

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Milica B. Markelić

**MOLEKULSKI MEHANIZMI  
STRUKTURNOG REMODELIRANJA  
MRKOG MASNOSTI TKIVA PACOVA  
INDUKOVANOG INSULINOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Milica B. Markelić

**MOLECULAR MECHANISMS  
OF INSULIN-INDUCED RAT BROWN  
ADIPOSE TISSUE STRUCTURAL  
REMODELLING**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

# KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

---

## MENTORI:

**dr Aleksandra Korać**, redovni profesor  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

**dr Ana Stančić**, naučni saradnik  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,  
Univerzitet u Beogradu

---

## ČLANOVI KOMISIJE:

**dr Bato Korać**, vanredni profesor  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu  
naučni savetnik  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,  
Univerzitet u Beogradu

---

**dr Aleksandra Janković**, naučni saradnik  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,  
Univerzitet u Beogradu

---

**dr Biljana Buzadžić**, naučni savetnik  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,  
Univerzitet u Beogradu

---

## DATUM ODBRANE:

---

## ZAHVALNICA

---

Ova doktorska disertacija urađena je u okviru projekta #173055 - „Belo i/ili mrko: značaj masnog tkiva u održavanju ukupne redoks zavisne metaboličke kontrole u fiziološkim adaptacijama i metaboličkim poremećajima“, koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije. Urađena je na Katedri za biologiju ćelija i tkiva i pri Centru za elektronsku mikroskopiju, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Ovom prilikom želim da se zahvalim:

Prof. dr Aleksandri Korać, mentoru, na prenetom znanju i iskustvima tokom mog istraživačkog rada, na stručnom vođenju prilikom planiranja i izvođenja eksperimenta, kao i sugestijama i smernicama tokom pisanja i uobličavanja ove disertacije;

Dr Ani Stančić za svu pomoć, savete i sugestije, kako u istraživačkom radu, tako i pri pisanju doktorske disertacije, za njen detaljan kritički pregled i ocenu;

Kseniji Veličković, za pomoć u prvim danima mog profesionalnog rada, kao i pomoć u praktičnom radu i pri pisanju disertacije;

Igoru Goliću, za pomoć u izradi i pri pisanju disertacije;

Prof. dr Waltraud Klepal, za to što je omogućila i nesebično pomogla, da deo praktičnog rada bude obavljen u *Cell Imaging and Ultrastructure Unit*, na Fakultetu prirodnih nauka, Univerziteta u Beču, Austrija;

Prof. dr Batu Koraću, na prenetom znanju i korisnim savetima, u mom laboratorijskom radu i pri pisanju ove disertacije;

Dr Biljani Buzadžić, na korisnim savetima i sugestijama pri radu;

Prof. dr Vesni Koko, za sve korisne savete u vezi sa stereološkim i morfometrijskim metodama;

Stručnim saradnicama Centra za elektronsku mikroskopiju, Aniti Lazarević i Maji Bogdanović, za pomoć u pripremi i izradi elektron-mikrografija;

Hvala Kseniji, Igoru, Vesni, Ani, Aleksandri i Milici za drugarstvo i kolegijalnost.

Hvala mojoj porodici, što su sve sa mnom zajedno prošli, na ljubavi i podršci zbog kojih sve, pa i ova disertacija, ima sasvim novu dimenziju.

## MOLEKULSKI MEHANIZMI STRUKTURNOG REMODELIRANJA MRKOG MASNOG TKIVA PACOVA INDUKOVANOG INSULINOM

### REZIME

U svetlu sve većeg broja dokaza koji ukazuju na prisustvo metabolički aktivnog mrkog masnog tkiva (BAT – *brown adipose tissue*, engl.) kod odraslih ljudi, kao i na njegovu potencijalnu ulogu u sprečavanju razvoja gojaznosti, insulinske rezistence i metaboličkog sindroma uopšte, sve je više studija o rasvetljavanju metaboličkog značaja ovog tkiva, kao i njegovoj termogenoj stimulaciji u svrhu terapije navedenih poremećaja. Insulin se, kao važan anabolički hormon, smatra značajnim modulatorom strukturne organizacije i funkcije BAT. Cilj ovog istraživanja bio je rasvetljavanje molekulskih osnova insulinom-indukovanog strukturnog remodeliranja BAT putem identifikacije mehanizama koji regulišu insulinom-stimulisanu proliferaciju i diferencijaciju ćelija, kao i identifikacije mehanizama koji učestvuju u oštećenjima ćelija i njihovom umiranju. Pacovi soja Wistar su jednom dnevno tretirani fiziološkom (0.4 IU/kg telesne mase) i suprafiziološkom (4 IU/kg telesne mase) dozom insulina, jedan (akutan tretman) ili tri (hroničan tretman) dana. Kao fiziološka kontrola, dve grupe pacova su u istom trajanju tretirane fiziološkim rastvorom (akutna i hronična kontrola). Tri sata nakon poslednje doze, životinje su žrtvovane, a interskapularni depo BAT je izolovan, izmeren i pripremljen za tehnike svetlosne i elektronske mikroskopije. Analiza tkiva izvršena je korišćenjem metoda histohemijskog i imunohistohemijskog bojenja, metoda konfokalne i transmisionne elektronske mikroskopije i elektron-disperzivne analize X-zracima (EDX) hemijskog sastava tkiva kao i metoda stereološke i morfometrijske analize. Rezultati su pokazali postojanje strukturnog i funkcijskog remodeliranja BAT, gde dominiraju procesi hipertrofije i hiperplazije ćelija, praćene povećanjem termogenog kapaciteta mrkih adipocita (raste ekspresija dekaplirajućeg proteina 1 (UCP1 – *uncoupling protein 1*, engl.), udeo mitohondrija, procesi mitohondriogeneze). S druge strane, primetno je da se, naročito pri hroničnim i tretmanima visokom dozom insulina, javljaju citotoksični i inhibitorni efekti na pojedine ćelije ili klastere ćelija: raste učestalost ćelijske smrti, ekstravazacija eritrocita i njihovo uklanjanje od strane mrkih adipocita i makrofaga, (evidentno toksično po adipocite sudeći po rastu: ekspresije enzima antioksidativne odbrane; lipidne peroksidacije i nitrozilacije proteina, učestalosti lipofuscinogeneze). Takođe se pri hronično visokoj hiperinsulinemiji smanjuje

ekspresija regulatora termogeneze (PGC-1 $\alpha$  - *peroxisome proliferator-activated receptor –  $\gamma$  coactivator - 1 $\alpha$* , engl.) ukazujući da produženo izlaganje visokim dozama insulina, može da inhibira termogeni odgovor tkiva, o čemu svedoči i povećana učestalost mitohondrijalnih oštećenja. Povećana ekspresija proinflamatornih citokina (TNF- $\alpha$  - *tumor-necrosis factor –  $\alpha$* , engl., interleukina 6), nukleusnog faktora – kB (NF-kB) i makrofagnog inflamatornog proteina - 3 $\beta$  (MIP-3 $\beta$ ) u pojedinačnim zrelim, multilokulusnim adipocitima, preadipocitima i unilokulusnim adipocitima ukazuje na njihovu potencijalnu ulogu u lokalnom smanjenju insulinske senzitivnosti. U vezi sa hiperplazijom ćelija, primećeno je da su adipogeneza i angiogeneza u BAT vremenski i prostorno povezane, tj. da postoji udruženost navedenih procesa, koja ukazuje na potrebu udruženog nastanka adipocita i endotelskih ćelija, u svrhu efikasnog strukturno-funkcijskog remodeliranja tkiva. Sumarno, može se zaključiti da hiperinsulinemija ima značajan efekat na BAT – potvrđeno je anaboličko dejstvo insulina i važnost njegove uloge u stimulaciji BAT, ali je i pokazana toksičnost visoke doze i hroničnog izlaganja na ćelije BAT; što je sve doprinelo rasvetljavanju molekulskih mehanizama u osnovi strukturnog remodeliranja ovog tkiva. Takođe, pokazano je da se visoka plastičnost BAT ogleda u postojanju funkcionalnih klastera ćelija, u kojima se odvijaju svi važni tkivni procesi (adipo/angiogeneza, ćelijska smrt, eritrofagocitoza), što ukazuje na pravilnu uređenost tkivne organizacije i strukturnog remodeliranja, kao preduslova za pravilno funkcionisanje tkiva, kako u fiziološkim, tako i u uslovima izmenjene tkivne homeostaze, što je pokazano na modelu hiperinsulinemije.

**KLJUČNE REČI:** mrko masno tkivo, insulin, hiperinsulinemija, strukturno remodeliranje tkiva, adipogeneza, angiogeneza, termogeneza, mrki adipocit

**NAUČNA OBLAST:** BIOLOGIJA

**UŽA NAUČNA OBLAST:** BIOLOGIJA ĆELIJA I TKIVA

**UDK BROJ:** 591.82+612.51 ] :612.349.8(043.3)

## **MOLECULAR MECHANISMS OF INSULIN-INDUCED RAT BROWN ADIPOSE TISSUE STRUCTURAL REMODELING**

### **ABSTRACT**

There is an increasing amount of evidence that indicates presence of brown adipose tissue (BAT) in adult humans, and its potential role in prevention of obesity, insulin resistance and metabolic syndrome, in general. That is why number of studies on elucidation of the metabolic importance of this tissue, along with its thermogenic stimulation in order to treat these disorders, increases. As an important anabolic hormone, insulin is considered as a major modulator of BAT structure and function. The aim of this study was to elucidate the molecular basis of insulin-induced structural remodeling of BAT through the identification of mechanisms that regulate insulin-stimulated proliferation and differentiation and through the identification of mechanisms involved in cell damage and death. Wistar strain rats were treated intraperitoneally with physiological (0.4 IU/kg BW) or supraphysiological (4 IU/kg BW) dose of insulin for one (acute treatment) or three days (chronic treatment), respectively. Two groups of rats served as physiological controls, and were treated with saline (acute and chronic control). Three hours after the last injection the animals were sacrificed and the interscapular portion of BAT was removed, its weight was measured and it was processed for electron and light microscopic examinations. Methods of histochemical staining, immunohistochemical labeling, confocal and transmission electron microscopy, tissue electron-dispersive X-ray microanalysis (EDX) and stereological and morphometric analyses were performed. The results showed the existence of structural and functional remodeling of BAT, based on adipocyte hypertrophy and hyperplasia which are followed by increasing of thermogenic capacity (expression of uncoupling protein 1 (UCP1), cellular proportion of mitochondria, mitochondrial biogenesis). On the other hand, it is obvious that, especially after chronic and high-dose treatments, insulin cytotoxic and inhibitory effects on individual cells or cell clusters occur: incidence of cell death increases, as well as red blood cell extravasation and their removal by brown adipocytes and macrophages (which is evidently toxic for the adipocyte, since expression of antioxidative defense enzymes, lipid peroxidation, protein nitrosylation and lipofuscin formation were increased). Also, during chronically high hyperinsulinemia, expression of peroxisome proliferator-activated receptor -  $\gamma$  coactivator - 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ), regulator of thermogenesis

decreases, indicating that prolonged exposure to high doses of insulin can inhibit thermogenic response of BAT, as evidenced by the increased frequency of mitochondrial damage in brown adipocytes. Increased expression of proinflammatory cytokines (tumor-necrosis factor -  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin 6), nuclear factor -  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and macrophage inflammatory protein -  $3\beta$  (MIP- $3\beta$ ) in individual mature, multilocular adipocytes, preadipocytes and unilocular adipocytes, demonstrates their potential role in local decrease of insulin sensitivity. Regarding hyperplasia of cells, it was noticed spatiotemporal association between processes of adipogenesis and angiogenesis, which means that there is a connection between these processes, demonstrating the need for the coupled differentiation of adipocytes and endothelial cells, for the purpose of efficient structural and functional remodeling of the tissue. In summary, it can be concluded that hyperinsulinemia has a significant impact on BAT – we confirmed the anabolic effect of insulin, and the importance of its role in BAT stimulation, but also demonstrated the toxicity of high dose and chronic exposure to insulin on BAT cells, all of which contribute to understanding the molecular mechanisms underlying structural remodeling of the tissue. In addition, it was shown that the high plasticity of BAT is reflected in the existence of functional clusters of cells, which take place in all the important processes in the tissue (adipo/angiogenesis, cell death, erythrophagocytosis), indicating the proper arrangement of tissue organization and structural remodeling as a prerequisite for the proper functioning of the tissue under physiological conditions and during altered tissue homeostasis, as shown on the model of hyperinsulinemia.

**KEY WORDS:** brown adipose tissue, insulin, hyperinsulinaemia, structural tissue remodeling, adipogenesis, angiogenesis, thermogenesis, brown adipocyte

**SCIENTIFIC FIELD:** BIOLOGY

**SPECIAL TOPICS:** CELL AND TISSUE BIOLOGY

**UDC NUMBER:** 591.82+612.51]:612.349.8(043.3)



# SADRŽAJ

---

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1. ŠTA JE MRKO MASNO TKIVO I ZBOG ČEGA JE ZNAČAJNO?</b>	<b>1</b>
1.1.1. Tipovi masnog tkiva	1
1.1.2. Osnovna funkcija mrkog masnog tkiva – termogeneza bez drhtanja	2
<b>1.2. PLASTIČNOST MRKOG MASNOG TKIVA</b>	<b>5</b>
1.2.1. Adipocitna diferencijacija u mrkom masnom tkivu	7
1.2.2. Poreklo mrkih adipocita	8
<b>1.3. EFEKTI INSULINA NA MRKO MASNO TKIVO</b>	<b>9</b>
1.3.1. Direktni efekti insulina na mrko masno tkivo	9
<i>Efekat insulina na adipocitnu diferencijaciju</i>	10
<i>Efekat insulina na termogenezu</i>	11
<i>Efekat insulina na transport glukoze</i>	11
1.3.2. Hiperinsulinemija i insulinska rezistenca u mrkom masnom tkivu	11
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIJAL I METODI</b>	<b>15</b>
<b>3.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE</b>	<b>15</b>
<b>3.2. DIZAJN EKSPERIMENTA</b>	<b>15</b>
<b>3.3. ŽRTVOVANJE ŽIVOTINJA I IZOLOVANJE TKIVA</b>	<b>16</b>
<b>3.4. PRIPREMA TKIVA ZA MIKROSKOPSKE ANALIZE</b>	<b>16</b>
3.4.1. Kalupljenje tkiva u parafinu	16
3.4.2. Kalupljenje tkiva u smoli	16
<b>3.5. ULTRASTRUKTURNA ANALIZA TKIVA</b>	<b>16</b>
<b>3.6. MORFOMETRIJSKA I STEREOLOŠKA ANALIZA TKIVA</b>	<b>17</b>
3.6.1. Određivanje volumenske gustine krvnih sudova	17
3.6.2. Određivanje volumenske gustine adipocita	17
3.6.3. Određivanje volumenske gustine lipidnih tela	17
3.6.4. Određivanje brojnosti adipocita	18
3.6.5. Određivanje prosečne zapremine adipocita	18
3.6.6. Određivanje volumenske gustine mitohondrija u mrkim adipocitima	18
3.6.7. Određivanje površine mitohondrijalnog profila mrkih adipocita	18
3.6.8. Određivanje volumenske gustine kristi mitohondrija mrkih adipocita	19
<i>Statistička obrada dobijenih rezultata</i>	19
<b>3.7. IMUNOHISTOHEMIJSKA DETEKCIJA PROTEINA</b>	<b>19</b>
3.7.1. Streptavidin-biotin metoda imunohistohemijske detekcije	19
3.7.2. Fluorescentna metoda imunohistohemijske detekcije i kolokalizacije proteina	20
3.7.3. Imunohistohemijska metoda detekcije proteina na nivou elektronske mikroskopije	20
<b>3.8. DETEKCIJA APOPTOZE U TKIVU</b>	<b>22</b>
<b>3.9. MIKROANALIZA ELEMENATA U TKIVU</b>	<b>22</b>
<b>4. REZULTATI</b>	<b>23</b>
<b>4.1. EFEKAT INSULINA NA TELESNU MASU I MASU MRKOG MASNOG TKIVA</b>	<b>23</b>
<b>4.2. UPOREDNA MORFOMETRIJSKA I STEREOLOŠKA ANALIZA</b>	

<b>MRKOG MASNOM TKIVA</b>	<b>23</b>
4.2.1. Promene volumenskih gustina mrkih adipocita i krvnih sudova u tkivu	23
4.2.2. Promena brojnosti adipocita	24
4.2.3. Promena zapremine mrkih adipocita	26
4.2.4. Promene volumenskih gustina lipidnih tela i mitohondrija u mrkim adipocitima	26
<b>4.3. EFEKAT INSULINA NA REMODELIRANJE KAPILARNE MREŽE U MRKOM MASNOM TKIVU</b>	<b>28</b>
4.3.1. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija VEGF	28
4.3.2. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija eNOS i iNOS	28
4.3.3. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija vWF	32
4.3.4. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija Ki-67 markera proliferacije	32
4.3.5. Angiogeneza i aktivacija endotela	33
<b>4.4. EFEKAT INSULINA NA TERMOGENI KAPACITET MRKOG MASNOM TKIVA</b>	<b>36</b>
4.4.1. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija UCP1	36
4.4.2. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija PGC-1 $\alpha$	36
4.4.3. Stereološke promene na nivou mitohondrija mrkih adipocita	39
<i>Površina mitohondrijalnog profila</i>	39
<i>Volumenska gustina kristi</i>	39
4.4.4. Oštećenja mitohondrija mrkih adipocita	40
<b>4.5. CITOTOKSIČNI EFEKAT INSULINA U MRKOM MASNOM TKIVU</b>	<b>42</b>
4.5.1. Hemijska karakterizacija mrkog masnog tkiva	42
4.5.2. Lipofuscinogeneza u mrkim adipocitima	43
<i>Autofluorescirajuća svojstva lipofuscina mrkih adipocita</i>	44
4.5.3. Eritrofagocitoza i smrt mrkih adipocita	47
<i>Imunohistohemijska detekcija HO-1 i HO-2 u eritrofagocitnim regionima</i>	51
4.5.4. Apoptoza endotelskih ćelija	52
4.5.5. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija 4-HNE proteinskih adukata	53
4.5.6. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija nitrotirozina	53
4.5.7. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija enzima antioksidativne odbrane	56
<i>Izoforme SOD (CuZnSOD i MnSOD)</i>	56
<i>Katalaza</i>	56
<b>4.6. INFLAMATORNI STATUS MRKOG MASNOM TKIVA</b>	<b>60</b>
4.6.1. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija proinflamatornih citokina	60
<i>TNF- <math>\alpha</math></i>	60
<i>Interleukin 6</i>	60
4.6.2. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija NF-kB	63
4.6.3. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija MIP3- $\beta$	65
4.6.4. Imunohistohemijska detekcija i morfološka analiza makrofaga	67
<b>4.7. SIGNALNI PUTEVI INSULINA U MRKOM MASNOM TKIVU</b>	<b>69</b>
4.7.1. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija insulina	69
4.7.2. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija IR-P	69
4.7.3. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija IRS-1	70
4.7.4. Uporedna histološka i citološka analiza lokalizacije insulina, IR-P i IRS-1	74
<i>Insulin i IR-P u multilokulusnim adipocitima</i>	75
<i>Insulin i IR-P u unilokulusnim adipocitima</i>	77

<i>Insulin i IR-P u eritrofagocitnim regionima</i>	78
<i>Insulin i IR-P u endotelskim ćelijama</i>	79
<i>Insulin i IR-P u regionima adipogeneze i angiogeneze</i>	80
<b>5. DISKUSIJA</b>	<b>82</b>
<b>5.1. INSULIN STIMULIŠE RAST MRKOG MASNOG TKIVA</b>	<b>82</b>
5.1.1. Prvo hipertrofija pa hiperplazija mrkih adipocita	82
5.1.2. Kapilarna mreža mrkog masnog tkiva prati njegov rast	83
<i>Uloga NO u regulaciji prokrvljenosti i remodeliranju kapilarne mreže</i>	83
<i>Uloga VEGF u remodeliranju mrkog masnog tkiva</i>	84
5.1.3. Adipogeneza i angiogeneza u mrkom masnom tkivu su povezane	85
<b>5.2. UTICAJ INSULINA NA TERMOGENI KAPACITET MRKOG MASNOG TKIVA</b>	<b>87</b>
5.2.1. Strukturno i molekularno remodeliranje mitohondrija mrkih adipocita	87
5.2.2. PGC-1 $\alpha$ i termogeni kapacitet	88
5.2.3. NO i termogeni kapacitet	89
<b>5.3. CITOTOKSIČNOST VISOKE DOZE INSULINA U MRKOM MASNOM TKIVU</b>	<b>91</b>
5.3.1. Apoptoza endotelskih ćelija	91
5.3.2. Eritrofagocitoza	92
5.3.3. Lipofuscinogeneza	95
<b>5.4. ANTIOKSIDATIVNA ODBRANA U MRKOM MASNOM TKIVU U USLOVIMA HIPERINSULINEMIJE</b>	<b>99</b>
<b>5.5. UTICAJ HIPERINSULINEMIJE NA RAZVOJ INFLAMACIJE I INSULINSKE REZISTENCE U MRKOM MASNOM TKIVU</b>	<b>100</b>
<b>5.6. SPECIFIČNOSTI ĆELIJA U MRKOM MASNOM TKIVU HIPERINSULINEMIČNIH PACOVA</b>	<b>103</b>
5.6.1. Unilokulusni adipociti mrkog masnog tkiva – više od mirujućih depoa lipida?	103
5.6.2. Preadipociti mrkog masnog tkiva	104
5.6.3. Makrofage mrkog masnog tkiva	106
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	<b>108</b>
<b>7. LITERATURA</b>	<b>111</b>
<b>PRILOG – SPISAK SKRAĆENICA</b>	<b>I</b>
<b>BIOGRAFIJA AUTORA</b>	<b>III</b>

# 1. UVOD

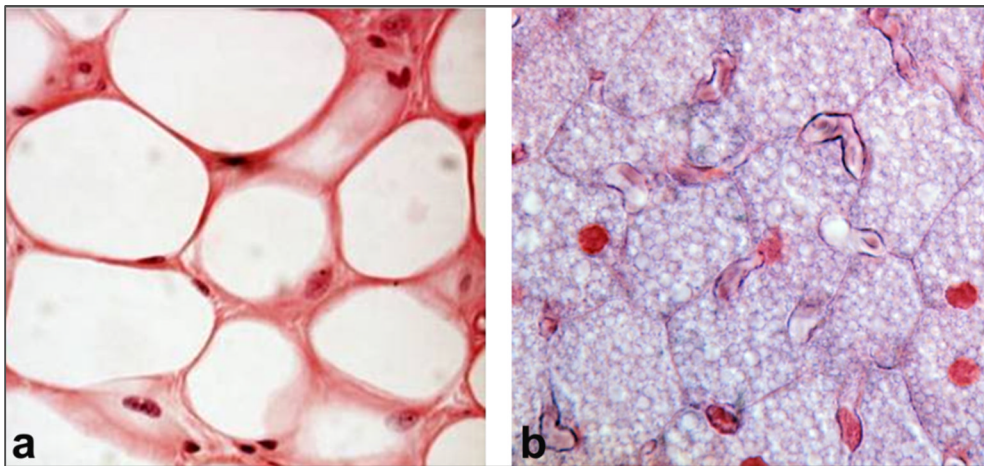
---

## 1.1. ŠTA JE MRKO MASNO TKIVO I ZBOG ČEGA JE ZNAČAJNO?

### 1.1.1. Tipovi masnog tkiva

Masno (adipozno) tkivo, izgrađeno prvenstveno iz adipocita, vrsta je vezivnog tkiva koje ima sposobnost masovnog deponovanja lipida. Kod sisara se na osnovu strukture, funkcije i anatomske lokalizacije razlikuju dva tipa masnog tkiva (*Slika 1*):

- Belo masno tkivo (WAT – *white adipose tissue*, engl.) čija je glavna funkcija deponovanje energije u formi lipida i sreće se kod svih životinja, kako potkožno tako i visceralno; i
- Mrko masno tkivo (BAT – *brown adipose tissue*, engl.) koje, sa druge strane, ima važnu ulogu u rasipanju energije pošto se lipidi deponovani u BAT koriste u procesu proizvodnje toplote (termogeneza). BAT se sreće samo kod sisara gde se prvenstveno nalazi u specifičnim regionima, prvenstveno u blizini većih krvnih sudova (interskapularno, subskapularno, aksilarno i suprasternalno).



*Slika 1. Tipovi masnog tkiva kod sisara – (a) – WAT sa krupnim, okruglim unilokulusnim adipocitima; (b) – BAT sa višeučeličnim, multilokulusnim adipocitima.*

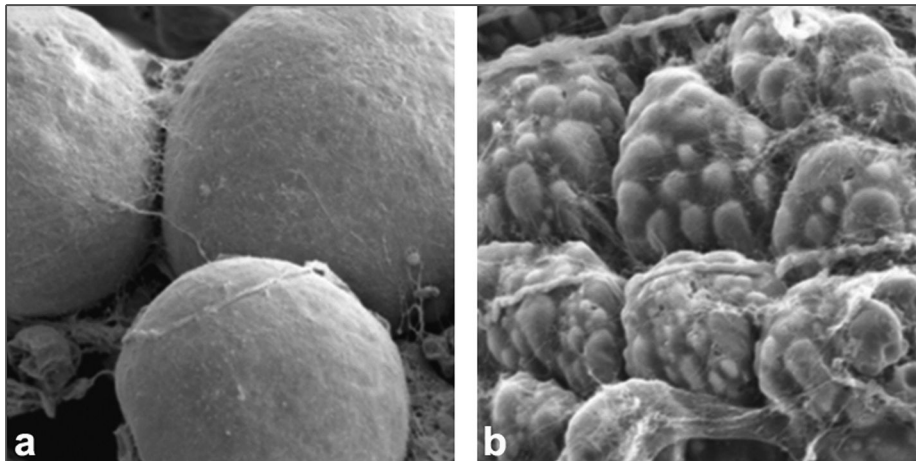
---

Strukturno se ova dva tipa tkiva mogu razlikovati već na nivou svetlosne mikroskopije, s obzirom da se i adipociti iz kojih su građeni razlikuju, kako anatomski tako i funkcionalno (*Slika 2*):

- **Beli adipociti** se još nazivaju i unilokulusni, s obzirom da njihovu unutrašnjost većim delom ispunjava krupno, jedinstveno lipidno telo, a ostatak citoplazme sa nukleusom je sveden na tanak sloj ispod ćelijske membrane; zbog čega su ove ćelije uglavnom krupne

i okruglog oblika. Njihova osnovna funkcija, u skladu sa građom, je akumulacija energije u formi masnih kiselina unetih hranom, u vidu triglicerida; koje se po potrebi oslobađaju i distribuiraju do ciljnih ćelija u organizmu. Pored funkcije deponovanja energije, ove ćelije imaju i važnu funkciju toplotne izolacije (insulacije) organizma kao i endokrinu funkciju, s obzirom da luče hormone, citokine i ostale bioaktivne molekule.

- **Mrki adipociti** (multilokulusni) su manji od unilokulusnih, višegaonog su oblika, poseduju veći broj sitnijih lipidnih tela, i veliki broj karakterističnih mitohondrija sa pravilno uređenim kristama (*Slika 3*). Njihova struktura je takođe u skladu sa funkcijom, naime masne kiseline lipidnih tela se koriste za produkciju toplote u mitohondrijama, pa su lipidi u formi sitnijih depozicija, kako bi se omogućio lakši pristup enzima (lipaza), i oslobađanje masnih kiselina.

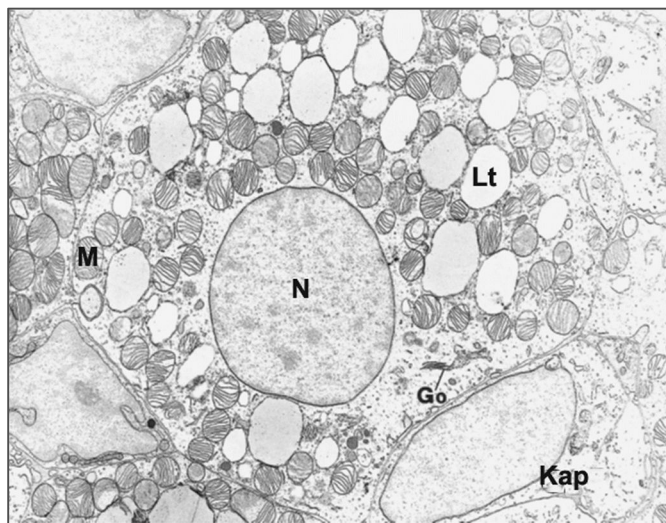


*Slika 2. Tipovi adipocita – (a) – beli, unilokulusni adipociti, i (b) – mrki multilokulusni adipociti. Modifikovano iz: Frontini A. i Cinti S., 2010. Cell Metab. 11.*

### 1.1.2. Osnovna funkcija mrkog masnog tkiva – termogeneza bez drhtanja

Mali, hibernatorski i novorođeni sisari prvenstveno, poseduju dve strategije za dodatnu produkciju toplote – termogenezu drhtanjem i termogenezu bez drhtanja (NST - *non-shivering thermogenesis*, engl.) (Banet i sar., 1978). Termogeneza drhtanjem podrazumeva kontrakcije skeletnih mišića u uslovima izlaganja hladnoći, dok se kod NST produkcija toplote vrši u jedinstvenom termogenom organu – BAT (Smith i Horwitz, 1969; Nicholls i Locke, 1984). Shodno svojoj funkciji, mrki adipociti imaju vrlo visok respiratorni kapacitet (Cannon i Nedergaard, 2004), zahvaljujući mitohondrijama, njihovoj velikoj zastupljenosti i

specijalizovanoj strukturi i funkciji, koje zajedno sa visokom prokrvljenošću doprinose mrkoj boji ovog tkiva.



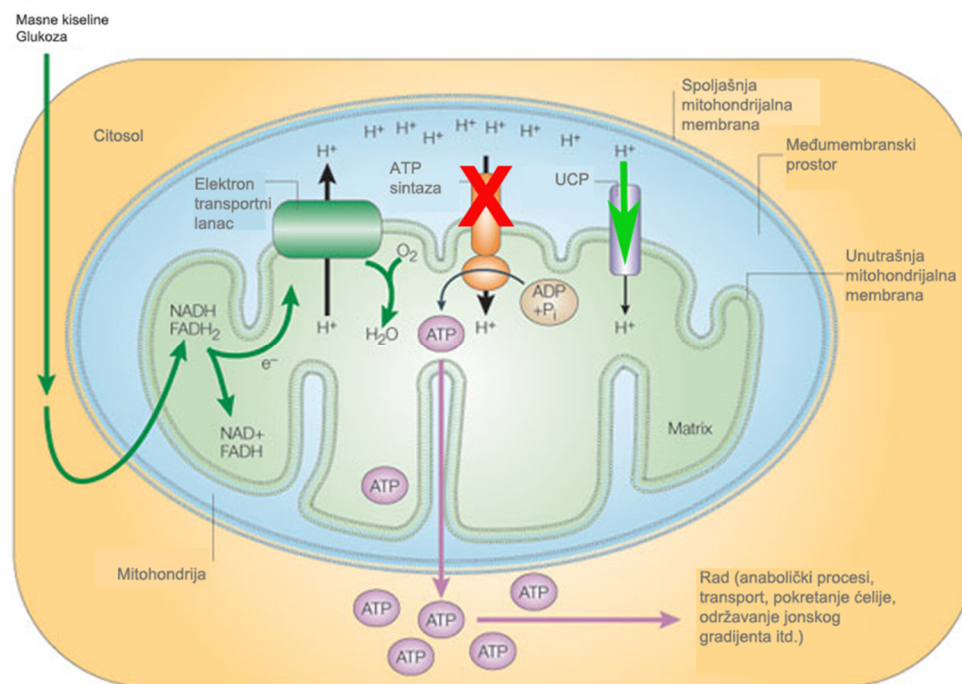
**Slika 3. Ultrastrukturni prikaz tipičnog mrkog adipocita** – uočavaju se brojne mitohondrije (M) sa pravilno uređenim kristama, brojna lipidna tela (Lt), kompleks Goldži (Go) i nukleus (N). Tipična za BAT je i visoka prokrvljenost, zbog čega je svaki adipocit okružen sa više kapilara (Kap). Modifikovano iz: Cinti S., 2001. *Proc Nutr Soc.* 60(3):319-28.

Termogena aktivnost mrkih adipocita je posledica posedovanja jedinstvenog mitohondrijalnog, tzv. dekluplirajućeg proteina - 1 (UCP1 – *uncoupling protein 1*, engl.) (Bouilland i sar., 1985) (**Slika 4**). UCP1 je protein unutrašnje mitohondrijalne membrane mrkih adipocita čija je funkcija rasipanje protonskog elektrohemijjskog gradijenta, čime se respiracija odvaja od sinteze ATP (Klingenberg i Huang, 1999). Drugim rečima, ovaj transmembranski protein omogućava protonima ( $H^+$ ), ispumpanim u međumembranski prostor radom elektron-transportnog lanca, da se vrate u matriks mitohondrije, čime se energija nastala pri oksidaciji supstrata umesto za sintezu ATP, rasipa u vidu toplote, koja se iz mrkih adipocita krvotokom šalje kroz organizam.

U cilju razumevanja funkcije BAT, a posebno remodeliranja (hiperplazija, hipertrofija i atrofija tkiva) pri različitim fiziološkim uslovima kojima se menja ukupan termogeni kapacitet tkiva, razumevanje faktora koji utiču na akutnu aktivaciju mrkih adipocita, njihov nastanak, diferencijaciju i umiranje, je od suštinskog značaja.

Termogeneza BAT je pod kontrolom simpatičkog nervnog sistema (SNS) koji obezbeđuje centralnu kontrolu NST (Suter, 1969). Termogeneza se akutno aktivira putem delovanja noradrenalina na  $\beta_3$ -adrenergičke receptore ( $\beta_3$ -AR). Glavno gorivo za održavanje termogenog kapaciteta tkiva su masne kiseline (Rousset i sar., 2004) koje se zahvaljujući

hormon senzitivnoj lipazi (HSL) i lipoprotein lipazi (LPL) oslobađaju iz triglicerida lipidnih tela i lipoproteina (Rabelo i sar., 1997).

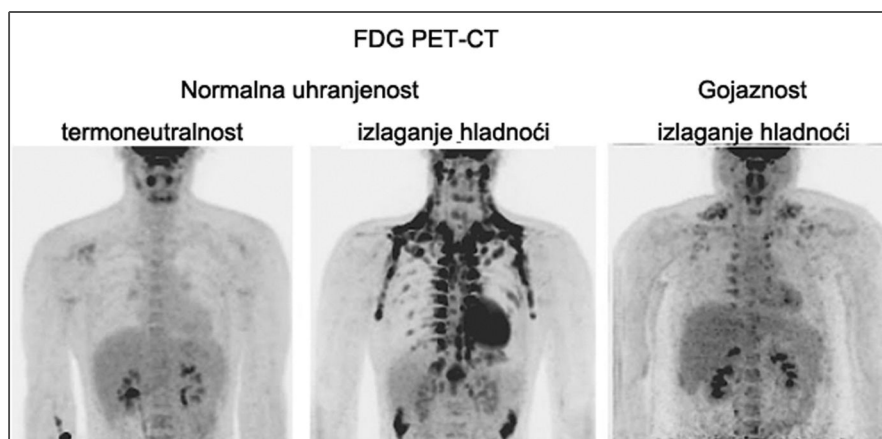


**Slika 4. Shematski prikaz procesa termogeneze bez drhtanja u mitohondriji mrkog adipocita – zahvaljujući UCP1 proteinu u unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani, elektrohemijski gradijent se ne koristi za sintezu ATP, već se rasipa u vidu toplote. Modifikovano iz: Krauss S. i sar., 2005. Nat Rev Mol Cell Biol. 6.**

Fiziološka uloga endogene produkcije toplote u procesu NST je održavanje stalne telesne temperature nezavisno od dnevnih i sezonskih temperaturnih fluktuacija. Produkcija toplote u BAT se takođe aktivira visokokaloričnom ishranom što doprinosi „sagorevanju“ viška hrane (Rothwell i Stock, 1983; Himms-Hagen, 1995). Genska ablacija BAT ili  $\beta$ -adrenergičkih receptora odgovornih za njegovu aktivaciju, dovodi do razvoja gojaznosti i dijabetesa tipa 2 (T2D) kod miševa (Lowell i sar., 1993; Bachman i sar., 2002) i u vezi je sa odsustvom termogene aktivnosti (Cannon i Nedergaard, 2010); dok su miševi sa većim udelom BAT manje skloni gojaznosti, imaju veću insulinsku senzitivnost i ne razvijaju T2D (Kopecky i sar., 1995; Tsukiyama-Kohara i sar., 2001; Xue i sar., 2007). Sve to potvrđuje fiziološki značaj BAT i ukazuje na njegovo antagonističko dejstvo u razvoju ovih oboljenja (van Marken Lichtenbelt i sar., 2009).

Kod ljudi, količina BAT se smanjuje kratko po rođenju (oko 3. meseca života) i doskorašnji naučni stav je bio da nema većeg značaja kod odraslih. Neočekivani dokaz o metabolički aktivnom BAT kod odraslih ljudi proizišao je pri fluoro-deoksi-glukoznoj

pozitron emisionoj tomografiji (FDG PET) (*Slika 5*) koja je imala za cilj detekciju metastaza tumora, usled njihove visoke metaboličke aktivnosti i unosa glukoze, a koja je pokazala prisustvo BAT u cervikalnom, supraklavikularnom, paravertebralnom, medijastinalnom, paraaortnom i suprarenalnom regionu značajnog procenta ljudi (*Nedergaard i sar., 2007*). Biopsije uzete iz ovih regiona od zdravih osoba, potvrdile su da se radi o metabolički aktivnom BAT, na osnovu histoloških karakteristika i ekspresije iRNK i proteina karakterističnih za ovo tkivo (*Virtanen i sar., 2009*). Danas je broj dokaza o prisustvu metabolički aktivnog BAT kod odraslih ljudi, u vezi sa adipoznošću, temperaturom, polom i uzrastom, sve veći (*Cypess i sar., 2009; Saito i sar., 2009; van Marken Lichtenbelt i sar., 2009; Virtanen i sar., 2009*), zbog čega su mehanizmi nastanka i razvoja ovog tkiva i njegovih ćelija, prvenstveno mrkih adipocita, pod dejstvom različitih fizioloških i farmakoloških faktora, predmet intenzivnih istraživanja na iznalaženju rešenja u terapiji gojaznosti.



*Slika 5. Detekcija BAT FDG PET metodom kod normalno uhranjenih i gojaznih ljudi pri temperaturi termoneutralnosti i izloženosti hladnoći. Modifikovano iz: van Marken Lichtenbelt i sar., 2009. New Engl. J. Med. 360.*

## 1.2. PLASTIČNOST MRKOG MASNOG TKIVA

Pored **aktivacije BAT**, koja podrazumeva postojanje termogene aktivnosti u tkivu, potrebno je razlikovati i proces **hipertrofije BAT** pod kojom se podrazumeva čitav niz koordinisanih strukturnih i funkcionalnih promena kojima se povećava termogeni/metabolički kapacitet, odnosno tkivo se priprema za predstojeću termogenu aktivnost (*Cannon i Nedergaard, 2004*). BAT je vrlo dinamično tkivo koje se karakteriše izuzetnim stepenom plastičnosti i sposobnošću remodeliranja (*Foster i Frydman, 1979*;



*Rothwell i Stock, 1979*) tokom celog života. Na remodeliranje BAT utiču dva suprotna procesa – tkivna hipertrofija i atrofija (regresija), koje imaju ulogu obezbeđivanja nove homeostaze u različitim metaboličkim uslovima koji vladaju u tkivu (*Otasevic i sar., 2011*). Naime, tkivna masa i njegova metabolička aktivnost se povećavaju u odgovoru na različite stimulse, kao što su: hladnoća, ishrana, hormoni, faza razvića, hibernacija itd. Prekid ovih stimulusa indukuje regresiju BAT koje se pri tom od aktivnog, hiperplastičnog tkiva, prevodi u inaktivno tkivo koje ulazi u proces atrofije (*Himms-Hagen, 1990*).

BAT je znatno prokrvljenije od WAT što mrkim adipocitima obezbeđuje odgovarajuće snabdevanje kiseonikom i metaboličkim supstratima, kao i odvođenje toplote produkovane u procesu NST (*Bukowiecki i sar., 1986*). Sem toga, BAT je i vrlo inervisano tkivo. Noradrenalin oslobođen iz simpatičkih nervnih završetaka u BAT se vezuje za brojne  $\alpha$ - i  $\beta$ -AR, čime se stimuliše hiperplazija preadipocita putem  $\beta_1$ -AR, a lipoliza i termogena aktivnost putem  $\beta_3$ -AR (*Cannon i Nedergaard, 2004*). Aktivacija simpatičke stimulacije termogenog programa u BAT, predstavlja kompleksan proces koga čini niz biohemijskih, morfoloških i citoloških dešavanja koji veoma brzo transformišu dormantno BAT u veoma hipertrofično i aktivno tkivo. Tom se prilikom povećava sadržaj UCP1, indukuje hipertrofija zrelih mrkih adipocita, kao i proliferacija i diferencijacija prekursorskih ćelija adipocita. Takođe dolazi do: mitohondriogeneze, angiogeneze, peroksizmalne biogeneze, povećanja proteinske i DNK sinteze, lipolize, mitohondrijske  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina i smanjenja nivoa ćelijske smrti (*Suter, 1969; Bukowiecki i sar., 1986; Himms-Hagen, 1990; Lindquist i Rehnmark, 1998*). Sem toga, sami mrki adipociti podležu morfološkim transformacijama - povećava se njihova multilokularnost (raste broj sitnijih lipidnih tela u citoplazmi), kao i broj mitohondrija sa pravilno uređenim, paralelnim kristama (*Suter, 1969; Trayburn, 2005*). Sve to omogućava povećanje metaboličke aktivnosti tkiva, kao i nivoa potrošnje kiseonika.

Pored klasične, hladnoćom-indukovane NST, i svi ostali vidovi adaptivne adrenergičke termogeneze, uključujući i dijetom-indukovanu, u potpunosti zavise od aktivnosti mrkih adipocita. Simpatička stimulacija BAT, ipak ne može da objasni sva fiziološka stanja koja dovode do uvećanja BAT i indukcije UCP1 ekspresije. Postoje barem dva fiziološka stanja koja su u vezi sa uvećanjem BAT, a kod kojih je simpatička stimulacija „kontraindikovana“. Jedno je fetalno razviće BAT, kod kojeg bi eventualna intrauterina simpatička stimulacija na 37 °C dovela do toplotnog opterećenja majke; a drugo je priprema za hibernaciju (prehibernacija), pošto bi simpatička inervacija u tom periodu dovela do

trošenja rezervi lipida neophodnih za termogeno zagrevanje tela u periodu podizanja iz hibernacije. Figurativno rečeno, ovakvo uvećanje BAT predstavlja „nepodloženu peć“ koja čeka na „varnicu“ – adrenergički stimulus, kako bi otpočela produkcija toplote, dakle radi se o hipertrofičnom, remodelovanom ali još uvek neaktiviranom BAT.

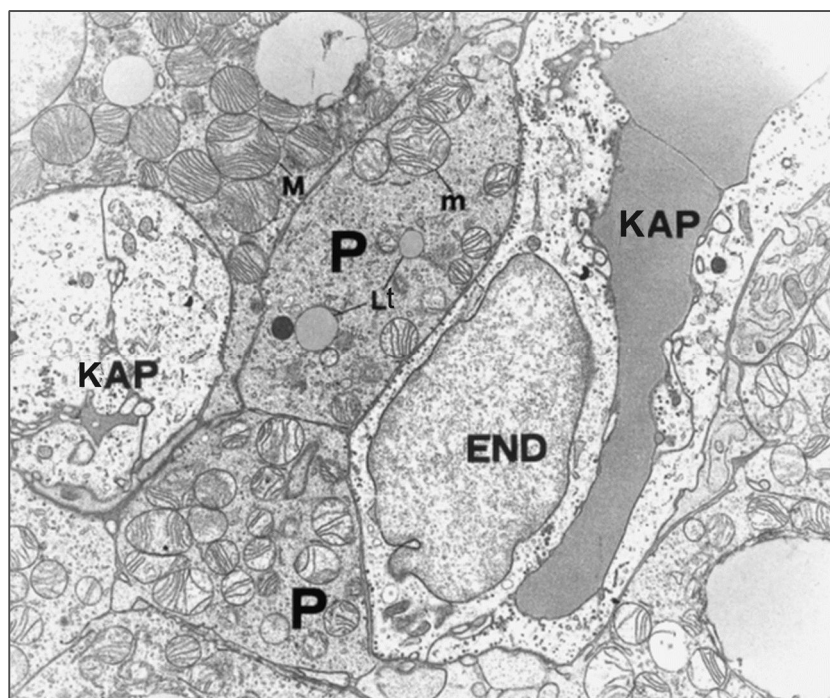
### 1.2.1. Adipocitna diferencijacija u mrkom masnom tkivu

Adipocitna diferencijacija se odvija u dva stadijuma - 1) proliferacija stem ćelija, opredeljivanje populacije u smeru preadipocitnog pula, ulazak u proces diferencijacije; 2) terminalna diferencijacija preadipocita do zrelih adipocita (*Cristancho i Lazar, 2011*). To je kompleksan proces koji zahteva komunikaciju između vanćelijskih stimulusa putem koordinisane mreže receptora i transkripcionih faktora u nukleusu (*Rangwala i Lazar, 2000; Rosen i sar., 2000; Camp i sar., 2002*). Terminalna diferencijacija mrkih adipocita podrazumeva proces lipogeneze (ekspresija lipogenih enzima koja dovodi do akumulacije lipida) i razvića termogene mašinerije (*Valverde i sar., 2005*). Mnoge skorašnje studije poslužile su identifikaciji kaskade adipogenih faktora koji regulišu adipogenezu i kod belih i kod mrkih adipocita (*Farmer, 2006; Rosen i MacDougald, 2006; Gesta i sar., 2007*). Različiti adipogeni stimuli indukuju terminalnu diferencijaciju preadipocita putem epigenetske aktivacije peroksizomalnim proliferatorom-aktiviranog receptora- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$  – *peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$* , engl.). Koordinacija PPAR- $\gamma$  i C/EBP (*CCAAT/enhancer-binding protein*, engl.) transkripcionih faktora održava adipocitnu gensku ekspresiju (*Cristancho i Lazar, 2011*). PPAR- $\gamma$ -koaktivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$  - *PPAR- $\gamma$ -coactivator-1 $\alpha$* , engl.) kao koaktivator mnogih transkripcionih faktora, i na prvom mestu, koaktivator PPAR $\gamma$  (*Puigserver i sar., 1998*), smatra se ključnim regulatorom adaptivne termogeneze, mada ne i glavnim regulatorom sazrevanja mrkih adipocita, jer je pokazano da mrki preadipociti u kulturi, bez PGC1- $\alpha$  i - $\beta$  gube mogućnost mitohondriogeneze, ali bez uticaja na zadobijanje ostalih karakteristika zrelih adipocita (*Uldry i sar., 2006*).

Pored ovih učesnika, identifikovani su i mnogi drugi aktivatori i inhibitori diferencijacije (*Gesta i sar., 2007; Kajimura i sar., 2008; Tontonoz i Spiegelman, 2008; Tseng i sar., 2008; Matsuo i sar., 2011*), što sve usložnjava put ka potpunom razumevanju molekulskih mehanizama terminalne adipocitne diferencijacije.

U svojoj ultrastrukturnoj studiji, Geloan i sar. (1990) opisuju četiri osnovna stadijuma u razvoju mrkih adipocita:

1. **Intersticijska stem ćelija**, koja ima izgled male, vretenaste ćelije, smeštene između mrkih adipocita i karakteriše se visokim nukleusno-citoplazmatskim odnosom, razbacanim organelama, i odsustvom lipidnih tela;
2. **Protoadipocit**, koji podseća na intersticijske ćelije sem što poseduje retka, sitna lipidna tela;
3. **Preadipocit**, koji je nešto veći, poseduje brojne mitohondrije i sitna lipidna tela i dobro razvijen glatki endoplazmin retikulum koji je u bliskoj poziciji sa lipidnim telima i mitohondrijama (*Slika 6*). Preadipocit poseduje tipičnu strukturu rastućih ćelija, sa dugim citoplazmatskim nastavcima između i oko kapilara.
4. **Zreli mrki adipocit**, po ovoj klasifikaciji predstavlja finalni stadijum diferencijacije i odlikuje se brojnim lipidnim telima i mitohondrijama sa paralelno uređenim kristama.



*Slika 6. Preadipociti (P) u BAT, uz endotelne ćelije (END) kapilara (KAP). Uočavaju se sitna lipidna tela (Lt) i mitohondrije (m) koje su sitnije od mitohondrija zrelih mrkih adipocita (M). Modifikovano iz: Cinti S. i sar., 2001. Proc. Nutr. Soc. 60(3):319-28.*

### 1.2.2. Poreklo mrkih adipocita

Smatra se da su adipozna tkiva, zajedno sa mišićnim, hrskavičavim i koštanim tkivom, mezodermalnog porekla, međutim detaljan opis linije mezenhimskih stem ćelija (MSC – *mesenchymal stem cells*, engl.) koja će dati bele, odnosno mrke adipocite, još uvek nije dat. Pretpostavka je da mezenhim daje populaciju zajedničkih progenitora koji se razvijaju u bele ili mrke adipocite, zavisno od tkivno-specifičnih efektor. Međutim, evolutivne i

razvojne karakteristike ukazuju da su u pitanju različita tkiva koja nemaju zajedničko poreklo. BAT je nastalo značajno kasnije tokom evolucije, paralelno sa evolucijom NST i endotemske regulacije na prelazu od ptica ka sisarima (*Gesta i sar., 2007*). Tokom fetalnog razvića međutim, BAT nastaje znatno ranije od WAT, dostižući maksimum rasta u periodu rođenja, dok razvoj WAT počinje sredinom gestacije (kod ljudi) ili ubrzo po rođenju (glodari) i postepeno se uvećava tokom života. *In vivo* ponekad mrki adipociti postaju unilokusni, i po nekim autorima zadobijaju fenotip belih adipocita, i obrnuto, pa neki naučnici smatraju da postoji mogućnost transdiferencijacije ovih ćelija (*Cinti, 2009*) i interkonverzije BAT i WAT (*Loncar, 1991*). Međutim, sve veći broj naučnika ukazuje da je poreklo mrkih adipocita od sasvim drugačijih progenitora u poređenju sa belim adipocitima. Timmons i saradnici (*2007*) su pokazali da mrki adipociti imaju svojstva miogenih ćelija, ukazujući na mogućnost zajedničkog porekla sa mišićnim ćelijama koje takođe sagorevaju lipide u svrhu produkcije energije, dok Cinti sa saradnicima (*Tran i sar., 2012*) dokazuje postojanje zajedničkog endotelsko-adipocitnog progenitora u BAT.

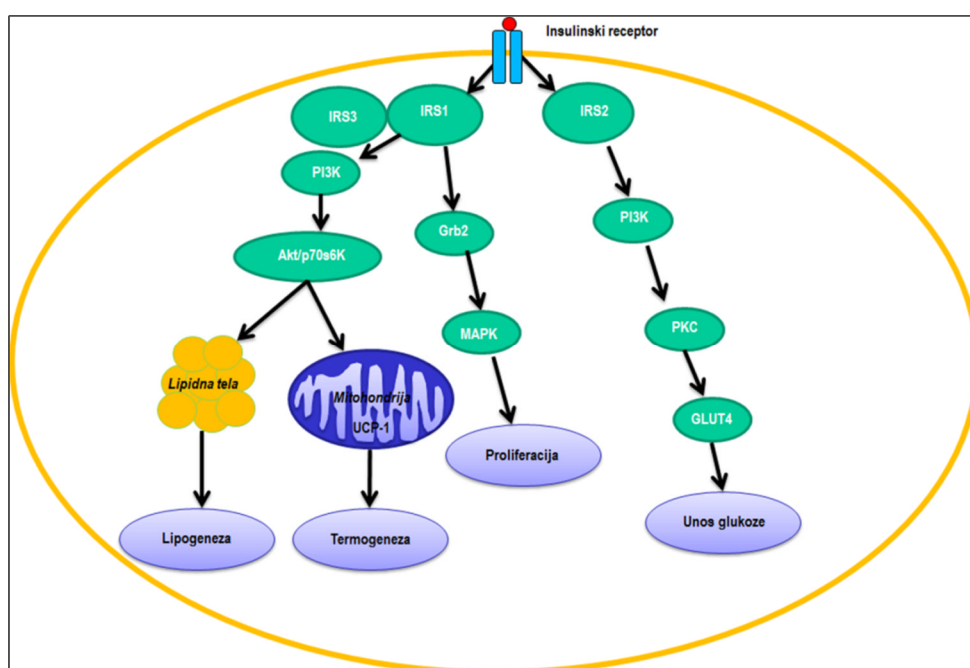
### 1.3. EFEKTI INSULINA NA MRKO MASNO TKIVO

Insulin ima centralno mesto u regulaciji potrošnje unete hrane, i to upravo preko dijetom-indukovane termogeneze, barem kod glodara (*Rothwell i Stock, 1983*). Naime, pokazana je veza insulina i termogeneze BAT u održanju telesne mase (*Woods i sar., 1974; Woods i sar., 1979; Baskin i sar., 1987*), kao i da insulin stimuliše termogenezu aktivacijom simpatikusa (*Landsberg, 1986; Rothwell i Stock, 1988; Davidovic i sar., 1997; Martinez-deMena i Obregon, 2005*). Takođe, insulin reguliše i broj  $\beta_3$ -AR u BAT kao odgovor na status ishranjenosti (*Hadri i sar., 1997*). Pored toga, sve više podataka ide u prilog hipotezi da insulin deluje kao regulator unosa hrane na raznim nivoima neuroendokrine ose, uključujući tu i opioidne peptide u hipotalamusu i hipofizi (*Unger i Lange, 1997*). Insulin utiče i na gensku ekspresiju leptina (*Ceddia i sar., 1998*), kao i neuropeptida Y (*Wilding i sar., 1993*), koji su takođe bitni u regulaciji unosa hrane.

#### 1.3.1. Direktni efekti insulina na mrke adipocite

Pored indirektnih efekata insulina na BAT, ovaj hormon ima i važno direktno dejstvo na mrke adipocite. Opšti model insulinskog delovanja ukazuje da insulin inicira svoje biološke efekte u ciljnim ćelijama putem vezivanja i aktivacije endogenog tirozin (Tyr)-kinaznog insulinskog receptora (IR). IR se tom prilikom fosforiliše (IR-P) i prenosi

signale putem fosforilacije Tyr-rezidua brojnih ćelijskih supstrata uključujući insulin-receptorne supstrate (IRS) -1, -2, -3 i -4 (White, 2003). Nizvodno od IRS aktiviraju se brojni signalni putevi, uključujući: regulatorne subjedinice fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI3K), Grb-2, SHP2 i druge, koji dalje pokreću kaskadu signala koje sadrže dva osnovna elementa – mitogen-aktiviranu protein kinazu (MAPK) i PI3K/Akt put (Virkamaki i sar., 1999). Insulinska stimulacija mrkih adipocita aktivira sve klasične metaboličke puteve kao što su: unos glukoze, proteinska sinteza, lipogeneza i sinteza glikogena (Klein i sar., 2002), ali i neke procese specifične za mrke adipocite, kao što je stimulacija UCP1 ekspresije (Valverde i sar., 2005) (Slika 7).



**Slika 7. Shematski prikaz važnih signalnih puteva insulina u mrkom adipocitu putem insulinskog receptora.** Najveći broj procesa podrazumeva signalne kaskade nizvodno od IRS-1, putem PI3K i MAPK puta – lipogeneza, UCP1 ekspresija, proliferacija; dok se IRS-2 smatra ključnim u unosu glukoze u ćeliju.

### Efekat insulina na adipocitnu diferencijaciju

Insulin se smatra glavnim stimulatorom adipogeneze putem aktivacije puta koji uključuje insulinski receptor (IR), IRS-1 i nizvodne efektore PI3K i Akt (Valverde i sar., 1997) čime se reguliše ekspresija gena uključenih u lipogenezu, i dolazi do nagomilavanja lipida u citoplazmi (Valverde i sar., 1992; Teruel i sar., 1996); inhibira inflamacija i stimuliše diferencijacija preadipocita u adipocite (Menghini i sar., 2005). Pored uloge u adipogenezi,

PI3K/Akt put pod dejstvom insulina i IGF-1 ima ulogu i u preživljavanju mrkih adipocita u kulturi (*Navarro i sar., 1998*).

### *Efekat insulina na termogenezu*

Insulin ima važnu ulogu i u regulaciji ekspresije UCP1 *in vivo* (*Valverde i sar., 2003*). Pokazano je, naime, da je održavanje normalne serumske koncentracije insulina neophodno za održavanje normalnog nivoa UCP1 u BAT.

### *Efekat insulina na transport glukoze*

Transport glukoze je glavni metabolički aspekt regulisan od strane insulina u perifernim tkivima, uključujući i BAT. Glukoza je važno gorivo za BAT *in vivo*, mnogo važnije nego u WAT (*Orava i sar., 2011*). Pri fiziološkoj insulinskoj stimulaciji BAT ima ekstremno visok nivo metabolizma glukoze (čak 10% totalnog obrta glukoze kod pacova), iako se smanjenje glikemije detektuje tek kod tretmana suprafiziološkom dozom insulina (*Davidovic i sar., 1997*), uz indukciju brojnih metaboličkih gena. Glukoza transport se održava prvenstveno putem aktivnosti insulinom-regulisanog glukoznog transportera 4 (GLUT4) (*Ternel i sar., 1995*). Insulin moduliše GLUT4 funkciju i povećava unos glukoze putem sledećih mehanizama: 1) stimulacije translokacije unutarćelijskih GLUT4 na membranu ćelije; 2) modifikacija GLUT4 proteina čime se utiče na unos glukoze; i 3) povećanja biosinteze i/ili smanjenja degradacije GLUT4 (*Watson i Pessin, 2001*). GLUT4 iRNK ekspresija se povećava uporedo sa otpočinjanjem programa adipogene i termogene diferencijacije u BAT (*Ternel i sar., 1996*) ukazujući na važnost razvoja sistema za unos glukoze u pravilnom funkcionisanju zrelih mrkih adipocita.

Adipociti BAT predstavljaju model sistem za izučavanje regulatornih elemenata energetskog metabolizma i insulinskog delovanja. Izučavanje adipocitnih modela značajno je unapredilo poznavanje osnovnih ćelijskih mehanizama uključenih u regulaciju unosa glukoze i energetskog metabolizma, kao i poznavanje mehanizama uključenih u kontrolu ćelijske diferencijacije i proliferacije (*Klein i sar., 2002*). Takođe, mrki adipociti su čest model sistem za proučavanje razvoja insulinske rezistence (IRes) (*Valverde i sar., 2005*).

### **1.3.2. Hiperinsulinemija i insulinska rezistenca u mrkom masnom tkivu**

Akutno povećanje koncentracije insulina deluje stimulatивно, ali perzistentno povećanje njegove koncentracije desenzitivise ciljne ćelije putem brojnih mehanizama, uključujući efekte na nivou IR (*Gavin i sar., 1974*) kao i nizvodno u signalnim kaskadama (*Le Marchand i sar., 1977; Zick, 2003*). Održavanje povišenog nivoa insulina, bez obzira na

poreklo, dovešće do opšte IRes. Kod transgenih miševa kojima su transfekcijom ubačene dodatne kopije insulinskog gena, bazalni nivo serumskog insulina je do četiri puta viši od normalnog, telesna težina je normalna, ali dolazi do opšte IRes koja je praćena poremećajem metabolizma glukoze i sekrecije insulina (javlja se netolerancija na glukozu) (*Marban i sar., 1989*). Drugi primer su pacijenti sa insulinomom, tumorom  $\beta$  ćelija pankreasa, koje karakterišu: 1) povećan nivo insulina u cirkulaciji; 2) IRes; 3) poremećaj lučenja insulina u odgovoru na glukozu (*Nankervis i sar., 1985; Del Prato i sar., 1993*); 4) povećanje količine izoformi IR sa nižim afinitetom za insulin (*Sbraccia i sar., 1996*); 5) smanjenje efekata insulina na nivou receptora i nizvodno od njega; kao i 6) smanjena osetljivost na insulin tokom *clamp* studija (*Bar i sar., 1977; Škerba i sar., 1996*). Hirurško uklanjanje ovog tumora u potpunosti obnavlja metabolizam glukoze i insulinsku senzitivnost nakon normalizacije lučenja insulina u pankreasu (*Škerba i sar., 1993*).

IRes se definiše kao smanjenje normalnog odgovora ciljne ćelije ili organizma na koncentraciju insulina kojoj je izložen i važan je učesnik u patogenezi T2D i ostalih metaboličkih poremećaja kao što su: gojaznost, hipertenzija, ateroskleroza, hiperlipidemija, sindrom policističnih jajnika itd. jednim nazivom objedinjeni kao metabolički ili sindrom insulinske rezistencije. Stanja IRes mogu biti vezana za defekte na IR ili nizvodno u signalnoj kaskadi insulina, kao što su: mutacije na IR koje smanjuju vezivanje insulina, smanjenje broja IR na membrani ciljne ćelije, kao i poremećaji insulinske signalizacije (*Pessin i Saltiel, 2000; Withers i White, 2000*). Veza između periferne IRes i T2D pokazana je u mišićima, jetri i WAT, ali je sve više studija koje ukazuju na značaj insulinskog delovanja i IRes u BAT na razvoj ove bolesti. Studije na transgenim modelima ukazuju na značaj BAT u metaboličkoj regulaciji i održanju energetske ravnoteže. Kao primer, delimična genska ablacija BAT dovodi do gojaznosti, insulinske rezistencije i smanjenja potrošnje kiseonika, čime se ukazuje na ulogu BAT u energetskom metabolizmu (*Lowell i sar., 1993; Klaus i sar., 1998*). Bliska veza između gojaznosti i IRes, kao i njihova progresija do T2D, predstavlja ozbiljan zdravstveni problem današnjice. Identifikacija faktora koji utiču na razvoj IRes, kao i otkrivanje nivoa poremećaja insulinske signalizacije, prvi je korak u ustanovljavanju molekularskih osnova IRes u perifernim tkivima. U skladu sa tim, mrki adipociti mogu doprineti boljem razumevanju ove situacije.

Mišljenje o uzročno-posledičnoj vezi hiperinsulinemije i IRes je podeljeno. Dominantna uloga se uglavnom pripisuje IRes, koja uzrokuje hiperinsulinemiju u pokušaju organizma da kompenzuje smanjeni odgovor tkiva na insulin, čime povećava njegovo

lučenje. Sa druge strane, i sama hiperinsulinemija, bez obzira na poreklo, dovodi do IRes u svim tkivima koja poseduju signalne puteve insulina, uključujući BAT. Međutim, hiperinsulinemija, IRes i poremećaj glukozom-stimulisanog lučenja insulina međusobno su povezani. Sama hiperinsulinemija može da pokrene sva tri procesa istovremeno (*Shanik i sar., 2008*). IRes je udružena sa produženim izlaganjem visokom nivou insulina. Bez obzira da li je prvo došlo do IRes ili do bazalne hiperinsulinemije, sama hiperinsulinemija može da pogorša IRes. Veći broj *in vivo* i *in vitro* studija sa aplikacijom visokih doza insulina (koje odgovaraju koncentraciji insulina kod insulin-rezistentnih stanja) potvrdio je da bazalna hiperinsulinemija može dovesti do IRes (*Kobayashi i Olefsky, 1978; Martin i sar., 1983; Rizza i sar., 1985*).

Pokazano je da akutna i hronična inflamacija dovode do IRes, što je značajan podatak u razumevanju mehanizama nastanka IRes usled nepravilne ishrane, fiziološkog stresa i gojaznosti (*Hotamisligil, 2003; Lyon i sar., 2003*), ali je takođe i značajna veza između gojaznosti i razvoja T2D. Feinstein i sar. (1993) i Hotamisligil i sar. (2003) prvi su pokazali vezu proinflamatornog citokina TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* , engl.) i IRes. Koncept o masnom tkivu kao endokrinom organu koje je u stanju da produkuje različite citokine i ostale bioaktivne supstance brzo je proširen, pa se pokazalo da pored TNF- $\alpha$  može da produkuje i: leptin, rezistin, adiponektin, visfatin, angiotenziogen, interleukin-6 (IL-6), hemoatraktante monocita, serumski amiloid A i mnoge druge (*Zhang i sar., 1994; Shimomura i sar., 1996; Fried i sar., 1998; Stepan i sar., 2001; Fukubara i sar., 2005*). TNF- $\alpha$ , IL-6 i rezistin, zajedno sa drugim pro- i antiinflamatornim citokinima se sve više povezuju sa indukcijom i održanjem subakutnog inflamatornog stanja koje se sreće kod gojaznosti. Smatra se da ovi citokini i hemokini aktiviraju unutarćelijske puteve koji pokreću razvoj IRes i T2D, pri čemu se ne radi o efektu pojedinačnih molekula već o njihovom udruženom delovanju koje se onda opisuje kao inflamacija (*Shoelson i sar., 2006*). Međutim, većina studija o inflamatornoj osnovi IRes je izvedena na WAT. Ostaje nerazjašnjeno, da li, i u kojoj meri, inflamacija, hiperinsulinemija i IRes u BAT učestvuju u razvoju metaboličkog sindroma.



## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

---

S obzirom na sve veću važnost koja se pripisuje BAT u sprečavanju razvoja metaboličkog sindroma i insulinske rezistencije, pri čemu se poseban značaj pridaje upravo efektima insulina na ovo tkivo, cilj ovog istraživanja je ispitati procese koji leže u osnovi insulinom-stimulisanog remodeliranja BAT.

U tom kontekstu, sprovedeće se detaljna mikroskopska, ultrastrukturalna, stereološka i morfometrijska analiza promena na nivou tkiva i ćelija (lipogeneza, mitohondriogeneza, adipogeneza, angiogeneza, infiltracija makrofaga, apoptoza i citotoksični efekti insulina); kao i imunohistohemijska analiza u cilju rasvetljavanja molekularnih mehanizama koji se nalaze u osnovi efekta insulina na ekspresiju proteina uključenih u procese: termogeneze (UCP1), mitohondriogeneze (PGC-1 $\alpha$ ), regulacije prokrvljenosti tkiva (vaskularni endotelski faktor (VEGF), izoforme azot monoksid sintaze (NOS – *nitric oxide synthase*, engl.); kao i analiza markera endotelskih ćelija - von Willebrand faktora (vWF)) i antioksidativne odbrane (izoforme superoksid dismutaze (SOD), katalaza).

Takođe, cilj je ispitati i uticaj insulina na: produkciju reaktivnih vrsta putem ekspresije markera lipidne peroksidacije (4-hidroksinonenal (4-HNE) – proteinskih adukata) i markera nitrozilacije proteina (nitrotirozin); akumulaciju gvožđa (eritrofagocitna aktivnost, sinteza feritina, ekspresija hem oksigenaza - HO-1 i HO-2) što može da ukaže na eventualnu citotoksičnost hiperinsulinemije.

Pratiće se i efekat insulina na ekspresiju pokazatelja inflamatornog statusa tkiva (proinflamatornih citokina (TNF- $\alpha$ , IL-6), nukleusnog faktora – kB (NF-kB) i makrofagnog inflamatornog proteina - 3 $\beta$  (MIP-3 $\beta$ ); detekcija makrofaga u tkivu) kako bi se razjasnilo, da li i u kojoj meri hiperinsulinemija indukuje inflamatorni odgovor i razvoj insulinske rezistencije u BAT.

Detekcija važnih molekula insulinske signalne kaskade (insulin, IR-P, IRS-1) izvešće se u cilju rasvetljavanja unutarćelijskih puteva delovanja insulina.

# 3. MATERIJAL I METODI

## 3.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

U eksperimentu su korišćeni mužjaci laboratorijskog pacova soja Wistar, stari dva meseca, prosečne telesne mase na početku eksperimenta oko 217 g. Životinje su tokom eksperimenta boravile u definisanim laboratorijskim uslovima: na temperaturi od  $22\pm 2$  °C, uz konstantnu vlažnost i dnevno-noćni režim od 12 časova svetlosti i 12 časova mraka, pri čemu su imale slobodan pristup česmenskoj vodi i standardnoj briketiranoj hrani za pacove.

## 3.2. DIZAJN EKSPERIMENTA

Pre tretmana, životinje su podeljene u šest grupa (po pet životinja), od kojih su dve tretirane fiziološkim rastvorom u različitom trajanju (kontrolne grupe), dok su preostale četiri grupe životinja tretirane različitim dozama insulina u različitom trajanju, kako je prikazano u *Tabeli 1*.

*Tabela 1. Eksperimentalne grupe – ukupno 30 mužjaka pacova soja Wistar, starosti oko 2 meseca podeljeno je u šest grupa od po 5 životinja, koje su tretirane fiziološkim rastvorom (kontrolne grupe) ili insulinom u dozi od 0.4 IU/kg telesne mase, odnosno u dozi od 4 IU/kg telesne mase; intraperitonealno (i.p.). Aplikacija je trajala 1 dan (akutan tretman) ili 3 dana (hroničan tretman).*

Grupa	Oznaka grupe	Vrsta tretmana	Trajanje
Akutna kontrolna grupa	Ka	fiziološki rastvor, intraperitonealno (1x dnevno)	1 dan
Hronična kontrolna grupa	Kh	fiziološki rastvor, intraperitonealno (1x dnevno)	3 dana
Grupa tretirana akutno niskom dozom insulina	0.4a	Insulin 0.4 IU/kg, intraperitonealno (1x dnevno)	1 dan
Grupa tretirana hronično niskom dozom insulina	0.4h	Insulin 0.4 IU/kg, intraperitonealno (1x dnevno)	3 dana
Grupa tretirana akutno visokom dozom insulina	4a	Insulin 4 IU/kg, intraperitonealno (1x dnevno)	1 dan
Grupa tretirana hronično visokom dozom insulina	4h	Insulin 4 IU/kg, intraperitonealno (1x dnevno)	3 dana

### 3.3. ŽRTVOVANJE ŽIVOTINJA I IZOLOVANJE TKIVA

Tri časa nakon poslednje injekcije, svim životinjama je izmerena telesna masa (hronično tretiranim životinjama telesna masa merena je i neposredno pre početka tretmana), a potom su žrtvovane dekapitacijom, bez anestezije. Odmah po dekapitaciji, izolovan je interskapularni depo BAT, izmeren i očišćen od okolnog veziva i mišića, a potom podvrgnut različitim metodama preparacije za svetlosnu i elektron-mikroskopsku analizu.

### 3.4. PRIPREMA TKIVA ZA MIKROSKOPSKE ANALIZE

#### 3.4.1. Kalupljenje tkiva u parafinu

Veći deo BAT odmah po izolovanju je prenet u neutralni, puferisani 10%-tni rastvor formaldehida u cilju fiksacije. Nakon 72 časa, tkivo je preko noći isprano u česmenskoj vodi, a potom dehidratirano kroz seriju etanola rastućih koncentracija, prosvetljeno u ksilolu i ukalupljeno u parafin. Parafinski kalupi tkiva su potom sečeni na rotacionom mikrotomu (Reichert, Austrija) na preseke debljine 5  $\mu\text{m}$  i preneti na mikroskopske pločice.

#### 3.4.2. Kalupljenje tkiva u smoli

Tkivni isečci BAT, veličine oko 1  $\text{mm}^3$  podvrgnuti su fiksaciji 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 postfiksacija u 2% rastvoru osmijum-tetraoksida ( $\text{OsO}_4$ ) koji je rastvoren u istom puferu. Potom su uzorci dehidratirani serijom etanola rastućih koncentracija, prosvetljeni u propilen-oksidu i ukalupljeni u epoksidnoj Araldit smoli (Fluka, Nemačka) na temperaturi od 50 °C, u trajanju od 72 časa.

### 3.5. ULTRASTRUKTURNA ANALIZA TKIVA

Za transmisionu elektron-mikroskopsku (TEM) analizu, aralditski kalupi tkiva su istrimovani i isečeni dijamantskim nožem (Diatome, Švajcarska) na tanke preseke debljine 70 nm, na UC6 ultramikrotomu (Leica Microsystems, Nemačka). Preseci su montirani na bakarne ili bakar-paladijumske mrežice, kontrastirani uranil acetatom i olovo citratom u EM Stain aparatu (Leica Microsystems, Nemačka), a potom posmatrani na CM12 transmisionom elektronskom mikroskopu (Philips/FEI, Holandija).

### 3.6. MORFOMETRIJSKA I STEREOLOŠKA ANALIZA TKIVA

#### 3.6.1. Određivanje volumenske gustine krvnih sudova

U svrhu određivanja volumenske gustine ( $V_v$ , zapreminskog udela) krvnih sudova u BAT, korišćeni su polu-tanki preseki tkiva (debljine  $1\ \mu\text{m}$ ) ukalupljenog u smoli, prethodno obojeni 1% rastvorom toluidin plavog u 1% tetraboraksu (natrijum tetraborat). Bojenje je vršeno nakapavanjem jednakih količina toluidin plavog i tetraboraksa na preseke, uz zagrevanje na grejnoj ploči 2-3 minuta, nakon čega su preseki isprani u česmenskoj vodi.  $V_v$  krvnih sudova u BAT određena je Vajblovom metodom (*Weibel, 1962*), na po 10 nasumično odabranih testnih polja od svake životinje iz svih grupa. Analiza je vršena na uveličanju od 1000x, na svetlosnom mikroskopu DMLB (Leica, Nemačka), snimanjem digitalnih mikrografija i njihovom morfometrijskom analizom u programu Image J (National Institute of Health, SAD) brojanjem tačaka projektovane merne mrežice koje padaju na krvne sudove u BAT (80 tačaka po mrežici). Odnosom zbira svih tačaka koje padaju na krvne sudove i ukupnog broja tačaka koje padaju na BAT određena je  $V_v$  krvnih sudova za svaku mikrografiju (**Formula 1**), a potom i srednja vrednost za svaku grupu ponaosob.

$$V_v = \frac{T_s}{T_u}$$

*Formula 1. Volumenska gustina ( $V_v$ ) određene strukture u tkivu/ćeliji jednaka je odnosu broja tačaka Vajblove mrežice koje padaju na datu strukturu ( $T_s$ ) i ukupnog broja tačaka koje padaju na tkivo/ćeliju ( $T_u$ ).*

---

#### 3.6.2. Određivanje volumenske gustine adipocita

$V_v$  adipocita određena je na identičan način kao i  $V_v$  krvnih sudova, brojanjem tačaka merne mrežice koje padaju na adipocite i ukupnog broja tačaka koje padaju na tkivo na mikrografijama polu-tankih preseka BAT. Odnosom ovih vrednosti dobijene su  $V_v$  adipocita za svaku mikrografiju, a potom i srednja vrednost za svaku grupu.

#### 3.6.3. Određivanje volumenske gustine lipidnih tela

$V_v$  lipidnih tela u adipocitima određena je na sličan način kao i  $V_v$  krvnih sudova i adipocita, s tom razlikom što je broj tačaka koje padaju na lipidna tela računat u odnosu na broj tačaka koje padaju na adipocite, kako bi se dobio udeo lipidnih tela po adipocitima, a ne po tkivu. Po dobijanju vrednosti za sve mikrografije, određene su srednje vrednosti  $V_v$  lipidnih tela za svaku grupu.

### 3.6.4. Određivanje brojnosti adipocita

Brojnost adipocita po jedinici zapremine BAT (na  $100^3 \mu\text{m}^3$ ), određena je na istim mikrografijama na kojima i  $V_v$  krvnih sudova, adipocita i lipidnih tela, brojanjem svih adipocita unutar rama dimenzije  $100 \times 100 \mu\text{m}$ , kao i onih koji seku gornju i desnu stranicu rama ("counting frame" pravilo) što predstavlja brojnost po jedinici površine ( $N_{p_{AC}}$ ). Odatle je preračunata brojnost po jedinici zapremine za svaku mikrografiju (**Formula 2**), a zatim i srednja vrednost za svaku eksperimentalnu grupu.

$$Nv_{AC} = \sqrt{\frac{N_{p_{AC}}^3}{Vv_{AC}}}$$

*Formula 2. Brojnost adipocita po jedinici zapremine ( $Nv_{AC}$ ) jednaka je kvadratnom korenu odnosa trećeg stepena njihove brojnosti po jedinici površine ( $N_{p_{AC}}$ ) i njihove volumenske gustine ( $Vv_{AC}$ ).*

---

### 3.6.5. Određivanje prosečne zapremine adipocita

Prosečna zapremina adipocita preračunata je iz odnosa  $V_v$  adipocita i njihove brojnosti po jedinici zapremine za svaku mikrografiju, a potom i za svaku grupu, određivanjem srednje vrednosti.

### 3.6.6. Određivanje volumenske gustine mitohondrija u mrkim adipocitima

$V_v$  mitohondrija mrkih adipocita određena je kao odnos broja tačaka Vajbllove mrežice koje padaju na mitohondrije u odnosu na broj tačaka koje padaju na mrke adipocite, sa elektron-mikrografija uveličanja 3400x (10 mikrografija po životinji).

### 3.6.7. Određivanje površine mitohondrijalnog profila mrkih adipocita

U Image J programu merene su površine mitohondrijalnih profila na po 100 nasumično izabranih mitohondrija sa 10 nasumično izabranih elektron-mikrografija po životinji, i na osnovu toga izvršena je podela mitohondrija na 6 površinskih klasa: do  $0.200 \mu\text{m}^2$ , od  $0.201-0.400 \mu\text{m}^2$ , od  $0.401-0.600 \mu\text{m}^2$ , od  $0.601-0.800 \mu\text{m}^2$ , od  $0.801-1.000 \mu\text{m}^2$  i preko  $1.000 \mu\text{m}^2$ .

### 3.6.8. Određivanje volumenske gustine kristi mitohondrija mrkih adipocita

Po istom principu kao i ostale Vv, korišćenjem Vajblove mrežice u Image J programu, preračunata je Vv kristi na 200 mitohondrija mrkih adipocita po grupi, sa elektron-mikrografija uveličanja 53000x.

#### *Statistička obrada dobijenih rezultata*

Svi rezultati prikazani su u vidu srednjih vrednosti za svaku grupu  $\pm$  standardna greška (SE). Normalnost raspodele testirana je Kolmogorov-Smirnovim testom. Student t-test korišćen je za poređenje srednjih vrednosti, a u slučaju neparametarske distribucije, rezultati su proveravani Mann-Whitney testom. Statistička značajnost prihvatana je za  $p < 0.05$ .

## 3.7. IMUNOHISTOHEMIJSKA DETEKCIJA PROTEINA

U svrhu imunohistohemijske analize na nivou svetlosnog mikroskopa (SM), korišćeni su parafinski preseći debljine 6  $\mu\text{m}$ , kao i aralditski preseći debljine 1  $\mu\text{m}$  ili 2  $\mu\text{m}$ . Bez obzira na vrstu imunohistohemijske metode (detekcija streptavidin-biotinskom ili fluorescentnom tehnikom), svi parafinski preseći su prethodno prošli kroz rutinski proces deparafinizacije i rehidratacije. Uporedno, aralditski preseći su sprovedeni kroz proceduru uklanjanja smole (u 1% rastvoru natrijum etoksida – 1% natrijum hidroksid (NaOH) u 100% etanolu, 30 minuta na 40 °C), a zatim i rehidratacije. Potom, u cilju otkrivanja epitopa (antigenih mesta) svi preseći su inkubirani 5 minuta u 10 mM citratnom puferu, na 600W u mikrotalasnoj pećnici, i isprani 2 puta u PBS (*phosphate-buffered saline*; engl.). Preseći su dalje procesuirani u skladu sa primenjenim imunohistohemijskom metodom.

### 3.7.1. Streptavidin-biotin metoda imunohistohemijske detekcije

Nakon otkrivanja epitopa i ispiranja u PBS, izvršeno je blokiranje endogene peroksidaze u 3% rastvoru vodonik peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) u metanolu, u trajanju od 10 minuta. Po ispiranju, preseći su inkubirani sa primarnim antitelom, odgovarajućeg razblaženja (**Tabela 2**), preko noći na 4 °C. Nakon detaljnog ispiranja u PBS, izvršena je inkubacija sa univerzalnom smešom sekundarnih antitela (zapreminsko razblaženje 1:1, anti-zečji, anti-mišji i anti-kozji imunoglobulini – LSAB Univerzalni kit, Dako Scientific, Danska), 25 minuta na sobnoj temperaturi. Potom su preseći inkubirani sa konjugatom streptavidina i

peroksidaze rena, takođe 25 minuta na sobnoj temperaturi. Detekcija mesta vezivanja u tkivu izvršena je inkubacijom preseka u 0.05% diaminobenzidinu (DAB, Sigma-Aldrich Chemie, Nemačka) rastvorenom u PBS, u prisustvu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (40 µl na 100 ml rastvora) do pojave bojene reakcije (maksimalno 10 minuta). Reakcija je prekinuta detaljnim ispiranjem u česmenskoj vodi, a kontrastiranje je izvršeno Majerovim hematoksilinom. Nakon dehidratacije, pločice su montirane u DPX medijumu i analizirane pod svetlosnim mikroskopom Leica DMLB.

### 3.7.2. Fluorescentna metoda imunohistohemijske detekcije i kolokalizacije proteina

Po demaskiranju epitopa i ispiranju u PBS, izvršeno je blokiranje nespecifičnog vezivanja antitela inkubiranjem preseka u 1% rastvoru goveđeg serumskog albumina (BSA – *bovine serum albumin*, engl.) napravljenom u 0.1% rastvoru Triton X deterdženta u PBS, 30 minuta. Bez ispiranja, sledi inkubacija sa smešom primarnih antitela na insulin (mišje monoklonsko antitelo, zapreminskog razblaženja 1:2000, Abcam, UK) i na IR-P (zečje poliklonsko antitelo, zapreminskog razblaženja 1:2000, Abcam, UK), preko noći na 4 °C. Sledi ispiranje u PBS i inkubacija sa fluorescentno-obeležanim sekundarnim antitelima (anti-mišje fluorescinom (FITC) obeleženo antitelo, zapreminskog razblaženja 1:200, Abcam, UK; anti-zečje rodaminom obeleženo antitelo, zapreminskog razblaženja 1:200, Abcam, UK), 30 minuta, na sobnoj temperaturi u mraku. Po ispiranju, preseci su montirani u Mowiol (Polysciences, Nemačka) i analizirani na konfokalnom mikroskopu LSM 510 (Carl Zeiss, Nemačka).

### 3.7.3. Imunohistohemijska metoda detekcije proteina na nivou elektronske mikroskopije (imunogold metoda)

Za imunogold detekciju proteinske ekspresije na nivou tkiva, korišćeni su tanki preseci (70 nm) tkiva ukalupljenog u smoli, koji su sečeni na niklovane mrežice prevučene olovkom za poboljšanje adhezije preseka (Coat-Quick “G”, Agar Scientific Ltd, UK). Nakon otkrivanja epitopa u citratnom puferu (3 minuta na 600W) i ispiranja u 1% TBS-Tween (*Tris-buffered saline – Tween*, engl.), blokirano je nespecifično vezivanje antitela inkubacijom mrežica u 5% rastvoru BSA u TBS-Tween, 1h na sobnoj temperaturi. Bez ispiranja, mrežice su nanošene na kap primarnog antitela odgovarajućeg razblaženja i inkubirane u odgovarajućem trajanju (*Tabela 2*). Po završetku inkubacije, izvršeno je

ispiranje u TBS-Tween (10 puta po 1 minut) i mrežice su prebačene na kap sekundarnog, antitela obeleženog česticama zlata (anti-mišje ili anti-zečje, u zavisnosti od porekla primarnog antitela, zapreminskog razblaženja 1:20, Abcam, SAD) i inkubirane 1h na sobnoj temperaturi. Finalno, mrežice su isprane u TBS-Tween (10 puta) i destilovanoj vodi (5 puta), osušene i posmatrane na CM12 transmissionom elektronskom mikroskopu (Philips/FEI, Holandija).

**Tabela 2. Podaci o primarnim antitelima korišćenim u metodi streptavidin-biotin imunohistohemijske detekcije proteina na nivou tkiva: antigen, poreklo, klonalnost (mk – monoklonsko; pk – poliklonsko), proizvođač, kataloški broj, korišćeno razblaženje (v – zapreminsko razblaženje).**

Antigen	Poreklo	Klonalnost	Proizvođač	Kataloški broj	Razblaženje
Insulin	Mišje	mk	Abcam, UK	ab6995	1/1000, v
IR-P	Zečje	pk	Abcam, UK	ab60946	1/1000, v
IRS-1	Zečje	pk	Abcam, UK	ab5603	1/750, v
UCP1	Zečje	pk	Abcam, UK	ab10983	1/500, v
PGC1- $\alpha$	Zečje	pk	Abcam, UK	ab54481	1/300, v
eNOS	Zečje	pk	Abcam, UK	ab66127	1/100, v
iNOS	Zečje	pk	Santa Cruz, SAD	sc-8310	1/200, v
HO-1	Zečje	pk	Santa Cruz, SAD	sc-10789	1/200, v
HO-2	Zečje	pk	Abcam, UK	ab19241	1/1000, v
CuZnSOD (SOD-1)	Zečje	pk	Abcam, UK	ab13498	1 $\mu$ g/ml
MnSOD (SOD-2)	Zečje	pk	Abcam, UK	ab13533	1 $\mu$ g/ml
Nitrotirozin	Mišje	mk	Millipore, SAD	MAB 5404	1/100, v
Katalaza	Zečje	pk	Abcam, UK	ab1877	1/200, v
4-HNE	Mišje	mk	Abcam, UK	ab48506	10 $\mu$ g/ml
TNF- $\alpha$	Zečje	pk	Abcam, UK	ab6671	1/200, v
IL-6	Mišje	mk	Abcam, UK	ab66231	2,5 $\mu$ g/ml
MIP-3 $\beta$ (CCL-19)	Kozje	pk	Santa Cruz, SAD	sc-9777	1/200, v
CD11b/c	Mišje	mk	Invitrogen, SAD	MR6200	1/100, v
Ki-67	Mišje	mk	Dako, Danska	M7248	1/25, v
VEGF	Mišje	mk	Abcam, UK	ab68334	10 $\mu$ g/ml
vWF	Zečje	pk	Santa Cruz, SAD	sc-14014	1/200, v



### 3.8. DETEKCIJA APOPTOZE U TKIVU

Preseci BAT debljine 5  $\mu\text{m}$  korišćeni su za histohemijsku detekciju apoptoze TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling*, engl.) metodom fluorescentnog obeležavanja nukleusa sa specifičnim oligonukleotidnim sekvencama nastalim usled prekida na lancu DNK, karakterističnih za apoptozu. Obeležavanje je izvršeno uz pomoć *TMR Red In Situ Cell Death Detection* kita (Roche-Applied Science, Nemačka), po preporuci proizvođača: nakon deparafinizacije i rehidratacije, preseci su tretirani proteazom, a potom inkubirani sa TUNEL reakcionom smešom (rastvor TdT enzima + rastvor smeše obeleženih nukleotida), 60 minuta na 37 °C, nakon čega su isprani i analizirani na fluorescentnom mikroskopu Leica DMLB.

### 3.9. MIKROANALIZA ELEMENTA U TKIVU

Preseci tkiva ukalupljenog u smoli (od po 3 životinje iz kontrolnih i grupa tretiranih visokim dozama insulina) debljine 2  $\mu\text{m}$ , montirani su na držače za skenirajući elektronski mikroskop (SEM), prevučeni slojem ugljenika i analizirani na EDAX Genesis X-ray mikroanalitičkom sistemu (Ametek, SAD) u kombinaciji sa SEM Philips XL 20 (Philips/FEI, Holandija). Elektron-disperzivna analiza X-zracima (EDX) izvršena je pri uveličanju 1000x i pri naponu snopa od 15.0 kV, pri čemu je dobijen procentualni težinski udeo svih elemenata prisutnih u tkivu, minimalnog udela 0.1%. Dobijeni rezultati su statistički obrađeni, a statistička značajnost je prihvaćena za  $p < 0.05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. EFEKAT INSULINA NA TELESNU MASU I MASU MRKOG MASNOG TKIVA

Statistička obrada podataka je pokazala da se telesna masa pacova nakon hroničnog tretmana insulinom ne menja statistički značajno, bez obzira na primenjenu dozu. Statistički značajan porast relativne mase BAT se beleži nakon hroničnog tretmana kako niskom, tako i visokom dozom insulina (*Tabela 3*).

*Tabela 3. Telesna masa, prirast telesne mase i relativna masa BAT kontrolnih i insulinom tretiranih životinja (srednja vrednost ± SE). Telesna masa pacova tretiranih insulinom se ne menja bez obzira na dozu, ali se masa BAT uvećava nakon hroničnog tretmana insulinom (obe doze). (\*) - statistička značajnost u odnosu na referentnu kontrolu: \* $p < 0.05$ .*

		Telesna masa (g)		Prirast telesne mase (%)	Relativna masa BAT (mg/100g)
		Pre tretmana	Po tretmanu		
Akutan tretman	Kontrola	/	211.0 ± 6.3	/	79.8 ± 5.5
	INS 0.4 IU	/	203.0 ± 2.6	/	81.3 ± 4.1
	INS 4 IU	/	209.6 ± 3.2	/	69.0 ± 11.1
Hroničan tretman	Kontrola	204.8 ± 3.5	217.5 ± 4.5	6.19 ± 1.37	64.2 ± 6.2
	INS 0.4 IU	205.6 ± 5.1	221.9 ± 5.6	9.30 ± 2.85	90.3 ± 8.4 *↑
	INS 4 IU	228.8 ± 4.0	245.0 ± 4.2	7.12 ± 1.09	99.0 ± 12.4 *↑

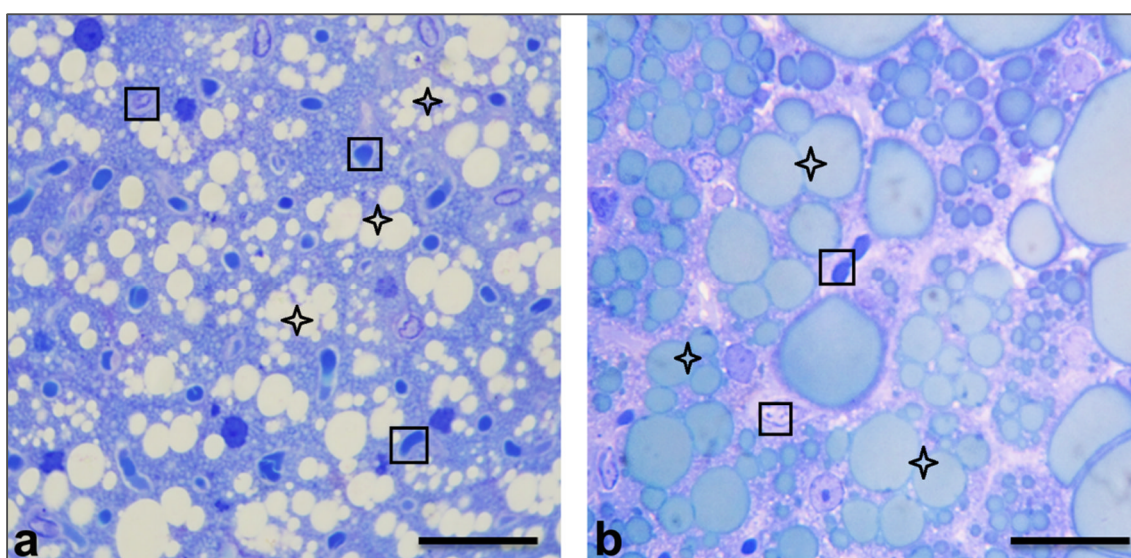
### 4.2. UPOREDNA MORFOMETRIJSKA I STEREOLOŠKA ANALIZA MRKOG MASNOG TKIVA

#### 4.2.1. Promene volumenskih gustina mrkih adipocita i krvnih sudova u tkivu

Akutni tretman insulinom, bez obzira na dozu, ne dovodi do statistički značajnih promena u odnosu Vv mrkih adipocita i Vv krvnih sudova (prvenstveno kapilara) (*Tabela 4*), dok hroničan tretman niskom i u većoj meri visokom dozom insulina, dovodi do povećanja Vv mrkih adipocita, kao i do smanjenja Vv krvnih sudova u tkivu, što se uočava i na nivou svetlosne mikroskopije (*Slika 8*).

**Tabela 4. Volumenska gustina mrkih adipocita ( $Vv_{AC}$ ), krvnih sudova ( $Vv_{KS}$ ) i intersticijuma sa ostalim ćelijama ( $Vv_{IS}$ ) - (srednja vrednost  $\pm$  SE). Kod oba hronična tretmana insulinom se uočava porast  $Vv_{AC}$  i smanjenje  $Vv_{KS}$ , u poređenju sa referentnim kontrolama. (\*) - statistička značajnost u odnosu na referentnu kontrolu: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .**

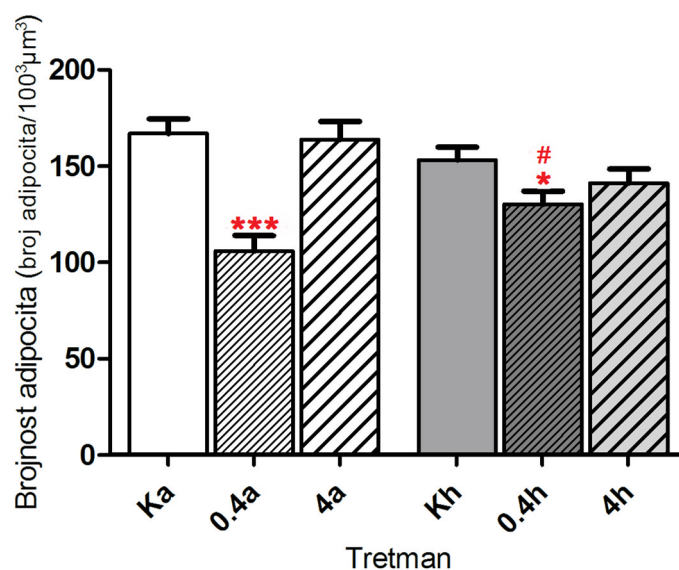
	Akutan tretman			Hroničan tretman			
	Kontrola	INS 0.4IU	INS 4IU	Kontrola	INS 0.4IU	INS 4IU	
$Vv_{AC} \%$	$\bar{X}$	87.15	88.71	88.68	86.13	88.75 <sup>*↑</sup>	90.44 <sup>***↑</sup>
	$\pm$ SE	0.67	0.89	0.89	0.98	0.82	0.71
$Vv_{KS} \%$	$\bar{X}$	10.19	9.52	9.33	11.16	7.99 <sup>*↓</sup>	7.92 <sup>**↓</sup>
	$\pm$ SE	0.81	1.54	0.82	0.98	0.70	0.24
$Vv_{IS} \%$	$\bar{X}$	2.66	1.77	1.99	2.71	3.26	1.64



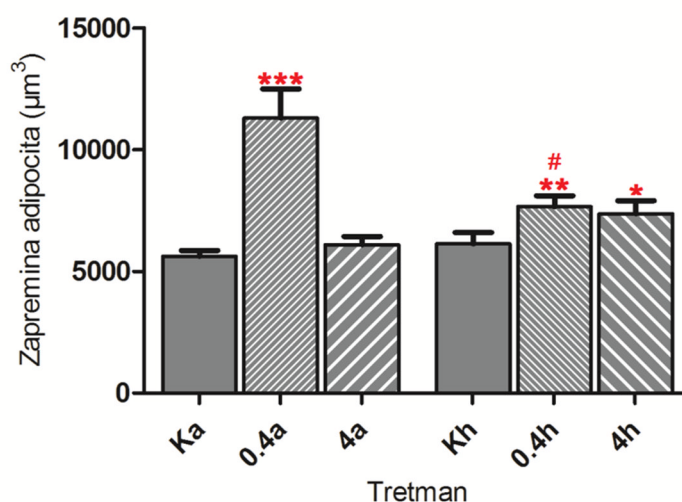
**Slika 8. BAT (a) akutno tretirane kontrolne i (b) grupe tretirane hronično visokom dozom insulina. Uočava se smanjenje zastupljenosti krvnih sudova (kvadrat), kao i povećanje zastupljenosti mrkih adipocita (zvezda) kod hronične hiperinsulinemije. SM, bojenje toluidin – plavim. Orig. uveličanje – 1000x. Bar – 20  $\mu$ m.**

#### 4.2.2. Promena brojnosti adipocita

Rezultati naše studije (**Grafik 1**) pokazuju da tretman niskom dozom insulina akutno dovodi do statistički značajnog smanjenja brojnosti adipocita po jedinici zapremine BAT (**Slika 9**), dok se nakon hroničnog tretmana brojnost vraća ka kontrolnom nivou, iako je i dalje značajno niža od kontrole ( $p < 0.05$ ). Tretman visokom dozom insulina ne dovodi do statistički značajnih promena u brojnosti adipocita, iako kod hroničnog tretmana postoji trend smanjenja vrednosti.



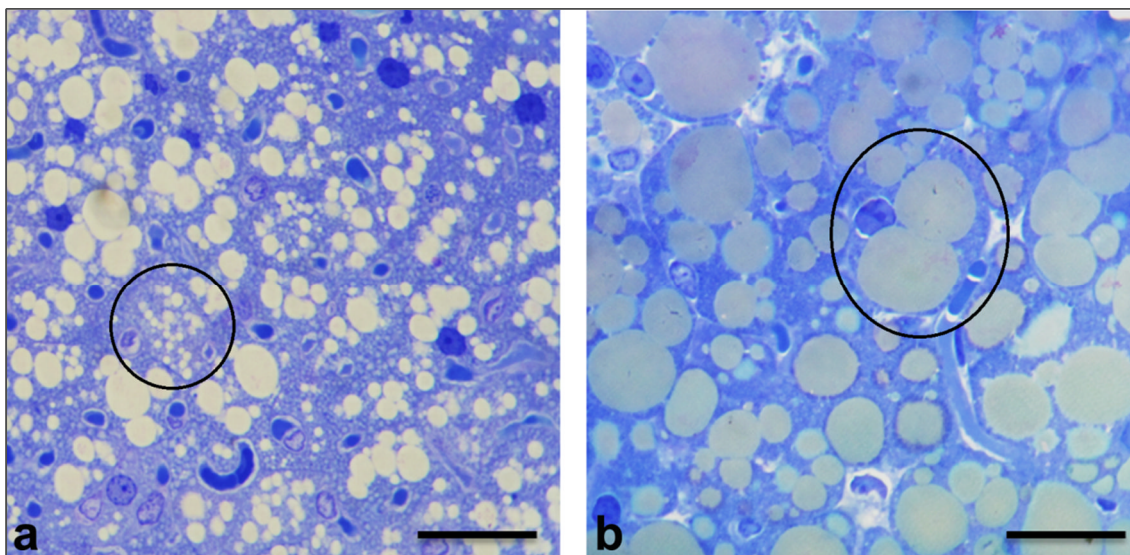
**Grafik 1. Brojnost adipocita po jedinici zapremine BAT (na 100<sup>3</sup>μm<sup>3</sup>; srednja vrednost ± SE).** Ka – akutna kontrola, 0.4a – akutan tretman niskom dozom insulina, 4a – akutan tretman visokom dozom insulina, Kh – hronična kontrola, 0.4h – hroničan tretman niskom dozom insulina, 4h – hroničan tretman visokom dozom insulina. (\*) - statistička značajnost u odnosu na referentnu kontrolu: \*p<0.05, \*\*\*p<0.001; (#) - statistička značajnost u odnosu na akutan tretman istom dozom: #p<0.05.



**Grafik 2. Prosečna zapremina mrkih adipocita (μm<sup>3</sup>; srednja vrednost ± SE).** Ka – akutna kontrola, 0.4a – grupa akutno tretirana niskom dozom insulina, 4a – grupa akutno tretirana visokom dozom insulina, Kh – hronična kontrola, 0.4h – grupa hronično tretirana niskom dozom insulina, 4h – grupa hronično tretirana visokom dozom insulina. (\*) - statistička značajnost u odnosu na referentnu kontrolu: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; (#) - statistička značajnost u odnosu na akutan tretman istom dozom: #p<0.05.

#### 4.2.3. Promena zapremine mrkih adipocita

U skladu sa smanjenjem brojnosti adipocita beleži se porast prosečne zapremine adipocita, tj. njihova hipertrofija, u BAT grupe tretirane akutno niskom dozom insulina, ali i kod obe hronično tretirane grupe (*Grafik 2, Slika 9*).



*Slika 9. Hipertrofija mrkih adipocita kod tretmana insulinom - (a) kontrolna i (b) grupa tretirana akutno niskom dozom insulina. Uočava se smanjenje brojnosti mrkih adipocita usled njihove hipertrofije kod akutnog tretmana insulinom, u poređenju sa kontrolom. SM, bojenje toluidin plavim. Orig. uveličanje – 1000x, bar – 20  $\mu$ m.*

#### 4.2.4. Promene volumenskih gustina lipidnih tela i mitohondrija u mrkim adipocitima

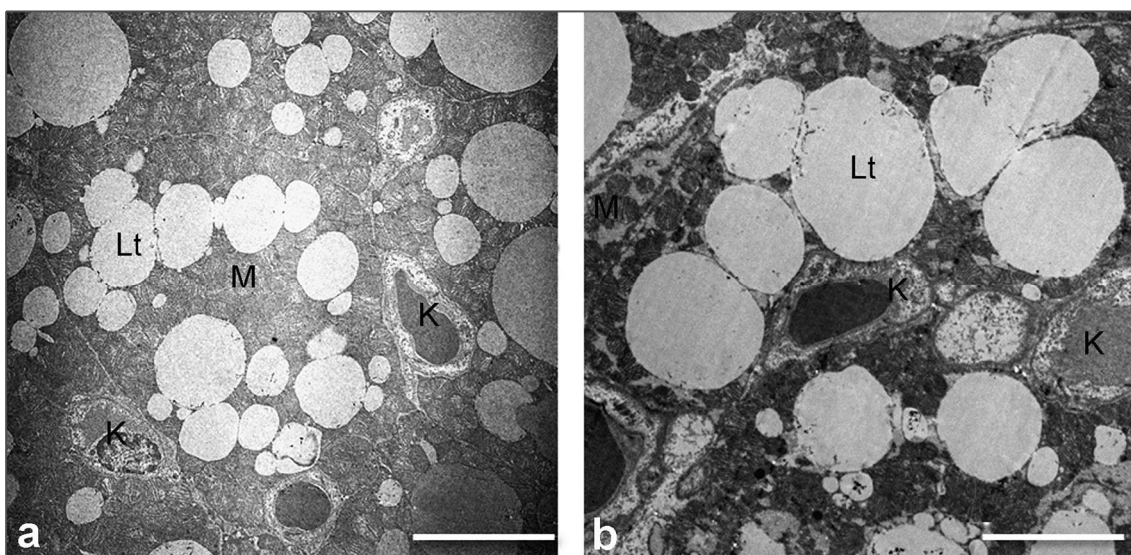
U skladu sa hipertrofijom adipocita, Vv lipidnih tela u adipocitima BAT (*Tabela 5*) se uvećava kod akutnog tretmana niskom dozom insulina, dok kod hronično tretiranih životinja raste progresivno sa primenjenom dozom. Takođe, ukoliko izvršimo poređenje između grupa tretiranih istom dozom insulina u različitom trajanju, uočićemo da se Vv lipidnih tela uvećava kod niske doze već nakon akutnog tretmana i održava se na istom nivou i nakon hroničnog tretiranja; dok kod visoke doze ovog hormona beležimo porast Vv lipidnih tela tek nakon hroničnog tretmana (*Slika 10*).

Što se Vv mitohondrija tiče (*Tabela 5*), kod tretmana niskom dozom insulina nema statistički značajne promene kod akutnog tretmana u poređenju sa referentnom kontrolom, ali se kod grupe koja je hronično tretirana istom dozom beleži povećanje Vv mitohondrija u odnosu na akutno tretiranu grupu. Kod tretmana visokom dozom insulina, Vv

mitohondrija raste nakon akutnog tretmana, dok se nakon hroničnog tretmana vraća na kontrolni nivo.

**Tabela 5. Volumenska gustina lipidnih tela ( $Vv_{LT}$ ) i mitohondrija ( $Vv_{MH}$ ) mrkih adipocita - (srednja vrednost  $\pm$  SE).  $Vv_{OS}$  –  $Vv$  ostatka ćelije. (\*) - statistička značajnost u odnosu na referentnu kontrolu: \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; (#) - statistička značajnost u odnosu na akutan tretman istom dozom: # $p < 0.05$ , ### $p < 0.001$ .**

		Akutan tretman			Hroničan tretman		
		Kontrola	INS 0.4IU	INS 4IU	Kontrola	INS 0.4IU	INS 4IU
$Vv_{LT}$ %	$\bar{X}$	53.31	61.84 <sup>*↑</sup>	53.93	47.93	60.51 <sup>***↑</sup>	66.44 <sup>***↑</sup>
	$\pm$ SE	2.72	3.05	1.65	2.96	2.13	2.08
$Vv_{MH}$ %	$\bar{X}$	31.78	28.48	44.78 <sup>***↑</sup>	31.89	37.53 <sup>#↑</sup>	27.26 <sup>###↓</sup>
	$\pm$ SE	2.11	2.65	1.74	1.94	3.06	1.61
$Vv_{OS}$ %	$\bar{X}$	14.91	9.68	1.29	20.18	1.96	6.30



**Slika 10. Mrki adipociti (a) akutne kontrolne grupe i (b) grupe tretirane hronično visokom dozom insulina. Uočava se povećanje profila lipidnih tela (Lt), kao i njihova fuzija, kod grupe tretirane insulinom u poređenju sa lipidnim telima mrkih adipocita kontrolne grupe. (M) – mitohondrija; (K) – kapilar. TEM, orig. uveličanje (a, b) - 3400x. Bar (a, b) - 5  $\mu$ m.**

### 4.3. EFEKAT INSULINA NA REMODELIRANJE KAPILARNE MREŽE U MRKOM MASNOM TKIVU

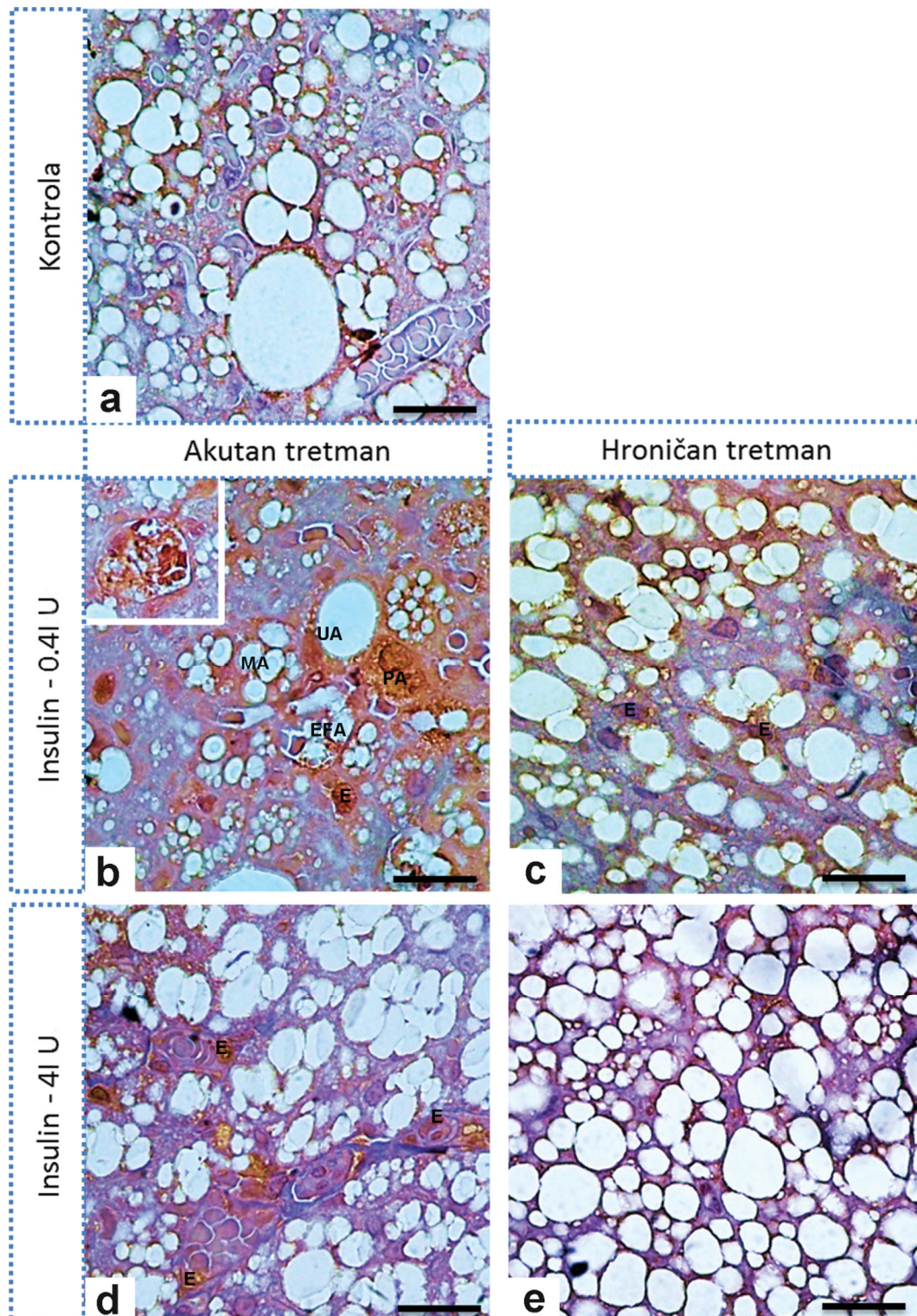
#### 4.3.1. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija VEGF

VEGF protein se eksprimira u mrkim adipocitima svih grupa i to uz manje ili više izražen harlekinski efekat (*Slika 11*). Posebno jaka imunoreaktivnost je prisutna kod grupa tretiranih niskom dozom insulina, u regionima eritrofagocitoze (*Slika 11b*) gde su imunopozitivni kako adipociti koji vrše eritrofagocitozu - eritrofagocitni adipociti (EFA), tako i okolni zreli adipociti i preadipociti. Takođe, u tim regionima se uočava i jaka imunoreaktivnost endotelskih ćelija. Kod grupa koje su tretirane visokom dozom insulina (*Slika 11d, e*) imunoreaktivnost mrkih adipocita je nešto blaža, ali je zato povećan udeo imunopozitivnih endotelskih ćelija.

#### 4.3.2. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija eNOS i iNOS

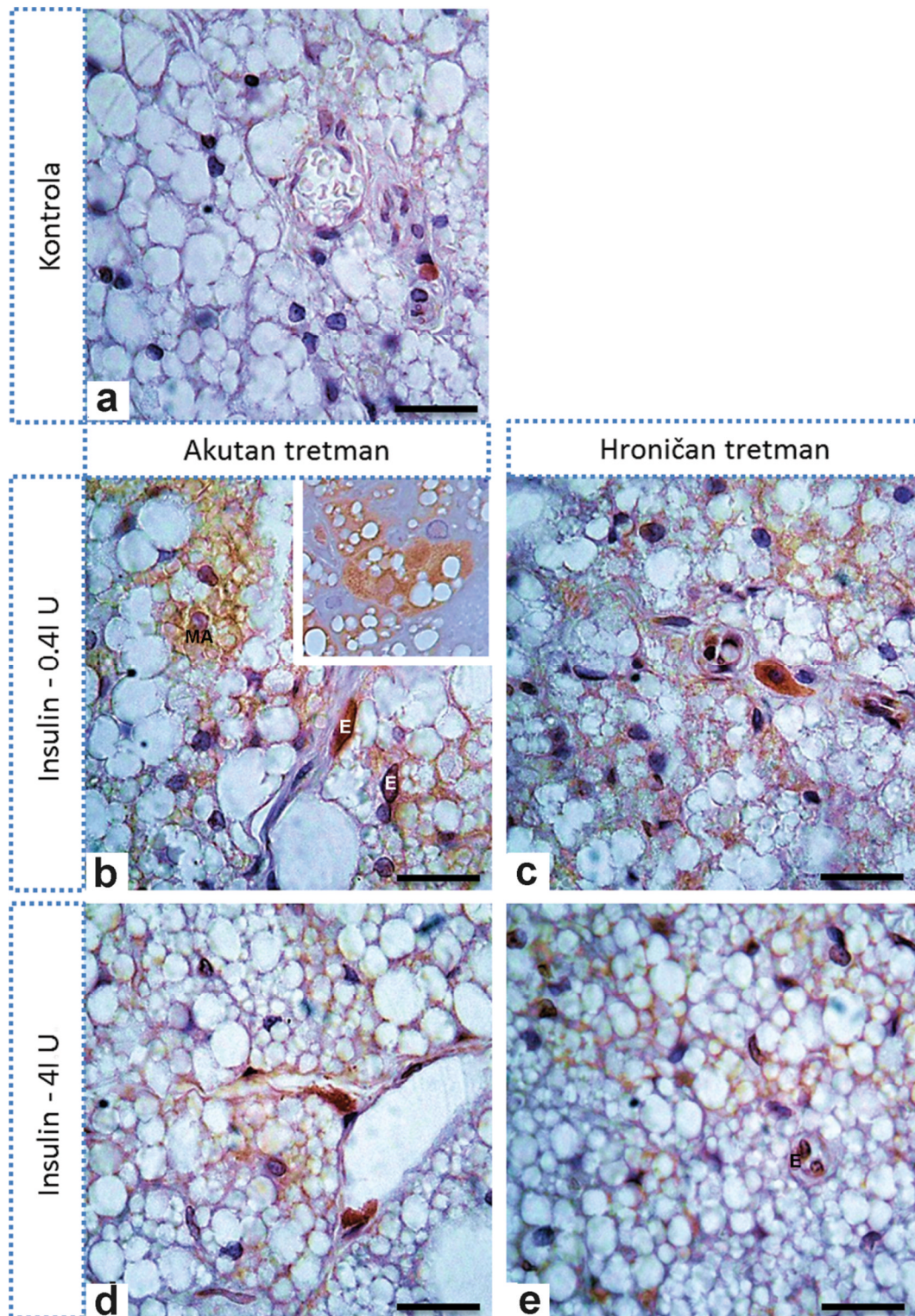
Imunopozitivnost na endotelsku (eNOS) (*Slika 12*) i inducibilnu (iNOS) (*Slika 13*) azot monoksid sintazu u BAT se razlikuje među grupama. Kod kontrolnih grupa imunopozitivnost na eNOS gotovo izostaje (*Slika 12a*), dok je ekspresija iNOS jaka i kod mrkih adipocita i kod endotelskih ćelija (*Slika 13a*). Veća imunoreaktivnost eNOS se može uočiti već kod akutnog tretmana niskom dozom insulina, gde postoji izražen harlekinski efekat među mrkim adipocitima, ali i jaka reakcija u endotelskim ćelijama (*Slika 12b*). Sličan nivo i distribucija imunoekspresije se detektuje i kod ostalih tretmana insulinom (*Slika 12c-e*). Što se tiče iNOS ne uočava se značajnija promena imunopozitivnosti kod hiperinsulinemičnih grupa u poređenju sa kontrolom (*Slika 13b-e*).

Takođe, uočljivo je da se obe izoforme NOS eksprimiraju i u nukleusima sporadičnih mrkih adipocita i endotelskih ćelija.

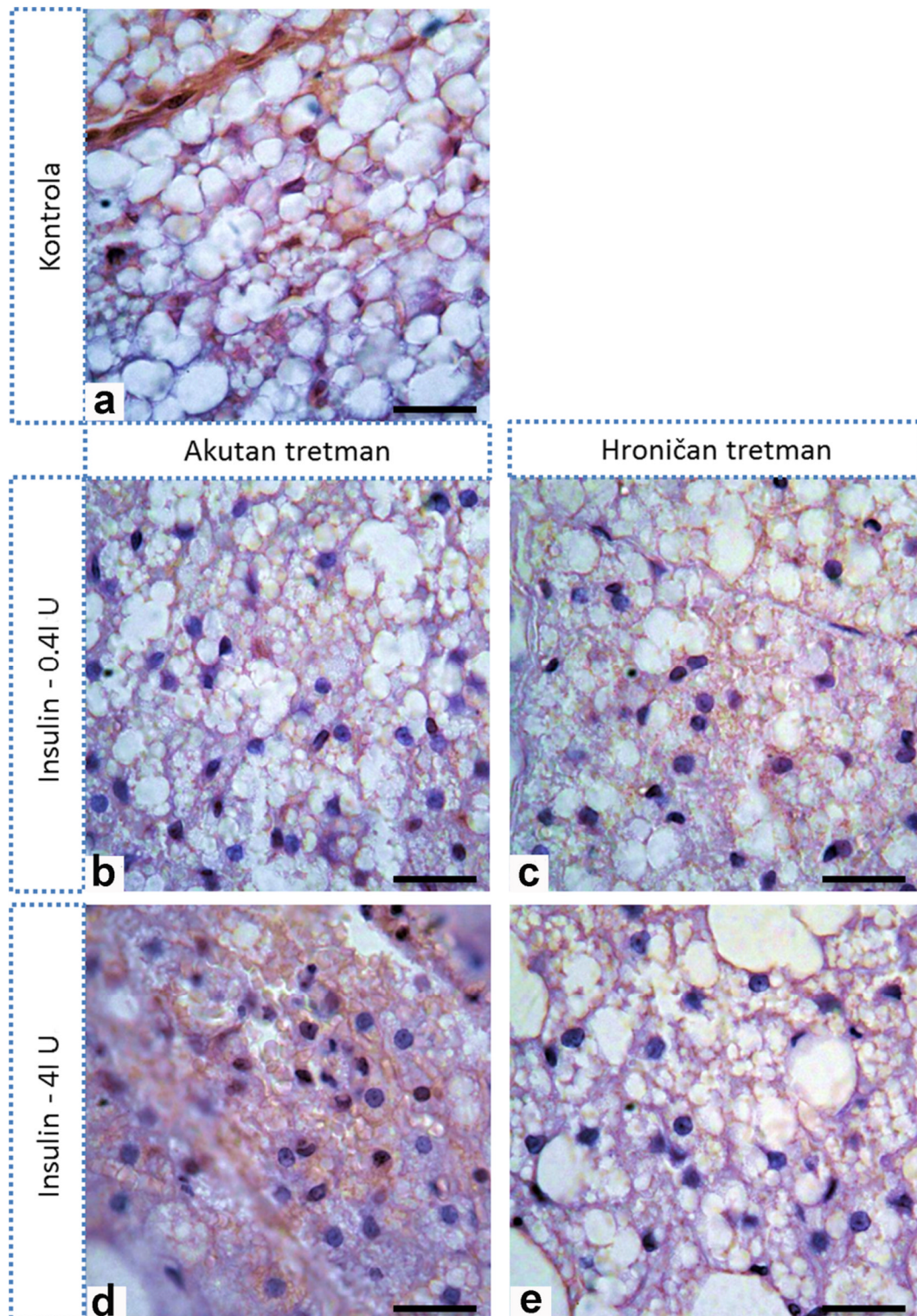


**Slika 11. Imunohistohemijaska detekcija VEGF u BAT** (a) kontrolne grupe i (b - e) grupa tretiranih insulinom. Najjača reakcija je prisutna kod tretmana niskom dozom insulina (b, c), posebno u regionima eritrofagocitoze, gde se jaka imunoekspresija detektuje u EFA, preadipocitima (PA), zrelim, multilokusnim (MA) i unilokusnim adipocitima (UA). Kod svih grupa se uočava reaktivnost endotelskih ćelija (E). Orig. uveličanje - 1000x. Bar - 20  $\mu$ m.





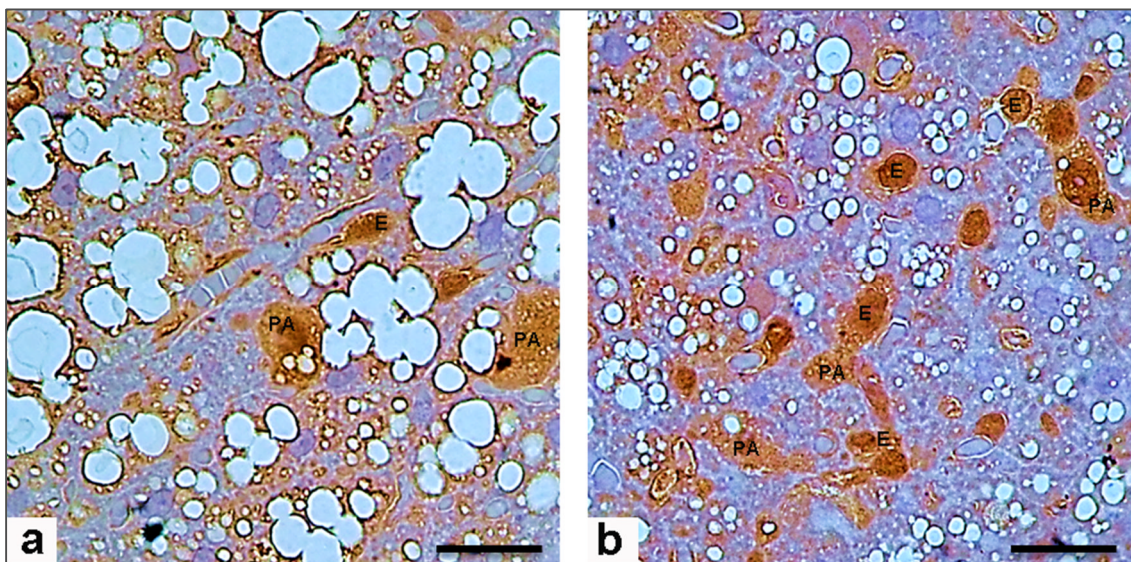
**Slika 12. Imunohistohemijaska detekcija eNOS u BAT (a) kontrolne grupe i (b - e) grupa tretiranih insulinom. Tretman insulinom pojačava tkivnu imunoekspresiju eNOS, naročito u endotelskim ćelijama (E), ali i u sporadičnim mrkim adipocitima (MA). Orig. uveličanje - 1000x. Bar - 20  $\mu$ m.**



**Slika 13. Imunohistohemijska detekcija iNOS u BAT** (a) kontrolne grupe i (b - e) grupa tretiranih insulinom. Kod svih eksperimentalnih grupa se beleži relativno homogena tkivna imunoekspresija iNOS, kako u mrkim adipocitima, tako i u endotelskim ćelijama. Orig. uveličanje - 1000x. Bar - 20  $\mu$ m.

### 4.3.3. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija vWF

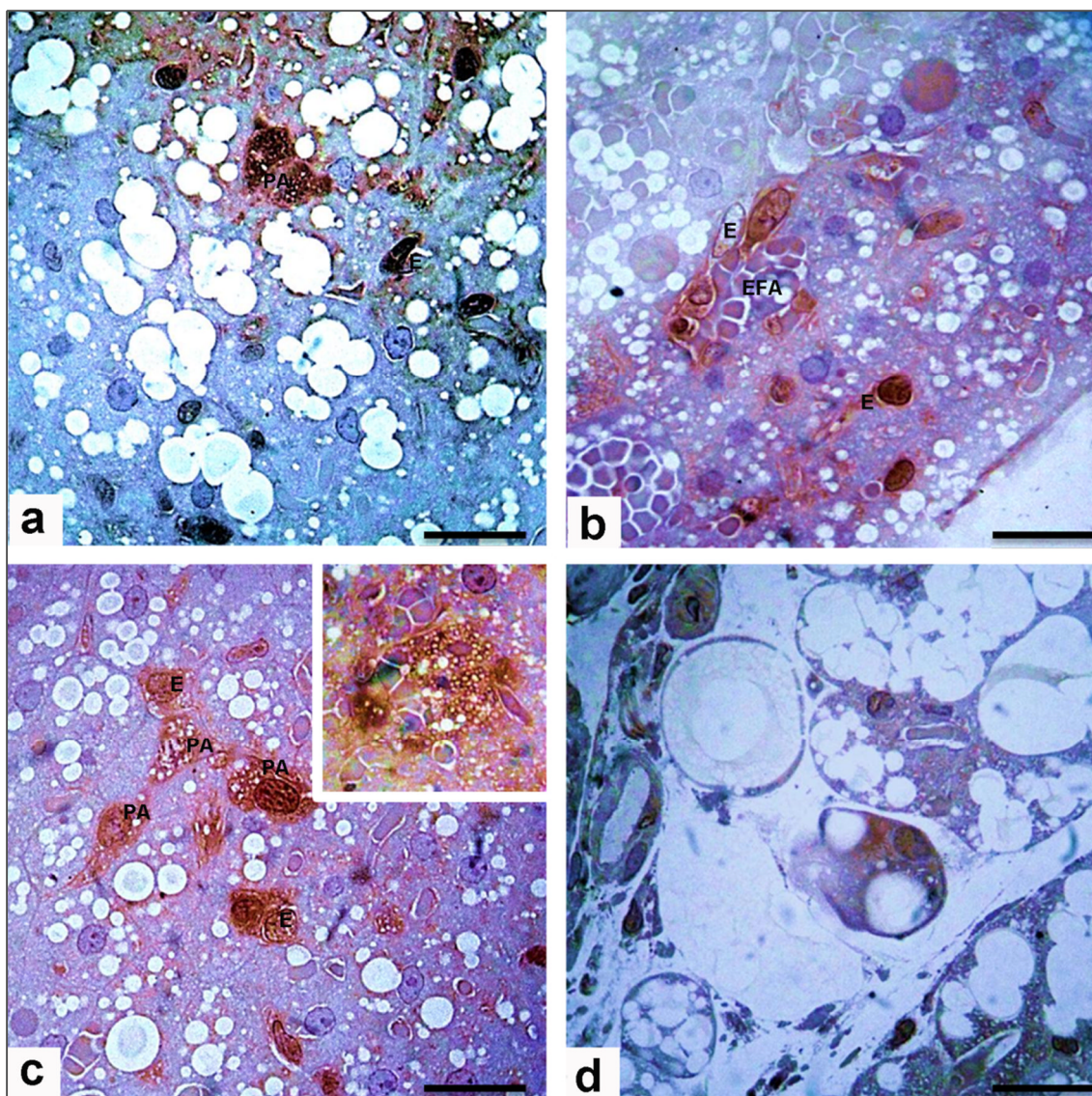
Imunohistohemijska analiza je pokazala da se vWF ne eksplicira samo u endotelskim ćelijama kako je očekivano, već i u preadipocitima i to kako kod kontrolnih, tako i kod insulinom-tretiranih grupa. Naime, u BAT se pored imunopozitivnih endotelskih ćelija, sreću u izvesnim regionima grupe aktiviranih endotelskih ćelija i preadipocita vrlo jake imunopozitivnosti, koja nije samo citoplazmatska već i nukleusna (*Slika 14*). Takođe se u mladim, nezrelim adipocitima sa sitnim lipidnim telima može uočiti imunoreaktivnost na vWF nešto blažeg intenziteta koja postaje sve slabija sa sazrevanjem mrkih adipocita i udaljavanjem od regiona proliferacije endotelskih ćelija i adipocita.



*Slika 14. Imunohistohemijska detekcija vWF u BAT (a) kontrolne i (b) grupe akutno tretirane niskom dozom insulina. Uočava se jaka reakcija u endotelskim ćelijama (E) i preadipocitima (PA) i blaga reakcija u okolnim zrelim adipocitima. Orig. uveličanje - 1000x. Bar - 20 µm.*

### 4.3.4. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija Ki-67 markera proliferacije

Imunohistohemijski, pokazano je prisustvo Ki-67 markera proliferacije u velikom broju endotelskih ćelija i ćelija adipocitnog pula, prvenstveno preadipocita i to kod svih grupa (*Slika 15*). Reakcija je najjača u nukleusima, ali je kod preadipocita jaka i citoplazmatski. Značajan podatak predstavlja nalaz bliske fizičke lokalizacije imunopozitivnih endotelskih ćelija i preadipocita, posebno kod grupa tretiranih niskom dozom insulina. Takođe, upravo kod ovih grupa uočava se bliska lokalizacija ovih ćelija uz EFA koje su takođe imunopozitivne na Ki-67.

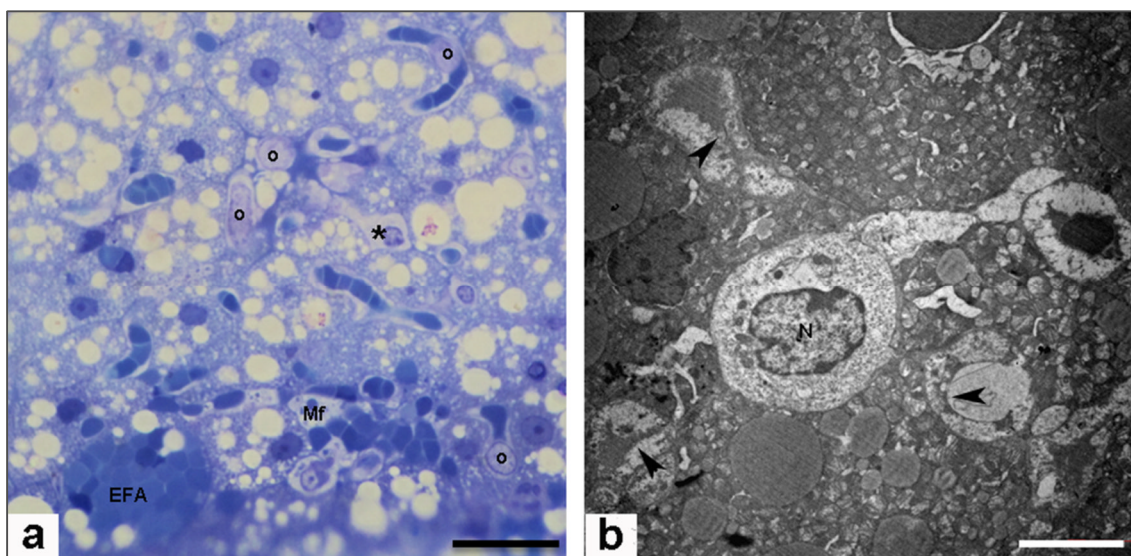


**Slika 15. Imunohistohemijska detekcija Ki-67 u BAT** (a) kontrolne grupe, (b, c) grupe akutno tretirane niskom dozom insulina i (d) grupe akutno tretirane visokom dozom insulina. (a, c) uočava se jaka citoplazmatska i nukleusna imunopozitivnost preadipocita (PA) i okolnih endotelskih ćelija (E); (b, c-**insert**) u region eritrofagocitoze je jaka imunoekspresija u EFA i susednim endotelskim ćelijama (E); (d) sporadično se javlja jaka reaktivnost u mrkim adipocitima sa krupnim lipidnim telima. Orig. uveličanje - 1000x. Bar - 20  $\mu$ m.

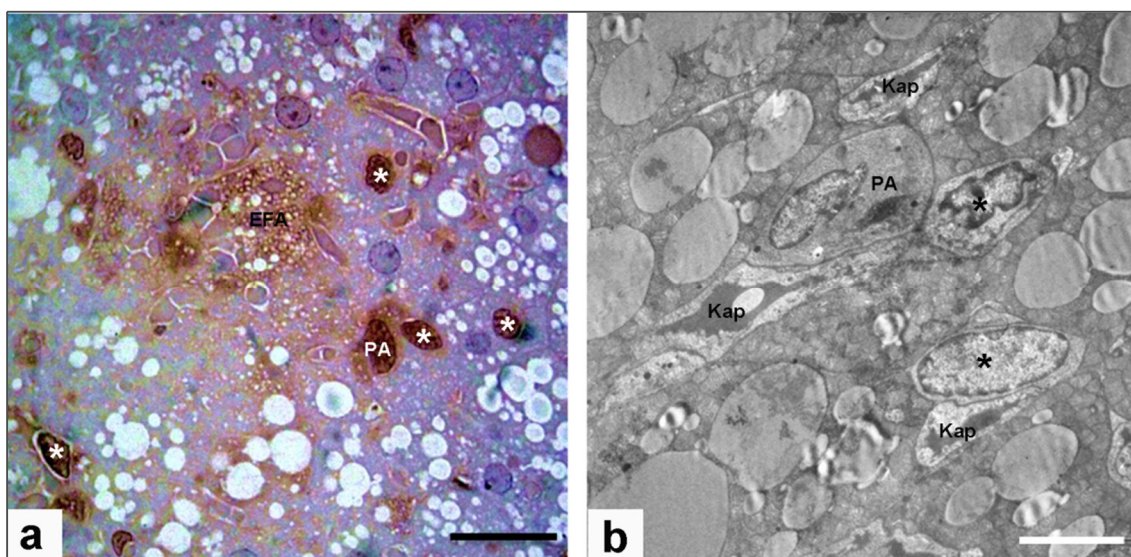
#### 4.3.5. Angiogeneza i aktivacija endotela

Tretman insulinom dovodi do povećane učestalosti aktiviranih endotelskih ćelija čija citoplazma deluje prosvetljeno i uvećano, uz smanjenje udela transcitotskih vezikula, i povećanje udela polizoma, ukazujući na povećanu sintetsku aktivnost (**Slika 16**). Takođe, povećava se i udeo angiogenih endotelskih ćelija koje pored navedenih karakteristika aktiviranih endotelskih ćelija imaju i uvećan, euhromatski nukleus ili se nalaze u nekoj od faza mitotske deobe. Endotelske ćelije aktiviranog i angiogenog fenotipa su često u

fizičkom kontaktu sa preadipocitima kao i uz regione eritrofagocitotske aktivnosti (Slika 17).



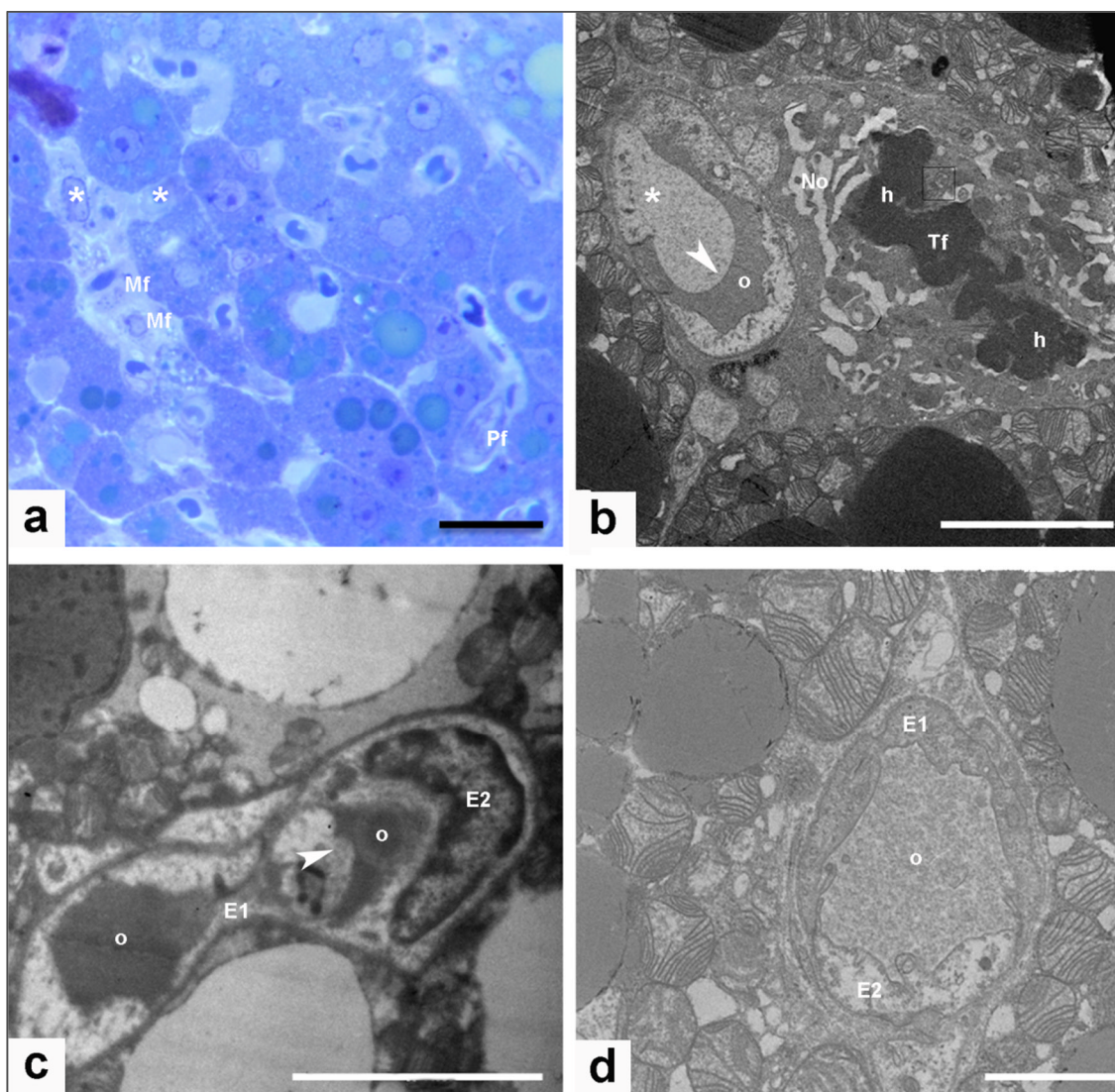
**Slika 16. Aktivirane i angiogene endotelne ćelije u BAT - hroničan tretman niskom dozom insulina.** (a) uočava se veliki broj aktiviranih (\*) i angiogenih (o) endotelne ćelije u blizini eritrofagocitnog regiona gde se uočavaju EFA i makrofage (Mf); (b) aktivirana endotelna ćelija, prosvetljene citoplazme; (N) nukleus aktivirane endotelne ćelije. Orig. uveličanje: (a) SM, bojenje toluidin plavim - 1000x; (b) TEM - 2650x. Bar: (a) 20  $\mu\text{m}$ , (b) 5  $\mu\text{m}$ .



**Slika 17. Lokalizacija aktiviranih i angiogenih endotelne ćelije uz preadipocite.** (a) Ki-67 imunoekspresija aktiviranim endotelne ćelijama u regionu eritrofagocitoze i uz preadipocit; akutan tretman niskom dozom insulina; (b) preadipociti (PA) uz aktivirane endotelne ćelije (\*) u hroničan tretman visokom dozom insulina. Orig. uveličanje: (a) SM - 1000x; (b) TEM - 2650x. Bar: (a) 20  $\mu\text{m}$ ; (b) 5  $\mu\text{m}$ .

Aktivirane i angiogene endotelne ćelije često prave protruzije u lumen endotela, pa sukcesivno dolazi do podele ćelije, čime se deo koji formira protruziju zadržava kao deo

postojećeg kapilara, a drugi deo sa susednom endotelnom ćelijom formira novi kapilar (*Slika 18*).



**Slika 18. Proces angiogeneze i formiranja novih kapilara:** (a) aktivacija endotela (\*) u regionu makrofagne infiltracije (Mf), uočiti endotelnu ćeliju u profazi mitoze (Pf); hronična kontrola; (b) endotelna ćelija u telofazi mitoze (Tf), uočavaju se hromozomi (h), kao i dilatiran nukleusni ovoj (No) u fazi formiranja, u istoj ćeliji se uočava i deoba mitohondrija (kvadrat). Susedna endotelna ćelija (\*) pokazuje znake aktivacije uz izraženu protruziju (strelica) u lumen kapilara (o); hroničan tretman visokom dozom insulina (4h). (c) Formiranje novog kapilarnog lumena (o) – endotelna ćelija (E1) se podeli formiranjem protruzije (strelica) koja se odvaja i sa susednom endotelnom ćelijom (E2) formira lumen kapilara. Ostatak podeljene ćelije gradi lumen susednog kapilara; 4h. (d) Novoformirani kapilar, uočavaju se dve endotelne ćelije – (E1) gornja, tamnije citoplazme, mirujuća, i (E2) donja, aktivirana, sa prosvetljenom citoplazmom, (o) lumen kapilara; 4h. Orig. uveličanje: (a) SM, bojenje toluidin plavim - 1000x, (b) TEM – 4400x, (c) TEM – 4400x, (d) TEM – 2650x. Bar: (a) 20  $\mu\text{m}$ ; (b, c) – 5  $\mu\text{m}$ ; (d) - 2  $\mu\text{m}$ .

## 4.4. EFEKAT INSULINA NA TERMOGENI KAPACITET MRKOG MASNOSTI

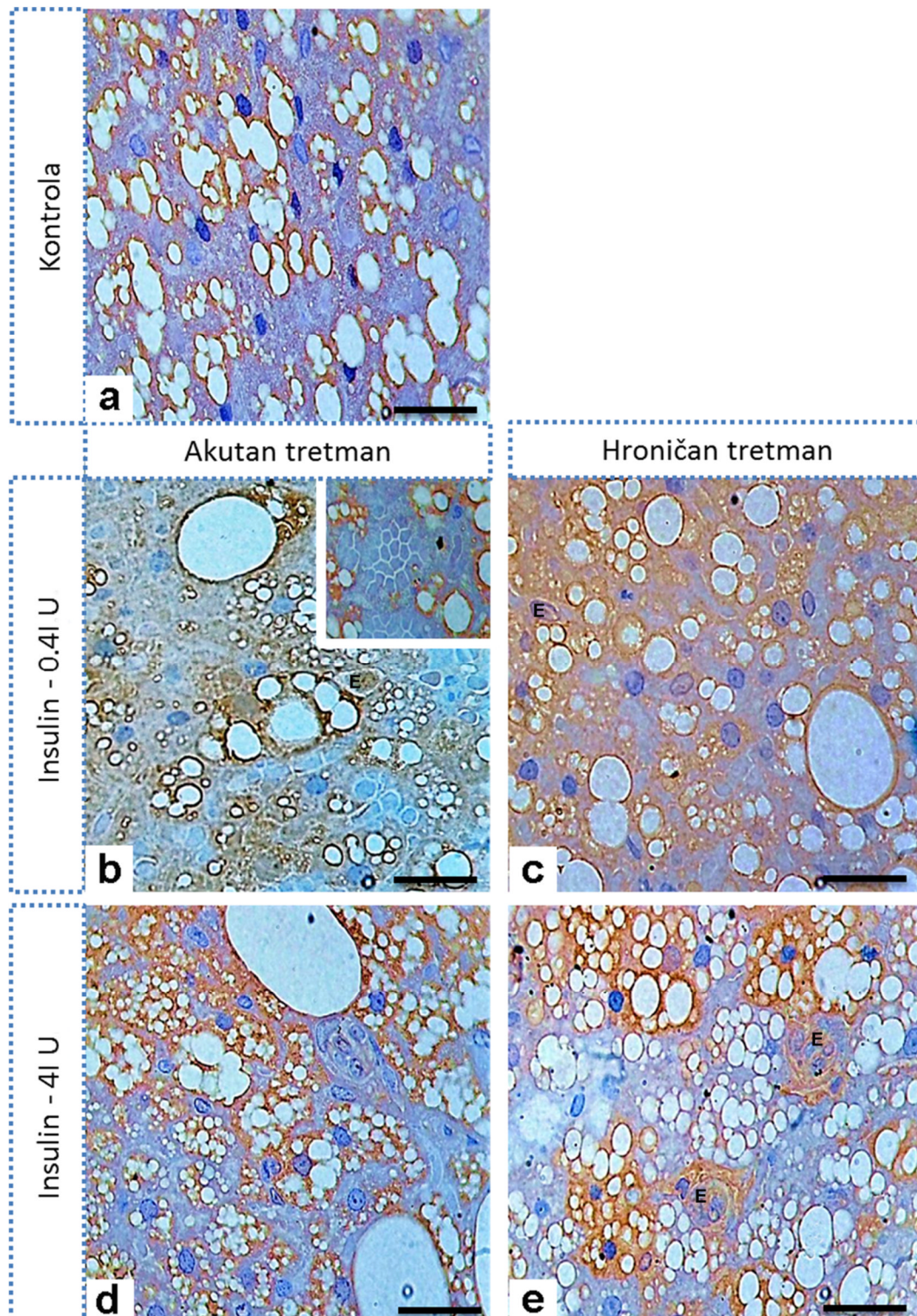
### 4.4.1. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija UCP1

Kod kontrolnih grupa ekspresija UCP1 je blaga, uz izražen harlekinski efekat među ćelijama (*Slika 19a*). Tretman niskom i visokom dozom insulina blago pojačava ekspresiju ovog proteina (*Slika 19b-e*). Niska doza insulina dovodi do postepenog pojačanja imunoekspresije među ćelijama, pa kod akutnog tretmana postoji izražen harlekinski efekat, dok se kod hroničnog tretmana istom dozom povećava broj mrkih adipocita sa jakom imunoekspresijom, čime se harlekinski efekat ublažava. Visoka doza insulina već pri akutnom tretmanu ukazuje na homogeno jaku imunoekspresiju UCP1 u mrkim adipocitima, a nakon hroničnog tretmana harlekinski efekat se pojačava. Kod svih grupa ekspresija UCP1 je vrlo jaka u mrkim adipocitima sa krupnim lipidnim telima i unilokulusnim adipocitima. Takođe, UCP1 se eksprimira i u pojedinim nukleusima mrkih adipocita.

Ekspresija UCP1 proteina se takođe detektuje i u endotelskim ćelijama BAT svih eksperimentalnih grupa.

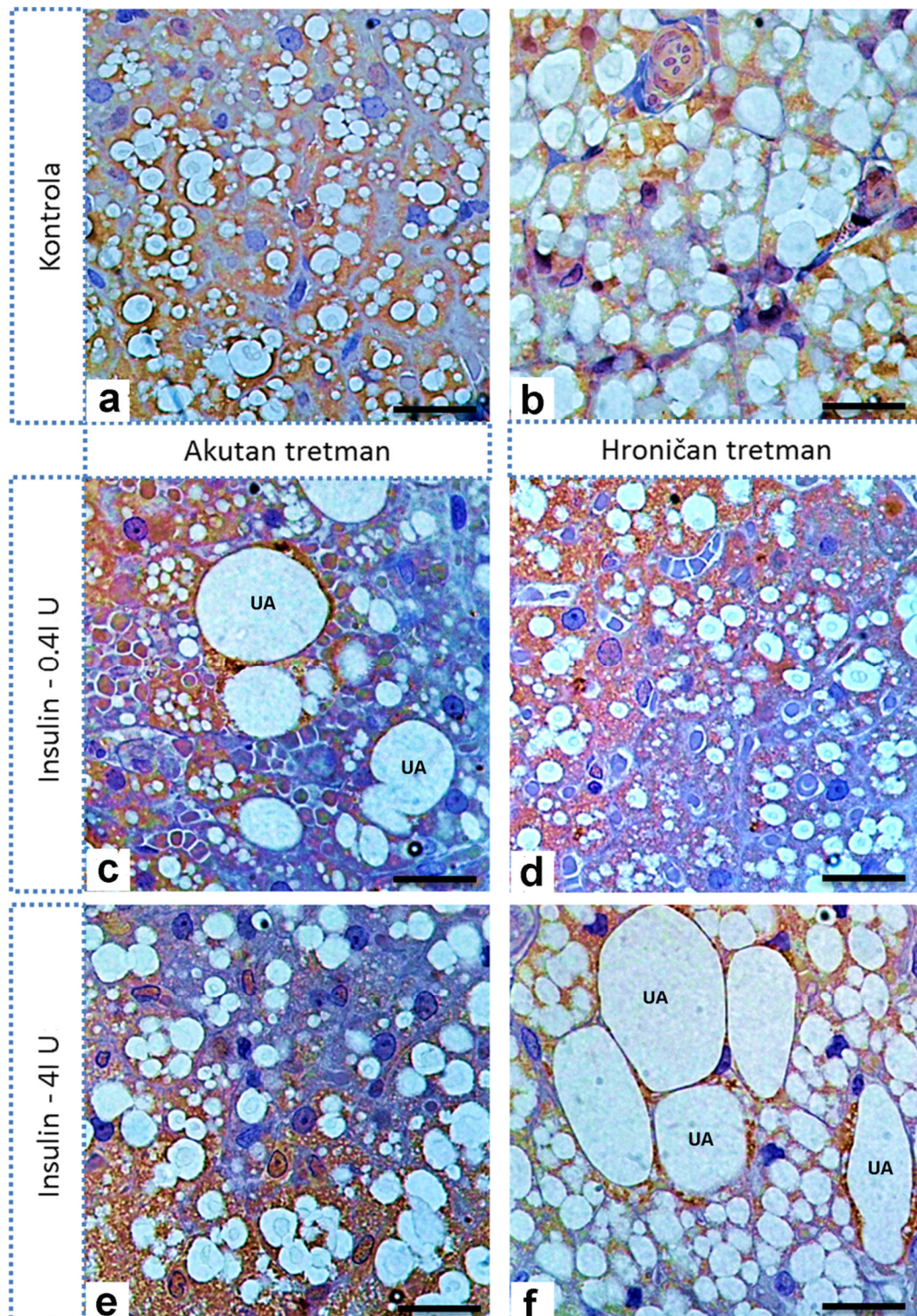
### 4.4.2. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija PGC-1 $\alpha$

Imunoreaktivnost mrkih adipocita na PGC-1 $\alpha$  je jaka kod svih grupa, sem kod grupe tretirane hronično visokom dozom insulina (*Slika 20*). U mrkim adipocitima, PGC-1 $\alpha$  protein se lokalizuje citoplazmatski, mitohondrijalno ali i nukleusno, posebno u krupnim, euhromatskim nukleusima, što je najizraženije kod insulinskih tretmana. Najjača reakcija među mrkim adipocitima je kod unilokulusnih adipocita, gde se uglavnom nalazi u mitohondrijama. Kod hroničnog tretmana visokom dozom insulina, reakcija je smanjena u svim mrkim adipocitima sem kod unilokulusnih (*Slika 20e*).



**Slika 19. Imunohistohemijaska detekcija UCPI u BAT** (a) kontrolne grupe i (b - e) grupa tretiranih insulinom – uočava se povećanje ekspresije UCPI proteina u mrkim adipocitima kod insulinom-tretiranih grupa u poređenju sa kontrolom. Takođe, kod tretmana insulinom uočava se i imunopozitivnost endotelskih ćelija (E). (**Insert**) – blaga ekspresija UCPI u eritrofagocitnim adipocitima. Orig. uveličanje - 1000x. Bar - 20  $\mu$ m.



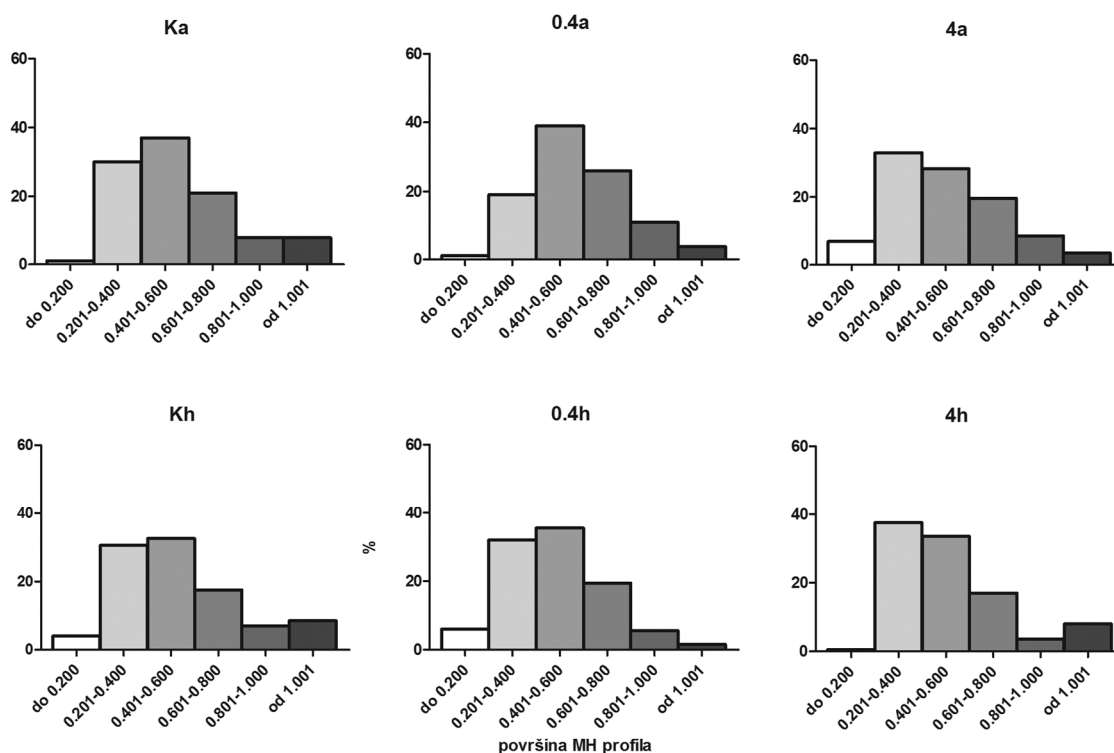


**Slika 20. Imunohistohemijaska detekcija PGC-1 $\alpha$  u BAT (a i b) kontrolnih i (c - e) insulinom tretiranih grupa – uočava se jaka reakcija u svim grupama, posebno u unilokusnim adipocitima (UA). Kod (e) hronično visoke hiperinsulinemije ekspresija opada, a jaka reakcija se zadržava samo u unilokusnim adipocitima. Orig. uveličanje - 1000x. Bar - 20  $\mu$ m.**

#### 4.4.3. Stereološke promene na nivou mitohondrija mrkih adipocita

##### *Površina mitohondrijalnog profila*

Kod kontrolnih grupa najveći je udeo mitohondrija sa površinom profila u opsegu od 0.2 do 0.6  $\mu\text{m}^2$  (**Grafik 3**). Akutan tretman niskom dozom insulina dovodi do trenda rasta mitohondrijalnog profila, pa je najviše onih površine od 0.4 - 0.6  $\mu\text{m}^2$ , a zatim i onih od 0.6 - 0.8  $\mu\text{m}^2$ . Kod hroničnog tretmana istom dozom se međutim, vrednosti vraćaju ka kontrolnom nivou. Suprotno niskoj dozi, kod visoke doze insulina javlja se trend smanjenja profila mitohondrija, raste udeo onih čija je površina 0.2 - 0.4  $\mu\text{m}^2$ , pa čak, kod akutnog tretmana i onih ispod 0.2  $\mu\text{m}^2$ .



**Grafik 3.** Klase mitohondrija na osnovu površine njihovog profila ( $\mu\text{m}^2$ ) i njihov procentualni udeo u odnosu na ukupan broj analiziranih mitohondrija po grupi (200). Mitohondrije su podeljene na 6 klasa: od ispod 0.2  $\mu\text{m}^2$ , do iznad 1  $\mu\text{m}^2$ . (**Ka**) akutna i (**Kh**) hronična kontrola, (**0.4a**) akutan i (**0.4h**) hroničan tretman niskom dozom insulina; (**4a**) akutan i (**4h**) hroničan tretman visokom dozom insulina.

##### *Volumenska gustina kristi*

Vv kristi mitohondrija mrkih adipocita (**Grafik 6**) je kod kontrolnih grupa, bez obzira na dužinu tretmana, ista i iznosi oko 25%. Tretman insulinom povećava vrednosti i to, kod niske doze progresivno – na oko 28.5% nakon akutnog tretmana i na 42.6% posle

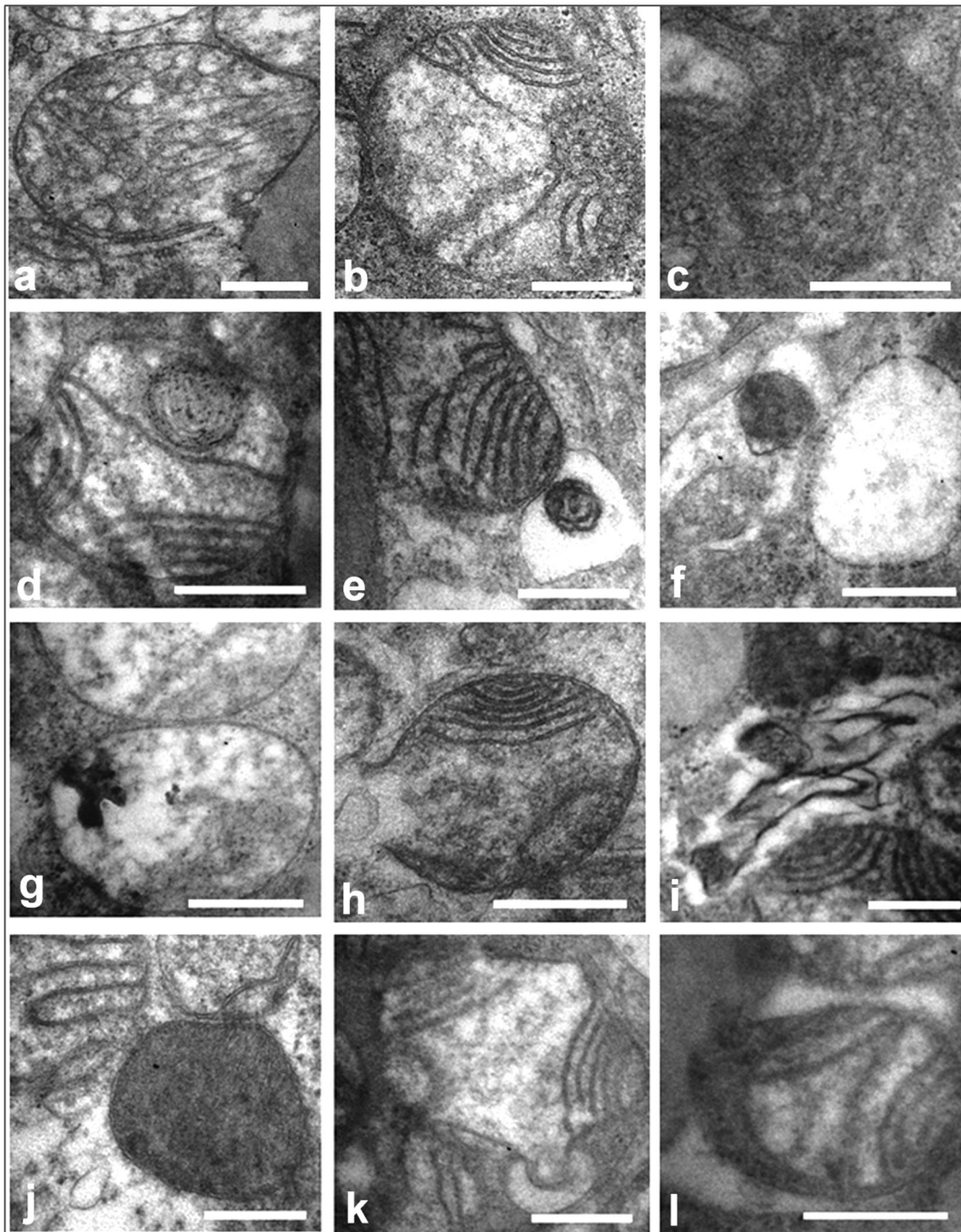
hroničnog tretmana. Kod visoke doze, već nakon akutnog tretmana dešava se nagli porast Vv kristi – 39%, ali se on ublažava nakon hroničnog tretmana kada se spušta na 35.4%, ali je i dalje iznad kontrolnog nivoa.

**Tabela 6. Volumenska gustina kristi ( $Vv_{CR}$ ), matriksa ( $Vv_{MX}$ ) i membrana ( $Vv_{MB}$ ) mitohondrija mrkih adipocita kod kontrolnih i grupa tretiranih insulinom (doza 0.4 IU ili 4 IU), akutno ili hronično. (\*) - Statistička značajnost u odnosu na referentnu kontrolu: \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; (#) - statistička značajnost u odnosu na akutan tretman istom dozom: ### $p < 0.001$ .**

		Akutan tretman			Hroničan tretman		
		Kontrola	INS 0.4IU	INS 4IU	Kontrola	INS 0.4IU	INS 4IU
$Vv_{CR} \%$	$\bar{X}$	25.72	28.47 <sup>**↑</sup>	39.04 <sup>***↑</sup>	25.91	42.56 <sup>***↑</sup> ###↑	35.36 <sup>***↑</sup> ###↑
	$\pm SE$	0.71	0.74	0.74	0.65	0.84	0.76
$Vv_{MX} \%$	$\bar{X}$	63.15	60.04	51.36	60.59	43.89	53.68
	$\pm SE$	0.78	0.84	0.80	0.68	0.86	0.84
$Vv_{MB} \%$	$\bar{X}$	11.13	11.49	9.60	13.50	13.55	10.96

#### 4.4.4. Oštećenja mitohondrija mrkih adipocita

Promene na mitohondrijama su naročito izražene kod akutnih tretmana insulinom u smislu različitih stupnjeva i tipova degradacije: a) dezorganizacija kristi (gubitak pravilne uređenosti, vezikulacija i namotavanje na jednom polu organele), formiranje lamelarnih (mijelinu-sličnih) struktura koje postepeno dovode do transformacije mitohondrija u lipofuscinske granule (*Slika 21a-f*); b) bubrenje mitohondrija uz prosvetljenje matriksa i gubitak kristi, što ponekad dovodi do prskanja i spljoštavanja mitohondrija uz izlivanje njenog sadržaja (*Slika 21g-i*); c) kondenzacija matriksa mitohondrija (*Slika 21j*); d) fuzija lizozoma i mitohondrija (*Slika 21l*); i e) autofagocitoza mitohondrija (*Slika 21b*).



**Slika 21. Različiti tipovi i faze degradativnih promena na mitohondrijama mrkih adipocita u BAT životinja tretiranih insulinom:** (a) narušavanje paralelne uredenosti kristi; akutan tretman visokom dozom insulina (4a); (b, c) vezikulacija kristi, (4a); (d - f) namotavanje kristi i formiranje mijelinu-sličnih struktura, do formiranja lipofuscina, (4a); (g) bubrenje mitohondrija uz prosvetljenje matriksa, (4a) (h) ruptura mitohondrije, (4a) i (i) njeno spljoštavanje, (4a); (j) kondenzacija mitohondrija, hroničan tretman visokom dozom insulina (4h); (k) mitofagija, hronična kontrola (Kh) i (l) fuzija mitohondrija i lizoma, (4a).TEM; orig. uveličanja: (d) 53000x, (g) 40000x, (b, f, h, k, l) 31000x, (a, c, e, i, j) 25000x. Bar – 0,5  $\mu$ m.

## 4.5. CITOTOKSIČNI EFEKAT INSULINA U MRKOM MASNOM TKIVU

### 4.5.1. Hemijska karakterizacija mrkog masnog tkiva

EDX analiza tkivnih preseka ukalupljenih u aralditu, pokazala je konstantan udeo makroelemenata u tkivu (ugljenika, kiseonika, fosfora i sumpora) zajedno sa osmijumom, koji je zbog procedure postfiksacije prisutan i detektabilan u tkivu. Zajednički težinski udeo ovih elemenata je konstantan kod svih analiziranih grupa (kontrolne i grupe tretirane visokom dozom insulina) i iznosi  $97.96 \pm 0.09\%$ , tako da se njihov uticaj na udele ostalih elemenata može isključiti. Od svih detektovanih elemenata, statistički značajna razlika među grupama se uočava kod težinskog udela: natrijuma, magnezijuma, gvožđa i bakra (*Tabela 7*). Udeo natrijuma i magnezijuma se povećava kod grupe tretirane akutno visokom dozom insulina, ali se posle trodnevnog tretmana vraća na kontrolni nivo, a udeo gvožđa se povećava kod obe grupe tretirane visokom dozom insulina u poređenju sa referentnim kontrolama.

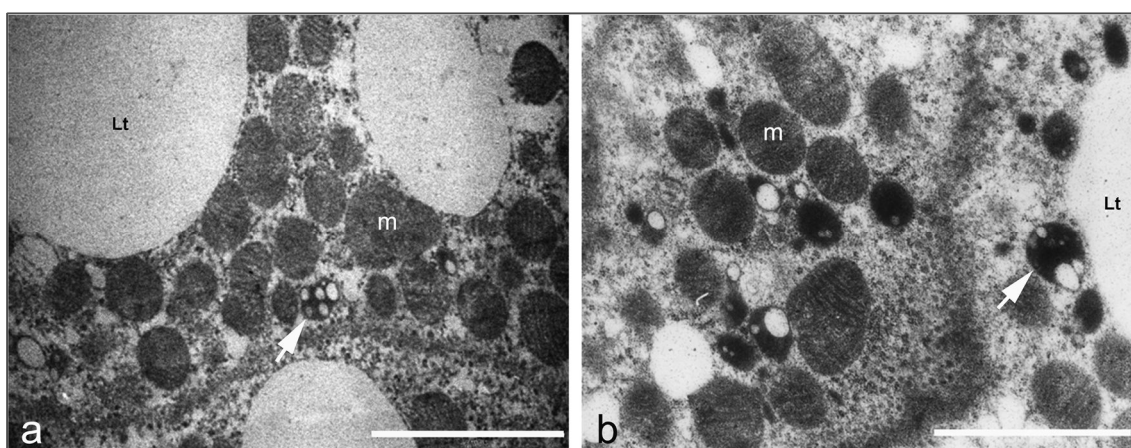
*Tabela 7. EDX mikroanaliza elemenata u BAT kontrolnih i insulinom tretiranih životinja, akutno ili hronično; (srednje vrednosti težinskih udela hemijskih elemenata  $\pm$  SE). (\*) - statistička značajnost u odnosu na referentnu kontrolu: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .*

	Akutan tretman		Hroničan tretman	
	Kontrola	INS 4IU	Kontrola	INS 4 IU
<b>C</b>	66.88 $\pm$ 0.41	67.08 $\pm$ 0.33	68.04 $\pm$ 0.45	68.16 $\pm$
<b>O</b>	14.66 $\pm$ 0.34	14.04 $\pm$ 0.13	15.47 $\pm$ 0.35	13.95 $\pm$ 0.24
<b>Os</b>	14.35 $\pm$ 0.53	14.42 $\pm$ 0.27	12.62 $\pm$ 0.33	13.65 $\pm$ 0.29
<b>P</b>	1.99 $\pm$ 0.09	2.13 $\pm$ 0.05	1.79 $\pm$ 0.07	1.97 $\pm$ 0.05
<b>S</b>	0.21 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01	0.22 $\pm$ 0.01
<b><math>\Sigma</math></b>	<b>98.11</b>	<b>97.90</b>	<b>98.09</b>	<b>97.94</b>
<b>Cl</b>	0.115 $\pm$ 0.004	0.105 $\pm$ 0.004	0.111 $\pm$ 0.006	0.104 $\pm$ 0.004
<b>Si</b>	0.115 $\pm$ 0.004	0.126 $\pm$ 0.003	0.111 $\pm$ 0.004	0.115 $\pm$ 0.004
<b>Na</b>	0.417 $\pm$ 0.017	0.496 $\pm$ 0.027** $\uparrow$	0.420 $\pm$ 0.024	0.439 $\pm$ 0.023
<b>K</b>	0.126 $\pm$ 0.004	0.125 $\pm$ 0.009	0.119 $\pm$ 0.004	0.121 $\pm$ 0.004
<b>Mg</b>	0.114 $\pm$ 0.003	0.136 $\pm$ 0.004*** $\uparrow$	0.120 $\pm$ 0.005	0.114 $\pm$ 0.003
<b>Ca</b>	0.122 $\pm$ 0.005	0.116 $\pm$ 0.005	0.116 $\pm$ 0.004	0.119 $\pm$ 0.004
<b>Fe</b>	0.323 $\pm$ 0.007	0.358 $\pm$ 0.006*** $\uparrow$	0.325 $\pm$ 0.008	0.365 $\pm$ 0.008*** $\uparrow$
<b>Cu</b>	0.698 $\pm$ 0.017	0.640 $\pm$ 0.011** $\downarrow$	0.654 $\pm$ 0.014	0.679 $\pm$ 0.014

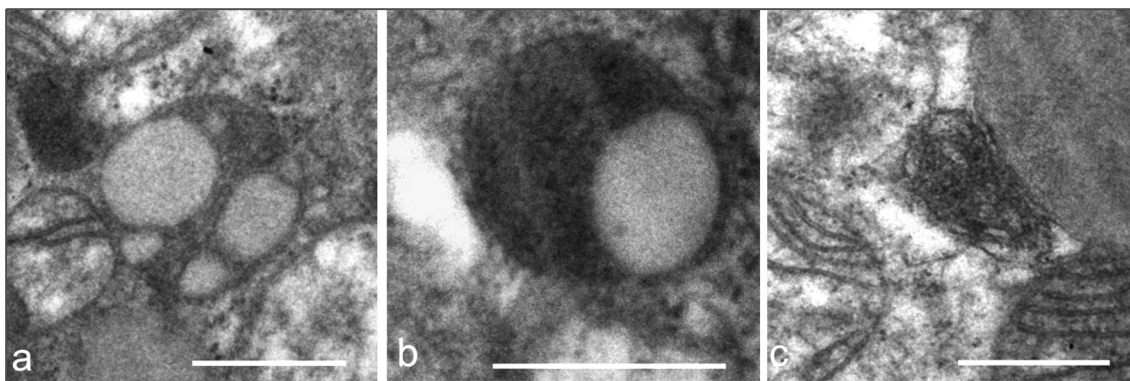
#### 4.5.2. Lipofuscinogeneza u mrkim adipocitima

Ultrastrukturna studija mrkih adipocita pokazala je da se količina lipofuscinskih granula povećava kod insulinom-tretiranih grupa, bez obzira na dužinu tretmana. Lipofuscinske granule se uočavaju i u citoplazmi mrkih adipocita kontrolnih životinja, ali su manje učestale nego kod hiperinsulinemičnih grupa. Profili mrkih adipocita kod kontrolnih životinja retko poseduju lipofuscinske granule, i one su uglavnom malobrojne i sitne (*Slika 22a*). Lipofuscinske granule poseduju tipičnu lizozomsku membranu, a ispunjene su osmiofilnim materijalom visoke elektron-gustine i lipidna telima, ponekad uz prisustvo vlaknastih struktura u njihovoj unutrašnjosti (*Slika 23a-c*). Njihov udeo varira među mrkim adipocitima i među eksperimentalnim grupama.

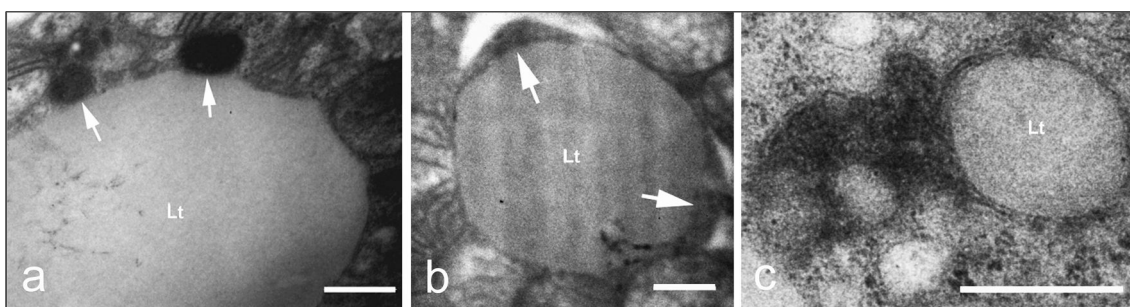
Najuočljivija razlika je kod BAT grupe akutno tretirane visokom dozom insulina gde se uočavaju različiti znaci unutarćelijske degradacije - broj lizozoma se povećava, nagomilavaju se lipofuscinske granule. Lipofuscin je naročito čest oko mitohondrija i uz lipidna tela (*Slika 22b*). Fuzija primarnih lizozoma i lipidnih tela takođe se uočava u mrkim adipocitima insulinom-tretiranih pacova, uz pojavu lipidnih tela unutar lipofuscinskih granula (*Slika 24*), a uočene degradativne promene na mitohondrijama takođe često završavaju fuzijom sa lizozomima i formiranjem lipofuscinskih granula, uglavnom sa mijelinu-sličnim strukturama, poreklom od membrana ovih organela (*Slika 21*).



*Slika 22. Akumulacija lipofuscina u mrkim adipocitima - (a) hronična kontrola; (b) hroničan tretman visokom dozom insulina. U poređenju sa kontrolom, gde se uočavaju sporadične lipofuscinske granule (strelica), kod tretmana insulinom se uočava veći broj lipofuscinskih granula različite veličine, sastava sličnog kao kod kontrole, raspoređenih oko mitohondrija (m) i lipidnih tela (Lt). Lipofuscinske granule su veće elektron-gustine od okolnih organela, sa sitnim lipidnim telima u svojoj unutrašnjosti. TEM; orig. uveličanja - 15000x. Bar - 2 $\mu$ m.*



**Slika 23. Izgled lipofuscinskih granula u mrkim adipocitima pacova nakon tretmana insulinom (akutan tretman visokom dozom).** Lipofuscinske granule su (a, b) obično ovalne, poseduju tipičnu lizozomsku membranu i ispunjene su osmiofilnim, elektron-gustim materijalom i lipidnim telima različite veličine, ili ređe, (c) fibrilarnim, mijelinu-sličnim strukturama. TEM; orig. uveličanja: (a) 19500x, (b) 40000x, (c) 19500x. Bar – 0.5 $\mu$ m.



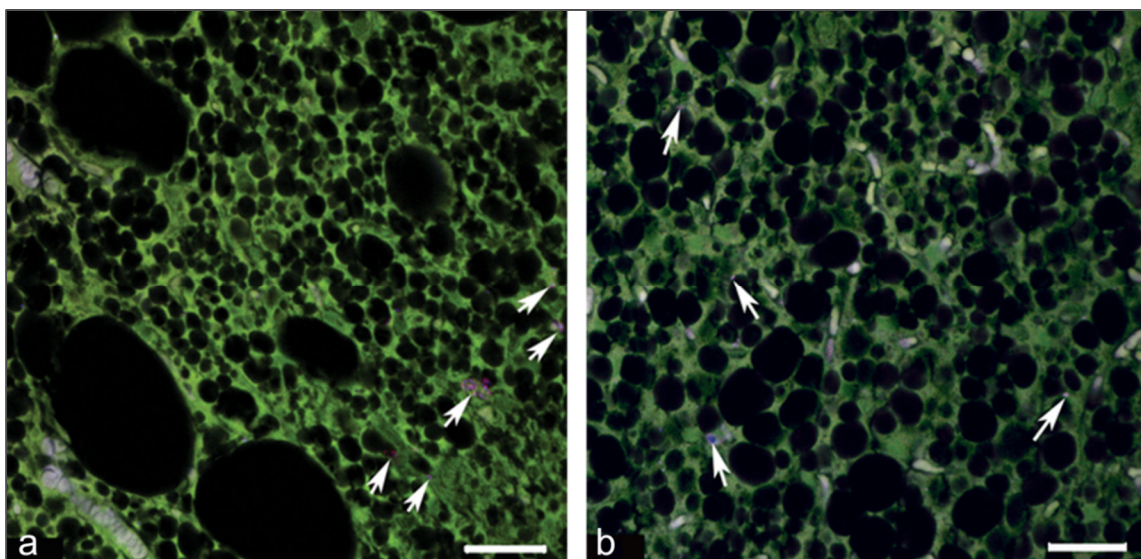
**Slika 24. Formiranje lipofuscinskih granula od lipidnih tela u mrkim adipocitima pacova nakon tretmana insulinom:** (a) lizozomi (strelice) u bliskom kontaktu sa lipidnim telima (Lt); (b) fuzija lipidnog tela i lizozoma; (c) lipidna tela unutar lipofuscinske granule, oko koje se uočavaju granule feritina. TEM; orig. uveličanja: (a, b) akutan tretman visokom dozom insulina, 40000x, (c) hroničan tretman visokom dozom insulina, 31000x. Bar – 0.5 $\mu$ m.

#### *Autofluorescirajuća svojstva lipofuscina mrkih adipocita*

Konfokalna mikroskopska analiza je pokazala prisustvo autofluorescirajućeg materijala u mrkim adipocitima svih eksperimentalnih grupa koji po svojoj lokalizaciji, količini i veličini odgovara lipofuscinu (*Slike 25 i 26*). Ovaj materijal autofluorescira nakon ekscitacije svetlošću talasne dužine 488 nm i 633 nm. Eritrociti takođe autofluoresciraju nakon ekscitacije ovim talasnim dužinama, ali i nakon ekscitacije sa 533 nm (*Slika 26a-d*), što omogućava razlikovanje od lipofuscina. Najveća količina lipofuscina se detektuje u BAT grupa akutno tretiranih insulinom (*Slika 26a-d*). Lipofuscin je lokalizovan prvenstveno u citoplazmi mrkih adipocita uz ćelijsku membranu, u vidu granula organizovanih u manje ili veće grupe. Prosečna veličina lipofuscinske granule je 1 - 2  $\mu$ m. Mrki adipociti hronično tretiranih životinja takođe poseduju značajne količine lipofuscina

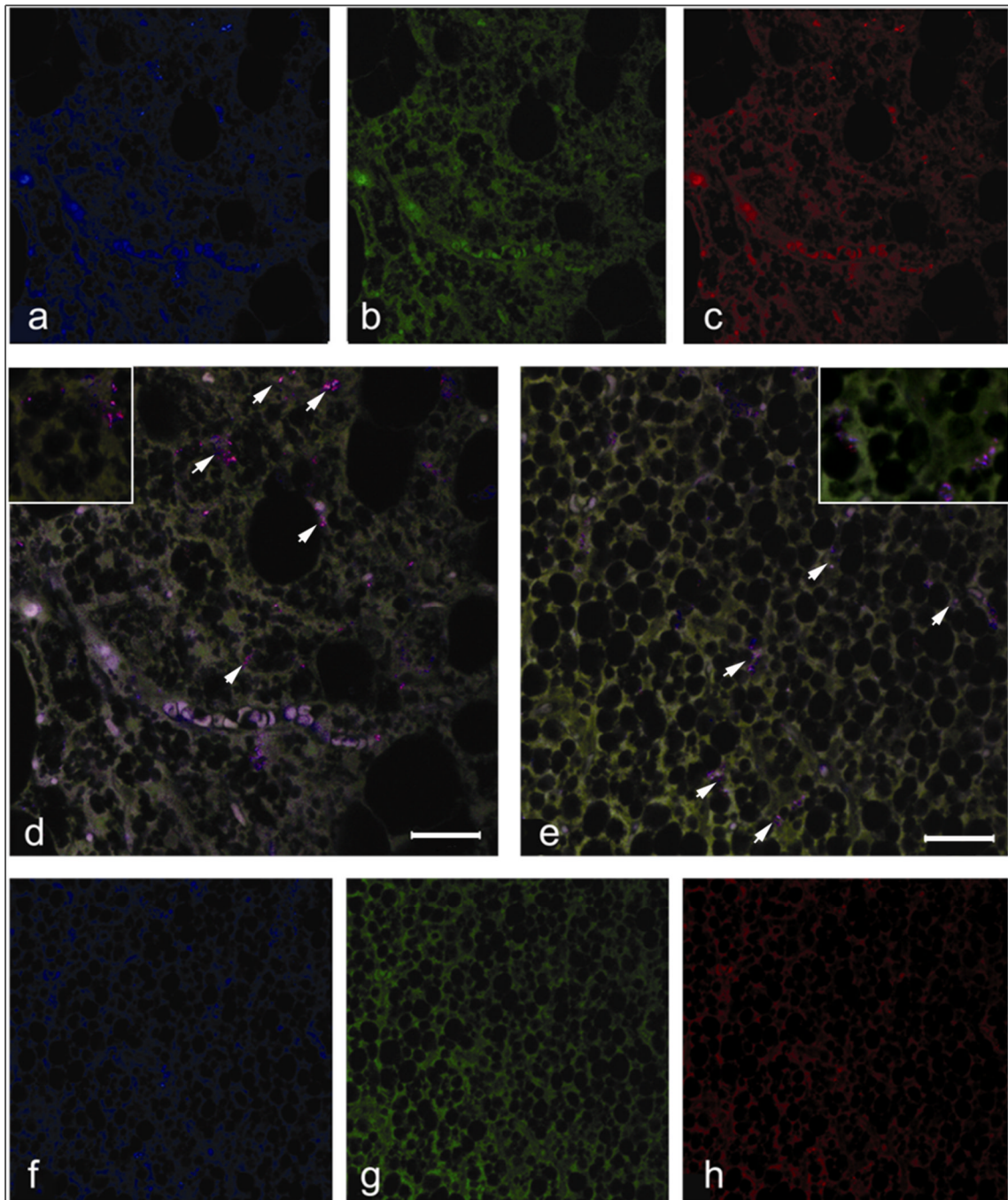
koji je po lokalizaciji i veličini granula sličan onom kod akutno tretiranih grupa, uz blago smanjenje količine (*Slika 26e-b*). Mnoge lipofuscinske granule se uočavaju uz lipidna tela.

U poređenju sa BAT insulinskih grupa, kod kontrolnih životinja se uočava znatno niža količina lipofuscinskih granula, naročito kod hronične kontrole, gde se uočavaju gotovo isključivo eritrociti (*Slika 25b*). Granule lipofuscina su manje (ispod 1  $\mu\text{m}$ ) i sporadično su raspoređene u citoplazmi mrkih adipocita (*Slika 25a*).



*Slika 25. Detekcija autofluorescence lipofuscina u BAT kontrolnih grupa - (a) akutna kontrola; (b) hronični kontrola. Prikazane mikrografije su dobijene preklapanjem signala nakon ekscitacije crvenom (633 nm), plavom (543 nm) i zelenom svetlošću (488 nm) Uočavaju se granule (strelice) koje fluoresciraju nakon ekscitacije u crvenom i plavom delu spektra, čija se zastupljenost povećava u BAT hiperinsulinemičnih životinja. Konfokalna mikroskopija; orig. uveličanja: 630x. Bar – 20 $\mu\text{m}$ .*

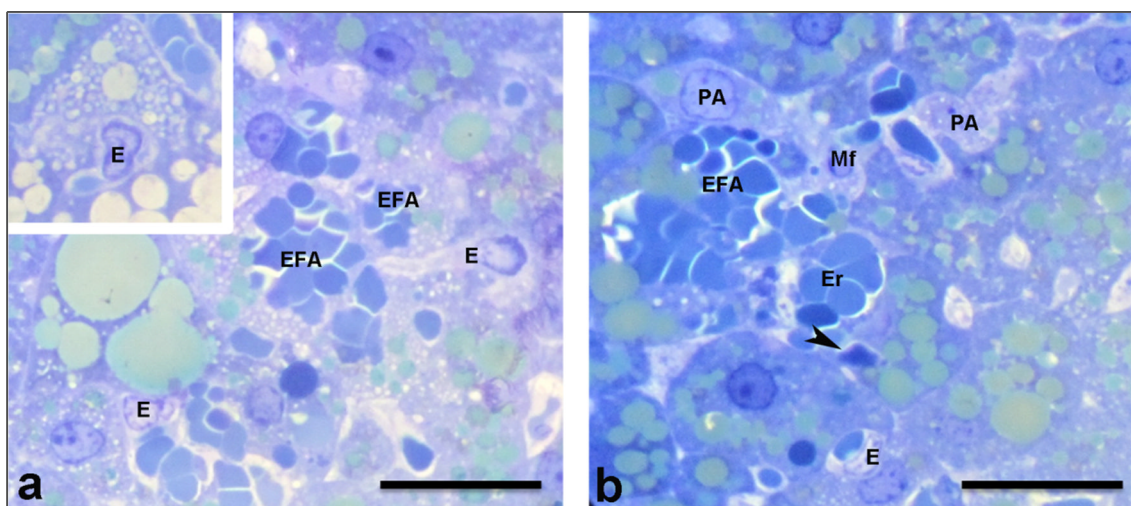




**Slika 26. Detekcija autofluorescence lipofuscina u BAT pacova tretiranih insulinom** - (a) akutan i (b) hroničan tretman visokom dozom insulina. Kombinovane mikrografije (d i e) su dobijene preklapanjem signala detektovanih nakon ekscitacije (a, f) plavom (543 nm), (b, g) zelenom (488 nm) i (c, h) crvenom (633 nm) svetlošću. Uočavaju se lipofuscinske granule (strelice) u mrkim adipocitima. Konfokalna mikroskopija; orig. uveličanja - 630x. Bar – 20 $\mu$ m.

#### 4.5.3. Eritrofagocitoza i smrt mrkih adipocita

Prisustvo mrkih adipocita koji fagocitiraju ekstravazirane eritrocite – EFA, uočava se kod svih grupa (*Slika 27*), međutim ekstravazacija eritrocita i njihova fagocitoza je najjača kod životinja tretiranih niskom dozom insulina, bez obzira na dužinu tretmana. Eritrofagocitni regioni osim EFA sadrže i aktivirane makrofage, endotelne ćelije i preadipocite. EFA su drugačije morfologije od okolnih mrkih adipocita, njihove mitohondrije su veće, što je uočljivo i na nivou svetlosne mikroskopije. Često se kod insulinom-tretiranih životinja uočavaju mrki adipociti locirani uz kapilare, bez eritrocita u svojoj citoplazmi, ali sa sličnim, uvećanim mitohondrijama (*Slika 27a-insert*).

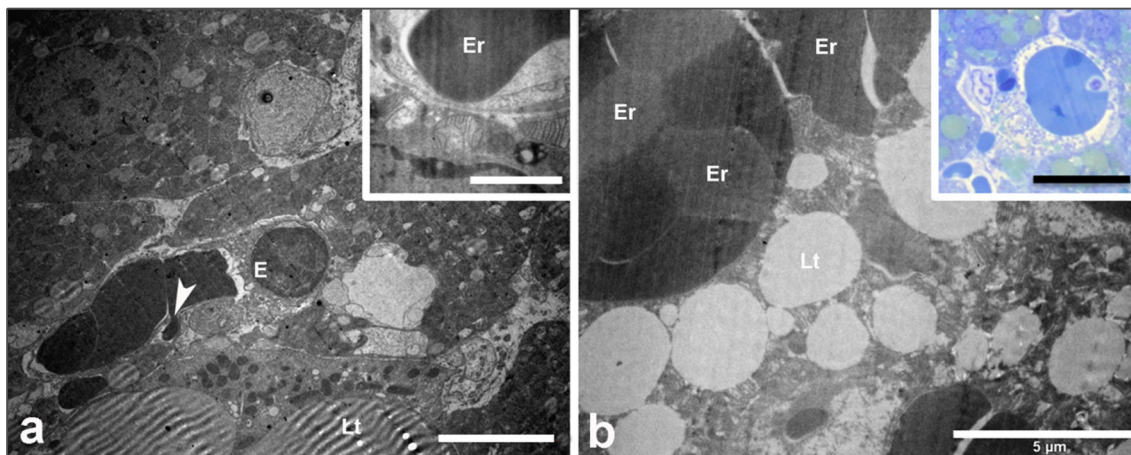


*Slika 27. Eritrofagocitoza u BAT pacova tretiranih insulinom - (a, b) eritrofagocitna žarišta uz krvne sudove na mestu ekstravazacije eritrocita (Er) uočava se njihov unos fagocitozom (strelica) i prisustvo u adipocitima (EFA); u ovim regionima sreću se i makrofage (Mf) i preadipociti (PA); akutan tretman niskom dozom, (insert) – mrki adipocit sa uvećanim mitohondrijama; hroničan tretman visokom dozom insulina; (E) endotelna ćelija SM, bojenje toluidin plavim; orig. uvećanja - 1000x. Bar – 20μm.*

U BAT insulinom-tretiranih životinja (posebno kod životinja tretiranih niskom dozom insulina) se često mogu uočiti mikrohemoragijska polja (*Slika 27*), odnosno regioni u kojima se uočavaju ekstravazirani eritrociti. U tim se regionima dešava unos eritrocita u mrke, tzv. EFA, u procesu fagocitoze (*Slika 27b*). Međutim, ponekad eritrociti direktno napuštaju lumen, menjajući konformaciju i „provlačeći“ se kroz zid kapilara i odmah bivaju fagocitirani od strane susjednog mrkog adipocita koji formira pseudopodije i u procesu klasične fagocitoze, unosi eritrocit (*Slika 28a*).

Količina fagocitiranih eritrocita u citoplazmi EFA varira od nekoliko, pa do potpune preplavljenosti uz jedva vidljivu citoplazmu adipocita. Eritrociti su uglavnom

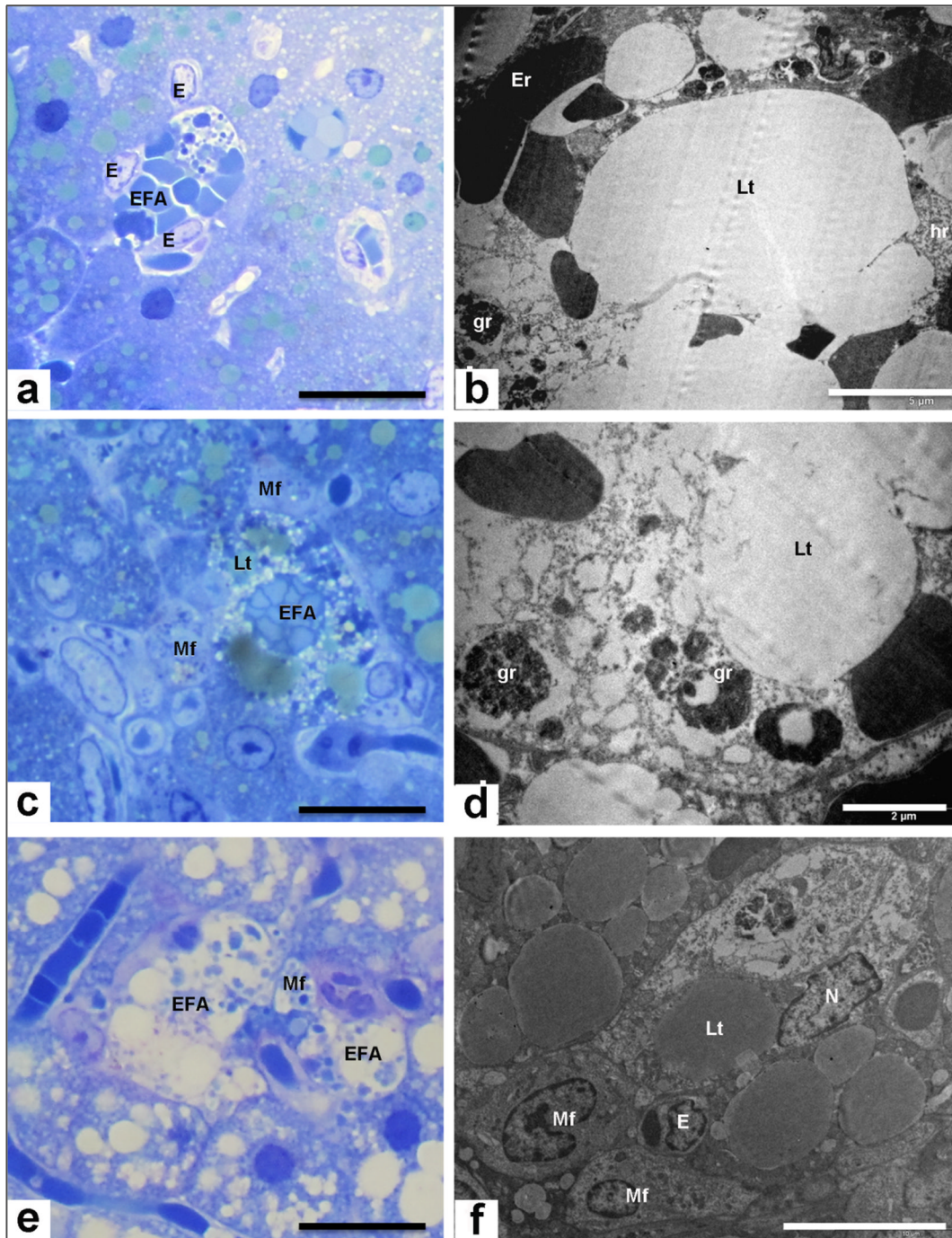
tesno „pakovani“, često u krupne sferične fagozome koji zauzimaju veći deo ćelijske zapremine (*Slika 28b*).



**Slika 28. Ekstravazacija eritrocita i njihov unos u mrki adipocit** – (a) eritrocit „provlačeći se“ napušta lumen kapilara i unosi se u mrki adipocit u procesu fagocitoze (strelica); (a-insert) – eritrocit (Er) uz stanjeni deo kapilarnog zida, ukazujući na proces ekstravazacije eritrocita; (b i b-insert) eritrociti unutar EFA, tesno grupisani u sferične fagozome. TEM; hroničan tretman visokom dozom insulina; (b-insert) – SM, bojenje toluidin plavim, akutan tretman niskom dozom insulina. Orig.uveličanja: (a) – 3400x, (a-insert) – 15000x, (b) – 4400x, (b-insert) – 1000x. Bar: (a) - 5  $\mu$ m, (a-insert) - 2  $\mu$ m; (b) - 5  $\mu$ m; (b-insert) - 20 $\mu$ m.

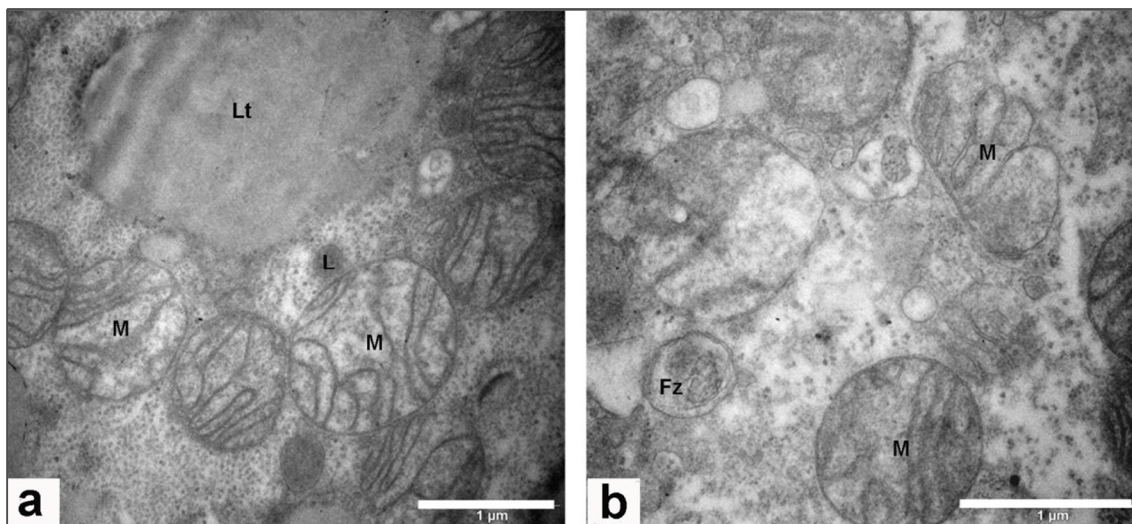
Pored eritrocita očuvane morfologije jasno se uočava, naročito na nivou TEM, da se u EFA odvija njihova razgradnja, pa se mogu uočiti različiti stepeni ali i tipovi degradacije eritrocita (*Slika 29*). Naime, ultrastrukturno se razlikuju dva tipa degradacije eritrocita, čak i u okviru istog adipocita – granularni i hemolitički tip (*Slika 29b*). Kod granularne degradacije eritrocita dolazi do progresivne razgradnje počevši od periferije eritrocita, gde se uočavaju zone elektron-gustog granularnog materijala, uz gubitak membranskog integriteta. U kasnijim stadijumima, promene se proširuju na ceo matriks eritrocita, fagozomi se postepeno smanjuju i na kraju se ne razlikuju od sekundarnih lizozoma i lipofuscinskih granula sa unutrašnjošću heterogene elektron-gustine i produktima nepotpune degradacije. Hemolitička razgradnja se karakteriše progresivnim, homogenim smanjenjem elektron-gustine eritrocitnog matriksa uz očuvanje plazma membrane.

Pored razgradnje eritrocita, neretko se i same ćelijske strukture EFA razrađuju prilikom eritrofagocitoze (*Slika 29d-f*) i dolazi do formiranja lipofuscinskih tela, autofagije ili citoplazmatske degradacije organela i finalno do smrti ćelije. Ćelijski materijal i lipidna tela se uklanjaju okolnim makrofagama (*Slika 29e, f*).

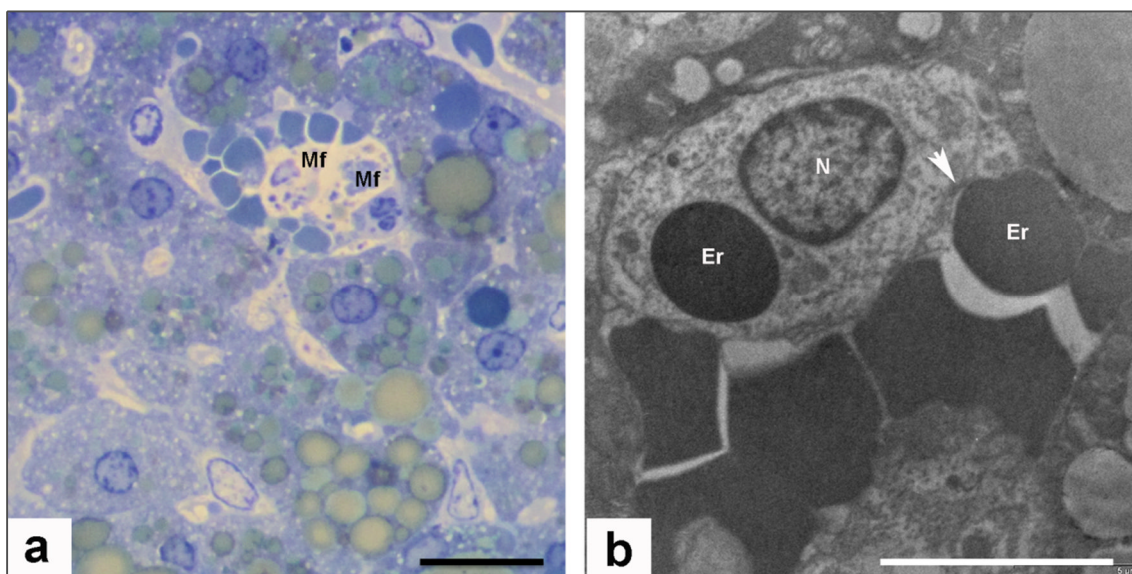


**Slika 29. Eritrofagocitni regioni u BAT -** (a) mrki adipociti akumuliraju eritrocite u svojoj citoplazmi, (b) koji se potom razgrađuju, hemolitički (hr) i granularno (gr), što takođe dovodi do (c - f) razgradnje struktura samog adipocita u procesu autofagije, prosvetljavanja citoplazme i unutarćelijske destrukcije. U regionima eritrofagocitoze često su prisutne makrofage (Mf); (E) – endotelske ćelije; (N) – nukleus mrkog adipocita; (Lt) – lipidno telo. (a) – akutan tretman niskom dozom insulina; (b, d) – hroničan tretman visokom dozom insulina; (c) hronična kontrola; (e, f) hroničan tretman niskom dozom insulina. Orig. uveličanja: SM (a, c, e) - 1000x; TEM: (b) - 4400x, (d) - 8800x, (f) - 2650x. Bar: (a, c, e) 20  $\mu$ m; (b) 5  $\mu$ m; (d) 2  $\mu$ m; (f) 10  $\mu$ m.

U EFA u kojima se odvija razgradnja eritrocita uočava se ultrastrukturno značajno povećanje količine feritinskih granula, naročito kod ćelija u kojima je degradacija u poodmakloj fazi, bez obzira na tip degradacije (*Slika 30*). Feritinske granule se uočavaju prvenstveno u citoplazmi uz eritrofagozome, nešto manje i u samim eritrofagozomima, ali i u sekundarnim lizozomima i lipofuscinskim granulama (*Slika 24c*).



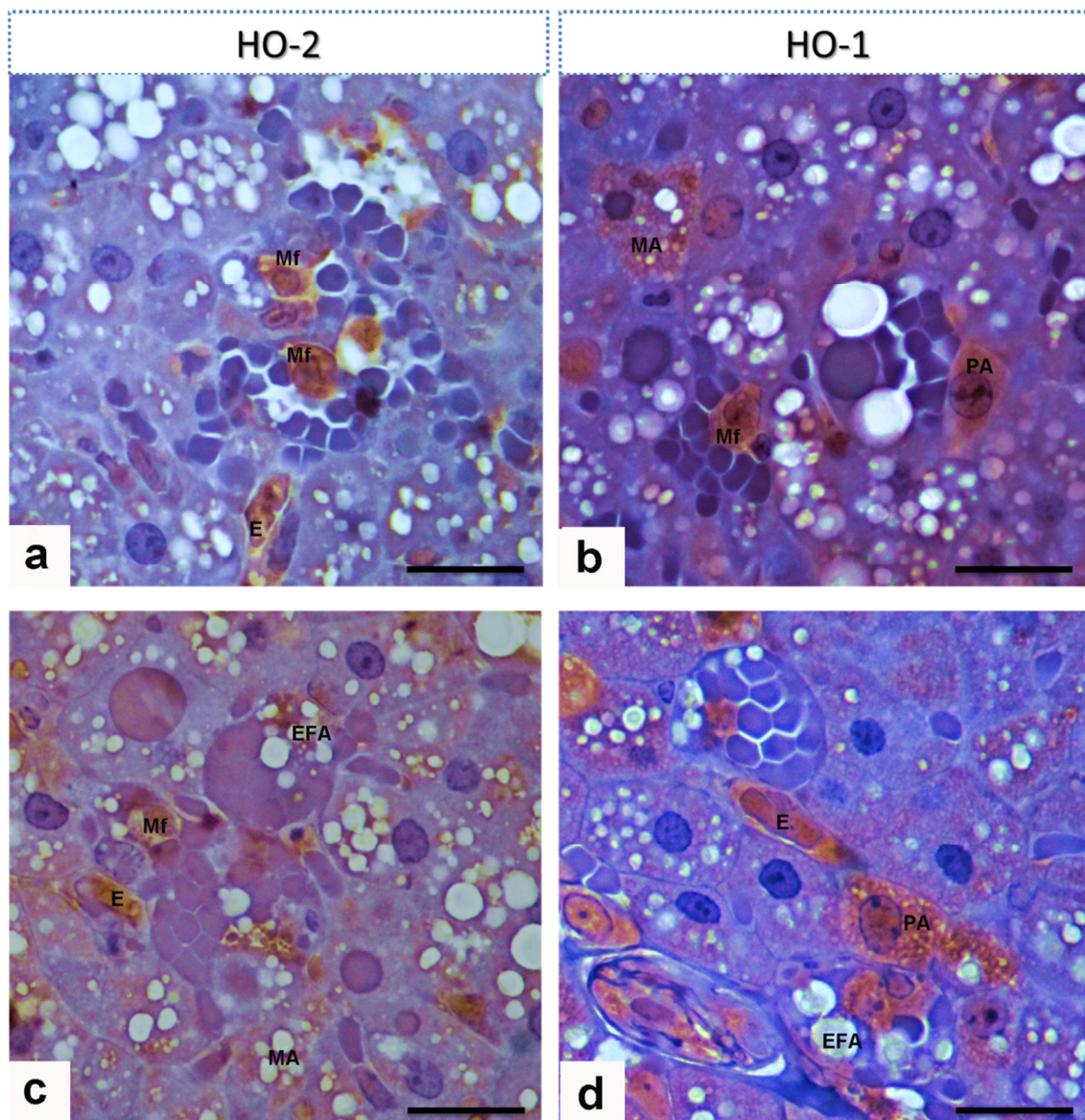
*Slika 30. Akumulacija feritina u eritrofagocitnim adipocitima kod (a, b) hroničnog tretmana visokom dozom insulina; (b) uočava se takođe veći broj autofagocitiranih organela, prvenstveno mitohondrija (M), u fagozomima (Fz). TEM, orig. uveličanja: (a) 19500x, (b) 25000x. Bar – 1µm.*



*Slika 31. Makrofage u regionu eritrofagocitoze: (a) makrofage (Mf) sa fagozomima i lipidnim telima u citoplazmi; akutan tretman niskom dozom insulina; (b) makrofaga sa fagocitiranim eritrocitom (Er) i u fazi fagocitiranja drugog eritrocita (strelica); (N) nukleus makrofage; hroničan tretman niskom dozom insulina. Orig. uveličanja: SM, bojenje toluidin plavim - (a) 1000x; TEM - (b) 5600x. Bar; (a) 20 µm, (b) 5 µm.*

### *Imunohistohemijska detekcija HO-1 i HO-2 u eritrofagocitnim regionima*

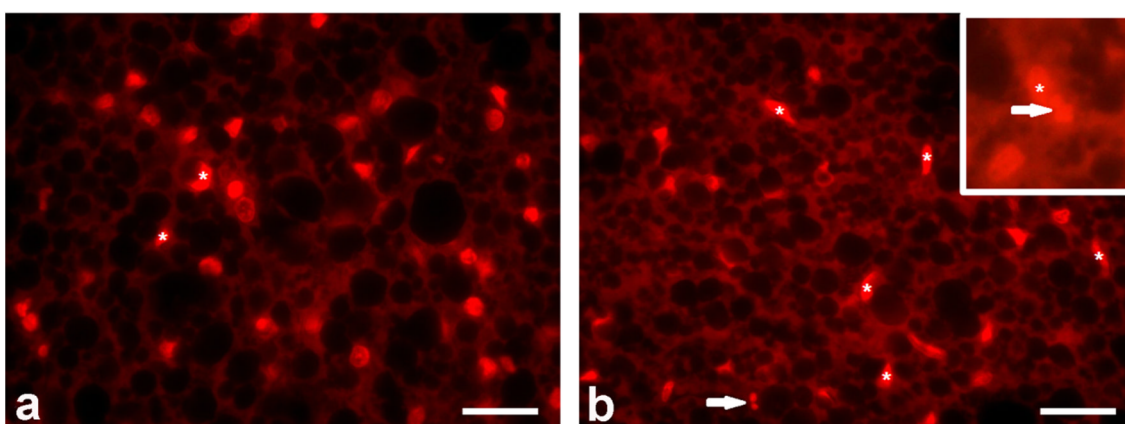
Pored akumulacije feritina, u prilog pojačanoj akumulaciji gvožđa u regionima eritrofagocitoze, govori i pojačana imunoekspresija hem oksigenaza – konstitutivne, HO-2 u makrofagama, preadipocitima i mladim mrkim adipocitima (*Slika 31a, c*), i inducibilne, HO-1, koja se pored u makrofagama i preadipocitima sreće i u EFA i okolnim endotelskim ćelijama (*Slika 32b, d*).



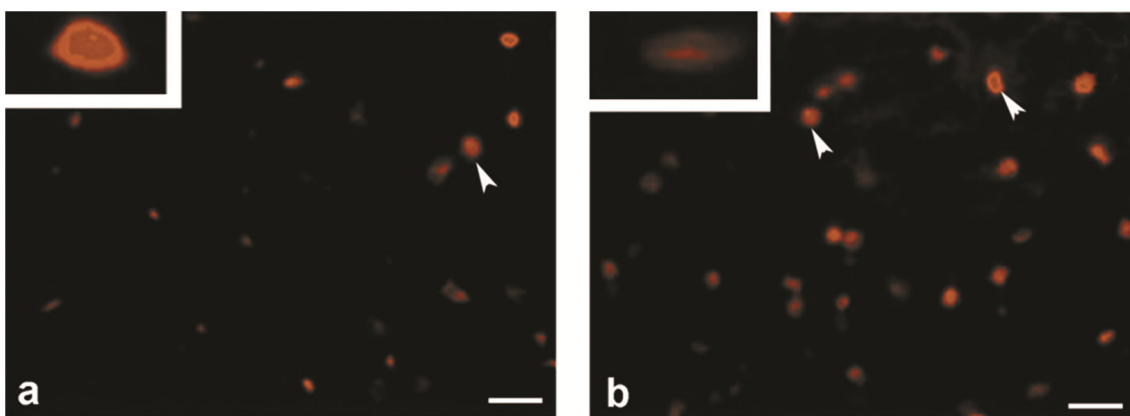
*Slika 32. Imunohistohemijska detekcija (a, c) HO-2 i (b, d) HO-1 u eritrofagocitnim regionima BAT kod insulinom-tretiranih pacova; akutan tretman niskom dozom. Obe izoforme se ekspimiraju u makrofagama (Mf) u regionu eritrofagocitoze, EFA i endotelskim ćelijama (E). HO-1 se pored u navedenim ćelijama, takođe ekspimirira, i to vrlo intenzivno, u preadipocitima (PA). Orig. uveličanja - 1000x. Bar – 20  $\mu$ m.*

#### 4.5.4. Apoptoza endotelskih ćelija

Bojenje propidijum jodidom (*Slika 33*) ukazuje na povećanje broja kondenzovanih, heterohromatinskih nukleusa endotelskih ćelija u BAT kod grupa koje su tretirane visokom dozom insulina, naročito nakon hroničnog tretmana, što ukazuje na povećan nivo apoptoze endotelskih ćelija kod ovih životinja. Takođe, TUNEL tehnika detekcije apoptotskih nukleusa potvrđuje ovaj nalaz, ukazujući na povećan nivo DNK fragmenata u nukleusima BAT insulinom-tretiranih životinja, naročito kod izduženih, ovalnih nukleusa endotelskih ćelija; što opet ukazuje na smrt ovih ćelija apoptozom (*Slika 34*).



*Slika 33. Bojenje BAT propidijum jodidom ukazuje na povećanje broja heterohromatinskih nukleusa kod insulinom-tretiranih pacova (b – hroničan tretman visokom dozom) u odnosu na kontrolne životinje (a – akutna kontrola). Heterohromatinski, kondenzovani nukleusi (\*) su uglavnom izduženi, ovalnog oblika, što odgovara nukleusima endotelskih ćelija. (B, insert) – nukleusna fragmentacija i mikronukleusi (strelice) Orig. uvećanje: 630x. Bar – 30  $\mu$ m.*



*Slika 34. TUNEL bojenje BAT – (a) akutna kontrola, i (b) hroničan tretman visokom dozom insulina – uočava se povećanje broja fluorescentno-obeđenih nukleusa (strelica) sa fragmentacijama DNK, što ukazuje na veću učestalost apoptoze u BAT. Orig. uvećanje - 400x. Bar – 20  $\mu$ m.*

#### 4.5.5. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija 4-HNE proteinskih adukata

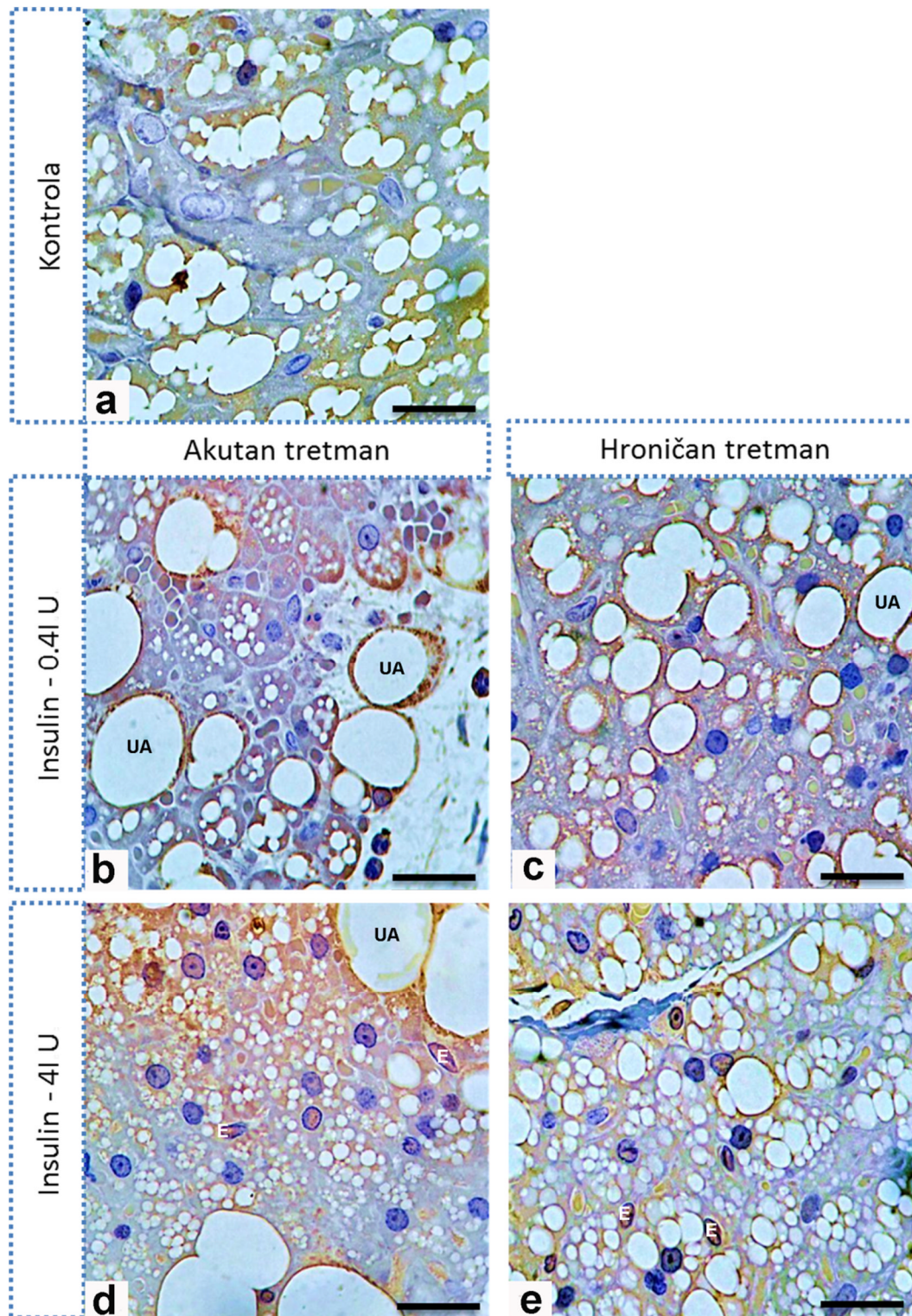
Imunoekspresija 4-HNE proteinskih adukata se sreće u BAT svih eksperimentalnih grupa (*Slika 35*) uključujući kontrolne, gde je reakcija blaga i homogeno distribuirana u citoplazmi mrkih adipocita, a u endotelskim ćelijama se uglavnom ne sreće. Kod grupa tretiranih insulinom uočava se jača reakcija u mrkim adipocitima sa krupnim lipidnim telima, posebno u unilokulusnim adipocitima. Kod grupa tretiranih visokom dozom insulina pored citoplazmatske reakcije javlja se i reakcija u nukleusima mrkih adipocita ali i endotelskih ćelija (*Slika 35d, e*).

#### 4.5.6. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija nitrotirozina

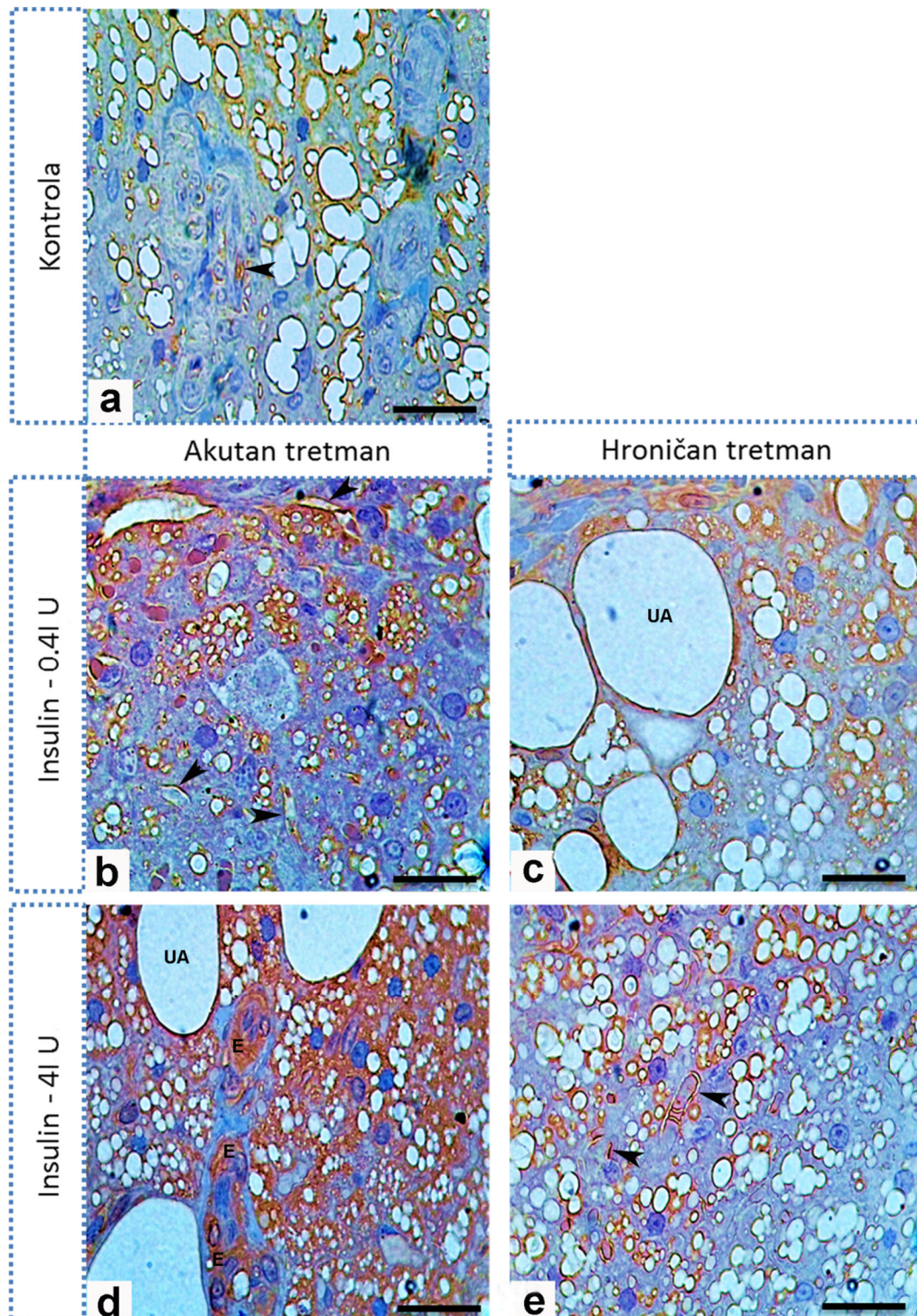
Nitrotirozin se detektuje imunohistohemijski (*Slika 36*) u citoplazmi mrkih adipocita svih eksperimentalnih grupa, prvenstveno oko lipidnih tela. Kod svih insulinskih grupa reakcija je nešto jača u unilokulusnim adipocitima gde se uočava i u nukleusima (*Slika 36c*). Najjača ekspresija nitrotirozina u BAT je kod grupe koja je akutno tretirana visokom dozom insulina (*Slika 36d*).

Kod svih grupa imunoekspresija nitrotirozina se uočava i u lumenu krvnih sudova, tačnije na luminalnoj membrani endotelskih ćelija, a kod hroničnog tretmana niskom dozom (*Slika 36c*), kao i kod akutnog tretmana visokom dozom insulina (*Slika 36d*), reakcija se uočava i u unutrašnjosti endotelskih ćelija.





**Slika 35. Imunohistohemijska detekcija 4-HNE u BAT** (a) kontrolne i (b-e) grupa tretiranih insulinom. Uočava se pojačanje imunoekspresije 4-HNE u citoplazmi i nukleusima mrkih adipocita, prvenstveno krupnih i unilokulusnih adipocita (UA). Kod (d, e) visoke doze insulina, javlja se i endotelska imunopozitivnost (E). Orig. uveličanje - 1000x. Bar – 20  $\mu$ m.



**Slika 36. Imunohistohemijska detekcija nitrotirozina u BAT (a) kontrolne i (b-e) grupa tretiranih insulinom. Tretman insulinom pojačava tkivnu ekspresiju nitrotirozina, prvenstveno u mrkim adipocitima, a kod unilokusnih adipocita (UA) se sreće i u nukleusima. U endotelskim ćelijama (E), prisutna je reakcija na luminalnoj membrani (strelica), a kod (c) hronične niske i (d) i akutne visoke hiperinsulinemije, i u samoj ćeliji (u citoplazmi i nukleusima). Orig. uveličanje - 1000x. Bar – 20  $\mu$ m.**

#### 4.5.7. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija enzima antioksidativne odbrane

##### *Izoforme SOD (CuZnSOD i MnSOD)*

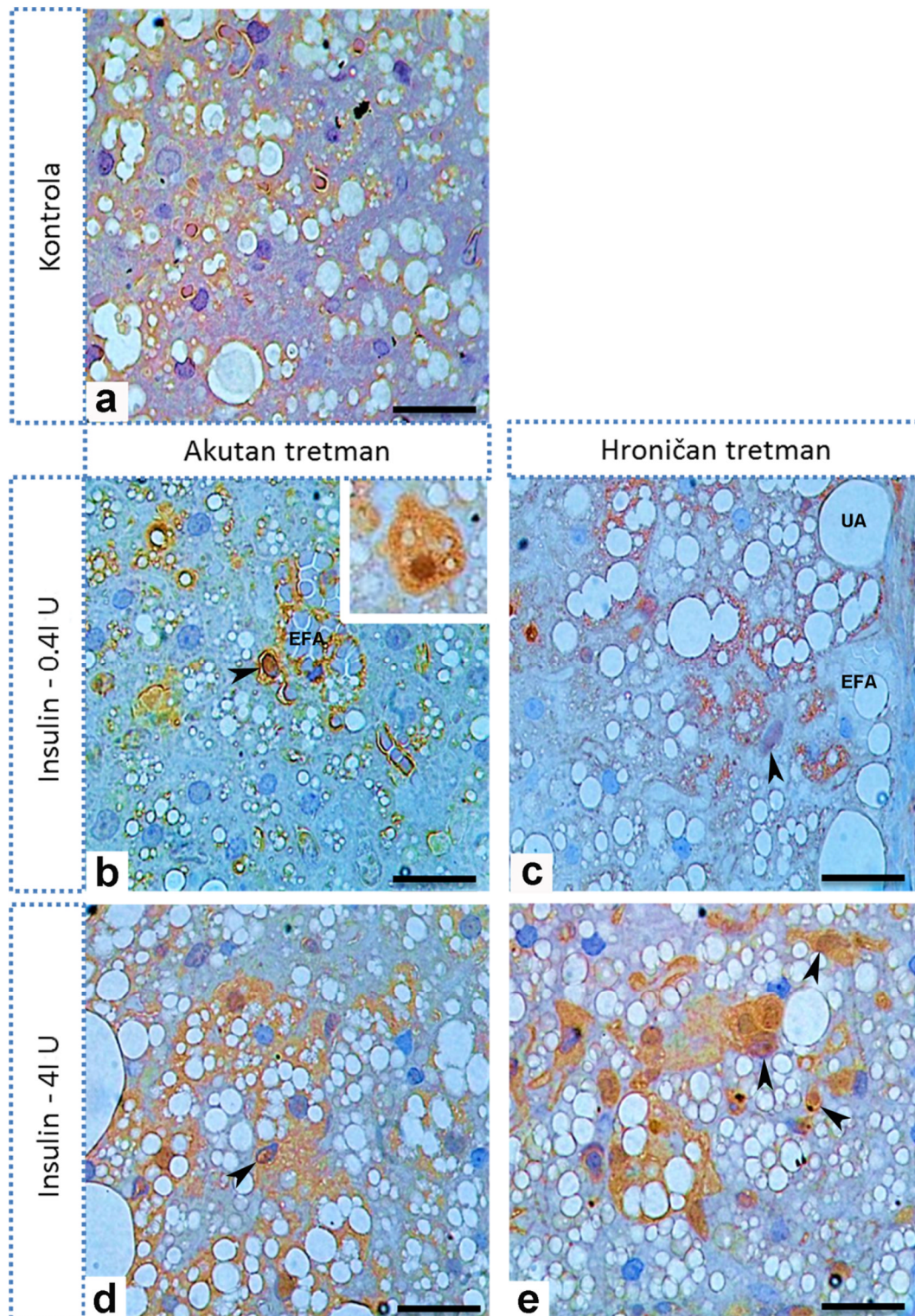
Obe izoforme SOD - i CuZnSOD (*Slika 37*) i MnSOD (*Slika 38*), se kod kontrolnih grupa eksprimiraju blago i homogeno među mrkim adipocitima, a reakcija je citoplazmatska. Kod grupa koje su tretirane visokim dozama insulina, kao i kod grupe hronično tretirane niskom dozom insulina, pojačava se ekspresija u mrkim adipocitima, kao i harlekinski efekat. Uočava se da su obe izoforme eksprimirane na mitohondrijama ovih ćelija. Najveće povećanje ekspresije u mrkim adipocitima pokazuje MnSOD i to kod grupe akutno tretirane visokom dozom insulina (*Slika 38d*). Kod grupa tretiranih insulinom uočava se jaka reakcija u unilokulusnim adipocitima, citoplazmatski ali i u nukleusima, što nije slučaj sa CuZnSOD čija se reaktivnost u unilokulusnim adipocitima ne razlikuje od reaktivnosti u ostalim mrkim adipocitima (*Slika 37*). Reakcija na obe SOD u EFA kod grupa tretiranih niskom dozom insulina se uočava na mitohondrijama i to neuniformno, na nekim mitohondrijama je jača, a na nekim slabija (*Slika 37b; 38b, c*).

Reakcija u endotelskim ćelijama se ne uočava kod kontrolnih grupa, ali se javlja kod grupa tretiranih insulinom, posebno u aktiviranim ćelijama sa uvećanim euhromatskim nukleusima, koje su najbrojnije kod grupa tretiranih hronično insulinom, kako niskom, a posebno visokom dozom. Obe SOD izoforme se kod endotelskih ćelija lokalizuju i u nukleusima.

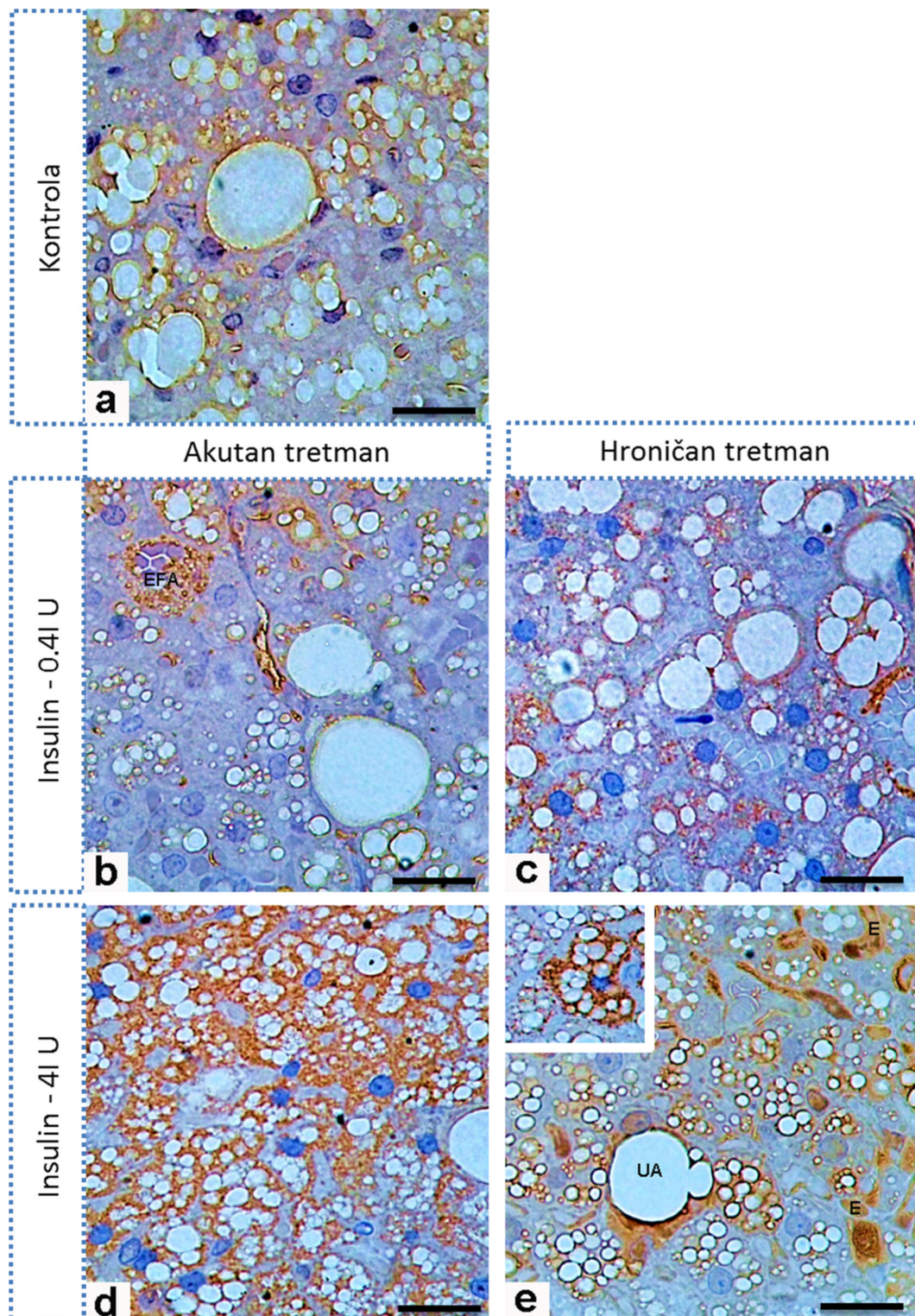
##### *Katalaza*

Imunohistohemijski, katalaza se detektuje u mrkim adipocitima svih eksperimentalnih grupa (*Slika 39*). Kod kontrolnih grupa, reakcija je blaga, homogeno distribuirana među ćelijama. Tretman insulinom (obe doze) dovodi do pojave harlekinskog efekta, tj. u pojedinim mrkim adipocitima javlja se jača citoplazmatska, ali i nukleusna imunopozitivnost. To se posebno odnosi na preadipocite, unilokulusne, EFA i mrke adipocite u apoptozi (*Slika 39c-insert*) kod svih insulinskih grupa. Citoplazmatska reakcija je tačkasta i odgovara peroksizomalnoj (*Slika 39e*).

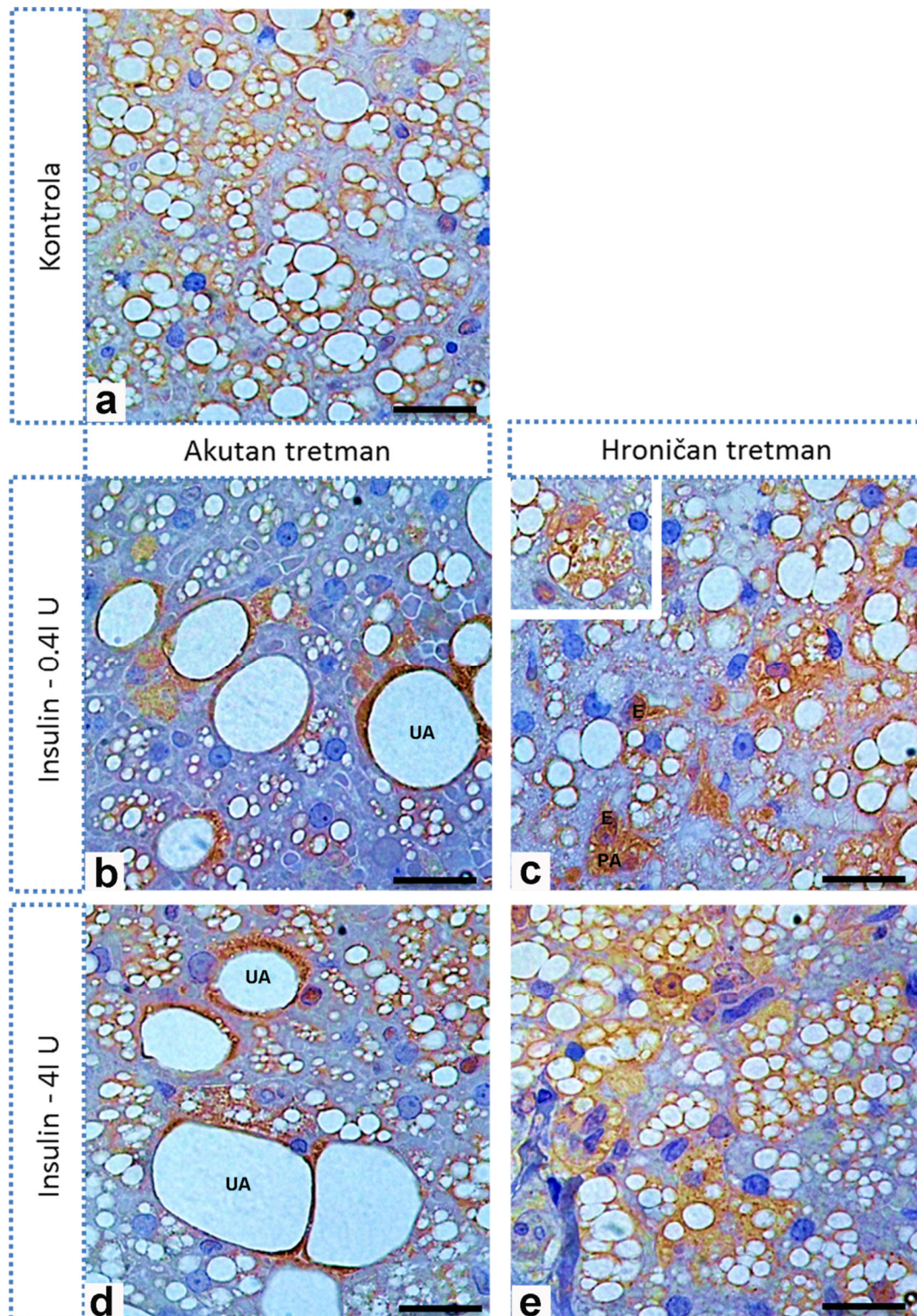
Kod svih grupa prisutna je imunopozitivnost u endotelskim ćelijama, čak i nukleusno. Najjača reakcija se sreće kod aktiviranih endotelskih ćelija koje su posebno brojne kod grupe hronično tretirane niskom dozom insulina (*Slika 39c*).



**Slika 37. Imunohistohemijaska detekcija CuZnSOD u BAT (a) kontrolne i (b-e) grupa tretiranih insulinom. Tretman insulinom pojačava adipocitnu ekspresiju CuZnSOD, kao i harlekinski efekat. (insert) - reakcija u mrkim adipocitima je citoplazmatska, oko mitohondrija, i u nukleusima. Reakcija se sreće i u (b) EFA, ali i u endotelskim ćelijama insulinom-tretiranih grupa, posebno aktiviranim, kod (e) hronične visoke hiperinsulinemije; (strelica) – imunopozitivni nukleusi endotelskih ćelija. Orig. uveličanje - 1000x. Bar – 20 μm.**



**Slika 38. Imunohistohemijska detekcija MnSOD u BAT** (a) kontrolne i (b-e) grupa tretiranih insulinom. Sve insulinom-tretirane grupe pokazuju jaku reakciju u EFA, i to na mitohondrijama. Mitohondrijska reakcija se uočava i u ostalim mrkim adipocitima (c, d, e-insert); a jaka reakcija je i u unilokulusnim adipocitima (UA) i endotelskim ćelijama (E), posebno kod (e) hronične visoke hiperinsulinemije. Najjača adipocitna ekspresija se uočava kod (d) akutnog tretmana visokom dozom insulina. Orig.uveličanje - 1000x. Bar - 20  $\mu$ m.



**Slika 39. Imunohistohemijaska detekcija katalaze u BAT** (a) kontrolne i (b-e) grupa tretiranih insulinom. Za razliku od (a) kontrolnih grupa gde je reakcija blaga i homogena među mrkim adipocitima, tretman insulinom pojačava harlekin efekat, tj. reakciju u pojedinim ćelijama, posebno u unilokusnim adipocitima (UA), adipocitima u program umiranja (c-insert), preadipocitima (PA) i endotelskim ćelijama (E). Reakcija je najjača kod (e) hronične hiperinsulinemije, gde se sreće u većem broju multilokusnih adipocita, u citoplazmi, peroksizomima, i u nukleusima. Orig. uveličanje - 1000x. Bar – 20  $\mu$ m.

## 4.6. INFLAMATORNI STATUS MRKOG MASNOG TKIVA

### 4.6.1. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija proinflamatornih citokina

#### *TNF- $\alpha$*

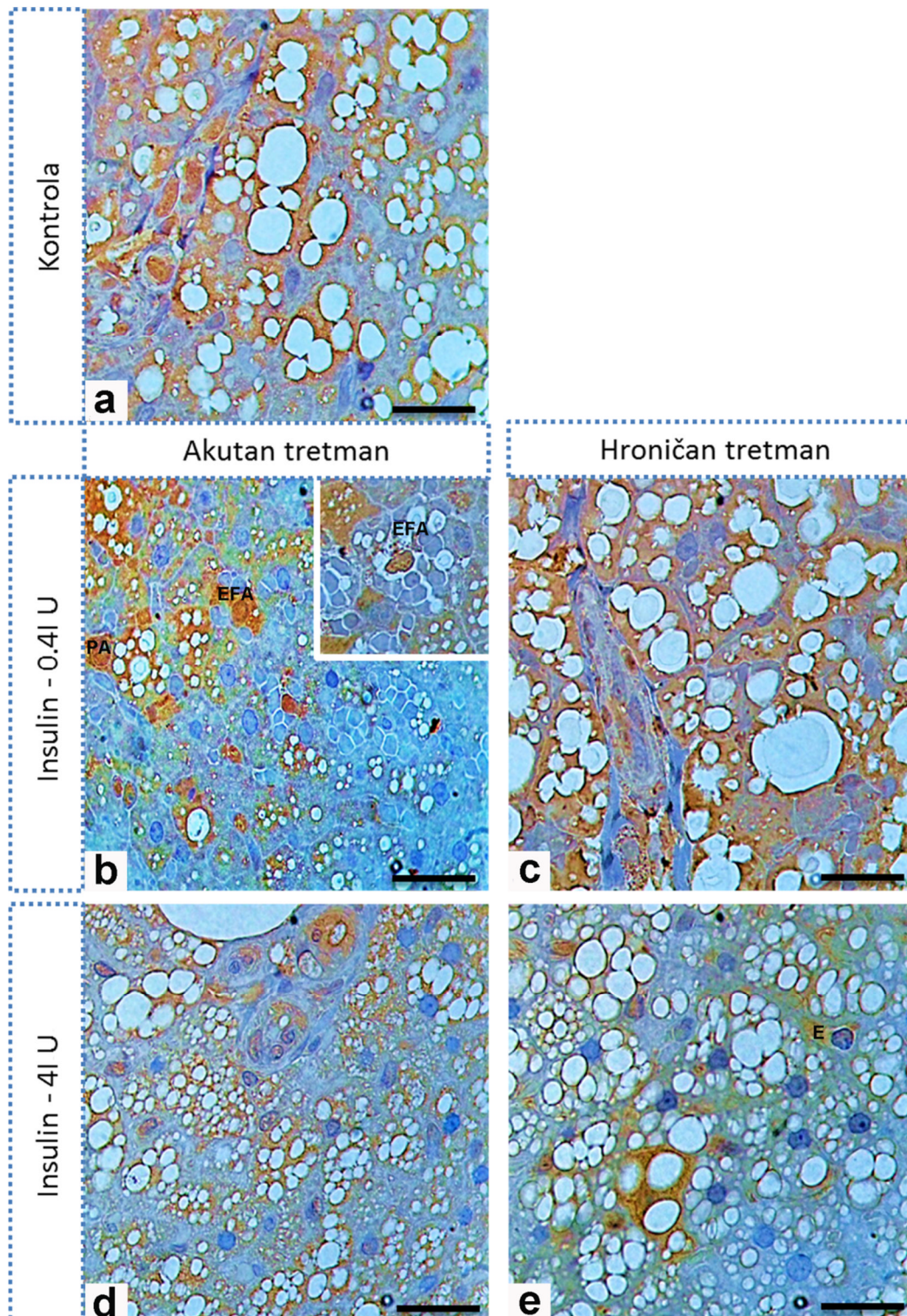
Imunoekspresija TNF- $\alpha$  je prisutna kod svih grupa, kako u mrkim adipocitima, tako i u endotelskim ćelijama (*Slika 40*). Među mrkim adipocitima prisutan je harlekin efekat, uz porast ekspresije kod grupa tretiranih insulinom i pojavu pojedinačnih ćelija koje su “preplavljene” ovim citokinom. Sporadično, vidljiva je i nukleusna lokalizacija TNF- $\alpha$ , posebno u krupnim euhromatskim nukleusima. Slično je i sa preadipocitima (*Slika 40b i 42a-insert*) ali i sa krupnim i unilokulusnim adipocitima u BAT insulinskih grupa, koji poseduju TNF- $\alpha$  kako u citoplazmi, tako i nukleusno. Reakcija u endotelskim ćelijama raste kod grupa tretiranih insulinom, a prisutna je u citoplazmi i nukleusima (*Slika 40b-e*).

U eritrofagocitnim regionima, TNF- $\alpha$  se jako eksprimira u citoplazmi EFA, kao i u okolnim preadipocitima (*Slika 42a*).

#### *Interleukin 6*

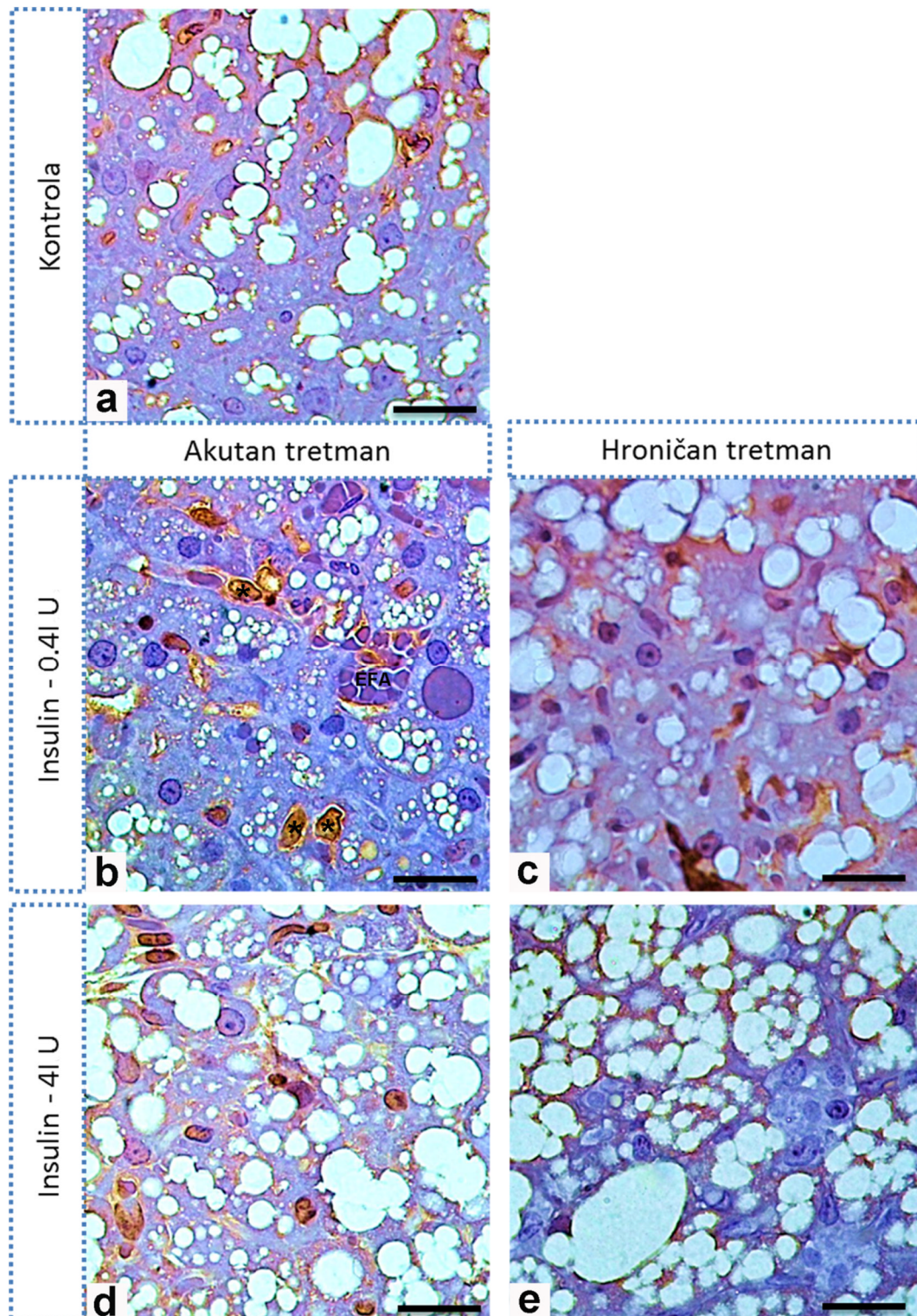
Imunohistohemijska detekcija IL-6 (*Slika 41*) otkrila je da se ovaj inflamatorni citokin eksprimira prvenstveno u endotelskim ćelijama BAT, kako kod kontrolnih, tako i kod insulinom tretiranih životinja, sa izuzetkom grupe tretirane hronično visokom dozom insulina, gde se u endotelskim ćelijama ne detektuje IL-6 (*Slika 40e*). U imunopozitivnim endotelskim ćelijama reakcija je lokalizovana na ćelijskoj membrani i u nukleusu. Takođe, primetna je jaka imunopozitivnost aktiviranih endotelskih ćelija sa krupnim, euhromatskim nukleusom u kome se takođe detektuje ovaj citokin. Aktivirane endotelske ćelije sa visokom ekspresijom IL-6 naročito su česte u regionu oko EFA (*Slika 41b*) što je posebno izraženo u BAT životinja tretiranih niskom dozom insulina, kod kojih je učestalost EFA najveća.

Sa druge strane, imunoreaktivnost mrkih adipocita je vrlo blaga, praktično zanemarljiva kod svih grupa, sem kod grupe tretirane hronično visokom dozom insulina, kod koje je ekspresija IL-6 nešto jača i citoplazmatski lokalizovana (*Slika 41e*). Izuzetak su EFA koje imaju veću citoplazmatsku ekspresiju IL-6 (*Slika 42b*), kao i preadipociti koji ponekad, a naročito u blizini žarišta eritrofagocitoze, mogu biti imunopozitivni na IL-6, kada je primetna i nukleusna lokalizacija ovog citokina (*Slika 42b*).

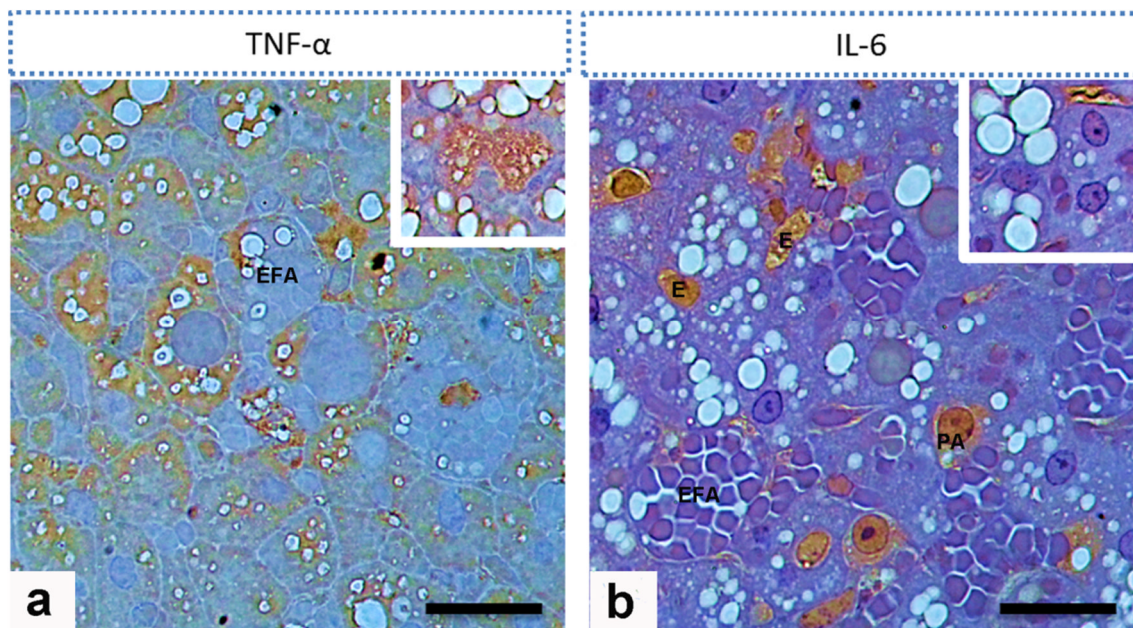


*Slika 40. Imunohistohemijaska detekcija TNF- $\alpha$  u BAT (a) kontrolne i (b-e) grupa tretiranih insulinom. Reakcija je prisutna u adipocitima svih grupa, ali tretman insulinom dovodi do pojave (e) pojedinačnih ćelija sa vrlo jakom ekspresijom TNF- $\alpha$ . Tretman insulinom pojačava i reakciju u endotelskim ćelijama (E), a reakcija je jaka i u preadipocitima (PA) i EFA. Orig. uveličanje - 1000x. Bar – 20  $\mu$ m.*





**Slika 41. Imunohistohemijaska detekcija IL-6 u BAT** (a) kontrolne i (b-e) grupa tretiranih insulinom. Uočava se endotelska reakcija u svim grupama sem kod (e) hronično tretirane visokom dozom insulina. Reakcija je naročito jaka u aktiviranim endotelskim ćelijama (\*) oko EFA koje takođe pokazuju imunopozitivnost na IL-6. Orig. uveličanje - 1000x. Bar – 20  $\mu$ m.



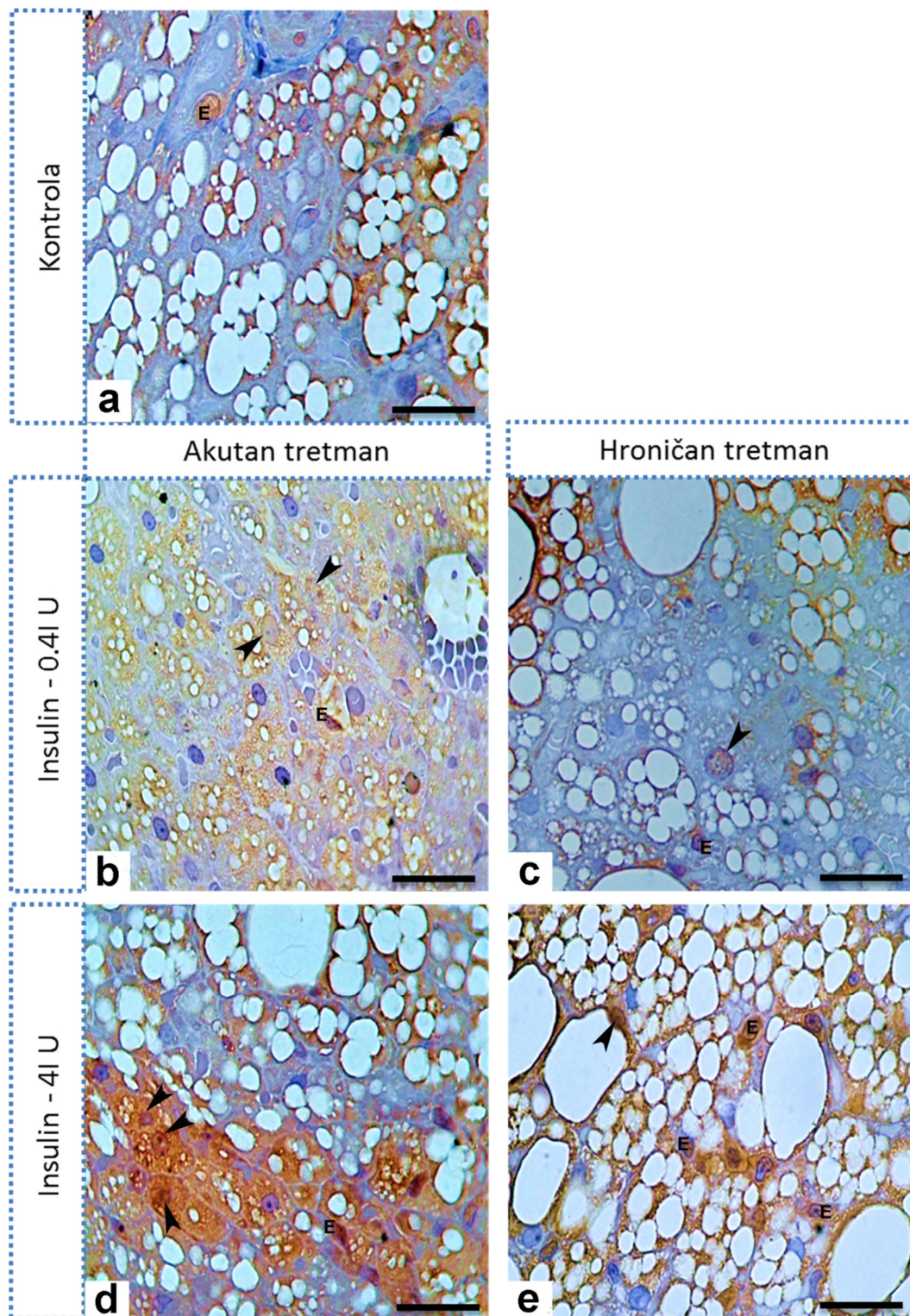
**Slika 42. Imunohistohemijska lokalizacija (a) TNF- $\alpha$  i (b) IL-6 u regionima eritrofagocitoze; akutan tretman niskom dozom, sem (insert-a) – hroničan tretman visokom dozom insulina. (a) TNF- $\alpha$  se jače eksprimira u EFA, u poređenju sa (b) IL-6, koji se jače eksprimira u okolnim, aktiviranim endotelskim ćelijama (E). I (insert-a) TNF- $\alpha$  i (b) IL-6 se međutim, jako ekspimiraju u okolnim preadipocitima (PA), što, kada je IL-6 u pitanju, nije slučaj sa (b-insert) preadipocitima udaljenim od regiona eritrofagocitoze. Orig. uveličanje - 1000x. Bar – 20  $\mu$ m.**

#### 4.6.2. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija NF- $\kappa$ B

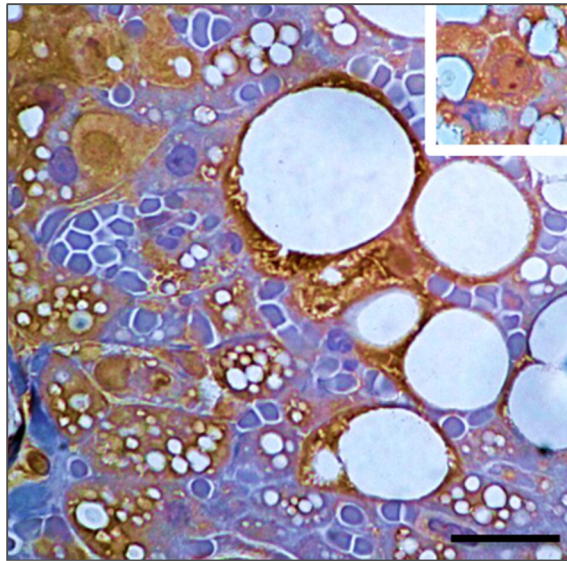
Imunohistohemijski, NF- $\kappa$ B p65 se detektuje u mrkim adipocitima svih grupa, uz blaži ili jači harlekinski efekat (**Slika 43**), koji je naročito izražen kod grupe tretirane akutno visokom dozom insulina gde se sreću grupe mrkih adipocita izražene imunopozitivnosti, kako citoplazmatski, tako i nukleusno. Nukleusna lokalizacija se uočava kod svih tretmana insulinom (**Slika 43b-e**), sporadično u multilokusnim adipocitima, a mnogo više u unilokusnim adipocitima, koji pokazuju i mnogo veću citoplazmatsku imunoekspresiju NF $\kappa$ B.

Takođe, imunopozitivnost je prisutna i u regionima eritrofagocitoze (**Slika 44**), u EFA i preadipocitima BAT svih insulinom-tretiranih grupa. Preadipociti sa euhromatskim, krupnim nukleusima (**Slika 44-insert**) pokazuju jaku nukleusnu imunopozitivnost na ovaj transkripcioni faktor.

Endotelne ćelije svih grupa, uključujući i kontrolne, pokazuju jaku imunopozitivnost na NF- $\kappa$ B, citoplazmatski, ali i nukleusno. To je posebno slučaj kod aktiviranih endotelskih ćelija, čija je brojnost povećana kod grupa hronično tretiranih insulinom, posebno kod hronično visoke hiperinsulinemije (**Slika 43e**).



**Slika 43. Imunohistohemijska detekcija NF- $\kappa$ B u BAT** (a) kontrolne i (b-e) grupa tretiranih insulinom. Tretman insulinom pojačava imunoekspresiju u adipocitima i endotelskim ćelijama (E), naročito kod (d) akutnog tretmana visokom dozom. Takođe se pri hiperinsulinemiji povećava učestalost nukleusne translokacije u mrkim adipocitima (strelice). Orig. uveličanje - 1000x. Bar – 20  $\mu$ m.

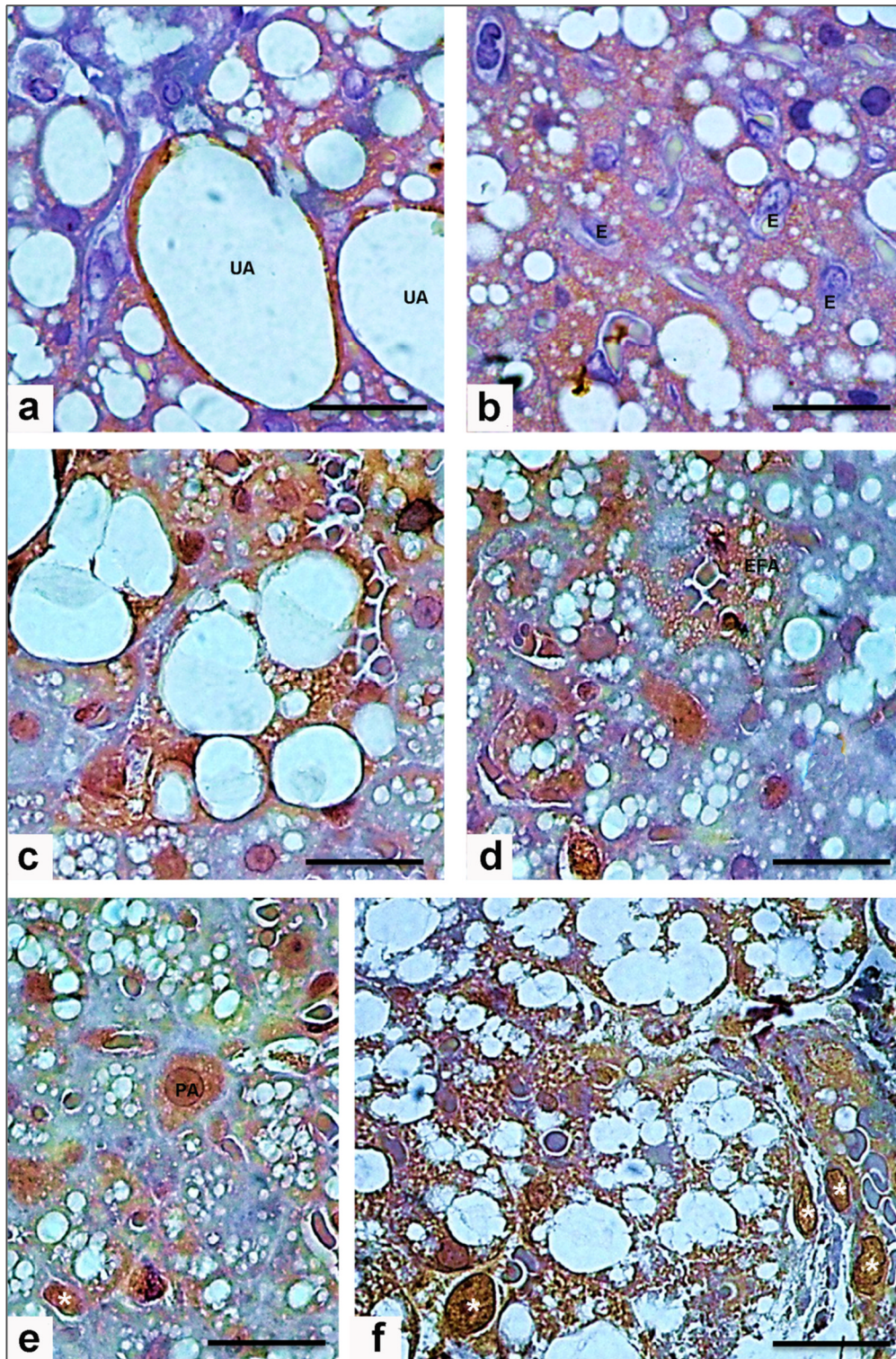


**Slika 44. Imunohistohemijska lokalizacija NF-kB u eritrofagocitnom regionu i (insert) preadipocitima u BAT - akutan tretman niskom dozom insulina, (insert) - akutan tretman visokom dozom insulina. Orig. uvećanje - 1000x. Bar – 20 µm.**

#### 4.6.3. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija MIP3-β

MIP3-β (CCL-19) citokin se sreće u BAT svih eksperimentalnih grupa (**Slika 45**), ali se kod kontrolnih grupa sreće uglavnom u mrkim adipocitima, i to naročito u unilokulusnim (**Slika 45a**) gde je prisutan citoplazmatski. Kod insulinom-tretiranih grupa, sreće se takođe u mrkim adipocitima, kako multilokulusnim, tako i unilokulusnim, ali se kod njih uočava i nukleusno. Takođe, uočljiva je lokalizacija ovog citokina i u nukleusima i mitohondrijama preadipocita (**Slika 45e**). Kod grupa tretiranih niskom dozom insulina, uočljiva je i jaka imunopozitivnost mrkih adipocita u regionu ekstravazacije eritrocita (**Slika 45c**) i u EFA (**Slika 45d**).

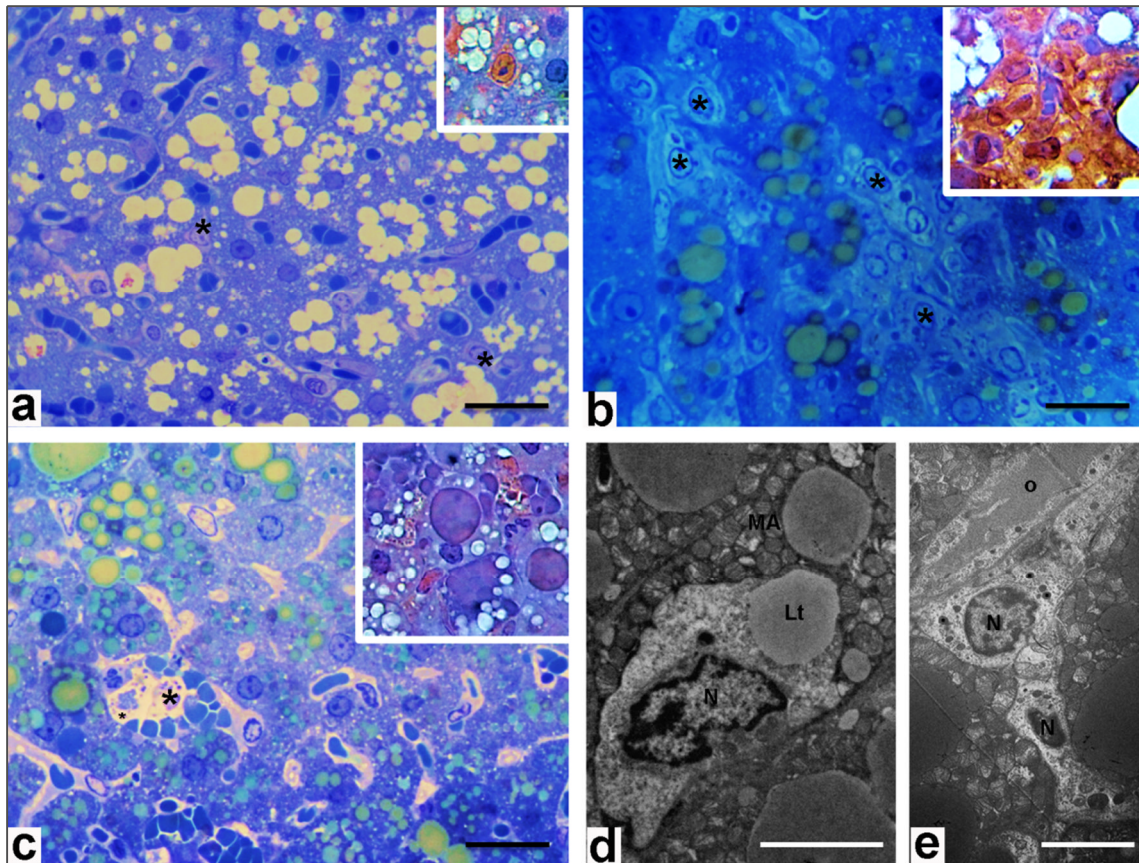
Reakcija na MIP3-β je jaka u endotelskim ćelijama svih grupa sem kontrolnih (**Slika 45**). Naročito jaka reakcija je u aktiviranim endotelskim ćelijama koje su najbrojnije kod grupe tretirane akutno visokom dozom insulina (**Slika 45f**).



**Slika 45. Imunohistohemijska lokalizacija MIP3- $\beta$  u BAT (a, b) kontrolnih životinja; akutna kontrola i (b-f) životinja tretiranih insulinom ((c-e) – akutan tretman niskom; i (f) – akutan tretman visokom dozom). Kod kontrolnih životinja, uočava se (a) jaka ekspresija u unilokusnim adipocitima (UA) i (b) blaga u multilokusnim, dok su (b) endotelne ćelije (E) negativne na MIP3- $\beta$ . Kod insulinom-tretiranih životinja uočava se (c) jaka reakcija u mrkim adipocitima u regionu ekstravazacije eritrocita, (d) EFA, (e) preadipocitima (PA) i (f) aktiviranom endotelu (\*). Orig. uvećanje - 1000x. Bar - 20  $\mu$ m.**

#### 4.6.4. Imunohistohemijska detekcija i morfološka analiza makrofaga

U BAT svih grupa sreću se pojedinačne, CD11<sup>+</sup> (CD – *cluster of differentiation*, engl.) makrofage, ovalnog ili poliugaonog oblika bez krupnih granula, po izgledu sličniji rezidentnom nego proinflamatornom fenotipu (*Slika 46a*). Mestimično, bez obzira na tretman, čak i kod kontrolnih životinja, sreću se regioni infiltracije makrofaga (*Slika 46b*) oko kapilara, sa aktiviranim fenotipom (poseduju veću količinu sekundarnih lizozoma). Takođe, aktivirane makrofage se nagomilavaju u regionima eritrofagocitoze (*Slika 46c*) gde vrše fagocitozu eritrocita (*Slika 31*). Takođe, makrofage uklanjaju i adipocite u procesu ćelijske smrti (*Slika 29f*), i njihove delove, kao što su krupna lipidna tela (*Slika 46d*).



**Slika 46. Makrofage (\*) u BAT kontrolnih i insulinom-tretiranih životinja (a) se uglavnom nalaze sporadično u tkivu (akutan tretman visokom dozom insulina) i (a-insert) pozitivne su na CD11 marker; (akutan tretman niskom dozom insulina). (b) Mestimično se, i kod kontrolnih grupa sreću infiltracije aktiviranih makrofaga (\*) (hronična kontrola); (b-insert) aktivirane makrofage u regionu infiltracije su takođe CD11<sup>+</sup> (hroničan tretman visokom dozom insulina). (c) Aktivirane (\*), (insert-c) CD11<sup>+</sup> makrofage se sreću i u regionima eritrofagocitoze (akutan tretman niskom dozom insulina). Ultrastrukturalno, uočava se (d) fagocitoza lipidna tela (Lt) mrkih adipocita od strane makrofaga (hroničan tretman niskom dozom insulina); kao i (e) perikapilarna lokalizacija aktiviranih makrofaga sa krupnijim, sekundarnim lizomima; (N) – nukleus makrofaga, (o) – lumen kapilara (akutna kontrola). Orig. uveličanje: (a, b, c) SM, bojenje toluidin plavim - 1000x; (d) TEM -3400x (e) TEM - 2650x. Bar: (a, b, c) - 20  $\mu$ m; (d) - 5  $\mu$ m; (e) - 10  $\mu$ m.**

## 4.7. SIGNALNI PUTEVI INSULINA U MRKOM MASNOM TKIVU

### 4.7.1. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija insulina

Imunohistohemijski, insulin se detektuje u BAT svih eksperimentalnih grupa (*Slika 47*). Kod kontrolnih grupa (*Slika 47a*) ekspresija insulina je jaka, kako u mrkim adipocitima, tako i u endotelskim ćelijama. Što se mrkih adipocita tiče, reakcija je uglavnom citoplazmatska, uz izražen harlekinski efekat među ćelijama, pri čemu se najjača imunoreaktivnost detektuje u unilokulusnim adipocitima, EFA i preadipocitima. Kod ovih se ćelija reaktivnost na insulin detektuje i u nukleusima, naročito kod preadipocita kod kojih su nukleusi euhromatski i većih dimenzija u odnosu na nukleuse zrelih adipocita. Reaktivnost je ipak jača u endotelskim ćelijama kod kojih se često sreću i imunopozitivni nukleusi, naročito kod aktiviranih endotelskih ćelija sa uvećanim nukleusima i prosvetljenom, uvećanom citoplazmom.

Kod grupa koje su tretirane niskom dozom insulina (*Slika 47b, c*), tkivna reaktivnost na insulin je takođe jaka. Slično kontrolnim grupama, i kod ovih grupa se sreće harlekin efekat među mrkim adipocitima, a najjača reaktivnost je opet u unilokulusnim i u eritrofagocitnim adipocitima i preadipocitima, kojih kod ovih grupa ima više nego kod kontrolnih, pa je reaktivnost nešto jača. Kod hroničnog tretmana, povećava se udeo multilokulusnih adipocita čija je citoplazma preplavljena insulinom, a često se uočava i nukleusno. Endotelske ćelije su kod ovih grupa mahom sve imunopozitivne, sa pozitivnim nukleusima, a uočava se veći broj ovih ćelija sa aktiviranim i angiogenim fenotipom koje imaju vrlo izraženu imunopozitivnost nukleusa.

Insulinska imunopozitivnost BAT kod grupa tretiranih visokom dozom insulina (*Slika 47d, e*) je najjača i većina mrkih adipocita poseduje vrlo jaku citoplazmatsku imunopozitivnost, uz povećanje udela imunopozitivnih nukleusa kod ovih ćelija. Što se preadipocita tiče, ovde se (naročito kod hronično tretirane grupe) mogu uočiti čitava polja imunopozitivnih ćelija sa pozitivnim nukleusima. Endotelske ćelije su kao i kod ostalih grupa uglavnom sve imunopozitivne sa pozitivnim nukleusima, a uvećan je broj pozitivnih aktiviranih i angiogenih ćelija.

### 4.7.2. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija IR-P

Generalno, kao i u slučaju insulina, reakcija na IR-P je kod svih grupa najjača u endotelskim ćelijama, koje su mahom sve imunopozitivne (*Slika 48*). Reakcija u



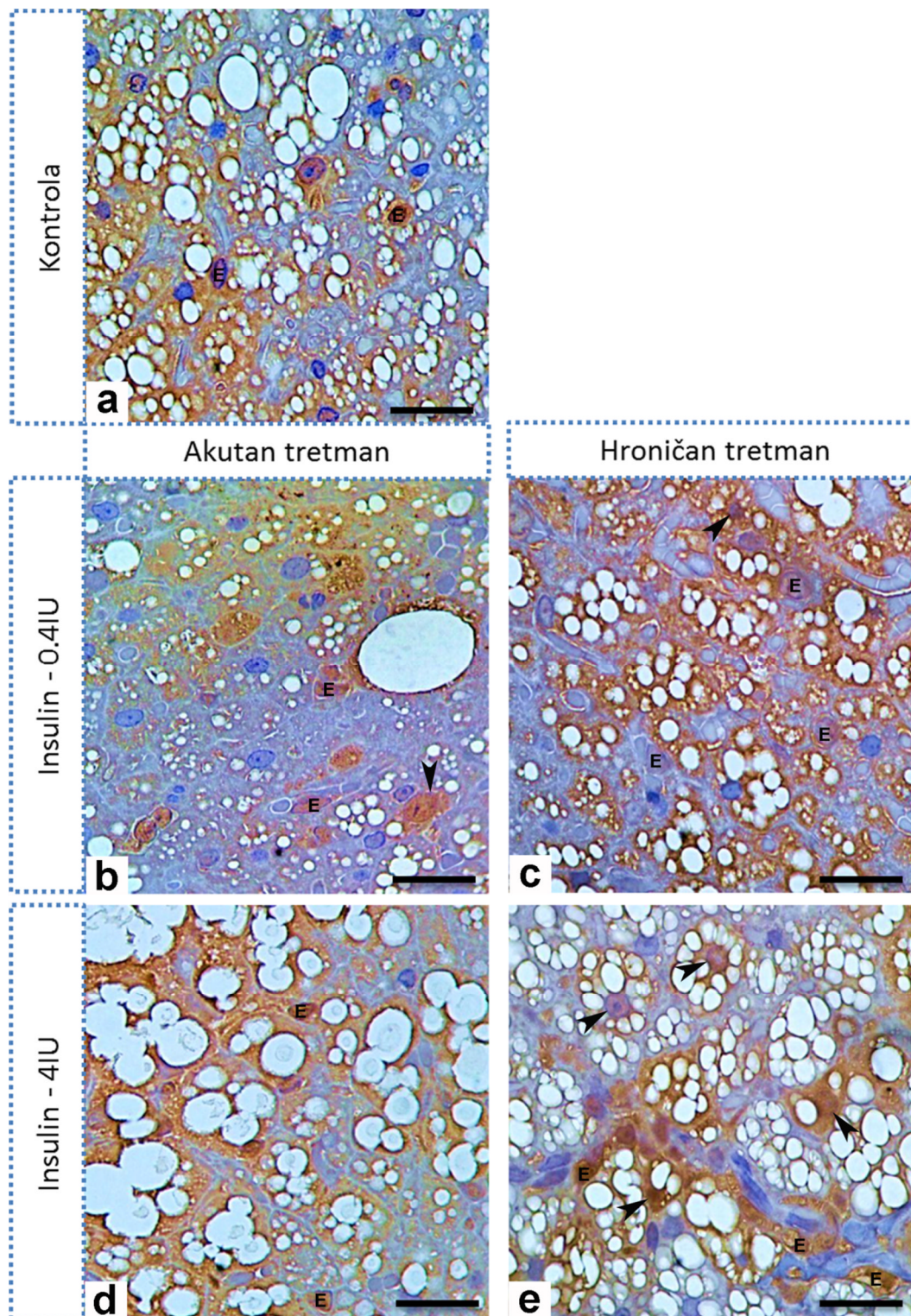
endotelskim ćelijama kod kojih se sreće citoplazmatski, nukleusno ali i na luminalnoj membrani.

Što se mrkih adipocita tiče, situacija je drugačija. Najblaža reakcija je kod kontrolnih i grupe koja je akutno tretirana niskom dozom insulina, gde su multilokulusne ćelije uglavnom negativne na IR-P, a imunopozitivnost se sreće većinom samo kod unilokulusnih i preadipocita, koje se nalaze sporadično u tkivu. Kod grupa tretiranih niskom dozom insulina povećan je udeo EFA koje su takođe imunopozitivne na IR-P. Reakcija u ovim ćelijama je citoplazmatska i nukleusna. Slična situacija je i kod životinja koje su tretirane hronično niskom, i akutno visokom dozom insulina, gde je opet najjača reakcija u endotelskim ćelijama, unilokulusnim i preadipocitima, a kod multilokulusnih adipocita je blaga.

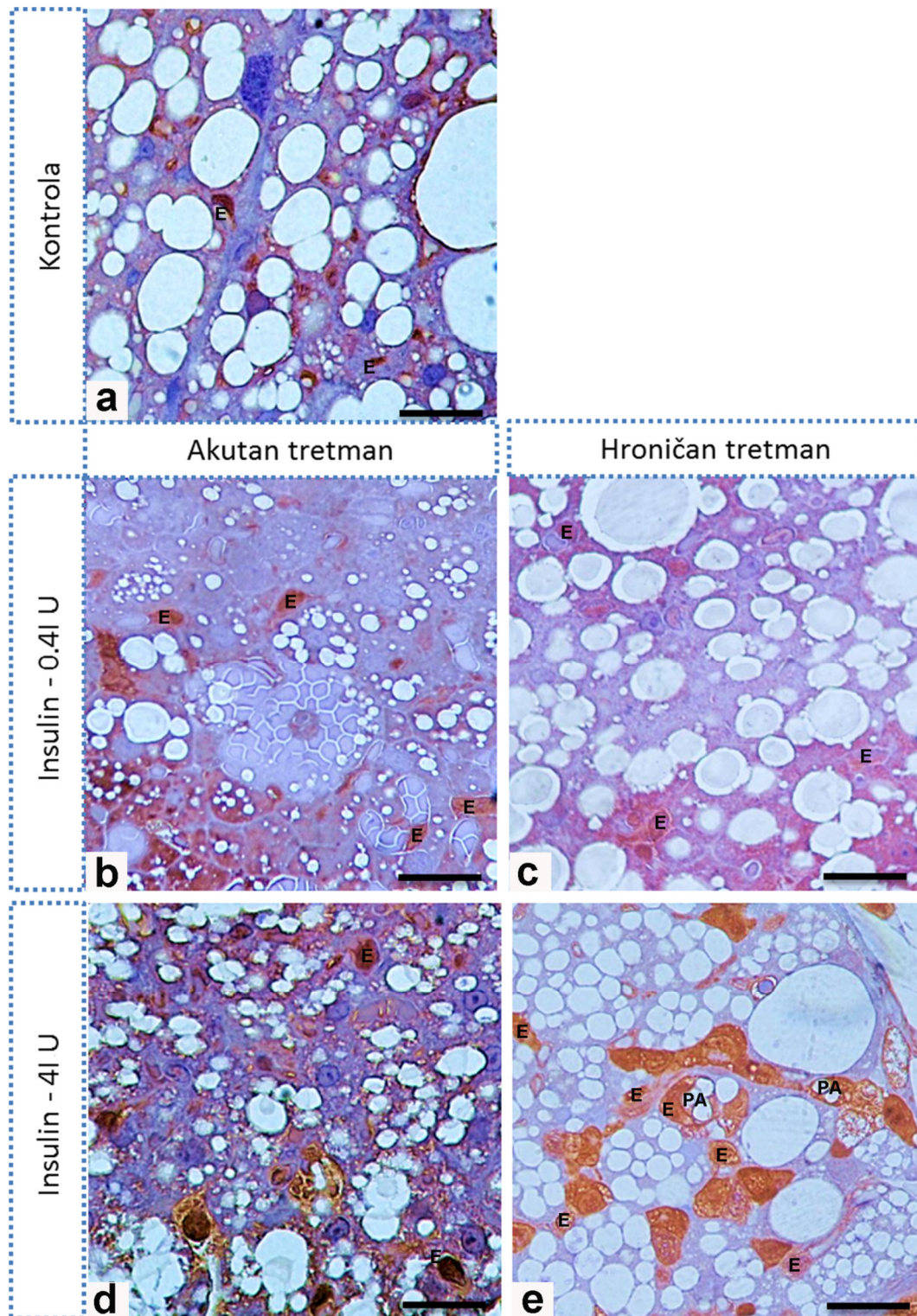
Kod grupe koja je hronično tretirana visokom dozom insulina (*Slika 48e*), uočavaju se brojni regioni adipo- i angiogeneze, naime veliki broj aktiviranih i angiogenih endotelskih ćelija, kao i preadipocita u grupama u perivaskularnim oblastima i uz vezivne septe, ima vrlo visoku imunoekspresiju IR-P u citoplazmi i nukleusima. Često se može uočiti da ovi regioni proliferacije okružuju unilokulusne i EFA koji su takođe IR-P-pozitivni. Adipogena ćelija u deobi ima takođe jaku citoplazmatsku ekspresiju ovog fosforilisanog receptora.

#### 4.7.3. Imunohistohemijska detekcija i lokalizacija IRS-1

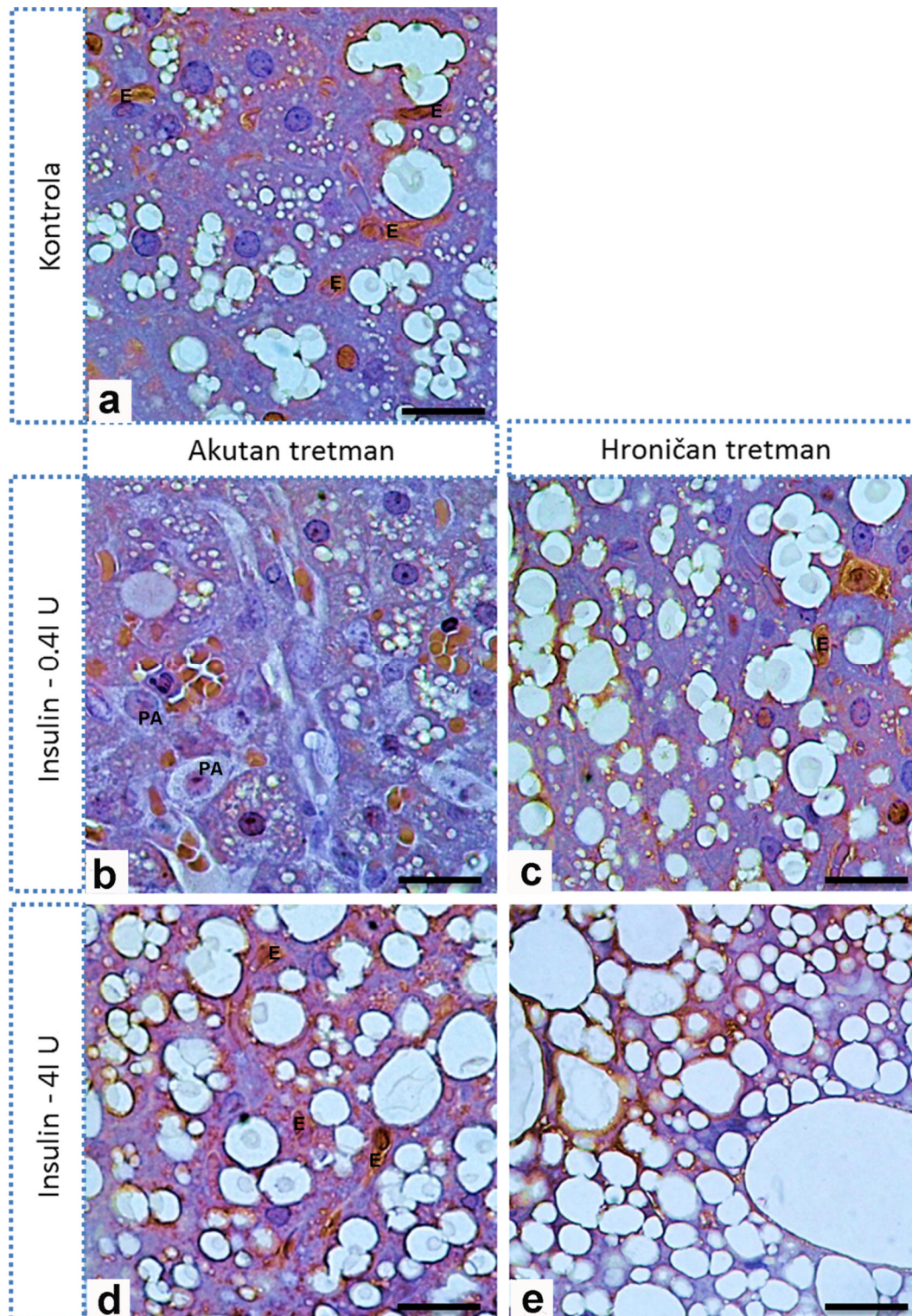
IRS-1 protein se imunohistohemijski najintenzivnije eksprimira u endotelskim ćelijama kod svih eksperimentalnih grupa (*Slika 49*). Endotelske ćelije eksprimiraju IRS-1 u citoplazmi i nukleusno. Reakcija u mrkim adipocitima je uglavnom blaga, a sporadično se sreću ćelije veće citoplazmatske imunopozitivnosti i ćelije sa imunopozitivnim nukleusima. Nešto jača adipocitna reakcija je kod grupe koja je hronično tretirana visokom dozom insulina (*Slika 49e*). Kod preadipocita se ne detektuje imunopozitivnost na IRS-1 (*Slika 49b*).



**Slika 47. Imunohistohemijska detekcija insulina u BAT** (a) kontrolne i (b-e) grupa tretiranih insulinom. Imunoekspresija insulina u mrkim adipocitima i endotelskim ćelijama je jaka kod svih grupa. Većina endotelskih ćelija (E) svih grupa poseduje insulin i u citoplazmi i u nukleusima. Nukleusna translokacija insulina kod mrkih adipocita (strelice) raste pri (b, e) hroničnim tretmanima i (d, e) tretmanima visokom dozom insulina. Orig. uveličanje - 1000x. Bar – 20  $\mu$ m.



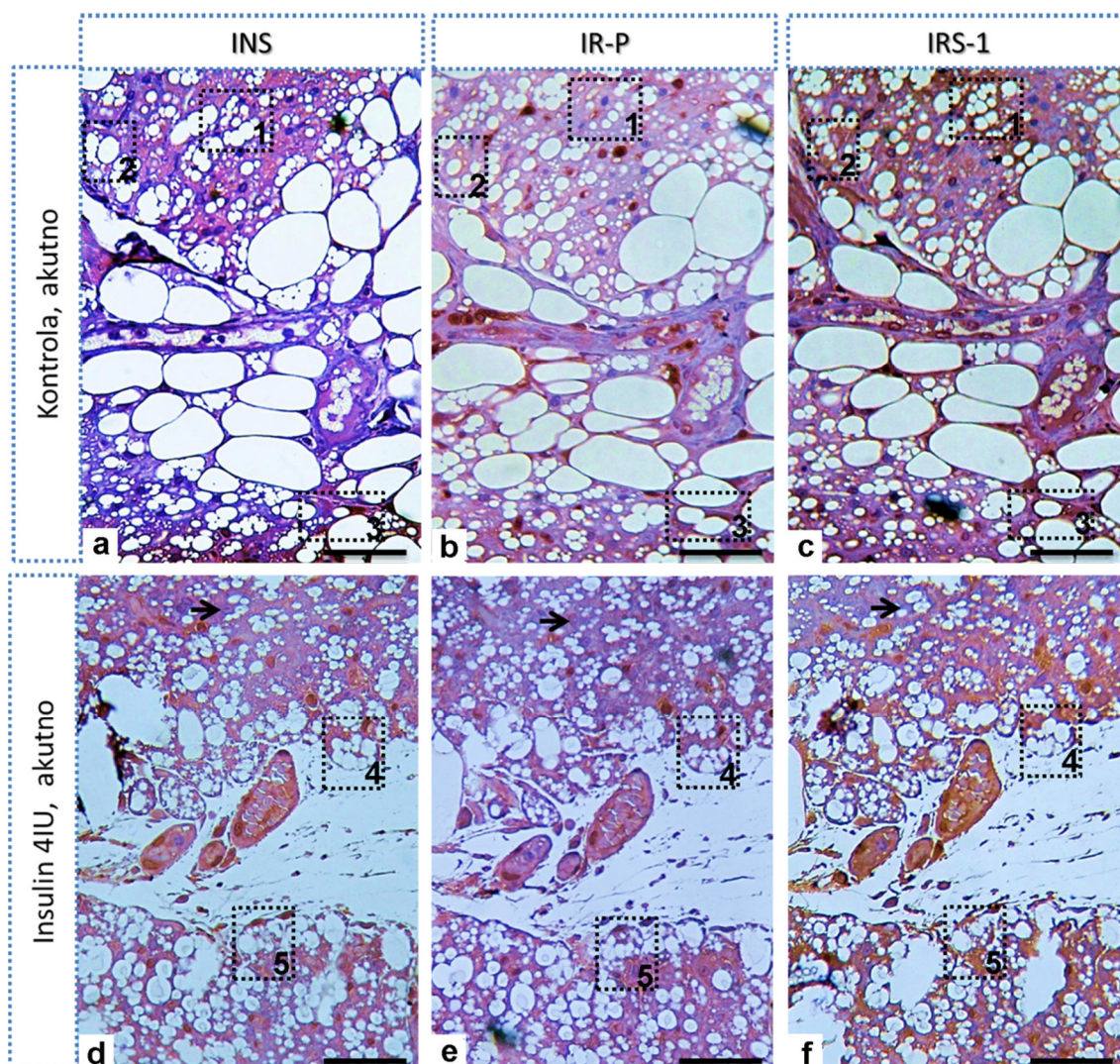
**Slika 48. Imunohistohemijska detekcija IR-P u BAT (a) kontrolne i (b-e) grupa tretiranih insulinom. Reakcija je najjača u endotelskim ćelijama (E) svih grupa. Reakcija u mrkim adipocitima raste sa tretmanom insulinom. (e) kod hronično visoke hiperinsulinemije uočava se jaka imunopozitivnost proliferišućih ćelija adipocitne linije, uključujući preadipocite (PA) i aktivirane endotelske ćelije (E). Orig. uvećanje - 1000x. Bar - 20  $\mu$ m.**



**Slika 49. Imunohistohemijaska detekcija IRS-1 u BAT (a) kontrolne i (b-e) grupa tretiranih insulinom. Najjača reakcija je u endotelskim ćelijama (E) svih grupa, dok je reaktivnost mrkih adipocita uglavnom blaga, i blago se pojačava tek kod (e) hroničnog tretmana visokom dozom. U preadipocitima (PA) nije zapažena ekspresija IRS-1. Orig. uveličanje - 1000x. Bar - 20  $\mu$ m.**

#### 4.7.4. Uporedna histološka i citološka analiza lokalizacije insulina, IR-P i IRS-1

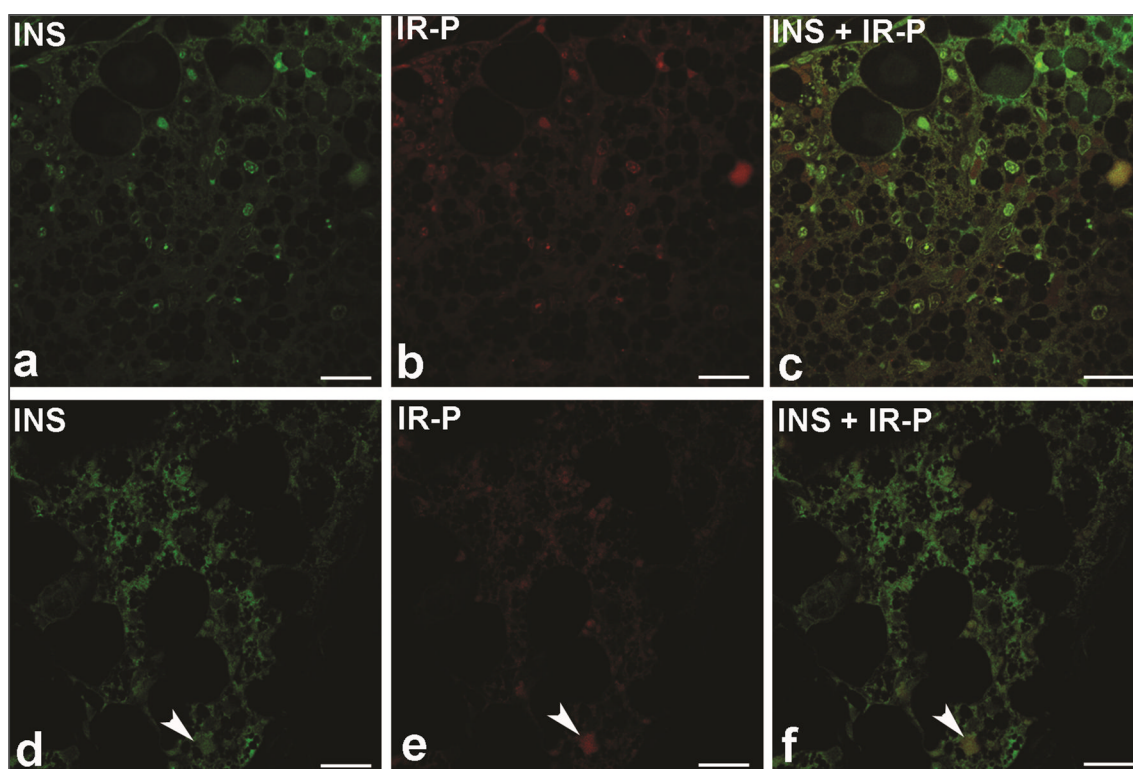
Tzv. imunohistohemijska „mirror“ tehnika (engl. *mirror* - ogledalo), kojom se porede lokalizacije različitih proteina na serijskim presecima, omogućila nam je bolji uvid u kolokalizaciju insulina, fosforilisane forme insulinskog receptora i IRS-1. Endotelne ćelije su uglavnom imunopozitivne na sva tri proteina, što je naročito uočljivo kod tretmana insulinom (*Slika 50d-f*).



*Slika 50. Uporedna imunohistohemijska analiza lokalizacije insulina (INS), IR-P i IRS-1 "mirror" tehnikom na serijskim presecima BAT (a-c) akutne kontrolne i (d-f) grupe tretirane akutno visokom dozom insulina. Endotelne ćelije su imunopozitivne na sva tri proteina, dok se kolokalizacija u mrkim adipocitima pojačava pri tretmanu insulinom. (strelica) - nukleus mrkog adipocita pozitivan na INS, IR-P i IRS-1. Orig. uveličanje - 400x. Bar - 50  $\mu$ m.*

Što se mrkih adipocita tiče, uočava se da izražen harlekinski efekat među određenim ćelijama za IRS-1 ne podrazumeva harlekinski efekat i za insulin i IR-P (*Slika 50a-c, ram 1*). Međutim, i kod kontrolnih, a posebno kod grupa tretiranih insulinom su česti mrki adipociti sa citoplazmatskom i nukleusnom imunoekspresijom sva tri komparirana proteina (*Slika 50d-f, ram 2, 4 i 5*).

Imunofluorescentna kolokalizacija insulina i IR-P (*Slika 51*) potvrdila je da se oba proteina mogu naći u istim nukleusima, prvenstveno endotelskih ćelija, ali i kod mrkih adipocita.



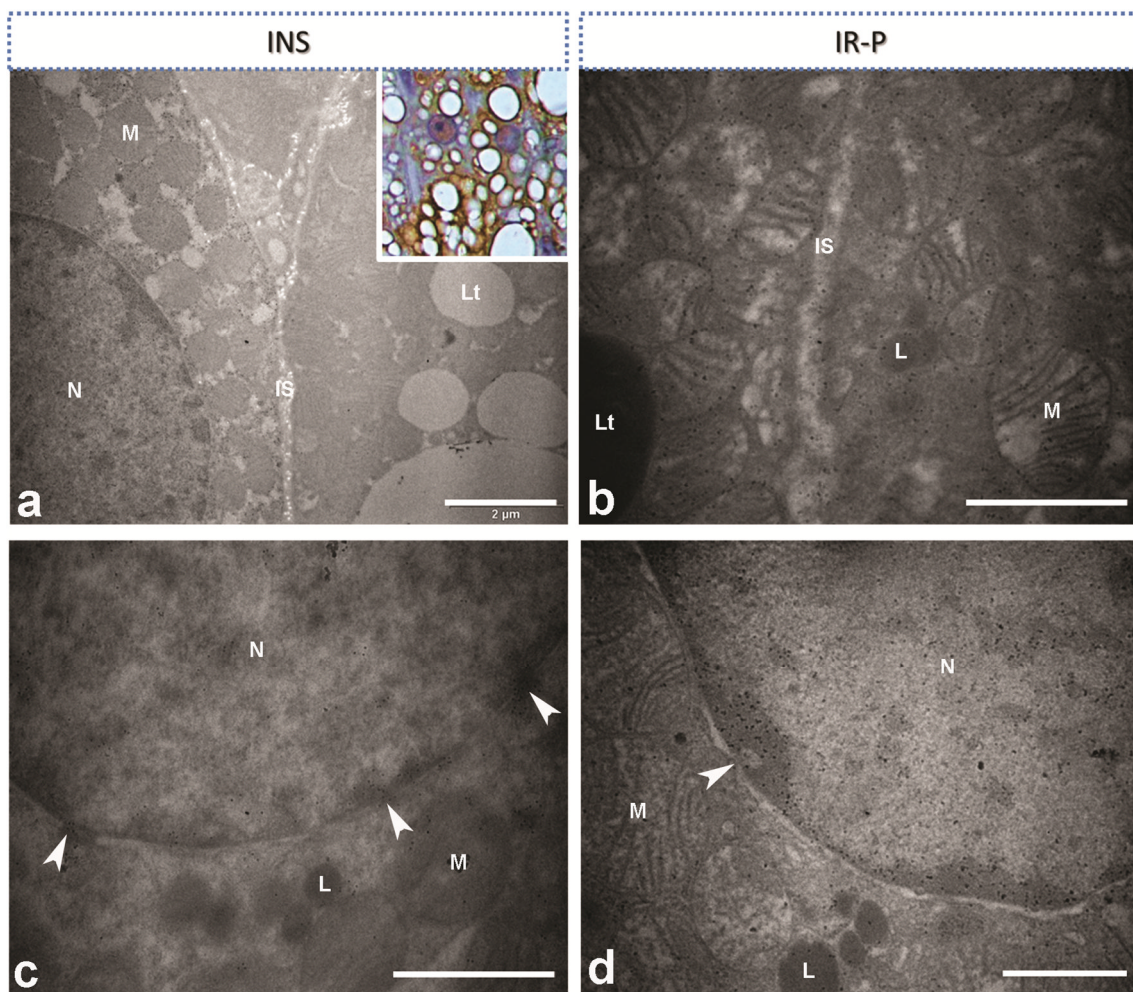
*Slika 51. Imunofluorescentna detekcija insulina i IR-P i njihova kolokalizacija u BAT; (a – c) uočava se veliki broj nukleusa u kojima se detektuju oba proteina; hroničan tretman visokom dozom insulina; (d – f) akutan tretman visokom dozom insulin, (strelica) kolokalizacija u nukleusu mrkog adipocita. Orig. uveličanje - 630x. Bar - 20  $\mu$ m.*

### *Insulin i IR-P u multilokusnim adipocitima*

Insulin se sreće u multilokusnim mrkim adipocitima svih grupa (*Slika 52a, c*). Imunoreaktivnost se razlikuje među ćelijama, tj. prisutan je harlekin efekat (*Slika 52a*). Insulin se lokalizuje u citoplazmi, ali i u citoplazmatskim organelama, mitohondrijama, lizozomima i lipofuscinskim granulama. Međutim, najveća količina insulina se nalazi

„slobodno“ u citoplazmi, tj. van membranom-odvojenih kompartmenata. Pored citoplazme, veoma velika količina ovog hormona je locirana u nukleusu, gde se prvenstveno uočava kako u nivou nukleusnih pora, tako i u heterohromatinu.

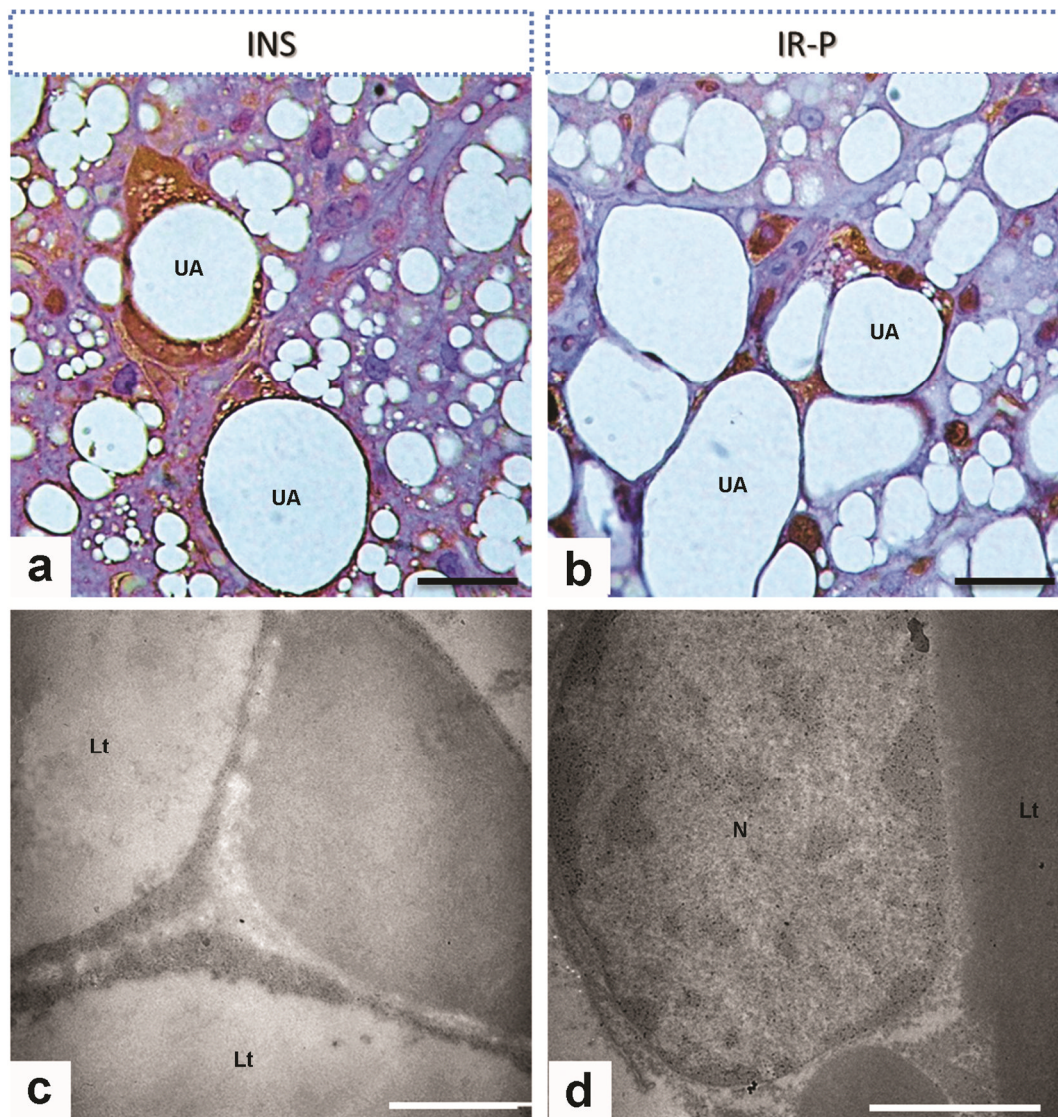
IR-P (*Slika 52b, d*) se detektuje u nivou ćelijske membrane multilokulusnih adipocita, ali se takođe detektuje citoplazmatski, i to kako u citoplazmi, tako i u organelama, gde prednjače mitohondrije kod kojih se detektuje na membrani, ali i na nivou kristi. Takođe, prisutan je u lizozomskom kompartmentu. Što se nukleusa tiče, lokalizacija je slična insulinskoj – u nivou nukleusnih pora i u heterohromatinu (prvenstveno uz nukleusni ovoj).



**Slika 52. Insulin (INS) i IR-P u multilokulusnim adipocitima.** (a) akutna kontrola; (a-insert) hroničan tretman visokom dozom insulina; (b) akutan tretman niskom dozom insulina; (c) hroničan tretman niskom dozom insulina; (d) hronična kontrola. U mrkim adipocitima insulin i IR-P se uočavaju u citoplazmi, mestimično u mitohondrijama (M), u regionu nukleusnog ovoja (strelica) i u nukleusu (N), gde su najprisutniji u heterohromatinu uz nukleusni ovoj, ali se u manjim grupama, uočavaju i dublje unutar nukleusa. (IS) - intersticijum, (L) - lizozom; (Lt) - lipidno telo. Orig. uveličanje: (a) TEM - 8800x; (a-insert) SM - 1000x; (b, c) TEM - 25000x; (d) TEM - 19500x. Bar: (a) - 2  $\mu$ m; (a-insert) - 20  $\mu$ m; (b, c, d) - 1  $\mu$ m.

### *Insulin i IR-P u unilokulusnim adipocitima*

Imunopozitivnost na insulin kod unilokulusnih adipocita je jaka kod svih grupa, kako u tankom citoplazmatskom sloju, tako i u nukleusima (*Slika 53a, c*). Imunoreaktivnost na IR-P je takođe jaka kod ovih adipocita u svim grupama, u istim regionima – citoplazmatski i nukleusno, opet prvenstveno u perifernom heterohromatinu kao i kod multilokulusnih mrkih adipocita (*Slika 53b, d*).

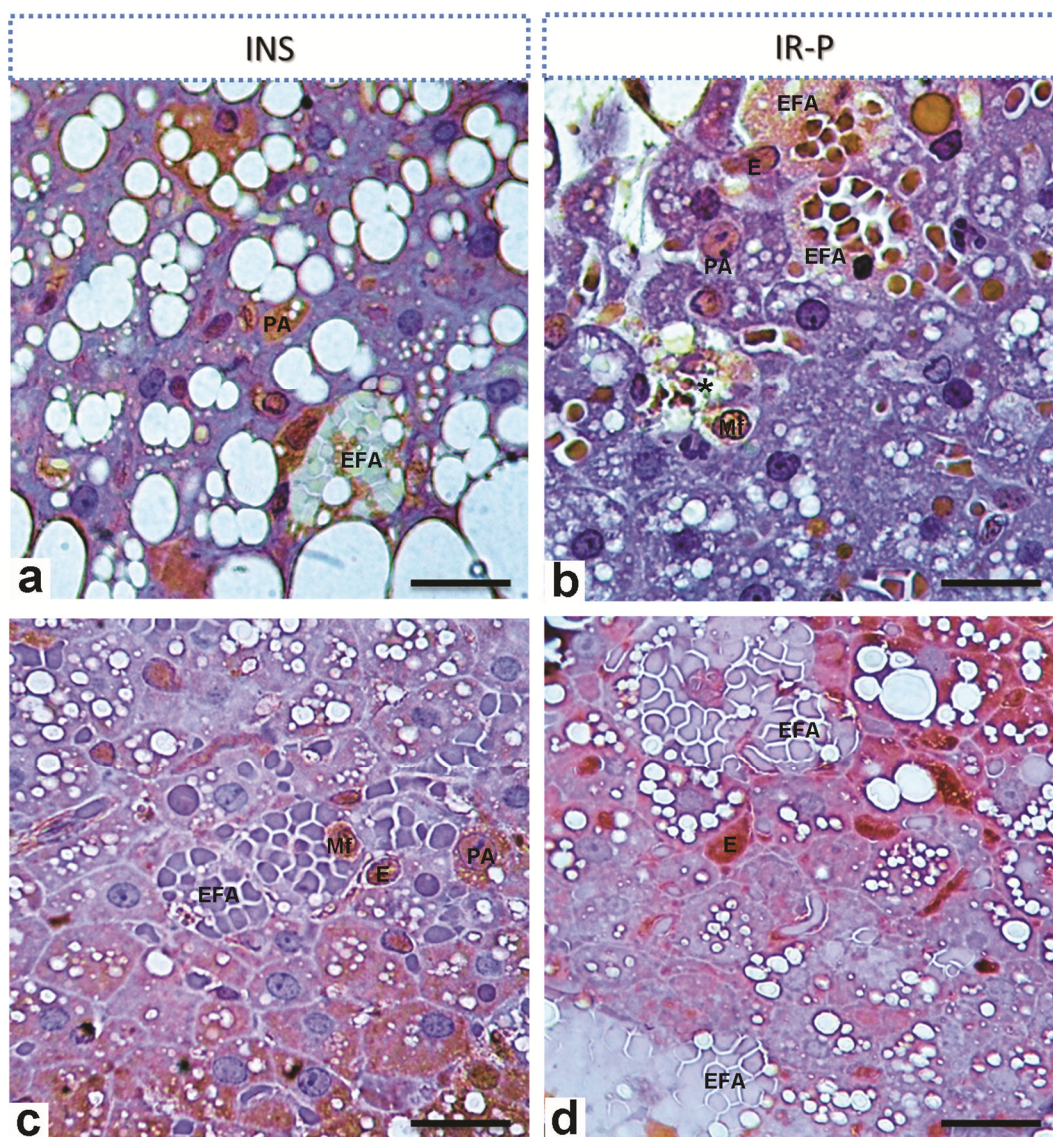


**Slika 53. Insulin (INS) i IR-P u unilokulusnim adipocitima** - (a) na nivou SM uočavaju se krupni unilokulusni adipociti (UA) sa jakom insulinskom imunopozitivnošću (akutna kontrola), i (b) jakom IR-P-imunopozitivnošću u citoplazmi i nukleusima (akutna kontrola). Na nivou TEM (c) imunogold partikule kojima je obeležen insulin uočavaju se u tankom sloju citoplazme uz lipidno telo (Lt) kod susednih ćelija (hronična kontrola); (d) IR-P obeležen imunogold partikulama se uočava u nukleusu, i to prvenstveno u heterohromatinu (akutan tretman visokom dozom insulina). Orig. uveličanje: (a, b) SM - 1000x, (c) TEM - 19500x, (d) TEM - 11500x. Bar: (a, b) - 20  $\mu\text{m}$ . (c) - 1  $\mu\text{m}$ , (d) - 2  $\mu\text{m}$ .



### *Insulin i IR-P u eritrofagocitnim regionima*

Regioni eritrofagocitne aktivnosti se sreću u BAT svih grupa, ali je njihova učestalost najveća kod životinja koje su tretirane niskom dozom insulina. Kod EFA imunopozitivnost na INS i IR-P je izrazito jaka, prvenstveno citoplazmatski ali i nukleusno (*Slika 54*). Imunoreaktivnost na insulin i fosforilisanu formu njegovog receptora je povećana i u ćelijama koje okružuju EFA – makrofagama, endotelskim ćelijama ali i preadipocitima koje se gotovo uvek uočavaju u žarištima izražene eritrofagocitne aktivnosti.

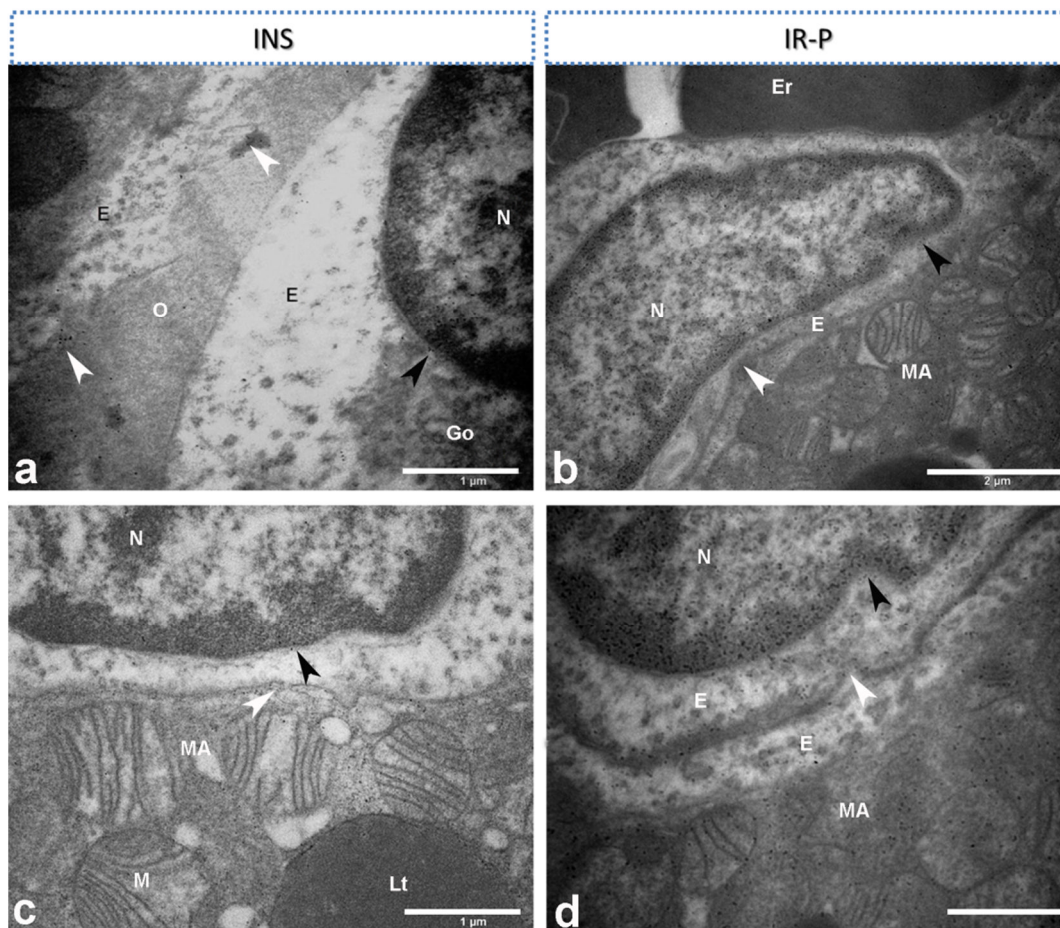


*Slika 54. Insulin (INS) i IR-P u eritrofagocitnim regionima - (a) - akutna kontrola; (b - d) - akutan tretman niskom dozom insulina. Uočava se izražena (a, c) insulinska i (b, d) IR-P-imunopozitivnost citoplazme i nukleusa EFA; ali i okolnih ćelija – makrofaga (Mf), endotelskih ćelija (E), preadipocita (PA) i EFA u programu umiranja (\*). Orig. uveličanje - 1000x. Bar - 20  $\mu$ m.*

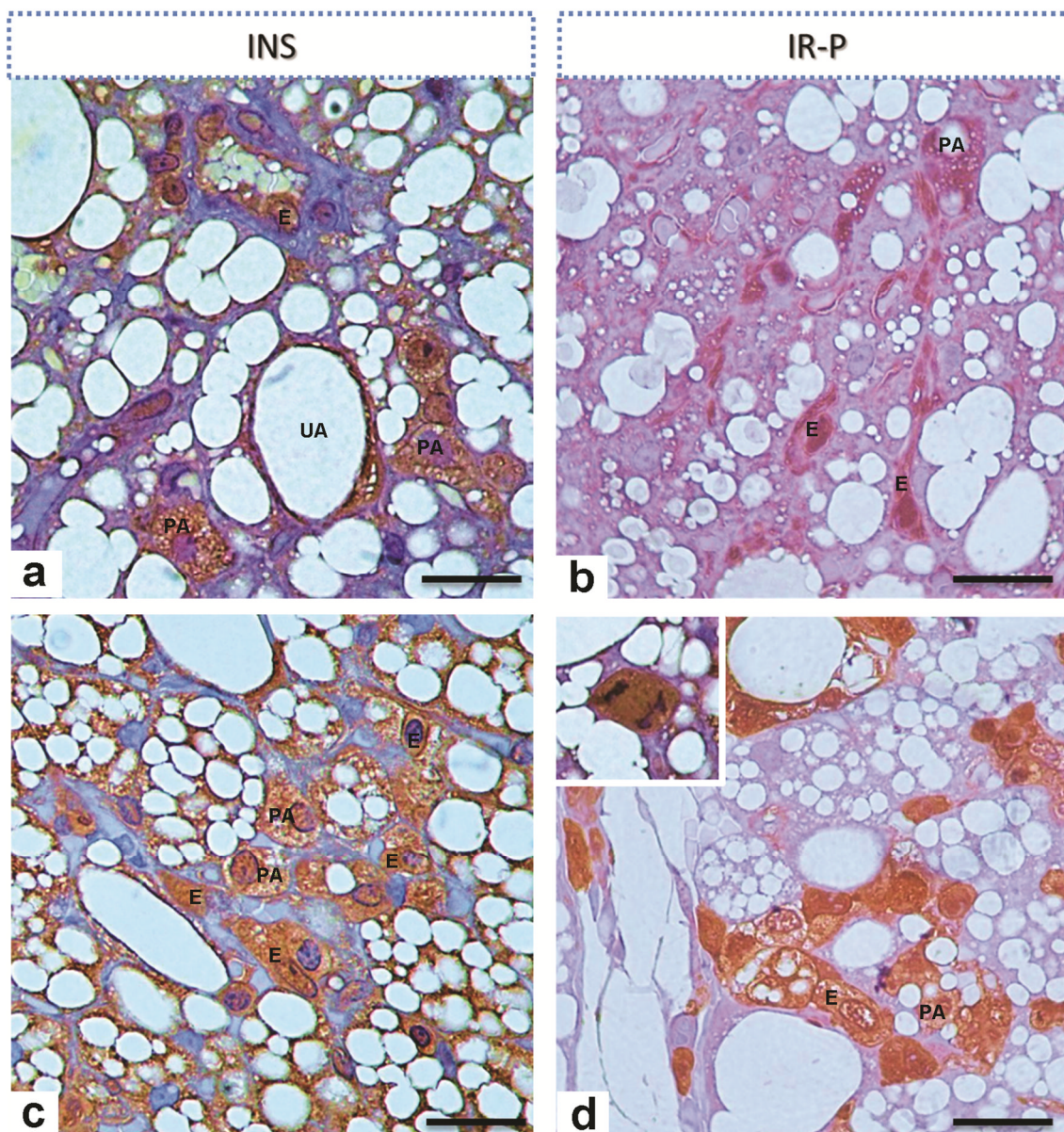
### *Insulin i IR-P u endotelskim ćelijama*

Za razliku od mrkih adipocita među kojima postoji izražen harlekinski efekat kad je imunoreaktivnost na insulin i IR-P u pitanju, endotelne ćelije BAT su uglavnom sve imunopozitivne na ove proteine, kako kod kontrolnih, tako i kod insulinom-tretiranih životinja (*Slika 55*). Insulin se uočava na ćelijskoj membrani, u citoplazmi, na mitohondrijama, na nukleusnom ovoju, gde se uočava veća količina partikula i put translokacije u nukleus (*Slika 55a, c*).

IR-P imunoreaktivnost u endotelskim ćelijama je još izraženija u poređenju sa insulinskom (*Slika 55b, d*). Dominira reaktivnost u nukleusima, posebno u heterohromatinu, ali je i citoplazmatska reaktivnost jaka. Na ćelijskoj membrani uočavaju se imunogold partikule i u nivou endocitotskih ulegnuća, uvrata, a u citoplazmi na membrani endocitotskih vezikula.



**Slika 55. Insulin (INS) i IR-P u endotelskim ćelijama BAT (a, c) - hroničan tretman niskom dozom insulina; (b, d) - akutan tretman niskom dozom insulina. Insulin i IR-P se uočavaju na membrani (bela strelica) i u endotelskim ćelijama (E) – na nukleusnom ovoju (crna strelica) i u nukleusima (N). (MA) mrki adipocit; (M) - mitohondrija, (Lt) - lipidno telo, (Er) - eritrocit, (O) - lumen kapilara, (Go) - kompleks Goldži. Orig. uveličanje: TEM (a, c, d) - 19500x, (b) - 11500x. Bar: (a, c, d) - 1 μm, (b) - 2 μm.**



**Slika 56. Insulin (INS) i IR-P u regionima adipo- i angiogeneze - (a, b) akutna kontrola; (c, d) hroničan tretman visokom dozom insulina. Uočava se udruženost aktiviranih i angiogenih endotelskih ćelija (E) sa ćelijama adipogenog pula u različitim fazama diferencijacije, od ćelija u deobi (d-insert) do preadipocita sa sitnim lipidnim telima (PA). U svim navedenim ćelijama se prisutna jaka imunoreaktivnost insulina i IR-P, kao u u okolnim unilokusnim adipocitima (UA). Orig. uveličanje - 1000x. Bar - 20  $\mu$ m.**

### *Insulin i IR-P u regionima adipogeneze i angiogeneze*

Primenjene imunohistohemijske metode pokazale su da se insulin i IR-P nalaze u proliferišućim ćelijama BAT, tj. angiogenim endotelskim ćelijama kao i preadipocitama, čak i u ćelijama u deobi (**Slika 56**). Kod kontrolnih grupa preadipociti su uglavnom sporadični i pojedinačni u tkivu, a ređe se sreću u manjim grupama (**Slika 56a, b**). Tretman insulinom povećava učestalost pojave preadipocita i endotelskih ćelija sa aktiviranim i angiogenim

fenotipom koje su vrlo imunopozitivne na insulin i njegov receptor u fosforilisanom formi, kako citoplazmatski tako i nukleusno (*Slika 56c, d*). To je naročito izraženo u BAT životinja koje su hronično tretirane visokom dozom insulina gde su česti regioni u kojima se sreću endotelne ćelije aktiviranog i angiogenog fenotipa i ćelije adipocitnog pula u različitim stadijumima diferencijacije, počevši od onih u deobi (*Slika 56d-insert*), preko višeučanih ćelija ispunjenih mitohondrijama, bez lipidnih tela, do onih kod kojih dolazi do nagomilavanja lipida u formi sve većih lipidnih tela. Zanimljivo je i da se često ovi regioni nalaze oko unilokulusnih adipocita koje su takođe vrlo imunopozitivni citoplazmatski i nukleusno na insulin i IR-P. Jasno se uočava i da se ovi regioni proliferativne aktivnosti u BAT lociraju perivaskularno i u oblasti vezivnih septi.

## 5. DISKUSIJA

---

Studija o efektima hiperinsulinemije na mrko masno tkivo je pokazala da se odgovor tkiva na tretman fiziološkim i suprafiziološkim dozama insulina odvija u dva smera – s jedne strane, zapaža se stimulacija tkivne hipertrofije i povećanje termogenog kapaciteta kao dominantan efekat, koji prvenstveno zavisi od dužine tretmana; a sa druge strane, naročito pri hroničnom i izlaganju visokoj dozi insulina, hiperinsulinemija ostvaruje citotoksičan efekat u tkivno-specifično lokalizovanim fokusima, dok hronična suprafiziološka hiperinsulinemija deluje inhibitorno na mitohondriogenezu i insulinsku senzitivnost u pojedinim ćelijama.

### 5.1. INSULIN STIMULIŠE RAST MRKOG MASNOG TKIVA

#### 5.1.1. Prvo hipertrofija pa hiperplazija mrkih adipocita

Rezultati ove studije potvrđuju lipogeno i adipogeno dejstvo insulina, pošto se masa BAT u eksperimentu povećala nakon hroničnog tretmana insulinom, bez obzira na dozu. To povećanje uzrokovano je jednim delom hipertrofijom mrkih adipocita, s obzirom da se kod grupa koje su hronično tretirane insulinom povećava Vv, kao i zapremina samih adipocita. Kod hroničnog tretmana niskom dozom insulina smanjuje se brojnost adipocita po jedinici zapremine kao posledica hipertrofije samih ćelija, dok se kod hroničnog tretmana visokom dozom brojnost održava na kontrolnom nivou, što ukazuje da se pored hipertrofije kod ovih životinja Vv adipocita i sama masa BAT povećavaju i usled proliferacije, odnosno hiperplazije ćelija adipocitnog pula u tkivu. Zanimljivo je da se i kod životinja koje su akutno tretirane niskom dozom insulina takođe dešava hipertrofija adipocita (zapremina ćelija raste, a brojnost po jedinici zapremine opada), ali se njihova Vv i masa tkiva ne menjaju, što ukazuje na proliferaciju kapilarne mreže kako bi se ispratilo fizičko uvećanje adipocita, a samim tim očuvao polazni, kontrolni odnos Vv adipocita i krvnih sudova. Ovakvom remodeliranju tkiva dopinose i umiranje određenog pula mrkih adipocita uz hipertrofiju ostalih, čime se Vv adipocita održava na kontrolnom nivou.

U osnovi hipertrofije adipocita je lipogeneza, tj. gomilanje lipida u formi lipidnih tela u njihovoj citoplazmi, što se uočava kod grupe tretirane akutno niskom dozom, kao i kod grupa koje su tretirane hronično niskom i visokom dozom insulina, s obzirom da se kod njih povećava Vv lipidnih tela u mrkim adipocitima. Anaboličko dejstvo insulina, kako

u BAT, tako i u drugim tkivima, odavno je poznato i podrazumeva efekte na unos i metabolizam glukoze, stimulaciju *de novo* sinteze masnih kiselina, stimulaciju unosa slobodnih masnih kiselina, kao i sintezu triglicerida (*Cannon i Nedergaard, 2004*) koji se deponuju u vidu lipidnih tela. Takođe, brojne studije pokazuju da insulin deluje i na ekspresiju gena za proteine koji su uključeni u proces unosa glukoze i lipogenezu (sintaza masne kiseline, malični enzim, glicerol-3-fosfat dehidrogenaza, GLUT4, itd.) (*Lorenzo i sar., 1989; Valverde i sar., 1998; Fassbauer i sar., 2000*).

U prilog povećanju adipogenih procesa, tj. procesa diferencijacije adipocita od njihovih progenitorskih ćelija pod dejstvom insulina, govore rezultati mikroskopske i imunohistohemijske detekcije velikog broja preadipocita u BAT hiperinsulinemičnih pacova. Diferencijacija adipocita je regulisana od strane čitave mreže hormona i faktora rasta (*Cannon i Nedergaard, 2004; Gesta i sar., 2007*), a među njima se insulin smatra vodećim, kako u adipogenezi belih, tako i mrkih adipocita (*Rosen i MacDougald, 2006*).

Sumarno, u uslovima hiperinsulinemije, BAT raste na račun fizičkog uvećanja postojećih adipocita, putem diferencijacije novih adipocita od postojećih preadipocita (i stem ćelija?), ali i putem koordinisanog razvoja tkivne vaskularne mreže.

### 5.1.2. Kapilarna mreža mrkog masnog tkiva prati njegov rast

Činjenica da se kod akutnog tretmana niskom dozom insulina Vv kapilara u tkivu održava na istom nivou kao kod referentne kontrole, uprkos tome što se sami adipociti fizički uvećavaju, ukazuje na rast kapilarne mreže u cilju održanja nivoa prokrvljenosti tkiva. Sa druge strane, hroničan tretman insulinom, bez obzira na primenjenu dozu, dovodi do smanjenja Vv kapilara u tkivu, u skladu sa hipertrofijom adipocita, ali pošto u tim grupama dolazi do uvećanja mase BAT, ne može se isključiti ni proces angiogeneze.

#### *Uloga NO u regulaciji prokrvljenosti i remodeliranju kapilarne mreže*

Kod svih insulinom-tetiranih grupa se, u odnosu na kontrolne grupe, povećava imunoekspresija eNOS u mrkim adipocitima i endotelskim ćelijama, dok se ekspresija iNOS na nivou tkiva ne menja u uslovima hiperinsulinemije, što ukazuje da insulin svoje eventualne efekte na produkciju azot monoksida (NO) u BAT ispoljava preko endotelske izoforme ovog enzima. Mrki adipociti ekspimiraju dve izoforme NOS - eNOS (*Giordano i sar., 2002*) i iNOS (*Nisoli i sar., 1997b*) koje mogu da se lokalizuju kako u citoplazmi, tako i u nukleusima, kao što je i ovde pokazano. NO kojeg proizvode uključeni je u regulaciju funkcije BAT (*Nisoli i sar., 1998; Petrovic i sar., 2005*), ali može da dovede i do brzog i

opsežnog povećanja prokrvljenosti vazodilatacijom prilikom povećanja aktivnosti BAT (*Foster i Frydman, 1978; Nagashima i sar., 1994; Fukumura i sar., 2001*). Pored vazodilatacije, koja je moguća posledica povećane eNOS ekspresije, evidentno je da u BAT insulinom-tretiranih pacova, dolazi do aktivacije endotela i do angiogeneze. Naime, uočava se veliki broj tzv. aktiviranih endotelskih ćelija čiji fenotip ukazuje na povećanu sintetsku aktivnost (uvećana, prosvetljena citoplazma, euhromatski nukleus, veći broj protruzija u lumen kapilara, smanjenje broja transcitotskih vezikula, povećanje količine poliribozoma u citoplazmi). Takođe, raste broj endotelskih ćelija koje su u nekoj od faza mitotske deobe (angiogene endotelske ćelije), učestvuju u formiranju novih kapilarnih izdanaka ili pregrađivanju postojećih lumena na dva nova, zahvaljujući formiranju protruzija i podeli endotelske ćelije na dve nove, od kojih jedna ostaje u sastavu starog lumena, a druga formira novi lumen. Ovi su podaci u skladu sa ranijim rezultatima naše laboratorije koji su pokazali da povećana produkcija NO na hladnoći stimuliše remodeliranje kapilarne mreže u BAT (*Korac i sar., 2008*).

Obe izoforme NOS se uočavaju i u nukleusima mrkih adipocita i endotelskih ćelija, što je u saglasnosti sa našim i rezultatima drugih (*Giordano i sar., 2002; Petrovic i sar., 2005; Korac i sar., 2008*) koji ukazuju na postojanje funkcionalnih NOS sistema u nukleusima mrkih adipocita koji mogu biti modulisani u uslovima različite funkcionalne aktivacije. S obzirom da je NO kratkoživeći molekul koji može slobodno da difunduje kroz biološke strukture, ali u ograničenoj zapremini (*Lancaster, 1994; Wood i Garthwaite, 1994*), subćelijska lokalizacija NOS sistema nam ukazuje na kompartmentalizaciju delovanja NO kojeg u datim uslovima produkuju.

### ***Uloga VEGF u remodeliranju mrkog masnog tkiva***

Rezultati naše studije kod svih eksperimentalnih grupa pokazuju visoku adipocitnu ekspresiju VEGF proteina, koji se smatra jednim od najvažnijih angiogenih faktora u fiziološkim i patološkim uslovima (*Thomas, 1996*). VEGF se, kao što je od ranije poznato, visoko eksprimira u BAT (*Asano i sar., 1997*) i u proliferišućim i u zrelim mrkim adipocitima (*Fredriksson i sar., 2000*), i vrlo je verovatno da je upravo to u osnovi velike prokrvljenosti ovog tkiva. Međutim, primetno je da se VEGF znatno više eksprimira u regionima eritrofagocitoze - u EFA i u okolnim endotelskim ćelijama i preadipocitima, što ukazuje na moguću diktiranost lokalizacije eritrofagocitoze, pošto je poznato da VEGF nije samo angiogeni faktor već ima ulogu i u povećanju vaskularne permeabilnosti (*Cannon i Nedergaard, 2004*), što može usloviti i lakšu ekstravazaciju eritrocita. U tom kontekstu,

tkivna ekspresija VEGF raste pri tretmanu insulinom jer raste učestalost eritrofagocitnih regiona. Takođe, nevezano od ekstravazacije eritrocita, VEGF je visoko ekspimiran u preadipocitima, što ukazuje na orkestraciju procesa adipocitne i vaskularne proliferacije.

### 5.1.3. Adipogeneza i angiogeneza u mrkom masnom tkivu su povezane

Poznato je da proliferacija masnog tkiva zahteva istovremenu ekspanziju njegove kapilarne mreže (*Rupnick i sar., 2002; Hausman i Richardson, 2004; Christiaens i Lijnen, 2010*), kao i da endotelske ćelije stimulišu proliferaciju prekursorskih ćelija izolovanih iz masnog tkiva *in vitro*. Ćelije stromalno-vaskularne frakcije (SVF) adipoznog tkiva diferenciraju se *in vitro* u ćelije adipogenog ili perivaskularnog fenotipa (*Cinti i sar., 1984; Gregoire, 2001*), ali identitet ovih progenitorskih ćelija *in vivo* nije poznat (*Gesta i sar., 2007*).

Tretman insulinom povećava učestalost regiona u kojima se uočavaju fizički blisko pozicionirane endotelske ćelije i preadipociti, što kulminira kod životinja koje su hronično tretirane visokom dozom insulina, gde je evidentna pojava masivne, udružene adipo- i angiogeneze u perivaskularnim oblastima BAT, koje se inače smatraju rezervoarima progenitorskih ćelija u masnim tkivima (*Maumus i sar., 2011; Gupta i sar., 2012*). Upravo ćelije tih regiona masnog tkiva predstavljaju adipoznu stromu iz koje se izolacijom dobija tzv. SVF, što objašnjava visoku proliferativnu moć ćelija ove frakcije.

Kako je pokazano u ovoj studiji, neretko se uz aktivirane i angiogene endotelske ćelije sreću preadipociti, što je potvrđeno i na nivou proteinske imunoekspresije Ki-67 markera proliferacije, pošto su Ki-67-pozitivne endotelske ćelije često lokalizovane uz Ki-67-pozitivne preadipocite. Zanimljiv podatak je da su naši rezultati takođe pokazali da se vWF, koji se smatra pokazateljem endotelske aktivacije (*Lip i sar., 2005*) i markerom endotelskih ćelija, u BAT ne ekspimiraju samo u endotelskim ćelijama, već i u susjednim preadipocitima, ali i kod mladih adipocita sa sitnim lipidnim telima uz regione udružene adipo- i angiogene aktivnosti, sa nešto blažim intenzitetom. To ukazuje da ekspresija vWF slabi sa sazrevanjem mrkih adipocita i udaljavanjem od žarišta proliferacije endotela i adipocita. Ostaje nepoznato iz kog se razloga ovaj faktor ekspimiraju u adipocitnoj liniji ćelija u BAT, međutim, bliska fizička povezanost aktiviranih endotelskih ćelija i preadipocita ukazuje na mogućnost zajedničkog porekla, ili pak transdiferencijacije endotelskih ćelija u ćelije adipocitne linije, što je pokazano od strane Tran i saradnika (2012) koji su, na eksplantima humanog WAT i BAT, pokazali da se kod oko 5% perilipin-pozitivnih ćelija sa lipidnim telima, ekspimiraju i vWF.



Naši rezultati ukazuju da se adipogeneza mahom odvija uz krvne sudove BAT, kao i da se aktivirane endotelske ćelije i preadipociti nalaze u fizičkom kontaktu, što je u skladu sa skorašnjim rezultatima Tran i saradnika (2012) koji su pokazali *in vivo* nastanak adipocita iz ćelija endotelskog porekla, upravo u regionima uz kapilare, gde se morfološki, pored tipičnih endotelskih ćelija opisuju i ćelije koje imaju karakteristike endotelskih ćelija (*zonula occludens* tip veze), pericitni položaj (perivaskularno), ali i glikogenske granule i marker adipogeneze (C/EBP- $\beta$ ) karakteristične za progenitore adipocita. Te tzv. endotelsko-pericitne ćelije predstavljaju mogući međustupanj između endotelskih ćelija i preadipocita, i dokaz su da endotelske ćelije WAT i BAT predstavljaju izvor prekursora adipocita. Ovi su podaci u saglasnosti sa rezultatima koji pokazuju prisustvo promotorskog Zfp423 (*zinc finger protein*, engl.) markera ćelija koje daju preadipocite, u endotelskim ćelijama i pericitima (Gupta i sar., 2012), kao i sa otkrićem da progenitori adipocita poreklom iz adipoznog tkiva ekspimiraju vaskularni endotelski (VE) - kadherin, karakterističan za endotelske ćelije (Tran i sar., 2012).

Iz svih navedenih rezultata proizilazi hipoteza da adipociti mogu nastati od endotelskih ćelija ili od prekursora sa karakteristikama endotelskih ćelija. U skladu sa ovim su i skorašnji dokazi da se endotelske ćelije mogu dediferencirati do mezenhimskih stem ćelija, koje se opet mogu diferencirati do adipocita, hondrocita i osteoblasta (Medici i sar., 2010). Takođe, pokazano je da adipociti imaju potencijal brzog zauzimanja endotelskog fenotipa *in vitro* (Planat-Benard i sar., 2004), kao i da se u SVF nalaze CD31<sup>+</sup> progenitorske ćelije koje u zavisnosti od uslova kultivacije mogu dati i endotelske ćelije i adipocite (Wosnitza i sar., 2007). Pri tom, te su CD31<sup>+</sup> ćelije pozitivne i na CD105, kao i na vWF, koji se svi smatraju markerima zrelih endotelskih ćelija, a negativne su na S100 adipocitni marker. S druge strane, čak i CD31<sup>-</sup>vWFS100<sup>+</sup> ćelije SVF, koje u adipogenom medijumu 100% daju zrele adipocite, mogu u angiogenim medijumima dati endotelske prekursorske i zrele endotelske ćelije (Wosnitza i sar., 2007). Sve ovo ukazuje na mogućnost da adipociti i endotelske ćelije poseduju plastičnost za vršenje interkonverzija u cilju održavanja homeostatske ravnoteže tokom rasta i redukcije adipoznih tkiva.

Buduća istraživanja mehanizama delovanja insulina na determinaciju adipocitne i/ili endotelske sudbine, kao i identifikacija ostalih fizioloških signala koji utiču na ovaj proces, dovešće do boljeg razumevanja mehanizama odgovornih za koordinaciju adipogeneze i angiogeneze tokom rasta adipoznog tkiva.

## 5.2. UTICAJ INSULINA NA TERMOGENI KAPACITET MRKOG MASNOSTI

### 5.2.1. Strukturno i molekularno remodeliranje mitohondrija mrkih adipocita

Insulin se, pored efekta na adipogenezu u BAT, smatra i termogenim faktorom s obzirom da je u stanju da poveća UCP1 gensku transkripciju i akumulaciju UCP1 mRNA (Valverde i sar., 2005). U našem eksperimentu je imunohistohemijski pokazano da se i ekspresija UCP1 proteina u mrkim adipocitima povećava u uslovima hiperinsulinemije, i to postepeno pri fiziološkoj i akutno, pri suprafiziološkoj hiperinsulinemiji. Povećanje UCP1 ekspresije je u skladu sa dekaplovanjem oksidativne fosforilacije i strukturnim promenama mitohondrija (Himm-Hagen, 1990), a pokazano je i da je termogeneza u BAT takođe povezana sa porastom mitohondrijalne biogeneze (mitohondriogeneze) (Butow i Bahassi, 1999).

U vezi sa ovim fenomenom, mitohondrije mrkih adipocita zauzimaju centralnu ulogu u kaskadi procesa uključenih u termogenezu BAT. Mrki adipociti spadaju među ćelije sa najvećom Vv mitohondrija među sisarskim ćelijama (Lindberg i sar., 1967). Biogeneza mitohondrija predstavlja kompleksan proces koji ne podrazumeva samo povećanje njihovog broja, već i remodeliranje na strukturnom i molekularnom nivou (Otasevic i sar., 2011). Mitohondrijalna struktura je u čvrstoj povezanosti sa njihovim funkcionalnim stanjem. Naime, mitohondrije su dinamične organele, sposobne da menjaju morfologiju putem procesa fuzije i fisije, čime se formira mitohondrijalni sincicijum ili se mitohondrije razdvajaju na pojedinačne, diskretne fenotipove (Liesa i sar., 2009). Unutrašnja mitohondrijalna membrana formira brojne invaginacije – kriste, čiji se broj, oblik i raspored značajno menjaju u odgovoru na fiziološke stimuluse (Otasevic i sar., 2011). U slučaju mrkih adipocita, mitohondrijalno remodeliranje podrazumeva seriju finih, vremenski usklađenih promena koje počinju njihovom hipertrofijom i pojavom novoformiranih mitohondrija sa jednostavnom unutrašnjom građom (Suter, 1969; Petrovic i sar., 2008) koja se postepeno usložnjava. To se prvenstveno odnosi na kriste koje se organizuju sve pravilnije, paralelno, brojnije su i raste njihova Vv. Pokazana je pozitivna veza između povećanja Vv kristi i sposobnosti mitohondrija da produkuju toplotu. S obzirom da se na unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani nalaze enzimi elektron-transportnog lanca i UCP1, logično je očekivati da progresivno povećanje Vv kristi predstavlja strukturnu i molekularnu bazu za povećanje oksidativnog i termogenog kapaciteta mitohondrija (Roberts i Smith, 1967; Suter, 1969).

Rezultati naše studije pokazuju da se Vv mitohondrija realno povećava kod akutnog tretmana visokom dozom insulina, dok se kod ostalih insulinskih tretmana, održava na nivou bliskom kontrolnom, što je posledica hipertrofije samih ćelija, i ukazuje da se količina mitohondrija u mrkim adipocitima povećava srazmerno rastu ćelija, kako bi se održala optimalna Vv. S tim u vezi, uočljiv je pozitivan mitohondriogeni efekat insulina, posebno kod životinja tretiranih visokom dozom insulina, gde raste udeo sitnijih mitohondrija, što ukazuje na povećanu mitohondrijalnu biogenezu; dok se Vv kristi u mitohondrijama povećava kod svih insulinom-tretiranih grupa - kod niske doze postepeno, jer se kod akutnog tretmana beleži blaži porast, a nakon tri dana vrednost značajnije raste; dok se kod visoke doze insulina beleži jak akutni odgovor, uz znatno povećanje udela kristi u mitohondrijama već kod akutnog tretmana.

### 5.2.2. PGC-1 $\alpha$ i termogeni kapacitet

Aktivacija termogenog programa BAT stimuliše se putem različitih termogenih faktora koji koordinišu biohemijske, strukturne i ćelijske promene. Među njima, UCP1, PPAR- $\gamma$  i njegov koaktivator PGC-1 $\alpha$ , su od posebnog značaja, zbog njihove uloge u povećanju termogenog kapaciteta putem intenzifikacije dekaplovanja, metabolizma masnih kiselina i diferencijacije, kao i putem uticaja na oksidativni metabolizam i mitohondriogenezu (*Nicholls i Locke, 1984; Puigserver i sar., 1998; Nedergaard i sar., 2005*). PGC-1 $\alpha$  (*Puigserver i sar., 1998*), koji se smatra glavnim regulatorom mitohondrijalne biogeneze i utroška energije, i kojem se pripisuje više metaboličkih funkcija u tkivima sa visokim oksidativnim kapacitetom (srčani i skeletni mišići, BAT); odgovoran je za razvoj morfološke i molekulske mašinerije neophodne za pravilno funkcionisanje BAT. Pored efekta na termogenu mašineriju, pokazano je da PGC-1 $\alpha$  stimuliše VEGF ekspresiju i angiogenezu u BAT i skeletnim mišićima u uslovima hipoksije i smanjenja dostupnosti hranjivih materija (*Arany i sar., 2008*). PGC-1 $\alpha$  ekspresija je precizno regulisana i odražava ćelijske energetske potrebe. Ovaj koaktivator vrši svoje funkcije putem regulacije aktivnosti velikog broja transkripcionih faktora, među kojima se ključnima smatraju PPAR- $\gamma$ , koji je glavni regulator diferencijacije adipocita (*Rosen i sar., 1999*), kao i nukleusni respiratorni faktori (NRF) - 1 i - 2 koji su neophodni za replikaciju, održavanje i transkripciju mitohondrijalne DNK (mtDNK) (*Fisher i sar., 1992; Larsson i sar., 1998; Garesse i Vallejo, 2001*), ali i za ekspresiju gena za subjedinice respiratornog lanca i drugih proteina važnih za funkcionisanje mitohondrija (*Virbasius i sar., 1993; Scarpulla, 2002*). S obzirom da insulin

stimuliše procese deponovanja energije, kao i da inhibira kataboličke puteve, za očekivati je da se aktivnost PGC-1 $\alpha$  inhibira pod dejstvom insulina. U tom kontekstu pokazano je da insulin može da inhibira PGC-1 $\alpha$  transkripciju putem aktivacije Akt puta, čime se inhibira FoxO1 (*Forkhead box protein O1*, engl.) koji ima ulogu vezivanja i stimulacije PGC-1 $\alpha$  (*Southgate i sar., 2005*). Ovi se podaci o inhibitornom delovanju insulina na PGC-1 $\alpha$  ekspresiju dobrim delom poklapaju sa našim rezultatima, gde se inače visoka tkivna ekspresija PGC-1 $\alpha$  smanjuje tek nakon hroničnog izlaganja visokoj dozi insulina, što ukazuje da hronična hiperinsulinemija inhibira termogenu aktivnost BAT. Takođe, kod visoke hiperinsulinemije, uprkos mitohondriogenezi, detektovali smo na ultrastrukturnom nivou porast učestalosti ćelija sa različitim defektima na nivou mitohondrija (dezorganizacija, namotavanje ili vezikulacija kristi, bubrenje, kondenzacija itd.), koje se onda uklanjaju autofagocitozom ili se, u slučaju većeg ćelijskog oštećenja, razgrađuju u samoj citoplazmi.

Zanimljiv je i naš rezultat vezan za adipocitnu lokalizaciju PGC-1 $\alpha$ , koji pokazuje da se pored očekivane citoplazmatske i nukleusne ekspresije, ovaj koaktivator eksprimira i u mitohondrijama i to ne samo kod multilokulusnih, već i kod unilokulusnih mrkih adipocita, kod kojih se jaka ekspresija zadržava i nakon hroničnog tretmana visokom dozom. To ukazuje da uprkos uvreženom stavu, PGC-1 $\alpha$  mitohondrijalnu biogenezu ne reguliše samo putem regulacije nukleusnih gena za mitohondrijalne proteine, već i putem regulacije gena na mtDNK, što je i pokazano u skorašnjoj studiji Safdar i saradnika (*2011*).

### 5.2.3. NO i termogeni kapacitet

Identifikovani su brojni faktori koji kontrolišu termogeni kapacitet BAT, a jedan od njih je i NO (*Otasevic i sar., 2011*). Efekat NO generisanog od strane eNOS (čija je imunoekspresija povećana u BAT hiperinsulinemičnih pacova u odnosu na kontrolu) na termogeni kapacitet mrkih adipocita nije isključen ni u uslovima hiperinsulinemije, pošto postoje dokazi da ovako generisan NO stimuliše UCP1 ekspresiju (*Nisoli i sar., 1998; Petrovic i sar., 2005*) kao i mitohondrijalnu biogenezu u BAT (*Nisoli i sar., 2003; Liesa i sar., 2009; Petrovic i sar., 2010b*). Takođe, pokazano je da kod eNOS-deficijentnih životinja dolazi do smanjenja broja mitohondrija, smanjenja potrošnje energije, povećanja telesne težine i razvoja IRes (*Shankar i sar., 2000*), što sve spada u tipične odlike metaboličkog sindroma.

Možemo zaključiti da akutna hiperinsulinemija pozitivno utiče na termogeni kapacitet BAT, kako putem strukturnog remodeliranja termogene mašinerije (hipertrofija mitohondrija, njihova biogeneza, povećanje udela kristi), tako i na molekulskom nivou, prvenstveno putem povećanja ekspresije UCP1 proteina. Da li pri tome dolazi i do stimulacije NST, ostaje nerazjašnjeno. Kod ljudi je uočeno da se kod akutne hiperinsulinemije u BAT povećava unos glukoze bez promena u perfuziji, što može ukazivati da insulin ne dovodi do aktivacije NST, ili je ona blaža pa ne zahteva povećanje prokrvljenosti, kao i da je mehanizam aktivacije BAT putem insulinske aplikacije drugačiji u poređenju sa hladnoćom-indukovanom aktivacijom gde dolazi i do povećanja unosa glukoze, i do povećanja prokrvljenosti (*Orava i sar., 2011*).

Negativni efekat na termogeni kapacitet BAT se uočava tek kod hroničnog izaganja visokoj dozi insulina, gde se smanjuje ekspresija PGC-1 $\alpha$  i povećava učestalost mitohondrijalnih oštećenja u pojedinim mrkim adipocitima. To može biti znak da hronično izlaganje tkiva visokim dozama ovog hormona dovodi do smanjenja termogenog kapaciteta tkiva, što može biti jedno od mogućih mehanizama za „isključivanje“ BAT kod gojaznih ljudi.

Naši rezultati dakle, ukazuju da efekat hiperinsulinemije na termogeni kapacitet BAT zavisi od primenjene doze i dužine tretmana insulinom.

### 5.3. CITOTOKSIČNOST VISOKE DOZE INSULINA U MRKOM MASNOM TKIVU

#### 5.3.1. Apoptoza endotelskih ćelija

Rezultati naše mikroskopske studije pokazuju da se kod akutnog i hroničnog tretmana visokom dozom insulina povećava broj apoptotskih endotelskih ćelija u BAT, koje pokazuju znake kondenzacije hromatina, promene oblika nukleusa, kao i pojave apoptotskih tela. Prethodna studija pokazala je da hiperinsulinemija ima citotoksičan efekat na BAT i da dovodi do smrti mrkih adipocita apoptozom (*Korac i sar., 1999*), što je od strane Porras i saradnika potvrđeno i u kulturi (*2003*). Naša studija pokazuje da pored smrti mrkih adipocita i apoptoza endotelskih ćelija igra važnu ulogu u remodeliranju BAT, barem u uslovima izloženosti visokim koncentracijama insulina. Udružena eliminacija mrkih adipocita i endotelskih ćelija mogući je mehanizam održavanja stalnosti odnosa ovih ćelijskih tipova, tj. njihovih Vv u tkivu (*Bukowiecki i sar., 1982*). Iako se smatra da većina adultnih tkiva ne raste, kao i da je njihova vaskulatura u stanju mirovanja (*Hobson i Denekamp, 1984*), to nije slučaj sa masnim tkivima, koja mogu da rastu i da se smanjuju tokom života, i za čiju je masu pokazano da može biti regulisana upravo zahvaljujući vaskulaturi (*Rupnick i sar., 2002*). Cirkulatorna mreža ima izuzetan kapacitet remodeliranja putem smanjenja ili povećanja mikrocirkulacijske mreže u zavisnosti od potreba tkiva, što je naročito važno kod tkiva sa tako izraženom plastičnošću kao što je BAT.

Značaj proapoptotskog efekta hronične hiperinsulinemije u BAT nije sasvim poznat. Apoptoza endotela smanjenjem kapaciteta kapilarne mreže za dopremanje supstrata i rasipanje toplote može da utiče na termogenu funkciju BAT. Smatra se da insulin u perivaskularni prostor dospeva tako što prvo ulazi u endotelske ćelije putem receptorom-posredovanog procesa (*Hachija i sar., 1988*). Imunogold analiza na insulin i na IR-P sprovedena u našoj studiji, zaista pokazuje njihovo prisustvo insulina i IR-P na membrani endotelskih ćelija - u uvratima membrane, kao i na membrani endocitotskih vezikula, što može biti bar jednim delom, deo transcitotskog prenosa insulina do tkiva, tj. prvenstveno do mrkih adipocita. Na taj način, redukcija ekspanzije kapilarne mreže i smanjenje protoka krvi u metabolički aktivnim tkivima, dovodi do zastoja u insulin-stimulisanim metabolizmu glukoze i lipida (*Kubota i sar., 2011*). Na osnovu svega može se pretpostaviti da smrt mrkih adipocita, kao i endotelskih ćelija, indukovane hroničnom hiperinsulinemijom, mogu predstavljati važan mehanizam uključen u lokalnu redukciju funkcije BAT u uslovima kontinuirane izloženosti delovanju insulina. Takođe, iako se

insulin smatra jednim od najrelevantnijih pozitivnih signala u regulaciji BAT, hronična izloženost visokim dozama insulina može imati patološki efekat i dovesti do indukcije smrti ćelija ovog tkiva.

Ipak, uprkos smrti izvesnog pula mrkih adipocita i endotelskih ćelija, u našoj studiji masa tkiva se kod hronične hiperinsulinemije povećava, zahvaljujući tome što se uporedno sa postojanjem regiona ćelijske smrti, u drugim regionima dešava hipertrofija i proliferacija – adipo- i angiogeneza. To ukazuje na značaj postojanja strukturno-funkcionalnih adipocitno-endotelskih klastera, odnosno centara u kojima se istovremeno, pod dejstvom istog stimulusa, mogu odvijati i potpuno suprotni procesi, kao što su ćelijska smrt u jednim i proliferacija u drugima, a sve u svrhu remodeliranja BAT i fine regulacije njegove funkcionalnosti u uslovima izmenjene homeostaze, kao što je to slučaj kod hiperinsulinemije.

### 5.3.2. Eritrofagocitoza

Fagocitoza i degradacija oštećenih, ostarelih ili ekstravaziranih eritrocita predstavlja normalan hemoregulatorni proces kojim se vrši recikliranje eritrocitnog gvožđa (*Delaby i sar., 2005*). Ovaj se proces vrši prvenstveno od strane makrofaga retikulo-endotelskog sistema (RES), ali je takođe uočeno da i mnogi drugi ćelijski tipovi mogu obavljati fagocitozu eritrocita, kako u fiziološkim, (*Wakefield i Hicks, 1974; Zeligs i WollmanSh, 1977; Listinsky, 1988; Ruegg i Jungi, 1988; Fens i sar., 2010*), tako i u patološkim uslovima (*Kessler i De Vries, 1956; Hino i sar., 1985; Lee i sar., 1999; Biondi i sar., 2001; Farina i sar., 2006; Radhakrishnan i sar., 2008*). Koliko nam je poznato, eritrofagocitna aktivnost mrkih adipocita je za sada opisana samo od strane naše laboratorije (*Radovanovic i sar., 1996; Grubic i sar., 2008*), iako je njihova fagocitna i mikrobicidna aktivnost uočena i od strane drugih (*Villena i sar., 2001*).

I akutan i hroničan tretman insulinom, a posebno niskom dozom, u našem eksperimentu stimuliše eritrofagocitnu funkciju mrkih adipocita, dovodeći do pojave velikog broja mikrohemoragijskih žarišta u tkivu u kojima se dešava ekstravazacija eritrocita, njihov unos u mrke adipocite do potpune preplavljenosti citoplazme i fizičkog uvećanja same ćelije, kao i razgradnja eritrocita u ovim, EFA. Naši rezultati međutim, pokazuju eritrofagocitnu aktivnost mrkih adipocita čak i kod kontrolnih životinja, ukazujući na fiziološki značaj ovog fenomena. Ipak, prava uloga ovog procesa u BAT tek treba da bude rasvetljena.

Jedno od mogućih objašnjenja je vezano za visoku prokrvljenost i jaku termogenu aktivnost, što može dovesti do povećane permeabilnosti krvnih sudova i ekstravazacije eritrocita, pa se mrki adipociti uključuju u njihovo uklanjanje, kao što je slučaj kod hiperglikemije ili tretmana kalcijumom (*Radovanovic i sar., 1996*). O tome svedoči i povećana ekspresija VEGF proteina u EFA i okolnim preadipocitima i endotelskim ćelijama, što ukazuje na značaj ovog proteina u povećanju propustljivosti krvnih sudova u BAT (*Cannon i Nedergaard, 2004*). Hiperinsulinemija kreira specifičan tkivni milje koji aktivira metabolizam mrkih adipocita, dovodi do povećanja prokrvljenosti i jake ekstravazacije eritrocita u intersticijum. S druge strane, hiperinsulinemija indukuje lipidne izmene u membrani eritrocita, povećavajući njihovu podložnost fagocitozi (*Zeghari i sar., 2000*). Takođe je pokazana moguća uloga hiperinsulinemije u regulaciji membranske fluidnosti eritrocita i promena reoloških karakteristika mikrocirkulacije (*Tsuda i sar., 2000; 2001*). Istovremeno, povećanje lokalne temperature verovatno dodatno menja fluidnost eritrocitne membrane. Zna se da mnoga patološka stanja (srpasta anemija, talasemija, malarija) dovode do oksidacije eritrocitne membrane, kao i do deponovanja hemina – (HE, Fe<sup>3+</sup> - oksidaciona forma hema), produkta razgradnje hemoglobina (Hb), čime se smanjuje deformabilnost eritrocita, promoviše fiksacija antitelo-komplement, narušava membranska asimetrija, što sve dovodi do preranog uklanjanja eritrocita od strane RES makrofaga (*Hebbel, 1991; Turrini i sar., 1992; Dondorp i sar., 1999*).

Drugo moguće objašnjenje je vezano za metaboličke zahteve samih adipocita, njihovu potrebu za hem prostetičkom grupom Hb, koja je neophodna za mnoge metaloproteine važne, između ostalog i za funkcionisanje mitohondrija (citohrom *c*, npr.). Ovo se objašnjenje međutim, čini manje verovatnim, jer se kod većine EFA uočavaju znaci citotoksičnosti, degradacije organela, a nije retkost ni smrt same ćelije.

U literaturi su opisana dva morfološka tipa unutarćelijske degradacije eritrocita – granularni (*Wheatley, 1968; Zeligs, 1977; Falini i sar., 1980*), koji se karakteriše postepenom razgradnjom eritrocita na materijal granularne forme uz gubitak plazma membrane; kao i hemolitički tip (*Pictet i sar., 1969; Simon i Burke, 1970; Sasaki, 1990*), kod kojeg dolazi do progresivnog i homogenog smanjenja gustine matriksa eritrocita. Kod tretmana insulinom, uočena su oba tipa razgradnje, čak i kod iste ćelije, što može biti objašnjeno činjenicom da se kod mrkih adipocita nalaze različite populacije lizozoma, zbog nekordinisane sinteze lizozomskih enzima (*Desautels i sar., 1990*). Takođe je moguće da je hemolitička degradacija eritrocita uzrokovana njihovim osmotskim bubrenjem u fagozomima, što ipak ne



objašnjava zašto se u jednoj istoj ćeliji javljaju oba tipa razgradnje. Moguće je da hemolitička degradacija eritrocita nastaje naknadno, usled kumulativnog citotoksičnog efekta prethodno nagomilanih produkata granularne razgradnje, što uzrokuje bubrenje kako eritrocita, tako i ćelijskih organela, prvenstveno mitohondrija, što je zaista uočljivo već na nivou svetlosne mikroskopije. Drugo objašnjenje je vezano za stanje u kojem se eritrocit nalazi u momentu fagocitoze, da li se radi o eritrocitima koji su prethodno iz lumena dospeli u intersticijum, gde su verovatno pretrpeli izvesne metaboličke preturbacije, a potom su naknadno uneti u EFA; ili se pak radi o onima koji su direktno iz lumena fagocitirani od strane mrkih EFA.

Na nivou TEM, u EFA je evidentno povećanje citosolne koncentracije feritina, proteina koji vrši deponovanje gvožđa u višku. Distribucija feritina nije vezana za tip degradacije eritrocita i slična je distribuciji kod ostalih ćelijskih tipova (*Fedorko i sar., 1973; Zeligs, 1977*), a povećanje se uočava uporedno sa progresijom degradacije eritrocita i to prvenstveno uz eritrofagozome, ali i u okviru samih fagozoma, sekundarnih lizozoma i lipofuscinskih granula, što ukazuje na povećanje unutarćelijske koncentracije gvožđa, koji se onda deponuje u feritinu, u cilju protekcije ćelije od izrazite toksičnosti redoks-aktivnog nevezanog gvožđa.

Uklanjanje eritrocita fagocitozom je evidentno toksično za sam adipocit. Na nivou TEM, brojni su znaci degradacije organela, njihove autofagocitoze ili citosolne razgradnje, uvećava se broj sekundarnih lizozoma i lipofuscinskih granula, a nije retka ni smrt ovih adipocita. Takođe, uočava se da su mitohondrije ovih ćelija uvećane, što može ukazivati na njihovo bubrenje, u skladu sa mogućim bubrenjem eritrocita koji se razgrađuju hemolitički. Promene se uočavaju i na nivou enzima antioksidativne odbrane u EFA; povećana je imunoekspresija katalaze i SOD izoformi (CuZnSOD i MnSOD) koje se lokalizuju oko (CuZnSOD) i u (MnSOD) mitohondrijama i to neuniformno, tj. postoji heterogenost među ovim organelama kada je u pitanju prisustvo navedenih enzima. To je u skladu sa zapaženom različitošću stepena eritrofagocitozom-indukovanih oštećenja među mitohondrijama jedne ćelije. Povećanje ekspresije enzima antioksidativne odbrane može se smatrati kompenzatornim odgovorom ovog sistema na povećan oksidativni pritisak uzrokovan eritrofagocitozom. Naime, *in vitro* studije su pokazale da masivna eritrofagocitoza utiče toksično na fagocite (*Kaye i Hook, 1963; Loegering i sar., 1987; Toure-Balde i sar., 1996; Helmby i sar., 2000*), dovodeći do redukcije njihove vijabilnosti, česte smrti ćelija; kao i da se prilikom eritrofagocitoze povećava oksidativni stres usled oslobađanja HE

(Cambos i Scorza, 2011). Produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS – *reactive oxygen species*, engl.) je odlika katabolizma Hb unutar fagocita. U fagozomu, Hb se oksiduje do methemoglobina što dovodi do ekvimolarne produkcije superoksida i do oslobađanja HE (Goldstein i sar., 2003; Becker i sar., 2004). Gvožđe se oslobađa putem enzimske (preko HO-1 (Goldstein i sar., 2003)) ili neenzimske (putem peroksida (O'Brien i Little, 1969)) degradacije HE. Iako i sam HE može da pokrene lipidnu peroksidaciju (O'Brien i Little, 1969), oksidativna oštećenja nastaju i usled ROS produkovanih u Fentonovoj reakciji, koju katalizuje slobodno gvožđe (Gutteridge, 1986). U saglasnosti sa ovim rezultatima je i naš, koji pokazuje indukciju ekspresije HO-1, koja predstavlja moćan sistem za detoksikaciju HE (Kumar i Bandyopadhyay, 2005), u EFA i okolnim makrofagama. Međutim, uprkos aktivaciji, ovaj zaštitni sistem ponekad nije dovoljan za detoksikaciju kod velikih količina Hb/HE, kao što je to kod masivne eritrofagocitoze, pa nastala oksidativna oštećenja dovode često do smrti ćelije, kako je pokazano i u našoj studiji. ROS mogu da dovedu do destabilizacije mitohondrijalne membrane (Simon i sar., 2000) što takođe može biti uzrok ćelijske smrti usled oslobađanja „molekula smrti“ (citohrom *c*, apoptoza-indukujući faktor (AIF), endonukleaza G itd. (Elmore, 2007)) i verovatno predstavlja direktan uzrok za bubrenje i oštećenja mitohondrija koje često uočavamo kod EFA u BAT.

Činjenica da mrki adipociti sa funkcijom eritrofagocitoze visoko ekspimiraju marker makrofagne infiltracije, MIP-3 $\beta$ , kao i da se u ovim regionima nalaze aktivirane makrofage koje takođe vrše eritrofagocitozu, ali i uklanjaju oštećene i uginule EFA; ide u prilog pretpostavci da se mrki adipociti i makrofage u BAT udruženo aktiviraju u svrhu istog procesa – uklanjanja ekstravaziranih eritrocita u mikrohemoragijskim regionima, čija se masivnost povećava kod tretmana insulinom. *In vitro* studije su pokazale da preadipociti mogu da se ponašaju i/ili da se transformišu u fagocite (Cousin i sar., 1999; Charriere i sar., 2003), ukazujući na bliskost ovih ćelijskih linija, kao i na mogućnost da su EFA ustvari preadipociti, čemu u prilog govori: redovno prisustvo preadipocita u regionima eritrofagocitoze, činjenica da EFA uglavnom imaju manji broj sitnih lipidnih tela, da ekspimiraju Ki-67 marker proliferacije, kao i da, slično adipocitima, u znatno većoj meri unose insulin i IR-P u svoju citoplazmu i nukleuse, mnogo više od zrelih mrkih adipocita.

### 5.3.3. Lipofuscinogeneza

Naši ultrastrukturni i rezultati na nivou fluorescentne mikroskopije pokazuju da hiperinsulinemija dovodi do povećanja akumulacije nerazgradivog, autofluorescirajućeg,

polimernog produkta – lipofuscina, u mrkim adipocitima pacova. Lipofuscin mrkih adipocita pokazuje svojstva autofluorescence nakon ekscitacije plavom (488 nm) i crvenom (633 nm), ali ne i zelenom svetlošću (543 nm). Ova svojstva lipofuscina zavise od prirode materijala koji sadrži i vrste ćelije u kojoj se stvara. Tako, Nakae i saradnici (2001) pokazuju autofluorescencu lipofuscina u ćelijama mišića dijafragme nakon ekscitacije plavom i zelenom svetlošću. Brunk i Terman (2002a) su takođe pokazali da lipofuscin fluorescira nakon ekscitacije plavom, ali i UV i zelenom svetlošću. Prava hemijska struktura fluorescirajućeg materijala (fluorofora) lipofuscina nije poznata, mada se smatra da ga čine produkti lipidne peroksidacije.

Nastanak lipofuscina je veoma kompleksan proces koji uključuje mitohondrije, lizozomski sistem, kao i različite produkte proteinske oksidacije i lipidne peroksidacije (Brunk i Terman, 2002b; Terman i sar., 2010) koji se, zbog nemogućnosti razgradnje i uklanjanja iz ćelije akumuliraju unutar ćelija (Terman i Brunk, 1998a; b). U mrkim adipocitima, uočene lipofuscinske granule, predstavljaju komplekse lipida i pigmentnog materijala, unutar tipične lizozomske membrane, čije je poreklo uglavnom od oštećenih ćelijskih komponenti, prvenstveno mitohondrija i lipidnih tela. Brojne mitohondrijske strukturne alteracije koje smo uočili (bubrenje, dezorganizacija, namotavanje i vezikulacija kristi, mitofagija i fuzija sa lizozomima), ukazuju na mitohondrijsko poreklo lipofuscina, što je u skladu sa rezultatima drugih laboratorija koje su pokazale prisustvo mitohondrijskog proteina ATP sintazne subjediniče *c* u lipofuscinu (Ezaki i sar., 1995a; Elleder i sar., 1997).

Akumulacija lipidnih tela u lipofuscinskim granulama mrkih adipocita hiperinsulinemičnih pacova, koju smo pokazali na ultrastrukturnom nivou, moguća je posledica uklanjanja lipida, što može dovesti do lipotoksičnosti i lipidne peroksidacije u ćeliji. S obzirom na poznati lipogeni efekat insulina (Deshaies i sar., 1991; Wang i Sul, 1998), o čemu svedoči povećana lipogeneza u mrkim adipocitima hiperinsulinemičnih pacova, moguće je da u izostanku signala za aktivaciju termogeneze dolazi do gomilanja neoksidovanih lipida, što utiče na izmenu strukture i funkcije mitohondrija. Jača imunohistohemijska reakcija na 4-HNE-proteinske adukte u mrkim adipocitima hiperinsulinemičnih pacova potvrđuje pretpostavke o povećanoj lipidnoj peroksidaciji. Naime, 4-HNE i malondialdehid (MDA) pripadaju grupi krajnjih produkata lipidne peroksidacije koji teže da povezuju različite proteinske rezidue u lizozomima, čime nastaju nerazgradivi polimeri lipofuscina (Brunk i Terman, 2002a). Skorašnja istraživanja su pokazala da 4-HNE i MDA mogu direktno da inaktiviraju lizozomske enzime, tzv. cistein katepsine

putem kovalentnog vezivanja za aktivno mesto što dovodi do prevođenja proteolitičkih supstrata lizozomskih enzima u njihove kompetitivne inhibitore (*Krohne i sar., 2010*).

Dakle, iako je lizozomska degradacija brza i efikasna, ona nije uvek potpuna (*Terman i sar., 2007*), pa čak i u fiziološkim uslovima dolazi do gvoždem-katalizovane peroksidacije koja rezultira u sporijoj akumulaciji lipofuscina (*Brunk i Terman, 2002a*). Povećan nivo lipidne peroksidacije koji detektujemo u mrkim adipocitima hiperinsulinemičnih pacova, moguća je posledica povećane produkcije ROS, prvenstveno  $H_2O_2$ , koji u sadejstvu sa gvoždem u njegovom fero ( $Fe^{2+}$ ) stanju indukuje lipidnu peroksidaciju, naročito u redukujućim, kiselim uslovima koji vladaju u lizozomima (*Terman i sar., 2007; Kurz i sar., 2008*). Štaviše, pokazano je da sam  $H_2O_2$  u koncentracijama koje normalno dovode do apoptoze ili nekroze nema efekata na ćeliju u prisustvu helatora gvožđa (*Kurz i Brunk, 2009*), što dokazuje da  $H_2O_2$  *per se*, ne pokazuje značajniju toksičnost već da se ona javlja tek u sadejstvu sa gvoždem. Takođe, nastanak lipofuscina značajno se povećava pri dodavanju gvožđa i obrnuto, značajno se otežava nakon tretmana helatorima gvožđa (*Marzabadi i Lhaas, 1996*). Naši rezultati pokazuju da se udeo gvožđa u BAT hiperinsulinemičnih pacova povećava u poređenju sa kontrolnim životinjama, o čemu svedoči i prethodno pokazan histološki dokaz povećanja adipocitne akumulacije gvožđa u BAT pri tretmanu insulinom (*Korac i sar., 2003*).

U ćeliji, gvožđe se konstantno reciklira iz ostarelih, gvoždem-bogatih organela, kao što su to mitohondrije i koristi za izgradnju novih organela. Izvor gvožđa u mrkim adipocitima mogu biti metaloproteini poput citohroma **c** poreklom iz mitohondrija koje se razgrađuju u procesu mitofagije (*Ezaki i sar., 1995b; Elleder i sar., 1997*) ali i Hb, s obzirom na izraženu eritrofagozomsku aktivnost ovih ćelija, naročito u uslovima hiperinsulinemije (*Grubic i sar., 2008*). Naime, pokazano je da povećan nivo eritrofagocitoze dovodi do akumulacije gvožđa (*Otogawa i sar., 2007*), o čemu svedoče i naše imunohistohemijske analize BAT koja pokazuje da se u ćelijama koje akumuliraju gvožđe, prvenstveno u EFA i makrofagama, povećava ekspresija HO, kako konstitutivne (HO-2), tako i inducibilne (HO-1) izoforme, koje razgradnjom hem prostetičke grupe daju gvožđe, bilirubin i ugljenik monoksid (CO) (*Kikuchi i sar., 2005*).

Nevezano gvožđe može biti veoma redoks-aktivno, dovodeći do oštećenja gotovo svih ćelijskih komponenti, što može dovesti do smrti ćelija, pa i celog organizma. Zbog toga je unos i metabolizam gvožđa veoma precizno kontrolisan i većina ćelija ne može efikasno da ukloni višak istog. Čak i kada se mala količina nevezanog gvožđa nađe u ćeliji,

ono se većinski bezbedno deponuje u vidu redoks-neaktivne forme u okviru citosolnog proteina feritina (*Kurç i sar., 2011*). Ultrastruktorno, uočeno je da hiperinsulinemija dovodi do povećanja količine feritina u EFA hiperinsulinemičnih pacova. Gvožđe koje se deponuje u feritinu oslobađa se u lizozomima, a ovaj je proces važna komponenta njegove ćelijske homeostaze (*Asano i sar., 2011*) pošto se tu obavlja najveći deo njegove reciklaže (*Kurç i sar., 2011*). Povećana akumulacija gvožđa u ovom kompartmentu čini ćelije mnogo podložnijim oksidativnom stresu i lipidnoj peroksidaciji (*Sakaida i sar., 1990; Baynes, 1996; Yuan i sar., 1996; Yu i sar., 2003*). S obzirom da je pokazano da su kancerske ćelije otporne na toksična dejstva gvožđa, pretpostavlja se da upravo izostanak prenosa feritina do lizozoma u uslovima povećane koncentracije gvožđa štiti ćeliju od smrti uzrokovane oksidativnim oštećenjima koje indukuje gvožđe (*Asano i sar., 2011*).

Kako se čini, tretman insulinom afektuje lizozomski enzimski sistem u BAT pacova putem menjanja nivoa enzima (*Obno i sar., 1996*) što može dovesti do poremećaja aktivnosti lizozoma kao i do akumulacije lipofuscina. S obzirom na nerazgradivost lipofuscina, to dovodi do trajne blokade lizozoma, iako i dalje primaju enzime u pokušaju da ga razgrade. Postepeno, raste blokada sve većeg broja lizozoma, pa ćelija nije u stanju da odstrani oštećene organele i makromolekule (*Terman i sar., 2007*). Naša ultrastruktorna studija, u skladu sa ovim tvrdnjama, pokazuje povećanje udela nabubrelih i oštećenih mitohondrija u citoplazmi, verovatno usled smanjenog autofagocitnog kapaciteta ćelije usled trajne blokade lizozoma lipofuscinom (*Ermini, 1976; Beregi i sar., 1988; Terman i sar., 2003*). Sem toga, lipofuscin *per se* može da utiče na smanjenje proteolitičkog kapaciteta ćelije (*Szweida i sar., 2003; Hohn i sar., 2011*). Kako je ranije pokazano, lipofuscin povećava osetljivost ćelije na oksidativni stres (*Terman i sar., 1999*), putem indukcije ruptur lizozoma i ćelijske smrti, najverovatnije usled povećanja količine gvožđa u lipofuscinskim granulama (*Terman i sar., 1999*).

Naši rezultati dakle, jasno ukazuju na povećanu lipofuscinogenezu u mrkim adipocitima hiperinsulinemičnih pacova, usled povećane lipidne peroksidacije, nagomilavanja gvožđa, kao i usled oštećenja mitohondrija (koje je i samo posledica lipidne peroksidacije i akumulacije gvožđa).

## 5.4. ANTIOKSIDATIVNA ODBRANA U MRKOM MASNOM TKIVU U USLOVIMA HIPERINSULINEMIJE

Povećanje metaboličke aktivnosti BAT neizbežno dovodi do povećanja koncentracije reaktivnih kiseoničnih (ROS) i azotnih vrsta (RNS – *reactive nitrogen species*, engl.), koji mogu dovesti do ozbiljnih ćelijskih i tkivnih oštećenja. Međutim, brojna istraživanja koja su sprovedena u poslednjih desetak godina, pokazala su da je većina procesa koji su uključeni u termogeni odgovor BAT redoks-senzitivna, tj. regulisana reaktivnim vrstama (*Saba i sar., 1996; Nisoli i sar., 1998; Petrovic i sar., 2005*). To se naročito odnosi na ROS i, među RNS, na NO, koji utiče na signalnu kaskadu uključenu u regulaciju termogeneze BAT (*Otasevic i sar., 2011*). Tokom poslednjih godina, pokazano je da produkti lipidne peroksidacije mogu uticati na biološke procese, kako putem indukcije adaptivnog odgovora i samim tim, tolerancije na oksidativni stres, tako i direktno, reagujući sa proteinima, uključujući tu i UCP izoforme (*Echtay i sar., 2003*). U tom kontekstu, čini se da finalni odgovor ćelije zavisi od koncentracije reaktivnih vrsta i njihovih produkata oksidacije (*Otasevic i sar., 2011*). Iz tog razloga, enzimi uključeni u metabolizam reaktivnih vrsta su od suštinskog značaja u regulaciji unutarćelijskog redoks statusa, putem regulacije ROS i RNS produkcije i uklanjanja. Antioksidativna odbrana se stoga smatra jednim od najvažnijih faktora za očuvanje redoks homeostaze, ne samo sa aspekta zaštite ćelije, već i sa aspekta održanja unutarćelijskog “mirujućeg” nivoa reaktivnih vrsta (*Hallinwell i Gutteridge, 1990; Buzadzic i sar., 1997; Otasevic i sar., 2011*).

U našoj studiji, uočava se povećanje proteinske ekspresije izoformi SOD, izraženije kod tretmana visokom dozom insulina, što se naročito odnosi na MnSOD. To je posebno uočljivo kod akutnog tretmana visokom dozom insulina gde je tkivna ekspresija MnSOD vrlo visoka i homogeno distribuirana među mrkim adipocitima. Zapaženo povećanje ekspresije MnSOD - mitohondrijske izoforme SOD, nakon akutnog tretmana visokom dozom insulina, u skladu je sa stimulacijom mitohondriogeneze i povećanom Vv mitohondrija. Pored intenzivirane mitohondriogeneze, opisani procesi indukovani tretmanom insulinom uključujući povećanu eritrofagocitozu, metaboličku aktivnost itd. ukazuju na mogućnost visoke produkcije ROS u BAT hiperinsulinemičnih pacova. Stoga je uočeni adaptivni odgovor SOD enzima ključan za održanje redoks homeostaze, i samim tim redoks-senzitivnih procesa, u BAT u uslovima hiperinsulinemije. Značaj adekvatnog odgovora antioksidativne odbrane na povećani oksidativni pritisak za normalno

funkcionisanje BAT, jasno je opisan u uslovima povećane metaboličke aktivnosti tkiva, kao što je slučaj pri izlaganju hladnoći (Petrovic i sar., 2006).

## 5.5. UTICAJ HIPERINSULINEMIJE NA RAZVOJ INFLAMACIJE I INSULINSKE REZISTENCE U MRKOM MASNOM TKIVU

Određena fiziološka stanja mogu dovesti do IRes u BAT. Kod trudnih ženki pacova recimo, smanjuje se insulinom-indukovano iskorišćavanje glukoze u BAT, što ukazuje na moguću ulogu ovog tkiva u IRes karakterističnoj za kasnu trudnoću (Ferre i sar., 1986), čime se glukozni supstrat preusmerava na sintezu komponenti neophodnih za sintezu mleka u mlečnim žlezdama. Takođe, odgovor na insulin u BAT se smanjuje kod gojaznih pacova (Ferre i sar., 1986) što sve ukazuje na značaj BAT u sveukupnoj kontroli glukozne homeostaze.

Studija na miševima sa BAT-specifičnim *knockout*-om IR (BATIRKO miševi) (Guerra i sar., 2001) pokazala je dva potencijalno važna aspekta IRes u ovom tkivu u vezi sa glukoznom homeostazom celog organizma. Prvo, insulin ima važnu ulogu u razvoju i održavanju BAT, kao što je i ranije pokazano na *in vivo* i *in vitro* modelima. Stoga, ove životinje pokazuju značajnu atrofiju BAT, što dalje dovodi do značajne redukcije u ekspresiji lipogenih gena; i drugo, ove životinje razvijaju dijabetični fenotip bez periferne IRes, ali sa blagim smanjenjem mase  $\beta$  ćelija pankreasa, kao i sa poremećajem insulinske sekrecije u odgovoru na unos glukoze. BATIRKO miševi dakle, pokazuju da disregulacija adipo-insularne ose zbog deficita IR u BAT utiče na homeostazu glukoze.

Više različitih faktora koje luči masno tkivo (citokini, faktori rasta, slobodne masne kiseline) mogu da utiču na procese koji su regulisani insulinom, gde spadaju i homeostaza glukoze, kao i metabolizam lipida (Ryden i sar., 2002; Arner, 2003). Jedan od njih je i TNF- $\alpha$  za koji se smatra da predstavlja vezu između adipoznosti i razvoja IRes pošto: 1) je većina osoba sa T2D gojazna; 2) TNF- $\alpha$  je visoko ekspimiran u adipoznom tkivu gojaznih životinja i ljudi (Hotamisligil i sar., 1993; Hofmann i sar., 1994; Hotamisligil i sar., 1995; Kern i sar., 1995; Saghizadeh i sar., 1996); i 3) gojazni miševi bez TNF- $\alpha$  ili bez njegovog receptora, ne razvijaju IRes (Uysal i sar., 1997; Uysal i sar., 1998). Aplikacija TNF- $\alpha$  kod odraslih pacova smanjuje sistemsku insulinsku senzitivnost usled favorizovanja ekspresije adipocitnih gena uključenih u otpuštanje slobodnih masnih kiselina (Ruan i sar., 2002). Direktno izlaganje izolovanih ćelija TNF- $\alpha$  inhibira insulinsku signalizaciju i indukuje stanje IRes kod različitih ćelija *in vitro*, uključujući 3T3-L1 i humane primarne adipocite

(*Hotamisligil i sar., 1994; Liu i sar., 1998; Wang i sar., 1998*) putem mehanizama koji uključuju inhibiciju Tyr-fosforilazne aktivnosti IR (*Feinstein i sar., 1993; Hotamisligil i sar., 1996; Sykietis i Papavasiliou, 2001*).

Naša studija pokazuje da hiperinsulinemija dovodi do povećanja TNF- $\alpha$  imunoekspresije u unilokulusnim adipocitima, preadipocitima i sporadičnim multilokulusnim adipocitima, uz intenzifikaciju harlekin efekta. Pokazano je da TNF- $\alpha$  indukuje apoptozu mrkih i belih adipocita *in vitro* (*Nisoli i sar., 1997a; Porras i sar., 1997; Prins i sar., 1997*) i *in vivo* (*Nisoli i sar., 2000*), a naši rezultati ukazuju i na moguću uključenost u apoptozu endotelskih ćelija u BAT kod hiperinsulinemije (*Markelic i sar., 2011*). To može dovesti do funkcionalne atrofije BAT, kakva se sreće kod gojaznosti. Sem apoptoze, pokazano je da TNF- $\alpha$  inhibira i ekspresiju  $\beta_3$ -AR i UCP1, što doprinosi smanjenju termoadaptivnog odgovora (*Nisoli i sar., 2000; Valladares i sar., 2001*). Takođe, TNF- $\alpha$  deluje kao negativni regulator diferencijacije i indukuje IRes u BAT u vezi sa unosom glukoze i GLUT4 translokacijom na plazma membranu (*Teruel i sar., 2001*), a ima i anti-adipogeno dejstvo jer inhibira efekat insulina na indukciju više adipogenih iRNK markera i smanjuje ekspresiju C/EBP- $\alpha$  i  $\beta$  iRNK (*Valverde i sar., 1998*). Na molekulskom nivou, negativno dejstvo TNF- $\alpha$  na mrke adipocite je izgleda u vezi sa hipofosforilacijom IR u odgovoru na insulin, kao i sa hipofosforilacijom IRS-2 (*Valverde i sar., 1998*) koji, za razliku od adipogene, termogene i proliferativne uloge IRS-1 u stimulaciji insulinom, ima ključnu ulogu u unosu glukoze putem GLUT4 (*Fassbauer i sar., 2000*). Sem navedenih, i aktivacija drugih medijatora u odgovoru na TNF- $\alpha$ , kao što su stres kinaze i inflamatorni putevi, može učestvovati u IRes mrkih adipocita.

Iz svega navedenog, može se zaključiti da hiperinsulinemijom-indukovana stimulacija TNF- $\alpha$  ekspresije kod preadipocita i pojedinačnih multilokulusnih adipocita BAT, predstavlja mehanizam uključen u regulaciju adekvatnog odgovora BAT u uslovima izmenjene homeostaze. Pored toga, pokazali smo i pojačanje ekspresije proinflamatornog citokina - IL-6, makrofagnog atraktanta - MIP-3 $\beta$  i NF-kB u pojedinačnim ćelijama, koji se dovode u pozitivnu vezu sa razvojem IRes (*Shoelson i sar., 2006*). Da li se zaista radi o razvoju lokalne inflamacije, nije sasvim jasno. S obzirom da po definiciji inflamacija ukazuje na uključenost ćelija imunskog sistema, tkivna slika BAT hiperinsulinemičnih pacova govori da se ne radi o inflamaciji. Stav da ekspresija molekula koji se pojačano eksprimiraju kod inflamacije, uvek znači i inflamaciju, čini se pogrešnim. Naši rezultati ukazuju na njihovu uključenost u regulaciji odgovora ćelije na delovanje različitih stimulusa, gde oni u



zavisnosti od jačine stimulusa, mogu da pojačaju svoju ekspresiju i dovedu do strukturnog i funkcijskog remodeliranja, koje, u uslovima hiperinsulinemije može da podrazumeva: lokalnu indukciju smrti adipocita i endotelskih ćelija, smanjenje termogenog odgovora ćelije i eventualno, smanjenje insulinske senzitivnosti ćelija.

## 5.6. SPECIFIČNOSTI ČELIJA U MRKOM MASNOM TKIVU HIPERINSULINEMIČNIH PACOVA

### 5.6.1. Unilokusni adipociti mrkog masnog tkiva – više od mirujućih depoa lipida?

Osnovna podela sisarskih adipocita, u vezi sa strukturom i funkcijom tkiva kojem pripadaju na bele, unilokusne koji deponuju višak hranom-unete energije u vidu triglicerida; i mrke, multilokusne sa funkcijom NST; dovela je do stava da su unilokusni adipociti koji se sreću u BAT, ustvari beli adipociti koji ne ekspimiraju UCP1 (*Sbarbati i sar., 1991; Cinti, 2009*), pošto se ovaj protein smatra ekskluzivnim markerom mrkih adipocita (*Cannon i sar., 1982; Cinti i sar., 1989; Ricquier i sar., 1991; Cannon i Nedergaard, 2004*). Neki naučnici pokazuju mogućnost reverzibilne konverzije između „belog“ i „mrkog“ fenotipa u WAT i BAT, u zavisnosti od potreba organizma (*Frontini i Cinti, 2010; Petrovic i sar., 2010a*), pri čemu se ukazuje na mogućnost transformacije adultnih ćelija, u procesu tzv. fiziološke transdiferencijacije (*Himms-Hagen i sar., 2000; Granneman i sar., 2005*) koja podrazumeva kako genetsko reprogramiranje, tako i tkivnu reorganizaciju uz promene u Vv kapilara i nervnih vlakana (*Murano i sar., 2009*).

Naši imunohistohemijski rezultati pokazuju da unilokusni adipociti BAT pacova ekspimiraju UCP1 protein u svojim mitohondrijama nevezano od eksperimentalnog tretmana, pa se shodno tome, mogu smatrati mrkim adipocitima, tj. adipoznim ćelijama sa termogenim kapacitetom. Pored UCP1, i imunoekspresija PGC-1 $\alpha$  markera mitohondrijske biogeneze je jaka kod unilokusnih adipocita, čak i kod hroničnog tretmana visokom dozom insulina, gde se ekspresija u multilokusnim adipocitima smanjuje. Markeri povećane lipidne peroksidacije (4-HNE) i nitrozilacije proteina (nitrotirozin) su takođe visoko ekspimirani u ovim ćelijama, ukazujući na visoku metaboličku aktivnost, shodno kojoj je visok i nivo ekspresije SOD izoformi, posebno MnSOD u uslovima hiperinsulinemije. Sve to ukazuje na povećan nivo produkcije reaktivnih vrsta u unilokusnim adipocitima, što ne ide u prilog dosadašnjem mišljenju da su ove ćelije zapravo mirujuće rezerve lipida.

Pored toga, ove ćelije visoko ekspimiraju VEGF marker angiogeneze, što može ukazivati da povećana lipogeneza i veća adipoznost mrkih adipocita (čiji je krajnji stupanj unilokularnost), koja se beleži pri hiperinsulinemiji, stimuliše razvoj kapilarne mreže, kako bi se ispratio hipertrofijom indukovani rast BAT. Takođe, hiperinsulinemija indukuje i jak unos insulina i IR-P u njihovu citoplazmu, i translokaciju istih u nukleus, ukazujući na

moćući značaj signalnih puteva insulina u funkciji unilokulusnih adipocita. Jedna od njih sigurno je i lipogeneza, što ukazuje na mogućnost da translokacija insulina i IR-P u nukleus ima ulogu u ovom procesu. Međutim, pravi značaj translokacije insulina, IR-P i IRS-1 u nukleuse mrkih adipocita, tek treba da bude razjašnjen.

Zanimljivo, i ekspresija TNF- $\alpha$ , za koji se smatra da deluje negativno na adipogenezu, jer inhibira efekat insulina na indukciju više adipogenih markera (*Valverde i sar., 1998*) i UCP1 (*Valladares i sar., 2001*), je povećana u ovim ćelijama, i to naročito kod hiperinsulinemičnih pacova, ukazujući na mogućnost sprege između pojačanog unosa insulina i inhibicije njegovih dejstava putem TNF- $\alpha$ , čime se objašnjava, barem delimično, veza između adipoznosti i IRes. Lokalno povećanje ekspresije TNF- $\alpha$  proteina u pojedinačnim ćelijama BAT u uslovima hiperinsulinemije, najverovatnije umanjuje dejstvo insulina na ove ćelije, i smanjuje njihovu senzitivnost na insulin, a samim tim sprečava dalje gomilanje lipida.

Sumarno, unilokulusni mrki adipociti su, sudeći po ekspresiji navedenih proteina i proteinskih adukata, mnogo više od pasivnih rezervoara triglicerida, i naši podaci ukazuju na njihovu visoku metaboličku aktivnost i uključenost u odgovor tkiva na dejstvo važnih stimulusa, kao što je insulin.

### 5.6.2. Preadipociti mrkog masnog tkiva

Uprkos značajnom napretku u definisanju adipocitne transkripcione kontrole, podaci o identitetu i lokalizaciji adipocitnih prekursorskih ćelija *in vivo* još uvek su oskudni. Hiperinsulinemija, kao što smo pokazali, povećava masu BAT, ne samo putem stimulacije fizičkog uvećanja postojećih adipocita, već i putem stimulacije adipogeneze, o čemu svedoči i veća učestalost preadipocita u tkivu kod hiperinsulinemičnih pacova. Po svojoj strukturi preadipociti uočeni u našoj ultrastrukturnoj studiji, odgovaraju definiciji Geloena i saradnika (*Geloen i sar., 1990*), to su poliugaone ćelije, sitnije od mrkih adipocita među kojima se nalaze, sa nastavcima koji se pružaju među okolnim ćelijama. Na prvom mestu se razlikuju po manjoj količini sitnih lipidnih tela i malobrojnim mitohondrijama sa slabije razvijenim sistemom kristi. Imunohistohemijski, o njihovoj proliferativnoj aktivnosti govori povećana ekspresija Ki-67 markera proliferacije. Kao što je već rečeno, često se uočavaju uz krvne sudove i aktivirane endotelske ćelije, a imunohistohemijska detekcija vWF endotelskog markera u preadipocitima, ukazuje na mogućnost zajedničkog porekla. Takođe, u regionima eritrofagocitne aktivnosti se često uočavaju, što može ukazivati na

moću transformaciju ovih ćelija u eritrofagocitne ćelije, s obzirom da EFA poseduju malu količinu lipidnih tela kao i preadipociti, da ekspimiraju Ki-67 marker proliferacije, i da i jedni i drugi ekspimiraju visok nivo VEGF, što je u skladu sa prethodnim studijama koje pokazuju fagocitnu transformaciju preadipocita (*Cousin i sar., 1999; Charriere i sar., 2003*). Visok nivo VEGF proteinske ekspresije u preadipocitima takođe ukazuje na značaj usklađenosti procesa adipo- i angiogeneze u BAT. Moguće je da stimulacijom angiogeneze, preadipociti stimulišu i povećanje endotelske permeabilnosti, što može da bude objašnjenje za pojavu ekstrasvazacije eritrocita u regionima adipogeneze.

IRS-1 se smatra glavnim molekulom uključenim u insulinsku signalizaciju nizvodno od IR, koji deluje putem aktivacije PI3K (*Fassbauer i sar., 2001; Miki i sar., 2001*) koja je neophodna za stimulaciju sinteze lipida u mrkim adipocitima pod dejstvom insulina (*Valverde i sar., 2005*). Takođe, IRS-1 je ključan u medijaciji insulinom-indukovane termogene genske ekspresije u mrkim adipocitima, pošto IRS-1<sup>-/-</sup> mrki adipociti nisu u stanju da povećaju ekspresiju UCP1 nakon stimulacije insulinom (*Valverde i sar., 2005*). Naši podaci nisu u skladu sa ovim studijama, s obzirom da, inače visoka u zrelih mrkim adipocitima, ekspresija IRS-1 proteina u preadipocitima izostaje. To je u skladu sa studijom na fetalnim mrkim adipocitima bez IGF-1 receptora, koja pokazuje da IRS-1 nije u stanju da pokrene insulinom-stimulisanu UCP1 ekspresiju, niti ekspresiju adipogenih gena (*Mur i sar., 2002; Mur i sar., 2003*) što ukazuje da IR put nije ekskluzivni i jedini put delovanja insulina u mrkim adipocitima. Pošto je reakcija na insulin i IR-P vrlo visoka u citoplazmi ali i u nukleusima, to ukazuje na mogućnost da sem kanonične signalne kaskade insulina, putem vezivanja insulina za receptor čija fosforilacija zatim pokreće niz procesa, prvenstveno preko IRS-1; postoji i drugačiji mehanizam delovanja insulina na adipogenezu. Nukleusna translokacija insulina i njegovog fosforilisanog receptora otvara pitanje da li, i na koji način, ovaj hormon direktno učestvuje u genskoj regulaciji adipocitne diferencijacije? S obzirom da se ovaj fenomen sreće i kod zrelih mrkih adipocita i endotelskih ćelija u BAT kontrolnih životinja, nameće se zaključak da je ovaj proces fiziološki učesnik u ćelijskoj signalizaciji, čija uloga tek treba da bude rasvetljena.

PGC-1 $\alpha$  kao koaktivator mnogih transkripcionih faktora, i na prvom mestu, koaktivator PPAR $\gamma$  (*Puigserver i sar., 1998*), smatra se ključnim regulatorom adaptivne termogeneze, mada ne i glavnim regulatorom sazrevanja mrkih adipocita, jer je pokazano da mrki preadipociti u kulturi, bez PGC-1 $\alpha$  i -1 $\beta$  gube mogućnost mitohondriogeneze, ali bez uticaja na zadobijanje ostalih fenotipskih karakteristika zrelih adipocita (*Uldry i sar.,*

2006). Što se PGC-1 $\alpha$  tiče, naši rezultati ne pokazuju veću ekspresiju u preadipocitima u poređenju sa zrelim, multilokulusnim ćelijama, čak ukazuju da se ona smanjuje kod hronične, visoke hiperinsulinemije, kao što je slučaj sa ekspresijom u zrelim adipocitima (sa izuzetkom unilokulusnih, kod kojih je ekspresija jaka kod svih grupa), što može da ukazuje na mogućnost prekida mitohondrijalne biogeneze kod hronične visoke hiperinsulinemije, o čemu svedoče nalazi da insulin inhibira ekspresiju ovog koaktivatora (*Southgate i sar., 2005*). U prilog ovom rezultatu je i povećana TNF- $\alpha$  ekspresija u preadipocitima BAT hiperinsulinemičnih pacova, za koji je poznato da inhibira adipogenezu i doprinosi razvoju IRes, što može ukazivati na odgovor ćelije na pojačanu izloženost insulinskoj stimulaciji. Skorašnja studija pokazuje da slično povećanje ekspresije TNF- $\alpha$  u preadipocitima WAT, dovodi do inhibicije adipogeneze (*Tchkonina i sar., 2007*). Pokazana je takođe i povećana ekspresija IL-6 inflamatornog medijatora, makrofagnih atraktanata i nukleusna translokacija proinflamatornog NF-kB (*Chung i sar., 2006*) što odgovara našim rezultatima koji takođe pokazuju povećanje ekspresije IL-6, MIP-3 $\beta$  i NF-kB u citoplazmi i nukleusima preadipocita BAT, i ukazuju na njihovu uključenost u razvoj lokalne IRes.

### 5.6.3. Makrofage mrkog masnog tkiva

Mikroskopska analiza makrofagne strukture i proteinske ekspresije pokazuje da se model makrofagne infiltracije razlikuje od modela koji se sreće u WAT, gde se makrofage nagomilavaju oko adipocita, što se opisuje kao strukture nalik krunama (CLS – *crownlike structures*, engl.) (*Cinti i sar., 2005*). Kod BAT se ne sreću CLS, makrofage su uglavnom pojedinačne, mirujućeg, rezidentnog fenotipa (sa sitnim, primarnim lizozomima, bez znakova fagocitne aktivnosti). Veća zastupljenost makrofaga je u regionima apoptoze i eritrofagocitoze, gde su uključene u proces uklanjanja eritrocita i apoptotskih EFA, o čemu svedoči njihova izražena fagocitna aktivnost (proinflamatorni fenotip) i povećana ekspresija HO-1 i HO-2, koje su uključene u razgradnju Hb do CO, bilirubina i gvožđa, što može imati ulogu u supresiji smrti ćelije, inflamacije i oksidativnog stresa, s obzirom da CO i bilirubin suprimiraju ove procese, a gvožđe stimuliše sintezu feritina koji ima antioksidativnu ulogu. Sve se veći značaj pripisuje CO, koji se slično NO, smatra važnim signalnim molekulom (*Hobbs, 1997*), i koji takođe može doprineti lokalnoj vazodilataciji (*Zakbary i sar., 1996; Durante i Schafer, 1998*). U drugim regionima, makrofage uglavnom ne ekspimiraju HO, ili je njihova ekspresija vrlo niska. Retko se, čak i kod kontrolnih

životinja, perivaskularno sreću regioni masivne makrofagne infiltracije, gde se takođe uočava njihova proinflamatorna aktivnost.

Prethodno pokazan lipogeni, adipogeni i angiogeni, sumarno – većinski pozitivan efekat hiperinsulinemije na BAT, daje nam za pravo da pretpostavimo kako je uloga makrofaga u ovom tkivu prvenstveno u remodeliranju tkiva, čak i u uslovima ekstremne hiperinsulinemije. Naime, sem lokalne produkcije proinflamatornih citokina, kao i lokalne aktivacije makrofaga u regionima EFA i apoptoze prvenstveno, ne uočavamo drugi vid korelacije između hiperinsulinemije i makrofagne infiltracije u BAT.

## 6. ZAKLJUČCI

---

Rezultati studije o efektima hiperinsulinemije na BAT pacova, pokazuju da se uočeno strukturno i funkcijsko remodeliranje tkiva vrši u svrhu prilagođavanja uslovima izmenjene homeostaze koja je uzrokovana pojačanim izlaganjem fiziološkoj i suprafiziološkoj dozi insulina. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da pozitivno dejstvo hiperinsulinemije na remodeliranje BAT podrazumeva:

- Stimulaciju rasta BAT, tj. povećanje njegove mase, što je naročito izraženo pri hroničnom izlaganju kako niskoj, fiziološkoj dozi, tako i visokoj, suprafiziološkoj dozi. U osnovi povećanja mase tkiva uzrokovanog hiperinsulinemijom su:
  - Povećanje lipogeneze, koja dovodi do hipertrofije adipocita, pošto se povećava Vv adipocita, i njihova zapremina, a smanjuje se njihova brojnost u tkivu;
  - Stimulacija adipogeneze, tj. hiperplazije adipocita, o čemu svedoči povećanje broja preadipocita u tkivu;
  - Stimulacija prokrvljenosti tkiva o čemu svedoče pojačana ekspresija eNOS, koja stimuliše vazodilataciju i VEGF koji stimuliše angiogenezu, što je i uočeno na nivou mikroskopske analize.
- Stimulaciju razvoja termogenog kapaciteta tkiva, koja podrazumeva pozitivan efekat na:
  - Ekspresiju UCP1 proteina, kako na nivou pojedinačnih adipocita, tako i na nivou celog tkiva, pri čemu niska doza insulina postepeno povećava ekspresiju u tkivu, dok visoka doza dovodi do brzog odgovora UCP1 proteinske ekspresije kod većine mrkih adipocita;
  - Povećanje zastupljenosti mitohondrija u adipocitima, kako bi se ispratio rast samih adipocita;
  - Mitohondrijalnu biogenezu, posebno kod tretmana visokom dozom insulina.

S druge strane, primetno je da hiperinsulinemija, naročito kada se radi o hroničnim tretmanima i tretiranju visokom dozom insulina, uporedno sa stimulacijom hipertrofije tkiva, tj. povećanja njegove funkcijskog, tj. termogenog kapaciteta, ispoljava i citotoksične efekte na pojedine ćelije ili klastere ćelija. U tom smislu, primećeni su sledeći citotoksični i inhibitorni efekti insulina:

- Raste učestalost umiranja ćelija u tkivu, kako mrkih adipocita, tako i endotelskih ćelija;
- Povećava se učestalost ekstravazacije eritrocita koji se uklanjaju u procesu fagocitoze od strane mrkih adipocita (EFA) i makrofaga. Sam proces eritrofagocitoze je toksičan za EFA što se ogleda u intenziviranju sledećih procesa:
  - Sinteze feritinskih granula i ekspresije HO-1 i HO-2, što svedoči o povećanoj razgradnji (Hb) i rastu koncentracije gvožđa u ovim ćelijama;
  - Lizozomske degradacije i akumulacije lipofuscina u EFA;
  - Oštećenja mitohondrija i njihove degradacija;
  - Ekspresije enzima antioksidativne odbrane (katalaza, CuZnSOD i MnSOD) u EFA, što ukazuje na pojačanje produkcije ROS;
  - Umiranja EFA i njihovog uklanjanja od strane makrofaga.
- Povećava se učestalost lipofuscinogeneze u mrkim adipocitima, što ukazuje na pojačanu produkciju ROS, akumulaciju gvožđa i jaku lipidnu peroksidaciju, o čemu govori povećanje:
  - Učestalosti lipofuscinskih granula u pojedinim mrkim adipocitima koje nastaju lizozomskom degradacijom oštećenih mitohondrija i uklanjanjem lipidnih tela;
  - Ekspresije markera lipidne peroksidacije (4-HNE);
  - Procentualnog udela gvožđa u tkivu;
  - Ekspresije HO-1 i HO-2 enzima koji ukazuju na pojačano oslobađanje gvožđa u procesu razgradnje metaloproteina, prvenstveno u EFA i makrofagama;
- Takođe, uprkos rastu termogenog kapaciteta, kod hroničnog izlaganja visokoj dozi insulina, evidentno je smanjenje ekspresije PGC-1 $\alpha$ , koji se smatra važnim regulatorom mitohondrijalne biogeneze, pa se može zaključiti da produžena hiperinsulinemija ipak može da inhibira termogeni odgovor tkiva. O tome svedoči i navedeno povećanje učestalosti oštećenja mitohondrija u pojedinim mrkim adipocitima;
- Visoka doza insulina stimuliše ekspresiju enzima antioksidativne odbrane (prvenstveno MnSOD) u BAT što svedoči o visokoj produkciji ROS u uslovima suprafiziološke hiperinsulinemije;
- Pojačana ekspresija proinflamatornih citokina (TNF- $\alpha$ , IL-6), makrofagnog hemokina (MIP-3 $\beta$ ) i NF- $\kappa$ B u pojedinačnim zrelim, multilokusnim adipocitima, preadipocitima i unilokusnim adipocitima ukazuje na njihovu potencijalnu uključenost u lokalnom smanjenju insulinske senzitivnosti, tj. lokalnom razvoju IRes.



S obzirom na uočenu nukleusnu translokaciju insulina, njegovog fosforilisanog receptora, i IRS-1 u nukleuse mrkih adipocita, kao i nukleuse endotelskih ćelija, koja se pojačava pri hiperinsulinemiji, možemo zaljučiti da insulin svoje efekte na mrke adipocite i endotelske ćelije u BAT ne obavlja samo putem signalne kaskade koja otpočinje nizvodno od fosforilacije IR u ćelijskoj membrani navedenih ćelija, već i putem njihovog direktnog delovanja u različitim ćelijskim kompartmentima, a prvenstveno u nukleusu. S obzirom da je nukleusna translokacija insulina i IR-P naročito visoka u proliferišućim ćelijama – aktiviranim endotelskim ćelijama i preadipocitima, možemo zaljučiti da ovaj proces ima značaja u proliferaciji i/ili diferencijaciji endotelskih ćelija i adipocita BAT.

U vezi sa proliferativnom aktivnošću u tkivu primećeno je da su adipogeneza i angiogeneza u BAT u bliskoj vremensko-prostornoj vezi, tj. da postoji povezanost navedenih procesa, koja ukazuje na potrebu udruženog nastanka adipocita i endotelskih ćelija u svrhu efikasnog funkcionalno-strukturnog remodeliranja tkiva. Takođe, naši rezultati ukazuju i na postojanje zajedničkog porekla endotelskih ćelija i adipocita, i to od prekursora endotelskih ćelija u BAT, o čemu, pored bliske fizičke povezanosti, govore i:

- Ekspresija vWF markera endotelskih ćelija u preadipocitima i u manjoj meri, mladim adipocitima oko regiona udružene adipo/angiogeneze;
- Perivaskularna lokalizacija ovih regiona.

Sumiranjem dobijenih rezultata može se zaključiti da hiperinsulinemija ima značajan efekat na BAT – potvrđeno je anaboličko dejstvo insulina i važnost njegove uloge u stimulaciji BAT, ali je i pokazana toksičnost visokih doza na ćelije BAT. Analiza efekata hiperinsulinemije na BAT pomogla je u rasvetljavanju molekulskih mehanizama u osnovi strukturnog remodeliranja ovog tkiva. Visoka plastičnost BAT se ogleda u postojanju funkcionalnih klastera ćelija u kojima se odvijaju svi važni tkivni procesi: adipo/angiogeneza, umiranje ćelija, eritrofagocitoza. To ukazuje da iako jednostavna, tkivna organizacija BAT je pravilno uređena, potvrđujući da je strukturno remodeliranje preduslov pravilnog funkcionisanja tkiva i to ne kao izolovan proces na nivou pojedinačne ćelije, već na nivou celokupnog tkiva, kao što smo pokazali na modelu hiperinsulinemije.

# 7. LITERATURA

---

- Arany, Z., S.Y. Foo, Y. Ma, J.L. Ruas, A. Bommi-Reddy, G. Girnun, M. Cooper, D. Laznik, J. Chinsomboon, S.M. Rangwala, K.H. Baek, A. Rosenzweig, and B.M. Spiegelman. 2008. HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *Nature*. 451:1008-12.
- Arner, P. 2003. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends Endocrinol Metab*. 14:137-45.
- Asano, A., M. Morimatsu, H. Nikami, T. Yoshida, and M. Saito. 1997. Adrenergic activation of vascular endothelial growth factor mRNA expression in rat brown adipose tissue: implication in cold-induced angiogenesis. *Biochem J*. 328 (Pt 1):179-83.
- Asano, T., M. Komatsu, Y. Yamaguchi-Iwai, F. Ishikawa, N. Mizushima, and K. Iwai. 2011. Distinct mechanisms of ferritin delivery to lysosomes in iron-depleted and iron-replete cells. *Mol Cell Biol*. 31:2040-52.
- Bachman, E.S., H. Dhillon, C.Y. Zhang, S. Cinti, A.C. Bianco, B.K. Kobilka, and B.B. Lowell. 2002. betaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science*. 297:843-5.
- Banet, M., H. Hensel, and H. Liebermann. 1978. The central control of shivering and non-shivering thermogenesis in the rat. *J Physiol*. 283:569-84.
- Bar, R.S., P. Gorden, J. Roth, and C.W. Siebert. 1977. Insulin receptors in patients with insulinomas: changes in receptor affinity and concentration. *J Clin Endocrinol Metab*. 44:1210-3.
- Baskin, D.G., D.P. Figlewicz, S.C. Woods, D. Porte, Jr., and D.M. Dorsa. 1987. Insulin in the brain. *Annu Rev Physiol*. 49:335-47.
- Baynes, R.D. 1996. Assessment of iron status. *Clin Biochem*. 29:209-15.
- Becker, K., L. Tilley, J.L. Vennerstrom, D. Roberts, S. Rogerson, and H. Ginsburg. 2004. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int J Parasitol*. 34:163-89.
- Beregi, E., O. Regius, T. Huttel, and Z. Gobl. 1988. Age-related changes in the skeletal muscle cells. *Z Gerontol*. 21:83-6.
- Biondi, C., C. Cotorruello, S. Garcia Borrás, A. Ensínck, L. Racca, R. di Monaco, and A. Racca. 2001. Erythrophagocytosis assay in patients with autoimmune hemolytic anemia. *Medicina (B Aires)*. 61:49-52.
- Bouillaud, F., D. Ricquier, J. Thibault, and J. Weissenbach. 1985. Molecular approach to thermogenesis in brown adipose tissue: cDNA cloning of the mitochondrial uncoupling protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82:445-8.
- Brunk, U.T., and A. Terman. 2002a. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med*. 33:611-9.
- Brunk, U.T., and A. Terman. 2002b. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem*. 269:1996-2002.
- Bukowiecki, L., A.J. Collet, N. Folléa, G. Guay, and L. Jahjah. 1982. Brown adipose tissue hyperplasia: a fundamental mechanism of adaptation to cold and hyperphagia. *Am J Physiol*. 242:E353-9.
- Bukowiecki, L.J., A. Geloën, and A.J. Collet. 1986. Proliferation and differentiation of brown adipocytes from interstitial cells during cold acclimation. *Am J Physiol*. 250:C880-7.
- Butow, R.A., and E.M. Bahassi. 1999. Adaptive thermogenesis: orchestrating mitochondrial biogenesis. *Curr Biol*. 9:R767-9.
- Buzadzic, B., D. Blagojevic, B. Korac, Z.S. Saicic, M.B. Spasic, and V.M. Petrovic. 1997. Seasonal variation in the antioxidant defense system of the brain of the ground squirrel (*Citellus citellus*) and response to low temperature compared with rat. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*. 117:141-9.
- Cambos, M., and T. Scorza. 2011. Robust erythrophagocytosis leads to macrophage apoptosis via a hemin-mediated redox imbalance: role in hemolytic disorders. *J Leukoc Biol*. 89:159-71.
- Camp, H.S., D. Ren, and T. Leff. 2002. Adipogenesis and fat-cell function in obesity and diabetes. *Trends Mol Med*. 8:442-7.

- Cannon, B., A. Hedin, and J. Nedergaard. 1982. Exclusive occurrence of thermogenin antigen in brown adipose tissue. *FEBS Lett.* 150:129-32.
- Cannon, B., and J. Nedergaard. 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 84:277-359.
- Cannon, B., and J. Nedergaard. 2010. Metabolic consequences of the presence or absence of the thermogenic capacity of brown adipose tissue in mice (and probably in humans). *Int J Obes (Lond).* 34 Suppl 1:S7-16.
- Ceddia, R.B., W.N. William, Jr., F.B. Lima, A.R. Carpinelli, and R. Curi. 1998. Pivotal role of leptin in insulin effects. *Braz J Med Biol Res.* 31:715-22.
- Charriere, G., B. Cousin, E. Arnaud, M. Andre, F. Bacou, L. Penicaud, and L. Casteilla. 2003. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem.* 278:9850-5.
- Christiaens, V., and H.R. Lijnen. 2010. Angiogenesis and development of adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol.* 318:2-9.
- Chung, S., K. Lapoint, K. Martinez, A. Kennedy, M. Boysen Sandberg, and M.K. McIntosh. 2006. Preadipocytes mediate lipopolysaccharide-induced inflammation and insulin resistance in primary cultures of newly differentiated human adipocytes. *Endocrinology.* 147:5340-51.
- Cinti, S. 2009. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297:E977-86.
- Cinti, S., M. Cigolini, O. Bosello, and P. Bjorntorp. 1984. A morphological study of the adipocyte precursor. *J Submicrosc Cytol.* 16:243-51.
- Cinti, S., G. Mitchell, G. Barbatelli, I. Murano, E. Ceresi, E. Faloia, S. Wang, M. Fortier, A.S. Greenberg, and M.S. Obin. 2005. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res.* 46:2347-55.
- Cinti, S., C. Zancanaro, A. Sbarbati, M. Cicolini, P. Vogel, D. Ricquier, and S. Fakan. 1989. Immunoelectron microscopical identification of the uncoupling protein in brown adipose tissue mitochondria. *Biol Cell.* 67:359-62.
- Cousin, B., O. Munoz, M. Andre, A.M. Fontanilles, C. Dani, J.L. Cousin, P. Laharrague, L. Casteilla, and L. Penicaud. 1999. A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *FASEB J.* 13:305-12.
- Cristancho, A.G., and M.A. Lazar. 2011. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12:722-34.
- Cypess, A.M., S. Lehman, G. Williams, I. Tal, D. Rodman, A.B. Goldfine, F.C. Kuo, E.L. Palmer, Y.H. Tseng, A. Doria, G.M. Kolodny, and C.R. Kahn. 2009. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med.* 360:1509-17.
- Davidovic, V., R. Radojicic, G. Cvijic, S. Durasevic, and N. Petrovic. 1997. Activities of antioxidant enzymes and monoamine oxidase-A in the rat interscapular brown adipose tissue: effects of insulin and 6-hydroxydopamine. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 117:181-6.
- Del Prato, S., A. Riccio, S. Vigili de Kreutzenberg, M. Dorella, A. Avogaro, M.C. Marescotti, and A. Tiengo. 1993. Mechanisms of fasting hypoglycemia and concomitant insulin resistance in insulinoma patients. *Metabolism.* 42:24-9.
- Delaby, C., N. Pilard, G. Hetet, F. Driss, B. Grandchamp, C. Beaumont, and F. Canonne-Hergaux. 2005. A physiological model to study iron recycling in macrophages. *Exp Cell Res.* 310:43-53.
- Desautels, M., E. Michalska, and B. Mozaffari. 1990. Role of acid proteases in brown adipose tissue atrophy caused by fasting in mice. *Biochem Cell Biol.* 68:441-7.
- Deshaias, Y., A. Geloan, A. Paulin, and L.J. Bukowiecki. 1991. Restoration of lipoprotein lipase activity in insulin-deficient rats by insulin infusion is tissue-specific. *Can J Physiol Pharmacol.* 69:746-51.
- Dondorp, A.M., K.T. Chotivanich, S. Fucharoen, K. Silamut, J. Vreeken, P.A. Kager, and N.J. White. 1999. Red cell deformability, splenic function and anaemia in thalassaemia. *Br J Haematol.* 105:505-8.
- Durante, W., and A.I. Schafer. 1998. Carbon monoxide and vascular cell function (review). *Int J Mol Med.* 2:255-62.
- Echtay, K.S., T.C. Esteves, J.L. Pakay, M.B. Jekabsons, A.J. Lambert, M. Portero-Otin, R. Pamplona, A.J. Vidal-Puig, S. Wang, S.J. Roebuck, and M.D. Brand. 2003. A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *EMBO J.* 22:4103-10.

- Elleder, M., J. Sokolova, and M. Hrebicek. 1997. Follow-up study of subunit c of mitochondrial ATP synthase (SCMAS) in Batten disease and in unrelated lysosomal disorders. *Acta Neuropathol.* 93:379-90.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 35:495-516.
- Ermini, M. 1976. Ageing changes in mammalian skeletal muscle: biochemical studies. *Gerontology.* 22:301-16.
- Ezaki, J., L.S. Wolfe, T. Higuti, K. Ishidoh, and E. Kominami. 1995a. Specific delay of degradation of mitochondrial ATP synthase subunit c in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (Batten disease). *J Neurochem.* 64:733-41.
- Ezaki, J., L.S. Wolfe, K. Ishidoh, and E. Kominami. 1995b. Abnormal degradative pathway of mitochondrial ATP synthase subunit c in late infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis (Batten disease). *Am J Med Genet.* 57:254-9.
- Falini, B., E. Bucciarelli, F. Grignani, and M.F. Martelli. 1980. Erythrophagocytosis by undifferentiated lung carcinoma cells. *Cancer.* 46:1140-5.
- Farina, J., M.C. Millana, M.J. Fernandez-Acenero, and V. Campo-Ruiz. 2006. Uremia associated with erythrophagocytosis by small intestine epithelial cells: a case report. *Acta Cytol.* 50:198-200.
- Farmer, S.R. 2006. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* 4:263-73.
- Fasshauer, M., J. Klein, K.M. Kriauciunas, K. Ueki, M. Benito, and C.R. Kahn. 2001. Essential role of insulin receptor substrate 1 in differentiation of brown adipocytes. *Mol Cell Biol.* 21:319-29.
- Fasshauer, M., J. Klein, K. Ueki, K.M. Kriauciunas, M. Benito, M.F. White, and C.R. Kahn. 2000. Essential role of insulin receptor substrate-2 in insulin stimulation of Glut4 translocation and glucose uptake in brown adipocytes. *J Biol Chem.* 275:25494-501.
- Fedoroko, M.E., N.L. Cross, and J.G. Hirsch. 1973. Appearance and distribution of ferritin in mouse peritoneal macrophages in vitro after uptake of heterologous erythrocytes. *J Cell Biol.* 57:289-305.
- Feinstein, R., H. Kanety, M.Z. Papa, B. Lunenfeld, and A. Karasik. 1993. Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J Biol Chem.* 268:26055-8.
- Fens, M.H., G. Storm, R.C. Pelgrim, A. Ultee, A.T. Byrne, C.A. Gaillard, W.W. van Solinge, and R.M. Schiffelers. 2010. Erythrophagocytosis by angiogenic endothelial cells is enhanced by loss of erythrocyte deformability. *Exp Hematol.* 38:282-91.
- Ferre, P., A.F. Burnol, A. Leturque, J. Terretaz, L. Penicaud, B. Jeanrenaud, and J. Girard. 1986. Glucose utilization in vivo and insulin-sensitivity of rat brown adipose tissue in various physiological and pathological conditions. *Biochem J.* 233:249-52.
- Fisher, R.P., T. Lisowsky, M.A. Parisi, and D.A. Clayton. 1992. DNA wrapping and bending by a mitochondrial high mobility group-like transcriptional activator protein. *J Biol Chem.* 267:3358-67.
- Foster, D.O., and M.L. Frydman. 1978. Nonshivering thermogenesis in the rat. II. Measurements of blood flow with microspheres point to brown adipose tissue as the dominant site of the calorogenesis induced by noradrenaline. *Can J Physiol Pharmacol.* 56:110-22.
- Foster, D.O., and M.L. Frydman. 1979. 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.* 57:257-70.
- Fredriksson, J.M., J.M. Lindquist, G.E. Bronnikov, and J. Nedergaard. 2000. Norepinephrine induces vascular endothelial growth factor gene expression in brown adipocytes through a beta - adrenoreceptor/cAMP/protein kinase A pathway involving Src but independently of Erk1/2. *J Biol Chem.* 275:13802-11.
- Fried, S.K., D.A. Bunkin, and A.S. Greenberg. 1998. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab.* 83:847-50.
- Frontini, A., and S. Cinti. 2010. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab.* 11:253-6.

- Fukuhara, A., M. Matsuda, M. Nishizawa, K. Segawa, M. Tanaka, K. Kishimoto, Y. Matsuki, M. Murakami, T. Ichisaka, H. Murakami, E. Watanabe, T. Takagi, M. Akiyoshi, T. Ohtsubo, S. Kihara, S. Yamashita, M. Makishima, T. Funahashi, S. Yamanaka, R. Hiramatsu, Y. Matsuzawa, and I. Shimomura. 2005. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*. 307:426-30.
- Fukumura, D., T. Gohongi, A. Kadambi, Y. Izumi, J. Ang, C.O. Yun, D.G. Buerk, P.L. Huang, and R.K. Jain. 2001. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:2604-9.
- Garesse, R., and C.G. Vallejo. 2001. Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene*. 263:1-16.
- Gavin, J.R., 3rd, J. Roth, D.M. Neville, Jr., P. de Meyts, and D.N. Buell. 1974. Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentrations: a direct demonstration in cell culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 71:84-8.
- Geloën, A., A.J. Collet, G. Guay, and L.J. Bukowiecki. 1990. In vivo differentiation of brown adipocytes in adult mice: an electron microscopic study. *Am J Anat*. 188:366-72.
- Gesta, S., Y.H. Tseng, and C.R. Kahn. 2007. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*. 131:242-56.
- Giordano, A., C. Tonello, A. Bulbarelli, V. Cozzi, S. Cinti, M.O. Carruba, and E. Nisoli. 2002. Evidence for a functional nitric oxide synthase system in brown adipocyte nucleus. *FEBS Lett*. 514:135-40.
- Goldstein, L., Z.P. Teng, E. Zeserson, M. Patel, and R.F. Regan. 2003. Hemin induces an iron-dependent, oxidative injury to human neuron-like cells. *J Neurosci Res*. 73:113-21.
- Granneman, J.G., P. Li, Z. Zhu, and Y. Lu. 2005. Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue I: effects of beta3-adrenergic receptor activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 289:E608-16.
- Gregoire, F.M. 2001. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med (Maywood)*. 226:997-1002.
- Grubic, M., M. Ukropina, M. Cacic-Milosevic, and A. Korac. 2008. Erythrophagosomal haemolytic degradative pathway in rat brown adipocytes induced by hyperinsulinaemia: an ultrastructural study. *J Microsc*. 232:526-9.
- Guerra, C., P. Navarro, A.M. Valverde, M. Arribas, J. Bruning, L.P. Kozak, C.R. Kahn, and M. Benito. 2001. Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance. *J Clin Invest*. 108:1205-13.
- Gupta, R.K., R.J. Mepani, S. Kleiner, J.C. Lo, M.J. Khandekar, P. Cohen, A. Frontini, D.C. Bhowmick, L. Ye, S. Cinti, and B.M. Spiegelman. 2012. Zfp423 expression identifies committed preadipocytes and localizes to adipose endothelial and perivascular cells. *Cell Metab*. 15:230-9.
- Gutteridge, J.M. 1986. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Lett*. 201:291-5.
- Hachiya, H.L., P.A. Halban, and G.L. King. 1988. Intracellular pathways of insulin transport across vascular endothelial cells. *Am J Physiol*. 255:C459-64.
- Hadri, K.E., C. Charon, J. Pairault, S. Hauguel-De Mouzon, A. Quignard-Boulange, and B. Feve. 1997. Down-regulation of beta3-adrenergic receptor expression in rat adipose tissue during the fasted/fed transition: evidence for a role of insulin. *Biochem J*. 323 ( Pt 2):359-64.
- Halliwell, B., and J.M. Gutteridge. 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*. 280:1-8.
- Hausman, G.J., and R.L. Richardson. 2004. Adipose tissue angiogenesis. *J Anim Sci*. 82:925-34.
- Hebbel, R.P. 1991. Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology. *Blood*. 77:214-37.
- Helmy, H., G. Jonsson, and M. Troye-Blomberg. 2000. Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. *Infect Immun*. 68:1485-90.
- Himms-Hagen, J. 1990. Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. *FASEB J*. 4:2890-8.
- Himms-Hagen, J. 1995. Role of brown adipose tissue thermogenesis in control of thermoregulatory feeding in rats: a new hypothesis that links thermostatic and glucostatic hypotheses for control of food intake. *Proc Soc Exp Biol Med*. 208:159-69.

- Himms-Hagen, J., A. Melnyk, M.C. Zingaretti, E. Ceresi, G. Barbatelli, and S. Cinti. 2000. Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 279:C670-81.
- Hino, N., S. Okushin, K. Takahashi, T. Ono, K. Okada, N. Sasaki, and K. Nanba. 1985. Marked erythrophagocytosis by cancer cells: a report of case with metastatic pulmonary adenocarcinoma hematologically mimicking malignant histiocytosis. *Rinsho Ketsueki.* 26:1665-71.
- Hobbs, A.J. 1997. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol Sci.* 18:484-91.
- Hobson, B., and J. Denekamp. 1984. Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br J Cancer.* 49:405-13.
- Hofmann, C., K. Lorenz, S.S. Braithwaite, J.R. Colca, B.J. Palazuk, G.S. Hotamisligil, and B.M. Spiegelman. 1994. Altered gene expression for tumor necrosis factor-alpha and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance. *Endocrinology.* 134:264-70.
- Hohn, A., T. Jung, S. Grimm, B. Catalgol, D. Weber, and T. Grune. 2011. Lipofuscin inhibits the proteasome by binding to surface motifs. *Free Radic Biol Med.* 50:585-91.
- Hotamisligil, G.S. 2003. Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 27 Suppl 3:S53-5.
- Hotamisligil, G.S., P. Arner, J.F. Caro, R.L. Atkinson, and B.M. Spiegelman. 1995. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 95:2409-15.
- Hotamisligil, G.S., D.L. Murray, L.N. Choy, and B.M. Spiegelman. 1994. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:4854-8.
- Hotamisligil, G.S., P. Peraldi, A. Budavari, R. Ellis, M.F. White, and B.M. Spiegelman. 1996. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science.* 271:665-8.
- Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 259:87-91.
- Kajimura, S., P. Seale, T. Tomaru, H. Erdjument-Bromage, M.P. Cooper, J.L. Ruas, S. Chin, P. Tempst, M.A. Lazar, and B.M. Spiegelman. 2008. Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Genes Dev.* 22:1397-409.
- Kaye, D., and E.W. Hook. 1963. The Influence of Hemolysis on Susceptibility to Salmonella Infection: Additional Observations. *J Immunol.* 91:518-27.
- Kern, P.A., M. Saghizadeh, J.M. Ong, R.J. Bosch, R. Deem, and R.B. Simsolo. 1995. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest.* 95:2111-9.
- Kessler, J., and A. De Vries. 1956. Erythrophagocytosis in various diseases. *Harefuah.* 50:101-2.
- Kikuchi, G., T. Yoshida, and M. Noguchi. 2005. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun.* 338:558-67.
- Klaus, S., H. Munzberg, C. Truloff, and G. Heldmaier. 1998. Physiology of transgenic mice with brown fat ablation: obesity is due to lowered body temperature. *Am J Physiol.* 274:R287-93.
- Klein, J., M. Fasshauer, H.H. Klein, M. Benito, and C.R. Kahn. 2002. Novel adipocyte lines from brown fat: a model system for the study of differentiation, energy metabolism, and insulin action. *Bioessays.* 24:382-8.
- Klingenberg, M., and S.G. Huang. 1999. Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochim Biophys Acta.* 1415:271-96.
- Kobayashi, M., and J.M. Olefsky. 1978. Effect of experimental hyperinsulinemia on insulin binding and glucose transport in isolated rat adipocytes. *Am J Physiol.* 235:E53-62.
- Kopecky, J., G. Clarke, S. Enerback, B. Spiegelman, and L.P. Kozak. 1995. Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity. *J Clin Invest.* 96:2914-23.
- Korac, A., B. Buzadzic, V. Petrovic, A. Vasiljevic, A. Jankovic, K. Micunovic, and B. Korac. 2008. The role of nitric oxide in remodeling of capillary network in rat interscapular brown adipose tissue after long-term cold acclimation. *Histol Histopathol.* 23:441-50.

- Korac, A., J. Radovanovic, V. Davidovic, V. Koko, and M. Nedeljkovic. 1999. Apoptosis in the rat brown adipose tissue after insulin treatment. *J Thermal Biology*. 24:461-4.
- Korac, A., M. Verec, and V. Davidovic. 2003. Insulin-induced iron loading in the rat brown adipose tissue: histochemical and electron-microscopic study. *Eur J Histochem*. 47:241-4.
- Krohne, T.U., E. Kaemmerer, F.G. Holz, and J. Kopitz. 2010. Lipid peroxidation products reduce lysosomal protease activities in human retinal pigment epithelial cells via two different mechanisms of action. *Exp Eye Res*. 90:261-6.
- Kubota, T., N. Kubota, H. Kumagai, S. Yamaguchi, H. Kozono, T. Takahashi, M. Inoue, S. Itoh, I. Takamoto, T. Sasako, K. Kumagai, T. Kawai, S. Hashimoto, T. Kobayashi, M. Sato, K. Tokuyama, S. Nishimura, M. Tsunoda, T. Ide, K. Murakami, T. Yamazaki, O. Ezaki, K. Kawamura, H. Masuda, M. Moroi, K. Sugi, Y. Oike, H. Shimokawa, N. Yanagihara, M. Tsutsui, Y. Terauchi, K. Tobe, R. Nagai, K. Kamata, K. Inoue, T. Kodama, K. Ueki, and T. Kadowaki. 2011. Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle. *Cell Metab*. 13:294-307.
- Kumar, S., and U. Bandyopadhyay. 2005. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett*. 157:175-88.
- Kurz, T., and U.T. Brunk. 2009. Autophagy of HSP70 and chelation of lysosomal iron in a non-redox-active form. *Autophagy*. 5:93-5.
- Kurz, T., J.W. Eaton, and U.T. Brunk. 2011. The role of lysosomes in iron metabolism and recycling. *Int J Biochem Cell Biol*. 43:1686-97.
- Kurz, T., A. Terman, B. Gustafsson, and U.T. Brunk. 2008. Lysosomes in iron metabolism, ageing and apoptosis. *Histochem Cell Biol*. 129:389-406.
- Lancaster, J.R., Jr. 1994. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:8137-41.
- Landsberg, L. 1986. Diet, obesity and hypertension: an hypothesis involving insulin, the sympathetic nervous system, and adaptive thermogenesis. *Q J Med*. 61:1081-90.
- Larsson, N.G., J. Wang, H. Wilhelmsson, A. Oldfors, P. Rustin, M. Lewandoski, G.S. Barsh, and D.A. Clayton. 1998. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet*. 18:231-6.
- Le Marchand, Y., E.G. Loten, F. Assimakopoulos-Jeannet, M.E. Forgue, P. Freychet, and B. Jeanrenaud. 1977. Effect of fasting and streptozotocin in the obese-hyperglycemic (ob/ob) mouse. Apparent lack of a direct relationship between insulin binding and insulin effects. *Diabetes*. 26:582-90.
- Lee, T.S., F.Y. Lee, J.H. Pang, and L.Y. Chau. 1999. Erythrophagocytosis and iron deposition in atherosclerotic lesions. *Chin J Physiol*. 42:17-23.
- Liesa, M., M. Palacin, and A. Zorzano. 2009. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev*. 89:799-845.
- Lindberg, O., J. de Pierre, E. Rylander, and B.A. Afzelius. 1967. Studies of the mitochondrial energy-transfer system of brown adipose tissue. *J Cell Biol*. 34:293-310.
- Lindquist, J.M., and S. Rehnmark. 1998. Ambient temperature regulation of apoptosis in brown adipose tissue. Erk1/2 promotes norepinephrine-dependent cell survival. *J Biol Chem*. 273:30147-56.
- Lip, G.Y., W. Foster, and A.D. Blann. 2005. Plasma von Willebrand factor levels and surrogates of atherosclerosis. *J Thromb Haemost*. 3:659-61.
- Listinsky, C.M. 1988. Common reactive erythrophagocytosis in axillary lymph nodes. *Am J Clin Pathol*. 90:189-92.
- Liu, L.S., M. Spelleken, K. Rohrig, H. Hauner, and J. Eckel. 1998. Tumor necrosis factor-alpha acutely inhibits insulin signaling in human adipocytes: implication of the p80 tumor necrosis factor receptor. *Diabetes*. 47:515-22.
- Loegering, D.J., L.M. Commins, F.L. Minnear, L.A. Gary, and L.A. Hill. 1987. Effect of Kupffer cell phagocytosis of erythrocytes and erythrocyte ghosts on susceptibility to endotoxemia and bacteremia. *Infect Immun*. 55:2074-80.
- Loncar, D. 1991. Convertible adipose tissue in mice. *Cell Tissue Res*. 266:149-61.

- Lorenzo, M., I. Fabregat, and M. Benito. 1989. Hormonal regulation of malic enzyme expression in primary cultures of foetal brown adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 163:341-7.
- Lowell, B.B., S.S. V, A. Hamann, J.A. Lawitts, J. Himms-Hagen, B.B. Boyer, L.P. Kozak, and J.S. Flier. 1993. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature.* 366:740-2.
- Lyon, C.J., R.E. Law, and W.A. Hsueh. 2003. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinology.* 144:2195-200.
- Marban, S.L., J.A. DeLoia, and J.D. Gearhart. 1989. Hyperinsulinemia in transgenic mice carrying multiple copies of the human insulin gene. *Dev Genet.* 10:356-64.
- Markelic, M., K. Velickovic, I. Golic, V. Otasevic, A. Stancic, A. Jankovic, M. Vucetic, B. Buzadzic, B. Korac, and A. Korac. 2011. Endothelial cell apoptosis in brown adipose tissue of rats induced by hyperinsulinaemia: the possible role of TNF-alpha. *Eur J Histochem.* 55:187-93.
- Martin, C., K.S. Desai, and G. Steiner. 1983. Receptor and postreceptor insulin resistance induced by in vivo hyperinsulinemia. *Can J Physiol Pharmacol.* 61:802-7.
- Martinez-deMena, R., and M.J. Obregon. 2005. Insulin increases the adrenergic stimulation of 5' deiodinase activity and mRNA expression in rat brown adipocytes; role of MAPK and PI3K. *J Mol Endocrinol.* 34:139-51.
- Marzabadi, M.R., and E. Llvaas. 1996. Spermine prevent iron accumulation and depress lipofuscin accumulation in cultured myocardial cells. *Free Radic Biol Med.* 21:375-81.
- Matsuo, K., A. Bettaieb, N. Nagata, I. Matsuo, H. Keilhack, and F.G. Haj. 2011. Regulation of brown fat adipogenesis by protein tyrosine phosphatase 1B. *PLoS One.* 6:e16446.
- Maumus, M., J.A. Peyrafitte, R. D'Angelo, C. Fournier-Wirth, A. Bouloumie, L. Casteilla, C. Sengenès, and P. Bourin. 2011. Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int J Obes (Lond).* 35:1141-53.
- Medici, D., E.M. Shore, V.Y. Lounev, F.S. Kaplan, R. Kalluri, and B.R. Olsen. 2010. Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. *Nat Med.* 16:1400-6.
- Menghini, R., V. Marchetti, M. Cardellini, M.L. Hribal, A. Mauriello, D. Lauro, P. Sbraccia, R. Lauro, and M. Federici. 2005. Phosphorylation of GATA2 by Akt increases adipose tissue differentiation and reduces adipose tissue-related inflammation: a novel pathway linking obesity to atherosclerosis. *Circulation.* 111:1946-53.
- Miki, H., T. Yamauchi, R. Suzuki, K. Komeda, A. Tsuchida, N. Kubota, Y. Terauchi, J. Kamon, Y. Kaburagi, J. Matsui, Y. Akanuma, R. Nagai, S. Kimura, K. Tobe, and T. Kadowaki. 2001. Essential role of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol.* 21:2521-32.
- Mur, C., M. Arribas, M. Benito, and A.M. Valverde. 2003. Essential role of insulin-like growth factor I receptor in insulin-induced fetal brown adipocyte differentiation. *Endocrinology.* 144:581-93.
- Mur, C., A.M. Valverde, C.R. Kahn, and M. Benito. 2002. Increased insulin sensitivity in IGF-I receptor-deficient brown adipocytes. *Diabetes.* 51:743-54.
- Murano, I., G. Barbatelli, A. Giordano, and S. Cinti. 2009. Noradrenergic parenchymal nerve fiber branching after cold acclimatisation correlates with brown adipocyte density in mouse adipose organ. *J Anat.* 214:171-8.
- Nagashima, T., H. Ohinata, and A. Kuroshima. 1994. Involvement of nitric oxide in noradrenaline-induced increase in blood flow through brown adipose tissue. *Life Sci.* 54:17-25.
- Nakae, Y., P.J. Stoward, M. Shono, and T. Matsuzaki. 2001. Most apoptotic cells in mdx diaphragm muscle contain accumulated lipofuscin. *Histochem Cell Biol.* 115:205-14.
- Nankervis, A., J. Proietto, P. Aitken, and F. Alford. 1985. Hyperinsulinaemia and insulin insensitivity: studies in subjects with insulinoma. *Diabetologia.* 28:427-31.
- Navarro, P., A.M. Valverde, M. Benito, and M. Lorenzo. 1998. Insulin/IGF-I rescues immortalized brown adipocytes from apoptosis down-regulating Bcl-xS expression, in a PI 3-kinase- and map kinase-dependent manner. *Exp Cell Res.* 243:213-21.
- Nedergaard, J., T. Bengtsson, and B. Cannon. 2007. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 293:E444-52.



- Nedergaard, J., N. Petrovic, E.M. Lindgren, A. Jacobsson, and B. Cannon. 2005. PPARgamma in the control of brown adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta*. 1740:293-304.
- Nicholls, D.G., and R.M. Locke. 1984. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev*. 64:1-64.
- Nisoli, E., L. Briscini, A. Giordano, C. Tonello, S.M. Wiesbrock, K.T. Uysal, S. Cinti, M.O. Carruba, and G.S. Hotamisligil. 2000. Tumor necrosis factor alpha mediates apoptosis of brown adipocytes and defective brown adipocyte function in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:8033-8.
- Nisoli, E., L. Briscini, C. Tonello, C. De Giuli-Morghen, and M.O. Carruba. 1997a. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis in rat brown adipocytes. *Cell Death Differ*. 4:771-8.
- Nisoli, E., E. Clementi, C. Paolucci, V. Cozzi, C. Tonello, C. Sciorati, R. Bracale, A. Valerio, M. Francolini, S. Moncada, and M.O. Carruba. 2003. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*. 299:896-9.
- Nisoli, E., E. Clementi, C. Tonello, C. Sciorati, L. Briscini, and M.O. Carruba. 1998. Effects of nitric oxide on proliferation and differentiation of rat brown adipocytes in primary cultures. *Br J Pharmacol*. 125:888-94.
- Nisoli, E., C. Tonello, L. Briscini, and M.O. Carruba. 1997b. Inducible nitric oxide synthase in rat brown adipocytes: implications for blood flow to brown adipose tissue. *Endocrinology*. 138:676-82.
- O'Brien, P.J., and C. Little. 1969. Intracellular mechanisms for the decomposition of a lipid peroxide. II. Decomposition of a lipid peroxide by subcellular fractions. *Can J Biochem*. 47:493-9.
- Ohno, H., Y. Habara, T. Kizaki, S. Oh-ishi, J. Tanaka, and S. Gasa. 1996. Increased growth of brown adipose tissue but its decreased lysosomal enzyme activity in heat-acclimatized, insulin-treated rats. *Horm Metab Res*. 28:397-9.
- Orava, J., P. Nuutila, M.E. Lidell, V. Oikonen, T. Noponen, T. Viljanen, M. Scheinin, M. Taittonen, T. Niemi, S. Enerback, and K.A. Virtanen. 2011. Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. *Cell Metab*. 14:272-9.
- Otasevic, V., A. Korac, B. Buzadzic, A. Stancic, A. Jankovic, and B. Korac. 2011. Nitric oxide and thermogenesis--challenge in molecular cell physiology. *Front Biosci (Schol Ed)*. 3:1180-95.
- Otogawa, K., K. Kinoshita, H. Fujii, M. Sakabe, R. Shiga, K. Nakatani, K. Ikeda, Y. Nakajima, Y. Ikura, M. Ueda, T. Arakawa, F. Hato, and N. Kawada. 2007. Erythrophagocytosis by liver macrophages (Kupffer cells) promotes oxidative stress, inflammation, and fibrosis in a rabbit model of steatohepatitis: implications for the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol*. 170:967-80.
- Pessin, J.E., and A.R. Saltiel. 2000. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest*. 106:165-9.
- Petrovic, N., T.B. Walden, I.G. Shabalina, J.A. Timmons, B. Cannon, and J. Nedergaard. 2010a. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem*. 285:7153-64.
- Petrovic, V., B. Buzadzic, A. Korac, A. Vasiljevic, A. Jankovic, and B. Korac. 2006. Free radical equilibrium in interscapular brown adipose tissue: relationship between metabolic profile and antioxidative defense. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 142:60-5.
- Petrovic, V., B. Buzadzic, A. Korac, A. Vasiljevic, A. Jankovic, and B. Korac. 2010b. NO modulates the molecular basis of rat interscapular brown adipose tissue thermogenesis. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 152:147-59.
- Petrovic, V., A. Korac, B. Buzadzic, and B. Korac. 2005. The effects of L-arginine and L-NAME supplementation on redox-regulation and thermogenesis in interscapular brown adipose tissue. *J Exp Biol*. 208:4263-71.
- Petrovic, V., A. Korac, B. Buzadzic, A. Vasiljevic, A. Jankovic, K. Micunovic, and B. Korac. 2008. Nitric oxide regulates mitochondrial re-modelling in interscapular brown adipose tissue: ultrastructural and morphometric-stereologic studies. *J Microsc*. 232:542-8.
- Pictet, R., L. Orci, W.G. Forssmann, and L. Girardier. 1969. An electron microscope study of the perfusion-fixed spleen. II. Nurse cells and erythrophagocytosis. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 96:400-17.
- Planat-Benard, V., J.S. Silvestre, B. Cousin, M. Andre, M. Nibbelink, R. Tamarat, M. Clergue, C. Manneville, C. Saillan-Barreau, M. Duriez, A. Tedgui, B. Levy, L. Penicaud, and L. Casteilla. 2004. Plasticity of human

- adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 109:656-63.
- Porras, A., A.M. Alvarez, A. Valladares, and M. Benito. 1997. TNF-alpha induces apoptosis in rat fetal brown adipocytes in primary culture. *FEBS Lett*. 416:324-8.
- Porras, A., S. Zuluaga, A. Valladares, A.M. Alvarez, B. Herrera, I. Fabregat, and M. Benito. 2003. Long-term treatment with insulin induces apoptosis in brown adipocytes: role of oxidative stress. *Endocrinology*. 144:5390-401.
- Prins, J.B., C.U. Niesler, C.M. Winterford, N.A. Bright, K. Siddle, S. O'Rahilly, N.I. Walker, and D.P. Cameron. 1997. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of human adipose cells. *Diabetes*. 46:1939-44.
- Puigserver, P., Z. Wu, C.W. Park, R. Graves, M. Wright, and B.M. Spiegelman. 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*. 92:829-39.
- Rabelo, R., A. Camirand, and J.E. Silva. 1997. 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-response sequences of the uncoupling protein gene are sequentially recruited during darglitazone-induced brown adipocyte differentiation. *Endocrinology*. 138:5325-32.
- Radhakrishnan, K., C. Tan, and J. Gallo. 2008. Erythrophagocytosis in hemolytic disease of the newborn. *Am J Hematol*. 83:679.
- Radovanovic, J., A. Korac, V. Davidovic, V. Koko, and V. Todorovic. 1996. Erythrophagocytosis by brown adipocytes of rat interscapular tissue. *Histol Histopathol*. 11:573-81.
- Rangwala, S.M., and M.A. Lazar. 2000. Transcriptional control of adipogenesis. *Annu Rev Nutr*. 20:535-59.
- Ricquier, D., L. Casteilla, and F. Bouillaud. 1991. Molecular studies of the uncoupling protein. *FASEB J*. 5:2237-42.
- Rizza, R.A., L.J. Mandarino, J. Genest, B.A. Baker, and J.E. Gerich. 1985. Production of insulin resistance by hyperinsulinaemia in man. *Diabetologia*. 28:70-5.
- Roberts, J.C., and R.E. Smith. 1967. Time-dependent responses of brown fat in cold-exposed rats. *Am J Physiol*. 212:519-25.
- Rosen, E.D., and O.A. MacDougald. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7:885-96.
- Rosen, E.D., P. Sarraf, A.E. Troy, G. Bradwin, K. Moore, D.S. Milstone, B.M. Spiegelman, and R.M. Mortensen. 1999. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell*. 4:611-7.
- Rosen, E.D., C.J. Walkey, P. Puigserver, and B.M. Spiegelman. 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*. 14:1293-307.
- Rothwell, N.J., and M.J. Stock. 1979. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature*. 281:31-5.
- Rothwell, N.J., and M.J. Stock. 1983. Diet-induced thermogenesis. *Adv Nutr Res*. 5:201-20.
- Rothwell, N.J., and M.J. Stock. 1988. Insulin and thermogenesis. *Int J Obes*. 12:93-102.
- Rousset, S., M.C. Alves-Guerra, J. Mozo, B. Miroux, A.M. Cassard-Doulier, F. Bouillaud, and D. Ricquier. 2004. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes*. 53 Suppl 1:S130-5.
- Ruan, H., P.D. Miles, C.M. Ladd, K. Ross, T.R. Golub, J.M. Olefsky, and H.F. Lodish. 2002. Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-alpha: implications for insulin resistance. *Diabetes*. 51:3176-88.
- Ruegg, S.J., and T.W. Jungi. 1988. Antibody-mediated erythrolysis and erythrophagocytosis by human monocytes, macrophages and activated macrophages. Evidence for distinction between involvement of high-affinity and low-affinity receptors for IgG by using different erythroid target cells. *Immunology*. 63:513-20.
- Rupnick, M.A., D. Panigrahy, C.Y. Zhang, S.M. Dallabrida, B.B. Lowell, R. Langer, and M.J. Folkman. 2002. Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:10730-5.
- Ryden, M., A. Dicker, V. van Harmelen, H. Hauner, M. Brunnberg, L. Perbeck, F. Lonnqvist, and P. Arner. 2002. Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor-alpha -mediated lipolysis in human fat cells. *J Biol Chem*. 277:1085-91.

- Safdar, A., J.P. Little, A.J. Stokl, B.P. Hettinga, M. Akhtar, and M.A. Tarnopolsky. 2011. Exercise increases mitochondrial PGC-1 $\alpha$  content and promotes nuclear-mitochondrial cross-talk to coordinate mitochondrial biogenesis. *J Biol Chem.* 286:10605-17.
- Saghizadeh, M., J.M. Ong, W.T. Garvey, R.R. Henry, and P.A. Kern. 1996. The expression of TNF  $\alpha$  by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J Clin Invest.* 97:1111-6.
- Saha, S.K., H. Ohinata, and A. Kuroshima. 1996. Effects of acute and chronic inhibition of nitric oxide synthase on brown adipose tissue thermogenesis. *Jpn J Physiol.* 46:375-82.
- Saito, M., Y. Okamatsu-Ogura, M. Matsushita, K. Watanabe, T. Yoneshiro, J. Nio-Kobayashi, T. Iwanaga, M. Miyagawa, T. Kameya, K. Nakada, Y. Kawai, and M. Tsujisaki. 2009. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes.* 58:1526-31.
- Sakaida, I., M.E. Kyle, and J.L. Farber. 1990. Autophagic degradation of protein generates a pool of ferric iron required for the killing of cultured hepatocytes by an oxidative stress. *Mol Pharmacol.* 37:435-42.
- Sasaki, K. 1990. Erythrophagocytosis of the lymph node macrophages caused by autotransplantation of the splenic tissue into the lymph nodes of rat. *Anat Anz.* 171:335-42.
- Sbarbati, A., M. Morroni, C. Zancanaro, and S. Cinti. 1991. Rat interscapular brown adipose tissue at different ages: a morphometric study. *Int J Obes.* 15:581-7.
- Sbraccia, P., M. D'Adamo, F. Leonetti, S. Caiola, P. Iozzo, A. Giaccari, A. Buongiorno, and G. Tamburrano. 1996. Chronic primary hyperinsulinaemia is associated with altered insulin receptor mRNA splicing in muscle of patients with insulinoma. *Diabetologia.* 39:220-5.
- Scarpulla, R.C. 2002. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1576:1-14.
- Shanik, M.H., Y. Xu, J. Skrha, R. Dankner, Y. Zick, and J. Roth. 2008. Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse? *Diabetes Care.* 31 Suppl 2:S262-8.
- Shankar, R.R., Y. Wu, H.Q. Shen, J.S. Zhu, and A.D. Baron. 2000. Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance. *Diabetes.* 49:684-7.
- Shimomura, I., T. Funahashi, M. Takahashi, K. Maeda, K. Kotani, T. Nakamura, S. Yamashita, M. Miura, Y. Fukuda, K. Takemura, K. Tokunaga, and Y. Matsuzawa. 1996. Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat Med.* 2:800-3.
- Shoelson, S.E., J. Lee, and A.B. Goldfine. 2006. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 116:1793-801.
- Simon, G.T., and J.S. Burke. 1970. Electron microscopy of the spleen. 3. Erythro-leukophagocytosis. *Am J Pathol.* 58:451-70.
- Simon, H.U., A. Haj-Yehia, and F. Levi-Schaffer. 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis.* 5:415-8.
- Skrha, J., J. Hilgertova, and V. Justova. 1993. Insulin action in patients with insulinoma influenced by pharmacological and surgical therapy. *Exp Clin Endocrinol.* 101:360-4.
- Skrha, J., G. Sindelka, T. Haas, J. Hilgertova, and V. Justova. 1996. Comparison of insulin sensitivity in patients with insulinoma and obese Type 2 diabetes mellitus. *Horm Metab Res.* 28:595-8.
- Smith, R.E., and B.A. Horwitz. 1969. Brown fat and thermogenesis. *Physiol Rev.* 49:330-425.
- Southgate, R.J., C.R. Bruce, A.L. Carey, G.R. Steinberg, K. Walder, R. Monks, M.J. Watt, J.A. Hawley, M.J. Birnbaum, and M.A. Febbraio. 2005. PGC-1 $\alpha$  gene expression is down-regulated by Akt-mediated phosphorylation and nuclear exclusion of FoxO1 in insulin-stimulated skeletal muscle. *FASEB J.* 19:2072-4.
- Steppan, C.M., S.T. Bailey, S. Bhat, E.J. Brown, R.R. Banerjee, C.M. Wright, H.R. Patel, R.S. Ahima, and M.A. Lazar. 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* 409:307-12.
- Suter, E.R. 1969. The fine structure of brown adipose tissue. I. Cold-induced changes in the rat. *J Ultrastruct Res.* 26:216-41.
- Sykiotis, G.P., and A.G. Papavassiliou. 2001. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1: a novel target for the reversal of insulin resistance. *Mol Endocrinol.* 15:1864-9.

- Szweda, P.A., M. Camouse, K.C. Lundberg, T.D. Oberley, and L.I. Szweda. 2003. Aging, lipofuscin formation, and free radical-mediated inhibition of cellular proteolytic systems. *Ageing Res Rev.* 2:383-405.
- Tchkonina, T., T. Pirtskhalava, T. Thomou, M.J. Cartwright, B. Wise, I. Karagiannides, A. Shpilman, T.L. Lash, J.D. Becherer, and J.L. Kirkland. 2007. Increased TNF alpha and CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein with aging predispose preadipocytes to resist adipogenesis. *Am J Physiol-Endoc M.* 293:E1810-9.
- Terman, A., N. Abrahamsson, and U.T. Brunk. 1999. Ceroid/lipofuscin-loaded human fibroblasts show increased susceptibility to oxidative stress. *Exp Gerontol.* 34:755-70.
- Terman, A., and U.T. Brunk. 1998a. Ceroid/lipofuscin formation in cultured human fibroblasts: the role of oxidative stress and lysosomal proteolysis. *Mech Ageing Dev.* 104:277-91.
- Terman, A., and U.T. Brunk. 1998b. On the degradability and exocytosis of ceroid/lipofuscin in cultured rat cardiac myocytes. *Mech Ageing Dev.* 100:145-56.
- Terman, A., H. Dalen, J.W. Eaton, J. Neuzil, and U.T. Brunk. 2003. Mitochondrial recycling and aging of cardiac myocytes: the role of autophagocytosis. *Exp Gerontol.* 38:863-76.
- Terman, A., B. Gustafsson, and U.T. Brunk. 2007. Autophagy, organelles and ageing. *J Pathol.* 211:134-43.
- Terman, A., T. Kurz, M. Navratil, E.A. Arriaga, and U.T. Brunk. 2010. Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. *Antioxid Redox Signal.* 12:503-35.
- Teruel, T., R. Hernandez, and M. Lorenzo. 2001. Ceramide mediates insulin resistance by tumor necrosis factor-alpha in brown adipocytes by maintaining Akt in an inactive dephosphorylated state. *Diabetes.* 50:2563-71.
- Teruel, T., A.M. Valverde, A. Alvarez, M. Benito, and M. Lorenzo. 1995. Differentiation of rat brown adipocytes during late foetal development: role of insulin-like growth factor I. *Biochem J.* 310 ( Pt 3):771-6.
- Teruel, T., A.M. Valverde, M. Benito, and M. Lorenzo. 1996. Insulin-like growth factor I and insulin induce adipogenic-related gene expression in fetal brown adipocyte primary cultures. *Biochem J.* 319 ( Pt 2):627-32.
- Thomas, K.A. 1996. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem.* 271:603-6.
- Timmons, J.A., K. Wennmalm, O. Larsson, T.B. Walden, T. Lassmann, N. Petrovic, D.L. Hamilton, R.E. Gimeno, C. Wahlestedt, K. Baar, J. Nedergaard, and B. Cannon. 2007. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:4401-6.
- Tontonoz, P., and B.M. Spiegelman. 2008. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem.* 77:289-312.
- Toure-Balde, A., J.L. Sarthou, G. Aribot, P. Michel, J.F. Trape, C. Rogier, and C. Roussillon. 1996. Plasmodium falciparum induces apoptosis in human mononuclear cells. *Infect Immun.* 64:744-50.
- Tran, K.V., O. Gealekman, A. Frontini, M.C. Zingaretti, M. Morroni, A. Giordano, A. Smorlesi, J. Perugini, R. De Matteis, A. Sbarbati, S. Corvera, and S. Cinti. 2012. The vascular endothelium of the adipose tissue gives rise to both white and brown fat cells. *Cell Metab.* 15:222-9.
- Trayhurn, P. 2005. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol Scand.* 184:285-93.
- Tseng, Y.H., E. Kokkotou, T.J. Schulz, T.L. Huang, J.N. Winnay, C.M. Taniguchi, T.T. Tran, R. Suzuki, D.O. Espinoza, Y. Yamamoto, M.J. Ahrens, A.T. Dudley, A.W. Norris, R.N. Kulkarni, and C.R. Kahn. 2008. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature.* 454:1000-4.
- Tsuda, K., Y. Kinoshita, I. Nishio, and Y. Masuyama. 2000. Role of insulin in the regulation of membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension: an electron paramagnetic resonance investigation. *Am J Hypertens.* 13:376-82.
- Tsuda, K., Y. Kinoshita, I. Nishio, and Y. Masuyama. 2001. Hyperinsulinemia is a determinant of membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension. *Am J Hypertens.* 14:419-23.

- Tsukiyama-Kohara, K., F. Poulin, M. Kohara, C.T. DeMaria, A. Cheng, Z. Wu, A.C. Gingras, A. Katsume, M. Elchebly, B.M. Spiegelman, M.E. Harper, M.L. Tremblay, and N. Sonenberg. 2001. Adipose tissue reduction in mice lacking the translational inhibitor 4E-BP1. *Nat Med.* 7:1128-32.
- Turrini, F., H. Ginsburg, F. Bussolino, G.P. Pescarmona, M.V. Serra, and P. Arese. 1992. Phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells by human monocytes: involvement of immune and nonimmune determinants and dependence on parasite developmental stage. *Blood.* 80:801-8.
- Uldry, M., W. Yang, J. St-Pierre, J. Lin, P. Seale, and B.M. Spiegelman. 2006. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab.* 3:333-41.
- Unger, J.W., and W. Lange. 1997. Insulin receptors in the pituitary gland: morphological evidence for influence on opioid peptide-synthesizing cells. *Cell Tissue Res.* 288:471-83.
- Uysal, K.T., S.M. Wiesbrock, and G.S. Hotamisligil. 1998. Functional analysis of tumor necrosis factor (TNF) receptors in TNF-alpha-mediated insulin resistance in genetic obesity. *Endocrinology.* 139:4832-8.
- Uysal, K.T., S.M. Wiesbrock, M.W. Marino, and G.S. Hotamisligil. 1997. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature.* 389:610-4.
- Valladares, A., C. Roncero, M. Benito, and A. Porras. 2001. TNF-alpha inhibits UCP-1 expression in brown adipocytes via ERKs. Opposite effect of p38MAPK. *FEBS Lett.* 493:6-11.
- Valverde, A.M., M. Arribas, C. Mur, P. Navarro, S. Pons, A.M. Cassard-Doulier, C.R. Kahn, and M. Benito. 2003. Insulin-induced up-regulated uncoupling protein-1 expression is mediated by insulin receptor substrate 1 through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in fetal brown adipocytes. *J Biol Chem.* 278:10221-31.
- Valverde, A.M., M. Benito, and M. Lorenzo. 1992. Hormonal regulation of malic enzyme and glucose-6-phosphate-dehydrogenase expression in fetal brown-adipocyte primary cultures under non-proliferative conditions. *Eur J Biochem.* 203:313-9.
- Valverde, A.M., M. Benito, and M. Lorenzo. 2005. The brown adipose cell: a model for understanding the molecular mechanisms of insulin resistance. *Acta Physiol Scand.* 183:59-73.
- Valverde, A.M., M. Lorenzo, P. Navarro, and M. Benito. 1997. Phosphatidylinositol 3-kinase is a requirement for insulin-like growth factor I-induced differentiation, but not for mitogenesis, in fetal brown adipocytes. *Mol Endocrinol.* 11:595-607.
- Valverde, A.M., T. Teruel, P. Navarro, M. Benito, and M. Lorenzo. 1998. Tumor necrosis factor-alpha causes insulin receptor substrate-2-mediated insulin resistance and inhibits insulin-induced adipogenesis in fetal brown adipocytes. *Endocrinology.* 139:1229-38.
- van Marken Lichtenbelt, W.D., J.W. Vanhommerig, N.M. Smulders, J.M. Drossaerts, G.J. Kemerink, N.D. Bouvy, P. Schrauwen, and G.J. Teule. 2009. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med.* 360:1500-8.
- Villena, J.A., B. Cousin, L. Penicaud, and L. Casteilla. 2001. Adipose tissues display differential phagocytic and microbicidal activities depending on their localization. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 25:1275-80.
- Virbasius, C.A., J.V. Virbasius, and R.C. Scarpulla. 1993. NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators. *Genes Dev.* 7:2431-45.
- Virkamaki, A., K. Ueki, and C.R. Kahn. 1999. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest.* 103:931-43.
- Virtanen, K.A., M.E. Lidell, J. Orava, M. Heglind, R. Westergren, T. Niemi, M. Taittonen, J. Laine, N.J. Savisto, S. Enerback, and P. Nuutila. 2009. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med.* 360:1518-25.
- Wakefield, J.S., and R.M. Hicks. 1974. Erythrophagocytosis by the epithelial cells of the bladder. *J Cell Sci.* 15:555-73.
- Wang, C.N., L. O'Brien, and D.N. Brindley. 1998. Effects of cell-permeable ceramides and tumor necrosis factor-alpha on insulin signaling and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes.* 47:24-31.
- Wang, D., and H.S. Sul. 1998. Insulin stimulation of the fatty acid synthase promoter is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Involvement of protein kinase B/Akt. *J Biol Chem.* 273:25420-6.

- Watson, R.T., and J.E. Pessin. 2001. Subcellular compartmentalization and trafficking of the insulin-responsive glucose transporter, GLUT4. *Exp Cell Res.* 271:75-83.
- Weibel, E.R. 1962. Morphometric analysis of the number, volume and surface of the alveoli and capillaries of the human lung. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 57:648-66.
- Wheatley, D.N. 1968. Cellular engulfment of erythrocytes. *Br J Exp Pathol.* 49:541-3.
- White, M.F. 2003. Insulin signaling in health and disease. *Science.* 302:1710-1.
- Wilding, J.P., S.G. Gilbey, P.D. Lambert, M.A. Ghatei, and S.R. Bloom. 1993. Increases in neuropeptide Y content and gene expression in the hypothalamus of rats treated with dexamethasone are prevented by insulin. *Neuroendocrinology.* 57:581-7.
- Withers, D.J., and M. White. 2000. Perspective: The insulin signaling system--a common link in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocrinology.* 141:1917-21.
- Wood, J., and J. Garthwaite. 1994. Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology.* 33:1235-44.
- Woods, S.C., E. Decke, and J.R. Vasselli. 1974. Metabolic hormones and regulation of body weight. *Psychol Rev.* 81:26-43.
- Woods, S.C., E.C. Lotter, L.D. McKay, and D. Porte, Jr. 1979. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature.* 282:503-5.
- Wosnitza, M., K. Hemmrich, A. Groger, S. Graber, and N. Pallua. 2007. Plasticity of human adipose stem cells to perform adipogenic and endothelial differentiation. *Differentiation.* 75:12-23.
- Xue, B., J.S. Rim, J.C. Hogan, A.A. Coulter, R.A. Koza, and L.P. Kozak. 2007. Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat. *J Lipid Res.* 48:41-51.
- Yu, Z., H.L. Persson, J.W. Eaton, and U.T. Brunk. 2003. Intralysosomal iron: a major determinant of oxidant-induced cell death. *Free Radic Biol Med.* 34:1243-52.
- Yuan, X.M., W.L. Anders, A.G. Olsson, and U.T. Brunk. 1996. Iron in human atheroma and LDL oxidation by macrophages following erythrophagocytosis. *Atherosclerosis.* 124:61-73.
- Zakhary, R., S.P. Gaine, J.L. Dinerman, M. Ruat, N.A. Flavahan, and S.H. Snyder. 1996. Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:795-8.
- Zeghari, N., M. Younsi, L. Meyer, M. Donner, P. Drouin, and O. Ziegler. 2000. Adipocyte and erythrocyte plasma membrane phospholipid composition and hyperinsulinemia: a study in nondiabetic and diabetic obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 24:1600-7.
- Zeligs, J.D. 1977. Ultrastructure of the degradation of erythrocytes by thyroid epithelial cells in vivo. *Am J Pathol.* 89:85-104.
- Zeligs, J.D., and S.H. Wollman. 1977. Ultrastructure of erythrophagocytosis and red blood cell fission by thyroid epithelial cells in vivo. *J Ultrastruct Res.* 59:57-69.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, and J.M. Friedman. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 372:425-32.
- Zick, Y. 2003. Role of Ser/Thr kinases in the uncoupling of insulin signaling. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 27 Suppl 3:S56-60.

# PRILOG - SPISAK SKRAĆENICA

<b>4-HNE</b>	4-hidroksinonenal
<b>AR</b>	adrenergički receptor
<b>BAT</b>	engl. <i>brown adipose tissue</i> - mrko masno tkivo
<b>BATIRKO</b>	engl. <i>BAT insulin receptor knockout</i> - <i>knockout</i> insulinskog receptora u BAT
<b>BSA</b>	engl. <i>bovine serum albumine</i> - goveđi serumski albumin
<b>C/EBP-<math>\alpha</math></b>	engl. <i>CCAAT-enhancer-binding protein</i>
<b>CD</b>	engl. <i>cluster of differentiation</i>
<b>CLS</b>	engl. <i>crown-like structures</i>
<b>CuZnSOD</b>	engl. <i>copper-zinc superoxide dismutase</i> - bakar-cink superoksid dismutaza
<b>DAB</b>	di-amino-benzidin
<b>EDX</b>	engl. <i>electron dispersive X-ray microanalysis</i> - elektron-disperzivna analiza X zracima
<b>EFA</b>	eritrofagocitni adipocit
<b>eNOS</b>	engl. <i>endothelial nitric oxide synthase</i> – endotelska azot-oksidi sintaza
<b>FDG PET</b>	fluoro-deoksi-glukoza pozitron emisijska tomografija
<b>FITC</b>	fluorescein izotiocijanat
<b>FoxO1</b>	engl. <i>forkhead box protein O1</i>
<b>GLUT4</b>	glukoza transporter 4
<b>Grb2</b>	engl. <i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
<b>Hb</b>	hemoglobin
<b>HE</b>	hemin
<b>HO</b>	hem oksigenaza
<b>HSL</b>	hormon-senzitivna lipaza
<b>IL-6</b>	interleukin 6
<b>iNOS</b>	engl. <i>inducible nitric oxide synthase</i> – inducibilna azot-oksidi sintaza
<b>IR</b>	insulinski receptor
<b>IRes</b>	engl. <i>insulin resistance</i> - insulinska rezistencija
<b>iRNK</b>	informacijska ribonukleinska kiselina
<b>IR-P</b>	fosforilirani insulinski receptor
<b>IRS</b>	engl. <i>insulin receptor substrate</i>
<b>LPL</b>	lipoprotein lipaza
<b>MAPK</b>	engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i> - mitogen-aktivirana protein kinaza
<b>MDA</b>	malondialdehid
<b>MnSOD</b>	engl. <i>manganese superoxide dismutase</i> - mangan superoksid dismutaza
<b>MSC</b>	engl. <i>mesenchymal stem cell</i> - mezenhimska stem ćelija
<b>mtDNK</b>	mitohondrijska dezoksiribonukleinska kiselina

<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	engl. <i>nuclear factor – <math>\kappa</math>B</i> - nukleusni faktor – $\kappa$ B
<b>NOS</b>	engl. <i>nitric oxide synthase</i> – azot-oksidi sintaza
<b>NRF</b>	engl. <i>nuclear respiratory factor</i>
<b>NST</b>	engl. <i>non-shivering thermogenesis</i> - termogeneza bez drhtanja
<b>PBS</b>	engl. <i>phosphate-buffered saline</i>
<b>PGC-1</b>	engl. <i>PPAR-<math>\gamma</math> coactivator -1</i>
<b>PI3K</b>	engl. <i>phosphoinositol-3-kinase</i> - fosfoinozitol-3-kinaza
<b>PPAR-<math>\gamma</math></b>	engl. <i>peroxisome proliferator-activated receptor - <math>\gamma</math></i>
<b>RES</b>	retikulo-endotelski sistem
<b>RNS</b>	engl. <i>reactive nitrogen species</i> - reaktivne azotne vrste
<b>ROS</b>	engl. <i>reactive oxygen species</i> - reaktivne kiseonične vrste
<b>SE</b>	engl. <i>standard error</i> - standardna greška
<b>SEM</b>	skenirajuća elektronska mikroskopija
<b>SHP2</b>	engl. <i>SH2 domain-containing tyrosine phosphatase 2</i>
<b>SM</b>	svetlosna mikroskopija
<b>SNS</b>	simpatički nervni sistem
<b>SOD</b>	engl. <i>superoxide dismutase</i> - superoksid dismutaza
<b>T2D</b>	engl. <i>type 2 diabetes</i> - dijabetes tipa 2
<b>TBS</b>	engl. <i>Tris-buffered saline</i>
<b>TEM</b>	transmisiona elektronska mikroskopija
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	engl. <i>tumor-necrosis factor - <math>\alpha</math></i>
<b>Tyr</b>	engl. <i>tyrosine</i> - tirozin
<b>UCP1</b>	engl. <i>uncoupling protein 1</i> - dekoplujući protein 1
<b>VEGF</b>	engl. <i>vascular endothelial growth factor</i> - vaskularni endotelski faktor rasta
<b>VE-kadherin</b>	vaskularni endotelski kadherin
<b>Vv</b>	volumenska gustina
<b>vWF</b>	von Willebrand faktor
<b>WAT</b>	engl. <i>white adipose tissue</i> - belo masno tkivo
<b>Zfp423</b>	engl. - <i>zinc finger protein 423</i>



## BIOGRAFIJA AUTORA

---

Milica Markelić (rođena Grubić) rođena je 05. avgusta 1982. godine u Kninu, Republika Hrvatska. Diplomirala je na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, smer Biologija, juna 2006. godine pod mentorstvom prof. dr Aleksandre Korać, sa prosečnom ocenom u toku studija 9.74. Iste godine, upisuje doktorske studije, smer Biologija ćelija i tkiva, na matičnom fakultetu, pod mentorstvom prof. dr Aleksandre Korać. Od školske 2006/07. do septembra 2008. bila je stipendista doktorand Ministarstva nauke Republike Srbije, a od septembra 2008. je zaposlena u istraživačkom zvanju, prvo kao istraživač pripravnik na projektu #143059 Ministarstva nauke Republike Srbije (Biološki fakultet, Institut za zoologiju, Katedra za biologiju ćelija i tkiva); a potom, od 2010. kao istraživač saradnik na na projektu #143059 (do decembra 2010. godine) i projektu #173055 (od januara 2011. godine) Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije (Biološki fakultet, Institut za zoologiju, Katedra za biologiju ćelija i tkiva). Od 2007. godine članica je Srpskog i Evropskog društva za mikroskopiju, a od 2008. godine i Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalnu fiziologiju. 2008. godine boravila je na Fakultetu prirodnih nauka Univerziteta u Beču, Austrija, Cell Imaging and Ultrastructure Research Unit, u organizaciji World University Service (WUS) i Austrian Exchange Service („One Month Visit to Austrian Universities“), gde je pohađala Napredni kurs elektronske mikroskopije, X-ray mikroanalize i krio-ultramikrotomije.

Autor je: dva rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), dva rada u međunarodnim časopisima (M23), dva saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini (M33), pet saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u izvodu (M34) i deset saopštenja sa nacionalnih naučnih skupova štampanih u izvodu (M64).

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписана Милица Б. Маркелић

број уписа ВО 060197

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Молекулски механизми структурног ремоделирања мрког масног ткива пацова индукованог инсулином“

- 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, 06. 04. 2012.

Милица Б. Маркелић

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милица Б. Маркелић

Број уписа ВО 060197

Студијски програм Биологија ћелија и ткива

Наслов рада „Молекулски механизми структурног ремоделирања мрког масног  
ткива пацова индукованог инсулином“

Ментори: Др Александра Кораћ, редовни професор,  
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

Др Ана Станчић, научни сарадник,  
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“  
Универзитет у Београду

Потписани Милица Б. Маркелић

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, 06.04.2012.

Маркелит М.

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 структурног ремоделирања мрког масног ткива пацова индукованог инсулином“

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, 06.04.2012.

Маринка М.