osim toga, tokom produženog izlaganja hladnoći, smanjena proteinska ekspresija gotovo svih komponenti elektron-transportnog lanca i ATP sintaze ukazuje da je u ovom periodu i kapacitet OXPHOS značajno suprimiran. Ovakve promjene u skeletnim mišićima hibernatora se značajno razlikuju od onih detektovanih kod nehibernirajućih pacova, koje ukazuju na prelazak sa glukoznog na lipidni energetskei metabolizam u mišićima tokom dužeg boravka životinje na hladnoći (Vaillancourt i sar., 2009; Stančić i sar., 2013). Takođe, kod pacova se jasno vidi da ovaj „*switch*“ u korišćenju goriva vodi uspostavljanju „nove“ energetske homeostaze (Stančić i sar., 2013), dok kod tekunica upravo u ovom periodu dolazi do određenog energetskeg disbalansa, koji se manifestuje detektovanim povećanjem aktivnosti AMPK u periodu od 7-12. dana izlaganja hladnoći. Odgovor na pitanje zašto mišići tekunica u ovom periodu ne aktiviraju energetskei-efikasnu β -oksidaciju masnih kiselina (kada/ako već ne mogu glikolizu), može biti u činjenici da dugotrajno izlaganje životinja hladnoći postepeno vodi regresiji krvnih sudova, a time i smanjenju oksigenacije. U prilog tom stanovištu govori detektovano smanjenje ekspresije VEGF, znatno ispod kontrolnog nivoa, paralelno sa povećanjem nivoa HIF-1 α . Iako nema mnogo podataka o angiogenezi u skeletnim mišićima tokom izlaganja hladnoći, Devenci i Egginton (2003) su u svojoj studiji pokazali da postepeno izlaganje hrčaka niskoj temperaturi vodi povećanju angiogeneze u brzo-grčecim mišićima, ali da je ovaj efekat prolazan i da se nakon produžene aklimacije uspostavlja kontrolni nivo.

Interesantno je naglasiti da nivo aktivne AMPK forme nije ostao povećan do kraja ispitivanog perioda, već je došlo do njegove restitucije 21. dana aklimacije na hladnoću. Moguće je da aktivirani kompenzatorni mehanizmi u samim miocitima koji i pored nepovoljnih uslova (akumulacija HIF-1 α , smanjen proteinski nivo OXPHOS komponenti i GAPDH), ipak vode uspostavljanju energetskeg balansa. Ti mehanizmi ne moraju uključivati povećanu produkciju, već smanjenu potrošnju ATP, poput supresije transkripcije i translacije na koje odlazi ~40% ukupnih energetskeg rezervi (Rolfe i Brown, 1997). U prilog ovoj pretpostavci ide i činjenica da su ovi procesi značajno suprimirani u skeletnim mišićima tokom hibernacije (Morin i Storey, 2006). Dakle, možda je upravo dovođenje skeletnih mišića u nepovoljne uslove smanjene dostupnosti glukoze i O₂, odgovorno za karakterističnu metaboličku supresiju ovog tkiva tokom faze duboke hibernacije.

Na osnovu svega iznesenog može se zaključiti da se metabolički profil skeletnih mišića hibernirajuće vrste *Spermophilus citellus*, umnogome ne razlikuje od onog viđenog kod nehibernatora, tokom faze aktivne termogeneze. Ono što značajno razlikuje skeletne mišiće hibernatora jeste njihovo (ne)prilagođavanje dugotrajnom izlaganju niskoj temperaturi. Naime, čini se da produžena aklimacija na hladnoću vodi energetskom disbalansu u skeletnim mišićima tekunica, sa kojim ćelije vjerovatno mogu da se izbore jedino suprimiranjem potreba za sintezom ATP. Ono što ostaje kao otvoreno pitanje, jeste da li je ova supresija puteva produkcije energije zaista vezana za ulazak životinje u fazu hibernacije.

5.2.2. Metaboličko remodeliranje skeletnih mišića hibernatora tokom faze duboke hibernacije

Nasuprot aklimaciji na nisku temperaturu (i buđenju iz hibernacije), gdje mišićne kontrakcije imaju važnu termoregulatornu ulogu (Foster i Frydman, 1979), u toku faze duboke hibernacije skeleni mišići su potpuno kontraktilno mirni, ne pokazujući nikakvu EMG aktivnost (Daan i sar., 1991). U saglasnosti sa ovim su i naši rezultati promjene ekspresije SERCA1 - Ca^{2+} -ATPazne jonske pumpe. Ovaj transportni protein omogućava vraćanje citoplazmatskog Ca^{2+} u sarkoplazmin retikulum, gdje biva uskladišten tokom neaktivnog perioda mišića. Ova jonska pumpa sama doprinosi ~5% bazalnog metabolizma (Simonides i sar., 2001). Povećanje njegove ekspresije tokom čitavog perioda aklimacije na hladnoću, jasno ukazuje na značajnu aktivnost skeletnih mišića. Sa druge strane, tokom duboke hibernacije nepromjenjen EMG zapis očekivano je praćen smanjenjem ekspresije SERCA1. Do istog rezultata su došli i Hindle i saradnici (2011). Ovakav scenario promjene aktivnosti skeletnih mišića tokom eutermija-torpor ciklusa privlačio je oduvijek pažnju, posebno sa aspekta ispitivanja mehanizama moguće atrofije mišića usled njihovog nekorišćenja tokom faze duboke hibernacije. Period neaktivnosti u trajanju od ~2 nedelje kod nehibernatora, koliko u prosjeku traje jedna epizoda torpora, lako može da dovede do atrofije mišića (Musacchia i sar., 1989; Musacchia i sar., 1990). Međutim, brojne studije su potvrdile da kod hibernirajućih vrsta neaktivnost mišića ne indukuje ili sasvim malo indukuje njihovu atrofiju, bez negativnih efekata na kontraktilnost čak i nakon 4 - 7 mjeseci hibernacije (Wickler i sar., 1987; 1991; Lohuis i sar., 2007; Hershey i sar., 2008).

Iako molekularni mehanizmi očuvanja mišićne mase i aktivnosti kod hibernatora nakon produžene neaktivnosti do danas nisu potpuno razjašnjeni i otkriveni, izgleda da važnu ulogu u ovome ima održanje ili čak povećanje oksidativnog kapaciteta u skeletnim mišićima tokom faze hibernacije (Wickler i sar., 1991). Nedavno je čak pokazano da sama

hibernacija aktivira konverziju mišićnih vlakana Tipa IIB u vlakna Tipa I, koja karakteriše oksidativni fenotip (Xu i sar., 2013). U saglasnosti sa tim su i naši rezultati povećane ekspresije ključnog enzima Krebsovog ciklusa - SCAS, kao i restitucija (nakon pada u toku aklimacije na hladnoću) proteinskog nivoa ATP sintaze i enzima β -oksidacije - ACADM. Slično tome, Wickler i saradnici (1987; 1991) su pokazali da se u hibernaciji aktivnost enzima Krebsovog ciklusa - citrat sintaze, značajno povećava kod vrsta *Spermophilus lateralis* i *Melanochromis auratus*, dok su Hindle i saradnici (2011) u opsežnoj proteomskoj studiji detektovali indukciju ekspresije nekoliko enzima β -oksidacije i Krebsovog ciklusa. Naši rezultati su pokazali da se glikolitički kapacitet miocita tokom hibernacije suprimira (smanjenje proteinskog nivoa GAPDH, PDH, PYG i GSK), što je u saglasnosti sa prelazom sa glukoznog na lipidni metabolizam u skeletnim mišićima hibernatora tokom torpora (Andrews i sar., 1998; Buck i sar., 2002).

Takođe, rezultati pokazuju da u toku faze duboke hibernacije (kao i kod BAT) u mišićima dolazi do značajnog smanjenja proteinskog nivoa VEGF, što može ukazivati na kompromitovanu perfuziju, a time i oksigenaciju skeletnih mišića u toku torpora. U saglasnosti sa ovom tvrdnjom je i povećana količina HIF-1 α u fazi hibernacije. Slično tome, identično povećanje proteinskog (ali ne i mRNA) nivoa, kao i aktivnosti HIF-1 α pokazano je i kod vrste *Spermophilus tridecemlineatus* tokom hibernacije (Morin i Storey, 2005). Ističući da detektovani stepen povećanja proteinske ekspresije (~ 2 puta) ne korelira sa stepenom povećanja aktivnosti (~ 6 puta) HIF-1 α , autori navode da fosforilacija ERK1/2 protein kinazama može značajno uticati na njegovu transkripcionu aktivnost. Zaista, naši rezultati pokazuju paralelizam proteinske ekspresije ERK1/2 sa povećanom ekspresijom HIF-1 α , i to ne samo tokom hibernacije, već i tokom produženog izlaganja hladnoći (7 - 21. dan aklimacije).

S obzirom da do indukcije HIF-1 dolazi u uslovima limitiranosti O₂, logično se nameće pitanje kako je moguće ranije pomenuto povećanje oksidativnog kapaciteta tokom uslova koji omogućavaju akumulaciju HIF-1 α , ili *vice versa*? Vrlo slična situacija je detektovana i u drugom termogenom organu - BAT, što može ukazivati na neku funkciju HIF-1 tokom hibernacije, koja se ne odnosi primarno na regulaciju metabolizma već na kontrolu termogeneze. Naime, odavno je predložen djelimično izmjenjen model autonarkotičke teorije (Dubois, 1892), po kojoj male promjene pH mogu, pored suprimiranja hipotalamičke „*threshold*“ vrijednosti za termogenezu (Schaefer i Wunnenberg, 1976), značajno inhibirati i metabolizam koji podržava termoregulaciju u BAT i mišićima

(Harken, 1976). Imajući u vidu da su ključni regulatori pH u tkivima laktat i CO₂, supresija VEGF i indukcija HIF-1, a time i LDH aktivnosti, može se posmatrati sa aspekta indukcije/održanja mehanizama, koji suprimiraju termogenezu i time uvode/održavaju hipotermiju kod hibernirajućih životinja.

5.2.3. PPARs i Nrfl u transkripcionoj kontroli metaboličkog remodeliranja skeletnih mišića hibernatora

Od tri do sad opisane izoforme PPAR (Mukherjee i sar., 1997), u skeletnim mišićima najzastupljenija varijanta ovog transkripcionog faktora je PPAR δ , koji reguliše preuzimanje i oksidaciju glukoze i lipida (Holst i sar., 2003). Sa druge strane, pri bazalnim uslovima PPAR α i PPAR γ su manje zastupljene izoforme, koje, međutim, mogu biti indukovane pri određenim fiziološkim uslovima, poput vježbanja, gladovanja itd. (Tunstall i sar., 2002). Studije na nehibernatorima pokazuju da sve tri izoforme imaju udjela u metaboličkom remodeliranju skeletnih mišića tokom izlaganja niskoj temperaturi (Stančić i sar., 2013).

Ova studija potvrđuje da je u mišićima najzastupljenija forma PPAR δ , ali isto tako i da se njena ekspresija skoro ne mijenja (konstantno je visoko ekspimirana) kako tokom aklimacije na hladnoću tako i u dubokoj hibernaciji. Sa druge strane, tokom izlaganja niskoj temperaturi snažno se indukuje proteinska ekspresija PPAR α i PPAR γ (3 - 21. dana). Ovu indukciju prati povećana ekspresija PGC-1 α tokom čitavog ispitivanog perioda. Vrlo sličan profil ekspresionih promjena je detektovan kod pacova: povećana ekspresija PPAR α , PPAR γ i PGC-1 α , tokom čitavog perioda aklimacije od 45 dana, dok do indukcije ekspresije PPAR δ proteina dolazi tek nakon nedelju dana izlaganja hladnoći (Stančić i sar., 2013). S obzirom da ove tri izoforme pokazuju preklapajuće dejstvo na lipidni i glukozni metabolizam (Wang, 2010), očekivalo bi se da indukcija PPAR α i PPAR γ /PGC-1 α u skeletnim mišićima aktivira lipidni metabolizam. Međutim, pokazano je da ipak ova aktivacija „miruje“ do momenta indukcije PPAR δ (Stančić i sar., 2013). To je vjerovatno posledica veće bazalne zastupljenosti δ izoforme u mišićima, koja održava bazalni nivo metaboličkog fluksa. To može biti objašnjenje zašto oksidativni metabolizam masnih kiselina u mišićima hibernatora nije stimulisan i pored značajne indukcije PPAR α , PPAR γ i PGC-1 α ekspresije. Takođe, moguće je da α i γ izoforma PPAR i PGC-1 α u mišićima imaju neke druge regulatorne uloge, kako tokom aklimacije, tako i u hibernaciji.

U fazi duboke hibernacije dolazi do snažnog suprimiranja ekspresije PGC-1 α , PPAR α i PPAR γ , čija je ekspresija bila indukovana tokom aklimacije na hladnoću. Međutim, kao i pri izlaganju niskoj temperaturi, ni u fazi hibernacije promjene ekspresije ne

moгу se dovesti u direktnu vezu sa reprogramiranjem metabolizma. Suprimirana ekspresija ovih transkripcijskih regulatora je možda posledica generalne supresije transkripciono-translacione mašinerije, zabilježene u skeletnim mišićima tokom hibernacije (Morin i Storey, 2006).

Transkripcijska regulacija metabolizma skeletnih mišića u toku faze duboke hibernacije zasluđuje posebnu pažnju. Xu i saradnici (2013) su pokazali da se značajno povećava ekspresija PGC-1 α kao i njegovih targeta: fosfo-AMPK, Nrf1 i GLUT4. Na osnovu ovih rezultata, postavljena je hipoteza o aktiviranju istih puteva povećanja oksidativnog kapaciteta skeletnih mišića kao i pri vježbanju. Nasuprot ovome, naši rezultati ukazuju da u istom tipu mišića (*m. quadriceps*), kod vrste *Spermophilus citellus*, dolazi do suprotnih promjena na nivou transkripcijskih regulatora; tj. dolazi do smanjenja proteinskog nivoa PGC-1 α i Nrf1, dok je i ovdje zabilježen veći nivo aktivne forme AMPK. Nekonzistentnost rezultata ove dvije studije, moguće je leđi u činjenici da su kontrolnu grupu u studiji Xu i saradnika činile ljetnje-aktivne životinje (jul/avgust), dok su u našoj kontrolnoj grupi bile aktivne životinje koje se nalaze u fazi pripreme za hibernaciju (septembar/oktobar). Ovo bi moglo ukazivati da zapravo promjene zabilježene u studiji Xu i saradnika ne moraju neophodno biti posledica hibernacije, već cirkaanualnih promjena koje se dešavaju kod sezonskih hibernatora (Epperson i sar., 2011). Sa druge strane, u studijama koje su rađene na skeletnim mišićima *Spermophilus tridecemlineatus* u kojima su kontrolnu grupu činile aktivne životinje u fazi pre-hibernacije (kao i u ovom radu), detektovano je slično povećanje PGC-1 α kao i u studiji Xu i saradnika (Eddy i sar., 2005), dok nije zabilježen rast aktivnosti AMPK (Horman i sar., 2005) i ekspresije Nrf (Morin i sar., 2008). Uz to suprimirana je aktivnost RNK polimeraze i ukupna transkripcijska aktivnost, tokom torpora (Morin i Storey, 2006). Očigledno da transkripcijska regulacija u skeletnim mišićima hibernatora još uvijek predstavlja enigmatično područje, koje zasluđuje dalje i detaljnije ispitivanje.

5.2.4. Antioksidativna odbrana u skeletnim mišićima hibernatora tokom izlaganja hladnoći i tokom faze duboke hibernacije

Gotovo nepromjenjena ekspresija enzima AD, zabilježena u ovoj studiji, u ranoj fazi aklimacije na nisku temperaturu (do nedelju dana) idu u prilog tezi da se u ovom periodu aktivne glikolitičke strategije bitno ne narušava redoks ravnoteđa u mišićima. Nasuprot tome, nakon 7. dana izlaganja niskoj temperaturi, dolazi do indukcije ekspresije CuZnSOD i katalaze, dok se u istom periodu proteinski nivo GSH-Px smanjuje. S obzirom da u ovom

periodu rezultati pokazuju da nema indukcije (ili čak možemo govoriti i o supresiji) oksidativnog metabolizma, ove promjene na nivou AD, mogu se posmatrati kao priprema ovog važnog termogenog organa za uslove neaktivnosti, tj. mogu se tumačiti kao prekondicioniranje mišića.

U prilog pretpostavci o prekondicioniranju skeletnih mišića za uslove hipotermije i neaktivnosti svijedoči i činjenica da ekspresija CuZnSOD, katalaze i GSH-Px ostaje povećana i u fazi duboke hibernacije. Posebno je interesantno da je proteinska ekspresija mitohondrijalne izoforme SOD suprimirana. Naime, naši i rezultati drugih autora (Andrews i sar., 1998; Buck i sar., 2002; Muleme i sar., 2006) ukazuju na pretežno lipidni metabolizam ovog termogenog organa u toku hibernacije, te bi se na osnovu toga mogla očekivati i povećana produkcija ROS, a sledstveno i aktivacija AD, u ćelijskom kompartmentu u kom se odvija najveći stepen oksidacije masnih kiselina - mitohondrijama. Međutim, Eddy i saradnici (2006) su pokazali da, nasuprot BAT, mišići ne pokazuju karakteristično povećanje ekspresije CPT-I β , enzima od kog zavisi brzina β -oksidacije u mitohondrijalnom kompartmentu. Iako bi ovo moglo na prvi pogled da djeluje zbunjujuće, značajno povećanje ekspresije katalaze ukazuje da bi oksidacija masnih kiselina mogla u najvećem stepenu da se obavlja u peroksizomalnom ćelijskom kompartmentu. Slično povećanje peroksizomalnog oksidativnog metabolizma je viđeno i u BAT tokom hibernacije (Kabine i sar., 2003; 2004). U ovom slučaju, međutim, mitohondrijalni metabolizam ne zaostaje po svojoj aktivnosti, što pokazuju rezultati povećanja ekspresije CuZnSOD i katalaze. U saglasnosti sa tim su i rezultati naše ranije studije o promjeni aktivnosti MnSOD i katalaze kod tekunica (Buzadžić i sar., 1990).

5.3. Molekulsko remodeliranje depoa WAT tokom aklimacije na nisku temperaturu i u fazi hibernacije

Uloga WAT tokom izlaganja (ne)hibernirajućih životinja hladnoći, dugo vremena je bila zanemarivana iz razloga što je ovo tkivo posmatrano prvenstveno sa aspekta pasivnog rezervoara goriva, tj. lipida. Međutim, danas se zna da je WAT endokrini organ koji ima aktivnu ulogu u ukupnom energetsom balansu organizma (Ahima i Flier, 2000). Novije studije ukazuju da različiti fiziološki stimulusi, poput hladnoće, mogu povećati oksidativni metabolizam u samom WAT pacova (Mulligan i sar., 2007; Janković i sar., 2009; Janković i sar., 2013). Još uvijek su neispitane molekulske i metaboličke osnove WAT remodeliranja (posebno pojedinačnih depoa) kod hibernatora u uslovima koji zahtijevaju korišćenje lipida

za produkciju toplote (aklimacija na hladnoću), ali i kao osnovnog energetskog goriva organizma (hibernacija).

5.3.1. Uloga pojedinačnih depoa WAT u ukupnoj energetskoj homeostazi tokom aklimacije na nisku temperaturu

Ova studija je rađena na tekunicama koje su bile u fazi pripreme za hibernaciju, za koju je karakteristična hiperfagija i povećanje tjelesne mase životinja (*weight-gain phase*) (Frank i Storey, 1995). Tokom perioda provedenog u laboratorijskim uslovima na sobnoj temperaturi tekunice su, prije početka eksperimenta, napredovale, tj. dobijale na težini. Međutim, odmah po izlaganju hladnoći detektovano je smanjenje tjelesne mase, kao rezultat intenziviranja produkcije toplote. Rezultati su u skladu sa pokazanom noradrenalin-stimulisanom lipolizom u WAT pacova (revija Bartness i Bamshad, 1998), što je potvrđeno i kod hibernatora (Youngstrom i Bartness, 1995; Bamshad i sar., 1998; Song i Bartness, 2001). Naši rezultati ukazuju da i pored toga što se volumenski udio adipocita u svim WAT depovima ne mijenja tokom izlaganja hladnoći, površina adipocitnog profila značajno je smanjena počevši već od prvog dana izlaganja hladnoći u slučaju eWAT, odnosno od 12. dana u slučaju rWAT. Sa druge strane, površina profila adipocita u subkutanom depou WAT u ranom periodu izlaganja hladnoći (do 3 dana) raste, a nakon toga se vraća na kontrolni nivo i ostaje gotovo nepromjenjen do kraja ispitivanog perioda. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Bartness i saradnika (1989), koji su pokazali da se unutrašnji depoi (eWAT i rWAT) mobilisu znatno prije potkožnih depoa. Kao moguće objašnjenje ove razlike u odgovoru između različitih WAT depoa, autori ističu različit stepen inervacije. Naime, iako naša studija nije detektovala veće promjene u inervaciji različitih depoa; pokazano je da je obrt noradrenalina znatno veći u eWAT u odnosu na subkutano ingvinalno WAT, što koincidira sa znatno bržim smanjenjem mase eWAT (Youngstrom i Bartness, 1995). Slično tome, nađeno je i da je nivo mRNA za β_3 -AR povećan upravo u eWAT tokom izlaganja hrčaka uslovima kratkih „*winterlike*“ dana (Demas i sar., 2002). Sve ovo jasno ide u prilog tezi da u toku aklimacije na hladnoću najveći stepen lipolize, a time vjerovatno i najveći doprinos produkciji toplote, imaju visceralni depoi WAT, eWAT u prvom redu (mada se ne može isključiti mogućnost učešća i drugih unutrašnjih depoa koji nisu razmatrani u ovoj studiji).

Naši rezultati pokazuju da je, počevši od 7. dana izlaganja hladnoći pa sve do kraja ispitivanog perioda i to u sva tri depoa WAT, snažno aktivirana AMPK. Sličan rezultat je dobijen i u rWAT kod nehibernirajućih životinja (Janković i sar., 2013). S obzirom na

pokazani anti-lipolitički efekat AMPK (Daval i sar., 2005; Gauthier i sar., 2008), koji je vjerovatno posledica fosforilacije i inaktivacije HSL i adipozne triacilglicerol lipaze (Narbonne i Roy; 2009); sinhronizovana aktivacija AMPK u sva tri depoa WAT ukazuje da je u ovom periodu lipoliza suprimirana. Sličan scenario je pokazan i u rWAT pacova, gdje je inicijalno čitav metabolički program podređen snabdijevanju drugih tkiva masnim kiselinama, dok kasnije u toku aklimacije dolazi do promjena koje primarno za cilj imaju obezbjeđivanje energetske homeostaze u samim adipocitima (Janković i sar., 2013).

Očigledno da WAT ima važnu ulogu u održanju ukupnog energetskog balansa tokom ranog perioda izlaganja hladnoći, kada dolazi do intenzivne produkcije toplote kako u mišićima, tako i u BAT.

5.3.2. Energetski metabolizam depoa WAT tokom aklimacije na hladnoću

Rana faza aklimacije na nisku temperaturu karakteriše se intenzivnom lipolizom u visceralnim depoima WAT, kako kod nehibernatora (Janković i sar., 2013), tako i kod hibernatora, što se primarno može posmatrati sa aspekta obezbjeđivanja goriva za termogene organe. Nije iznenađujuće što upravo u ovom periodu dolazi do povećanja kapaciteta glikolize za produkciju energije u svim depoima (povećanje ekspresije GAPDH, PDH, kao i obje subjediniče LDH). Ovi rezultati su u saglasnosti sa metaboličkim reprogramiranjem rWAT pacova tokom ranog perioda izlaganja hladnoći (Janković i sar., 2013). Važno je istaći da je kod pacova ova indukcija glikolitičke strategije vođena HIF-1, dok su kod tekunica uključeni drugačiji mehanizmi. Naime, do povećane ekspresije HIF-1 α dolazi u eWAT, ali ne i u rWAT. Moguće objašnjenje za ovo leži u smanjenju vaskularizacije eWAT depoa, s obzirom da je proteinska ekspresija VEGF u ranom periodu aklimacije značajno suprimirana. Rezultati morfometrijske analize pokazali su da adipociti tekunica iznenađujuće krupni. Naime, u poređenju sa adipocitima pacova, koji su veličine od 20-70 μm (Le Lay i sar., 2001); adipocitima gojaznih Zucker pacova veličine od 40-240 μm (Margues i sar., 1998); pa i adipocitima mrmota koji su u fazi pripreme za hibernaciju (septembar) veličine 250-300 μm ; ćelije WAT tekunica su dramatično veće (5000-12500 μm). S obzirom na veličinu ćelije, male promjene u prokrvljenosti mogu značajno afektovati dostupnost O₂ adipocitima. Ovo je u saglasnosti sa povećanom količinom HIF-1 α i smanjenom ekspresijom VEGF u eWAT. Sa druge strane, u rWAT dolazi do indukcije proteinske ekspresije VEGF, te se nivo HIF-1 α ne mijenja ili čak smanjuje.

Nasuprot visceralnim depoima, sWAT izgleda indiferentan na lipolitičko dejstvo hladnoće, vjerovatno usled manje inervacije (Youngstrom i Bartness, 1995; Demas i sar., 2002), manjeg broja β -adrenergičkih receptora ili čak boljeg antilipolitičkog efekta insulin (Arner, 1995; Wajchenberg, 2000). U skladu sa tim, površina adipocitnog profila u sWAT se čak povećava tokom ranog perioda aklimacije na hladnoću, što može ukazivati na akumulaciju lipida u sWAT tokom ranog perioda aklimacije na nisku temperaturu. S obzirom da se u ovom periodu nivo ACC, enzima ključnog za inicijalni korak *de novo* sinteze masnih kiselina, značajno smanjuje, moguće je spekulirati o eventualnom povećanom unosu masnih kiselina u sWAT. sWAT se razlikuje od visceralnih depoa i po supresiji kapaciteta svih puteva produkcije energije 1. dana aklimacije na hladnoću (supresija proteinskog nivoa komponenti OXPHOS, GAPDH, PDH, LDH i ACADM). Uz to nivo aktivne forme AMPK ostaje nepromenjen. Ovo jasno ukazuje da kratkotrajno izlaganje hladnoći (do 24h) u sWAT indukuje na prvom mjestu povećano skladištenje lipida. Po tome se ovaj depo bitno razlikuje od oba ispitivana visceralna depoa.

Naši rezultati pokazuju da se visceralni depoi razlikuju od subkutanog i na nivou anabolizma lipida, u toku rane faze aklimacije. Naime, nasuprot sWAT u depoima visceralnog WAT dolazi do snažne indukcije proteinske ekspresije ACC i FAS, što jasno sugerira povećanu *de novo* sintezu masnih kiselina u njima. Može se zaključiti da je indukcija sinteze masnih kiselina kompenzatorni odgovor u eWAT i rWAT na praznjenje lipidnih rezervi, tj. pojačanu lipolizu.

Nagla aktivacija AMPK od 7. dana izlaganja hladnoći i pored nepromenjenog kapaciteta za produkciju energije, moguće je da zapravo predstavlja posledicu lipolize. Sam proces hidrolize triacilglicerola ne zahtijeva utrošak ATP, međutim, lipoliza je nužno spregnuta sa procesom reesterifikacije, što jeste energetski-zahitjevan proces (~30-70% oslobođenih masnih kiselina pri lipolizi biva reesterifikovano u triacilglicerole) (Vaughan, 1962; Reshef i sar., 2003); koji troši ćelijski ATP (Nelson i Cox; 2005). Drugi faktor koji može uticati na aktivaciju AMPK jeste indukcija termogene aktivnosti samog WAT. Naime, pokazano je da noradrenergična stimulacija WAT indukuje regrutaciju „*brite/beige*” adipocita (Walden i sar., 2012). Kod hibernirajuće vrste *Phodopus sungorus*, u rWAT depou, usled noradrenergične stimulacije prilikom izlaganja životinje hladnoći, dolazi do indukcije genske ekspresije UCP1, ključnog markera termogeneze mrkih adipocita. U skladu sa tim je i pojava „*brite/beige*” adipocita 3. dana izlaganja hladnoći u rWAT; odnosno 7. dana aklimacije u svim depoima. To je momenat kada dolazi do naglog povećanja aktivne forme

AMPK. Saglasno tome, jedan od mogućih faktora koji utiče na povećanje aktivnosti AMPK u svim WAT depovima, može biti i aktivacija dekaplovanja u ovim ćelijama. Nadalje, iako se povećani nivo aktivne forme AMPK održava do kraja aklimacije, vidljiva je tendencija njegovog vraćanja na kontrolni nivo, koji se u slučaju sWAT čak i postiže 21. dana izlaganja hladnoći. Ovo može ukazivati na aktivaciju kompenzatornih mehanizama u WAT, koji postepeno vraćaju narušeni energetske balans. Generalno, postoje dva moguća scenarija za ponovno uspostavljanje energetske balansa: aktivacija puteva produkcije energije i/ili supresije puteva potrošnje energije. U slučaju visceralnih depoa, u prilog prvom scenariju ide indukcija ekspresije OXPHOS komponenti i SCAS (prvenstveno od 7. dana), uz održanje povećanog proteinskog nivoa GAPDH, PDH i LDH. Sa druge strane, u prilog drugom scenariju ide činjenica da prisustvo „*brite/ beige*” adipocita nakon 7. dana izlaganja hladnoći nije zapaženo u ovoj studiji. Nije isključeno ni da obje strategije (indukcija oksidativnog uz suprimiranje termogenog kapaciteta, tj. UCP1 ekspresije) doprinose normalizaciji energetske statusa. U prilog indukciji oksidativnog metabolizma visceralnih depoa WAT govori i činjenica da dolazi do smanjenja površina profila adipocita i u uslovima suprimirane lipolize, što ukazuje da se lipidne rezerve u stvari koriste u samim adipocitima.

Nasuprot eWAT i rWAT, u subkutanom depou drugačije se remodelira metabolizam tokom produženog boravka tekunice na niskoj temperaturi. Naime, u ovom depou je zabilježen pad proteinskog nivoa OXPHOS komponenti, GAPDH, LDH i ACADM. Zato nije iznenađujuće što se površina profila adipocita sWAT u ovom periodu gotovo ne mijenja. To je vjerovatno i razlog zbog čega se upravo ovaj depo kasnije mobilise u odnosu na unutrašnje depoe (Bartness i sar., 1989). S obzirom da se jedino u sWAT nivo fosfo-AMPK restituiše na kontrolni nakon 21. dana aklimacije, razlog može biti supresija potrošnje energije. Kao i kod visceralnih depoa, ove promjene se mogu posmatrati sa aspekta pripreme životinje za ulazak u fazu hipotermije, tj. hibernacije. Povećanje oksidativnog kapaciteta u visceralnim depovima, a ne i u sWAT može izgledati iznenađujuće s obzirom da je bazalni respiratorni fluks u subkutanom veći u poređenju sa visceralnim depovima (Kraunsoe i sar., 2010). Međutim, u saglasnosti sa našim rezultatima; primjećeno je i to da bez obzira na niži bazalni fluks kroz respiratorni lanac, unutrašnji depoi WAT su energetske mnogo aktivniji i brže odgovaraju na supstrate elektron-transportnog lanca (Kraunsoe i sar., 2010).

Može se zaključiti da se u visceralnim depoima WAT, rani period aklimacije na hladnoću karakteriše intenzivnom lipolizom, indukcijom glikolitičkog puta uz paralelno povećanje *de novo* sinteze masnih kiselina. Nasuprot tome, u sWAT se prvenstveno skladište lipidi i suprimira oksidativni metabolizam, vjerovatno u cilju čuvanja lipidnih rezervi koje su od vitalnog značaja za hibernaciju i buđenje iz nje. Nakon ovog perioda, od 7. dana aklimacije na hladnoću, indukcija AMPK inhibira lipolizu u visceralnim depoima WAT, a sami adipociti se „bore“ protiv ovog energetskog disbalansa, prvenstveno supresijom puteva potrošnje energije (sWAT, rWAT, eWAT), ali i indukcijom puteva produkcije ATP (eWAT i rWAT). Sve to jasno ukazuje da depoi WAT hibernatora pokazuju depo-specifičan odgovor tokom izlaganja tekunica hladnoći. Regulatorni mehanizmi koji vode ovakvom aktiviranju oksidativnog metabolizma u visceralnim depoima WAT mogli bi imati primjenu u biomedicinske svrhe, s obzirom da je upravo visceralna ili “androgena” gojaznost spregnuta sa nizom metaboličkih poremećaja (Bosello i Zamboni, 2000).

5.3.3. Transkripciona regulacija metaboličkog remodeliranja WAT depoa tokom aklimacije na hladnoću

Brojni literaturni podaci pokazuju da je za indukciju gena važnih za preuzimanje, skladištenje lipida i diferencijaciju adipocita, najodgovornija PPAR γ izoforma (revije Farmer, 2006; Rosen i MacDougald, 2006). Ovaj transkripcioni faktor, *per se*, ima ključnu ulogu u generisanju karakterističnog adipogenog fenotipa WAT (Barak i sar., 1999). Naši rezultati su pokazali da se ekspresija ovog transkripcionog faktora u visceralnim depoima WAT, tokom izlaganja životinja hladnoći, ne mijenja. Moguće da je u osnovi ovakvih promjena činjenica da se tekunice nalaze u fazi pripreme za hibernaciju, pa je njihov adipogeni potencijal već značajno povećan. Slično ovome, PPAR γ i PGC-1 α u BAT i najzastupljenija PPAR δ izoforma u mišićima, se takođe ne mijenjaju, vjerovatno iz istih razloga. Drugim riječima, izgleda da je transkripciona kontrola ključnih i karakterističnih dešavanja u tkivima hibernatora cirkaanualno vođena, tj. određena.

U saglasnosti sa ovim je indukcija PGC-1 α u sva tri WAT depoa tokom aklimacije na hladnoću. Imajući u vidu transkripcionu metaboličku regulaciju u BAT, gdje PPAR γ u kooperaciji sa PGC-1 α , indukuje BAT-specifični termogeni program, poput ekspresije UCP1 i biogeneze mitohondrija (Puigserver i sar., 1998; Seale i sar., 2007; Kajimura i sar., 2009; Petrović i sar., 2010), indukcija PGC-1 α vjerovatno je odgovorna za indukciju „*browning*“ efekta, koji je detektovan u WAT depoima 3 - 7. dana aklimacije. Shodno tome, čini se da je PGC-1 α odgovoran i za indukciju oksidativnog metabolizma u mitohondrijama

u visceralnim depovima WAT tokom produženog perioda aklimacije. Međutim, PGC-1 α izgleda nema isti efekat na metabolizam u sWAT. Razlog može ležati u činjenici da su ključni regulatori mitohondrijalne respiracije i AMPK-vođene biogeneze mitohondrija – Nrf (Bergeron i sar., 2001), značajno suprimirani u sWAT. Sa druge strane, u eWAT i rWAT njihova ekspresija se povećava, zajedno sa ekspresijom mitofuzina 1 (u rWAT), što je sve praćeno povećanim stepenom ekspresije enzima oksidativnog metabolizma.

Promjene PPAR α i PPAR δ , čija je osnovna funkcija u stimulaciji oksidativnog metabolizma (Wang, 2010), takođe su specifične za visceralne i subkutani WAT depo. Tako je u oba visceralna depoa WAT detektovana izrazita supresija PPAR α , dok je nivo PPAR δ bio povećan, posebno tokom produženog izlaganja tekunica hladnoći. U sWAT zabilježene su suprotne promjene: povećana proteinska ekspresija PPAR α i smanjen proteinski nivo PPAR δ . Iako uzrok ovakvih promjena nije najjasniji, nesumnjivo je da one utiču na različit obrazac oksidativnog metabolizma visceralnog i subkutanog WAT (Kraunsoe i sar., 2010).

5.3.4. Uloga pojedinačnih WAT depoa u ukupnoj energetske homeostazi tokom faze duboke hibernacije

Naši i rezultati drugih autora sugerišu da tokom izlaganja životinja hladnoći, noradrenergička stimulacija ima pozitivan efekat na lipolizu, primarno u visceralnim depovima WAT (revija Bartness i Bamshad, 1998). Međutim, rezultati *in vitro* studija pokazuju da je noradrenalinom-stimulisana lipoliza u adipocitima značajno suprimirana na niskim temperaturama, karakterističnim za torpor i da ne postoje specifične adaptacije WAT hibernatora koje bi eventualno povećale osjetljivost tkiva na noradrenalin (Dark i sar., 2003). U prilog ovome idu i naši rezultati povećanja aktivne forme (anti-lipolitičkog) AMPK u eWAT i sWAT tokom faze duboke hibernacije. Ovaj odgovor je suprotan u rWAT, gdje je nivo fosfo-AMPK niži od kontrolnog, što može ukazivati da se lipoliza u ovom depou dešava i tokom torpora. U studiji u kojoj su ispitivane moguće adaptacije WAT depoa na uslove hibernacije, ispitivane su samo promjene u eWAT i sWAT. Sa druge strane Bauer i saradnici (2001) su detektovali možda jednu od ključnih adaptacija WAT. Naime, ovi autori su pokazali da u WAT vrste *Spermophilus tridecemlineatus*, u toku faze duboke hibernacije dolazi do povećanja ekspresije pankreasne triacilglicerol lipaze, koja pokazuje visoku stopu aktivnosti i na niskim temperaturama (Squire i sar., 2003). Na žalost, autori u radu nisu specificirali na kom depou WAT je rađeno.

Činjenica da je respiratorni koeficijent životinja tokom hibernacije približno 0,7, ukazuje da se kao glavno energetske gorivo u ovoj fazi koriste lipidi (Lyman, 1982). Iz tog

razloga, konstatacija da je lipoliza u eWAT i sWAT suprimirana, može djelovati zbunjujuće. Međutim, naši rezultati ukazuju na potencijalnu depo-specifičnu mobilizaciju lipida, pretežno iz rWAT. Ovaj segment hibernacijom indukovanoj depo-specifičnog remodeliranja tkiva je malo poznat, a izuzetno je značajan te zahtijeva dalja ispitivanja.

5.3.5. Energetski metabolizam i njegova transkripciona regulacija u WAT depoima tokom torpora

Ukoliko se pogleda ekspresija anaboličkih enzima u sva tri depoa WAT tokom hibernacije, generalno se može zaključiti da se visceralni depoi WAT i u toku ove faze ponašaju slično. Naime, u oba depoa je došlo do indukcije ekspresije GAPDH i obje subjedinice LDH, što ukazuje na povećani kapacitet ovih depoa za produkciju ATP iz glukoze. U eWAT je zabilježen i rast proteinske ekspresije nekih komponenti elektron-transportnog lanca (kompleks III i IV), kao i ATP sintaze. Međutim, u istom depou detektovana je i povećana proteinska ekspresija HIF-1 α , što može ukazivati na smanjen oksidativni metabolizam. Na to dodatno ukazuje smanjenje proteinske ekspresije svih PPAR izoformi, PGC-1 α , NFE2L2, kao i mitofuzina 1. U eWAT situacija je nešto dugačija, te pored sličnog suprimiranja proteinske ekspresije PPAR α i PPAR γ , ovaj depo pokazuje povećan proteinski nivo PPAR δ , Nrf1 i NFE2L2. Ukoliko se pogledaju ovi rezultati moglo bi se pomisliti da je u eWAT mitohondrijalni metabolizam indukovanoj tokom hibernacije. Međutim, imajući u vidu da je u ovoj studiji detektovana indukcija HIF-1 transkripcionog faktora, koji suprimira respiratorni fluks (Zhang i sar., 2007), jasno je da to nije slučaj.

Rezultati naše studije ukazuju da nasuprot visceralnom, sWAT u znatno većoj mjeri zavisi od oksidativnog metabolizma. Naime, indukcija GAPDH u sWAT je praćena povećanom ekspresijom PDH kompleksa, ali ne i LDH; što jasno ukazuje da je glikoliza “kuplovana” sa Krebsovim ciklusom (Nelson i Cox, 2005), tj. da se glukoza oksiduje do CO₂ i H₂O. U visceralnim depoima izgleda da se oksidacija glukoze u velikoj mjeri zaustavlja na nivou piruvata, koji se dalje u citoplazmi konvertuje u laktat. Takođe, detektovano je i povećanje proteinske ekspresije kompleksa II i IV i restitucija proteinske ekspresije kompleksa I, citohroma *c* i ATP sintaze. U skladu sa ovom tezom je i povećanje PPAR α , odnosno restitucija PPAR δ i NFE2L2 proteinske ekspresije. Ovakve promjene predstavljaju transkripcionu podršku oksidativnom metabolizmu i respiratornom fluksu u eWAT (Wang, 2010).

5.3.6. Antioksidativna odbrana depoa WAT tokom izlaganja hladnoći i torpora

Ispitivanjem proteinskog nivoa enzima antioksidativne odbrane u visceralnim depoima WAT, zabilježeno je da i u eWAT i u rWAT dolazi do značajne indukcije GSH-Px gotovo tokom čitavog perioda izlaganja hladnoći. Slično tome, pokazano je da u rWAT nehibernatora (pacova) dolazi do indukcije GSH-Px tokom 45 dana izlaganja niskoj temperaturi (Janković i sar., 2009). Osim toga, u rWAT je detektovana i povećana proteinska ekspresija citoplazmatske SOD izoforme u periodu od 12 - 21. dana, kao i mitohondrijalne SOD od 3 - 7. dana izlaganja hladnoći. Imajući u vidu da je rWAT posebno podložan transdiferencijaciji i/ili regrutaciji „*brite/beige*” adipocita (Demas i sar., 2002), ovo povećanje mitohondrijalne SOD bi moglo ukazivati na indukciju upravo ovih ćelija u kojima je mitohondrijalni metabolizam značajno indukovano u cilju produkcije toplote. Povećan nivo MnSOD u periodu od 3 - 7. dana aklimacije koincidira sa detekcijom „*brite/beige*” adipocita. Sa druge strane, indukcija ekspresije CuZnSOD tokom produženog boravka tekunica na hladnoći (12. i 21. dan), u saglasnosti je sa ranije diskutovanom indukcijom ATP-produkujućih puteva u rWAT.

Nasuprot visceralnim depoima WAT, ekspresija svih ispitivanih komponenti AD u sWAT je značajno suprimirana tokom čitavog perioda izlaganja životinja hladnoći. Izuzetak je jedino katalaza, čija se proteinska ekspresija povećava počevši od 3. dana pa sve do kraja ispitivanog perioda. U odnosu na GSH-Px, aktivnost ovog enzima je prvenstveno vezana za veće koncentracije H₂O₂ (Halliwell and Gutteridge, 2007), kao i za peroksizomalni ćelijski kompartment (Chance i sar., 1979). Iako promjene ekspresije metaboličkih enzima, detektovane u ovoj studiji, pokazuju suprimiranje kapaciteta za glikolizu u citoplazmi i β-oksidaciju u mitohondrijama (što korelira sa suprimiranim proteinskim nivoima CuZnSOD, MnSOD i GSH-Px); povećanje katalaze ukazuje da bi peroksizomalni metabolizam u sWAT mogao imati presudnu ulogu u održanju energetske homeostaze.

5.4. Molekulsko remodeliranje jetre tokom aklimacije na nisku temperaturu i u fazi hibernacije

Jetra ima centralnu ulogu u održanju ukupne metaboličke i energetske homeostaze, te samim tim i u adaptivnim procesima koji prate termogenezu (Jansky i Hart, 1968). Primjećeno je, čak, da kod vrste torbara *Monodelphis domestica*, koji ne posjeduje BAT dolazi do hipertrofije hepatocita (Villarin i sar., 2003), dok kod pacova i hrčaka nije primjećeno povećanje mase jetre prilikom aklimacije na hladnoću (Deveci i Egginton, 2002). Jetra je

ključno mjesto oksidativnog metabolizma, na koji odlazi čak ~20% ukupne BMR (*engl.* basal metabolic rate), koji je kuplovan sa sintezom lipida, glukoze, lipoproteina veoma male gustine (*engl.* very-low density lipoprotein, VLDL) i ketonskih tijela (Couture i Hulbert, 1995). Zato jetra i jeste centralno mjesto regulacije energetskeg metabolizma. Ipak, jako malo toga se zna o ulozi jetre u metaboličkim promjenama tokom aklimacije na hladnoću i hibernacije.

5.4.1. Energetski metabolizam u jetri i njeno učešće u ukupnoj energetskoj homeostazi tokom perioda izlaganja niskoj temperaturi

Pored noradrenalina, pokazano je da tokom aklimacije na hladnoću, važnu ulogu u energetskom remodeliranju ima i pankreasni hormon - glukagon (Helman i sar., 1984; Edwards i Howland, 1986; Heppner i sar., 2010). Njegovo ključno dejstvo u uslovima povećanih energetskeg potreba organizma ogleda se kroz mobilizaciju masnih kiselina iz WAT i glukoze iz jetre (Lefebvre, 1975). Tako je kod nehibernatora primjećeno smanjenje rezervi glikogena u hepatocitima tokom izlaganja hladnoći (Hauton i sar., 2006). U saglasnosti sa ovim je detektovano povećanje proteinske ekspresije PYG u hepatocitima tekunica u periodu od 1 - 12. dana aklimacije, koje jasno ukazuje na povećano razlaganje glikogena. Takođe, tokom čitavog perioda izlaganja niskoj temperaturi zabilježeno je povećanje količine GAPDH proteina, ključnog i za glikolizu i za glukoneogenezu. Prvog dana aklimacije ovo povećanje GAPDH koincidira sa povećanjem proteinske ekspresije M subjediniice LDH, kao i povećanjem količine HIF-1 α i fosfo-AMPK α proteina, što ukazuje da je prvog dana aklimacije, GAPDH uključen u glikolitičku produkciju energije u hepatocitima, kako bi se obezbijedio energetski balans u ovim ćelijama. Nakon ovog inicijalnog perioda, od trećeg, odnosno sedmog dana aklimacije, detektovano je smanjenje proteinskog nivoa fosfo-AMPK α i HIF-1 α , respektivno, što ukazuje da se u hepatocitima vrlo brzo po izlaganju hladnoći uspostavlja energetski balans, te održanje povećane količine GAPDH, uz smanjenje količine GLUT2 i M subjediniice LDH na ili ispod kontrolnog nivoa, ukazuje na intenziviranu glukoneogenezu.

Što se tiče metabolizma lipida, smanjena proteinska ekspresija ACADM u periodu od 3 - 12. dana aklimacije ukazuje na suprimiranu β -oksidaciju u mitohondrijama hepatocita. U istom periodu je zabilježen pad i u količini ATP sintaze, što je takođe u saglasnosti sa pretpostavkom o suprimiranom mitohondrijalnom metabolizmu. Međutim, pored ovih rezultata u studiji je zabilježena indukcija proteinske ekspresije PPAR α 3. i 7.

dana izlaganja tekunica hladnoći. Ključna uloga ovog transkripcionog faktora, koji se eksprimira u mnogim metabolički aktivnim tkivima, ali najviše u jetri (Braissant i sar., 1996), je u stimulaciji oksidacije masnih kiselina (Aoyama i sar., 1998; Kersten i sar., 1999; Leone i sar., 1999; Akiyama i sar., 2001; Sugden i sar., 2002). Morfološka analiza ključnih kompartmenata oksidacije masnih kiselina - mitohondrija i peroksizoma, u jetri vrste *Jaculus orientalis* tokom izlaganja niskoj temperaturi, pokazala je da dolazi do povećanja veličine oba kompartmenta, ali da se povećava broj samo peroksizoma, ne i mitohondrija (Kabine i sar., 2003). U istoj studiji je pokazano i da u ovim uslovima dolazi do indukcije peroksizomalne (AOX aktivnost), a suprimiranja mitohondrijalne (aktivnost ACADM i CPT-I) β -oksidacije. Dakle, na osnovu svega iznesenog, jasno je da aklimacija na hladnoću specifično indukuje peroksizomalnu oksidaciju masnih kiselina. Ovo je u saglasnosti sa nepromjenjenom ekspresijom faktora mitohondrijalne dinamike (mitofuzina 1 i PGC-1 α), zabilježenoj u disertaciji tokom perioda izlaganja hladnoći. Sa druge strane, pored PPAR α , u ovoj studiji je detektovano povećanje i druge PPAR izoforme - PPAR γ , u periodu od 3 - 21. dana aklimacije na nisku temperaturu. PPAR γ , iako eksprimiran u malim količinama, u jetri ima istu funkciju u depoziciji lipida kao i u masnom tkivu (revija Wang, 2010). U saglasnosti sa ovim je i pokazana intracelularna akumulacija lipidnih kapi u jetri hibernatora *Muscardinus avellanarius* prilikom izlaganja niskoj temperaturi (Horwitz, 1976).

U fiziološkim uslovima paralelna indukcija oksidacije i sinteze masnih kiselina je spriječena tako što mitohondrijalni transportni protein - CPT-I biva inhibiran prvim intermedijerom u sintezi masnih kiselina - malonil-CoA. Međutim, ovaj „*futile cycle*“ fenomen, tj. paralelna indukcija oksidacije masnih kiselina i lipogeneze tokom aklimacije na nisku temperaturu već je nekoliko puta zabilježen u literaturi (Buckley i Rath, 1987; Yu i sar., 2002; Vučetić i sar., 2011). Takođe, interesantno je to da se i u jetri nehibernatora prilikom izlaganja hladnoći dešava paralelna oksidacija i sinteza masnih kiselina (Bedu i sar., 2001; Hauton i sar., 2006). Naši rezultati ukazuju da indukcija peroksizomalne oksidacije masnih kiselina u hepatocitima tekunica tokom aklimacije vjerovatno predstavlja način na koji hepatociti ostvaruju dualnu ulogu tokom izlaganja hladnoći: oksidacija masnih kiselina radi obezbjeđivanja goriva za sopstvene potrebe, a sa druge strane indukcija lipogeneze u cilju održanja lipidnih, s obzirom da je ovo energetsko gorivo ključno za nastupajući period hibernacije.

5.4.2. Molekulsko remodeliranje hepatocita tokom faze duboke hibernacije

Naši rezultati su pokazali da tokom produženog izlaganja hladnoći (više od dvije nedelje) u jetri tekunica dolazi do restitucije nivoa ACADM na kontrolni nivo, paralelno sa povećanjem proteinske ekspresije SCAS. Ovakav obrazac promjena zadržan je i tokom hibernacije, što ukazuje na restituciju ili čak intenziviranje oksidativnog metabolizma u mitohondrijama hepatocita tokom produženog boravka životinje na hladnoći, kao i u fazi duboke hibernacije. Ovo je u saglasnosti sa studijama koje su pokazale intenziviran lipidni metabolizam jetre tokom hibernacije (Serkova i sar., 2007; Williams i sar., 2011). Takođe, detektovano je povećanje aktivnosti mitohondrijalnog enzima β -oksidacije - ACADM, u jetri vrste *Jaculus orientalis* tokom faze duboke hibernacije (Kabine i sar., 2003); kao i povećanje broja i veličine mitohondrija hepatocita kod vrste *Muscardinus avellanarius* tokom istog perioda (Malatesta i sar., 2001); što se često dovodi u vezu sa intenziviranjem lipidnog metabolizma (Halestrap i Dunlop, 1986; Halestrap, 1987; Lončar i sar., 1988; Morroni i sar., 1995). Za ovakav fenotip jetre je najčešće odgovoran PPAR α transkripcioni faktor (Aoyama i sar., 1998; Kersten i sar., 1999; Leone i sar., 1999; Akiyama i sar., 2001; Sugden i sar., 2002), međutim, u našoj studiji zabilježeno je značajno povećanje proteinske ekspresije druge PPAR izoforme - PPAR δ , koji posreduje u metaboličkoj adaptaciji u skeletnim mišićima tokom vježbanja (Luquet i sar., 2003; Fritz i sar., 2006). Koincidencija indukcije δ izoforme PPAR (a ne PPAR α) i indukcije oksidacije masnih kiselina u jetri tekunica, kandiduje ovaj (a ne PPAR α) transkripcioni faktor za ključnu ulogu regulatora oksidativnog metabolizma hepatocita tokom faze duboke hibernacije.

Sa druge strane, iako je oksidacija lipida neraskidivo vezana sa mitohondrijalnom respiracijom; rezultati dosadašnjih studija ispitivanja OXPHOS u jetri tokom hibernacije su se pokazali nekonzistentnim. Tako, neke studije ukazuju da se brzina oksidativne fosforilacije u hepatocitima tokom hibernacije ne mijenja (Mokrasch i sar., 1960; Chaffee i sar., 1961; Chaffee i sar., 1962; Frehn i Anthony, 1962), povećava (Staples i Hochachka, 1997), ili čak smanjuje (Liu i sar., 1969; Brustovetsky i sar., 1990; Chung i sar., 2011). Međutim, naši rezultati su pokazali da se kapacitet OXPHOS u jetri životinja u hibernaciji održava na nivou kontrolnog i pored generalne supresije transkripcije/translacije u ovom organu (Knight i sar., 2000). Ovo nedvosmisleno ukazuje na važnost održanja respiratornog kapaciteta u hepatocitima u uslovima hipotermije; što u krajnjoj instanci može biti važan parametar „rezistentnog fenotipa“ jetre hibernatora, posebno ako se imaju u vidu radovi koji pokazuju da je održanje mitohondrijalne elektron-transportne funkcije

miocita jedan od ključnih „prekondicionih“ efekata koje ostvaruju anestetici (na taj način štiteći ćelije od ishemija/reperfuzija povreda) (Yabe i sar., 1997; Crestanello i sar., 2002; Jović i sar., 2012). Jedina komponenta OXPHOS čiji je proteinski nivo smanjen u uslovima hibernacije je citohrom ϵ . Imajući na umu važnost ovog molekula u procesu programirane ćelijske smrti (Liu i sar., 1996; Green i Reed; 1998; Zou i sar., 1999; Petronilli i sar., 2001), ovo smanjenje ekspresije citohoroma ϵ može biti posledica suprimiranog kapaciteta jetre za regeneraciju tokom faze torpora (Michalopoulos, 2007).

Nasuprot rezultatima vezanim za lipidni metabolizam, u hibernaciji je detektovano smanjenje proteinske ekspresije enzima ključnih za unos i razgradnju šećera: GLUT2, PDH i H subjedinic LDH. Takođe, u studiji je zabilježeno i smanjenje količine fosfo-AMPK α ispod kontrolnog nivoa, što je u saglasnosti sa smanjenjem njene aktivnosti u jetri vrste *Spermophilus tridecemlineatus* tokom hibernacije (Horman i sar., 2005). Zajedno ovi rezultati jasno ukazuju na suprimiran glikolitički fluks u hepatocitima. U prilog tome govore i studije drugih autora koje su zabilježile smanjenje aktivnosti glikolitičkih enzima u jetri tokom hibernacije: PFK, piruvat kinaze i PDH (Storey, 1987; Brooks i Storey, 1991).

Indukcija lipidnog i supresija glukoznog katabolizma u jetri, predstavlja uobičajenu metaboličku strategiju ovog organa tokom perioda gladovanja (Lyman, 1982; Hochachka i Somero, 1984). Takođe, fosforilacija (inaktivacija) piruvat kinaze i PFK, koja ima ulogu u indukciji glukoneogeneze karakteristična je kako za period hibernacije tako i za uslove gladovanja (Engstrom, 1978; Hers i Hue, 1983; Storey, 1987; Brooks i Storey, 1991). Štaviše, saglasno tome je u ovoj studiji detektovano povećanje proteinske ekspresije GAPDH, koje ukazuje prije na intenziviran glukoneogeni nego glikolitički mod, kao i zabilježeno suprimiranje ekspresije GSK3, enzima odgovornog za inhibiciju sinteze glikogena. Sve ove metaboličke promjene jasno ukazuju da u toku faze hibernacije jetra funkcioniše (očekivano) kao i u tipičnim uslovima afagije. Međutim, ono što značajno razlikuje ova dva stanja je korišćenje glukoznih rezervi u hepatocitima. Naime, poznato je da tokom gladovanja dolazi do aktivacije PYG i sledstvene, brze potrošnje rezervi glikogena (Ruderman i sar., 1977; Van de Werve i Jeanrenaud, 1984). Nasuprot tome, u ovoj studiji je detektovano i smanjenje ekspresije PYG u hibernaciji, što je u saglasnosti sa ranije detektovanim smanjenjem njegove aktivnosti (Storey, 1987), kao i održanjem rezervi glikogena u jetri (Zimmerman, 1982) tokom hibernacije. Interesantno je upravo to što kod većine sisara tokom perioda gladovanja dolazi prvo do potrošnje rezervi glikogena iz jetre i mišića (Ruderman i sar., 1977; Van de Werve i Jeanrenaud, 1984), a tek potom se pokreće

oksidacija masnih kiselina. Dakle, izgleda da se jetra hibernatora u toku faze afagije (torpor) ponaša na neki način autonomno, održavajući svoje rezerve glikogena konstantnim (Zimmerman, 1982). Sa druge strane, kod tekunica i mrmota nivo glukoze u plazmi tokom ovog perioda ostaje iznenađujuće stabilan (Tashima i sar., 1970; Krilowicz, 1985; Florant i sar., 1986; Nizielski i sar., 1989), što je vjerovatno posledica pomenutog povećanja glukoneogeneze u jetri (Engstrom, 1978; Hers i Hue, 1983; Storey, 1987; Brooks i Storey, 1991).

Nasuprot indukovanoj glukoneogenezi, naši rezultati ukazuju da se tokom faze hibernacije u jetri značajno suprimira ekspresija dva ključna enzima sinteze masnih kiselina - FAS i ACC. Naime, ranije je pokazano da se najveći dio sinteze masnih kiselina tokom ljetnje aktivne sezone dešava u jetri i BAT kod vrste *Spermophilus richardsonii* (Bintz, 1988), kao i da je doprinos jetre u ovom kontekstu najveći kod vrste *Mesocricetus auratus* u toku izlaganja hladnoći (Turner i sar., 1989). Međutim, u prilog našim rezultatima, koji ukazuju na suprimiran kapacitet hepatocita za sintezu masnih kiselina u hibernaciji, idu i studije koje su pokazale značajno smanjenje genske ekspresije svih enzima uključenih u sintezu masnih kiselina u jetri hibernirajućih vrsta u poređenju sa ljetnje-aktivnim životinjama (Williams i sar., 2005; 2010), kao i studije koje su pokazale smanjenje aktivnosti FAS u jetri tokom zimskog perioda u poređenju sa njenom aktivnošću tokom ljetnjih mjeseci (Bintz, 1988; Turner i sar., 1989; Mostafa i sar., 1993). Ovi rezultati još jednom ukazuju na značajnu autonomnost jetre tokom faze duboke hibernacije. Štaviše, naši rezultati su pokazali da se ekspresija FAS značajno povećava u svim ispitivanim depoima bijelog masnog tkiva, kao i u BAT. Ovakva indukcija ključnog enzima sinteze masnih kiselina tokom hibernacije (kada je biosinteza lipida u jetri suprimirana), u tkivima u kojima FAS pokazuje ~10 puta manju specifičnu aktivnost tokom ljeta (Wang i sar., 1997), nedvosmisleno ukazuje na veću autonomnost ne samo jetre već i BAT i WAT. Sa fiziološke tačke gledišta ovo se može objasniti smanjenim stepenom interorganske komunikacije tokom hibernacije usled: 1) smanjenja krvnog pritiska (sa 130/80 mmHg na 90/30 mmHg), 2) suprimiranja srčanog rada (na 1/60 eutermične vrijednosti) i 3) smanjenje perfuzije organa (na 10% eutermične vrijednosti) (Wang i sar., 1988).

5.4.3. Antioksidativna odbrana u jetri tokom izlaganja hladnoći i tokom faze duboke hibernacije

Nasuprot BAT i skeletnim mišićima, pa čak i depoima WAT, jetra pokazuje iznenađujuću stabilnost ekspresije svojih antioksidativnih komponenti. Naime, osim blagog

smanjenja citoplazmatske izoforme SOD tokom čitavog perioda aklimacije na hladnoću, proteinski nivo ostalih ispitivanih komponenti AD održava se konstantnim. Ovi rezultati su u saglasnosti sa prethodno detektovanim promjenama aktivnosti GSH-Px i SOD u jetri tekunica tokom izlaganja hladnoći (Buzadžić i sar., 1990). Međutim, ranije studije u našoj laboratoriji su pokazale da je bazalna SOD aktivnost u jetri i pacova i tekunica znatno veća od one detektovane u drugim tkivima (bubrezi, BAT, pluća, srce, slezina) (Petrović i sar., 1983), te je moguće da ovakav nivo antioksidativnih enzima u jetri zadovoljava njene potrebe za zaštitom od reaktivnih vrsta tokom izlaganja niskoj temperaturi.

Ključni regulator ekspresije većine antioksidativnih enzima ispitivanih u ovoj studiji (CuZnSOD i katalaza) jeste NFE2L2 (Kensler i sar., 2007; Kensler i Wakabayashi, 2010). Naši rezultati su pokazali da je njegova proteinska ekspresija značajno suprimirana tokom čitavog perioda aklimacije na hladnoću. Ovo je u saglasnosti sa identičnim smanjenjem CuZnSOD, ali ne i katalaze. Naime, kao što je već rečeno ekspresija katalaze tokom perioda aklimacije na hladnoću održava se na kontrolnom nivou. Ovakav odgovor katalaze je u saglasnosti sa ranije diskutovanim metaboličkim remodeliranjem jetre tokom aklimacije na nisku temperaturu, gdje je pokazano da peroksizomalni metabolizam masnih kiselina ima dominantnu ulogu.

Tokom hibernacije, nivo GSH-Px i MnSOD se ne mijenja, dok se proteinska ekspresija CuZnSOD, katalaze i regulatora njihove ekspresije - NFE2L2, smanjuje. Ovi rezultati su u saglasnosti sa ranije detektovanom promjenom aktivnosti CuZnSOD, MnSOD, katalaze i GSH-Px u jetri hibernirajućih tekunica (Buzadžić i sar., 1990). Takođe, značajno smanjenje aktivnosti katalaze tokom hibernacije u jetri detektovano je i kod vrsta *S. tridecemlineatus* (Page i sar., 2009) i *J. orientalis* (Kabine i sar., 2003), što ide u prilog pretpostvci o prelasku sa peroksizomalnog, na mitohondrijalni metabolizam masnih kiselina u jetri tokom hibernacije, koji je diskutovan ranije u tekstu.

6. Zaključci

Hibernator, tekunica *Spermophilus citellus*, ima izuzetnu tkivno-specifičnu plastičnost energetskog metabolizma, sa fascinantnim kapacitetom za remodeliranje koji im obezbijeduje preživljavanje u nepovoljnim uslovima sredine, bilo da su aktivni i eutermični ili letargični i hipotemični. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće:

I) Izlaganje tekunica hladnoći indukuje koordinisanu i strogo regulisanu aktivaciju tkiva/organa, ključnih za održanje energetskog balansa organizma, u cilju održanja eutermije do momenta ulaska u hibernaciju.

Mrko masno tkivo

- ✓ Hladnoća indukuje specifične molekulske i morfološke promjene u BAT. Uočljiva je pojačana termogena aktivnost tkiva na šta ukazuje indukcija proteinske i genske ekspresije UCP1, fuzija mitohondrija i hipertrofija mrkih adipocita. Ove promjene su različite u poređenju sa nehibernirajućim životinjama.
- ✓ U toku prve dvije nedelje aklimacije na hladnoću dolazi do indukcije ključnog markera termogeneze, UCP1. Mrki adipociti se nalaze u stanju energetskog disbalansa, koji nije kompenzovan metaboličkim remodeliranjem tkiva (nepromjenjena proteinska ekspresija metaboličkih enzima). Mrki adipociti u ovom periodu „svjesno“ podliježu energetskom deficitu, kako bi obavili svoju termogenu funkciju i tako sačuvali što više svojih energetskih rezervi, koje će im biti potrebne u toku hibernacije i/ili prilikom buđenja iz nje.
- ✓ Nakon inicijalnog prilagođavanja, mrki adipociti tekunica podliježu reverzibilnim promjenama koje se prije mogu posmatrati kao priprema za fazu hibernacije, nego kao faza novo-uspostavljene homeostaze. Naime, dolazi do supresije genske i proteinske ekspresije UCP1, smanjenja volumenskog udjela kapilara i proteinske ekspresije VEGF i eNOS, kao i indukcije genske i proteinske ekspresije HIF-1 α .
- ✓ Komparativna studija na nehibernirajućim životinjama (pacovi) pokazala je da BAT ovih vrsta u ranom periodu izlaganja hladnoći (prva nedelja) prolazi kroz fazu najvećih promjena, koja je strogo regulisana i pažljivo koordinisana vremenski-zavisnim promjenama u aktivnosti AMPK i HIF-1. Ove promjene obezbjeđuju postepenu indukciju termogene mašinerije i održanje novo-uspostavljene strukture i funkcije BAT u kasnoj fazi.
- ✓ Rezultati nedvosmisleno ukazuju na uključenost transkripcionih faktora (PPAR γ /PGC-1 α) u termogeni odgovor BAT hibernatora prilikom izlaganja niskoj

temperaturi. Međutim, nasuprot termogenu, metabolički odgovor tkiva nije tako jednoznačno regulisan. Pored ispitivanih transkripcionih aktivatora, postoje i neki drugi (vjerovatno supresori) koji regulišu (mitohondrijalni) metabolizam u BAT tekunica tokom izlaganja hladnoći.

- ✓ Aklimacija na nisku temperaturu, preko transkripcionog regulatora NFE2L2, vodi indukciji proteinske ekspresije antioksidativnih enzima (CuZnSOD i MnSOD), prvenstveno radi zaštite biomolekula od oštećenja pred nastupajuću fazu hibernacije, ali isto tako i kao vid molekulske pripreme za ovu hipotermično-hipometaboličku fazu.

Skeletni mišići

- ✓ Metabolički profil skeletnih mišića tekunica ne razlikuje se mnogo od onog kod nehibernatora (pacov) u ranom periodu aklimacije na hladnoću. Naime, povećanje proteinske ekspresije PDK4 i obje subjedinice LDH, kao i PYG, jasno ukazuje da mišići tekunica u ovom periodu energiju primarno obezbjeđuju iz metabolizma šećera.
- ✓ Ono što značajno razlikuje skeletne mišiće hibernirajućih vrsta jeste njihovo (ne)prilagođavanje dugotrajnom izlaganju niskoj temperaturi. Naime, produžena aklimacija na hladnoću vodi energetskom disbalansu u skeletnim mišićima tekunica, sa kojim ćelije mogu da se izbore jedino suprimiranjem puteva potrošnje ATP.
- ✓ Aklimacija na nisku temperaturu nema efekta na proteinsku ekspresiju ključnog regulatora oksidativnog metabolizma u mišićima - PPAR δ , što objašnjava zašto oksidativni metabolizam u skeletnim mišićima nije stimulisan tokom aklimacije i pored indukcije ostalih PPAR izoformi i PGC-1 α .

Bijelo masno tkivo

- ✓ U ranom periodu aklimacije na hladnoću visceralni depoi WAT se karakterišu intenzivnom lipolizom (smanjenje tjelesne mase životinja i volumenskog udjela adipocita u rWAT i eWAT) uz paralelno povećanje *de novo* sinteze masnih kiselina, čime se obezbjeđuje gorivo za termogene procese, a sami adipociti energiju obezbjeđuju glikolitičkom produkcijom ATP.
- ✓ Za razliku od visceralnih depoa, sWAT se u ovom periodu karakteriše prvenstveno skladištenjem lipida (povećanje volumenskog udjela i površine adipocitnog profila) i suprimiranjem oksidativnog metabolizma, a u cilju čuvanja lipidnih rezervi koje su od vitalnog značaja za hibernaciju i buđenje iz nje.

- ✓ U osnovi različitog obrasca oksidativnog metabolizma u visceralnim i potkožnom depou WAT nalazi se suprotan ekspresioni profil PPAR α i PPAR δ u visceralnim depouima WAT u poređenju sa sWAT.
- ✓ Od 7. dana aklimacije na hladnoću, indukcija AMPK inhibira lipolizu u visceralnim depouima WAT, a sami adipociti se „bore“ protiv ovog energetskeg disbalansa prvenstveno supresijom puteva potrošnje energije (sWAT, rWAT, eWAT), ali i indukcijom puteva produkcije ATP (eWAT i rWAT).
- ✓ Metabolički aktivniji visceralni depoi WAT se očekivano karakterišu značajnom indukcijom AD: GSH-Px u rWAT i eWAT, SODs u rWAT tokom aklimacije na hladnoću.

Jetra

- ✓ Hladnoća indukuje glukoneogeni mod jetre, čemu svjedoči indukcija GAPDH tokom čitavog aklimacionog perioda i pored smanjenja proteinskog nivoa fosfo-AMPK α , HIF-1 α , LDH M i GLUT2. Takođe, u ovim uslovima stimulisana je i sinteza masnih kiselina dejstvom lipogenog transkripcionog faktora - PPAR γ .
- ✓ Suprotno anaboličkim procesima, tokom izlaganja tekunica niskoj temperaturi oksidativni metabolizam u mitohondrijama je značajno suprimiran (smanjena ekspresija ACADM i ATP sintaze), što omogućava „čuvanje“ lipidnih rezervi za fazu hibernacije. U prilog ovome ide i značajno smanjenje proteinske ekspresije transkripcionog faktora NFE2L2, kao i enzima AD - CuZnSOD.

II) Rezultati disertacije pokazuju da supresija vitalnih funkcija tokom faze duboke hibernacije jeste povezana sa uspostavljanjem tkivne metaboličke autonomnosti, koja omogućava preživljavanje organizma tokom hipotermičnih/hipometaboličkih uslova.

Mrko masno tkivo

- ✓ U hibernaciji, mrki adipociti tekunica aktiviraju puteve oksidacije masnih kiselina, ali ne u cilju održanja energetskeg balansa, već da bi obezbijedili određeni nivo kontinuiranog dotoka elektrona elektron-transportnom lancu, radi održanja neophodnog nivoa termogeneze.
- ✓ Sa druge strane i pored toga što se radi o uslovima „gladovanja“, glikolitički put predstavlja glavni izvor energije. Za razliku od aklimacije na nisku temperaturu gdje povećanje aktivnosti AMPK ukazuje na energetskeg disbalans, u toku hibernacije čini

se da je ovaj disbalans prevaziđen i to prvenstveno koordinisanom aktivnošću transkripcionog faktora HIF-1 i indukovane „glikolitičke strategije“.

- ✓ Rezultati studije ukazuju da transkripciona kontrola u toku hibernacije igra sporednu ulogu u metaboličkoj adaptaciji mrkih adipocita, dok je glavna uloga ipak na translacionoj i post-translacionoj regulaciji metaboličkih puteva.
- ✓ Povećanje proteinske ekspresije enzima AD u BAT tokom hibernacije je spregnuto kako sa metaboličkim remodeliranjem tkiva, tako i sa neophodnošću prevencije oksidativnih oštećenja, čiji izuzetno energetski-skupi mehanizmi reparacije nisu poželjni u uslovima globalne metaboličke supresije.

Skeletni mišići

- ✓ Skeletni mišići u toku faze hibernacije povećavaju svoj oksidativni kapacitet, što je vjerovatno povezano sa odsustvom atrofije i pored dugotrajne imobilnosti tokom hibernacije.
- ✓ Indukcija oksidativnog kapaciteta mišića, praćena akumulacijom HIF-1 α i supresijom VEGF (faktora vaskularizacije), na prvi pogled može izgledati kontradiktorno, ali izgleda da se upravo ovaj mehanizam nalazi u osnovi suprimiranja metaboličke aktivnosti uz, istovremeno očuvanje funkcionalnosti mišića tokom hibernacije.
- ✓ Nakon nedelju dana izlaganja niskoj temperaturi u skeletnim mišićima dolazi do indukcije ekspresije CuZnSOD i katalaze, što se može posmatrati sa aspekta pripreme ovog važnog termogenog organa za stanje neaktivnosti, tj. sa aspekta njihovog prekondicioniranja.

Bijelo masno tkivo

- ✓ Rezultati vezani za metaboličko reprogramiranje depoa WAT sugerišu da metabolizam šećera ima važnu ulogu u održanju energetske ravnoteže u samim adipocitima.
- ✓ Za razliku od visceralnih depoa, sWAT u mnogo većoj mjeri zavisi od mitohondrijalnog metabolizma, te se za njega može reći da se u fazi hibernacije ponaša „sebično”, koristeći lipidne rezerve prvenstveno za svoje potrebe.
- ✓ Indukcija oksidativnog metabolizma u sWAT je posledica povećanja (PPAR α), odnosno restitucije proteinske ekspresije transkripcionih faktora (PPAR δ i NRF2) koji su odgovorni za indukciju oksidativnog metabolizma i respiratornog fluksa.

Jetra

- ✓ Rezultati su pokazali da u hibernaciji jetra ostvaruje veoma sličnu metaboličku strategiju kao pri uslovima gladovanja: indukcija katabolizma lipida i supresija razlaganja glukoze, uz istovremenu indukciju glukoneogeneze. Tome svjedoči:
 - restitucija nivoa ACADM proteina i povećana proteinska ekspresija SCAS;
 - smanjenje proteinske ekspresije ključnih (faktora) enzima za preuzimanje i razgradnju šećera: GLUT2, PDH i LDH H;
 - smanjenje količine proteina fosfo-AMPK α ispod kontrolnog nivoa.
- ✓ Značajnu razliku između hibernacije i tipičnih promena pri gladovanju predstavlja nekorišćenje rezervi glikogena tokom torpora, o čemu govori smanjenje količine PYG proteina, ključnog za razgradnju glikogena.
- ✓ Tokom hibernacije u jetri je takođe suprimiran kapacitet za sintezu masnih kiselina (suprimirana proteinska ekspresija ACC i FAS), a ovu funkciju jetra „predaje“ WAT i BAT. Može se reći da u hibernaciji jetra „gubi“ centralnu ulogu u koordinaciji lipidnog metabolizma.

Generalno se može zaključiti da energetske metabolizam hibernatora predstavlja centralnu osovinu fiziološke plastičnosti koja im omogućava brojne prednosti u odnosu na nehibernirajuće srodnike.

Lipidni metabolizam je ključan i za period intenzivne termogeneze, ali posebno za fazu hibernacije, međutim, rezultati disertacije jasno pokazuju da glukozni metabolizam, čak i u uslovima afagije, predstavlja važnu komponentu energetske homeostaze.

Na osnovu rezultata disertacije, može se zaključiti da se regulatorni mehanizmi koji omogućavaju tkivno metaboličko remodeliranje hibernatorima u uslovima aklimacije na nisku temperaturu i u hibernaciji umnogome razlikuju, pri čemu je transkripciona kontrola ključna za aklimaciju, a translaciona i post-translaciona za uslove duboke hibernacije.

7. Literatura

- Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 2000, 11(8):327-32.
- Aizencang G, Solis C, Bishop DF, Warner C, Desnick RJ. Human uroporphyrinogen-III synthase: genomic organization, alternative promoters, and erythroid-specific expression. *Genomics.* 2000, 70(2):223-31.
- Akimoto T, Pohnert SC, Li P, Zhang M, Gumbs C, Rosenberg PB, Williams RS, Yan Z. Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J Biol Chem.* 2005, 280(20):19587-93.
- Akiyama TE, Nicol CJ, Fievet C, Staels B, Ward JM, Auwerx J, Lee SS, Gonzalez FJ, Peters JM. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha regulates lipid homeostasis, but is not associated with obesity: studies with congenic mouse lines. *J Biol Chem.* 2001, 276(42):39088-93.
- Andrews MT, Squire TL, Bowen CM, Rollins MB. Low-temperature carbon utilization is regulated by novel gene activity in the heart of a hibernating mammal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998, 95(14):8392-7.
- Aoyama T, Peters JM, Iritani N, Nakajima T, Furihata K, Hashimoto T, Gonzalez FJ. Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *J Biol Chem.* 1998, 273(10):5678-84.
- Arner P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. *Ann Med.* 1995, 27(4):435-8.
- Aruoma OI. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Radic Biol Med.* 1996, 20(5):675-705.
- Au HC, Scheffler IE. Promoter analysis of the human succinate dehydrogenase iron-protein gene--both nuclear respiratory factors NRF-1 and NRF-2 are required. *Eur J Biochem.* 1998, 251(1-2):164-74.
- Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M, Kelly DP, Holloszy JO. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J.* 2002, 16(14):1879-86.
- Bamshad M, Aoki VT, Adkison MG, Warren WS, Bartness TJ. Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue. *Am J Physiol.* 1998, 275(1 Pt 2):R291-9.
- Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell.* 1999, 4(4):585-95.
- Barak Y, Liao D, He W, Ong ES, Nelson MC, Olefsky JM, Boland R, Evans RM. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002, 99(1):303-8.
- Bartness TJ, Hamilton JM, Wade GN, Goldman BD. Regional differences in fat pad responses to short days in Siberian hamsters. *Am J Physiol.* 1989, 257(6 Pt 2):R1533-40.
- Bartness TJ, Bamshad M. Innervation of mammalian white adipose tissue: implications for the regulation of total body fat. *Am J Physiol.* 1998, 275(5 Pt 2):R1399-411.
- Bauer VW, Squire TL, Lowe ME, Andrews MT. Expression of a chimeric retroviral-lipase mRNA confers enhanced lipolysis in a hibernating mammal. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001, 281(4):R1186-92.
- Bedu E, Cohen-Adad F, Dallevet G, Garin D, Barre H, Duchamp C. Effect of cold-acclimation on oxygen uptake and glucose production of perfused duckling liver. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2001, 128(4):851-61.
- Ben-Yosef Y, Lahat N, Shapiro S, Bitterman H, Miller A. Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation. *Circ Res.* 2002, 90(7):784-91.
- Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med.* 2002, 53:409-35.
- Bergeron R, Ren JM, Cadman KS, Moore IK, Perret P, Pypaert M, Young LH, Semenkovich CF, Shulman GI. Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001, 281(6):1340-6.
- Bernson SM, Nicholls DG. Acetate, a major end product of fatty-acid oxidation in hamster brown-adipose-tissue mitochondria. *Eur J Biochem.* 1974, 47(3):517-25.
- Berra E, Pages G, Pouyssegur J. MAP kinases and hypoxia in the control of VEGF expression. *Cancer Metastasis Rev.* 2000, 19(1-2):139-45.
- Bianchi L, Tacchini L, Cairo G. HIF-1-mediated activation of transferrin receptor gene transcription by iron chelation. *Nucleic Acids Res.* 1999, 27(21):4223-7.
- Bintz GL. Lipid synthesis and deposition by adult Richardson's ground squirrels in the natural environment. *J Comp Physiol B.* 1988, 158(2):199-204.

- Blackstone E, Morrison M, Roth MB. H₂S induces a suspended animation-like state in mice. *Science*. 2005, 308(5721):518.
- Bonawitz ND, Clayton DA, Shadel GS. Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery. *Mol Cell*. 2006, 24(6):813-25.
- Borgmann U, Moon TW, Laidler KJ. Molecular kinetics of beef heart lactate dehydrogenase. *Biochemistry*. 1974, 13(25):5152-8.
- Bosello O, Zamboni M. Visceral obesity and metabolic syndrome. *Obes Rev*. 2000, 1(1):47-56.
- Brahimi-Horn C, Mazure N, Pouyssegur J. Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications. *Cell Signal*. 2005, 17(1):1-9.
- Brahimi-Horn MC, Bellot G, Pouyssegur J. Hypoxia and energetic tumour metabolism. *Curr Opin Genet Dev*. 2011, 21(1):67-72.
- Braidotti G, Borthwick IA, May BK. Identification of regulatory sequences in the gene for 5-aminolevulinic acid synthase from rat. *J Biol Chem*. 1993, 268(2):1109-17.
- Braissant O, Fougère F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*. 1996, 137(1):354-66.
- Brauch KM, Dhruv ND, Hanse EA, Andrews MT. Digital transcriptome analysis indicates adaptive mechanisms in the heart of a hibernating mammal. *Physiol Genomics*. 2005, 23(2):227-34.
- Brooks SP, Storey KB. A quantitative evaluation of the effect of enzyme complexes on the glycolytic rate in vivo: mathematical modeling of the glycolytic complex. *J Theor Biol*. 1991, 149(3):361-75.
- Brooks SP, Storey KB. A kinetic description of sequential, reversible, Michaelis-Menten reactions: practical application of theory to metabolic pathways. *Mol Cell Biochem*. 1992, 115(1):43-8.
- Brustovetsky NN, Amerkhanov ZG, Popova EYu, Konstantinov AA. Reversible inhibition of electron transfer in the ubiquinol. Cytochrome *c* reductase segment of the mitochondrial respiratory chain in hibernating ground squirrels. *FEBS Lett*. 1990, 263(1):73-6.
- Buck MJ, Squire TL, Andrews MT. Coordinate expression of the PDK4 gene: a means of regulating fuel selection in a hibernating mammal. *Physiol Genomics* 2002, 8:5-13.
- Buckley MG, Rath EA. Regulation of fatty acid synthesis and malonyl-CoA content in mouse brown adipose tissue in response to cold-exposure, starvation or re-feeding. *Biochem J*. 1987, 243(2):437-42.
- Bukowiecki LJ, Geloën A, Collet AJ. Proliferation and differentiation of brown adipocytes from interstitial cells during cold acclimation. *Am J Physiol*. 1986, 250(6 Pt 1):C880-7.
- Bunn HF, Poyton RO. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev*. 1996, 76(3):839-85.
- Buzadžić B, Spasić M, Saičić ZS, Radojičić R, Petrović VM, Halliwell B. Antioxidant defenses in the ground squirrel *Citellus citellus*. 2. The effect of hibernation. *Free Radic Biol Med*. 1990, 9(5):407-13.
- Cameron IL, Smith RE. Cytological responses of brown fat tissue in cold-exposed rats. *J Cell Biol*. 1964, 23:89-100.
- Cannon B, Nedergaard J. The biochemistry of an inefficient tissue: brown adipose tissue. *Essays Biochem*. 1985, 20:110-64.
- Cannon B, Bengtsson T, Bronnikov G, Svoboda P, Zhao J, Nedergaard J. Non-shivering thermogenesis in a hibernator, the golden hamster: mediation exclusively through beta 3-adrenergic receptors which are desensitized due to cold acclimation. In: Geiser F, Hulbert AJ, Nicol SC, editors. Adaptation to cold. Armidale: University of New England Press. 1996, pp 271-279.
- Carey HV, Andrews MT, Martin SL. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol Rev*. 2003, 83(4):1153-81.
- Carneheim C, Nedergaard J, Cannon B. Beta-adrenergic stimulation of lipoprotein lipase in rat brown adipose tissue during acclimation to cold. *Am J Physiol*. 1984, 246(4 Pt 1):E327-33.
- Carter RS, Bhat NK, Basu A, Avadhani NG. The basal promoter elements of murine cytochrome *c* oxidase subunit IV gene consist of tandemly duplicated ets motifs that bind to GABP-related transcription factors. *J Biol Chem*. 1992, 267(32):23418-26.
- Cawthorne MA. Does brown adipose tissue have a role to play in glucose homeostasis? *Proc Nutr Soc*. 1989, 48(2):207-14.
- Chaffee RR, Hoch FL, Lyman CP. Mitochondrial oxidative enzymes and phosphorylations in cold exposure and hibernation. *Am J Physiol*. 1961, 201:29-32.
- Chaffee RR. Mitochondrial changes during the process of awakening from hibernation. *Nature*. 1962, 196:789-90.

- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979, 59(3):527-605.
- Chavez JC, LaManna JC. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in the rat cerebral cortex after transient global ischemia: potential role of insulin-like growth factor-1. *J Neurosci.* 2002, 22(20):8922-31.
- Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science.* 2001, 294(5548):1866-70.
- Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem.* 2001, 276(12):9519-25.
- Choi I, Lee K, Kim M, Lee M, Park K. Differential activation of stress-responsive signalling proteins associated with altered loading in a rat skeletal muscle. *J Cell Biochem.* 2005, 96(6):1231-43.
- Christian SL, Ross AP, Zhao HW, Kristenson HJ, Zhan X, Rasley BT, Bickler PE, Drew KL. Arctic ground squirrel (*Spermophilus parryi*) hippocampal neurons tolerate prolonged oxygen-glucose deprivation and maintain baseline ERK1/2 and JNK activation despite drastic ATP loss. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008, 28(7):1307-19.
- Chung D, Lloyd GP, Thomas RH, Guglielmo CG, Staples JF. Mitochondrial respiration and succinate dehydrogenase are suppressed early during entrance into a hibernation bout, but membrane remodeling is only transient. *J Comp Physiol B.* 2011, 181(5):699-711.
- Churchill TA, Cheetham KM, Simpkin S, Green CJ, Wang LC, Fuller BJ. Liver metabolism in cold hypoxia: a comparison of energy metabolism and glycolysis in cold-sensitive and cold-resistant mammals. *J Comp Physiol B.* 1994, 164(5):396-404.
- Coe NR, Simpson MA, Bernlohr DA. Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J Lipid Res.* 1999, 40(5):967-72.
- Combs CK, Bates P, Karlo JC, Landreth GE. Regulation of beta-amyloid stimulated proinflammatory responses by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Neurochem Int.* 2001, 39(5-6):449-57.
- Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res.* 2001, 49(3):507-21.
- Cooney GJ, Caterson ID, Newsholme EA. The effect of insulin and noradrenaline on the uptake of 2-[1-14C]deoxyglucose in vivo by brown adipose tissue and other glucose-utilising tissues of the mouse. *FEBS Lett.* 1985, 188(2):257-61.
- Corton JM, Gillespie JG, Hardie DG. Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. *Curr Biol.* 1994, 4(4):315-24.
- Cottle M, Carlson LD. Turnover of thyroid hormone in cold-exposed rats determined by radioactive iodine studies. *Endocrinology.* 1956, 59(1):1-11.
- Couture P, Hulbert AJ. Relationship between body mass, tissue metabolic rate, and sodium pump activity in mammalian liver and kidney. *Am J Physiol.* 1995, 268(3 Pt 2):R641-50.
- Crawford FI, Hodgkinson CL, Ivanova E, Logunova LB, Evans GJ, Steinlechner S, Loudon AS. Influence of torpor on cardiac expression of genes involved in the circadian clock and protein turnover in the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Physiol Genomics.* 2007, 31(3):521-30.
- Crestanello JA, Doliba NM, Babsky AM, Doliba NM, Niibori K, Whitman GJ, Osbakken MD. Ischemic preconditioning improves mitochondrial tolerance to experimental calcium overload. *J Surg Res.* 2002, 103(2):243-51.
- Daan S, Barnes BM, Strijkstra AM. Warming up for sleep? Ground squirrels sleep during arousals from hibernation. *Neurosci Lett.* 1991, 128(2):265-8.
- Dang CV, Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci.* 1999, 24(2):68-72.
- Dark J, Miller DR, Lewis DA, Fried SK, Bunkin D. Noradrenaline-induced lipolysis in adipose tissue is suppressed at hibernation temperatures in ground squirrels. *J Neuroendocrinol.* 2003, 15(5):451-8.
- Dark J. Annual lipid cycles in hibernators: integration of physiology and behavior. *Annu Rev Nutr.* 2005, 25:469-97.
- Daval M, Diot-Dupuy F, Bazin R, Hainault I, Viollet B, Vaulont S, Hajduch E, Ferre P, Foufelle F. Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes. *J Biol Chem.* 2005, 280(26):25250-7.
- Demas GE, Bowers RR, Bartness TJ, Gettys TW. Photoperiodic regulation of gene expression in brown and white adipose tissue of Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002, 282(1):R114-21.
- Depocas F, Hart J S., Heroux O. Cold Acclimation and the Electromyogram of Unanesthetized Rats. *J Appl Physiol.* 1956a, 9(3):404-8.

- Depocas F, Hart JS, Heroux O. Metabolism and muscle activity of anesthetized warm and cold acclimated rats on exposure to cold. *J Appl Physiol.* 1956b, 9(3):399-403.
- Depocas F. The calorogenic response of cold-acclimated white rats to infused noradrenaline. *Can J Biochem Physiol.* 1960, 38:107-14.
- Deveci D, Egginton S. Differing mechanisms of cold-induced changes in capillary supply in *m. tibialis anterior* of rats and hamsters. *J Exp Biol.* 2002, 205(Pt 6):829-40.
- Deveci D, Egginton S. Cold exposure differentially stimulates angiogenesis in glycolytic and oxidative muscles of rats and hamsters. *Exp Physiol.* 2003, 88(6):741-6.
- Dicker A, Cannon B, Nedergaard J. Cold acclimation-recruited non-shivering thermogenesis: the Syrian hamster is not an exception. *Am J Physiol.* 1995; 269:767-74.
- Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell.* 1992, 68(5):879-87.
- Dubois R. Physiologie compare de la marmotte. *Ann. de l'Univ. de Lyon.* Paris: Masson, 1896, pp 1-268.
- Dutta-Roy AK, Huang Y, Dunbar B, Trayhurn P. Purification and characterization of fatty acid-binding proteins from brown adipose tissue of the rat. *Biochim Biophys Acta.* 1993, 1169(1):73-9.
- Eddy SF, Morin P Jr, Storey KB. Differential expression of selected mitochondrial genes in hibernating little brown bats, *Myotis lucifugus*. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* 2006, 305(8):620-30.
- Edwards CI, Howland RJ. Adaptive changes in insulin and glucagon secretion during cold acclimation in the rat. *Am J Physiol.* 1986, 250(6 Pt 1):E669-76.
- Elbehti-Green A, Au HC, Mascarello JT, Ream-Robinson D, Scheffler IE. Characterization of the human SDHC gene encoding of the integral membrane proteins of succinate-quinone oxidoreductase in mitochondria. *Gene.* 1998, 213(1-2):133-40.
- Engstrom L. The regulation of liver pyruvate kinase by phosphorylation--dephosphorylation. *Curr Top Cell Regul.* 1978, 13:28-51.
- Epperson LE, Karimpour-Fard A, Hunter LE, Martin SL. Metabolic cycles in a circannual hibernator. *Physiol Genomics.* 2011, 43(13):799-807.
- Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med.* 2004, 10(4):355-61.
- Fahlman A, Storey JM, Storey KB. Gene up-regulation in heart during mammalian hibernation. *Cryobiology.* 2000, 40(4):332-42.
- Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* 2006, 4(4):263-73.
- Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res.* 1999, 59(16):3915-8.
- Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989, 161(2):851-8.
- Ferre P, Burnol AF, Leturque A, Terretaz J, Penicaud L, Jeanrenaud B, Girard J. Glucose utilization in vivo and insulin-sensitivity of rat brown adipose tissue in various physiological and pathological conditions. *Biochem J.* 1986, 233(1):249-52.
- Finck BN, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. *Circulation.* 2007, 115(19):2540-8.
- Fitts RH, Riley DR, Widrick JJ. Functional and structural adaptations of skeletal muscle to microgravity. *J Exp Biol.* 2001, 204(Pt 18):3201-8.
- Florant GL, Hoo-Paris R, Castex C, Bauman WA, Sutter BC. Pancreatic A and B cell stimulation in euthermic and hibernating marmots (*Marmota flaviventris*): effects of glucose and arginine administration. *J Comp Physiol B.* 1986, 156(3):309-14.
- Fogarty S, Hardie DG. Development of protein kinase activators: AMPK as a target in metabolic disorders and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2010, 1804(3):581-91.
- Foretz M, Carling D, Guichard C, Ferre P, Foufelle F. AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *Biol Chem.* 1998, 273(24):14767-71.
- Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell.* 1995, 83(5):803-12.
- Foster DO, Frydman ML. Tissue distribution of cold-induced thermogenesis in conscious warm- or cold-acclimated rats reevaluated from changes in tissue blood flow: the dominant role of brown adipose tissue in the replacement of shivering by nonshivering thermogenesis. *Can J Physiol Pharmacol.* 1979, 57(3):257-70.

- Frank CL, Storey KB. The optimal depot fat composition for hibernation by golden-mantled ground squirrels (*Spermophilus lateralis*). *J Comp Physiol B*. 1995, 164(7):536-42.
- Freedland ES. Role of a critical visceral adipose tissue threshold (CVATT) in metabolic syndrome: implications for controlling dietary carbohydrates: a review. *Nutr Metab (Lond)*. 2004, 1(1):12.
- Freeman M, Meredith MJ. Subcellular localization of glutathione and thermal sensitivity. *Radiat Res*. 1988, 115:461–471.
- Frehn JL, Anthony A. Respiration and phosphorylation of liver mitochondria from cold-exposed rats and chipmunks. *Am J Physiol*. 1962, 203:821-4.
- Fritz T, Krämer DK, Karlsson HK, Galuska D, Engfeldt P, Zierath JR, Krook A. Low-intensity exercise increases skeletal muscle protein expression of PPARdelta and UCP3 in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Res Rev*. 2006, 22(6):492-8.
- Furukawa H, Todo S, Imventarza O, Wu YM, Scotti C, Day R, Starzl TE. Cold ischemia time vs outcome of human liver transplantation using UW solution. *Transplant Proc*. 1991, 23(1 Pt 2):1550-1.
- Galster WA, Morrison P. Cyclic changes in carbohydrate concentrations during hibernation in the arctic ground squirrel. *Am J Physiol*. 1970, 218(4):1228-32.
- Galster W, Morrison PR. Gluconeogenesis in arctic ground squirrels between periods of hibernation. *Am J Physiol*. 1975, 228(1):325-30.
- Gammell P. MicroRNAs: recently discovered key regulators of proliferation and apoptosis in animal cells: Identification of miRNAs regulating growth and survival. *Cytotechnology*. 2007, 53(1-3):55-63.
- Gaspari M, Larsson NG, Gustafsson CM. The transcription machinery in mammalian mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2004, 1659(2-3):148-52.
- Gauthier MS, Miyoshi H, Souza SC, Cacicedo JM, Saha AK, Greenberg AS, Ruderman NB. AMP-activated protein kinase is activated as a consequence of lipolysis in the adipocyte: potential mechanism and physiological relevance. *J Biol Chem*. 2008, 283(24):16514-24.
- Geiser F. Reduction of metabolism during hibernation and daily torpor in mammals and birds: temperature effect or physiological inhibition? *J Comp Physiol B*. 1988, 158(1):25-37.
- Geiser F. Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. *Annu Rev Physiol*. 2004, 66:239-74.
- Gessner K. Conradi Gesneri medici Tigurine Historiae Animalium Lib. I de Quadripedibus uiuiparis. 1551, 842.
- Giordano FJ, Johnson RS. Angiogenesis: the role of the microenvironment in flipping the switch. *Curr Opin Genet Dev*. 2001, 11(1):35-40.
- Glanemann M, Langrehr JM, Stange BJ, Neumann U, Settmacher U, Steinmüller T, Neuhaus P. Clinical implications of hepatic preservation injury after adult liver transplantation. *Am J Transplant*. 2003, 3(8):1003-9.
- Gluck EF, Stephens N, Swoap SJ. Peripheral ghrelin deepens torpor bouts in mice through the arcuate nucleus neuropeptide Y signaling pathway. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006, 291(5):R1303-9.
- Gospodarowicz D, Lau K. Pituitary follicular cells secrete both vascular endothelial growth factor and follistatin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989, 165(1):292-8.
- Goto M, Terada S, Kato M, Katoh M, Yokozeki T, Tabata I, Shimokawa T. cDNA Cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000, 274(2):350-4.
- Green C. Mammalian hibernation: lessons for organ preparation? *Cryo Letters*. 2000, 21(2):91-8.
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998, 281(5381):1309-12.
- Griggio MA. The participation of shivering and nonshivering thermogenesis in warm and cold-acclimated rats. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. 1982, 73(3):481-4.
- Grodums EI. Ultrastructural changes in the mitochondria of brown adipose cells during the hibernation cycle of *Citellus lateralis*. *Cell Tissue Res*. 1977, 185(2):231-7.
- Guan HP, Li Y, Jensen MV, Newgard CB, Steppan CM, Lazar MA. A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nat Med*. 2002, 8(10):1122-8.
- Guan Y, Hickey MJ, Borgstahl GE, Hallewell RA, Lepock JR, O'Connor D, Hsieh Y, Nick HS, Silverman DN, Tainer JA. Crystal structure of Y34F mutant human mitochondrial manganese superoxide dismutase and the functional role of tyrosine 34. *Biochemistry*. 1998, 37(14):4722-30.
- Halestrap AP, Dunlop JL. Intramitochondrial regulation of fatty acid beta-oxidation occurs between flavoprotein and ubiquinone. A role for changes in the matrix volume. *Biochem J*. 1986, 239(3):559-65.

- Halestrap AP. The regulation of the oxidation of fatty acids and other substrates in rat heart mitochondria by changes in the matrix volume induced by osmotic strength, valinomycin and Ca²⁺. *Biochem J.* 1987, 244(1):159-64.
- Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* 1990, 280(1):1-8.
- Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med.* 1992, 119(6):598-620.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, editori. Free radicals in biology and medicine. New York: *Oxford University Press*; 2007.
- Haman F, Peronnet F, Kenny GP, Massicotte D, Lavoie C, Weber JM. Partitioning oxidative fuels during cold exposure in humans: muscle glycogen becomes dominant as shivering intensifies. *J Physiol.* 2005, 566(Pt 1):247-56.
- Hardie DG, Carling D, Carlson M. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem.* 1998, 67:821-55.
- Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett.* 2003, 546(1):113-20.
- Harken AH. Lactic acidosis. *Surg Gynecol Obstet.* 1976, 42(4):593-606.
- Hauton D, Richards SB, Egginton S. The role of the liver in lipid metabolism during cold acclimation in non-hibernator rodents. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2006, 144(3):372-81.
- Heldmaier G, Ruf T. Body temperature and metabolic rate during natural hypothermia in endotherms. *J Comp Physiol B.* 1992, 162(8):696-706.
- Heldmaier G, Ortmann S, Elvert R. Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals. *Respir Physiol Neurobiol.* 2004, 141(3):317-29.
- Helman A, Gilbert M, Pfister-Lemaire N, Reach G, Assan R. Glucagon and insulin secretion and their biological activities in hypothermic rats. *Endocrinology.* 1984, 115(5):1722-8.
- Hems DA, Rath EA, Verrinder TR. Fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of normal and genetically obese (ob/ob) mice during the 24-hour cycle. *Biochem J.* 1975, 150(2):167-73.
- Hensel H. Temperature reception and thermal comfort. *Arch Sci Physiol (Paris).* 1973, 27(4):359-70.
- Heppner KM, Habegger KM, Day J, Pfluger PT, Perez-Tilve D, Ward B, Gelfanov V, Woods SC, DiMarchi R, Tschöp M. Glucagon regulation of energy metabolism. *Physiol Behav.* 2010, 100(5):545-8.
- Hers HG, Hue L. Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Annu Rev Biochem.* 1983, 52:617-53.
- Hershey JD, Robbins CT, Nelson OL, Lin DC. Minimal seasonal alterations in the skeletal muscle of captive brown bears. *Physiol Biochem Zool.* 2008, 81(2):138-47.
- Hershey JD, Robbins CT, Nelson OL, Lin DC. Minimal seasonal alterations in the skeletal muscle of captive brown bears. *Physiol Biochem Zool.* 2008, 81(2):138-47.
- Himms-Hagen J. Lipid metabolism during cold-exposure and during cold-acclimation. *Lipids.* 1972, 7(5):310-23.
- Himms-Hagen J. Cellular thermogenesis. *Annu. Rev. Physiol.* 1976; 38:315-51.
- Himms-Hagen J. Brown adipose tissue and cold-acclimation. In: Brown adipose tissue (P Trayhurn, DG Nicholls, eds), London: *Edward Arnold*, 1986, pp 214-268.
- Himms-Hagen J. Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. *FASEB J.* 1990, 4(11):2890-8.
- Hindle AG, Karimpour-Fard A, Epperson LE, Hunter LE, Martin SL. Skeletal muscle proteomics: carbohydrate metabolism oscillates with seasonal and torpor-arousal physiology of hibernation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011, 301(5):R1440-52.
- Hirawake H, Taniwaki M, Tamura A, Amino H, Tomitsuka E, Kita K. Characterization of the human SDHD gene encoding the small subunit of cytochrome b (cybS) in mitochondrial succinate-ubiquinone oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta.* 1999, 1412(3):295-300.
- Hissa R, Hirsimäki P. Calorigenic effects of noradrenaline and inderal in the temperature-acclimated golden hamster. *Comp Gen Pharmacol.* 1971, 2(6):217-24.
- Hittel D, Storey KB. Differential expression of adipose- and heart-type fatty acid binding proteins in hibernating ground squirrels. *Biochim Biophys Acta.* 2001, 1522(3):238-43.
- Hittel DS, Storey KB. Differential expression of mitochondria-encoded genes in a hibernating mammal. *J Exp Biol.* 2002, 205(Pt 11):1625-31.

- Hochachka PW, Somero GN. Biochemical Adaptations. Princeton NJ: *Princeton University Press*, 1984, pp 537.
- Hofmann B, Hecht HJ, Flohe L. Peroxiredoxins. *Biol Chem*. 2002, 383(3-4):347-64.
- Holst D, Luquet S, Nogueira V, Kristiansen K, Leverve X, Grimaldi PA. Nutritional regulation and role of peroxisome proliferator-activated receptor delta in fatty acid catabolism in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*. 2003, 1633(1):43-50.
- Hoo-Paris R, Castex Ch, Sutter BC. Plasma glucose and insulin in the hibernating hedgehog. *Diabetes Metab*. 1978, 4(1):13-8.
- Horman S, Hussain N, Dilworth SM, Storey KB, Rider MH. Evaluation of the role of AMP-activated protein kinase and its downstream targets in mammalian hibernation. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2005, 142(4):374-82.
- Horwitz BA. The effect of cold exposure on liver mitochondrial and peroxisomal distribution in the rat, hamster and bat. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. 1976, 54(1):45-8.
- Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE, Spiegelman BM. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science*. 1996, 274(5291):1377-9.
- Hsieh AC, Carlson LD, Gray G. Role of the sympathetic nervous system in the control of chemical regulation of heat production. *Am J Physiol*. 1957, 190(2):247-51.
- Hsieh Y, Guan Y, Tu C, Bratt PJ, Angerhofer A, Lepock JR, Hickey MJ, Tainer JA, Nick HS, Silverman DN. Probing the active site of human manganese superoxide dismutase: the role of glutamine 143. *Biochemistry*. 1998, 37(14):4731-9.
- Hu J, Discher DJ, Bishopric NH, Webster KA. Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998, 245(3):894-9.
- Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem*. 1996, 271(50):32253-9.
- Hur W, Gray NS. Small molecule modulators of antioxidant response pathway. *Curr Opin Chem Biol*. 2011, 15(1):162-73.
- Imbeault P, Couillard C, Tremblay A, Despres JP, Mauriege P. Reduced alpha(2)-adrenergic sensitivity of subcutaneous abdominal adipocytes as a modulator of fasting and postprandial triglyceride levels in men. *J Lipid Res*. 2000, 41(9):1367-75.
- Inaternet stranica http://www.bio.miami.edu/tom/courses/bil265/bil265goods/04_thermal2.html
- Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 1990, 347(6294):645-50.
- James DE, Strube M, Mueckler M. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature*. 1989, 338(6210):83-7.
- Janković A, Buzadžić B, Korać A, Petrović V, Vasiljević V, Korać B. Antioxidative defense organization in retroperitoneal white adipose tissue during acclimation to cold—The involvement of l-arginine/NO pathway. 2009, 34(7):358-65.
- Janković A, Korać A, Buzadžić B, Otašević V, Stančić A, Vučetić M, Markelić M, Veličković K, Golić I, Korać B. Endocrine and metabolic signaling in retroperitoneal white adipose tissue remodeling during cold acclimation. *J Obes*. 2013:937572.
- Jansky L, Hart JS. Cardiac output and organ blood flow in warm- and cold-acclimated rats exposed to cold. *Can J Physiol Pharmacol*. 1968, 46(4):653-9.
- Jansky L. Non-shivering thermogenesis and its thermoregulatory significance. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 1973, 48(1):85-132.
- Johansson B. Brown fat: a review. *Metabolism*. 1959, 8(3):221-40.
- Johnson P. Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2002, 133(4):493-505.
- Josko J, Gwozdz B, Jedrzejowska-Szypulka H, Hendryk S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med Sci Monit*. 2000, 6(5):1047-52.
- Jović M, Stančić A, Nenadić D, Cekić O, Nezić D, Milojević P, Mićović S, Buzadžić B, Korać A, Otašević V, Janković A, Vučetić M, Veličković K, Golić I, Korać B. Mitochondrial molecular basis of sevoflurane and propofol cardioprotection in patients undergoing aortic valve replacement with cardiopulmonary bypass. *Cell Physiol Biochem*. 2012, 29(1-2):131-42.

- Kabine M, Clemencet MC, Bride J, El Kebbjaj MS, Latruffe N, Cherkaoui-Malki M. Changes of peroxisomal fatty acid metabolism during cold acclimatization in hibernating jerboa (*Jaculus orientalis*). *Biochimie*. 2003, 85(7):707-14.
- Kabine M, El Kebbjaj Z, Oaxaca-Castillo D, Clemencet MC, El Kebbjaj MS, Latruffe N, Cherkaoui-Malki M. Peroxisome proliferator-activated receptors as regulators of lipid metabolism; tissue differential expression in adipose tissues during cold acclimatization and hibernation of jerboa (*Jaculus orientalis*). *Biochimie*. 2004, 86(11):763-70.
- Kaikaus RM, Bass NM, Ockner RK. Functions of fatty acid binding proteins. *Experientia*. 1990, 46(6):617-30.
- Kajimura S, Seale P, Kubota K, Lunsford E, Frangioni JV, Gygi SP, Spiegelman BM. Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-beta transcriptional complex. *Nature*. 2009, 460(7259):1154-8.
- Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L. Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997, 94(11):5667-72.
- Kansanen E, Kivela AM, Levonen AL. Regulation of Nrf2-dependent gene expression by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *Free Radic Biol Med*. 2009, 47(9):1310-7.
- Kansanen E, Jyrkkanen HK, Levonen AL. Activation of stress signaling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids. *Free Radic Biol Med*. 2012, 52(6):973-82.
- Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen AL. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol*. 2013, 1(1):45-49.
- Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*. 2006, 70(5):1469-80.
- Kelly DP, Scarpulla RC. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev*. 2004, 18(4):357-68.
- Kemp BE, Mitchelhill KI, Stapleton D, Michell BJ, Chen ZP, Witters LA. Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. *Trends Biochem Sci*. 1999, 24(1):22-5.
- Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007, 47:89-116.
- Kensler TW, Wakabayashi N. Nrf2: friend or foe for chemoprevention? *Carcinogenesis*. 2010, 31(1):90-9.
- Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest*. 1999, 103(11):1489-98.
- Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature*. 2000, 405(6785):421-4.
- Kietzmann T, Roth U, Jungermann K. Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes. *Blood*. 1999, 94(12):4177-85.
- Kim YI, Lee FN, Choi WS, Lee S, Youn JH. Insulin regulation of skeletal muscle PDK4 mRNA expression is impaired in acute insulin-resistant states. *Diabetes*. 2006, 55(8):2311-7.
- Kline DD, Peng YJ, Manalo DJ, Semenza GL, Prabhakar NR. Defective carotid body function and impaired ventilatory responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002, 99(2):821-6.
- Klingenspor M, Ivemeyer M, Wiesinger H, Haas K, Heldmaier G, Wiesner RJ. Biogenesis of thermogenic mitochondria in brown adipose tissue of Djungarian hamsters during cold adaptation. *Biochem J*. 1996, 316(Pt 2):607-13.
- Klingenspor M. Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. *Exp Physiol*. 2003, 88(1):141-8.
- Knight BL, Hebbachi A, Hauton D, Brown AM, Wiggins D, Patel DD, Gibbons GF. A role for PPARalpha in the control of SREBP activity and lipid synthesis in the liver. *Biochem J*. 2005, 389(Pt 2):413-21.
- Knight JE, Narus EN, Martin SL, Jacobson A, Barnes BM, Boyer BB. mRNA stability and polysome loss in hibernating Arctic ground squirrels (*Spermophilus parryii*). *Mol Cell Biol*. 2000, 20(17):6374-9.
- Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuiji M, Zenke Y, Chiba T, Igarashi K, Yamamoto M. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol*. 2004, 24(16):7130-9.
- Kobayashi M, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul*. 2006, 46:113-40.

- Kojima H, Gu H, Nomura S, Caldwell CC, Kobata T, Carmeliet P, Semenza GL, Sitkovsky MV. Abnormal B lymphocyte development and autoimmunity in hypoxia-inducible factor 1alpha -deficient chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002, 99(4):2170-4.
- Korać A, Buzadžić B, Petrović V, Vasiljević A, Janković A, Mićunović K, Korać B. The role of nitric oxide in remodeling of capillary network in rat interscapular brown adipose tissue after long-term cold acclimation. *Histol. Histopathol* 2008, 23:441-50.
- Kraunsoe R, Boushel R, Hansen CN, Schjerling P, Qvortrup K, Stockel M, Mikines KJ, Dela F. Mitochondrial respiration in subcutaneous and visceral adipose tissue from patients with morbid obesity. *J Physiol*. 2010, 588(Pt 12):2023-32.
- Krief S, Lonnqvist F, Raimbault S, Baude B, Van Spronsen A, Arner P, Strosberg AD, Ricquier D, Emorine LJ. Tissue distribution of beta 3-adrenergic receptor mRNA in man. *J Clin Invest*. 1993, 91(1):344-9.
- Krilowicz BL. Ketone body metabolism in a ground squirrel during hibernation and fasting. *Am J Physiol*. 1985, 249(4 Pt 2):R462-70.
- Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, Iyer N, LaRusch J, Pak B, Taghavi P, Semenza GL. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res*. 2003, 63(5):1138-43.
- Krishnan J, Suter M, Windak R, Krebs T, Felley A, Montessuit C, Tokarska-Schlattner M, Aasum E, Bogdanova A, Perriard E, Perriard JC, Larsen T, Pedrazzini T, Krek W. Activation of a HIF1alpha-PPARgamma axis underlies the integration of glycolytic and lipid anabolic pathways in pathologic cardiac hypertrophy. *Cell Metab*. 2009, 9:512-24.
- Ladd Prosser C. Temperature. In: Environmental and Metabolic Animal Physiology. (C. Ladd Prosser, ed), New York: Wiley-Liss, 1991, pp 109-166.
- LaManna JC, Chavez JC, Pichiule P. Structural and functional adaptation to hypoxia in the rat brain. *J Exp Biol*. 2004, 207(Pt 18):3163-9.
- Lee M, Choi I, Park K. Activation of stress signaling molecules in bat brain during arousal from hibernation. *J Neurochem*. 2002, 82(4):867-73.
- Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL, Choi AM. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem*. 1997, 272(9):5375-81.
- Lee YJ, Miyake S, Wakita H, McMullen DC, Azuma Y, Auh S, Hallenbeck JM. Protein SUMOylation is massively increased in hibernation torpor and is critical for the cytoprotection provided by ischemic preconditioning and hypothermia in SHSY5Y cells. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007, 27(5):950-62.
- Lefebvre P. Glucagon and adipose tissue. *Biochem Pharmacol*. 1975, 24(13-14):1261-6.
- Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem*. 1995, 270(22):12953-6.
- Le Lay S, Krief S, Farnier C, Lefrere I, Le Liepvre X, Bazin R, Ferre P, Dugail I. Cholesterol, a cell size-dependent signal that regulates glucose metabolism and gene expression in adipocytes. *J Biol Chem*. 2001, 276(20):16904-10.
- Lemieux S, Despres JP. Metabolic complications of visceral obesity: contribution to the aetiology of type 2 diabetes and implications for prevention and treatment. *Diabete Metab*. 1994, 20(4):375-93.
- Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999, 96(13):7473-8.
- Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem*. 1995, 270(22):13333-40.
- Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegelman BM. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*. 2002, 418(6899):797-801.
- Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab*. 2005, 1(6):361-70.
- Lindell SL, Klahn SL, Piazza TM, Mangino MJ, Torrealba JR, Southard JH, Carey HV. Natural resistance to liver cold ischemia-reperfusion injury associated with the hibernation phenotype. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005, 288(3):G473-80.

- Lindquist JM, Rehnmark S. Ambient temperature regulation of apoptosis in brown adipose tissue. Erk1/2 promotes norepinephrine-dependent cell survival. *J Biol Chem.* 1998, 273(46):30147-56.
- Liu C, Lin JD. PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2011, 43(4):248-57.
- Liu CC, Frehn JL, Laporta AD. Liver and brown fat mitochondrial response to cold in hibernators and nonhibernators. *J Appl Physiol.* 1969, 27(1):83-9.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome *c*. *Cell.* 1996, 86(1):147-57.
- Liu X, Li Q, Lin Q, Sun R. Uncoupling protein 1 mRNA, mitochondrial GTP-binding, and T₄ 5'-deiodinase of brown adipose tissue in euthermic Daurian ground squirrel during cold exposure. *Comp. Biochem. Physiol. A* 2001, 128:827-835.
- Lohuis TD, Harlow HJ, Beck TD, Iaizzo PA. Hibernating bears conserve muscle strength and maintain fatigue resistance. *Physiol Biochem Zool.* 2007, 80(3):257-69.
- Lok CN, Ponka P. Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J Biol Chem.* 1999, 274(34):24147-52.
- Lončar D, Afzelius BA, Cannon B. Epididymal white adipose tissue after cold stress in rats. II. Mitochondrial changes. *J Ultrastruct Mol Struct Res.* 1988, 101(2-3):199-209.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951, 193(1):265-75.
- Lu H, Forbes RA, Verma A. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem.* 2002, 277(26):23111-5.
- Luquet S, Lopez-Soriano J, Holst D, Fredenrich A, Melki J, Rassoulzadegan M, Grimaldi PA. Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. *FASEB J.* 2003, 17(15):2299-301.
- Lyman B. The nutritional values and food group characteristics of foods preferred during various emotions. *J Psychol.* 1982, 112(1st Half):121-7.
- Lyman CP, O'Brien RC, Greene GC, Papafrangos ED. Hibernation and longevity in the Turkish hamster *Mesocricetus brandti*. *Science.* 1981, 212(4495):668-70.
- Ma SW, Foster DO. Uptake of glucose and release of fatty acids and glycerol by rat brown adipose tissue in vivo. *Can J Physiol Pharmacol.* 1986, 64(5):609-14.
- MacDonald JA, Storey KB. Mitogen-activated protein kinases and selected downstream targets display organ-specific responses in the hibernating ground squirrel. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005, 37(3):679-91.
- Majima HJ, Oberley TD, Furukawa K, Mattson MP, Yen HC, Szweda LI, St Clair DK. Prevention of mitochondrial injury by manganese superoxide dismutase reveals a primary mechanism for alkaline-induced cell death. *J Biol Chem.* 1998, 273(14):8217-24.
- Malatesta M, Battistelli S, Rocchi MB, Zancanaro C, Fakan S, Gazzanelli G. Fine structural modifications of liver, pancreas and brown adipose tissue mitochondria from hibernating, arousing and euthermic dormice. *Cell Biol Int.* 2001, 25(2):131-8.
- Malatesta M, Biggiogera M, Baldelli B, Barabino SM, Martin TE, Zancanaro C. Hibernation as a far-reaching program for the modulation of RNA transcription. *Microsc Res Tech.* 2008, 71(8):564-72.
- Marin P, Andersson B, Ottosson M, Olbe L, Chowdhury B, Kvist H, Holm G, Sjostrom L, Bjorntorp P. The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. *Metabolism.* 1992, 41(11):1242-8.
- Marques BG, Hausman DB, Martin RJ. Association of fat cell size and paracrine growth factors in development of hyperplastic obesity. *Am J Physiol.* 1998, 275(6 Pt 2):R1898-908.
- Mates JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology.* 2000, 153(1-3):83-104.
- McArthur M D, Milsom W K. Changes in ventilation and respiratory sensitivity associated with hibernation in columbian (*Spermophilus columbianus*) and golden-mantled (*Spermophilus lateralis*) ground squirrels. *Physiol Zool.* 1991, 64:940-59.
- McCormack JG. The regulation of fatty acid synthesis in brown adipose tissue by insulin. *Prog Lipid Res.* 1982, 21(3):195-223.
- Meigal A. Gross and fine neuromuscular performance at cold shivering. *Int J Circumpolar Health.* 2002, 61(2):163-72.

- Melillo E, Iabichella L, Berchiolli R, Ferrari M, Catapano G, Dell'Omo G, Pedrinelli R. Transcutaneous oxygen and carbon dioxide during treatment of critical limb ischemia with iloprost, a prostacyclin derivative. *Int J Microcirc Clin Exp*. 1995, 15(2):60-4.
- Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol*. 2007, 213(2):286-300.
- Misra A, Vikram NK. Clinical and pathophysiological consequences of abdominal adiposity and abdominal adipose tissue depots. *Nutrition*. 2003, 19(5):457-66.
- Mokrasch LC, Grady HJ, Grisolia S. Thermogenic and adaptive mechanisms in hibernation and arousal from hibernation. *Am J Physiol*. 1960, 199:945-9.
- Morin P Jr, Storey KB. Cloning and expression of hypoxia-inducible factor 1alpha from the hibernating ground squirrel, *Spermophilus tridecemlineatus*. *Biochim Biophys Acta*. 2005, 1729(1):32-40.
- Morin P Jr, Storey KB. Evidence for a reduced transcriptional state during hibernation in ground squirrels. *Cryobiology*. 2006, 53(3):310-8.
- Morin P Jr, Ni Z, McMullen DC, Storey KB. Expression of Nrf2 and its downstream gene targets in hibernating 13-lined ground squirrels, *Spermophilus tridecemlineatus*. *Mol Cell Biochem*. 2008, 312(1-2):121-9.
- Morin P Jr, Storey KB. Mammalian hibernation: differential gene expression and novel application of epigenetic controls. *Int J Dev Biol*. 2009, 53(2-3):433-42.
- Morroni M, Barbatelli G, Zingaretti MC, Cinti S. Immunohistochemical, ultrastructural and morphometric evidence for brown adipose tissue recruitment due to cold acclimation in old rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1995, 19(2):126-31.
- Mostafa N, Everett DC, Chou SC, Kong PA, Florant GL, Coleman RA. Seasonal changes in critical enzymes of lipogenesis and triacylglycerol synthesis in the marmot (*Marmota flaviventris*). *J Comp Physiol B*. 1993, 163(6):463-9.
- Motojima K, Passilly P, Peters JM, Gonzalez FJ, Latruffe N. Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner. *J Biol Chem*. 1998, 273(27):16710-4.
- Mukherjee R, Jow L, Croston GE, Paterniti JR Jr. Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPARgamma2 versus PPARgamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *J Biol Chem*. 1997, 272(12):8071-6.
- Muleme HM, Walpole AC, Staples JF. Mitochondrial metabolism in hibernation: metabolic suppression, temperature effects, and substrate preferences. *Physiol Biochem Zool*. 2006, 79(3):474-83.
- Mulligan JD, Gonzalez AA, Stewart AM, Carey HV, Saupe KW. Upregulation of AMPK during cold exposure occurs via distinct mechanisms in brown and white adipose tissue of the mouse. *J Physiol*. 2007, 580(Pt. 2):677-84.
- Musacchia XJ, Steffen JM, Fell R. Biochemical and histochemical observations of *vastus medialis* from rats flown in Cosmos 1887 (experiment K608). *Physiologist*. 1989, 32(1 Suppl):S21-2.
- Musacchia XJ, Steffen JM, Fell RD, Dombrowski MJ. Skeletal muscle response to spaceflight, whole body suspension, and recovery in rats. *J Appl Physiol* (1985). 1990, 69(6):2248-53.
- Narbonne P, Roy R. AMP-activated protein kinase (AMPK) allows prolonged energy stockpile! *Med Sci (Paris)*. 2009, 25(6-7):565-6.
- Nedergaard J, Alexson S, Cannon B. Cold adaptation in the rat: increased brown fat peroxisomal beta-oxidation relative to maximal mitochondrial oxidative capacity. *Am J Physiol*. 1980, 239(5):C208-16.
- Needham DM. *Machina carnis*, the Biochemistry of Muscular Contraction in its Historical Development. Cambridge University Press, 1971, pp 782.
- Nelson DL, Cox MM. Principles of Biochemistry, *Freeman Publishers* (Fourth Edition), New York, 2005.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*. 1999, 13(1):9-22.
- Nicholls DG, Locke RM. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev*. 1984, 64(1):1-64.
- Nicholls D, Cunningham S, Wiesinger H. Mechanisms of thermogenesis in brown adipose tissue. *Biochem Soc Trans*. 1986, 14(2):223-5.
- Nikami H, Nedergaard J, Fredriksson JM. Norepinephrine but not hypoxia stimulates HIF-1alpha gene expression in brown adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005, 337(1):121-6.
- Nizielski SE, Billington CJ, Levine AS. Brown fat GDP binding and circulating metabolites during hibernation and arousal. *Am J Physiol*. 1989, 257(3 Pt 2):R536-41.
- Ongwijitwat S, Wong-Riley MT. Is nuclear respiratory factor 2 a master transcriptional coordinator for all ten nuclear-encoded cytochrome c oxidase subunits in neurons? *Gene*. 2005, 360(1):65-77.

- Ormseth OA, Nicolson M, Pellemounter MA, Boyer BB. Leptin inhibits prehibernation hyperphagia and reduces body weight in arctic ground squirrels. *Am J Physiol.* 1996, 271(6 Pt 2):R1775-9.
- Osborne PG, Gao B, Hashimoto M. Determination in vivo of newly synthesized gene expression in hamsters during phases of the hibernation cycle. *Jpn J Physiol.* 2004, 54(3):295-305.
- Page MM, Peters CW, Staples JF, Stuart JA. Intracellular antioxidant enzymes are not globally upregulated during hibernation in the major oxidative tissues of the 13-lined ground squirrel *Spermophilus tridecemlineatus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2009, 152(1):115-22.
- Park EY, Rho HM. The transcriptional activation of the human copper/zinc superoxide dismutase gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin through two different regulator sites, the antioxidant responsive element and xenobiotic responsive element. *Mol Cell Biochem.* 2002, 240(1-2):47-55.
- Pedersen SB, Hansen PS, Lund S, Andersen PH, Odgaard A, Richelsen B. Identification of oestrogen receptors and oestrogen receptor mRNA in human adipose tissue. *Eur J Clin Invest.* 1996, 26(4):262-9.
- Pescador N, Villar D, Cifuentes D, Garcia-Rocha M, Ortiz-Barahona A, Vazquez S, Ordóñez A, Cuevas Y, Saez-Morales D, Garcia-Bermejo ML, Landazuri MO, Guinovart J, del Peso L. Hypoxia promotes glycogen accumulation through hypoxia inducible factor (HIF)-mediated induction of glycogen synthase 1. *PLoS One.* 2010, 5(3):e9644.
- Peters JM, Lee SS, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C, Reitman ML, Hudson LD, Gonzalez FJ. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol.* 2000, 20(14):5119-28.
- Petronilli V, Penzo D, Scorrano L, Bernardi P, Di Lisa F. The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. *J Biol Chem.* 2001, 276(15):12030-4.
- Petrović VM, Saičić Z, Milić B, Spasić M, Radojičić R. Distribution of superoxide dismutase in the ground squirrel (*Citellus citellus*): effect of the hibernation and arousal. *Comp Biochem Physiol B.* 1983, 75(4):699-700.
- Petrović V, Korać A, Buzadžić B, Korać B. The effects of L-arginine and L-NAME supplementation on redox-regulation and thermogenesis in interscapular brown adipose tissue. *J Exp Biol.* 2005, 208(Pt 22):4263-71.
- Petrović V, Korać A, Buzadžić B, Vasiljević A, Janković A, Mićunović K, Korać B. Nitric oxide regulates mitochondrial re-modelling in interscapular brown adipose tissue: ultrastructural and morphometric-stereologic studies. *J Microsc.* 2008, 232(3):542-8.
- Petrović V, Buzadžić B, Korać A, Vasiljević A, Janković A, Korać B. NO modulates the molecular basis of rat interscapular brown adipose tissue thermogenesis. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2010, 152(2):147-59.
- Pietsch CA, Scanlan TS, Anderson RJ. Thyronamines are substrates for human liver sulfotransferases. *Endocrinology.* 2007, 148(4):1921-7.
- Pilegaard H, Saltin B, Neufer PD. Effect of short-term fasting and refeeding on transcriptional regulation of metabolic genes in human skeletal muscle. *Diabetes.* 2003, 52(3):657-62.
- Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Hoffmann RM, Eckhoff D, Isaacs R, Knechtle SJ, Pirsch JD, Stegall MD, Kalayoglu M, Belzer FO. Impact of donor factors and preservation on function and survival after liver transplantation. *Transplant Proc.* 1993, 25(6):3031-3.
- Pohl H. Temperature regulation and cold acclimation in the golden hamster. *J Appl Physiol.* 1965, 20(3):405-10.
- Porte RJ, Ploeg RJ, Hansen B, van Bockel JH, Thorogood J, Persijn GG, Hermans J, Terpstra OT. Long-term graft survival after liver transplantation in the UW era: late effects of cold ischemia and primary dysfunction. European Multicentre Study Group. *Transpl Int.* 1998, 11 Suppl 1:S164-7.
- Pospisilova D, Jansky L. Effect of various adaptational temperatures on oxidative capacity of the brown adipose tissue. *Physiol Bohemoslov.* 1976, 25(6):519-27.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell.* 1998, 92(6):829-39.
- Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest.* 2003, 111(2):225-30.
- Rebuffe-Scrive M, Lundholm K, Bjorntorp P. Glucocorticoid hormone binding to human adipose tissue. *Eur J Clin Invest.* 1985, 15(5):267-71.
- Rebuffe-Scrive M, Andersson B, Olbe L, Bjorntorp P. Metabolism of adipose tissue in intraabdominal depots of nonobese men and women. *Metabolism.* 1989, 38(5):453-8.

- Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr.* 2001, 21:193-230.
- Reshef L, Olswang Y, Cassuto H, Blum B, Croniger CM, Kalhan SC, Tilghman SM, Hanson RW. Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J Biol Chem.* 2003, 278(33):30413-6.
- Rhee SG, Chae HZ, Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med.* 2005, 38(12):1543-52.
- Ricquier D, Mory G, Bouillaud F, Combes-George M, Thibault J. Factors controlling brown adipose tissue development. *Reprod Nutr Dev.* 1985, 25(1B):175-81.
- Ricquier D. Uncoupling protein 1 of brown adipocytes, the only uncoupler: a historical perspective. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2011, 2:85.
- Rifenberck DH, Gamble JG, Max SR. Response of mitochondrial enzymes to decreased muscular activity. *Am J Physiol.* 1973, 225(6):1295-9.
- Rifenberck DH, Koski CL, Max SR. Metabolic studies of skeletal muscle regeneration. *Exp Neurol.* 1974, 45(3):527-40.
- Rolfe DF, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev.* 1997, 77(3):731-58.
- Rolfs A, Kvietikova I, Gassmann M, Wenger RH. Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem.* 1997, 272(32):20055-62.
- Rolland V, Dugail I, Le Liepvre X, Lavau M. Evidence of increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and fatty acid synthetase promoter activities in transiently transfected adipocytes from genetically obese rats. *J Biol Chem.* 1995, 270(3):1102-6.
- Rosen ED, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands and atherosclerosis: ending the heartache. *J Clin Invest.* 2000, 106(5):629-31.
- Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006, 7(12):885-96.
- Roth MB, Nystul T. Buying time in suspended animation. *Sci Am.* 2005, 292(6):48-55.
- Ruderman NB, Goodman MN, Berger M, Hagg S. Effect of starvation on muscle glucose metabolism: studies with the isolated perfused rat hindquarter. *Fed Proc.* 1977, 36(2):171-6.
- Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem.* 1997, 272(36):22642-7.
- Scanlan TS, Suchland KL, Hart ME, Chiellini G, Huang Y, Kruzich PJ, Frascarelli S, Crossley DA, Bunzow JR, Ronca-Testoni S, Lin ET, Hatton D, Zucchi R, Grandy DK. 3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone. *Nat Med.* 2004, 10(6):638-42.
- Scarpulla RC. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2002a, 1576(1-2):1-14.
- Scarpulla RC. Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene.* 2002b, 286(1):81-9.
- Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem.* 2006, 97(4):673-83.
- Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev.* 2008, 88(2):611-38.
- Schaefer KE, Wünnenberg W. Threshold temperatures for shivering in acute and chronic hypercapnia. *J Appl Physiol.* 1976, 41(1):67-70.
- Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, Wouters BG, Knapp M, Thibault P, Laderoute K, Johnson RS. Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 2001, 21(10):3436-44.
- Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M, Tavernier G, Langin D, Spiegelman BM. Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab.* 2007, 6(1):38-54.
- Sellers EA, Scott JW, Thomas N. Electrical activity of skeletal muscle of normal and acclimatized rats on exposure to cold. *Am J Physiol.* 1954, 177(3):372-6.
- Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991, 88(13):5680-4.
- Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev.* 1998, 8(5):588-94.

- Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol.* 2002, 64(5-6):993-8.
- Serkova NJ, Rose JC, Epperson LE, Carey HV, Martin SL. Quantitative analysis of liver metabolites in three stages of the circannual hibernation cycle in 13-lined ground squirrels by NMR. *Physiol Genomics.* 2007, 31(1):15-24.
- Shao C, Liu Y, Ruan H, Li Y, Wang H, Kohl F, Goropashnaya AV, Fedorov VB, Zeng R, Barnes BM, Yan J. Shotgun proteomics analysis of hibernating arctic ground squirrels. *Mol Cell Proteomics.* 2010, 9(2):313-26.
- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006, 116(7):1793-801.
- Silverman WA, Zamelis A, Sinclair JC, Agate FJ. Warm nape of the newborn. *Pediatrics.* 1964, 33:984-7.
- Simonides WS, Thelen MH, van der Linden CG, Muller A, van Hardeveld C. Mechanism of thyroid-hormone regulated expression of the SERCA genes in skeletal muscle: implications for thermogenesis. *Biosci Rep.* 2001, 21(2):139-54.
- Smalley RL, Smalley KN. Brown and white fats: development in the hamster. *Science.* 1967, 157(3795):1449-51.
- Smith RE, Hock RJ. Brown fat: thermogenic effector of arousal in hibernators. *Science.* 1963, 140(3563):199-200.
- Song CK, Bartness TJ. CNS sympathetic outflow neurons to white fat that express MEL receptors may mediate seasonal adiposity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001, 281(2):R666-72.
- Southard JH, Belzer FO. Organ preservation. *Annu Rev Med.* 1995, 46:235-47.
- Spiegelman BM, Green H. Control of specific protein biosynthesis during the adipose conversion of 3T3 cells. *J Biol Chem.* 1980, 255(18):8811-18.
- Squire TL, Lowe ME, Bauer VW, Andrews MT. Pancreatic triacylglycerol lipase in a hibernating mammal. II. Cold-adapted function and differential expression. *Physiol Genomics.* 2003, 16(1):131-40.
- Stančić A, Buzadžić B, Korać A, Otašević V, Janković A, Vučetić M, Markelić M, Veličković K, Golić I, Korać B. Regulatory role of PGC-1 α /PPAR signaling in skeletal muscle metabolic recruitment during cold acclimation. *J Exp Biol.* 2013, 216(Pt 22):4233-41.
- Staples JF, Hochachka PW. Liver energy metabolism during hibernation in the golden-mantled ground squirrel, *Spermophilus lateralis*. *Can J Zool.* 1997, 74(7):1059-65.
- Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* 2001, 409(6818):307-12.
- Storey KB. Regulation of liver metabolism by enzyme phosphorylation during mammalian hibernation. *J Biol Chem.* 1987, 262(4):1670-3.
- Storey KB, Storey JM. Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2004, 79(1):207-33.
- Storey KB, Storey JM. Tribute to P. L. Lutz: putting life on 'pause'--molecular regulation of hypometabolism. *J Exp Biol.* 2007, 210(Pt 10):1700-14.
- Storey KB. Out cold: biochemical regulation of mammalian hibernation - a mini-review. *Gerontology.* 2010, 56(2):220-30.
- Stromme SB, Hammel HT. Effects of physical training on tolerance to cold in rats. *J Appl Physiol.* 1967, 23(6):815-24.
- Sucharov C, Basu A, Carter RS, Avadhani NG. A novel transcriptional initiator activity of the GABP factor binding ets sequence repeat from the murine cytochrome c oxidase Vb gene. *Gene Expr.* 1995, 5(2):93-111.
- Sugden MC, Bulmer K, Gibbons GF, Knight BL, Holness MJ. Peroxisome-proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) deficiency leads to dysregulation of hepatic lipid and carbohydrate metabolism by fatty acids and insulin. *Biochem J.* 2002, 364(Pt 2):361-8.
- Sundin U, Moore G, Nedergaard J, Cannon B. Thermogenin amount and activity in hamster brown fat mitochondria: effect of cold acclimation. *Am J Physiol.* 1987, 252(5 Pt 2):R822-32.
- Suter ER. The fine structure of brown adipose tissue. I. Cold-induced changes in the rat. *J Ultrastruct Res.* 1969a, 26(3):216-41.
- Suter ER. The fine structure of brown adipose tissue. II. Perinatal development in the rat. *Lab Invest.* 1969b, 21(3):246-58.
- Suter ER. The fine structure of brown adipose tissue. III. The effect of cold exposure and its mediation in newborn rats. *Lab Invest.* 1969c, 21(3):259-68.

- Tacchini L, Bianchi L, Bernelli-Zazzera A, Cairo G. Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 1999, 274(34):24142-6.
- Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells*. 2011, 16(2):123-40.
- Takahashi Y, Kako K, Arai H, Ohishi T, Inada Y, Takehara A, Fukamizu A, Munekata E. Characterization and identification of promoter elements in the mouse COX17 gene. *Biochim Biophys Acta*. 2002, 1574(3):359-64.
- Takahashi Y, Takahashi S, Shiga Y, Yoshimi T, Miura T. Hypoxic induction of prolyl 4-hydroxylase alpha (I) in cultured cells. *J Biol Chem*. 2000, 275(19):14139-46.
- Tashima LS, Adelstein SJ, Lyman CP. Radioglucose utilization by active, hibernating, and arousing ground squirrels. *Am J Physiol*. 1970, 218(1):303-9.
- Tavassoli M. Medical problems of space flight. *Am J Med*. 1986, 81(5):850-4.
- Tempe D, Piechaczyk M, Bossis G. SUMO under stress. *Biochem Soc Trans*. 2008, 36(Pt 5):874-8.
- Tomasi TE, Horwitz BA. Thyroid function and cold acclimation in the hamster, *Mesocricetus auratus*. *Am J Physiol*. 1987, 252(2 Pt 1):E260-7.
- Tong KI, Kobayashi A, Katsuoka F, Yamamoto M. Two-site substrate recognition model for the Keap1–Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. *Biol Chem*. 2006, 387(10-11):1311-20.
- Trayhurn P. Fatty acid synthesis in mouse brown adipose tissue. The influence of environmental temperature on the proportion of whole-body fatty acid synthesis in brown adipose tissue and the liver. *Biochim Biophys Acta*. 1981, 664(3):549-60.
- Trayhurn P, Richard D, Jennings G, Ashwell M. Adaptive changes in the concentration of the mitochondrial 'uncoupling' protein in brown adipose tissue of hamsters acclimated at different temperatures. *Biosci Rep*. 1983, 3(12):1077-84.
- Tunstall RJ, Mehan KA, Wadley GD, Collier GR, Bonen A, Hargreaves M, Cameron-Smith D. Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002, 283(1):E66-72.
- Turner JJ, Anderson BO, Bintz, GL. Whole body lipids and fatty acids synthase activity in Richardson's ground squirrels, *Spermophilus richardsonii*. *Physiol. Zool*. 1989; 62:1383-97.
- Vaillancourt E, Haman F, Weber JM. Fuel selection in Wistar rats exposed to cold: shivering thermogenesis diverts fatty acids from re-esterification to oxidation. *J Physiol*. 2009, 587(Pt 17):4349-59.
- Van de Werve G, Jeanrenaud B. Synthase activation is not a prerequisite for glycogen synthesis in the starved liver. *Am J Physiol*. 1984, 247(2 Pt 1):E271-5.
- Vaughan M. The production and release of glycerol by adipose tissue incubated *in vitro*. *J Biol Chem*. 1962, 237:3354-8.
- Vega RB, Huss JM, Kelly DP. 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*. 2000, 20(5):1868-76.
- Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res*. 2008, 79(2):208-17.
- Villarin JJ, Schaeffer PJ, Markle RA, Lindstedt SL. Chronic cold exposure increases liver oxidative capacity in the marsupial *Monodelphis domestica*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2003, 136(3):621-30.
- Virbasius CA, Virbasius JV, Scarpulla RC. NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators. *Genes Dev*. 1993, 7(12A):2431-45.
- Virbasius JV, Scarpulla RC. Transcriptional activation through ETS domain binding sites in the cytochrome *c* oxidase subunit IV gene. *Mol Cell Biol*. 1991, 11(11):5631-8.
- Virbasius JV, Scarpulla RC. Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994, 91(4):1309-13.
- Voet D, Voet JG. Biochemistry. *John Wiley & Sons, Inc* (Fourth Edition), New York, 2004.
- Vučetić M, Otašević V, Korać A, Stančić A, Janković A, Markelić M, Golić I, Veličković K, Buzadžić B, Korać B. Interscapular brown adipose tissue metabolic reprogramming during cold acclimation: Interplay of HIF-1 α and AMPK α . *Biochim Biophys Acta*. 2011, 1810(12):1252-61.

- Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 2000, 21(6):697-738.
- Walden TB, Hansen IR, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012, 302(1):E19-31.
- Wallace DC. Mitochondria and cancer: Warburg addressed. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2005, 70:363-74.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995, 92(12):5510-4.
- Wang LC, Belke D, Jourdan ML, Lee TF, Westly J, Nurnberger F. The "hibernation induction trigger": specificity and validity of bioassay using the 13-lined ground squirrel. *Cryobiology.* 1988, 25(4):355-62.
- Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, Evans RM. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell.* 2003, 113(2):159-70.
- Wang YX. PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. *Cell Res.* 2010, 20(2):124-37.
- Weibel ER. Morphometric analysis of the number, volume and surface of the alveoli and capillaries of the human lung. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1962, 57:648-66.
- Wickler SJ, Stern JS, Glick Z, Horwitz BA. Thermogenic capacity and brown fat in rats exercise-trained by running. *Metabolism.* 1987, 36(1):76-81.
- Wickler SJ, Hoyt DF, van Breukelen F. Disuse atrophy in the hibernating golden-mantled ground squirrel, *Spermophilus lateralis*. *Am J Physiol.* 1991, 261(5 Pt 2):R1214-7.
- Williams CT, Goropashnaya AV, Buck CL, Fedorov VB, Kohl F, Lee TN, Barnes BM. Hibernating above the permafrost: effects of ambient temperature and season on expression of metabolic genes in liver and brown adipose tissue of arctic ground squirrels. *J Exp Biol.* 2011, 214(Pt 8):1300-6.
- Williams DR, Epperson LE, Li W, Hughes MA, Taylor R, Rogers J, Martin SL, Cossins AR, Gracey AY. Seasonally hibernating phenotype assessed through transcript screening. *Physiol Genomics.* 2005, 24(1):13-22.
- Williamson JR. Control of energy metabolism in hamster brown adipose tissue. *J Biol Chem.* 1970, 245(8):2043-50.
- Winder WW, Holmes BF, Rubink DS, Jensen EB, Chen M, Holloszy JO. Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985).* 2000, 88(6):2219-26.
- Wu CW, Biggar KK, Storey KB. Biochemical adaptations of mammalian hibernation: exploring squirrels as a perspective model for naturally induced reversible insulin resistance. *Braz J Med Biol Res.* 2013, 46(1):1-13.
- Wu H, Kanatous SB, Thurmond FA, Gallardo T, Isotani E, Bassel-Duby R, Williams RS. Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science.* 2002, 296(5566):349-52.
- Wu P, Inskeep K, Bowker-Kinley MM, Popov KM, Harris RA. Mechanism responsible for inactivation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase complex in starvation and diabetes. *Diabetes.* 1999, 48(8):1593-9.
- Xu R, Andres-Mateos E, Mejias R, MacDonald EM, Leinwand LA, Merriman DK, Fink RH, Cohn RD. Hibernating squirrel muscle activates the endurance exercise pathway despite prolonged immobilization. *Exp Neurol.* 2013, 247:392-401.
- Yabe K, Nasa Y, Sato M, Iijima R, Takeo S. Preconditioning preserves mitochondrial function and glycolytic flux during an early period of reperfusion in perfused rat hearts. *Cardiovasc Res.* 1997, 33(3):677-85.
- Yacoe ME, Dawson WR. Seasonal acclimatization in American goldfinches: the role of the pectoralis muscle. *Am J Physiol.* 1983, 245(2):R265-71.
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Ide T, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Miki H, Tsuchida A, Akanuma Y, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T. The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) deficiency and PPARgamma agonist improve insulin resistance. *J Biol Chem.* 2001, 276(44):41245-54.
- Yan J, Burman A, Nichols C, Alila L, Showe LC, Showe MK, Boyer BB, Barnes BM, Marr TG. Detection of differential gene expression in brown adipose tissue of hibernating arctic ground squirrels with mouse microarrays. *Physiol Genomics.* 2006, 25(2):346-53.

- Yan J, Barnes BM, Kohl F, Marr TG. Modulation of gene expression in hibernating arctic ground squirrels. *Physiol Genomics*. 2008, 32(2):170-81.
- Yoon JC, Chickering TW, Rosen ED, Dussault B, Qin Y, Soukas A, Friedman JM, Holmes WE, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma target gene encoding a novel angiopoietin-related protein associated with adipose differentiation. *Mol Cell Biol*. 2000, 20(14):5343-9.
- Youngstrom TG, Bartness TJ. Catecholaminergic innervation of white adipose tissue in Siberian hamsters. *Am J Physiol*. 1995, 268(3 Pt 2):R744-51.
- Yu XX, Lewin DA, Forrest W, Adams SH. Cold elicits the simultaneous induction of fatty acid synthesis and beta-oxidation in murine brown adipose tissue: prediction from differential gene expression and confirmation *in vivo*. *FASEB J*. 2002, 16(2):155-68.
- Yun Z, Maecker HL, Johnson RS, Giaccia AJ. Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. *Dev Cell*. 2002, 2(3):331-41.
- Zatzman ML. Renal and cardiovascular effects of hibernation and hypothermia. *Cryobiology*. 1984, 21(6):593-614.
- Zhang H, Gao P, Fukuda R, Kumar G, Krishnamachary B, Zeller KI, Dang CV, Semenza GL. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell*. 2007, 11(5):407-20.
- Zhang J, Kaasik K, Blackburn MR, Lee CC. Constant darkness is a circadian metabolic signal in mammals. *Nature*. 2006, 439(7074):340-3.
- Zimmerman ML. Carbohydrate and torpor duration in hibernating golden-mantled ground squirrels (*Citellus lateralis*). *J Comp Physiol*. 1982, 147(1):129-35.
- Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1 cytochrome *c* multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*. 1999, 274(17):11549-56.

LISTA SKRAĆENICA:

<i>Skraćenica</i>	<i>Pun naziv na srpskom (ispod) i/ili engleskom (iznad)</i>
ACADM	<i>engl. acyl-CoA dehydrogenase medium-chain</i> acil-CoA dehidrogenaza masnih kiselina srednjeg lanca;
ACC	<i>engl. acetyl-CoA carboxylase</i> acetil-CoA karboksilaza;
AD	<i>engl. antioxidant defense</i> antioksidativna odbrana;
AOX	<i>engl. acyl-CoA oxidase</i> acil-CoA oksidaza;
ARE	<i>engl. antioxidant response elements;</i>
ATP5a1	subjedinica ATP sintaze;
β -AR	<i>engl. β-adrenergic receptor</i> β -adrenergički-receptor;
BAT	<i>engl. brown adipose tissue</i> mrko masno tkivo;
BMR	<i>engl. basal metabolic rate</i> bazalni nivo metabolizma;
BSA	<i>engl. bovine serum albumine</i> goveđi serum albumin;
COX	<i>engl. cytochrome c oxidase</i> citohrom c oksidaza, kompleks IV oksidativne fosforilacije;
CPT-I	<i>engl. carnitine palmitoyltransferase I</i> karnitin palmitoiltransferaza I;
Cs	<i>engl. citrate synthase</i> citrat sintaza;
CuZn/Mn SOD	<i>engl. CuZn/Mn superoxide dismutase</i> CuZn/Mn superoksid dismutaza;
DEPC	<i>engl. diethylpyrocarbonate</i> dietilpirokarbonat;
EER	<i>engl. estrogen-related receptors;</i>
e/i NOS	<i>engl. endothelial/ inducible nitric oxide synthase</i> endotelijalna/inducibilna azot oksid sintaza;
ERK 1/2	<i>engl. extracellular signal-regulated kinase 1/2</i> vanćelijskim signalima regulisana kinaza 1/2;
Fabp4	<i>engl. fatty-acid binding protein 4</i> protein koji vezuje masne kiseline 4;
FAS	<i>engl. fatty acid synthase</i> sintaza masnih kiselina;
FBPaza	<i>engl. fructosobisphosphatase</i> fruktozobisfosfataza;
fosfo-AMPK	<i>engl. AMP-actived protein kinase phosphorylated at T172 and T183</i> AMP-aktivirana protein kinaza sa fosforilacijom na T172 i T183;
GAPDH	<i>engl. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza;
GLUT 2/4	<i>engl. glucose transporter 2/4</i> glukočni transporter 2/4;
Gpd1	<i>engl. glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1</i> glycerol-3-fosfat dehidrogenaza 1;

GSH-Px	<i>engl. glutathione peroxidase</i> glutation peroksidaza;
GS	<i>engl. glycogen synthase</i> glikogen sintaza;
GSK3	<i>engl. glycogen synthase kinase 3</i> kinaza glikogen sintaze 3;
H ₂ O ₂	vodonik peroksid;
HIF-1 α	<i>engl. alpha subunit of hypoxia-inducible factor-1</i> α subjedinica hipoksija inducibilnog faktora-1;
HRE	<i>engl. hypoxia response element;</i>
Hsl	<i>engl. hormon-sensitive lipase</i> hormon-osjetljiva lipaza;
Keap1	<i>engl. Kelch ECH associating protein 1;</i>
LDH A/B	<i>engl. M/H subunit of lactate dehydrogenase</i> M/H subjedinica laktat dehidrogenaze;
Mdh2	<i>engl. malate dehydrogenase 2</i> malat dehidrogenaza 2;
miRNK	mikroRNK;
Ndufa6	subjedinica kompleksa I oksidativne fosforilacije;
NFE2L2	<i>engl. nuclear factor (erythroid 2-related)-like 2;</i>
Nrf1	<i>engl. - nuclear respiratory factor 1</i> nukleusni respiratorni factor 1;
Nrfs	<i>engl. - nuclear respiratory factors</i> izoforme Nrf;
O ₂ ^{•-}	superoksid anjon radikal;
OXPHOS	<i>engl. oxidative phosphorylation</i> oksidativna fosforilacija;
PAS	<i>engl. Period-Acid-Schiff reagent</i> Šifov reagens sa perijodnom kiselinom;
Pck	<i>engl. phosphoenolpyruvate carboxykinase</i> fosfoenolpiruvat karboksikinaza;
PDH	<i>engl. pyruvate dehydrogenase</i> piruvat dehidrogenaza;
PDK4	<i>engl. pyruvate dehydrogenase kinase 4</i> kinaza piruvat dehidrogenaze 4;
PEP	<i>engl. phosphoenolpyruvate</i> fosfoenolpiruvat;
Pfk m	<i>engl. phosphofructokinase (muscle)</i> fosfofruktokinaza (izoforna u mišićima);
PGC-1 α	<i>engl. peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1a</i> koaktivator peroksisomalnim proliferatorom-aktiviranog receptora 1 α ;
PPAR $\alpha/\delta/\gamma$	<i>engl. peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha/\delta/\gamma$</i> peroksisomalnim proliferatorom-aktivirani receptor $\alpha/\delta/\gamma$;
PPARs	<i>engl. peroxisome proliferator-activated receptors</i> izoforme PPAR;

PVDF	<i>engl. polyvinylidene fluoride</i> poliviniliden fluorid;
PYG (B/L/M)	<i>engl. glycogen phosphorylase (brain/ liver/ muscle)</i> glikogen fosforilaza (izoforna u mozgu, jetri, mišićima);
RIPA pufer	<i>engl. radio-immuno precipitation pufer</i> radio-immuno precipitacioni pufer;
ROS	<i>engl. reactive oxygen species</i> reaktivne vrste kiseonika;
RPP	<i>engl. reversible protein phosphorylation</i> reverzibilna fosforilacije proteina;
RQ	<i>engl. respiratory quotient</i> respiratorni koeficijent;
RT-PCR	<i>engl. reverse-transcriptase polymerase chain reaction;</i>
SCAS	<i>engl. succinyl-CoA synthetase</i> sukcinitil-CoA sintetaza;
SDS-PAGE	<i>engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> Na ⁺ -dodecil sulfat-poliakrilamidna gel elektroforeza;
SERCA1	<i>engl. sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 1</i> sarkoplazmina Ca ²⁺ -ATPaza 1;
SUMO	<i>engl. small ubiquitin-related modifier</i> mali modifikatori srodni ubikvitinu;
SODs	<i>engl. superoxide dismutases</i> izoforne SOD;
TEM	<i>engl. transmission electron microscopy</i> transmisiona elektronska mikroskopija;
TEMED	<i>eng. N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine</i> N,N,N',N'-tetrametiletildiamin;
UCP 1/2/3	<i>engl. uncoupling protein 1/2/3</i> dekupljujući protein 1/2/3;
VEGF	<i>engl. - vascular endothelial growth factor</i> vaskularni endotelijalni faktor rasta;
VLDL	<i>engl. very low density lipoproteins</i> lipoproteini veoma male gustine;
Vv	zapreminska gustina;
WAT	<i>engl. white adipose tissue</i> bijelo masno tkivo;
o/m/g/e/r WAT	<i>engl. subcutaneous/ omental/ mesenteric/ gonadal/ epididimal/ retroperitoneal WAT</i> subkutano/ omentalno/ mezenterično/ gonadalno/ epididimalno/ retroperitonealno WAT.

BIOGRAFIJA AUTORA:

Milica M. Vučetić rođena je 26. decembra 1985. godine u Pljevljima, Republika Crna Gora, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Diplomirala je na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, smer Biohemija, marta 2010. godine, sa prosečnom ocenom u toku studija 9,00. Iste godine upisuje na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, doktorske studije Biologije na modulu Animalna i humana fiziologija.

Od 2010. godine zaposlena je u Odeljenju za fiziologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” Univerziteta u Beogradu, gde i danas radi u zvanju istraživač saradnik.

Od početka naučne karijere je angažovana na više projekata domaćeg i međunarodnog karaktera, uključujući i dva tekuća projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije: „Belo ili/i mrko: značaj masnog tkiva u održanju ukupne redoks zavisne metaboličke kontrole u fiziološkim adaptacijama i metaboličkim poremećajima“ i „Uloga reaktivnih vrsta kiseonika i azota u reprodukciji: moguća primena u lečenju humanog steriliteta“.

Član je „Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalnu fiziologiju“ i „European Society for Free Radical Research“.

Autor je sedam radova u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), tri rada u istaknutim međunarodnim časopisima (M22), tri rada u međunarodnim časopisima (M23), jednog rada u međunarodnom časopisu na SCI listi bez impact faktora (M23a), jednog rada u međunarodnom časopisu van SCI liste bez impact faktora, jednog rada u časopisu domaćeg značaja (M52), dvadeset kongresnih saopštenja na skupovima međunarodnog značaja (M34) i sedamnaest kongresnih saopštenja na skupovima domaćeg značaja (M64).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана Милица М. Вучетић

број уписа Б3032/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Молекулски механизми метаболичке регулације у хибернацији и током аклимације на хладноћу код текунице (*Spermophilus citellus*)“

- 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, 17.01.2014.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милица М. Вучетић

Број уписа Б3032/2010

Студијски програм Анимална и хумана физиологија

Наслов рада „Молекулски механизми метаболичке регулације у хибернацији и током аклимације на хладноћу код текунице (*Spermophilus citellus*)“

Ментори: Др Бато Кораћ,
ванредни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду
научни саветник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
Универзитет у Београду

Др Биљана Бузацић,
научни саветник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
Универзитет у Београду

Потписани Милица М. Вучетић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 17.01.2014.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Молекулски механизми метаболичке регулације у хибернацији и током аклимације на хладноћу код текунице (*Spermophilus citellus*)“

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 17.01.2014.

