



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**



**Немања У. Јовичић**

**ИМУНОМЕТАБОЛИЧКИ ФЕНОТИП МИШЕВА СА  
ДОМИНАНТНИМ ТИП 1 И ТИП 2 ИМУНСКИМ  
ОДГОВОРОМ У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МОДЕЛУ  
ГОЈАЗНОСТИ**

**ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА**

**Ментор: проф. др Нада Пејновић**

**Крагујевац, 2016. Године**

*Неизмерну захвалност дугујем ментору,  
проф. др Нади Пејновић, проф. др Миодрагу Лукићу,  
проф. др Небојши Арсенијевићу, колегама из Центра  
за молекулску медицину и истраживање матичних  
ћелија и колегама са Катедре за хистологију и  
ембрологију Факултета медицинских наука у  
Крагујевцу.*

*Хвала Биљани и Тари и мојим родитељима на  
подршци, љубави и стрпљењу.*

## Садржај

1. УВОД.....	1
1.1. ГОЈАЗНОСТ.....	1
1.1.1. Физиолошка и патофизиолошка улога адипозног ткива.....	2
1.1.2 Гојазност и инсулинска резистенција.....	4
1.1.3 Инфламација адипозног ткива изазвана гојазношћу.....	5
1.2. НЕАЛКОХОЛНА МАСНА БОЛЕСТ ЈЕТРЕ.....	10
1.2.1 Стеатоза јетре.....	11
1.2.2 Неалкохолни стеатохепатитис.....	13
1.2.3 Фиброза јетре.....	14
1.2.4 Инфламација у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре.....	16
1.3 IL-33/ST2 СИГНАЛНИ ПУТ.....	19
1.3.1 ST2 молекула - грађа и функција.....	19
1.3.2. IL-33 - структура и функција.....	21
1.3.3. IL-33 - улога у патологији јетре и гојазности.....	23
2. ЦИЉ СТУДИЈЕ.....	27
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	30
3.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ.....	30
3.1.1 Поступак добијања BALB/c мишева са циљаном делецијом гена за ST2 молекула.....	30
3.2. ИНДУКЦИЈА ГОЈАЗНОСТИ ПРИМЕНОМ РЕЖИМА ИСХРАНЕ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ.....	32

3.3. ПРАЋЕЊЕ МЕТАБОЛИЧКИХ ПАРАМЕТАРА.....	34
3.4. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦИТОКИНА У ХОМОГЕНАТУ ТКИВА ЈЕТРЕ И СЕРУМУ .....	35
3.5. АНАЛИЗА МОНОНУКЛЕАРНЕ ПОПУЛАЦИЈЕ ЋЕЛИЈА ВИСЦЕРАЛНОГ АДИПОЗНОГ ТКИВА И ЈЕТРЕ МЕТОДОМ ПРОТОЧНЕ ЦИТОМЕТРИЈЕ .	37
3.5.1. Изолација ћелија стромалне васкуларне фракције из висцералног адипозног ткива .....	37
3.5.2. Изолација мононуклеарних ћелија из јетре .....	38
3.6. ФЕНОТИПСКА И ФУНКЦИОНАЛНА АНАЛИЗА ИЗОЛОВАНИХ МОНОНУКЛЕАРНИХ ЋЕЛИЈА.....	38
3.6.1. Бојење мембранских маркера.....	40
3.6.2. Бојење интрацелуларних маркера и цитокина .....	40
3.7. ХИСТОПАТОЛОШКА АНАЛИЗА ТКИВА ЈЕТРЕ.....	41
3.7.1. Израда патохистолошких препарата .....	41
3.7.3. Бојење хематоксилином и еозином .....	42
3.7.4. Бојење липида Oil-red O методом.....	43
3.7.5. Бојење колагена Sirius red методом.....	43
3.7.6. Бојење гликогена PAS (Periodic acid–Schiff) техником.....	44
3.7.7. Квантификација и скорирање патохистолошких промена у јетри.....	44
3.8. ИМУНОХИСТОХЕМИЈА .....	46

3.9. АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈА ГЕНА У ТКИВУ ЈЕТРЕ МЕТОДОМ КВАНТИТАТИВНЕ ЛАНЧАНЕ РЕАКЦИЈЕ ПОЛИМЕРАЗЕ У РЕАЛНОМ ВРЕМЕНУ .....	47
3.9.1. Изолација RNA из ткива јетре миша.....	47
3.9.2. Реверзна транскрипција RNA у комплементарну DNA .....	48
3.9.3. Квантификација експресије гена .....	48
3.11. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА.....	50
4. РЕЗУЛТАТИ .....	51
4. 1. ИМУНОМЕТАБОЛИЧКИ ФЕНОТИП МИШЕВА ЧИСТОГ СОЈА C57Bl/6 И BALB/c НА СТАНДАРДНОЈ ИСХРАНИ И ИСХРАНИ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ.....	51
4.1.1.Телесна тежина мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c.....	51
4.1.2. Гликорегулација код мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c .....	52
4.1.3. Карактеристике висцералног масног ткива и липидни профил код мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c .....	56
4.1.4. Фенотипска анализа имунских ћелија у висцералном масном ткиву мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c .....	60
4.1.5. Стеатоза јетре код мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c .....	62
4.1.6. Лобуларна инфилтрација јетре код мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c .....	64
4.1.7. Фиброза јетре код мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c.....	67
4.1.8. Фенотипска анализа имунских ћелија у јетри мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c .....	70

4.1.9. Експресија гена укључених у метаболизам липида и стеатофиброзу у јетри мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c .....	77
4.1.10. Цитокински профил у серуму и јетри мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c .....	80
4. 2. УЛОГА IL-33/ST2 СИГНАЛНОГ ПУТА У ИМУНОМЕТАБОЛИЧКОМ ФЕНОТИПУ BALB/c МИШЕВА СА ДОМИНАНТНИМ ТИП 2 ИМУНСКИМ ОДГОВОРОМ НА ИСХРАНИ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ: ПОРЕЂЕЊЕ ИМУНОМЕТАБОЛИЧКИХ ПАРАМЕТАРА ИЗМЕЂУ ДИВЉЕГ СОЈА (WT) И ST2 ДЕФИЦИЈЕНТНИХ (ST2 <sup>-/-</sup> ) BALB/c МИШЕВА .....	82
4.2.1.Телесна тежина WT и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева.....	82
4.2.2. Гликорегулација код WT и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева.....	83
4.2.3. Карактеристике висцералног масног ткива и липидни профил WT и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева .....	84
4.2.4. Фенотипска анализа имунских ћелија у висцералном масном ткиву код WT и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева .....	86
4.2.5. Стеатоза јетре код WT и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева .....	90
4.2.6. Лобуларна инфилтрација јетре код WT и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева.....	91
4.2.7. Фиброза јетре код BALB/c мишева дивљег соја и ST2 <sup>-/-</sup> мишева.....	94
4.2.8. Фенотипска анализа имунских ћелија у јетри код WT и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева.....	96
4.2.9. Експресија гена укључених у метаболизам липида и стеатофиброзу у јетри код WT и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева.....	99

4.2.10. Цитокински профил у серуму и јетри WT и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева.....	101
4. 3. УЛОГА IL-33/ST2 СИГНАЛНОГ ПУТА У ИМУНОМЕТАБОЛИЧКОМ ФЕНОТИПУ BALB/c МИШЕВА СА ДОМИНАНТНИМ ТИП 2 ИМУНСКИМ ОДГОВОРОМ НА ИСХРАНИ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ И ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ ФРУКТОЗЕ: ПОРЕЂЕЊЕ ИМУНОМЕТАБОЛИЧКИХ ПАРАМЕТАРА У ДИВЉЕГ СОЈА (WT) И ST2 ДЕФИЦИЈЕНТНИХ (ST2 <sup>-/-</sup> ) BALB/c МИШЕВА.....	103
4.3.1.Телесна тежина WT и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева.....	103
4.3.2. Гликорегулација код WT и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева на комбинованом режиму исхране .....	104
4.3.3. Карактеристике висцералног масног ткива WT и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева на комбинованом режиму исхране .....	105
4.3.4. Фенотипска анализа имунских ћелија у висцералном масном ткиву BALB/c мишева дивљег соја и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева на комбинованом режиму исхране .....	109
4.3.5. Стеатоза јетре BALB/c мишева дивљег соја и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева на комбинованом режиму исхране.....	113
4.3.6. Лобуларна инфилтрација јетре код BALB/c мишева дивљег соја и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева на комбинованом режиму исхране .....	114
4.3.7. Фиброза јетре код BALB/c мишева дивљег соја и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева на комбинованом режиму исхране .....	116
5. ДИСКУСИЈА .....	122
5.1. ИМУНОМЕТАБОЛИЧКИ ФЕНОТИП МИШЕВА СА ДОМИНАНТНИМ ТИП 1 И ТИП 2 ИМУНСКИМ ОДГОВОРОМ .....	122

5.1.1	Анализа параметара промене телесне тежине и гликорегулације .....	123
5.1.2	Анализа карактеристика висцералног адипозног ткива и липидног профила .....	124
5.1.2	Инфламација и фенотип имунских ћелија у висцералном адипозном ткиву .....	125
5.1.3	Специфичности соја мишева у развоју стеатозе јетре и метаболизма липида у јетри .....	126
5.1.4	Специфичности соја мишева у развоју лобуларне инфилтрације јетре и хепатоцелуларног оштећења .....	128
5.1.5	Специфичности соја мишева у развоју фиброзе јетре.....	128
5.1.6	Фенотипска и функционална анализа имунских ћелија у јетри.....	129
5.2.	УЛОГА IL-33/ST2 СИГНАЛНОГ ПУТА У ИМУНОМЕТАБОЛИЧКОМ ФЕНОТИПУ BALB/c МИШЕВА СА ДОМИНАНТНИМ ТИП 2 ИМУНСКИМ ОДГОВОРОМ НА ИСХРАНИ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ.....	131
5.2.1.	Улога IL-33/ST2 сигналног пута у имунометаболичком фенотипу BALB/C мишева са доминантним тип 2 имунским одговором на исхрани са високим садржајем масти и високим садржајем фруктозе.....	133
6.	ЗАКЉУЧЦИ.....	137
	СКРАЋЕНИЦЕ .....	140
7.	ЛИТЕРАТУРА .....	146
8.	ПРИЛОГ .....	170
8.1.	КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА.....	170
8.2.	KEY WORDS DOCUMENTATION.....	175



8.3. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА .....	179
8.4. СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА.....	180
8.5. THE LIST OF PUBLISHED PAPERS .....	184
8.6. ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ.....	187

## 1. УВОД

Гојазност је хронично обољење које карактерише прекомерно и ектопично накупљање масног ткива у организму. Гојазност представља главни фактор ризика за развој метаболичких поремећаја укључујући инсулинску резистенцију, тип 2 дијабетес, неалкохолну масну болест јетре, атеросклерозу и друге болести.

Истраживања у последњих десет година су јасно показала да имунски систем има значајну улогу у метаболичким поремећајима. Ово откриће укључује и значај инфламације посредоване ћелијама урођене и стечене имуности у развоју гојазности и метаболичког синдрома. У хуманој популацији и експерименталним животињама јасно је показано да осетљивост на велики број болести може зависити од имуногенетских фактора који поред осталог одређују и преовлађујући тип имунског одговора. Тако, М1/Th1 индивидуе имају снажан целуларни имунски одговор, док М2/Th2 индивидуе развијају чешће и интензивније агресивне имунске реакције као што су алергијске реакције и одговор на неке инфекције.

Гојазност карактерише постојање инфламације у увећаном висцералном адипозном ткиву и хронична системска инфламација ниског степена, означена као метаболичка инфламација (метафламација), чији молекулски механизми настанка и деловања нису довољно разјашњени. У физиолошким условима, у масном ткиву преовлађује антиинфламаторни М2/Th2 тип имунског одговора, док у гојазном масном ткиву преовлађује проинфламаторни М1/Th1 имунски одговор.

### 1.1. ГОЈАЗНОСТ

Гојазност представља једно од најраспрострањенијих хроничних обољења савременог друштва. Основна карактеристика гојазности је повећано стварање и накупљање масних наслага у организму. Гојазност се клинички дефинише одређивањем вредности индекса телесне масе (енгл. *body mass index*, ВМІ). Индекс телесне масе представља однос између телесне масе изражене у килограмима и вредности квадрата телесне висине израженог у квадратним метрима (1). Коришћењем овог параметра, особе са вредношћу ВМІ од 25 до 29 kg/m<sup>2</sup> се сврставају у групу са прекомерном тежином, док се особе са ВМІ изнад 30 kg/m<sup>2</sup> сматрају гојазним (1, 2). Прекомерна тежина представља шести најзначајнији

фактор ризика који доприноси укупном оптерећењу болешћу (енг: *overall burden of disease*) у свету (3). У основи, гојазност представља последицу поремећаја у односу између повећаног уноса нутријената и енергетске потрошње у дужем временском периоду, али заправо, гојазност је комплексно мултифакторијално стање у чијем настанку значајну улогу има генетска компонента (4). Абдоминално адипозно ткиво представља комплексан орган сачињен од различитих одељака који укључују субкутани депо и интра-абдоминални депо, који даље можемо поделити на ретроперитонеални и интраперитонеални део. Интраперитонеални депо се састоји од мезентеричне и оменталне адипозне масе (5). Од укупне количине масног ткива у организму, више од 85% се налази у субкутаном депоима, док интраперитонеални депо, који још називамо и висцерално адипозно ткиво (енгл. *visceral adipose tissue*, VAT), чини тек 10% укупног масног ткива (6). Управо се овај депо сматра значајним за развој метаболичких компликација (7-9). Повећање висцералног адипозног ткива је основни узрок настанка метаболичког синдрома и његових компликација као што је неалкохолна масна болест јетре (енгл. *Nonalcoholic fatty liver disease*, NAFLD) (10-13).

### *1.1.1. Физиолошка и патофизиолошка улога адипозног ткива*

Адипозно ткиво представља одељак организма у ком се складишти вишак енергије у облику триглицерида. Такође, адипозно ткиво представља и активан ендокрини орган (14). Поред адипоцита и преадипоцита, основних ћелијских популација, адипозно ткиво садржи и ћелије ендотела као и резидентне имунске ћелије (15). У случају позитивног енергетског баланса адипоцити депонују вишак енергије у виду триглицерида у ћелијским инклузијама, липидним капима. Раст адипозног ткива се одвија механизмом хиперплазије ћелија, односно увећањем броја адипоцита, као и механизмом хипертрофије, увећањем величине и капацитета постојећих адипоцита (16). Постојало је уверење да је број адипоцита одређен до краја адолесценције и да затим остаје непромењен у старијем животном добу, и код мршавих и код гојазних људи (17). Скорашње студије су показале да је адипозно ткиво много комплексније грађе, као и да је динамика раста процес који се не зауставља у младости, већ се механизам хиперплазије под одређеним условима може јавити и код људи старијег узраста (18). Такође је истакнут значај локализације адипозног ткива. Показано је да је акумулација масти у горњим партијама тела, у висцералним адипозним депоима, удружена са инсулинском резистенцијом и метаболичким поремећајима (19), док је пораст

депоа адипозног ткива у доњим партијама тела имао протективан ефекат (20, 21). Сматра се да у људском организму постоје два различита типа прекурсора адипоцита, преадипоцита. Ови преадипоцити се значајно разликују по развојним и функционалним карактеристикама и сматра се да су одговорни за пластичност у развоју и функцији различитих депоа адипозног ткива у организму (22).

Адипозно масно ткиво у основи представља депо триглицерида из којих се, у случају потребе организма, процесом липолизе у циркулацију ослобађају слободне масне киселине. Оне се затим допремају до ћелија и ткива који их користе као извор енергије. Сматра се да управо продукти липолизе, односно слободне масне киселине, имају кључну улогу код метаболичких поремећаја повезаних са гојазношћу, као што је инсулинска резистенција (15). Анатомска локализација висцералног адипозног ткива у великој мери утиче на његову улогу у метаболичким поремећајима. Захваљујући локализацији, метаболити, пре свега слободне масне киселине (енгл. *free fatty acids, FFAs*), као и продукти ендокрине секреције ћелија висцералног масног ткива, доспевају директно у систем *venae portae* (23). Позитиван енергетски баланс, односно повећани унос нутритијената, праћен је хипертрофијом адипоцита. Уколико је капацитет адипоцита за депоновање триглицерида премашен, настаје инфлукс слободних масних киселина директно у портну циркулацију (13). У растућем висцералном адипозном ткиву, процес липолизе се додатно увећава, што доприноси доступности слободних масних киселина у портној циркулацији (24). Повећана количина слободних масних киселина у јетри индукује повећану синтезу липида, глуконеогенезу, као и развој инсулинске резистенције у јетри (25). Инсулин сензитивни хепатоцити бивају директно изложени повећаној концентрацији слободних масних киселина и других метаболита као и адипокинима и цитокинима из висцералног адипозног ткива. Уколико је ова изложеност хронична, она промовише глуконеогенезу, смањује продукцију ензима укључених у оксидацију слободним масних киселина, и истовремено повећава складиштење и синтезу триглицерида и липопротеина, а такође и индукује инсулинску резистенцију (26-28). Повећана концентрација циркулишућих слободних масних киселина такође може бити узрочник инсулинске резистенције у периферним ткивима што је показано код људи као и код експерименталних животиња (25, 29).

На сложеност механизма који учествују у иницирању и прогресији метаболичке дисфункције указује и студија која је показала да су и депои субкутаног масног ткива веома значајан извор слободних масних киселина у системској и портној циркулацији у гојазности (30).

### 1.1.2 Гојазност и инсулинска резистенција

Инсулинска резистенција је дефинисана као смањена способност ткива да развије биолошки одговор на инсулин. Инсулинска резистенција је кључни поремећај у оквиру метаболичког синдрома и сматра се основним прогностичким фактором у настанку тип 2 *Diabetes mellitus*-а (31). Адипозно ткиво ја инсулин-сензитивно ткиво у ком инсулин има вишеструко дејство. У адипозном ткиву инсулин стимулише депоновање триглицерида вишеструким механизмима укључујући стимулисање диференцијације преадипоцита у адипоците, повећано преузимање глукозе и масних киселина пореклом од циркулишућих липопотеина, стимулацију липогенезе и инхибирање липолизе (15, 32). Метаболички ефекти инсулина су посредовани комплексном мрежом сигналних путева. У овој мрежи се као најзначајнија издвајају два пута: PI3K-АКТ/ПКВ (енгл. *phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)-AKT/protein kinase B (PKB)*), сигнални пут преко ког инсулин остварује своје метаболичке ефекте и MAPK (енгл. *Ras-mitogen-activated protein kinase*) сигнални пут преко ког инсулин остварује митогене ефекте (15). У току развоја гојазности, слободне масне киселине као и различити адипокини које ослобађа адипозно ткиво утичу на поремећаје у сигналним путевима инсулина. Показано је да слободне масне киселине и њихови метаболити као што су ацил-коензим А, церамиди и диацилглицерол, нарушавају сигналне путеве инсулина промовишући активност протеин киназа као што су протеин киназа С, MAPK, JNK (енгл. *c-Jun N-terminal kinase*), као и инхибитора NFκB β киназе (енгл. *nuclear factor κB kinase β*) (33).

Поремећај у сигналном путу инсулина односно инсулинска резистенције се манифестују смањењем транспорта и метаболисања глукозе, пре свега у ћелијама адипозног ткива и у попречнопругастој скелетној мускулатури. Истовремено настаје смањена супресија процеса глуконеогенезе и гликогенолизе у јетри (34). Периферна липолиза узрокује повећано допремање слободних масних киселина у јетру, при чему оне смањују везивање инсулина за хепатоците, а тиме и његову разградњу (35). Као последица настаје

системска хиперинсулинемија. Хиперинсулинемију прати смањена способност инсулина да супримира механизам глуконеогенезе док исти процес додатно појачавају слободне масне киселине (36). Даљу прогресију инсулинске резистенције прати акумулација липида у хепатоцитима односно стеатоза јетре, као и развој дислипидемије (37, 38). Дислипидемију, поред повећаног системског ниво слободних масних киселина, карактерише и повећање нивоа триглицерида и VLDL, LDL (енгл. *low-density lipoprotein*), уз редукован HDL (енгл. *high-density lipoprotein*) (39).

Експерименталне и клиничке студије су показале да је висцерално адипозно ткиво, поред његове основне улоге енергентског депоа, и веома значајан ендокрини орган. Висцерално адипозно ткиво секретује бројне супстанце међу којима су хормони (адипонектин, лептин, резистин и др.) и цитокини као што су интерлеукин-6 (енгл. *interleukin-6*, IL-6) и фактор некрозе тумора- $\alpha$  (енгл. *tumor necrosis factor- $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ) (40).

### 1.1.3 Инфламација адипозног ткива изазвана гојазношћу

Хронична системска инфламација индукована гојазношћу представља најзначајнији фактор ризика у развоју тип 2 *Diabetes mellitus*-а. Студије показују да је да је гојазношћу индукована инфламација адипозног ткива основни узрок настанка инсулинске резистенције и хроничне системске инфламације (33, 41). Инфламација адипозног ткива узрокована гојазношћу представља процес одговоран за активацију проинфламаторних сигналних путева који ометају сигналне путеве инсулина и индукују инсулинску резистенцију. Активација проинфламаторних путева истовремено у адипоцитима утиче на смањење депоновања триглицерида и ослобађање слободних масних киселина, чија повећана концентрација индукује инсулинску резистенцију у јетри и скелетној мускулатури (42).

У току развоја гојазности, висцерално адипозно ткиво инфилтрира велики број макрофага који имају кључну улогу у развоју инфламације и патогенези инсулинске резистенције (43, 44). Највећи број макрофага у адипозном ткиву гојазних особа и мишева има карактеристичну локализацију. Они секвестрирају некротичне адипоците, фузионишу око њих и формирају карактеристичне крунолике (енгл. *crown-like*) структуре које представљају хистопатолошко обележје гојазног адипозног ткива (45). У инфилтришућим макрофазима активирају се проинфламаторни сигнални путеви и настаје продукција

проинфламаторних цитокина, TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-1 $\beta$  (46). Инфилтрација макрофага и експресија проинфламаторних маркера представља реверзибилни процес, пошто је показано да се њихов број значајно смањује након губитка телесне тежине (47, 48)

Прекомерни унос нутритијената стимулише продукцију хемокина у адипоцитима висцреалног масног ткива међу којима су најзначајнији MCP-1 (енгл. *monocyte chemotactic protein-1*) и LTB4 (енгл. *Leukotriene B4*). Настаје хемокински градијент који је одговоран за миграцију и привлачење моноцита у висцерално адипозно ткиво, након чега настаје њихова диференцијација у макрофаге адипозног ткива (49). Макрофази настављају да продукују хемокине одржавајући процес инфламације и инфилтрације активним (46).

Студије су одавно показале да је популација макрофага веома хетерогена и да фенотипске и функционалне карактеристике ових ћелија у великој мери зависе од околне средине односно ткива у којем се налазе. Основна класификација популације макрофага је направљена по угледу на поделу ефекторских Т лимфоцита на Th1 и Th2 (енгл. *T helper*) ћелије (50). M1 макрофази представљају класично активирани макрофаге који под утицајем интерферона- $\gamma$  (енгл. *interferon- $\gamma$* , IFN- $\gamma$ ) и липополисахарида (енгл. *lipopolysaccharide*, LPS) развијају проинфламаторни фенотип. M1 макрофази учествују у одбрани од интрацелуларних патогена и продукцијом IL-12 (енгл. *interleukin-12*) поларизују стечени имунски одговор у Th1 правцу (51). Ову популацију макрофага одликује продукција проинфламаторних цитоина као што су TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 и IL-23, затим реактивних кисеоничних врста (енгл. *reactive oxygen species*, ROS) и азот-моноксида (енгл. *nitric oxid*, NO). M1 макрофази такође појачано експримирају МНС молекулу (енгл. *major histocompatibility complex*) и костимулаторне молекуле, као и различите хемокине (51). Другу популацију макрофага чине алтернативно активирани M2 макрофаги који функционалне карактеристике стичу под утицајем цитокина Th2 имунског одговора, IL-4 и IL-13. Они учествују у имунској одбрани од паразита, ремоделовању и репарацији ткива, а имају и имунорегулаторну улогу. Њихову функцију одликује синтеза антиинфламаторних цитокина, IL-10, IL-1 рецептор антагонист (IL-1Ra), TGF- $\beta$  (енгл. *transforming growth factor- $\beta$* ) (52, 53).

У току развоја гојазности, адипозно ткиво инфилтрирају M1, макрофази проинфламаторног фенотипа (54). Такође је показано да резидентни макрофази адипозног

тквива мишева нормалне телесне тежине експримирају гене који одговарају М2 статусу активације, док макрофаги адипозног тквива гојазних мишева карактерише повећана експресија маркера проинфламаторног, М1 статуса. Ови резултати указују на то да резидентни макрофази у гојазном адипозном тквиву мењају свој поларизациони статус као одговор на промене микросредине тквива (55). У висцералном адипозном тквиву, обе популације макрофага, и М1 и М2, експримирају F4/80 и CD11b (енгл. *cluster of differentiation*, CD) маркере, при чему М1 макрофази додатно експримирају и CD11c интегрин (54, 56). У нормалном висцералном адипозном тквиву преовладавају резидентни М2 макрофази који су CD11c<sup>-</sup> и испољавају М2 фенотип. Њега карактерише експресија антиинфламаторног IL-10, као и експресија рецептора за манозу CD206 (54, 56, 57). Као што је претходно поменуто, у току развоја гојазности, адипозно тквиво инфилтрирају М1 макрофази проинфламаторног фенотипа који експримирају CD11c и продукују проинфламаторне цитокине, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, и хемокине као што је MCP-1 (58). Код гојазности, макрофази адипозног тквива представљају основни извор проинфламаторних медијатора који узрокују локалне и системске метаболичке поремећаје као и стање системске инфламације. Присуство проинфламаторних макрофага односно поларизација у М1 смеру у значајној мери корелира са појавом инсулинске резистенције у гојазности.

Бројне студије указују да, поред макрофага, у патогенези инсулинске резистенције веома значајну улогу имају и друге ћелије имунског система и њихова међусобна комуникација. Т лимфоцити такође активно регулишу и доприносе инфламацији изазваној гојазношћу. Испитивања инфламације у раној фази гојазности узроковане исхраном са високим садржајем масти, су показала да инфилтрација адипозног тквива лимфоцитима претходи моноцитној инфилтрацији, односно да Т лимфоцити имају улогу у иницијацији инфламације масног тквива (59). Сматра се да Т лимфоцити у инфламацији индукованој гојазношћу превасходно имају улогу у регулацији инфилтрације и активационог статуса макрофага (60). Показано је да кључну улогу у прогресији метаболичких поремећаја удружених са гојазношћу имају CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити (61). CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити су према фенотипском и функционалном статусу подељени на проинфламаторну Th1 субпопулацију коју карактерише продукција IFN- $\gamma$ , и Th2 субпопулацију која продукује IL-4 и IL-13 (62). У адипозном тквиву се налази и одређени број резидентних регулаторних CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Т лимфоцита (енгл. *forkhead boxP3*, FoxP3) који секрецијом антиинфламаторних цитокина као

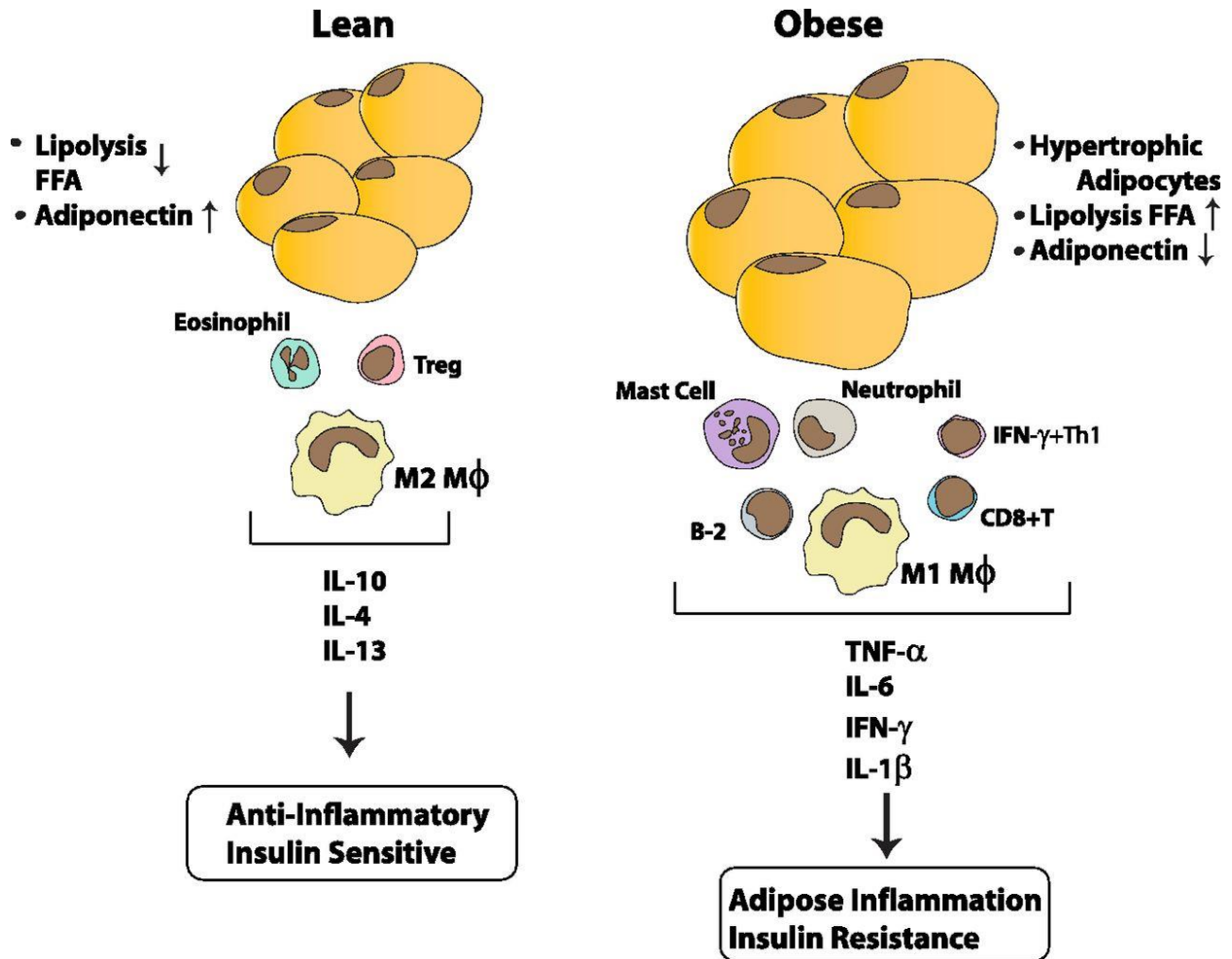


што је IL-10, спречавају миграцију макрофага и индукују поларизацију у M2 смеру (63). У току развоја гојазности број резидентних регулаторних CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>T лимфоцита опада. Показано је и да у развоју инфламације адипозног ткива, инфилтрација CD8<sup>+</sup> T лимфоцита претходи регрутовању макрофага (60). CD8<sup>+</sup> T цитотоксични лимфоцити који инфилтрирају адипозно ткиво, затим продукцијом проинфламаторних цитокина стимулишу миграцију и активацију макрофага. Сматра се да CD8<sup>+</sup> T лимфоцити имају улогу у започињању али и у одржавању и прогресији инфламације у адипозном ткиву.

У висцералном адипозном ткиву се налазе и резидентни еозинофили који продукцијом IL-4 и IL-13 учествују у одржавању M2 поларизационог статуса макрофага. Еозинофили адипозног ткива одржавањем броја и функција алтернативно активираних M2 макрофага у адипозном ткиву, утичу на одржање метаболичке хомеостазе (64). Насупрот њима, у висцералном адипозном ткиву гојазних мишева, повећана је инфилтрација мастоцитима, а њихова деплеција значајно смањује инфламацију и стабилизује гликорегулацију (65).

У одсуству гојазности, имунске ћелије адипозног ткива, M2 макрофази, регулаторни T лимфоцити и еозинофили, синтезом IL-10, IL-4 и IL-13, омогућавају одржање антиинфламаторног миљеа и доприносе осетљивости ткива на инсулин (66). Гојазност изазива промену фенотипа и функционалног стања имунских ћелија (46, 67). Настаје регрутација моноцита и инфилтрација адипозног ткива праћена поларизацијом у M1 смеру и последичном продукцијом проинфламаторних цитокина, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , и IL-6, што доприноси настанку инсулинске резистенције (66). Развој инфламације у адипозном ткиву прати смањење броја регулаторних T лимфоцита и еозинофила, а истовремено и пораст броја неутрофила, мастоцита, проинфламаторних Th1 интерферон- $\gamma$  продукујућих лимфоцита и CD8<sup>+</sup> T цитотоксичних лимфоцита. Хемокини и проинфламаторни цитокини

делују аутокринно, паракринно и ендокринно и промовишу инфламацију и инсулинску резистенцију у адипозном и другим ткивима (66) (Схема 1).



**Схема 1.** Инфламаторни миље у висцералном адипозном ткиву у физиолошким условима и инфламацији индукованој гојазношћу (кориговано према: Samad F, Ruf W. *Inflammation, obesity, and thrombosis. Blood.* 2013;122(20):3415-22.)

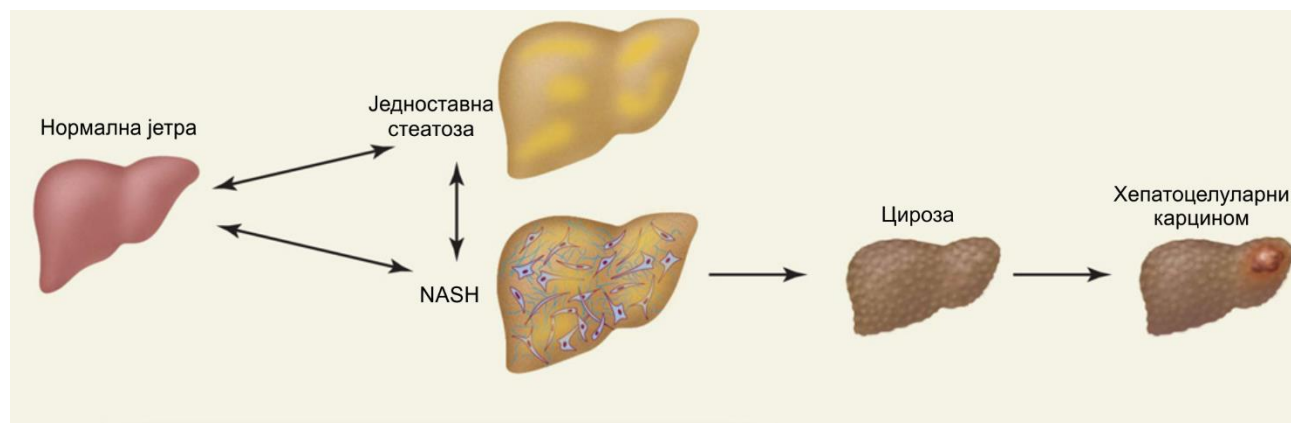
## 1.2. НЕАЛКОХОЛНА МАСНА БОЛЕСТ ЈЕТРЕ

Неалкохолна масна болест јетре (енгл. NAFLD - *Nonalcoholic fatty liver disease*) подразумева широк опсег поремећаја које у основи карактерише повећана акумулација липида унутар ћелија јетре. Ови поремећаји се крећу у распону од бенигне статозе јетре до неалкохолног стеатохепатитиса (енгл. NASH - *Nonalcoholic steatohepatitis*), цирозе и хепатоцелуларног карцинома (68-70). Неалкохолна масна болест јетре представља једну од манифестација метаболичког синдрома и сматра се његовом хепатичком манифестацијом (71). Појам неалкохолни стеатохепатитис је уведен 1980. године да би описао клинички ентитет који по биохемијским и патохистолошким параметрима одговара алкохолном стеатохепатитису, али који настаје у одсуству позитивне анамнезе о конзумацији алкохола (72).

Неалкохолна масна болест јетре је водећи узрок хроничне болести јетре у развијеним земљама (68). Сматра се да је преваленца NAFLD 20-30% у општој популацији, а чак 75-100% код гојазних особа. Код 20% пацијената са NAFLD развија се хронична инфламација у јетри односно NASH, која може изазвати цирозу јетре, портну хипертензију, хепатоцелуларни карцином и повећани морталитет (73). И поред ових чињеница, узрочници и молекуларни механизми који доводе до прогресије болести и NASH још увек нису довољно разјашњени. Експериментални подаци показују да инфламацију у NASH-у узрокују различити фактори: инсулинска резистенција, системска липотоксичност због прекомерног уноса хране, продукти метаболизма липида, проинфламаторни цитокини, адипокини, ендотоксин и други фактори (71). Молекулска патогенеза NASH-а је још увек у великој мери непозната. Деј и Џејмс (енг. *Day, James*) су 1998. поставили хипотезу „два удараца“ (74). „Први ударац“ представља екцесивну акумулацију липида у хепатоцитима која је последица инсулинске резистенције. „Други ударац“ који изазива оштећење хепатоцита, инфламацију, а након тога и фиброзу, настаје под утицајем различитих фактора. Сматра се да су најзначајнији фактори: оксидативни стрес настао као последица митохондријалне  $\beta$ -оксидације масних киселина, продукција проинфламаторних цитокина и адипокина од стране висцералног адипозног ткива, ендотоксин из бактерија пореклом из гастроинтестиналног тракта, као и активација инфлазома (75)

### 1.2.1 Стеатоза јетре

Неалкохолна масна болест јетре или NAFLD представља термин који обухвата широк спектар клиничких ентитета који су међусобно повезани. Они такође представљају фазе прогресије болести које се најчешће, али не обавезно, међусобно надовезују (Схема 2).



**Схема 2.** Неалкохолна масна болест јетре - прогрессија болести. (Кориговано према: *Cohen JC. et al. Science 2011; 332:1519-1523.*)

Почетни стадијум болести представља једноставна стеатоза јетре. Стеатоза јетре представља акумулацију триглицерида у цитоплазми хепатоцита, а дијагноза се може поставити када се у више од 5% хепатоцита патохистолошки утврди присуство липидних капи. Дијагноза се такође може поставити када ниво триглицерида у јетри премаши вредност од 95% вредности нормалне концентрације (>55mg/грам ткива јетре) (76). Стеатоза јетре се развија из поремећаја баланса у аквизицији и уклањању триглицерида из јетре (68).

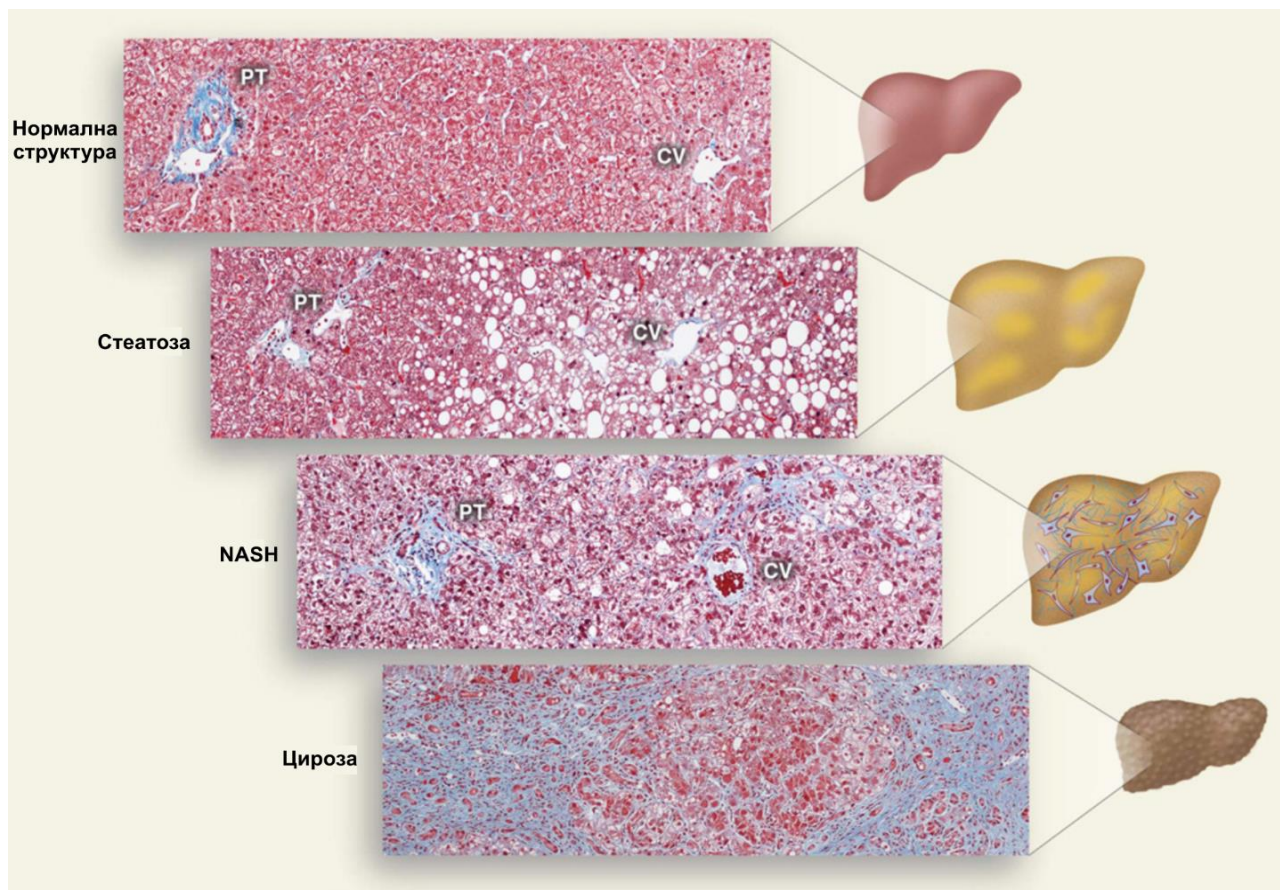
У настанку стеатозе улогу имају различити метаболички путеви, повећање допремања масти, повећање синтезе триглицерида, смањење оксидације масти и/или смањење отпремања масти у облику VLDL (енгл. *Very low-density lipoprotein*) (77). Слободне масне киселине које учествују у синтези триглицерида у јетри потичу из три извора: исхране, *de novo* синтезе и из адипозног ткива (68).

Раније је поменуто да постоје различита мишљења у пореклу слободних масних киселина из адипозног ткива. Преовладава мишљење да у току развоја гојазности у висцералном адипозном ткиву настају сложени имунометаболички поремећаји који стимулишу липолизу, што за последицу има директно отпуштање слободних масних киселина у портну циркулацију. Према другом тумачењу, висцерално масно ткиво није примарни иницијатор настанка метаболичке дисфункције и учествује само са 5-20 % у допремању слободних масних киселина у портну циркулацију. Највећи извор слободних масних киселина у портној циркулацији, према овим студијама, представља субкутано адипозно ткиво (30).

Прекомеран унос нутритивних прати повећано ослобађање слободних масних киселина у портну циркулацију и њихово повећано допремање у јетру (71). Мласти унете храном се након апсорбовања у цревима пакују у триглицеридима богате честице, хиломикроне, а затим улазе у системску циркулацију. Студије су показале да се код глодара око 80 % триглицерида у хиломикронима хидролизује липопротеин липазом, при чему настају слободне масне киселине које преузимају периферна ткива, док се преосталих 20 % допрема у јетру (78). Угљени хидрати унешени храном такође дају велики допринос развоју стеатозе јетре. Они изазивају пораст нивоа инсулина и директно промовишу *de novo* синтезу слободних масних киселина из ацетил коензима А (енгл. *acetyl-coenzyme A*, CoA) (68). Инсулин стимулише експресију транскрипционог фактора SREBP-1c (енгл. *sterol regulatory element-binding protein-1c*) преко сигналне каскаде која укључује AKT2, LXR, и mTOR (79), а SREBP-1c стимулише функцију ензима који учествују у липогенези (80). Глукоза такође стимулише липогенезу активацијом транскрипционог фактора ChREBP (енгл. *carbohydrate responsive element-binding protein*). ChREBP стимулише експресију бројних гена који учествују у биосинтези масних киселина (81). Поред глукозе, сматра се да фруктоза у исхрани има још већи значај у развоју стеатозе јетре. За разлику од глукозе, готово целу количину циркулишуће фруктозе директно преузима јетра (82). Због своје специфичне молекулске структуре, фруктоза се не може искористити за синтезу гликогена већ се конвертује у глицералдехид-3-фосфат, при чему настаје супстрат за *de novo* липогенезу (68).

### 1.2.2 Неалкохолни стеатохепатитис

Депонување масти у ћелијама јетре представља бенигни поремећај, али масно измењени хепатоцити постају остљиви на настанак оштећења што за последицу може имати развој запаљенске реакције и инфилтрацију паренхима јетре (83). За разлику од једноставне стеатозе, неалкохолни стеатохепатитис карактерише присуство некроинфламаторне компоненте као и последични знаци репарације ткива, односно фиброзе јетре (Схема 3) (84). За постављање дијагнозе неалкохолног стеатохепатитиса, поред стеатозе, неопходно је и присуство хепатоцелуларног оштећења које се манифестује присуством балонираних хепатоцита (енгл. *hepatocyte ballooning*) и присуство лобуларне инфилтрације (84). Хепатоцелуларно оштећење односно присуство балонираних хепатоцита представља једну од најзначајнијих патохистолошких карактеристика стеатохепатитиса и повезано је са прогресијом болести (85, 86). Патохистолошке карактеристике балонираних хепатоцита обухватају увећање ћелије са бледом цитоплазмом и великим хиперхроматским једром са уочљивим једарцем. У непосредној близини једра балонираних хепатоцита налазе се изразито еозинофилне инклузије које се састоје од измењених филамената као што је цитокератин 8/18. Ове цитоплазматске инклузије називамо Малоријева (енгл. *Mallory*) хијалинска телашца (87). У јетри је такође присутан и лобуларни инфилтрат мононуклеарних ћелија који је најчешће благог степена. Израженија инфилтрација и обимнији инфилтрат се уочавају у тежим облицима болести и знак су прогресије (88).



**Схема 3.** Неалкохолна масна болест јетре – патохистолошки налази и прогресија болести. (Кориговано према: Cohen JC. et al. *Science* 2011; 332:1519-1523.)

### 1.2.3 Фиброза јетре

Током прогресије болести, услед оштећења паренхима јетре, могу се активирати и механизми репарације ткива при чему настаје фиброза јетре. Присуство знакова фиброзе у великој мери позитивно корелира са прогресијом болести и настанком компликација, али није неопходно за постављање дијагнозе неалкохолног стеатохепатитиса. Процес фиброгенезе се у почетној фази патохистолошки уочава као перисинусоидно и перипортално депоновање коллагених влакана унутар лобулуса јетре. У почетним стадијумима, фиброзни ожиљак због своје локализације, има облик жичане мреже (“*chicken-wire fence fibrosis*”). У касним фазама болести појављује се и стеатофиброза локализована перипортално и у портним просторима. Настаје широка фиброзна септа која повезује односно “премошћава” (“*bridging fibrosis*”) васкуларне структуре јетриног паренхима, централну вену и портне просторе или портне просторе међусобно (89). Током прогресије

болести и развоја фиброзе, знаци стеатозе се могу постепено изгубити. Сматра се да је овај феномен повезан са капацитетом хепатоцита да метаболишу липиде (90).

У процесу репарације ткива јетре, односно фиброгенезе, кључне ћелије које синтетишу и депонују компоненте екстрацелуларног матрикса су активирани хепатичне стелатне ћелије (енгл. *Hepatic stellate cell*, HCSs). Хепатичне стелатне ћелије или Ито ћелије представљају резидентну популацију у јетри која је локализована у Дизеевим просторима и у физиолошким условима, њихова основна улога је депоновање витамина А (91). У одговору на оштећење хепатоцита, стимулисане хепатичне стелатне ћелије попримају активациони фенотип и трансформишу се у миофибробласте (92). У овом процесу трансформације или трансдиференцијације настају миофибробласти који имају висок пролиферативни потенцијал. Миофибробласти синтетишу компоненте екстрацелуларног матрикса и експримирају карактеристичан алфа изотип актина  $\alpha$ -SMA (енгл. *alpha-smooth muscle actin*) (91, 93). Осим активираних стелатних ћелија у продукцији колагених влакана активно учествују и фибробласти портних простора, ћелије доспеле из коштане сржи (мезенхималне стем ћелије, фиброцити и хематопоетске ћелије), као и ћелије паренхима јетре које улазе у процес епителијално-мезенхималне трансформације (91). Активација стелатних ћелија се одвија у две фазе. У првој фази ћелија се трансформише у миофибробласт, док се у другој фази повећава експресија рецептора за факторе раста и цитокине који стимулишу фиброзу (92). Цитокини који активирају стелатне ћелије регулишу инфламаторни одговор на оштећење и међу њима су IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  и TGF- $\beta$  (94, 95). У механизму развоја фиброзе велики значај има продукција интерлеукина-13. Интерлеукин 13 стимулише продукцију TGF- $\beta$  који представља кључни цитокин у процесу фиброгенезе, а може деловати профиброгено и путем независним од TGF- $\beta$  (96, 97).

Студије су недавно показале да је процес фиброгенезе у јетри регулисан и преко интерлеукина 33 (енгл. *interleukin-33*, IL-33) (98). Интерлеукин 33 је плејотропан цитокин, члан IL-1 фамилије цитокина, који има улогу у патогенези различитих инфламаторних и аутоимунских болести (99). Своје дејство IL-33 остварује везивањем за рецепторски комплекс на плазма мембрани који се састоји од ST2 молекула и IL-1R аксесорног протеина. Досадашње студије су показале да IL-33 има протективне метаболичке ефекте у гојазности и атеросклерози (100). У фибрози јетре IL-33 има улогу промотора фиброгенезе коју



остварује активацијом и експанзијом резидентних ИЛС ћелија (енгл. *innate lymphoid cells*) које продукују профиброгени ИЛ-13 (101). У здравој јетри основи извор ИЛ-33 јесу ендотелне ћелије синусоида, док су у фибротичној јетри то активирани стелатне ћелије, које су кључни медијатор фиброзе јетре (98).

#### 1.2.4 Инфламација у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре

Механизми настанка неалкохолног стеатохепатитиса на основи бенигне стеатозе још увек нису довољно разјашњени. Иницијална теорија „два удараца“ описује инсулинску резистенцију као „први ударац“ који изазива прекомерну акумулацију липида у хепатоцитима, а који затим постају осетљиви на „друге ударце“ који могу изазвати оштећења хепатоцита, инфламацију и фиброзу (74). Овакав модел развоја болести је у међувремену проширен и постављена је хипотеза „мултиплих паралелних удараца“ по којој велики број различитих механизма доприноси настанку инфламације у јетри (102). Медијатори запаљења, поготово из висцералног адипозног ткива и црева, имају кључну улогу у настанку каскаде коју чине инфламација, фиброза и туморогенеза (103). По овом моделу, основни покретач развоја неалкохолног стеатохепатитиса су стрес ендоплазматског ретикулума, адипокини, цитокини и механизми имунског одговора (102).

Јетру можемо посматрати и као орган имунског система, пре свега због јединственог анатомског положаја и изложености многобројним антигенима који у њу доспевају крвљу из гастроинтестиналног тракта (104). Поред локализације, у јетри се налази и веома велики број различитих имунских ћелија које представљају резидентне ћелијске популације. Највећи део ткива јетре чине ћелије паренхима, хепатоцити, док остатак чине резидентни макрофази (Купферове ћелије), дендритичне ћелије (енгл. *Dendritic cells*, DCs), ћелије природне убице (енгл. *Natural killer*, NK), НКТ (енгл. *Natural killer T*, НКТ) ћелије, Т лимфоцити, ендотелне ћелије јетриних синусоида и стелатне Ито ћелије. Сматра се да је инфламација у јетри пре свега посредована активацијом механизма и ћелија урођене имуности.

Купферове ћелије чине велику популацију резидентних макрофага јетре који у највећој мери потичу од циркулишућих моноцита који доспевају у јетру и насељавају синусоидалне просторе јетриног паренхима, мада постоје и докази који указују на то да

моноцити јетре још у фази ембрионалног развоја насељавају јетрин паренхим. У физиолошким условима, Купферове ћелије уклањају ендотоксине, ћелијски дебрис и микроорганизме. У стабилном стању, Купферове ћелије могу инхибирати антиген специфичну активацију Т лимфоцита и промовисати супресивну активност регулаторних Т лимфоцита (105). Купферове ћелије активирани бактеријским антигенима као што је LPS модулирају диференцијацију и активацију различитих имунских ћелија, пре свега дендритских ћелија, Т лимфоцита и неутрофила (104). У активираним стању Купферове ћелије могу допринети оштећењу ткива продукцијом проинфламаторних цитокина, продукцијом реактивних кисеоничних форми и активацијом комплемента (106).

Купферове ћелије су прве ћелије које развијају одговор на оштећење хепатоцита. У анималном моделу дијетом индукованог стеатохепатитиса показано је да прво настаје активација Купферових ћелија и последична продукција проинфламаторних цитокина пре свега TNF- $\alpha$ . У току развоја гојазности, број Купферових ћелија се не мења али оне продукцијом IP-10 (енгл. *interferon  $\gamma$ -induced protein-10*) и MCP-1 (енгл. *monocyte chemotactic protein-1*) хемокина изазивају инфилтрацију јетре проинфламаторним CD11b<sup>int</sup>Ly6C<sup>hi</sup> моноцитима. MCP-1 хемокин, познатији као CCL2, има посебно значајну улогу у инфилтрацији моноцитима. Насупрот томе, деплеција Купферових ћелија смањује инциденцу иштећења јетре, стеатозе и инфилтрацију моноцитима (107).

У развоју стеатохепатитиса значајну улогу има активација Купферових ћелија преко TLR рецептора (енгл. *toll-like receptor*). Активација TLR-9 стимулише Купферове ћелије на продукцију IL-1 $\beta$  (108). У експерименталним и клиничким студијама је показано да посебан значај у развоју и прогресији неалкохолног стеатохепатитиса има LPS-ом посредована активација TLR-4 и индукција активности Купферових ћелија (109, 110).

Макрофази представљају фенотипски и функционално хетерогену популацију ћелија и у зависности од ткивне микросредине могу да испоље различите карактеристике. M1 макрофази или макрофази активирани класичним путем, стимулирани дејством интерферона- $\gamma$  и липополисахарида експримирају проинфламаторни фенотип (111). Поларизација макрофага у проинфламаторни M1 фенотип и продукција проинфламаторних цитокина као што је IL-1 $\beta$  има значајну улогу у прогресији стеатохепатитиса (112). У почетним фазама развоја стеатохепатитиса значајну улогу има поларизација урођеног

имунског одговора у јетри у Th1 правцу која омогућава континуирану продукцију проинфламаторних медијатора. Даља прогресија у правцу цирозе може захтевати померање имунског одговора у правцу Th2 и поларизацију макрофага у правцу M2 фенотипа (113).

Улога дендритских ћелија у патогенези хроничних болести јетре и NAFLD није довољно разјашњена. Малобројне студије су показале да се у експерименталном моделу стеатохепатитиса дендритске ћелије појављују у раним фазама развоја болести и да имају проинфламаторни фенотип (114). Показано је и да примена хране са високим садржајема масти изазива пораст броја дендритских ћелија у висцералном масном ткиву и јетри где имају улогу у регрутовању проинфламаторних моноцита (115). У фазама регресије фиброзе, број дендритских ћелија се повећава и оне имају улогу ограничавања процеса фиброгенезе (116).

Број NK ћелија се повећава у гојазности али улога ових ћелија у патогенези стеатохепатитиса није до краја разјашњена (117). Студије на експерименталним моделима су показала да се број NK ћелија повећава са прогресијом стеатохепатитиса, али да ове ћелије спречавају настанак фиброзе продукцијом IFN $\gamma$  (118). NKT ћелије представљају популацију имунских ћелија јетре која развија одговор на непептидне антигене, као што су липидни и гликолипидни антигени, презентовани преко CD1d молекула, који може бити експримиран на антиген презентујућим ћелијама али и на хепатоцитима. Након активације NKT ћелије продукују и проинфламаторне антифибротичке Th1 цитокине као што је IFN- $\gamma$ , и профибротичке Th2 цитокине као што су IL-4 и IL-13, у чему се оглава њихов регулаторни потенцијал (104). NKT такође могу секретовати и специфичне цитокине као што је OPN (енгл. *Osteopontin*) који има улогу у прогресији оштећења јетре и Shh (енгл. *sonic hedgehog*), који има улогу у активацији хепатичних стелатних ћелија (119, 120).

У неалкохолном стеатохепатитису укупна популација CD3<sup>+</sup> Т лимфоцита у јетри је стабилна, али је показано да је однос CD8<sup>+</sup> / CD4<sup>+</sup> повећан (114). У току прогресије стеатохепатитиса цитотоксични CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити инфилтрирају јетру и продукцијом проинфламаторних цитокина стимулишу регрутовање макрофага (121). Улога помоћничких CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита у инфламацији јетре индукованој гојазношћу, је заснована на продукцији цитокина. Иако се сматра да је стеатохепатитис доминантно тип 1 поларизована болест, нови подаци указују на значај равнотеже између Th1 и Th2 одговора у развоју ове болести

(63). Нове студије такође све више указују на значај Th17 субпопулације Т лимфоцита и улогу IL-17 у прогресији стеатохепатитиса и развоју фиброзе (122, 123). Такође је значајна и улога регулаторних CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Т лимфоцита, који секрецијом антиинфламаторних цитокина спречавају миграцију макрофага, а истовремено стимулишу поларизацију ка M2 фенотипу (124).

### 1.3 IL-33/ST2 СИГНАЛНИ ПУТ

Један од главних циљева нашег истраживања био је испитивање улоге IL-33/ST2 сигналног пута у патогенези метаболичких поремећаја узрокованих гојазношћу и њихових хепатичних манифестација, посебно фиброзе јетре.

#### 1.3.1 ST2 молекула - грађа и функција

ST2 ген је код људи локализован на хромозому број 2 док је код мишева лоциран на хромозому број 1. Овај ген, који је такође познат и под називима T1, Fit1 и DER4, је први пут идентификован на фибробластима миша (125, 126). У мишијем геному се ST2 ген налази у близини IL-1R гена који су одговорни за кодирање рецептора за чланове IL-1 породице цитокина у коју убрајамо IL-1, IL-18, IL-33 (127, 128). Транскрипција ST2 гена је и код људи и код мишева под контролом два промотера, „горњег“ и „доњег“ (129, 130). Различитим везивањем (енгл. *splicing*) ST2 ген кодира најмање три изоформе протеина: солубилну форму ST2 молекула (sST2), мембрански ST2 молекул (ST2L), а код људи и варијантни ST2 (ST2V) (131, 132). Солубилна форма, sST2 овог молекула представља структурни хомолог мембранског ST2L од ког се разликује у 9 аминокиселина које су локализоване на његовом С-терминусу (129, 130, 133). Шмиц и сарадници (*Schmitz et al.*) су 2005. године анализирајући чланове IL-1 фамилије цитокина, идентификовали до тада непознат лиганд за ST2рецептор и назвали га IL-33(134). Улога солубилне форме овог молекула, sST2, још увек није разјашњена. Претпоставка је да он функционише као рецептор „мамац“ (енгл. *decoy*) који се везује за IL-33 и блокира његово дејство у системској циркулацији (131). Мембранска форма ST2L је експримирана у различитим ћелијама организма, пре свега на ћелијама имунског система, макрофазима, дендритским ћелијама, базофилним и еозинофилним гранулоцитима, НК и НКТ ћелијама, мастоцитима и Th2 лимфоцитима (131, 133, 135, 136).

Сматра се да је ST2L рецептор селективни маркер Th2 лимфоцита и да има велики значај за настанак и ефекторску функцију Th2 ћелија (137). Прве студије на основу којих је установљено овакво мишљење су показале да је ST2L mRNA (енгл. *messenger RNA*) конститутивно експримирана у мишијој Th2 ћелијској линији, док је у Th1 ћелијској линији одсутна, што је касније показано и PCR методом (138, 139). На мембрани Т лимфоцита и NK ћелија које продукују IL-4 и IL-5, ST2L рецептор је стабилно експримиран, док није присутан на мембрани Th1 лимфоцита и NK ћелија које продукују IFN- $\gamma$  (140-142). Иако је ST2 молекул значајан маркер за разликовање Th2 и Th1 подгрупа Т лимфоцита, показано је да постоји и субпопулација мишијих Th2 лимфоцита који не експримирају ST2L али продукују IL-4 и IL-10 (141).

Испитивања утицаја IFN- $\gamma$ , цитокина који карактерише Th1 имунски договор и IL-4, кључног Th2 цитокина, показала су да они имају антагонистички ефекат на експресију ST2L рецептора који остварују модулацијом функције нисходно локализованог промотера ST2 гена чиме утичу на синтезу ST2 молекула (143). Истраживања на IL-4 дефицијентним мишевима су показала да овај цитокин није неопходан за базичну синтезу и експресију ST2L молекула (140, 144). Међутим, такође је показано да апликација рекомбинантног IL-4 стимулише експресију ST2L и поларизацију имунског одговора у Th2 смеру (145). Супротан ефекат је имала примена егзогеног IFN- $\gamma$  који је узроковао поларизацију имунског одговора у Th1 смеру и утицао на смањење мембранске експресије ST2L на Т лимфоцитима (143).

Улога ST2 молекула је испитивана у различитим анималним моделима аутоимунских обољења и болести у чијој патогенези имунски одговор игра значају улогу. Показано је да блокада или делеција ST2 рецептора усмерава имунски одговор у Th1/Th17 смеру и супримира развој Th2 имунског одговора. У зависности од типа имунског одговора који има улогу у патогенези обољења, делеција ST2 рецептора може имати повољан ефекат или може погоршати тежину болести. У анималном моделу дијабетеса изазваног вишеструком применом малих доза стрептозотоцина, у чијем развоју доминантну улогу има Th1/Th17 имунски одговор, делеција ST2 рецептора погоршава тежину болести (146). Насупрот томе, у експерименталном моделу карцинома дојке, делеција ST2 гена успорава прогресију болести поларизујући имунски одговор у Th1 смеру и повећава антитуморску активност ћелија природне имуности (147).

Поред експресије и улоге у функцији помоћничких Th2 лимфоцита, ST2L молекули могу експримирати и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити. Такође је показана експресија ST2 молекула на В1 лимфоцитима, али не и на В2 лимфоцитима, што може указати на његов потенцијални значај у разликовању ове две ћелијске популације (148, 149).

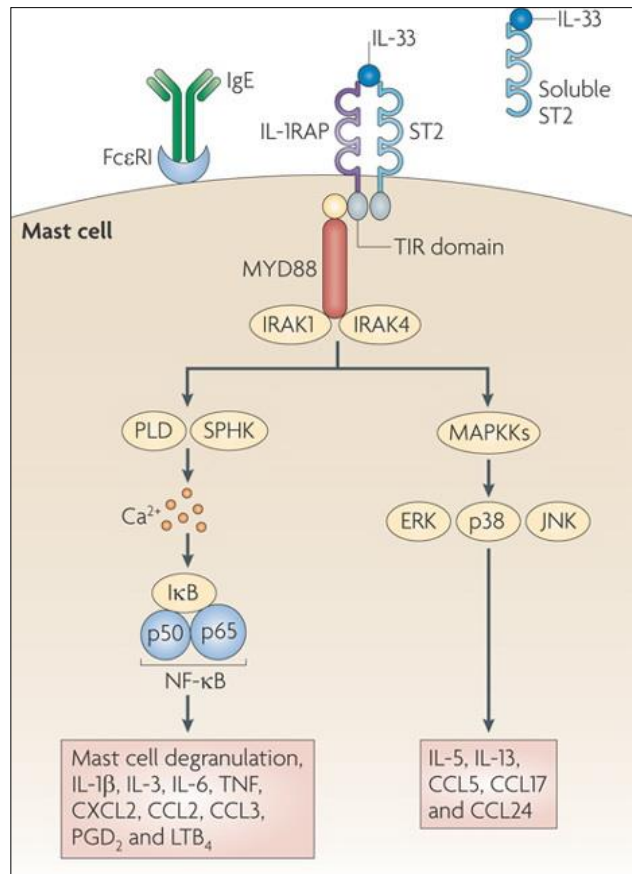
### 1.3.2. IL-33 - структура и функција

Као што је раније поменуто, Шмиц и сарадници су 2005. године анализирајући чланове IL-1 фамилије цитокина, открили молекулу која је представљао лиганд за ST2 рецептор и доделили су му назив интерлеукин 33 (IL-33). Тек након тога је установљено да је овај молекулу идентичне структуре као раније описани продукт Dv27 гена и нуклеарни фактор венула са високим ендотелом (енгл. *nuclear factor of high endothelial venules*, NF-HEV) (150, 151). Интерлеукин 33 је протеин молекуларне тежине 30 kDa (килодалтона) ког чини 270 аминокиселина и који кодира ген који је код људи локализован на деветом, а код мишева на деветнаестом хромозому. Између хуманог и мишијег IL-33 постоји хомологија у 55% аминокиселина (131).

У многим хуманим и мишијим ткивима IL-33 је експримиран на нивоу mRNA, а на нивоу протеина је у највећој мери експримиран у ћелијама епитела, пре свега епитела крвних судова (152). Код мишева, IL-33 у значајној мери експримирају и глатке мишићне ћелије, као и фибробласти и различите ћелије имунског система (131, 152). У здравој хуманој и мишијој јетри основни извор IL-33 јесу ендотелне ћелије синусоидних капиЛАРА јетре, док су у јетри захваћеној фиброзом његов извор у највећој мери активирани епителне ћелије јетре (98). Пошто IL-33 припада IL-1 породици цитокина, претпоставка је била да IL-33 аналогно другим цитокинима ове групе, постаје активан активношћу каспаза. Студије су касније показале да каспаза 1, каспаза 3 и каспаза 7, које се ослобађају након апоптотске смрти ћелије, инактивирају IL-33 и да је он заправо активан у својој проформи која представља комплетан облик молекула (енгл. *full length*) (99, 153, 154). Сматра се да услед некротичне смрти ћелије настаје ослобађање велике количине IL-33 који затим „алармира“ суседне ћелије да је настала деструкција ткива (152). Стога је IL-33 сврстан у групу молекула које називамо „алармини“. Термин „алармини“ описује класу структурно различитих и мултифункционалних протеина који се у току трауме или инфекције брзо ослобађају или секретују из мртве или умируће ћелије (155, 156). Установљени су и критеријуми који

омогућавају сврставање молекула у ову класу, а које IL-33 испуњава: молекул се ослобађа из ћелије у некрози али не и апоптози, молекул се секретује неконвенционалним механизмом, молекул индукује урођени и стечени имунски одговор и активира инфламаторне сигналне путеве као што је NF- $\kappa$ B (156, 157). Неконвенционални механизам секреције којим се IL-33 ослобађа из ћелије се другачије назива „некротична секреција“ и односи се на пасивно ослобађање молекула из некротичне ћелије у току насилне смрти ћелије (156).

Након ослобађања из ћелије, IL-33 остварује своје функције везујући се за специфични рецептор који је по структури хетеродимер који чине ST2 молекул и IL-1R аксесорни протеин (IL-1RacP) (134). Такође постоји још један члан IL-1R фамилије рецептора, SIGIRR (енгл. *Single Ig IL-1-related receptor*), који удружен са ST2L формира IL-33R2 и негативно регулише ефекте IL-33 (158). Везивањем IL-33 започиње активација сигналног пута која обухвата регрутовање, преко цитоплазматског TIR домена ST2L, адаптерског myD88 молекула (енгл. *myeloid differentiation primary-response protein 88*, myD88), IL-1R-удружене киназе 1 (енгл. *IL-1R-associated kinase 1*, IRAK1) и IRAK4, и TRAF6 (енгл. *tumour necrosis factor receptor-associated factor-6*, TRAF6). Овај процес индукује активацију различитих сигналних протеина као што су NF- $\kappa$ B, инхибитор NF- $\kappa$ B- $\alpha$  (IkB $\alpha$ ), eRK1 (енгл. *extracellular signal-regulated kinase 1*, eRK1), eRK2, p38 и JNK (енгл. *c-Jun N-terminal kinase*, JNK). Активација NF- $\kappa$ B индукује продукцију IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6, TNF, CXCL2, CCL2, CCL3, PGD2 и LTB4, док активација MAP киназа p38, JNK и eRK резултује продукцијом IL-5, IL-13, CCL5, CCL17 и CCL24 (Схема 4) (137, 159). Интеракција IL-33 са циљним ћелијама преко ST2 молекула има вишеструке ефекте. Ова интеракција промовише ћелијско преживљавање, адхезију, дегранулацију, хемотаксу и секрецију проинфламаторних цитокина (160, 161).



**Схема 4.** IL-33/ ST2 сигнални пут. (Кориговано према: *Liew FY. et al. Nat Rev Immunol. 2010;10(2):103-110.*)

IL-33 сигнални пут је негативно регулисан преко солубилне форме ST2 рецептора, sST2, којој недостаје трансмембрански домен и која има улогу "мамац" рецептора за функционални молекул IL-33. Раније поменути SIGGR молекул, познат и као TIR8 (енгл. *Toll IL-1R-8*, TIR8), блокира сигнални пут IL-33 везујући се за ST2-IL-33 комплекс (158).

### 1.3.3. IL-33 - улога у патологији јетре и гојазности

Све више студија указује на значајну улогу IL-33 у различитим обољењима јетре. Утврђено је да су повећана експресија IL-33 и његовог рецептора ST2 у позитивној корелацији са развојем фиброзе јетре код људи али и у различитим анималним моделима болести (156). У експерименталном моделу хемијски индукованог оштећења јетре изазваног понављаном применом угљен тетра хлорида CCl<sub>4</sub>, повећану синтезу и



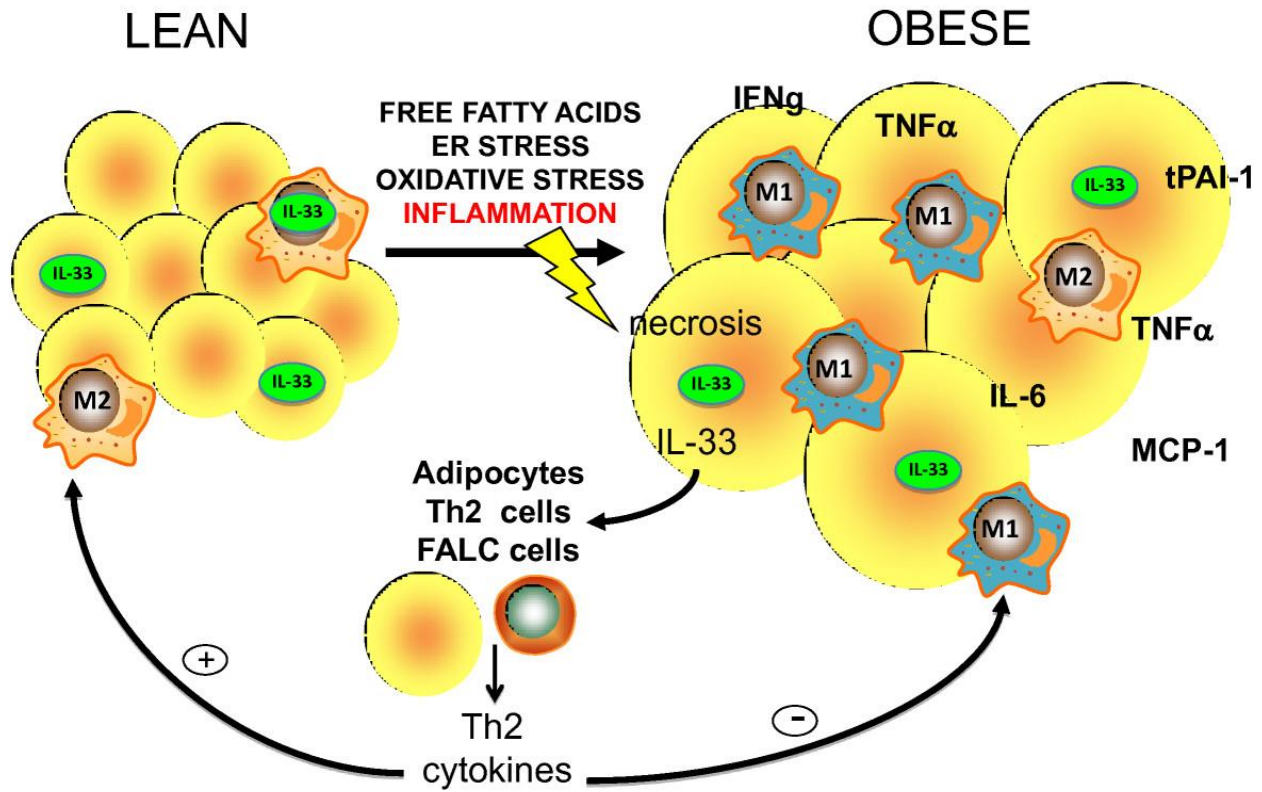
депоновање колагена је пратио и пораст експресије IL-33 и ST2 (162). Сматра се да су у јетри захваћеној фиброзом, најзначајнији ћелијски извор IL-33 активирани хепатичне стелатне ћелије и миофибробласти који настају њиховом трансформацијом (162). Фибробласти у стању мировања, за разлику од активираних миофибробласта, не експримирају IL-33, што сугерише, иако механизам још није разјашњен, да процес диференцијације и пролиферације у активираних миофибробласта омогућава овим ћелијама да стекну могућност експримирања IL-33. Још увек није разјашњено како и зашто ткивни миофибробласти експримирају IL-33, али је показано да хепатичне стелатне ћелије у култури након стимулације проинфламаторним цитокинима као што су IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , продукују IL-33 (162).

Ендотелне ћелије синусоидних капилара јетре као и ендотелне ћелије других крвних судова јетре конститутивно експримирају IL-33. Ова експресија је појачана у експерименталним моделима хепатитиса индукованог угљентетрахлоридом и конкавалином А (енгл. *concanavalin A*, ConA) (156, 163). Ови подаци указују на то да је IL-33 први проинфламаторни цитокин који у току оштећења јетре алармира друге ћелије након отпуштања из епителних ћелија. Такође је показано и да хепатоцити у току развоја ConA-индукованог хепатитиса у једру експримирају IL-33 што представља доказ о новом извору овог молекула у оштећењу јетре (156, 163). У ConA-индукованом хепатитису, који представља болест посредовану Т лимфоцитима, показано је да IL-33/ST2 сигнални пут има протективан ефекат. Оштећење јетре у овом моделу је било знатно израженије код мишева који су имали делецију ST2 молекула и праћено је већом интрахепатичном инфилтрацијом макрофага, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита, NK и NKT ћелија, као и смањеним бројем регулаторних CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Т лимфоцита. ST2 дефицијентни мишеви су такође имали измењен системски имунски одговор усмерен ка Th1/Th17 одговору (99, 164). Ови подаци су указали да протективни механизам у овом моделу болести који IL-33/ST2 сигнални пут највероватније остварује спречавањем развоја Th1/Th17 имунског одговора као и повећањем регулаторних CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Т лимфоцита (99, 156). Испитивање утицаја IL-33 на експресију проапоптотских и антиапоптотских гена у току развоја ConA-индукованог хепатитиса, показало је да IL-33 супримира експресију антиапоптотских Bcl-2 и p-ERK, што смањује оштећење ткива и промовише репарацију (99, 164, 165).

Утицај IL-33 на фиброгенезу и његов профибротски ефекат је показан у различим органима као што су кожа и плућа (166, 167). Истраживања су такође показала да је IL-33 удружен са развојем фиброзе у јетри. У фибротичној јетри мишева и људи, показана је повећана продукција mRNA за IL-33 и ST2 (98). Показано је да продукција IL-33 и ST2 позитивно корелирају са експресијом колагена у јетри захваћеној фиброзом. У здравој јетри и мишева и људи, основни извор IL-33 јесу ендотелне ћелије синусоидних капилара, док су у јетри захваћеној фиброзом најзначајнији извор овог молекула активирани хепатичне стелатне ћелије (98). У овој студији је коришћен експериментални модел хроничног оштећења јетре индукваног угљентетрахлоридом (CCl<sub>4</sub>). Коришћењем истог модела болести, касније студије су покушале да објасне механизам помоћу ког IL-33 остварује своје профибротско дејство у јетри. Потврђено је да IL-33 заиста представља кључни медијатор фиброзе јетре *in vivo* (101). У овој студији је показано да се IL-33 ослобађа у одговору на хронични хепатоцелеларни стрес и да тако ослобођен екстрацелуларни IL-33 преко ST2 сигналног пута изазива акумулацију и активацију ILC2 ћелијске популације (енгл. *Innate Lymphoid Cells type2*, ILC2). Активирани хепатични ILC2 затим продукују IL-13 који преко IL-4R $\alpha$  и STAT6 транскрипционог фактора иницирају активацију хепатичних стелатних ћелија и њихову трансформацију у миофибробласте (101). Иако је профибротска улога IL-33 у обољењима јетре недвосмислено потврђена, и механизми његовог дејства делимично описани, његова улога у обољењима јетре који прате развој гојазности још увек није у потпуности расветљена.

Показано је да адипоцити и масно ткиво експримирају IL-33 и његов рецептор ST2 (168-170). Такође је показано да третирање културе адипоцита *in vitro* интерлеукином 33 изазива повећану продукцију Th2 цитокина IL-5 и IL-13, истовремено редукује акумулацију липида и снижава експресију гена чији продукти учествују у метаболизму липида као што су C/EBP $\alpha$ , SREBP-1c, LXR $\alpha$ , LXR $\beta$ , и PPAR $\gamma$  (168, 171). Сматра се да IL-33 протективни ефекат на развој гојазности и инфламацију адипозног ткива остварује стимулацијом повећане продукције Th2 цитокина и поларизацијом макрофага из M1 у M2 смеру (Схема 5) (168). У масном ткиву је такође описана и популација ћелија која као одговор на IL-33 секретује велику количину Th2 цитокина и која је названа FALC (енгл. *fat-associated lymphoid cluster cells*, FALC) (168, 172). Регулаторни Foxp3<sup>+</sup> Т лимфоцити у висцералном адипозном ткиву спречавају развој инфламације и доприносе очувању инсулинске

сензитивности. Показано је да IL-33 преко ST2 рецептора и MyD88 молекула, има кључну улогу у диференцијацији и одржавању популације регулаторних Foxp3<sup>+</sup> Т лимфоцита у масном ткиву (173).



**Схема 5.** Антиинфламаторна улога IL-33 у инфламацији адипозног ткива. (Кориговано према: Miller MA. et al. *J Inflamm.* 2011;8(1):1-12.)

## 2. ЦИЉ СТУДИЈЕ

### Главни циљеви истраживања:

- Испитати разлике у развоју гојазности, инфламације у висцералном масном ткиву, гликорегулације, стеатозе, стеатохепатитиса и фиброзе јетре у експерименталном моделу гојазности применом дијете са високим садржајем масти (енгл. *high-fat diet*, HFD) у C57BL/6 мишева са доминантним Th1 и BALB/c мишева са доминантним Th2 имунским одговором;
- Испитати разлике у развоју гојазности, инфламације у висцералном масном ткиву, гликорегулације, стеатозе, стеатохепатитиса и фиброзе јетре у експерименталном моделу гојазности применом HFD у ST2 дефицијентних BALB/c мишева у односу на Th1 и Th2 доминантне мишеве;

У складу са основним циљем поставили смо следеће експерименталне задатке:

1. Описати разлике у имунометаболичком фенотипу мишева са доминантним тип 1 и тип 2 имунским одговором
  - 1.1. Пратити развој гојазности мерењем увећања телесне масе и количине висцералног адипозног ткива, као и утврђивањем липидног статуса након индукције болести у C57BL/6 мишева са доминантним Th1 и BALB/c мишева са доминантним Th2 имунским одговором;
  - 1.2. Утврдити параметре гликорегулације у C57BL/6 мишева и BALB/c мишева;
  - 1.3. Утврдити фенотипске и функционалне карактеристике ћелија које посредују у инфламацији у висцералном адипозном ткиву у C57BL/6 мишева и BALB/c мишева;
2. Дефинисати и квантификовати масну инфилтрацију јетре (стеатозу јетре) коришћењем селективног хистохемијског бојења у C57BL/6 мишева и BALB/c мишева. Одредити нивое експресије гена значајних за метаболизам масти у ткиву јетре методом

квантитативне ланчане реакције полимеразе у реалном времену (енгл. *Quantitative Real Time-PCR*, qRT-PCR) C57BL/6 мишева и BALB/c мишева;

3. Дефинисати и квантификовати стеатохепатитис применом бодовног система усклађеног са експерименталним моделом болести (инфилтрација 0-3, стеатоза 0-4, фиброза 0-4, "балон" дегенерација хепатоцита 0-1) у C57BL/6 мишева и BALB/c мишева. Утврдити фенотипске и функционалне карактеристике ћелија које посредују у инфламацији и процесу фиброзе у јетри у C57BL/6 мишева и BALB/c мишева;

4. Дефинисати и квантификовати фиброзу јетре у C57BL/6 мишева и BALB/c мишева коришћењем селективног хистохемијског бојења. Одредити нивое експресије гена значајних за фиброзу у јетри C57BL/6 мишева и BALB/c мишева qRT-PCR методом;

5. Утврдити концентрације цитокина IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-33, IL-13, и TGF- $\beta$  у системској циркулацији у C57BL/6 мишева и BALB/c мишева;

6. Испитати утицај IL-33/ST2 осовине на развој гојазности мерењем увећања телесне масе и количине висцералног адипозног ткива код WT BALB/c и ST2-/- BALB/c мишева;

7. Испитати утицај IL-33/ST2 осовине на гликорегулацију WT BALB/c и ST2-/- BALB/c мишева;

8. Утврдити фенотипске и функционалне карактеристике ћелија које посредују у инфламацији у висцералном адипозном ткиву код WT BALB/c и ST2-/- BALB/c мишева;

9. Дефинисати и квантификовати масну инфилтрацију јетре (стеатозу јетре) коришћењем селективног хистохемијског бојења у WT BALB/c и ST2-/- BALB/c мишева. Одредити нивое експресије гена значајних за метаболизам масти у јетри методом квантитативне ланчане реакције полимеразе у WT BALB/c и ST2-/- BALB/c мишева;

10. Дефинисати и квантификовати стеатохепатитис применом бодовног система усклађеног са експерименталним моделом болести код WT BALB/c и ST2-/- BALB/c мишева. Одредити нивое експресије гена значајних за инфламаторни одговор у јетри WT BALB/c и ST2-/- BALB/c мишева методом квантитативне ланчане реакције полимеразе;

11. Дефинисати и квантификовати фиброзу јетре у WT BALB/c и ST2<sup>-/-</sup> BALB/c мишева коришћењем селективног хистохемијског бојења. Одредити нивое експресије гена значајних за фиброзу у јетри WT BALB/c и ST2<sup>-/-</sup> BALB/c мишева методом квантитативне ланчане реакције полимеразе;

12. Утврдити фенотипске и функционалне карактеристике ћелија које посредују у инфламацији и процесу фиброзе у јетри у WT BALB/c и ST2<sup>-/-</sup> BALB/c мишева;

### **Радна хипотеза истраживања:**

Гојазност, метафламација, поремећај гликорегулације и неалкохолна масна болест јетре индуковани дуготрајном дијетом са високим садржајем масти су израженији у C57BL/6 соју мишева са доминантним Th1 имунским одговором и ST2 дефицијентних BALB/c мишева, док су BALB/c мишеви са доминантним Th2 имунским одговором резистентни на развој метаболичких поремећаја.

### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

#### 3.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ

Експерименти су изведени коришћењем мишева чистог соја BALB/с чистог соја C57Bl/6 (енгл. *wild type*, WT). Такође су коришћени и ST2 "*knock-out*" (ST2<sup>-/-</sup>) мишеви на BALB/с подлози, добијени циљаном делецијом гена за ST2 молекул. ST2 *knock-out* мишеви су добијени захваљујући љубазношћу проф. Foo Y Liew ( *Institute of Infection, Immunity and Inflammation, University of Glasgow, Glasgow, Scotland, United Kingdom*).

Животиње су одгајане у стандардним условима у виваријуму Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. У току трајања експеримента, експерименталне животиње су имале слободан приступ храни и води (лат. *ad libitum*). Мишеви коришћени у истраживањима су били мушког пола, старости 8 недеља, приближно исте телесне тежине.

Истраживање је одобрено од стране Етичке комисије за експерименталне животиње, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, број 01-2759/3 од 19.03.2014. године.

##### 3.1.1 Поступак добијања BALB/с мишева са циљаном делецијом гена за ST2 молекул

"*Knock-out*" мишеви, имају један или више нефункционалних гена. За добијање "*knock-out*" мишева користи се метода хомологе рекомбинације. Хомолога рекомбинација је генетска рекомбинација којом се замењују генетске секвенце између два слична или идентична молекула дезоксирибонуклеинске киселине. Методом хомологе рекомбинације могуће је функционални ген заменити некодирајућим геном. Резултат је потпуна елиминација функције постојећег гена. Методологија се заснива на уношењу, путем вектора, страног, хомологог, нефункционалног гена у ембрионалне матичне ћелије са циљем хомологе рекомбинације и замене функционалног гена нефункционалним (174). Након тога се селектују само ћелије у којима се одиграла жељена рекомбинација.

Процес селекције ћелија у којима се одиграла хомолога рекомбинација представља полазну основу у добијању "*knock-out*" мишева. Фрагмент ДНК са мутираним или

искљученим геном се прво уграђује у вектор. Вектор садржи додатна два гена за контролу рекомбинације ген за резистенцију на неомицин (*Neo* ген) и ген за тимидин киназу (*TK* ген) (175). Конструкција вектора је таква да се при хомологој рекомбинацији *Neo* ген увек инкорпорира у хромозомалну ДНК док се *TK* ген губи. Добијени вектор се ставља у културу ћелија. У култури се налази који садржи неомицин и ганцикловир или FIAU (енгл. *1-(29-deoxy-29-fluoro-1-β-D-arabinofuranosyl)-5-iodo-uracil*) који се под утицајем тимидин киназе метаболише у летални продукт. Ћелије у култури у којима је вектор случајно интегрисан у геном резистентне су на неомицин, али су осетљиве на присуство ганцикловира или FIAU. Уколико се у ћелијама догодила хомолога рекомбинација, оне постају резистентне на неомицин и на ганцикловир или FIAU, јер се у њима *TK* ген не инкорпорира у геном. Овим процесом селекције, одвајају се живе ћелије у којима се одиграо процес хомологе рекомбинације (175).

Хомозиготни *ST2*<sup>-/-</sup> мишеви су дизајнирани у лабораторији проф. *Andrew McKenzie* (*Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, United Kingdom*), искључењем *T1/ST2* гена помоћу вектора. Вектор је дизајниран тако да унесе ген одговоран за резистентност на неомицин између дефинисаних места: *Xba*I на четвртом и *Bam*HI на петом егзону *T1/ST2* гена. На тај начин је уклоњен већи део четвртог и петог егзона. Вектор је поседовао 5,1 kb парова који обезбеђују 5' хомологију и 2 kb пара који обезбеђују 3' хомологију са ендогеним *T1/ST2* геном. Коришћењем PCR технике (енгл. *Polymerase Chain Reaction*) направљени су хомологи крајеви коришћењем *Pfu turbo* полимеразе (*Stratagene, La Jolla, CA, USA*). Хомологни 5' крај инсертованог гена добијен је помоћу нуклеотида: 5'-AGTGCATCTAGAGATACTGATGAGGCACC и 5'-CTTCTTTCTAGATTATTCА - AGTTGGGGCTATTAAAAGAAGCC, а хомологи 3' крај помоћу нуклеотида: 5' -CCACCGGATCCTTCACAGTTGAAGGTAAGCTCTTGGCTTCAACAAGGG и 5' -GGAAGGAAAAAAGCGGCCGCGATCTCGCTCCACAGAGATGAGGAACGGCC.

Линеаризован вектор је уграђен у мишије матичне ћелије (E14.1), а хомолога рекомбинација у трансфектованим ћелијама резистентним на аминокликозидни антибиотик, генетицин (G418) је детектована помоћу две технике: PCR и *Southern blot*. Од 1600 G418 резистентних клонова ембрионалних матичних ћелија, потврђених *Southern blot* анализом помоћу пробе А, идентификовано је само 5 у којима се десила хомолога рекомбинација.

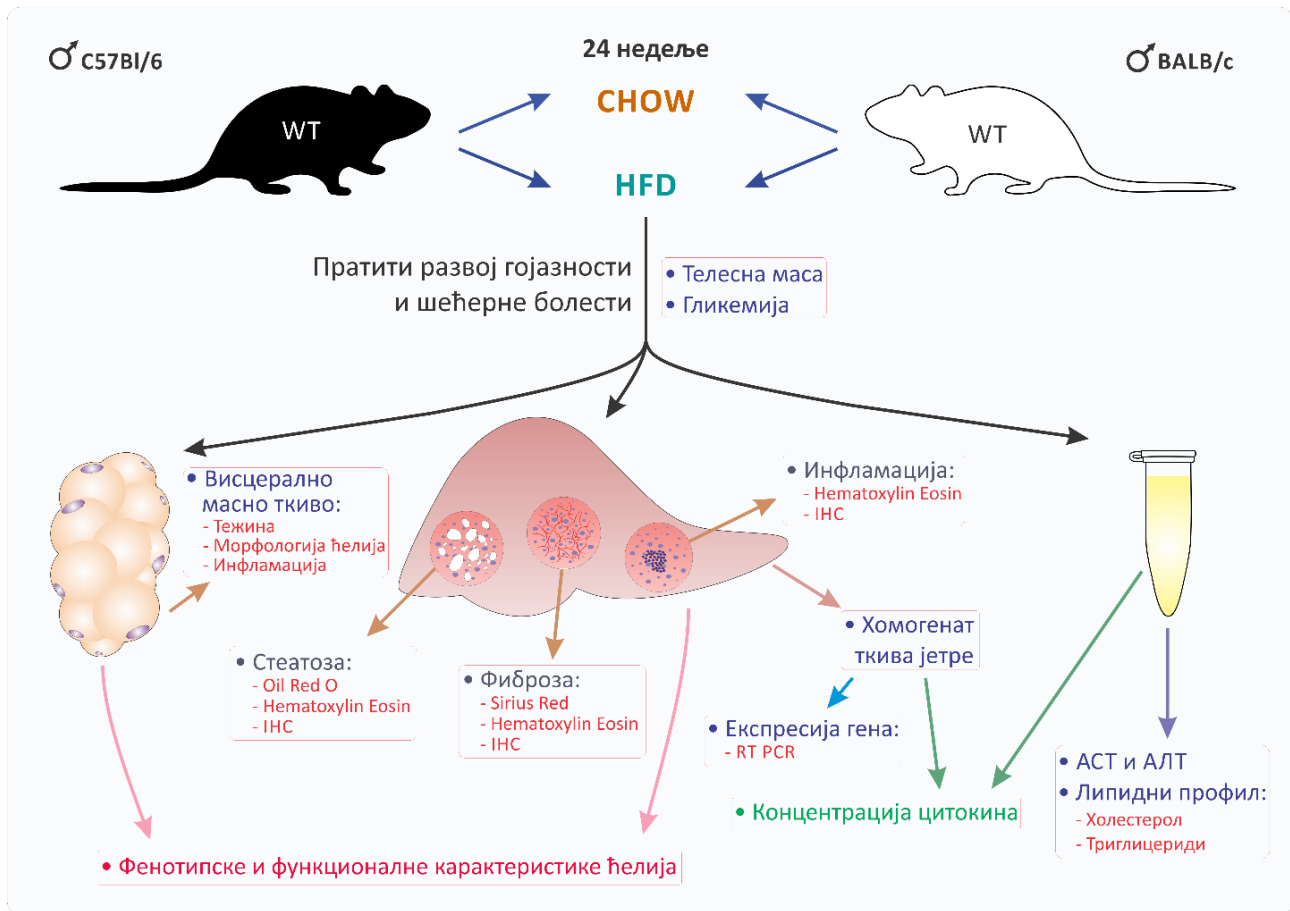


Проба А је добијена коришћењем PCR технике помоћу прајмера: 5'-TACGТААСТСССА-TGTGCAGTCСТТGCTGCC и 5'-GTCACATCACAGGCATGAGGG. Један од добијених клонова ембрионалних матичних ћелија у коме се десила хомолога рекомбинација је прво пропагиран, а затим су добијене ћелије убризгане у 3,5 дана старе бластоцисте BALB/c мишева.

На овакав начин добијени химерични мишеви, хетерозиготни за T1/ST2 ген су потом укрштани са BALB/c женкама и добијени су хетерозиготи ST2<sup>-/-</sup> мишеви. Хомозиготи за нефункционалан T1/ST2 ген су добијени инцестним спаривањем хетерозигота. У наредним генерацијама добијени су хомозиготни, "knock-out" мишеви, генетски дефицијентни у експресији T1/ST2 гена (ST2<sup>-/-</sup> мишеви). Упоредивањем добијених ST2<sup>-/-</sup> мишева и ST2<sup>+/+</sup> мишева је показано да не постоји разлика у броју ћелија у периферној крви и профили биохемијских анализа. Укупан број лимфоцита као и однос CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ћелија у тимусу, слезини и лимфним чворовима је био приближно исти између два генотипа мишева (176).

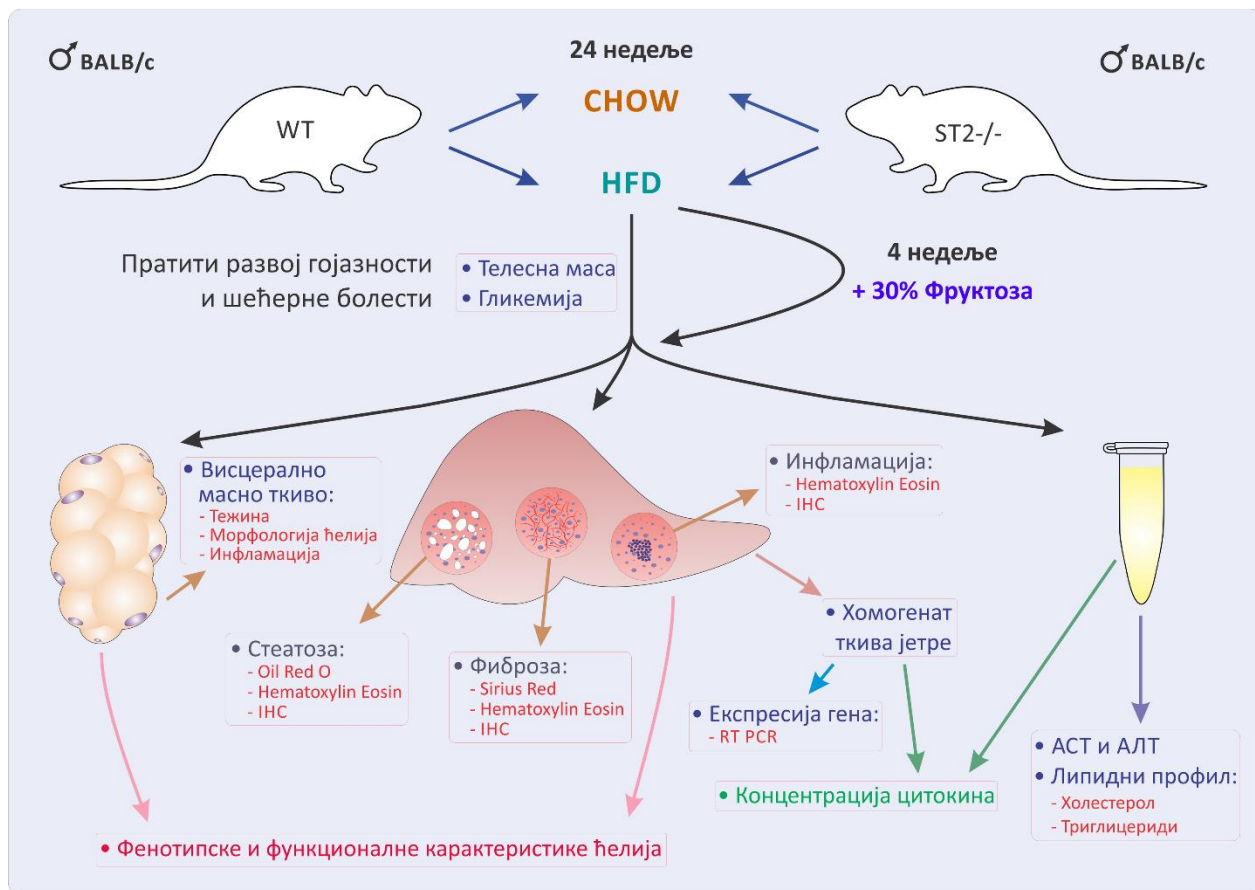
### *3.2. ИНДУКЦИЈА ГОЈАЗНОСТИ ПРИМЕНОМ РЕЖИМА ИСХРАНЕ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ*

Гојазност код мишева је индукована применом дијете са високим садржајем масти код које је 60% kcal пореклом из масти (енгл. *High-fat diet*, HFD, *Mucedola, Milano, Italy*). Индукција гојазности је започета у 8. недељи старости, а мишеви су храњени у трајању од 24 недеље. Контролна група животиња је храњена стандардном храном (енгл. *Standard-fat diet*, CHOW, 10% kcal из масти, *Mucedola, Milano, Italy*). У току трајања експеримента, животиње су имале слободан приступ храни и води. У једном експерименту, животиње су, почев од 8. недеље старости, стављене на режим исхране са високим садржајем масти 24 недеље, након чега је, наредне 4 недеље, дијети додат и 30% раствор фруктозе. Раствор фруктозе је животињама дат као замена за воду и животиње су имале слободан приступ овом раствору (Схема 6, 7).



**Схема 6. Дизајн експеримента.** Индукција гојазности применом дијете са високим садржајем масти код C57Bl/6 мишева чистог соја и BALB/c мишева чистог соја.

Након 24 недеља специјалног режима исхране, животиње су жртвоване у атмосфери zasiћеној диетилетром (*ВЕТАНЕМ, Београд, Србија*). Након жртвовања изоловани су јетра, висцерално масно ткиво из перигонадалних депоа и панкреас за даљу анализу. Крв је добијена пункцијом абдоминалне аорте. Након коагулације, 30 минута на собној температури, серум је издвојен центрифугирањем (20 минута на 3000 rpm) и замрзнут на -20°C за даљу анализу.



**Схема 7. Дизајн експеримента.** Индукција гојазности применом дијете са високим садржајем масти код BALB/c мишева дивљег соја и ST2<sup>-/-</sup> BALB/c мишева.

### 3.3. ПРАЋЕЊЕ МЕТАБОЛИЧКИХ ПАРАМЕТАРА

Увећање телесне тежине мерено је сваке четврте недеље мерењем сваког појединачног миша. Сваке четврте недеље мерене су и вредности глукозе у пуној крви. Крв за анализу концентрације глукозе добијена је пункцијом репне вене након 4 сата гладовања. У експерименту у ком је коришћен 30% раствор фруктозе, раствор је, заједно са храном уклоњен 4 сата пре мерења. Кап крви је нанесена на тест траку за мерење гликемије (*Accu-Chek Performa Test Strips, Roche, Germany*), а потом је вредност гликемије очитана на глукомеру (*Accu-Chek Performa, Roche, Germany*).

Након 4 сата гладовања, помоћу ELISA теста (*Alpco, Salem, NH, USA*) одређивана је концентрација секретованог инсулина наште. На основу измерених вредности гликемије наште и инсулинемије у време жртвовања животиња израчунате су вредности НОМА-IR (енгл. *Homeostasis model assessment of insulin resistance*) индекса сваког миша појединачно на основу следеће формуле:

$$\text{НОМА-IR} = (\text{концентрација инсулина наште (mU/ml)} \times \text{гликемија наште (mmol/l)}) / 22,5$$

Липидни профил у серуму (концентрације триглицерида и укупног холестерола), као и серумска активност трансаминаза (АСТ и АЛТ) мерени су за сваког миша појединачно, употребом *Olympus AU600 chemistry immuno analyzer-a (Olympus, Japan)*.

### 3.4. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦИТОКИНА У ХОМОГЕНАТУ ТКИВА ЈЕТРЕ И СЕРУМУ

Хомогенат ткива јетре је добијен након изолације дела левог режња (100 mg) механичком обрадом у 0,5 ml PBS-а (енгл. *Phosphate Buffered Saline*) (pH=7,2). Након центрифугирања (10 минута на 4000 rpm) добијен је супернатант који је затим замрзнут на -20°C за даљу анализу.

У супернатанту хомогенизованог ткива јетре и серуму мерени су нивои цитокина, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-13, IL-33, IL-10 и TGF- $\beta$ , коришћењем комерцијалних ELISA китова (*R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*).

Према упутству произвођача, стандарди су растворени у PBS-у, при чему је почетна концентрација била 1000 pg/ml за IL-6, IL-17 и IL-33; 2000 pg/ml за IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 и TGF- $\beta$  и 4000 pg/ml за IL-13. Од стандарда највеће концентрације направљена су серијска двоструко растућа разблажења у 8 тачака у комерцијалном растварачу (енгл. *Reagent Diluent, PBS са 1%-тним BSA* (енгл. *Bovine Serum Albumin, BSA*)). Стандардна крива је конструисана на основу вредности стандарда и одређена је једначина праве према којој су израчунате концентрације мерених цитокина.

У микротитар плочу (енгл. *Microtiter plate*) са 96 бунарчића са равним дном (*Sarsted, Germany*) сипано је по 100  $\mu\text{l}$  радне концентрације везујућег антитела (енгл. *Capture Antibody*). Након тога су микротитар плоче прекривене адхезивном фолијом (енгл. *ELISA Plate Sealers*) и остављене преко ноћи на собној температури. У следећем кораку су бунарчићи испрани пуфером за испирање (енгл. *Wash buffer*). Затим је додат блокирајући пуфер (енгл. *Block Buffer, PBS са 1%-тним BSA*) укупног волумена 300  $\mu\text{l}$  и плоче су остављене један сат на собној температури. Након инкубације, микротитар плоче су опране пуфером за испирање.

Испитивани узорци су претходно разблажени 10 пута у дејонизованој води. Узорци и припремљени стандарди су сипани у микротитар плочу, прекривени адхезивном фолијом и инкубирани два сата на собној температури. Након тога микротитар плоча је испрана и у бунарчиће је додато по 100  $\mu\text{l}$  радне концентрације антитела за детекцију (енгл. *Detection Antibody*). Плоче обложене адхезивном фолијом су затим инкубиране на собној температури у трајању од два часа. Након инкубације, микротитар плоче су испране и у бунарчиће је сипано 100  $\mu\text{l}$  радне концентрације *Streptavidin-HRP* (енгл. *Streptavidin horseradish peroxidase*). Плоче су заштићене од излагања сунчевој светлости и инкубиране на собној температури 20 минута, након чега су испране. Затим је у бунарчиће додато 100  $\mu\text{l}$  раствореног супстрата (енгл. *Substrate solution: Color reagent A + Color reagent B*) у размери 1:1). Након 20 минута, додато је 50  $\mu\text{l}$  стоп раствора (енгл. *Stop solution: 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>*) и очитана је оптичка густина на 450nm, на *Microplate reader-у (Zenyth 3100 Multi-Mode-Detektor, Anthos, Austria)*.

Очитане вредности су пре анализе умањене за вредности абсорбанце слепе пробе (дејонизована вода). На основу измерених вредности стандарда конструисана је стандардна крива која је коришћена је за израчунавање вредности за сваки појединачни узорак.

### 3.5. АНАЛИЗА МОНОНУКЛЕАРНЕ ПОПУЛАЦИЈЕ ЋЕЛИЈА ВИСЦЕРАЛНОГ АДИПОЗНОГ ТКИВА И ЈЕТРЕ МЕТОДОМ ПРОТОЧНЕ ЦИТОМЕТРИЈЕ

Мишеви којима су изоловане мононуклеарне ћелије из висцералног адипозног ткива и јетре жртвовани су у атмосфери засићеној диетилетром након 24 недеље специјалног режима исхране. Мононуклеарне ћелије су изоловане из висцералног адипозног ткива и јетре, а потом су анализирани методом проточне цитометрије. Анализиран је апсолутни број, процентуална заступљеност, као и фенотипске и функционалне карактеристике различитих ћелијских популација.

#### 3.5.1. Изолација ћелија стромалне васкуларне фракције из висцералног адипозног ткива

Висцерално адипозно ткиво је изоловано из перитонеалне шупљине екцизијом из периепидидималних и периреналних депоа. Изоловано ткиво је уситњено маказицама у 3 ml PBS-а, а потом додатно опрано у истом волумену. Ткиво је затим дигестирано. Пребачено је у епрувету од 50 ml и додато је 4 ml раствора за дигестију који је садржао 1 mg/ml колагеназе тип 2 (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) у RPMI-1640 медијуму са 2% BSA (*Sigma Aldrich*). Процес дигестије ткива је трајао 1 час на температури од 37°C при чему је коришћено водено купатило уз константно мешање на 100 rpm. Након дигестије ткиво је пропуштено кроз ћелијско сито величине 40  $\mu\text{m}$  (*BD Biosciences, San Jose, CA, USA*). Ћелијска суспензија је центрифугирана (5 минута на 1800 rpm), а након одливања супернатанта, ћелије су ресуспендоване у 2 ml пуфера за лизирање еритроцита (енгл. *Lysis buffer*) и инкубиране 3 минута на 37°C. Пуфер за лизирање је неутрализован са истим волуменом RPMI-1640 медијума са 10% FBS-а (енгл. *Fetal bovine serum*). Након лизирања еритроцита, преостале ћелије су потом центрифугиране (10 минута 1400 rpm) и два пута опране у 4 ml RPMI медијума са 10% FBS-а. Након другог прања, ћелије су ресуспендоване у 500  $\mu\text{l}$  RPMI медијума са 10% FBS-а.

### 3.5.2. *Изолација мононуклеарних ћелија из јетре*

Пре изолације јетре, уклоњена је жучна кеса, а затим је ткиво јетре перфундовано кроз *v.portae* апликовањем 7 ml PBS-а. Јетра је након перфузије изолована и уситњена маказицама. Ткиво је здробљено кроз челичну мрежу величине 200  $\mu\text{m}$ , помоћу шприца. Добијена суспензија ћелија је затим пропуштена кроз ћелијско сито величине 70  $\mu\text{m}$  (*Cell strainer, BD Pharmigen, USA*) и добијени садржај ресуспендован у 15 ml RPMI-1640 медијума са 10% FBS-а. Суспензија је два пута центрифугирана на 507 rpm, 1 минут на собној температури, са опцијом без наглог кочења центрифуге (енгл. *with off break settings*). Супернатант је пребачен у нову епрувету и центрифугиран на 1433 rpm 8 минута, на собној температури, са активираним опцијом наглог кочења (енгл. *with high break settings*). Добијени талог ресуспендован је у 10 ml 37.5% перколу (*Percoll, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) у HBSS (енгл. *Hank's Balanced Salt Solution, HBSS*) медијуму који је садржао 100 U јединица по ml. Суспензија је затим центрифугирана на 1907 rpm 30 минута на собној температури без наглог заустављања центрифуге. Након одливања супернатанта ћелије су ресуспендоване у 5 ml пуфера за лизирање еритроцита (енгл. *Lysis buffer*) и инкубиране 5 минута на +4°C. Пуфер за лизирање је неутрализован са 5 ml RPMI-1640 медијума са 10% FBS-а. Ћелије су потом центрифугиране (10 минута 1400 rpm) са активираним опцијом наглог кочења и два пута опране у 5 ml RPMI медијума са 10% FBS-а. Након последњег прања, ћелије су ресуспендоване у волумену од 1ml RPMI медијума са 10% FBS-а.

### 3.6. *ФЕНОТИПСКА И ФУНКЦИОНАЛНА АНАЛИЗА ИЗОЛОВАНИХ МОНОНУКЛЕАРНИХ ЋЕЛИЈА*

Фенотипске и функционалне карактеристике различитих субпопулација мононуклеарних ћелија изолованих из висцералног адипозног ткива и јетре испитиване су коришћењем анти-мишијих моноклонска антитела специфичних за различите површинске и интрацелуларне молекуле. За анализу је коришћено  $5 \times 10^5$  ћелија ресуспендованих у 50  $\mu\text{l}$  пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer, BD Biosciences*). Ћелијама је додата одговарајућа количина

обележених моноклонских антитела (Табела 1) или одговарајућих изотипских контрола (Табела 2).

**Табела 1. Примарно коњугована моноклонска антитела**

НАЗИВ	КЛОН	ПРОИЗВОЂАЧ
PE Anti mouse F4/80	CI:A3-1	Biolegend, San Diego, CA, USA
FITC Anti mouse CD11b	M1/70	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Per CP Anti mouse CD11c	N418	Biolegend, San Diego, CA, USA
PE Anti mouse CD3	145-2C11	eBiosciences, San Diego, CA, USA
Per CP Anti mouse CXCR3	CXCR3-173	Biolegend, San Diego, CA, USA
APC Anti mouse NK1.1	PK136	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
PE Anti mouse CCR7	4B12	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FITC Anti mouse CD8	eBioH35-17.2	eBiosciences, San Diego, CA, USA
APC Anti mouse CD4	RM4-5	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FITC Anti mouse F4/80	BM8	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
PE Anti mouse IL-1 $\beta$	166931	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
PE Anti mouse IL-13	eBio13A	eBiosciences, San Diego, CA, USA
APC Anti mouse CD206	15-II	Biolegend, San Diego, CA, USA
PE Anti mouse MHC II	14-4-4S	eBiosciences, San Diego, CA, USA
FITC Anti mouse B220	RA3-6B2	eBiosciences, San Diego, CA, USA
APC Anti mouse CD11c	N418	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
APC Anti mouse CD8a	53-6.7	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FITC Anti mouse CD80	16-10A1	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
PE Anti mouse CD86	GL1	eBiosciences, San Diego, CA, USA
APC Anti mouse Ly6C	RB6-8C5	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
PE Anti mouse Ly6G	1A8	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
APC Anti mouse ST2	245707	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
APC Anti mouse CD45	30-F11	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

**Табела 2. Изотипске контроле**

НАЗИВ	КЛОН	ПРОИЗВОЂАЧ
PE Rat anti mouse IgG <sub>2a</sub> Isotype control	eBR2a	eBiosciences, San Diego, CA, USA
Per CP Rat anti mouse IgG <sub>2ak</sub> Isotype control	R35-95	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
APC Rat anti mouse IgG <sub>2b</sub> Isotype control	A95-1	eBiosciences, San Diego, CA, USA
FITC Rat anti mouse IgG <sub>2a</sub> Isotype control	R35-95	BD Biosciences, San Jose, CA, USA



### 3.6.1. Бојење мембранских маркера

Финално разблажење у суспензији моноклонских антитела која су коришћена за бојење мембранских маркера била су у опсегу 1:200. У 50  $\mu\text{l}$  претходно растворених антитела додато је  $5 \times 10^5$  ћелија ресуспендованих у 50  $\mu\text{l}$  пуфера за бојење. Узорци су промешани и инкубирани 20 минута на температури од  $+4^\circ\text{C}$  у одсуству светлости. Након инкубације, ћелије су опране додавањем 2 ml хладног пуфера за бојење и центрифугирањем 5 минута на 1400 rpm. Затим је одливен супернатант, а ћелије су ресуспендоване у 350  $\mu\text{l}$  пуфера за бојење. Након завршеног бојења површинских маркера, ћелије су анализирани помоћу проточног цитометра *FACSCalibur* (BD Biosciences). За све цитометријске анализе коришћен је регион (енгл. *Gate*) моноклеарних ћелија у FSC/SSC (енгл. *Forward scattered light/Side-scattered light*) плоту. Током сваке цитометријске анализе, регистровано је најмање 30000 догађаја. Добијени подаци су анализирани коришћењем *FlowJo* (*Tree star*) рачунарског програма.

### 3.6.2. Бојење интрацелуларних маркера и цитокина

Бојење интрацелуларних молекула и цитокина изведено је по упутству произвођача коришћењем *BD Cytofix/Cytoperm<sup>TM</sup>* протокола. За стимулацију ћелија коришћени су РМА (енгл. *Phorbol 12-myristate 13-acetate*, РМА; *Sigma Aldrich*) и јономицин (енгл. *ionomycin*, *Sigma Aldrich*). Ови стимулатори активирају протеин киназу С (енгл. *Protein Kinase C*, РКС) и инфлукс јона калцијума у ћелију, што индукује повећану експресију одређених интрацелуларних молекула и цитокина у ћелији. Због цитотоксичних ефеката који могу настати при дуготрајној стимулацији ћелија, оптимално трајање стимулације је износило од 4 до 6 часова.

У току *in vitro* стимулације ћелија коришћени су инхибитори интрацелуларног транспорта протеина, *BD GolgiStop<sup>TM</sup>* BD (садржи моненсин) и *GolgiPlug<sup>TM</sup>* (садржи брефелдин А). Овим инхибиторима блокира се интрацелуларни транспорт и повећава акумулација цитокина у ендоплазматском ретикулуму и Голџи комплексу, што омогућава интраћелијску детекцију цитокина. Пошто моненсин и брефелдин испољавају дозно и временски завистан цитотоксичан ефекат, време инкубације је ограничено на 4 до 6 часова.

Након активације ћелије су центрифугиране 5 минута на 1400 rpm, а затим ресуспендоване у пуферу за бојење. Уследило је бојење површинских маркера према претходно описаном протоколу. Ћелије су инкубиране са моноклонским антителима специфичним за површинске маркере 20 минута на температури од +4°C у одсуству светлости. Након инкубације ћелије су опране у 2 ml хладног пуфера за бојење 5 минута на 1400 rpm. Фиксација и пермеабилizација ћелија изведене су коришћењем 250 µl раствора за фиксацију и пермеабилizацију (енгл. *Fixation/Permeabilisation solution, BD Biosciences*) у трајању 20 минута на +4°C. Ћелије су затим опране у 2 ml 10% пуфера за пермеабилizацију (енгл. *Perm/Wash™, BD Biosciences*) 5 минута на 1400 rpm. Супернатант је одливен, а на ћелије су додата антитела за интрацелуларно бојење растворена у 10% пуферу за пермеабилizацију и инкубирана 30 минута на +4°C. Након истека инкубације ћелије су опране у 2 ml 10%-ног пуфера за пермеабилizацију 5 минута на 1400 rpm. Након испирања у 2 ml 10% пуфера за пермеабилizацију 5 минута на 1400 rpm, ћелије су ресуспендоване у 350 µl пуфера за бојење. Након бојења ћелије су анализиране на проточном цитометру *FACSCalibur (BD Biosciences)*.

### 3.7. ХИСТОПАТОЛОШКА АНАЛИЗА ТКИВА ЈЕТРЕ

За хистопатолошку анализу су коришћени формалином фиксирани и парафином укалупљени (енгл. *Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded, FFPE*) исечци ткива јетре. Такође су коришћени и криостатски исечци ткива дебљине 5-8 µm. Од парафинских калупа направљени су пресеци дебљине 5 µm који су бојени хематоксилином и еозином за процену стеатозе и инфилтрације мононуклеарних ћелија у јетри. За детекцију колагена у ткиву јетре коришћена су две селективне хистохемијске технике: *Sirius red* бојење и трихромно бојење по *Masson*-у. За детекцију липида коришћени су криостатски исечци ткива јетре и *Oil-Red O* селективна хистохемијска техника.

#### 3.7.1. Израда патохистолошких препарата

Након жртвовања експерименталних животиња и изолације ткива, ткиво је фиксирано у 10% раствору формалдехида на собној температури. Волумен фиксатива је био 10 пута већи од волумена ткива. Дехидратација, испирање и импрегнација ткива су извршени

коришћењем ткивног процесора. Обрађено ткиво је укалупљено у парафинске блокове и помоћу микротоме су исечени резови дебљине 5  $\mu\text{m}$ . Пресеци су нанешени на предметна стакла, а затим бојени одговарајућом техником.

Такође су коришћени и препарати добијени техником смрзнутих резова. Поступком смрзавања ткива на температури од  $-25^{\circ}\text{C}$  постиже се истовремена брза фиксација и дехидратација ткива. Техника је такође погодна и за имунохистохемијско бојење. Непосредно након изолације јетре, узорак ткива је замрзнут на температури од  $-25^{\circ}\text{C}$ , а затим фиксиран на подлогу и сечен криотомом на пресеке дебљине 5-8  $\mu\text{m}$ . Пресеци су нанешени на предметна стакла и складиштени на температури од  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.7.3. Бојење хематоксилином и еозином

Парафински исечци су претходно загрејани у термостату на  $+56^{\circ}\text{C}$  у трајању од 45 минута. Затим су депарафинисани у ксилолу и урађен је поступак рехидратације ткива испирањем у опадајућим концентрацијама етил алкохола: 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу, потом 5 минута у 96% алкохолу, 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 70% алкохолу и на крају 5 минута у дестилованој води. Препарати су бојени *Mayer*-овим хематоксилином (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) 10 минута а затим су испрани дестилованом, а потом и текућом водом 5 минута. Препарати су затим бојени алкохолним еозином (*Sigma Aldrich*) 2 минута. Након бојења ткиво је дехидратисано и просветљено у ксилоју. За процес дехидратације коришћене су растуће концентрације алкохола и то: 5 минута у 70% алкохолу, затим 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 96% алкохолу и на крају 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу. Након бојења и поступка дехидратације, добијени препарати су просветљени потапањем 1 минут у мешавини ксилола и апсолутног алкохола у односу 1:1, а потом 2 пута по 1 минут само у ксилолу. Ткивни исечци су прекривени канада балзамом (*Canada balsam, Centrohem, Србија*) и покровним стаклима. Након 24-часовног сушења препарати су анализирани и израђене су фотомикрографије на светлосном микроскопу (*BX51, Olympus, Japan*).

#### 3.7.4. Бојење липида Oil-red O методом

За детектовање интрацелуларних липида коришћена је хистохемијска техника бојења *Oil-Red O*. За бојење су коришћени криоисечци дебљине 5-8  $\mu\text{m}$ . Исечци су остављени да се осуше 30 до 60 минута на собној температури, а потом су фиксирани у 10% формалину 10 минута. Фиксирани препарати су испрани у текућој води у трајању од 10 минута. Затим су препарати опрани у 60% изопропранолу (*Isoprpanol, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) и бојени 15 минута у свеже припремљеном раствору 0,5% *Oil-red O* (енгл. *Oil-red O working solution, Sigma Aldrich*). Након бојења, вишак боје је испран у 60% изопропранолу и препарати су обојени *Mayer*-овим хематоксилином (*Sigma Aldrich*) 60 секунди, а затим су испрани текућом водом 5 минута. Препарати су покривени медијумом на бази воде и покровним стаклима. Након вишедневног сушења, препарати су анализирани помоћу светлосног микроскопа (*BX51, Olympus, Japan*) помоћу ког су израђене и фотомикрографије.

#### 3.7.5. Бојење колагена Sirius red методом

За селективну детекцију колагених влакана у ткиву коришћена је хистохемијска техника бојења *Sirius red*. На парафинским исечцима ткива јетре је урађен поступак депарафинизације и рехидратације ткива, испирањем у падајућим концентрацијама алкохола, као што је претходно описано. Оригинални протокол бојења обухвата и примену *Weigert*-овог хематоксилина. Бојење је урађено модификованом методом без коришћења хематоксилина. Препарати су бојени *Picro-Sirius red* раствором у трајању од 1 сата. Радни раствор *Picro-Sirius red* добијен је растварањем 0,5 g *Sirius red* боје (*Direct Red 80, Sigma Aldrich*) у 500 ml засићеног раствора пикричне киселине (енгл. *Picric acid Solution, Sigma Aldrich*). Након бојења препарати су два пута по 5 минута опрани у 0,005% воденом раствору глацијалне сирћетне киселине (*Centrohem, Србија*). Затим је урађен поступак дехидратације, у три измене апсолутног алкохола и просветљивања препарата, 5 минута у ксилолу. На ткивне исечке је нанет канада балзам (*Canada balsam, Centrohem, Србија*) и прекривени су покровним стаклима. Резултат бојења су црвено пребојена колагена влакна и жуто пребојена цитоплазма. Након сушења препарати су анализирани на светлосном микроскопу (*BX51,*

*Olympus, Japan*), при чему су израђене фотомикрографије које су коришћене за анализу помоћу рачунарског програма *ImageJ*.

### 3.7.6. Бојење гликогена PAS (*Periodic acid–Schiff*) техником

Интрацелуларну акумулацију гликогена у ћелијама јетре експерименталних животиња испитали смо селективним хистохемијским бојењем PAS (*Periodic acid–Schiff*) техником. Молекули угљених хидрата у ткивним структурама показују се овом техником.

Парафински исечци ткива јетре на којима је урађен поступак депарафинизације и рехидратације ткива, као што је претходно описано, коришћени су бојење. Препарати су обојени у PAS раствору (енгл. *Periodic acid solution*) на собној температури у трајању од 5 минута. Затим су испрани у три измене дестиловане воде у трајању од 10 минута. Препарати су потопљени у Шифов реагенс (енгл. *Schiff's reagent*) у трајању од 15 минута, а затим испрани у текућој води 5 минута. Препарати су затим обојени хематоксилином по Жилу број 3 у трајању од 90 секунди (енгл. *Hematoxylin Solution, Gill No. 3*), након чега су испрани у млакој текућој води. Након прања, урађен је поступак дехидратације, у две измене по 5 минута, прво 96% а затим и апсолутним алкохолом, након чега су препарати просветљени 5 минута у ксилолу. На крају је на ткивне исечке нанет канада балзам (*Canada balsam, Centrohem, Србија*) и прекривени су покровним стаклима. Након сушења препарати су анализирани на светлосном микроскопу (*BX51, Olympus, Japan*), при чему су израђене фотомикрографије које су коришћене за анализу помоћу рачунарског програма *ImageJ*.

### 3.7.7. Квантификација и скорирање патохистолошких промена у јетри

Тренутно постоје два патохистолошка система бодовања патохистолошких карактеристика у NAFLD која су у широј употреби. Коришћен је систем скорирања и квантификације који је предложен 2005. године од стране *Kleiner*-а и сарадника (177). Скорирање је урађено за сваку појединачну хистолошку карактеристику и то: стеатозу, балонирање хепатоцита, лобуларну инфилтрацију и фиброзу. Степен стеатозе се процењује семиквантитативно, паренхим ацинуса се дели на трећине, па се процењује проценат паренхима који је захваћен процесом; 0: до 5% (нормално); 1: 5-33% (блага стеатоза); 2: 34-66% (умерена стеатоза) или 3: >66% (изражена стеатоза). Процена балонираних хепатоцита

је урађена на следећи начин: 0: нема балонираних хепатоцита; 1: присутно неколико балонираних хепатоцита; 2: присуство балонираних хепатоцита изражено. Процена лобуларног инфилтрата је урађена на следећи начин: 0: нема инфилтрације; 1: мање од 2 фокуса инфилтрације у видном пољу, увећање 20 пута; 2 до 4 фокуса инфилтрације у видном пољу, увећање 20 пута; 3: више од 4 фокуса инфилтрације у видном пољу, увећање 20 пута. Процена фиброзе је урађена на следећи начин: 0: нема присутне фиброзе; 1: присутна перисинусоидална фиброза; 2: присутна перипортална фиброза; 3: присутна фиброза између перипорталних простора („bridging“ фиброза); 4: присутна цироза. Предложени систем скорирања налази се у табели 3. Квантификација количине колагена као и количине масних капљица у ћелијама ткива је такође урађена анализом фотомикрографија помоћу рачунарског програма *ImageJ*. Помоћу овог програма, израчунат је проценат површине видног поља који је обојен црвеном бојом, односно проценат који заузимају колагена влакна или липидне капи. За анализу је коришћено по 10 видних поља са сваког препарата. Делови видног поља на којима није било ткива, изузети су из анализе.

**Табела 3. Скор систем коришћен за квантификацију NAFLD.**  
(Кориговано према: *Kleiner DE. et al. Hepatology 2005; 41:1313-21.*)

<b>NAFLD СКОР СИСТЕМ</b>	
<b>СТЕАТОЗА</b>	0: <5% паренхима 1: 5-33% паренхима 2: 34-66% паренхима 3: >66% паренхима
<b>БАЛОН ДЕГЕНЕРАЦИЈА ХЕПАТОЦИТА</b>	0: није присутно 1: присутно неколико 2: изражено
<b>ЛОБУЛАРНА ИНФИЛТРАЦИЈА</b>	0: није присутно 1: <2 фокуса (увећање x20) 2: 2-4 фокуса (увећање x20) 3: >4 фокуса (увећање x20)
<b>ФИБРОЗА</b>	0: нема фиброзе 1: присутна перисинусоидална фиброза 2: присутна перипортална фиброза 3: постоји „bridging“ фиброза 4: цироза

### 3.8. ИМУНОХИСТОХЕМИЈА

Имунохистохемијско бојење парафинских исечака јетре изведено је коришћењем *Mouse Specific HRP/DAB Detection IHC Kit (Abcam, Cambridge, UK)* за бојење CD68 и  $\alpha$ -SMA према препорученом протоколу. За бојење ST2 и IL-33 коришћен је *Rabbit Specific HRP/AEC Detection IHC Kit (Abcam)*, према препорученом протоколу.

За бојење су коришћени парафински исечци ткива јетре дебљине 5  $\mu\text{m}$  на којима је урађен поступак депарафинизације и рехидратације ткива. Након поступка депарафинизације отварање епитопа је изведено кувањем препарата 21 минут у 10mM Na-цитрату. Након хлађења препарати су интензивно испрани три пута у PBS-у. За инактивацију ендogene пероксидазе на ткивне исечке је потом додато 2-3 капи *Hydrogen Peroxide Block-a*, и након инкубације 10 минута на собној температури, препарати су два пута опрани у PBS-у. Затим је на препарате додато 2-3 капи *Protein Block-a* који је после 10 минута инкубације испран једном у PBS-у. На ткивне исечке је потом додато 150  $\mu\text{l}$  примарног антитела (1:200): мишијег анти-мишијег CD68 (*Abcam*) и мишијег анти-мишијег  $\alpha$ -SMA (*Abcam*), зечијег анти-мишијег ST2 (*Abcam*) и зечијег анти-мишијег IL-33 (*Santa Cruz Biotechnology, USA*). Сва примарна антитела су растворена у PBS-у са 1% BSA. Инкубација са примарним антителима је трајала 1 сат у влажној комори на собној температури. Након тога препарати су опрани 3 пута по 5 минута у PBS-у. Затим су ткивни исечци на којима је бојен CD68 и  $\alpha$ -SMA, инкубирани 30 минута на собној температури у присуству биотинизираниог козјег анти-мишијег антитела (енгл. *Biotinylated goat anti mouse IgG*). Након инкубације, препарати су опрани 3 пута по 5 минута у PBS-у. Затим је на ткивне исечке апликована *Streptavidin Peroxidase-a* која је инкубирана 10 минута на собној температуре. Након испирања 3 пута по 5 минута у PBS-у, апликовано је 2-3 капи DAB реагенса претходно добијеног додавањем 20  $\mu\text{l}$  DAB *Chromogen-a* у 1ml DAB *Substrate-a* пуфера. После истека 5 минута, препарати су испрани три пута у дестилованој води. На препарате на којима су бојени ST2 и IL-33 је након инкубације примарног антитела и испирања додато 2-3 капи секундарног HRP- конјугованог анти-зечијег антитела (*Rabbit Specific HRP conjugate*) које је инкубирано 30 минута на собној температури. Након инкубације, препарати су опрани 3 пута по 5 минута у PBS-у и на препарате је додат субстрат (*AEC Single Solution*). После истека 10 минута препарати су испрани три пута у дестилованој води.

Након испирања, ткивни исечци су бојени хематоксилином по *Mayer*-у 2 минута, а затим интензивно опрани млаком текућом водом. Обојени исечци су покривени воденим медијумом за покривање и покровним стаклом. Након сушења, интензитет и дистрибуција бојења су анализирани и израђене су фотомикрографије помоћу светлосног микроскопа (*BX51, Olympus, Japan*). Позитивно обојене ћелије избројане су у 10 различитих непреклапајућих видних поља, користећи програм *ImageJ*.

### ***3.9. АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈА ГЕНА У ТКИВУ ЈЕТРЕ МЕТОДОМ КВАНТИТАТИВНЕ ЛАНЧАНЕ РЕАКЦИЈЕ ПОЛИМЕРАЗЕ У РЕАЛНОМ ВРЕМЕНУ***

#### ***3.9.1. Изолација RNA из ткива јетре миша***

За изолацију укупне рибонуклеопротеинске киселине (енгл. *Ribonucleic acid, RNA*) из ткива јетре коришћен је тризол реагенс, који представља раствор фенола и гуанидин изотиоцианата.

Након изолације, део ткива јетре миша тежине приближно 100 mg је механички хомогенизован у 1 ml тризола (енгл. *TRI Reagent® Solution, Applied Biosystems, Foster city, CA, USA*) помоћу ручног хомогенизатора. Хомогенат је пребачен у епрувете величине 1,5 ml (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) инкубиран 5 минута на собној температури, а потом центрифугиран 10 минута на 12000 rpm на +4°C. На супернатант је додато 100 µl бромхлорпропана (енгл. *1-Bromo-3-chloropropane, BCP, Sigma Aldrich*), узорци су добро промешани, инкубирани 15 минута на собној температури, а потом центрифугирани 20 минута на 12000rpm на +4°C. Након центрифугирања раздвајају три слоја, а RNA је изолована из горњег провидног слоја. Садржај овог слоја слој је пребачен у нове епрувете у које је додато 500 µl расхлађеног изопропил алкохола да би се извршила преципитација RNA. Узорци су благо промешани, инкубирани 15 минута на собној температури и потом



центрифугирани 8 минута на 12000 rpm на +4°C. Талог из епрувета је опран два пута са по 1 ml расхлађеног 70% етил алкохола и потом сушен 2 до 5 минута на собној температури. Осушени тало је разблажен у води која не садржи нуклеазе (енгл. *Nuclease free water*, *Applied Biosystems*). Концентрација и пречишћеност RNA одређена је спектрофотометријски мерењем апсорбанце на 260/280 nm помоћу апарата Eppendorf® Biophotometer (*Eppendorf, Hamburg, Germany*).

### 3.9.2. Реверзна транскрипција RNA у комплементарну DNA

Реверзна транскрипција представља процес у коме се једноланчана RNA преписује у комплементарну DNA (енгл. *Complementary DNA*, cDNA). Процес реверзне транскрипције изведен је коришћењем кита *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*Applied Biosystems, Foster City, California, USA*), према упутству произвођача. Транскрипција је изведена по следећој процедури: 10 µl узорка који садржи 2 µg укупне RNA изоловане из јетре инкубиран је са 10 µl главне мешавине (енгл. *Master mix*).

*Master mix* је садржао: 2 µl пуфера (*RT Buffer*), 0,8 µl dNTP Mix-a, 2 µl хексамера (*Random Hexamer Primer*), 1 µl реверзне транскриптазе (*Multi Scribe™ Reverse Transcriptase*) и 3,2 µl воде која не садржи нуклеазе (*Nuclease-free H<sub>2</sub>O*). На растворени узорак RNA додат је *Master mix*, садржај је лагано промешан и инкубиран 10 минута на 25°C, затим 120 минута на 37°C. Реакција је заустављена грејањем 5 минута на 85°C, а узорци су затим охлађени на +4°C (*Mastercycler® ep realplex, Eppendorf, Hamburg, Germany*). Овако добијена cDNA коришћена је за квантификацију експресије гена. Сви кораци у току изолације RNA и њеног превођења у cDNA изведени су на леду, уколико у протоколу није другачије наведено.

### 3.9.3. Квантификација експресије гена

Методом квантитативне ланчане реакције полимеразе (енгл. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) у реалном времену (енгл. *Quantitative Real Time-PCR*, qRT-PCR) мерена је експресија гена од интереса. Реакција qRT-PCR је изведена у *Mastercycler® ep realplex* апарату

(Eppendorf, Hamburg, Germany) коришћењем микротитар плоча са 96 места (*Twin.tec. real time PCR plates 96, Eppendorf*). Реакциона смеша је имала волумен од 20  $\mu$ l по комори, а садржала је: 2  $\mu$ l узорка cDNA, 10  $\mu$ l *Master mix (Power SYBR Green PCR Master Mix (2x), Applied Biosystems)*, 2  $\mu$ l смеше парова прајмера за ген од интереса („forward“ и „reverse“) и 6  $\mu$ l воде која не садржи нуклеазе. Затим су плоче прелепљене оптичком адхезивном фолијом (*Masterclear real-time PCR Film, Eppendorf*), центрифугиране 1 минут на 3000 rpm и смештене у qRT-PCR апарат (*Mastercycler® ep realplex*). Реакције qRT-PCR је изведена по следећој температурној шеми: 4 минута на 95°C, затим 50 циклуса у трајању од по 15 секунди на 95°C и по минут на 62°C. Да би се одредила специфичност PCR продукта подешени су услови за извођење криве топљења (енгл. *Melting Curve*): 15 секунди на 95°C, 15 секунди на 60°C, 20 минута температурног раста и потом 95°C. Прајмери који су коришћени за амплификацију секвенце гена од интереса приказани су у табели (Табела 4).

**Табела 4. Прајмери коришћени за qRT-PCR анализу.**

	<b>Sense (5' to 3')</b>	<b>Antiense (5' to 3')</b>
Procol.α1	GCTCCTCTTAGGGGCCACT	CCACGTCTCACCATTGGGG
α-SMA	ACTGGGACGACATGGAAAAG	CATCTCCAGAGTCCAGCACA
IL-33	TCCTTGCTTGGCAGTATCCA	TGCTCAATGTGTCAACAGACG
ST2	GCAATTCTGACACTTCCCATG	ACGATTTACTGCCCTCCGTA
IL-13	CCTGGCTCTTGCTTGCCTT	GGTCTTGTGTGATGTTGCTCA
TGF-β	ATACAGGGCTTTCGATTCAGC	GTCCAGGCTCCAAATATAGG
ChREBP	CTGGGGACCTAAACAGGAGC	GAAGCCACCCTATAGCTCCC
LXR-α	ATCGCCTTGCTGAAGACCTCTG	GATGGGGTTGATGAACTCCACC
LXR-β	AAGCAGGTGCCAGGGTTCT	TGCATTCTGTCTCGTGGTTGT
CREBP-1c	GGAGCCATGGATTGCACATT	GGCCCGGGAAGTCACTGT
PPAR-γ	CCCAATGGTTGCTGATTACAAA	GAGGGTGTTAGAAGGTTCTTCATGA
Abca-1	CGCAGTGACCAGAAAACAATGTG	TATCAATGAGGCAAGGGTGTGG
Cd36	TCCAGCCAATGCCTTTGC	TGGAGATTACTTTTTTCAGTGCAGAA
FAS	AGAGATCCCGAGACGCTTCT	GCCTGGTAGGCATTCTGTAGT
β-actin	AGCTGCGTTTTACACCCTTT	AAGCCATGCCAATGTTGTCT

Релативна квантификација експресије циљног гена у односу на експресију референте контроле одређена је компаративном  $C_T$  (енгл. *Cycle threshold*,  $C_T$ ) методом ( $\Delta\Delta C_T$ ). Ниво експресије анализираних гена нормализован је у односу на ниво експресије гена за  $\beta$ -актин као референтног гена детектованог у идентичном узорку. Један узорак из контролне групе чија је вредност била приближна средњој вредности свих узорака контролне групе коришћен је као калибратор. Коначан резултат израчунат је у релативним јединицама као  $N$ -пута (енгл. *Fold change*) у односу на калибратор према следећој једначини.

$$N_{\text{узорка}} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T_{\text{узорка}} - \Delta C_T_{\text{калибратора}}$$

$$\Delta C_T_{\text{узорка}} = C_T_{\text{узорка}} - C_T_{\beta\text{-актина}}$$

$$\Delta C_T_{\text{калибратора}} = C_T_{\text{калибратора}} - C_T_{\beta\text{-актина}}$$

### 3.11. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Статистичка анализа добијених података је изведена коришћењем статистичког програма SPSS верзија 22. Први корак у статистичкој обради података је испитивање нормалности расподеле добијених вредности. Ако је број анализираних вредности био мањи од 50 за проверу је коришћен *Shapiro-Wilk* тест, а за број узорака већи од 50 коришћен је *Kolmogorov-Smirnov* тест. Вредности које су заузимале нормалну расподелу анализирани су коришћењем параметарског *Student*-овог  $t$  тест, док је у случају неправилне расподеле коришћен непараметарски *Mann-Whitney*-ев тест. Резултати експеримената су изражени као средња вредност +/- стандардна грешка (енгл. *Standard error*, SE). За статистички значајну разлику у добијеним вредностима између група користили смо два нивоа статистичке значајности: статистички значајна разлика  $p < 0.05$  и високо статистички значајна разлика  $p < 0.01$ . Добијени резултати су приказани табеларно и графички.

## 4. РЕЗУЛТАТИ

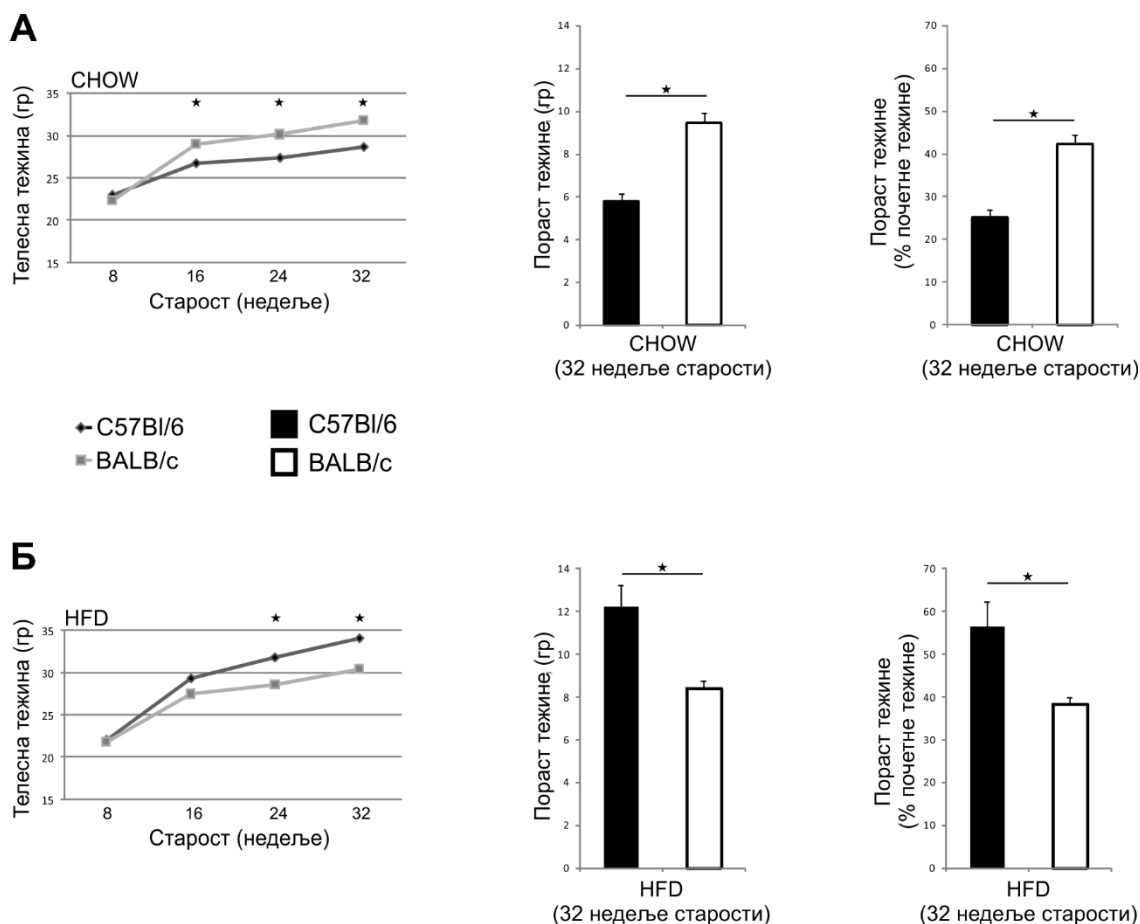
### 4. 1. ИМУНОМЕТАБОЛИЧКИ ФЕНОТИП МИШЕВА ЧИСТОГ СОЈА C57Bl/6 И BALB/c НА СТАНДАРДНОЈ ИСХРАНИ И ИСХРАНИ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ

#### 4.1.1. Телесна тежина мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c

Експериментални модел гојазности који је коришћен у испитивању имунометаболичког фенотипа мишева са доминантним тип 1 и тип 2 имунским одговором, подразумевао је храњење експерименталних животиња храном са високим садржајем масти (60% kcal из масти) (енг. *high-fat diet*, HFD) у трајању од 24 недеље. Контролне групе животиња су истовремено биле на режиму исхране стандардном лабораторијском храном (10% kcal из масти) (енг. CHOW), такође 24 недеље. У току трајања експеримента, све животиње су имале слободан, *ad libitum*, приступ храни и води. Телесна тежина животиња је контролисана периодично, сваке четири недеље, мерењем тежине сваког миша.

На почетку експеримента, 8 недеља стари мишеви C57Bl/6 и BALB/c соја су имали приближно исту телесну тежину. Након 24 недеље, мишеви старости 32 недеље C57Bl/6 соја храњени CHOW храном су имали значајно мању телесну тежину ( $p = 0.029$ ) у односу на мишеве BALB/c соја на истом режиму исхране. Пораст телесне тежине у односу на почетну тежину, као и пораст тежине изражен као проценат почетне тежине, такође су били значајно нижи код мишева C57Bl/6 соја ( $p = 0.009$ ) (Слика 1А).

Мишеви C57Bl/6 соја старости 32 недеље, односно након 24 недеље храњења HFD храном, су имали значајно већу телесну тежину ( $p = 0.039$ ) у односу на BALB/c мишеве на истом режиму исхране. C57Bl/6 мишеви на HFD су такође имали већи пораст телесне тежине, као и већи пораст тежине изражен као проценат почетне тежине ( $p = 0.009$ ) (Слика 1Б).



**Слика 1. Промене телесне тежине C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти.** Телесна тежина експерименталних животиња мерена је сваке 4 недеље током трајања експеримента. (А) Периодични приказ пораста тежине на сваких 8 недеља код мишева на стандардној исхрани (CHOW). Пораст тежине у грамама у 32. недељи старости у односу на тежину у 8. недељи старости и пораст тежине изражен као % повећања у односу на тежину у 8. недељи старости код мишева на стандардној исхрани. (Б) Периодични приказ пораста тежине на сваких 8 недеља код мишева на исхрани са високим садржајем масти (HFD). Пораст тежине у грамама у 32. недељи старости у односу на тежину у 8. недељи старости и пораст тежине изражен као % повећања у односу на тежину у 8. недељи старости код мишева на исхрани са високим садржајем масти. Представљени резултати два експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

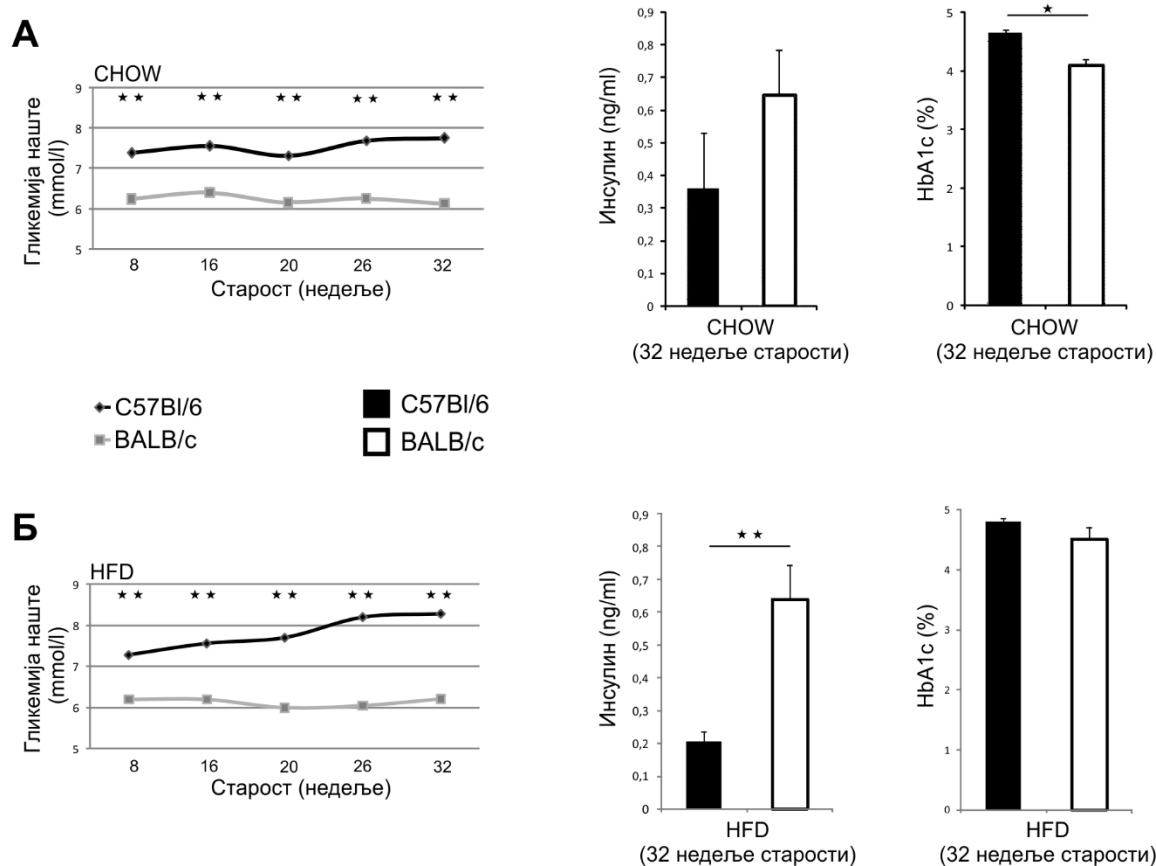
#### 4.1.2. Гликорегулација код мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c

Током трајања експеримента праћени су параметри гликорегулације. Мишевима је периодично мерена гликемија наше након четворочасовног гладовања. Серумска концентрација инсулина наше је мерена након 24 недеље храњења, односно у 32. недељи

живота. На основу измерених вредности гликемије наше и инсулинемије у време жртвовања животиња након 24 недеље на специјалном режиму исхране израчунате су вредности НОМА-IR индекса.

У групи животиња храњених CHOW храном, мишеви C57Bl/6 соја су у 8. недељи живота, на почетку експеримента, имали значајно већу гликемију наше ( $p = 0.009$ ). Ова разлика се одржавала у току целог периода храњења, као и на крају експеримента, у 32. недељи старости мишева ( $p = 0.003$ ). Међутим, у мишева старости 32. недеље није било значајне разлике у серумској концентрацији инсулина између C57Bl/6 и BALB/c мишева. Процент гликолизираног хемоглобина, HbA1c, је био значајно већи у C57Bl/6 мишева у поређењу са BALB/c мишевима на стандардној исхрани ( $p = 0.021$ ) (Слика 2А).

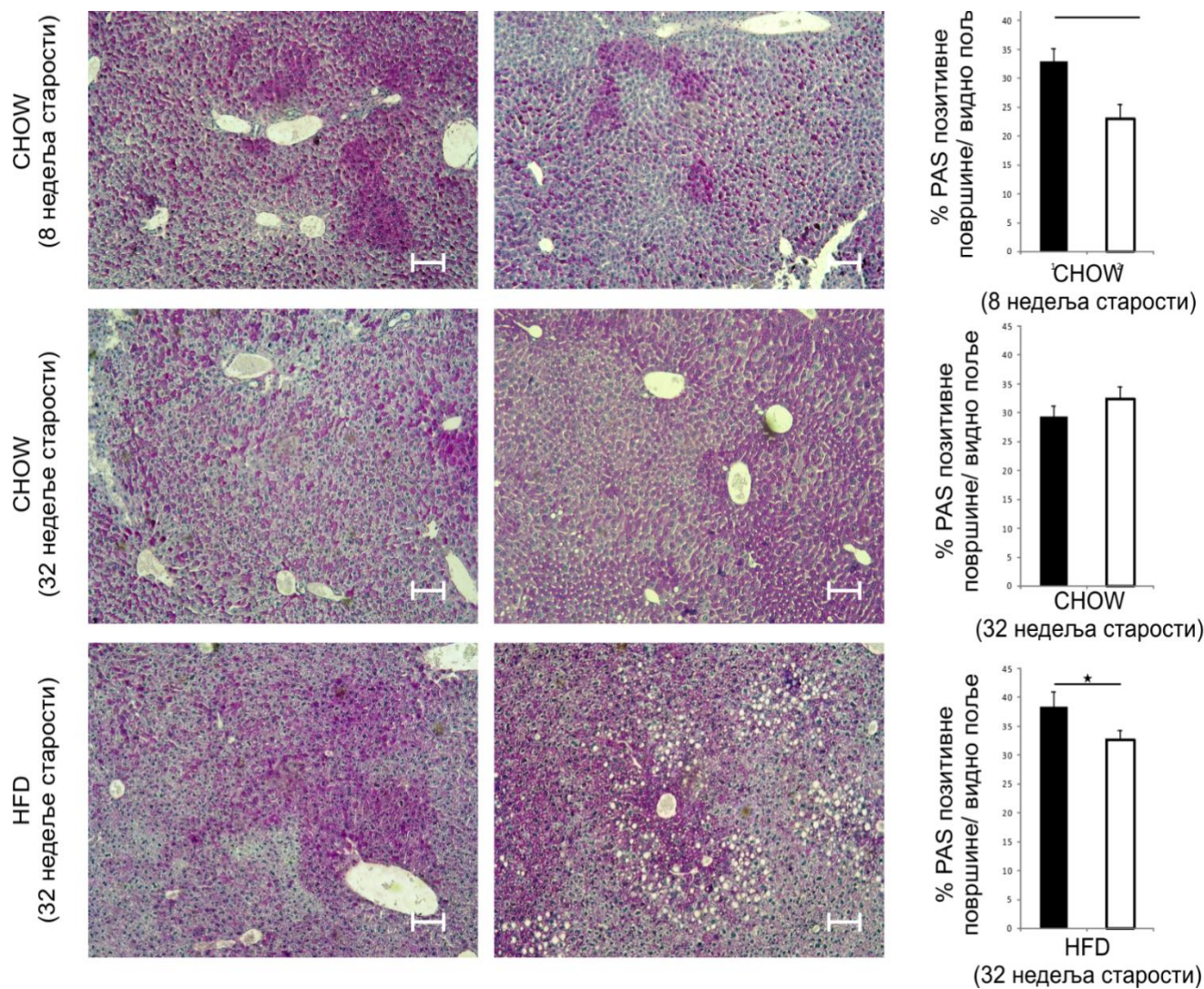
Праћењем параметара гликорегулације у групи мишева храњених са HFD, показано је да је гликемија наше такође значајно већа код C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c сој. У групи C57Bl/6 мишева вредности гликемије наше су у току трајања експеримента постепено расле, док тај тренд није примећен у групи BALB/c мишева. Након жртвовања животиња, у 32. недељи старости, мерењем серумске концентрације инсулина показана је значајно већа концентрација у групи BALB/c мишева у односу на C57Bl/6 мишеве ( $p = 0.006$ ). Такође, није било разлике између сојева мишева у вредностима HbA1c (Слика 2Б).



**Слика 2. Гликорегулација C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти.** Вредности гликемије наште из пуне капи крви мерене су периодично у току 24 недеље храњења. Након жртвовања мишева, у 32. недељи старости, одређен је проценат HbA1c и концентрација инсулина у серуму. (А) Периодични приказ гликемије наште код мишева на стандардној исхрани (CHOW). Концентрација инсулина у серуму у 32. недељи старости и проценат гликолилизованог хемоглобина HbA1c код мишева на стандардној исхрани. (Б) Периодични приказ гликемије наште код мишева на исхрани са високим садржајем масти (HFD). Концентрација инсулина у серуму у 32. недељи старости и проценат гликолилизованог хемоглобина HbA1c код мишева на исхрани са високим садржајем масти. Представљени резултати из два експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

Интрацелуларна акумулација гликогена у ћелијама јетре експерименталних животиња испитана је селективним хистохемијским бојењем PAS (*Periodic acid-Schiff*) техником. PAS техника се користи за бојење ткивних структура које садрже молекуле угљених хидрата.

Код младих мишева старих 8 недеља депо гликогена у јетри је био значајно већи у групи C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c сој ( $p = 0.007$ ). Након 24 недеље хранења CHOW храном, у 32. недељи живота, није било разлике у количини акумулираног гликогена у јетри. Код експерименталних животиња хранених HFD, у 32. недељи живота депои гликогена у јетри су били значано већи код C57Bl/6 соја у односу на BALB/c сој ( $p = 0.013$ ) (Слика 3).



**Слика 3. Депо гликогена у јетри C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти.** Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака ткива јетре обојених методом PAS (*Periodic acid-Schiff*) хистохемијског бојења (увеличање x10, размера=100µm. Графички су приказане средње вредности PAS позитивно обојене површине ткива изражене као проценат површине целог видног поља. Представљени резултати два експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01



### *4.1.3. Карактеристике висцералног масног ткива и липидни профил код мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c*

Основна карактеристика гојазности као хроничног обољења је повећано стварање и накупљање висцералног масног ткива у организму. У мишева, висцерално масно ткиво је у највећој мери локализовано у перигонадалним и периреналним депоима. Код младих животиња, старости 8 недеља, иако није било разлике у телесној тежини, показана је значајно већа количина висцералног масног ткива у C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c мишеве ( $p = 0.003$ ). У 32. недељи живота C57Bl/6 мишеви храњени CHOW храном су такође имали значајно већу тежину висцералног масног ткива ( $p = 0,009$ ) као и проценат висцералног масног ткива у односу на телесну тежину у поређењу са мишевима BALB/c соја ( $p = 0.05$ ). Уочена разлика у тежини висцералног адипозног ткива је била још израженија код животиња храњених HFD ( $p = 0.008$ ). Процент висцералног масног ткива у односу на телесну тежину је такође био значајно већи код мишева C57Bl/6 соја храњених HFD у односу на BALB/c сој ( $p = 0.05$ ) (Табела 6).

Одређивањем липидног профила је показано да су у узрасту од 8 недеља концентрације укупног холестерола у серуму C57Bl/6 мишева, као и концентрација триглицерида, биле значајно ниже у поређењу са мишевима BALB/c соја ( $p = 0.012$ ,  $p = 0.029$ ). Након 24 недеље исхране CHOW храном, C57Bl/6 мишеви су такође имали значајно мању концентрацију укупног холестерола у серуму ( $p = 0.012$ ) и триглицерида ( $p = 0.029$ ) у односу на BALB/c мишеве. Ова разлика у концентрацији холестеола и липида је одржана и у групама животиња које су храњене HFD храном ( $p = 0.012$ ,  $p = 0.029$ ) (Табела 5).

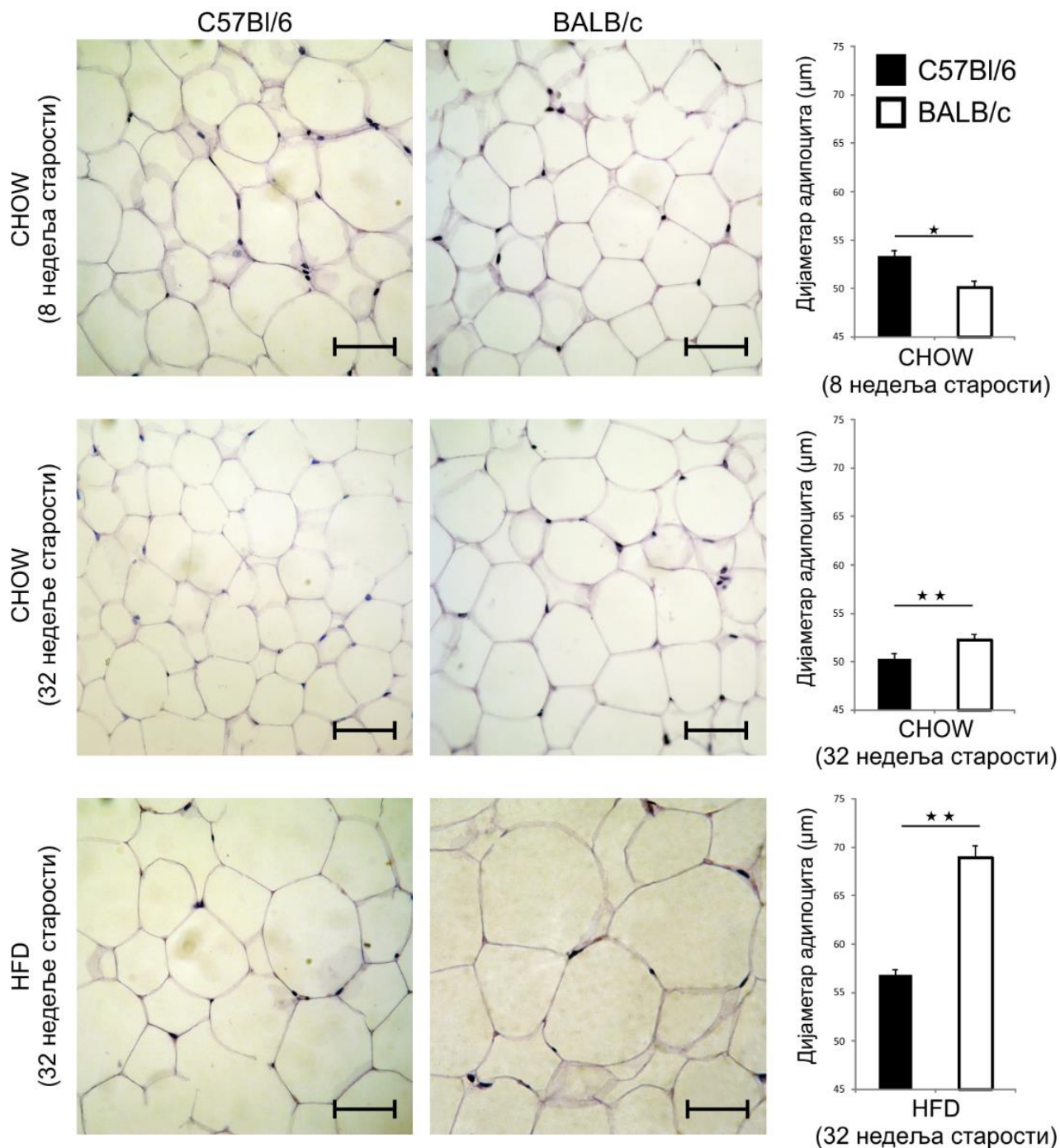
	CHOW 8 недеља старости		CHOW 32 недеље старости		HFD 32 недеље старости	
	C57Bl/6	BALB/c	C57Bl/6	BALB/c	C57Bl/6	BALB/c
Висцерално адипозно ткиво (g)	0,23 ± 0,03	0,17 ± 0,06**	0,46 ± 0,02	0,34 ± 0,04**	1,74 ± 0,24	0,70 ± 0,08**
Висцерално адипозно ткиво(% телесне тежине)	0,98 ± 0,13	0,70 ± 0,23	1,53 ± 0,05	1,16 ± 0,14*	5,09 ± 0,62	2,25 ± 0,24*
Укупни холестерол (mmol/l)	3,07 ± 0,29	4,73 ± 0,40*	3,14 ± 0,25	3,93 ± 0,32*	4,76 ± 0,13	6,02 ± 0,27*
Триглицериди (mmol/l)	0,92 ± 0,02	1,17 ± 0,19*	1,68 ± 0,14	1,85 ± 0,15*	1,34 ± 0,12	1,94 ± 0,06*

**Табела 5. Тежина висцералног адипозног ткива и липидни профил C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја.** Тежина висцералног адипозног ткива, проценат висцералног масног ткива у односу на телесну тежину, концентрација укупног холестерола и триглицерида у серуму. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

Испитиване су и морфолошке карактеристике висцералног адипозног ткива експерименталних животиња мерењем величине адипоцита на парафинским исечцима бојеним хематоксилин еозином. Приближна величина адипоцита одређена је мерењем највећег и најмањег пречника ћелије. Морфолошке карактеристике адипозног ткива и величина адипоцита, заједно са подацима о тежини ткива, дали су увид у динамику развоја овог ткива у два испитивана соја мишева.

Код животиња старих 8 недеља, показана је значајно већа величина ћелија висцералног адипозног ткива код C57Bl/6 соја у односу на BALB/c сој (p = 0.02). Морфолошки, адипоцити висцералног адипозног ткива C57Bl/6 мишева су показали велику варијабилност у величини, за разлику од адипоцита BALB/c мишева чија је величина била хетерогена и са знатно мање варијација у величини и облику. Овакав налаз указује на процес хиперплазије висцералног адипозног ткива у мишева C57Bl/6 соја који је израженији у односу на масно ткиво BALB/c мишева. Након 24 недеље исхране CHOW храном тежина висцералног адипозног ткива је увећана два пута у оба соја мишева. Адипоцити мишева C57Bl/6 соја су у 32. недељи живота имали значајно мању просечну величину у односу на адипоците BALB/c мишева (p = 0.001) али су, као и у 8. недељи, показали јасну хетерогеност

у морфологији. Са друге стране, адипоцити BALB/c мишева су и у 32. недељи били међусобно слични по величини и облику. Овај налаз указује да је пораст висцералног адипозног ткива C57Bl/6 мишева доминантно настао хиперплазијом односно пролиферацијом адипоцита, док је код BALB/c мишева увећање адипозног ткива настало преваходно хипертрофијом постојећих ћелија. Исти тренд, са много убедљивијим резултатима, је уочен и код мишева који су 24 недеље храњени HFD храном. Тежина висцералног масног ткива је код мишева C57Bl/6 соја била 7.5 пута већа у 32. недељи у односу на мишеве старе 8 недеља, док је код мишева BALB/c соја увећање тежине било четвороструко. Дијаметар адипоцита је био значајно мањи код C57Bl/6 мишева храњених HFD храном у односу на BALB/c мишеве ( $p = 0.001$ ). Морфолошки, висцерално масно ткиво C57Bl/6 мишева је и у овој групи имало јасне знаке хиперплазије, а велики број ћелија је био хипертрофичан. Код мишева BALB/c соја, у ткиву су доминирале хипертрофичне ћелије, док су знаци хиперплазије били много мање изражени у односу на ткиво C57Bl/6 мишева (Слика 4).

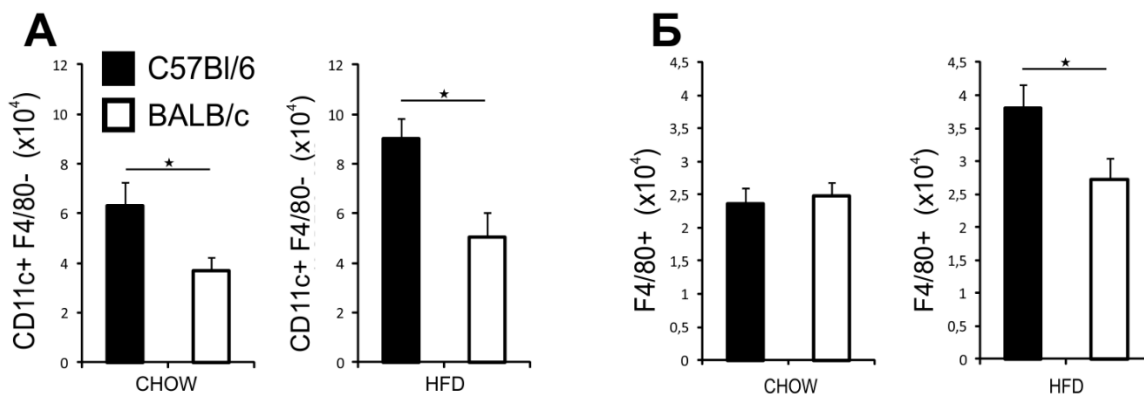


**Слика 4. Морфологија висцералног адипозног ткива C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја.** Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака висцералног масног ткива обојених ХЕ (хематоксилин-еозин) техником (увеличање x40, размера=50µm. Графички су приказане средње вредности дијаметра адипоцита. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

#### 4.1.4. Фенотипска анализа имунских ћелија у висцералном масном ткиву мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c

Након 24 недеље специјалног режима исхране, из висцералног масног ткива експерименталних животиња изолована је стромална васкуларна фракција ћелија. Методом проточне цитометрије испитиване су фенотипске карактеристике имунских ћелија у циљу доказивања присуства, степена и природе запаљења висцералног масног ткива које прати развој гојазности.

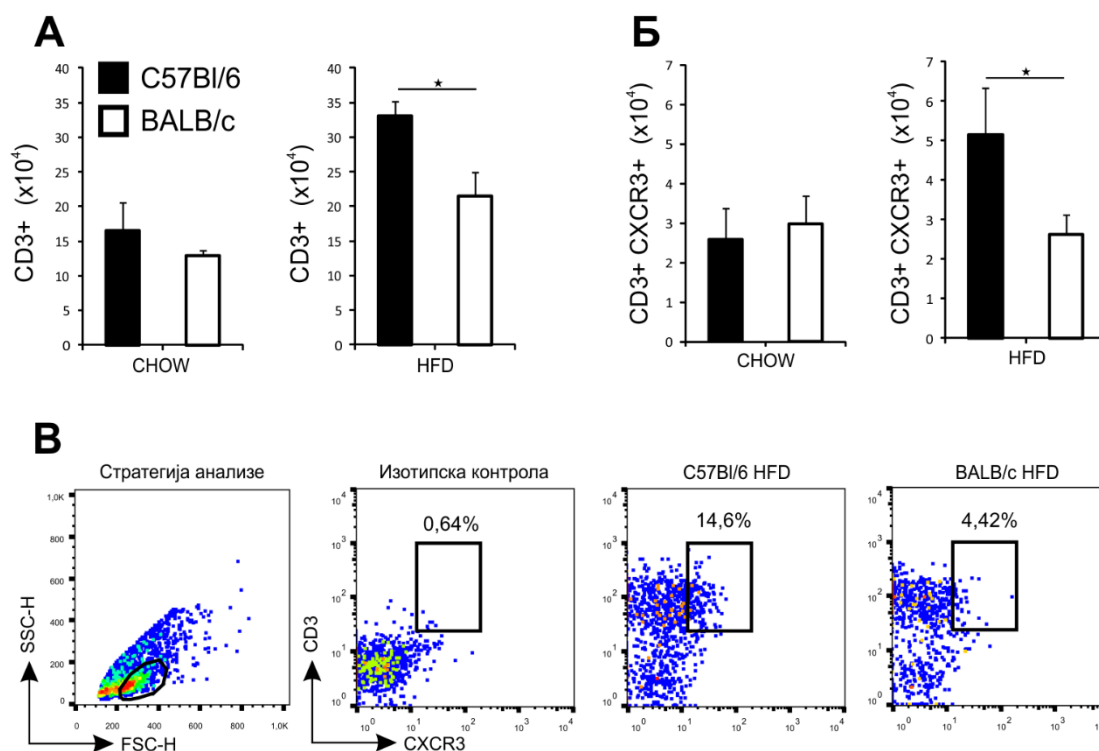
Испитивање ћелија урођене имуности, показано је да је број CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> дендритичних ћелија значајно већи у висцералном адипозном ткиву C57Bl/6 мишева на стандардном режиму исхране 24 недеље. Код животиња храњених HFD храном број CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> дендритичних ћелија је такође био значајно већи код C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c мишеве (Слика 5А). Није било значајне разлике између два соја мишева у броју F4/80<sup>+</sup> макрофага код животиња храњених CHOW храном. Међутим, код животиња на HFD режиму исхране, број F4/80<sup>+</sup> макрофага је био значајно већи у висцералном масном ткиву C57Bl/6 мишева (Слика 5Б).



**Слика 5. Фенотипска анализа ћелија урођене имуности у висцералном адипозном ткиву C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја.** Мононуклеарне ћелије изоловане из стромалне васкуларне фракције висцералног масног ткива анализирани су методом проточне цитометрије. (А) Апсолутни број CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> дендритичних ћелија. (Б) Апсолутни број F4/80<sup>+</sup> макрофага. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

Методом проточне цитометрије су затим испитане фенотипске карактеристике ћелија стечене имуности које су изоловане из стромалне васкуларне фракције висцералног

адипозног ткива експерименталних животиња након 24 недеље исхране. Након 24 недеље на CHOW исхрани, није било разлике у апсолутном броју CD3<sup>+</sup> лимфоцита између два соја мишева. Код мишева храњених HFD храном, апсолутни број CD3<sup>+</sup> лимфоцита је био значајно већи у висцералном адипозном ткиву C57Bl/6 мишева (Слика 6А). CXCR3 хемокински рецептор је превасходно експримиран на активираним Т лимфоцитима, претежно Th1 ћелијама. Апсолутни број CD3<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> лимфоцита у висцералном адипозном ткиву животиња на CHOW исхрани је био приближно једнак, али је код животиња храњених HFD храном, апсолутни број CD3<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> лимфоцита био значајно већи код C57Bl/6 мишева у поређењу са мишевима BALB/c соја (Слика 6Б).

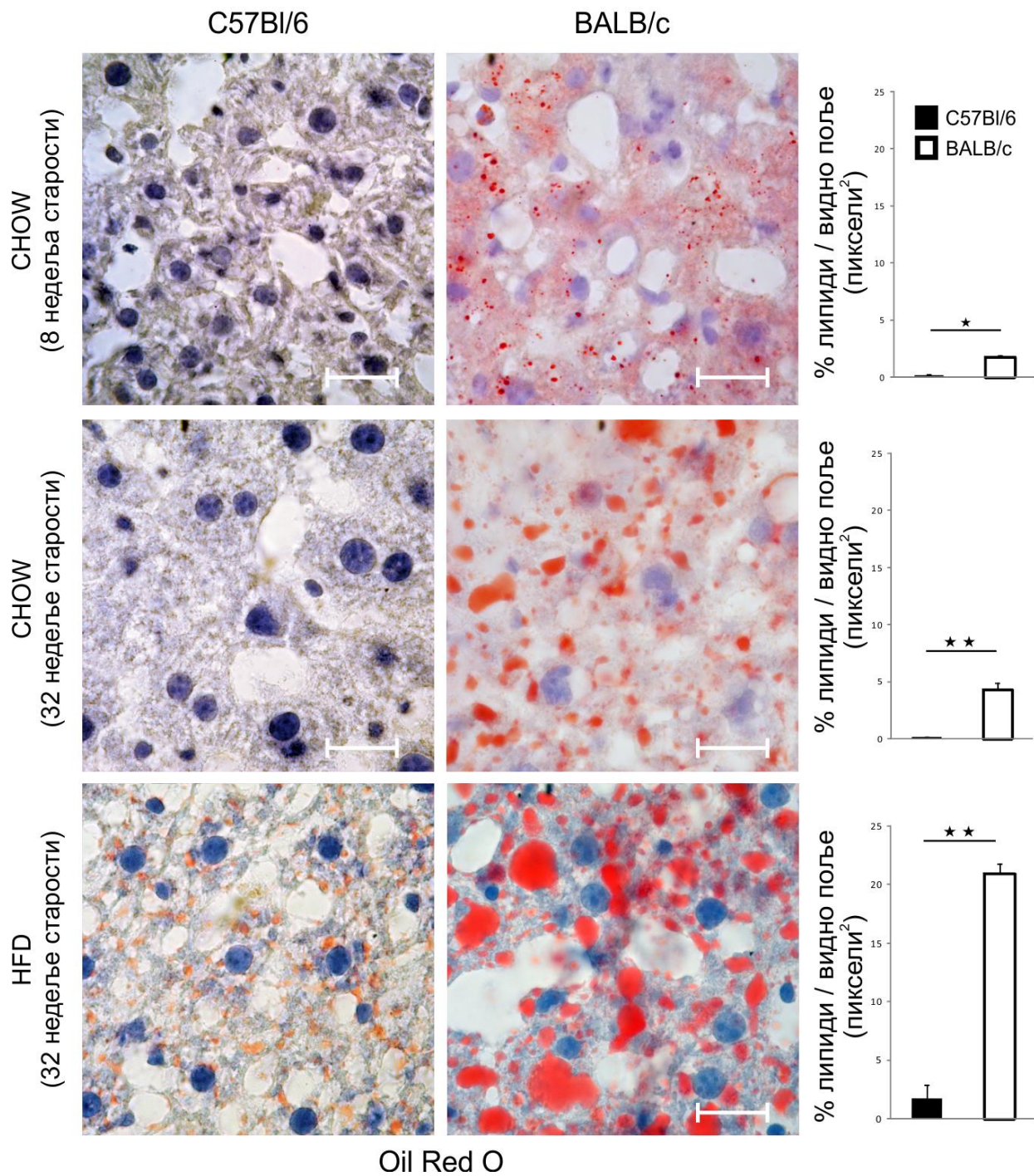


**Слика 6. Фенотипска анализа ћелија стечене имуности у висцералном адипозном ткиву C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја.** Мононуклеарне ћелије изоловане из стромалне васкуларне фракције висцералног масног ткива анализирани су методом проточне цитометрије. (А) Апсолутни број CD3<sup>+</sup> лимфоцита. (Б) Апсолутни број CD3<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> Th1 лимфоцита. (В) Приказана стратегија анализе резултата проточне цитометрије и репрезентативни плотови CD3<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> лимфоцита. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

#### 4.1.5. Стеатоза јетре код мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c

Накупљање масти унутар хепатоцита карактерише стеатозу јетре која представља основну патохистолошку карактеристику неалкохолне масне болести јетре. У хепатоцитима, масти се могу акумулирати у виду микро или макровезикула. За патохистолошко испитивање присуства масти у хепатоцитима коришћена је специфична хистохемијска техника бојења, *Oil Red O*. Ова техника се заснива на коришћењу лизохрома односно *Oil Red O* боје која је солубилна у липидима и боји липиде црвеном бојом. За бојење су коришћени смрзнути резове ткива јетре.

Код младих животиња старости 8 недеља количина акумулираних масти је била значајно мања код C57Bl/6 мишева ( $p=0.02$ ). Интересантно је да су већ у овом узрасту код BALB/c мишева били видљиви знакови макровезикуларне стеатозе. Код старијих животиња храњених SHOW храном, у 32. недељи живота C57Bl/6 мишеви нису имали знаке стеатозе јетре, док су код мишева BALB/c соја били изражени знаци мешовите, микро и макровезикуларне стеатозе. Семиквантитативна анализа ткива обојених *Oil Red O* бојењем је показала значајно мању количину липида у јетри C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c ( $p=0.000$ ). Исхрана са високим садржајем масти је изазвала благу макровезикуларну стеатозу код мишева C57Bl/6 соја, док су мишеви BALB/c соја развили изражену стеатозу са доминантним макровезикулама у ткиву. Семиквантитативно, утврђено је да је количина акумулираних липида и у овој групи мишева била значајно мања у јетрама C57Bl/6 мишева ( $p=0.000$ ) (Слика 7).



Слика 7. Стеатоза јетре C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја. Репрезентативне фотомикрографије смрзнутих исечака ткива јетре обојених Oil Red O техником (увеличање x100, размера=25µm). Графички су приказане средње вредности површине обојене црвено у односу на површину видног поља. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01



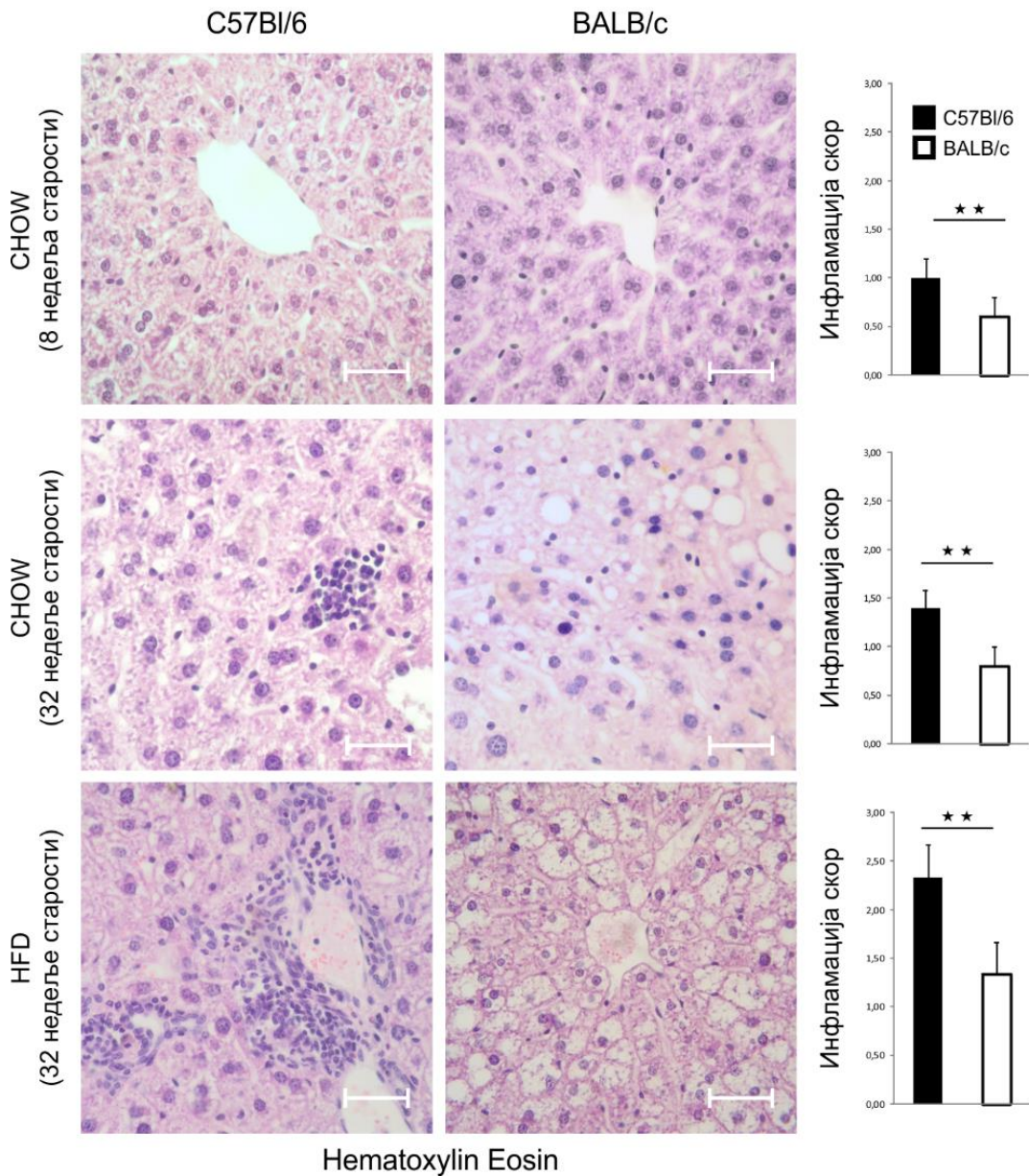
#### 4.1.6. Лобуларна инфилтрација јетре код мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c

Неалкохолна масна болест јетре представља значајну компликацију метаболичког синдрома те се сматра хепатичком манифестацијом овог синдрома. У постављању клиничке дијагнозе обољења јетре у склопу метаболичког синдрома неопходна је хистопатолошка анализа ткива јетре. Поред стеатозе јетре, код стеатохепатитиса у јетри је присутно и хепатоцелуларно оштећење праћено лобуларном инфилтрацијом. Оштећење хепатоцита манифестује се присуством балонираних хепатоцита, а такође је присутно и повећање активности јетриних ензима у серуму. Лобуларни инфилтрат се састоји од мононуклеарних ћелија. Током прогресије болести, лобуларни инфилтрат се увећава и присуство израженог инфилтрата корелира са тежим обликом болести.

Квантификовање лобуларног инфилтрата ткива јетре је извршено патохистолошким анализом парафинских исечака ткива обојених хематоксилин еозином. За квантификовање је коришћен NAFLD скор систем (*Kleiner DE. et al. Hepatology 2005; 41:1313-21.*), коригован и прилагођен експерименталном анималном моделу болести. Показано је да већ у 8. недељи старости C57Bl/6 мишеви за разлику од BALB/c мишева, у јетри имају присутне знакове инфламације ( $p=0.001$ ). Након 24 исхране CHOW храном, у 32. недељи живота, C57Bl/6 мишеви су имали јасно изражене лобуларне фокусе мононуклеарних ћелија и инфламаторни скор је био значајно већи у односу на BALB/c мишеве ( $p=0,004$ ). Анализа инфилтрата код мишева храњених храном са високим саржајем масти је показала присуство великих сливених инфилтрата локализованих интерлобуларно у јетрама C57Bl/6 мишева, док су у јетрама BALB/c мишева били присутни ретки, појединачни инфилтрати мале величине. Инфламаторни скор је био значајно већи код C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c мишеве ( $p=0,000$ ) (Слика 8).

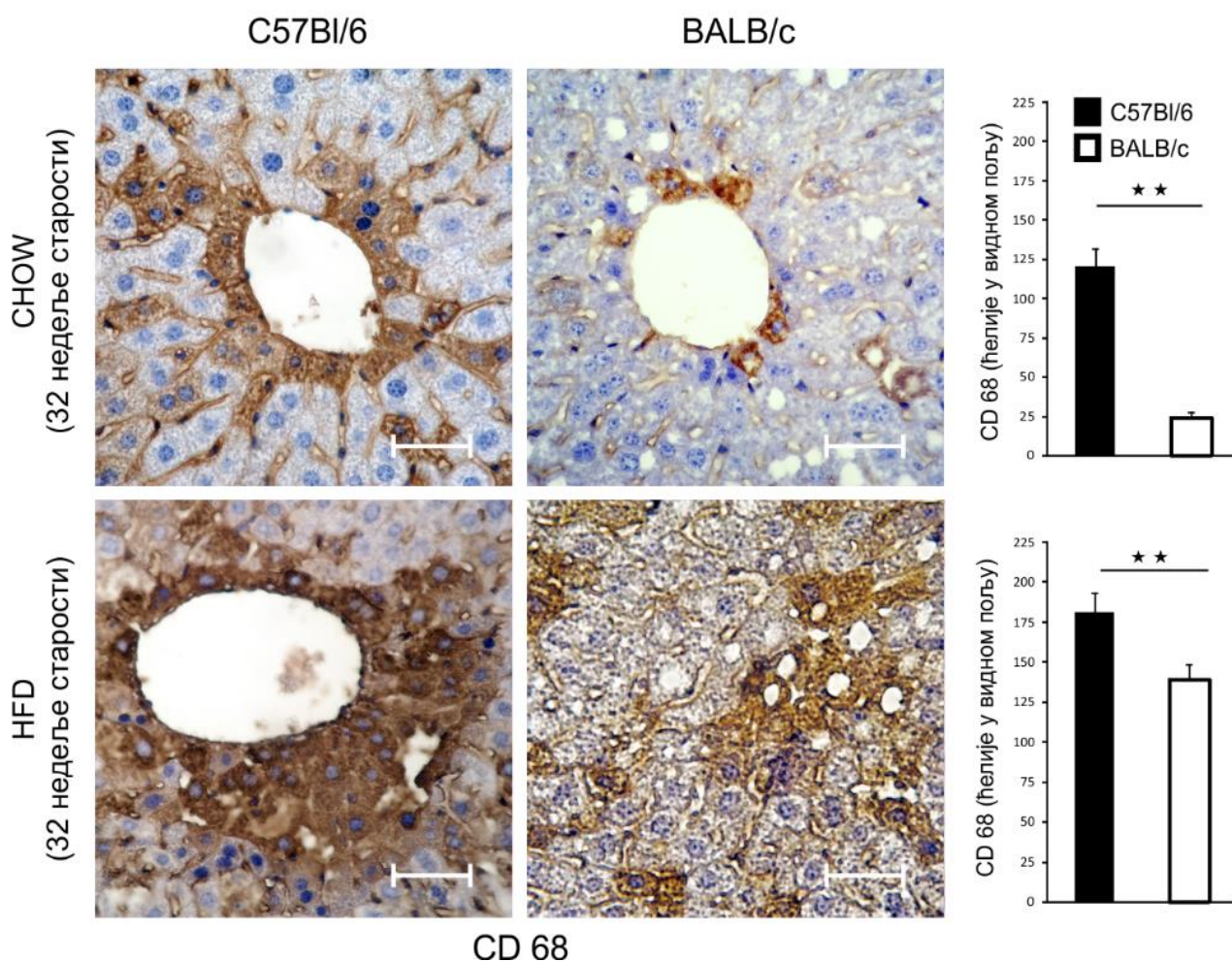
Маркери оштећења јетре, серумска активност аспартат трансминазе (АСТ) и аланин трансминазе (АЛТ) се нису разликовали код мишева старости 8 недеља, као ни код мишева старости 32 недеље на CHOW исхрани. У групи мишева храњених HFD храном, серумска

активност АСТ и АЛТ су биле значајно веће код C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c мишеве ( $p=0.013$ ;  $p=0.04$ ).



**Слика 8. Инфилтрација ткива јетре C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја.** Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака ткива јетре обојених ХЕ (хематоксилин-еозин) техником (увеличање  $\times 40$ , размера=50 $\mu\text{m}$ ). Графички су приказане средње вредности оцена инфламације. Представљени резултати два експеримента,  $n=9-10$  животиња по групи, средња вредност  $\pm$  SE, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$

Патохистолошка анализа инфламације јетре је такође извршена имунохистохемијским бојењем CD 68<sup>+</sup> маркера који се у највећој мери експримира на макрофазима. Анализа је показала да је, у складу са претходно приказаним резултатима који указују на значајно већу инфилтрацију мононуклеарних ћелија у јетри C57Bl/6 мишева, и број CD 68<sup>+</sup> проинфламаторних макрофага значајно већи код животиња на SHOW исхрани (p=0.001), као и на исхрани HFD храном (p=0.001) (Слика 9).



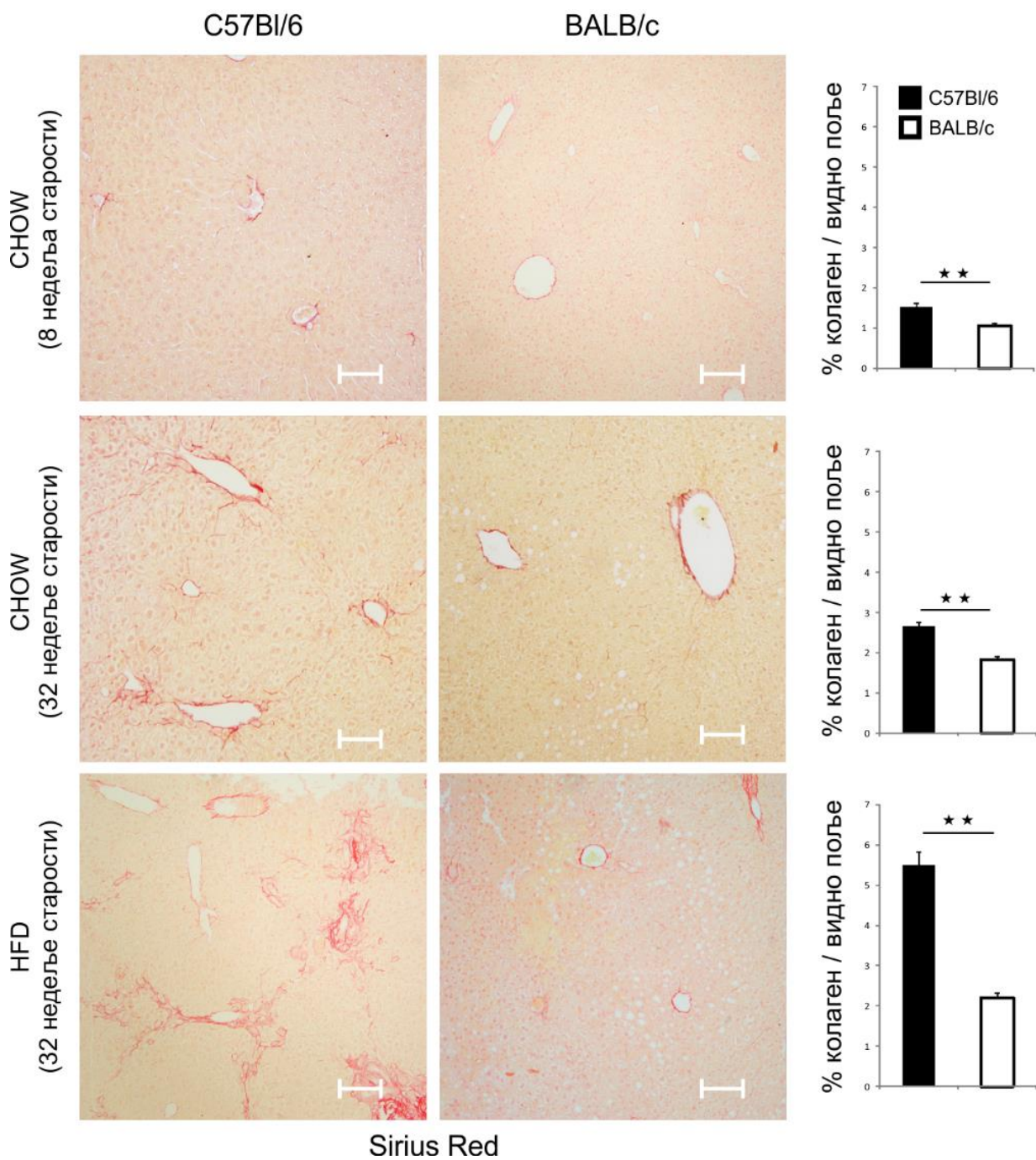
**Слика 9. Имунохистохемијско бојење CD68 маркера у ткиву јетре C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја.** Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака ткива јетре обојених имунохистохемијском техником. (увеличање x40, размера=50µm. Графички је приказана средња вредност броја CD68 позитивних ћелија по видном пољу. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \* p<0.05, \*\* p<0.01

#### 4.1.7. Фиброза јетре код мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c

Фиброза јетре, иако није неопходна за постављање клиничке дијагнозе стеатохепатитиса, корелира са прогресијом болести и њеним компликацијама. У почетној фази стеатофиброза се манифестује перивенуларним депоновањем колагена које се шири дуж синусоида јетре. Акумулација колагена се првенствено одвија у Дисеевим просторима, перицелуларно односно перисинусоидално (89). У почетним стадијумима фиброзни ожиљак, због своје локализације, има облик жичане мреже (“*chicken-wire fence fibrosis*”). У касним фазама болести појављује се и стеатофиброза локализована перипортално и у портним просторима. Настаје широка фиброзна септа која повезује односно “премошћава” (“*bridging fibrosis*”) васкуларне структуре јетриног паренхима, централну вену и портне просторе или портне просторе међусобно. У почетним фазама развоја стеатофиброзе, колагене нити су тешко уочљиве на хистолошким препаратима бојеним хематоксилин еозином. Стога је за верификацију и квантификовање фиброзе јетре коришћена селективна хистохемијска техника *Sirius Red* бојења помоћу које се колагена влакна боје јарко црвеном бојом, а друге структуре ткива светло жутом.

Хистопатолошка анализа ткива младих животиња старих 8 недеља је показала да се већ у овом узрасту у јетри C57Bl/6 мишева могу уочити почетни знаци стеатофиброзе. Семиквантитативна анализа је показала да је количина депонованих колагених влакана значајно већа у јетрама C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c мишеве у узрасту од 8 недеља ( $p=0.000$ ). Код C57Bl/6 мишева храњених SNOW храном током 24 недеље, јасни су били хистопатолошки знаци прогресије фиброзе. Депоновање колагена је било претежно перисинусоидално и перицелуларно са јасним знацима настанка *chicken-wire fence* фиброзе. Код BALB/c мишева истог узраста и на истој дијети, осим изолованих ретких фокуса перицелуларног депоновања колагена, било је мало доказа о развоју стеатофиброзе. Семиквантитативном анализом је показано да је количина депонованих колагених влакана значајно већа у јетрама C57Bl/6 мишева ( $p=0.000$ ). C57Bl/6 мишеви храњени HFD храном показали су јасне знаке развијене фиброзе јетре. Евидентне су биле развијене фиброзне септе, локализоване интерлобуларно и интралобуларно што указује на развијену *bridging* фиброзу. Истовремено, у јетрама BALB/c мишева храњених истом дијетом, није било јасних

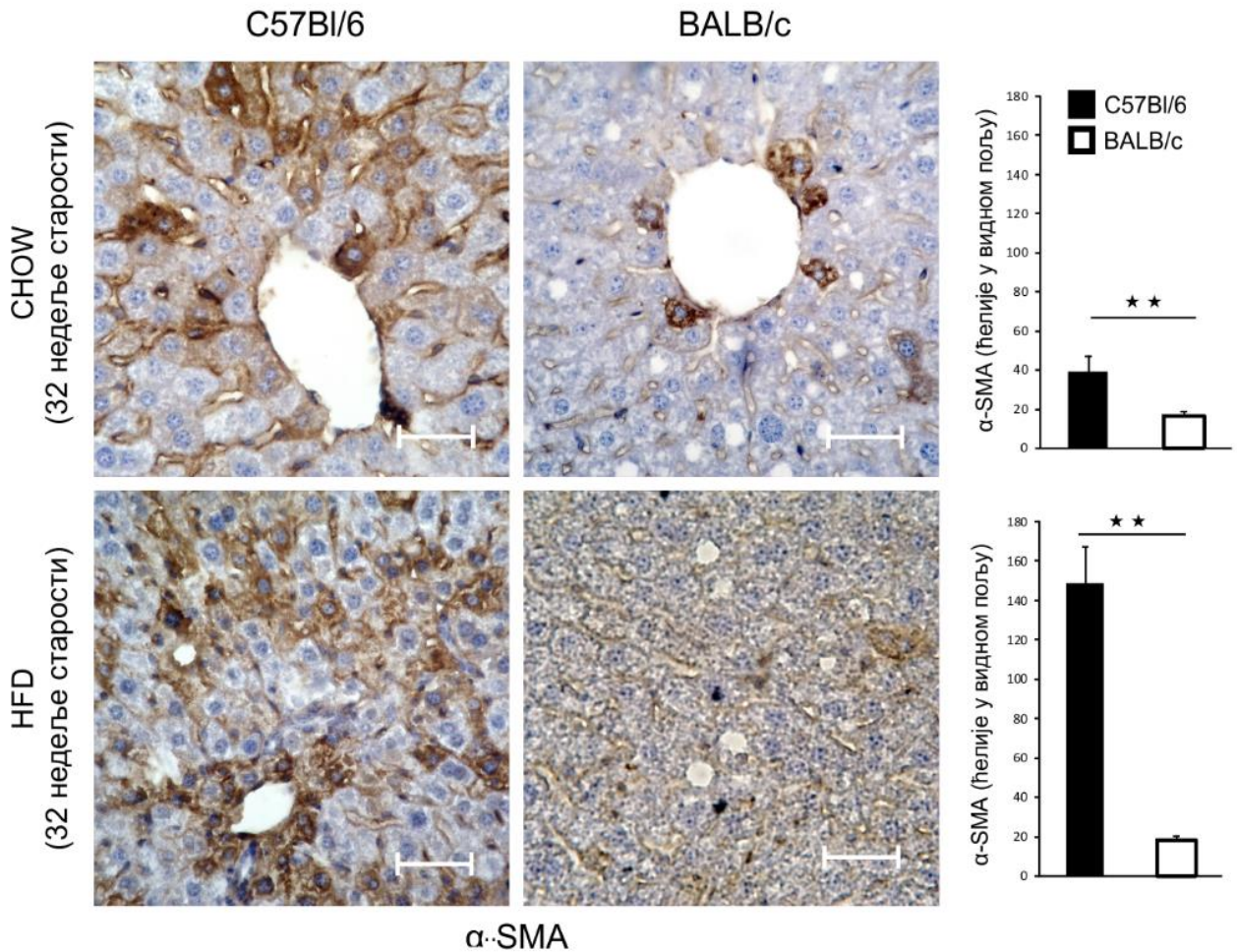
хистопатолошких знакова стеатофиброзе. Количина колагених влакана је била значајно већа у групи C57Bl/6 мишева ( $p=0.000$ ) (Слика 10).



**Слика 10. Фиброза јетре C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја.** Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака ткива јетре обојених Sirius Red техником (увеличање  $\times 10$ , размера=100 $\mu\text{m}$ ). Графички су приказане средње вредности површине обојене црвено у односу на површину видног поља. Представљени резултати два експеримента,  $n=9-10$  животиња по групи, средња вредност  $\pm$  SE, \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$

У развоју фиброзе јетре најзначајнију улогу имају резидентне хепатичне стелатне ћелије. Активирани хепатични стелатни ћелије се трансформишу у миофибробласте и одговорне су за стварање колагена и других компоненти екстрацелуларног матрикса. Активирани стелатни ћелије већ у почетку фенотипске и функционалне трансформације у миофибробласте, експримирају алфа изотип актина ( $\alpha$ -SMA, енгл. *alpha-smooth muscle actin*). Експресија  $\alpha$ -SMA маркера се сматра поузданим знаком активације стелатних ћелија и индикатор је развоја стеатофиброзе (93). Методом имунохистохемијског бојења на парафинским исечцима, испитано је присуство  $\alpha$ -SMA у ткиву јетре.

У складу са резултатима добијеним хистопатолошком и семиквантитативном анализом препарата бојених Sirius Red техником, број  $\alpha$ -SMA позитивних ћелија је био значајно већи ( $p=0.000$ ) код C57Bl/6 мишева на CHOW храни, а такође и код C57Bl/6 мишева храњених HFD храном ( $p = 0.000$ ), у поређењу са BALB/c мишевима на одговарајућем режиму исхране (Слика 11).



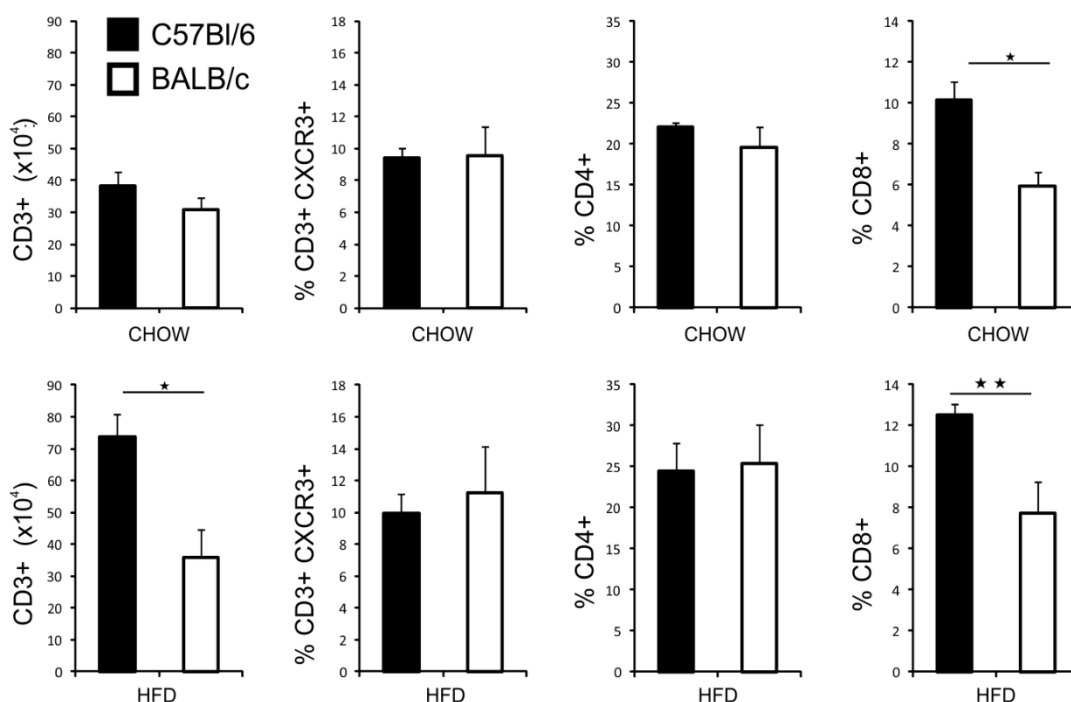
**Слика 11. Имунохистохемијско бојење  $\alpha$ -SMA маркера у ткиву јетре C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја.** Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака ткива јетре обојених имунохистохемијском техником. (увеличање  $\times 40$ , размера=50 $\mu$ m. Графички је приказана средња вредност броја  $\alpha$ -SMAпозитивних ћелија по видном пољу. Представљени резултати два експеримента,  $n=9-10$  животиња по групи, средња вредност  $\pm$  SE, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$

#### 4.1.8. Фенотипска анализа имунских ћелија у јетри мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c

Инфилтрација јетре представља основну патохистолошку компоненту која је неопходна за постављање дијагнозе неалкохолног стеатохепатитиса. Из јетре експерименталних животиња које су 24 недеље биле на посебном режиму исхране, односно на стандардном режиму, изолована је фракција непаренхимских ћелија. Природа

инфламације јетре и фенотипске и функционалне карактеристике мононуклеарних ћелија инфилтрата испитивне су методом проточне цитометрије.

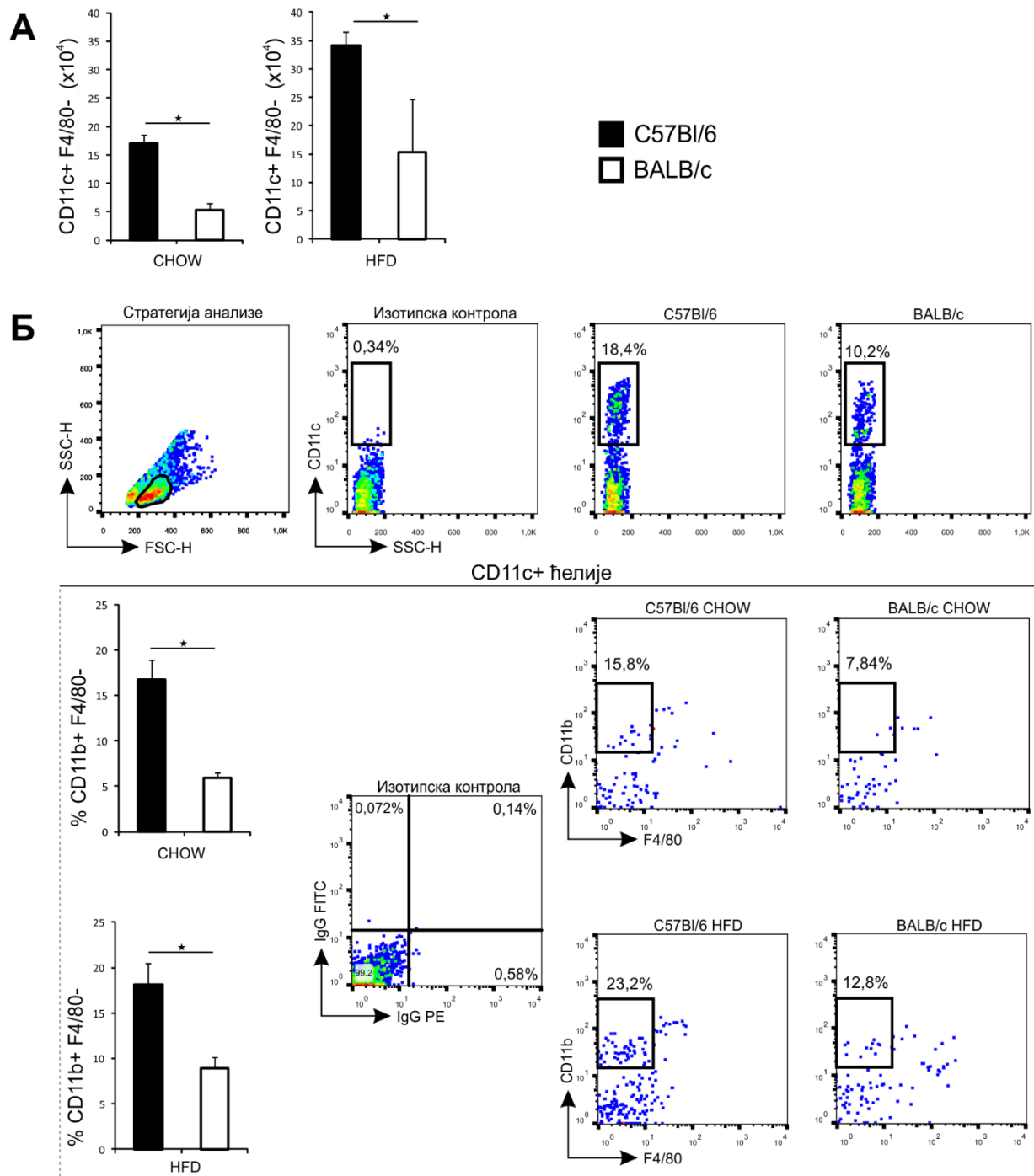
У групи мишева који су храњени CHOW храном није било разлике у апсолутном броју CD3<sup>+</sup>T лимфоцита, док је у групи храњеној HFD храном апсолутни број CD3<sup>+</sup>T лимфоцита био значајно већи у јетри C57Bl/6 мишева. Без обзира на режим исхране, није постојала разлика у проценту CD3<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> лимфоцита у јетри C57Bl/6 и BALB/c мишева. Такође, међусобним поређењем резултата на оба режима исхране, није утврђена разлика у проценту CD4<sup>+</sup>T лимфоцита. Насупрот томе, проценат CD8<sup>+</sup>T лимфоцита је био значајно већи у јетри C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c мишеве на CHOW исхрани, као и на HFD исхрани (Слика 12).



**Слика 12. Фенотипска анализа ћелија стечене имуности у јетри C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја.** Мононуклеарне ћелије изоловане из непаренхимске фракције јетре анализирани су методом проточне цитометрије. Приказан је апсолутни број CD3<sup>+</sup> лимфоцита, проценат CD3<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> Th1 лимфоцита, проценат CD4<sup>+</sup> T лимфоцита и проценат CD8<sup>+</sup> T лимфоцита. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

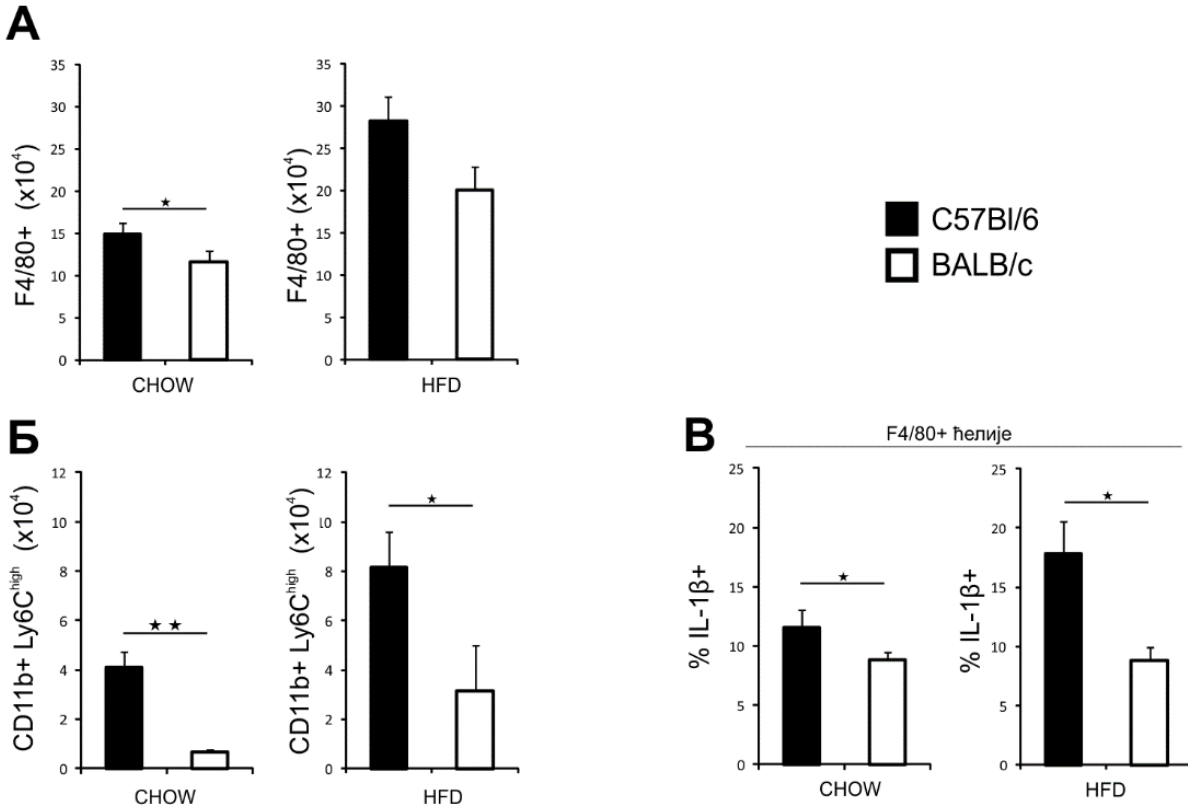


У групи мишева који су храњени CHOW храном показан је повећан апсолутни број CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> дендритичних ћелија у јетри C57Bl/6 мишева. Код мишева храњених HFD храном апсолутни број CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> дендритичних ћелија је порастао у оба соја, али је поново био већи у јетри C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c мишеве (Слика 13А). Процент CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> мијелоидних дендритичних ћелија је био значајно већи у јетри C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c мишеве у групи животиња на CHOW исхрани, као и у групи животиња на HFD исхрани (Слика 13Б).



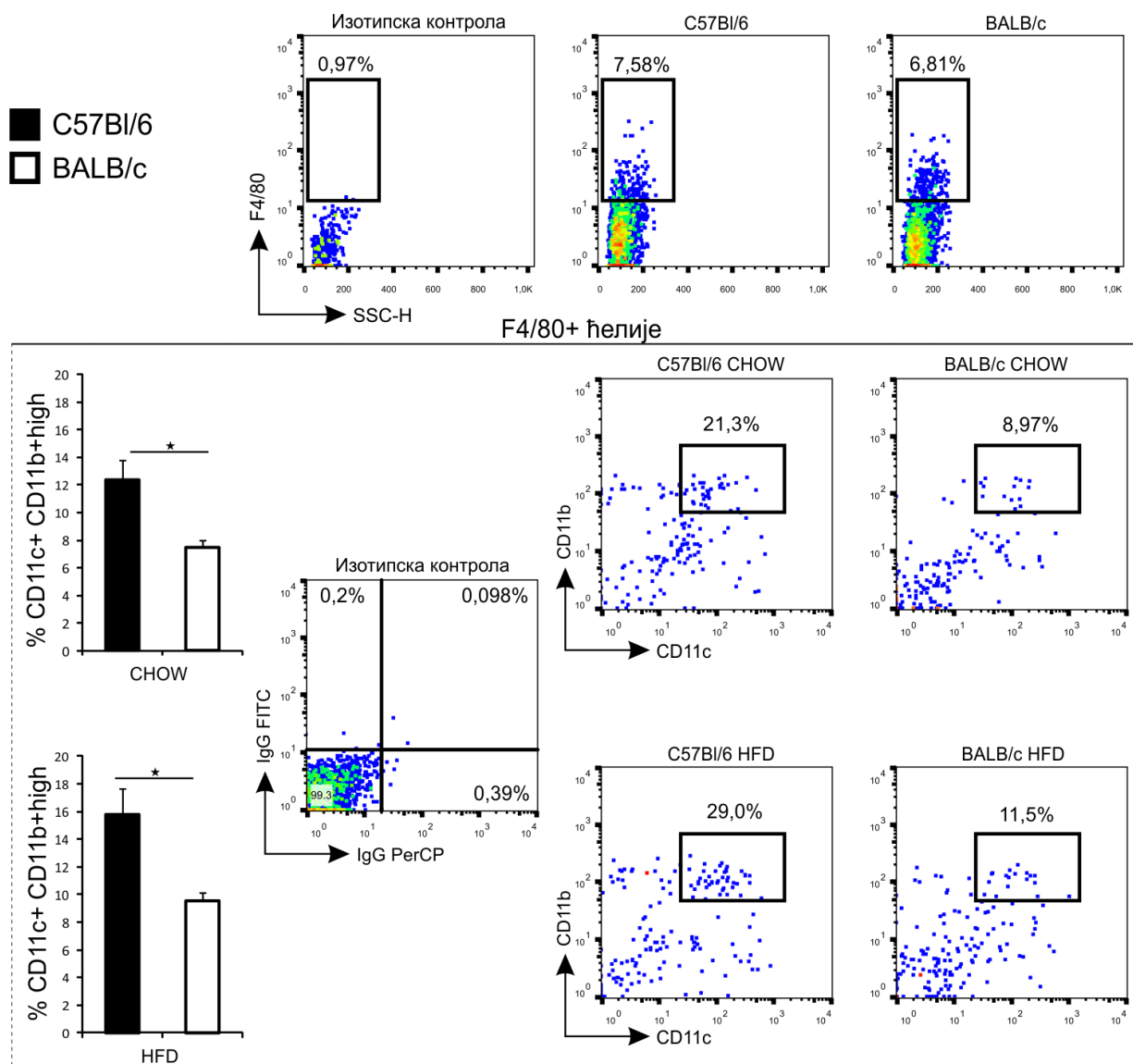
**Слика 13. Фенотипска анализа дендритичних ћелија у јетри C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја.** Мононуклеарне ћелије изоловане из непаренхимске фракције јетре анализирани су методом проточне цитометрије. (A) Приказан је апсолутни број CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> дендритичних ћелија (Б) Стратегија анализе и проценат CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> мијелоидних дендритичних ћелија са репрезентативним дот плотовима. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

У групи мишева који су храњени CHOW храном апсолутни број F4/80<sup>+</sup> макрофага је био значајно већи у јетри C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c мишеве. У оба соја мишева храњених HFD храном апсолутни број F4/80<sup>+</sup> макрофага је порастао али није било статистички значајне разлике између C57Bl/6 и BALB/c мишева (Слика 14А). Међутим, апсолутни број CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup> проинфламаторних моноцита је био значајно већи у јетри C57Bl/6 мишева у поређењу са BALB/c мишевима у групи животиња на CHOW храни. У групи мишева на HFD храни, апсолутни број CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup> проинфламаторних моноцита је порастао у оба соја, и даље је био значајно већи код C57Bl/6 мишева (Слика 14Б). У прилог повећаној инфламацији у јетри C57Bl/6 мишева, верификованој хистопатолошком анализом, иде и податак о значајно већем броју F4/80<sup>+</sup> макрофага који продукују IL-1 $\beta$  код мишева на CHOW храни. Процент F4/80<sup>+</sup> макрофага који продукују IL-1 $\beta$  је био значајно већи код C57Bl/6 мишева у поређењу са BALB/c мишевима и у групи животиња на HFD режиму исхране (Слика 14В). Интересантно је да је у оквиру појединачног соја, исхрана са високим садржајем масти изазвала пораст процентуалне заступљености ових ћелија код C57Bl/6 мишева, док код BALB/c мишева HFD режим исхране није имао такав ефекат.



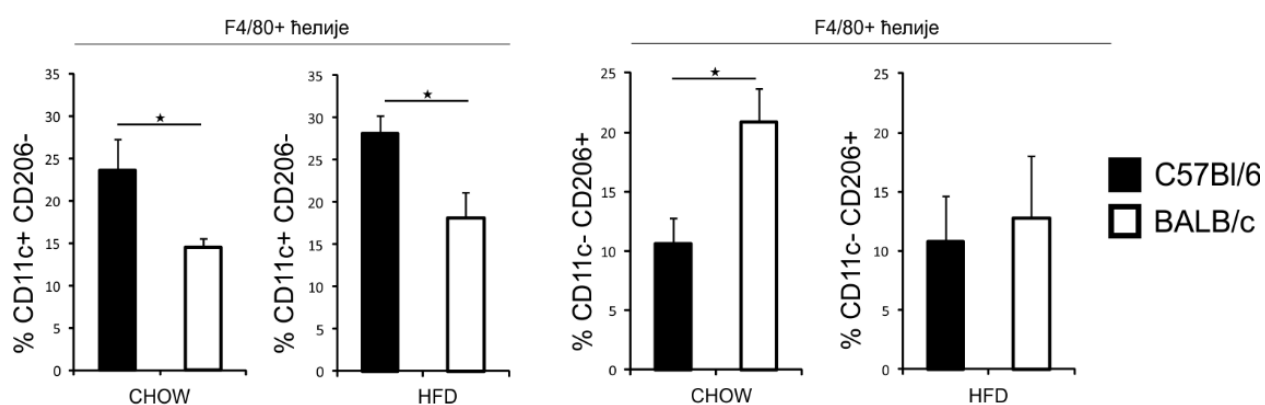
**Слика 14. Фенотипска анализа макрофага у јетри C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја.** Мононуклеарне ћелије изоловане из непаренхимске фракције јетре анализирани су методом проточне цитометрије. (А) Приказан је апсолутни број F4/80<sup>+</sup> макрофага (Б) Приказан је апсолутни број CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup> проинфламаторних моноцита (В) Приказан је апсолутни број F4/80<sup>+</sup> макрофага који продукују IL-1β. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

У прилог повећаној инфламацији у јетри C57Bl/6 мишева такође иде и податак о значајно већем проценту троструко позитивних проинфламаторних F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>high</sup> CD11c<sup>+</sup> макрофага у јетри C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c мишеве на CHOW дијети, као и на HFD дијети (Слика 15).



**Слика 15. Фенотипска анализа проинфламаторних макрофага у јетри C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја.** Мононуклеарне ћелије изоловане из непаренхимске фракције јетре анализирани су методом проточне цитометрије. Стратегија анализе и проценат троструко позитивних проинфламаторних F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>high</sup>CD11c<sup>+</sup> макрофага са репрезентативним дот плотовима. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

Процентуална заступљеност M1 макрофага, дефинисаних као  $F4/80^+CD11c^+CD206^-$  ћелије, била је значајно већа у јетри C57Bl/6 мишева на CHOW исхрани у односу на BALB/c мишеве. Ова разлика у корист C57Bl/6 мишева је уочена и у групи животиња храњених HFD храном. Насупрот томе, проценат M2 макрофага, дефинисаних као  $F4/80^+CD11c^-CD206^+$  ћелије, био је значајно мањи код C57Bl/6 мишева на CHOW дијети у односу на BALB/c сој. У групи животиња храњених HFD храном није било разлике у процентуалној заступљености  $F4/80^+CD11c^-CD206^+$  M2 макрофага између два соја мишева (Слика 16).



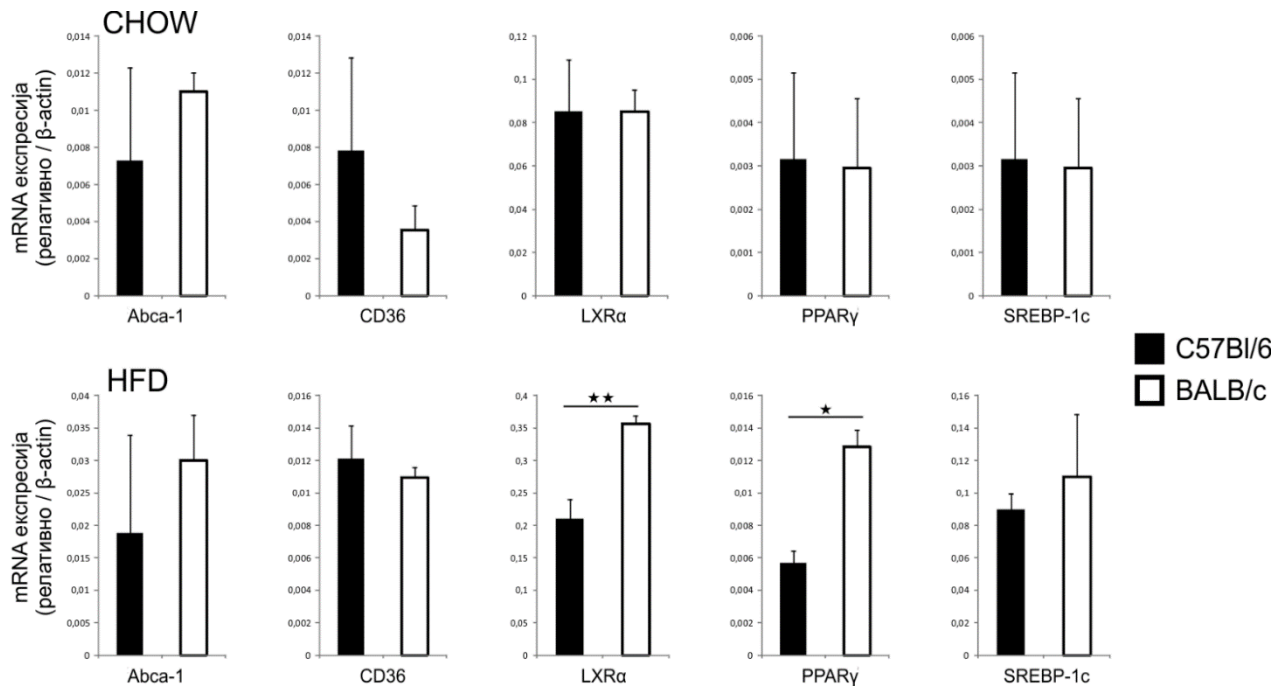
**Слика 16. Фенотипска анализа M1 и M2 макрофага у јетри C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја.** Мононуклеарне ћелије изоловане из непаренхимске фракције јетре анализирани су методом проточне цитометрије. Приказан је проценат селектованих  $F4/80^+CD11c^+CD206^-$  M1 макрофага и  $F4/80^+CD11c^-CD206^+$  M2 макрофага. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност  $\pm$  SE, \* p<0.05, \*\* p<0.01

#### 4.1.9. Експресија гена укључених у метаболизам липида и стеатофиброзу у јетри мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c

Патохистолошком анализом је утврђено да је феномен стеатозе присутан преважно код BALB/c мишева, док је код мишева C57Bl/6 соја стеатоза благог степена настала једино након исхране дијетом са високим садржајем масти (Слика 9). Стеатоза или адипозна, масна дегенерација у ћелијској патологији представља процес прекомерног акумулације липида у ћелији. Повећана акумулација липида настаје као последица оштећења

и дисбаланса у процесима синтезе и елиминације триглицерида. Сам појам стеатоза се најчешће везује за ћелије јетре, пошто је јетра централни орган у метаболизму липида. Методом ланчане реакције полимеризације у реалном времену испитивана је експресија гена у јетри који кодирају кључне молекуле укључене у метаболизам липида.

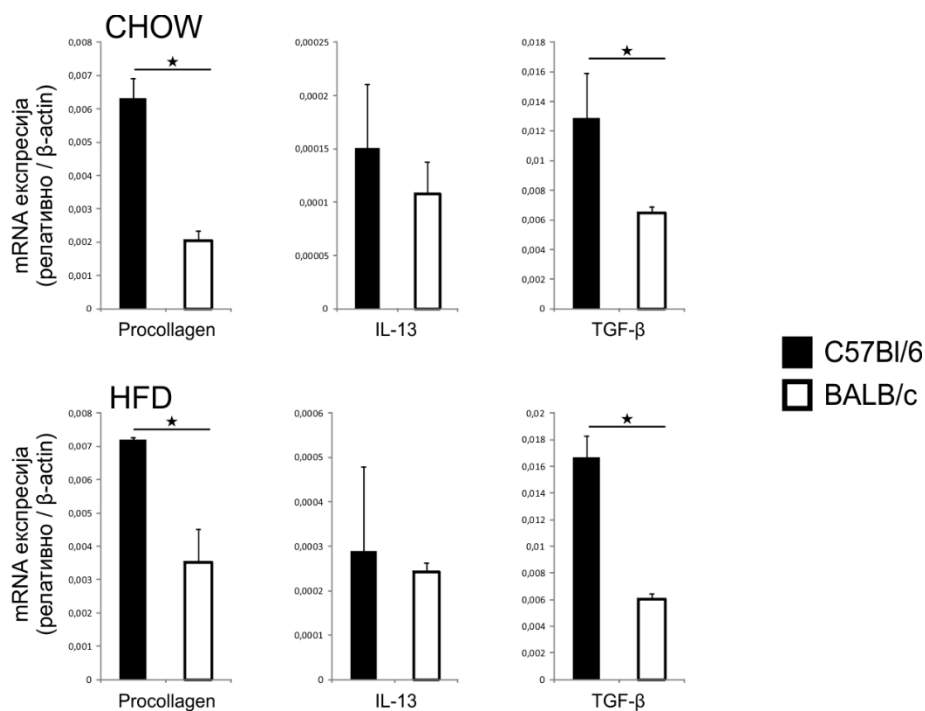
Показано је да није било разлике између два соја мишева, и на CHOW и на HFD исхрани, у експресији гена за ABCA1 (енгл. *ATP-binding cassette transporter*), транспортни протеин који представља главни регулатор хомеостазе целуларног холестерола и фосфолипида. Експресија гена за CD36/FAT (енгл. *fatty acid translocase*), молекул који је одговоран за преузимање и унос слободних масних киселина у ћелију, се такође није разликовала код два соја мишева на оба режима исхране, мада је повећање експресије било уочљиво у оба соја на HFD режиму исхране. Код мишева CHOW исхрани није било разлике у експресији гена за LXR $\alpha$  (енгл. *Liver X receptor alpha*), молекула који има контролну улогу у метаболизму холестерола и липида, али је код мишева на HFD режиму исхране експресија овог гена била значајно мања у јетри C57Bl/6 мишева. Експресија гена за PPAR $\gamma$  (енгл. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) који такође има контролну улогу у метаболизму холестерола и липида у јетри, се није разликовала код мишева на CHOW храни, док је код мишева на HFD храни експресија била значајно мања у јетри C57Bl/6 мишева. Анализирана је и експресија гена за SREBP-1c (енгл. *sterol regulatory element-binding protein 1*), молекул чију експресију регулише инсулин и који је одговоран за регулацију метаболизма глукозе и продукцију масних киселина и липида, и није уочена разлику између два соја мишева на оба режима исхране (Слика 17).



**Слика 17. Експресија гена укључених у метаболизам липида у јетри C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја.** Методом ланчане реакције полимеризације у реалном времену испитали смо улогу гена важних у метаболизму липида у јетри. Приказана је релативна експресија mRNA у односу на β-актин. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

Методом ланчане реакције полимеризације у реалном времену је такође испитивана експресија гена који кодирају молекуле значајне за развој фиброзе у јетри. Хистопатолошким анализом је утврђено да је фиброза јетре изражена у јетри C57Bl/6 мишева, док су код BALB/c мишева знаци фиброзе одсутни, односно веома дискретни на HFD режиму исхране (Слика 10). Експресија гена за проколаген, основну јединицу чијом полимеризацијом и просторном организацијом настаје колагено влакно, је била значајно већа у јетри мишева C57Bl/6 соја у односу на BALB/c мишеве на CHOW исхрани. Ова разлика је показана и у јетри животиња на HFD исхрани. Интересантан је податак да није било разлике у експресији гена за IL-13 између два соја мишева на оба типа исхране. Међутим, експресија гена за TGF-β, цитокина који као и IL-13 има велики значај у процесу фиброгенезе, је била значајно већа у јетри C57Bl/6 у односу на BALB/c мишеве на оба режима исхране (Слика 18).





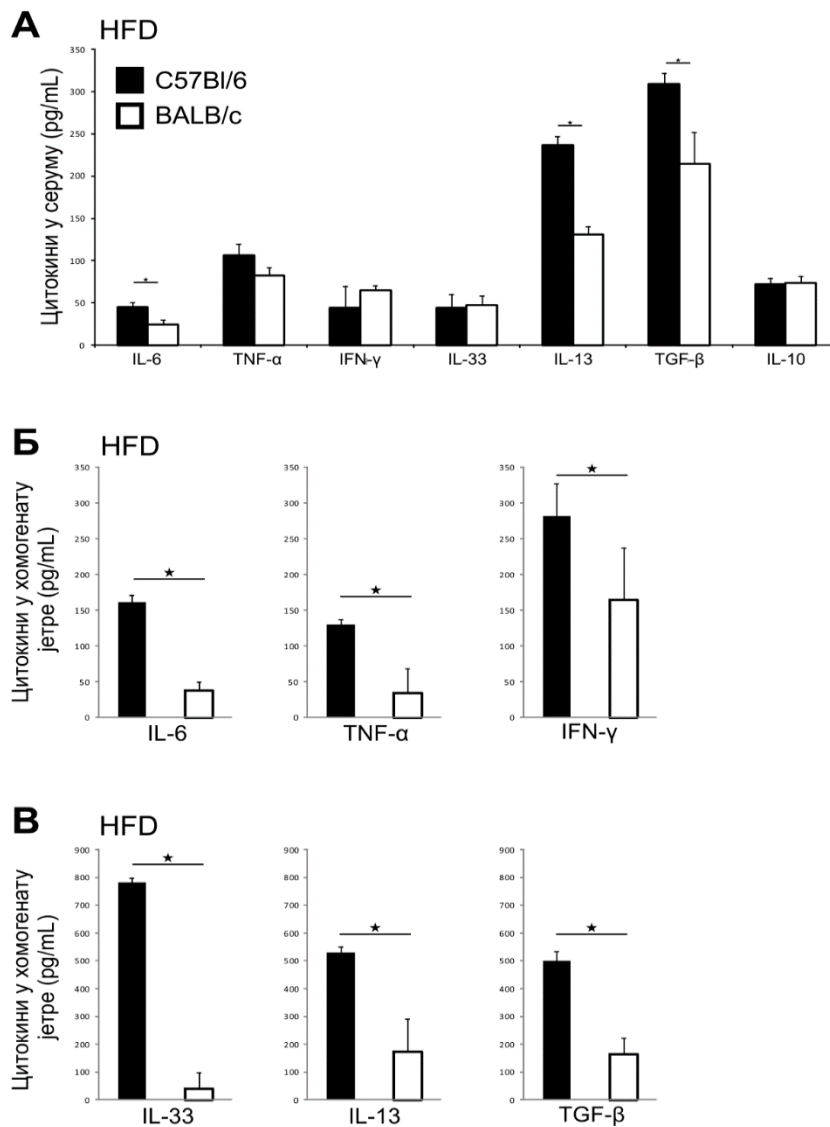
**Слика 18. Експресија гена укључених у развој фиброзе у јетри C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја.** Методом ланчане полимеризације у реалном времену испитали смо улогу гена важних у метаболизму липида у јетри. Приказана је релативна експресија mRNA у односу на β-актин. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

#### 4.1.10. Цитокински профил у серуму и јетри мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c

Параметри системске инфламације испитивани су мерењем нивоа проинфламаторних и профиброгених цитокина у серуму експерименталних животиња након 24 недеље исхране HFD храном. Параметри ткивне инфламације испитивани су мерењем концентрације проинфламаторних и профиброгених цитокина у хомогенизованом ткиву јетре након 24 недеље HFD режима исхране.

У серуму C57Bl/6 мишева на HFD исхрани, у односу на BALB/c мишеве, значајно је била већа концентрација проинфламаторног IL-6, као и профиброгених цитокина IL-13 и TGF-β. Између два соја мишева није постојала разлика у серумској концентрацији TNF-α, IFN-γ, IL-10 и IL-33 (Слика 19А). Анализа хомогенизованог ткива јетре је показала значајно већу ткивну инфламацију код мишева C57Bl/6 соја. Концентрације проинфламаторних цитокина IL-6, TNF-α и IFN-γ су биле значајно веће у јетри C57Bl/6 мишева у односу на

BALB/c мишеве (Слика 19Б). Такође су и концентрације профиброгенних цитокина IL-33, IL-13 и TGF- $\beta$ , биле значајно веће у хомогенату јетре C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c мишеве (Слика 19В).



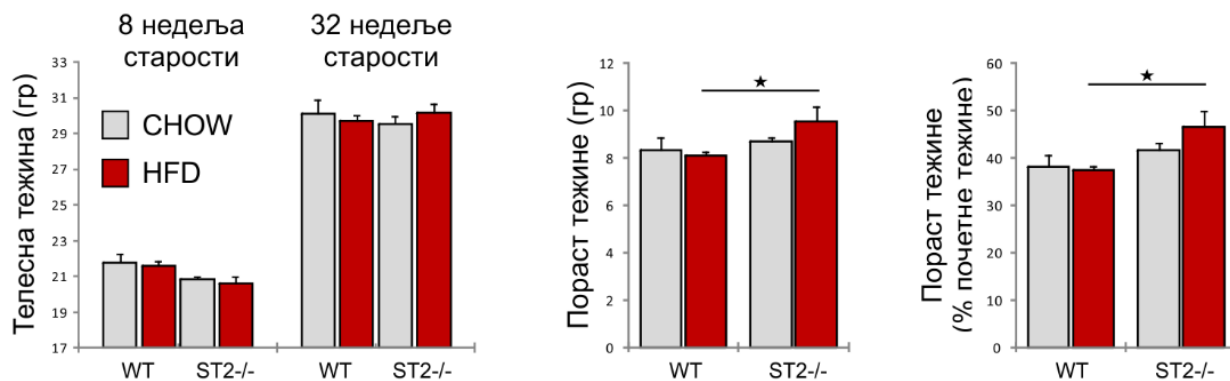
**Слика 19. Концентрација проинфламаторних и профиброгенних цитокина у серуму и јетри C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја.** Нивои цитокина у серуму (А) и хомогенату јетре (Б,В) мерени су ELISA техником. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност  $\pm$  SE, \* p<0.05, \*\* p<0.01

#### 4. 2. УЛОГА IL-33/ST2 СИГНАЛНОГ ПУТА У ИМУНОМЕТАБОЛИЧКОМ ФЕНОТИПУ BALB/c МИШЕВА СА ДОМИНАНТНИМ ТИП 2 ИМУНСКИМ ОДГОВОРОМ НА ИСХРАНИ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ: ПОРЕЂЕЊЕ ИМУНОМЕТАБОЛИЧКИХ ПАРАМЕТАРА ИЗМЕЂУ ДИВЉЕГ СОЈА (WT) И ST2 ДЕФИЦИЈЕНТНИХ (ST2<sup>-/-</sup>) BALB/c МИШЕВА

##### 4.2.1. Телесна тежина WT и ST2<sup>-/-</sup> BALB/c мишева

Значај IL-33/ST2 сигналног пута у развоју гојазности, метаболичког синдрома и његових хепатичних компликација испитиван је коришћењем експерименталног модела гојазности, односно храњењем експерименталних животиња храном са високим садржајем масти у трајању од 24 недеље. Контролне групе животиња су истовремено биле на режиму исхране стандардном лабораторијском храном, такође 24 недеље. Коришћени су ST2 дефицијентни BALB/c мишеви (ST2<sup>-/-</sup>) и BALB/c мишеви чистог соја (WT). У току трајања експеримента животиње су имале слободан, *ad libitum*, приступ храни и води. Телесна тежина животиња је контролисана периодично мерењем тежине сваког миша.

На почетку експеримента, 8 недеља стари WT и ST2<sup>-/-</sup> мишеви су имали приближно исту телесну тежину. Након 24 недеље храњења, односно у 32. недељи живота, није било значајне разлике у телесној тежини WT и ST2<sup>-/-</sup> мишева на оба режима исхране. Међутим, пораст телесне тежине изражен у грамима, као и пораст телесне тежине изражен као проценат почетне тежине су били значајно већи у групи ST2<sup>-/-</sup> мишева на HFD храни у односу на WT мишеве на истој исхрани (Слика 20).

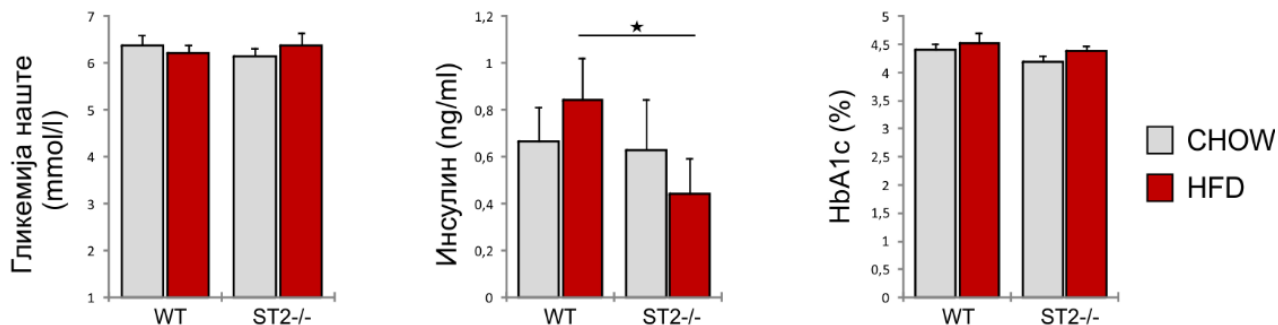


**Слика 20. Промене телесне тежине BALB/cWT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup>мишеванакон 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти.** Телесна тежина експерименталних животиња мерена је сваке 4 недеље током трајања експеримента. Телесна тежина у 8. недељи старости и 32. недељи старости. Пораст тежине у грамима у 32. недељи старости у односу на тежину у 8. недељи старости и пораст тежине изражен као % повећања у односу на тежину у 8. недељи старости, Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

#### 4.2.2. Гликорегулација код WT и ST2<sup>-/-</sup>BALB/c мишева

Током трајања експеримента праћени су параметри гликорегулације. Мишевима је периодично мерена гликемија наште након четворочасовног гладовања, а мерење је вршено у истом периоду дана. Серумска концентрација инсулина наште је мерена након 24 недеље исхране, у 32. недељи живота. Процент гликолизираног хемоглобина HbA1c је одређен након жртвовања животиња у 32. недељи старости.

Поређењем група WT мишева и ST2<sup>-/-</sup> мишева, показано је да није постојала значајна разлика у вредностима гликемије наште без обзира на режим исхране. Међутим, након 24 недеље храњења HFD храном, ST2<sup>-/-</sup> мишеви су имали значајно нижу концентрацију инсулина у серуму у поређењу са WT мишевима на истом режиму исхране. Процент гликолизираног хемоглобина, HbA1c, се није значајно разликовао између WT и ST2<sup>-/-</sup> групе мишева на оба режима исхране (Слика 21).

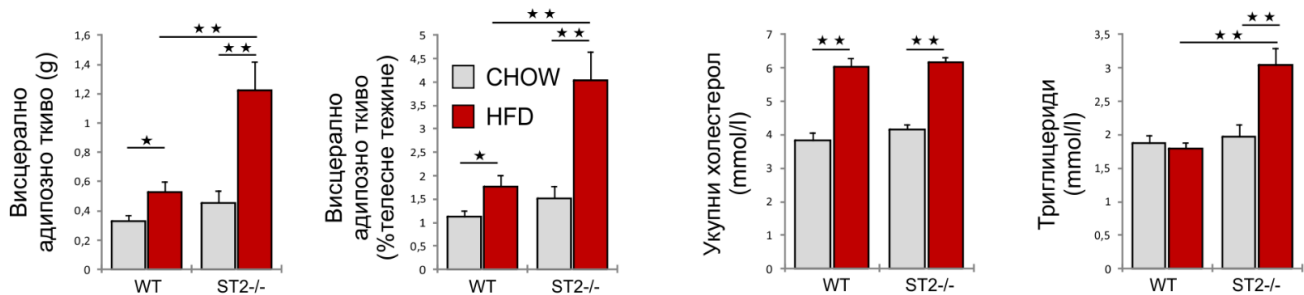


**Слика 21. Гликорегулација BALB/cWT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишеванакон 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти.** Вредности гликемије наште из пуне капи крви мерене су периодично у току 24 недеље храњења. Након жртвовања мишева, у 32. недељи старости, одређен је проценат HbA1c и концентрација инсулина у серуму. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

#### 4.2.3. Карактеристике висцералног масног ткива и липидни профил WT и ST2<sup>-/-</sup> BALB/c мишева

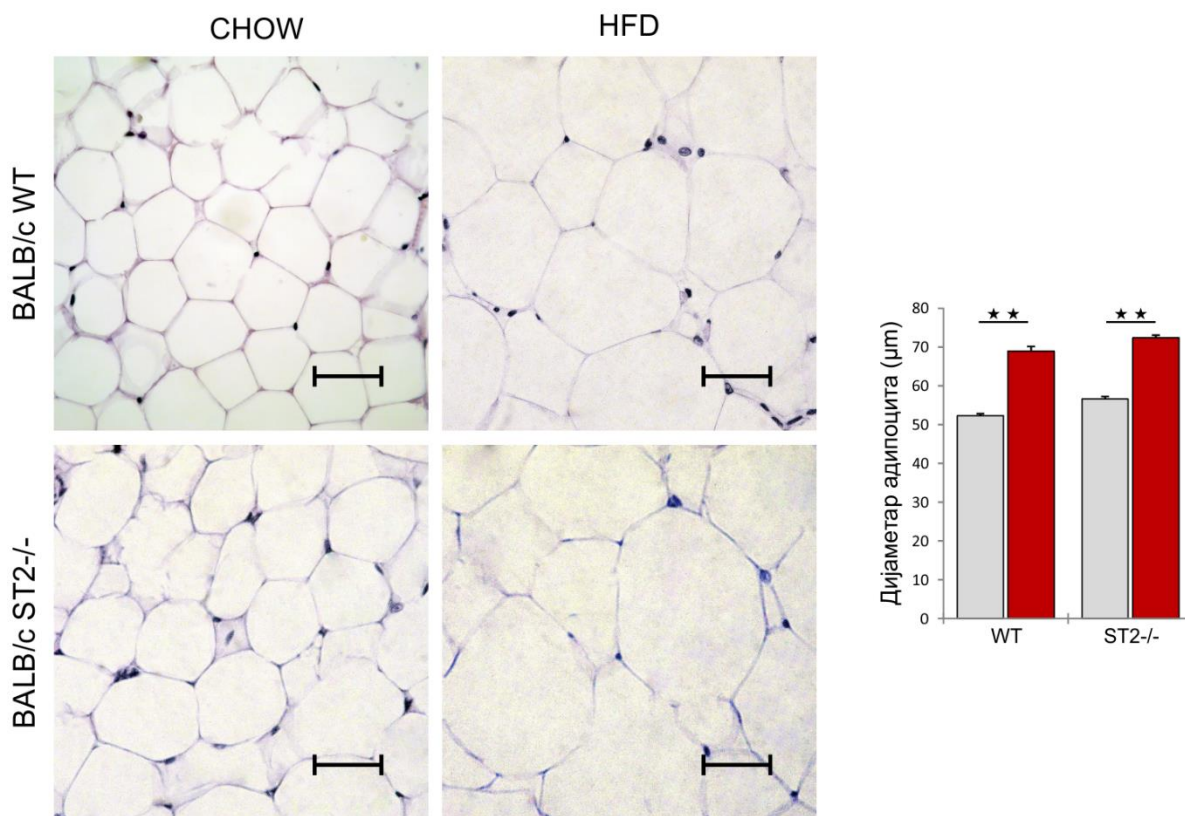
Испитивана је величина перигонадалних и периреналних депоа висцералног масног ткива код WT и ST2<sup>-/-</sup> мишева након 24 недеље храњења. Тежина висцералног масног ткива је била значајно већа код WT мишева на HFD храни у односу на WT мишеве на CHOW исхрани. Такође, тежина висцералног адипозног ткива ST2<sup>-/-</sup> мишева на HFD храни је била значајно већа у односу на ST2<sup>-/-</sup> мишеве храњене CHOW храном, као и у односу на WT мишеве храњене HFD храном. Тежина висцералног масног ткива изражена као проценат укупне телесне тежине је такође била већа код WT мишева на HFD храни у односу на WT мишеве на CHOW храни. Код ST2<sup>-/-</sup> мишева на HFD храни овај параметар је био већи у односу на ST2<sup>-/-</sup> мишеве на CHOW храни и у односу на WT мишеве на HFD храни. Концентрација укупног холестерола у серуму је била значајно већа код WT мишева на HFD храни у односу на WT мишеве на CHOW исхрани. Вредности укупног холестерола су биле значајно веће и код ST2<sup>-/-</sup> мишева на HFD исхрани у поређењу са ST2<sup>-/-</sup> мишевима на CHOW исхрани, али није било разлике између ST2<sup>-/-</sup> и WT мишева на оба режима исхране. Вредност

триглицерида у серуму је била значајно већа код ST2<sup>-/-</sup> мишева на HFD храни у поређењу са ST2<sup>-/-</sup> мишевима на контролној храни и у односу на WT мишеве на HFD исхрани (Слика 22).



**Слика 22. Тежина висцералног адипозног ткива и липидни профил BALB/c WT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишева након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти. Тежина висцералног адипозног ткива, проценат висцералног масног ткива у односу на телесну тежину, концентрација укупног холестерола и триглицерида у серуму. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01**

Испитиване су такође и микроморфолошке карактеристике висцералног адипозног ткива мерењем величине адипоцита на парафинским исечцима бојеним хематоксилин еозином. Дијаметар адипоцита BALB/c мишева чистог соја на HFD исхрани био је значајно већи у односу на дијаметар адипоцита мишева који су храњени CHOW храном. Адипоцити ST2<sup>-/-</sup> мишева храњених HFD храном је такође био значајно већи у односу на адипоците животиња истог генотипа које су храњене CHOW храном. Разлика у дијаметру адипоцита је била упоредива између два генотипа и међу њима није било значајне разлике (Слика 23). У висцералном масном ткиву WT животиња на HFD исхрани доминирали су знаци хипертрофије ћелија док су знаци хиперплазије били слабије присутни. У висцералном масном ткиву ST2<sup>-/-</sup> мишева храњених HFD храном, такође су доминирали хипертрофични адипоцити.



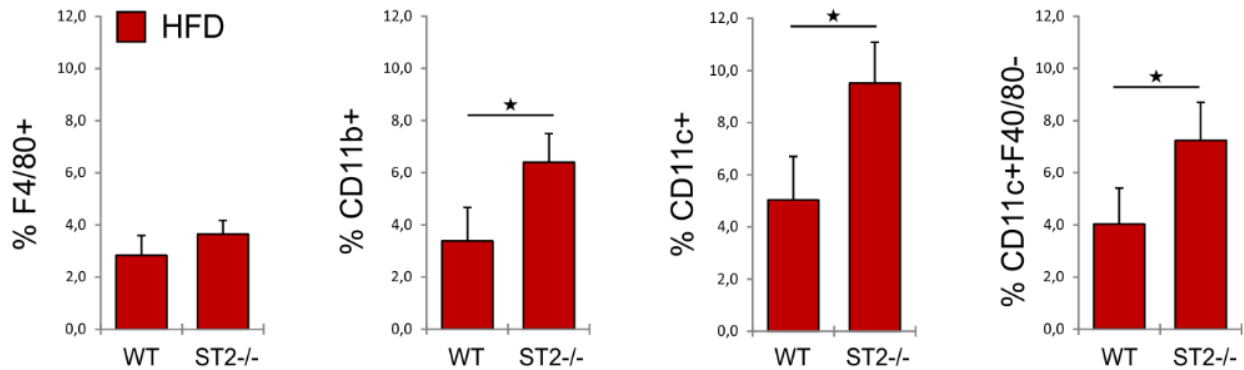
**Слика 23. Морфологија висцералног адипозног ткива BALB/c WT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишева након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти.** Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака висцералног масног ткива обојених ХЕ (хематоксилин-еозин) техником (увеличање  $\times 40$ , размера=50 $\mu\text{m}$ ). Графички су приказане средње вредности дијаметра адипоцита. Представљени резултати два експеримента,  $n=9-10$  животиња по групи, средња вредност  $\pm$  SE, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$

#### 4.2.4. Фенотипска анализа имунских ћелија у висцералном масном ткиву код WT и ST2<sup>-/-</sup> BALB/c мишева

Методом проточне цитометрије испитиване су фенотипске карактеристике имунских ћелија стромалне васкуларне фракције изоловане из висцералног масног ткива након 24 недеље специјалног режима исхране.

Испитиване су ћелије урођене имуности и показано је да нема разлике у пропорционалној заступљености F4/80<sup>+</sup> макрофага у висцералном адипозном ткиву BALB/c

мишева дивљег соја и  $ST2^{-/-}$  мишева који су храњени HFD храном. Међутим, у висцералном масном ткиву  $ST2^{-/-}$  мишева храњених HFD храном је био присутан значајно већи проценат  $CD11b^{+}$  мијелоидних ћелија,  $CD11c^{+}$  и  $CD11c^{+}F4/80^{-}$  дендритичних ћелија (Слика 24).



**Слика 24.** Фенотипска анализа имунских ћелија у висцералном масном ткиву  $BALB/cWT$  и  $BALB/c ST2^{-/-}$  мишева након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти. Мононуклеарне ћелије изоловане из стромалне васкуларне фракције висцералног адипозног ткива анализирани су методом проточне цитометрије. Процент  $F4/80^{+}$  макрофага. Приказан је проценат  $CD11b^{+}$ ,  $CD11c^{+}$  и  $CD11c^{+}F4/80^{-}$  дендритичних ћелија. Представљени резултати два експеримента,  $n=5-7$  животиња по групи, средња вредност  $\pm SE$ , \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$

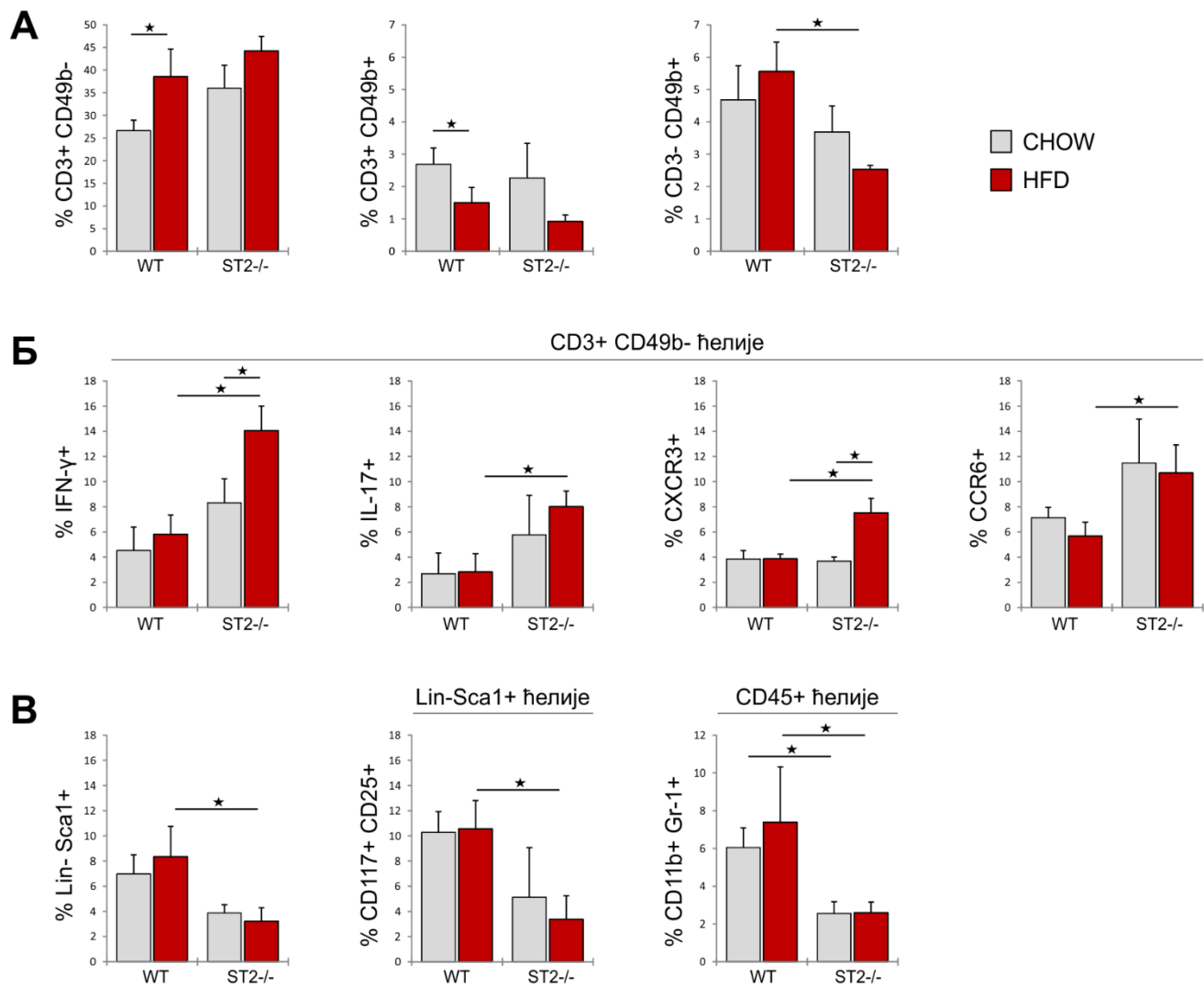
Анализом фенотипских карактеристика ћелија стечене имуности у висцералном масном ткиву, установљено је да код примене хране са високим садржајем масти постоји тенденција пораста процентуалне заступљености  $CD3^{+} CD49b^{-}$  лимфоцита у оба генотипа, при чему је само код WT мишева достигнута статистички значајна разлика. Примена HFD хране изазива смањење процентуалне заступљености  $CD3^{+} CD49b^{+} NKT$  ћелија у оба генотипа при чему је значајна разлика постигнута у групи животиња дивљег соја. Процентуална заступљеност  $CD3^{-} CD49b^{+} NK$  ћелија је била значајно већа код животиња дивљег соја храњених HFD храном у односу на  $ST2^{-/-}$  мишеве на истом режиму исхране (Слика 25A).

Између мишева дивљег соја на различитим режимима исхране није било разлике у процентуалној заступљености  $CD3^{+} CD49b^{-}$  лимфоцита који продукују  $IFN-\gamma$ . Насупрот, код  $ST2^{-/-}$  мишева храњених HFD храном проценат  $CD3^{+} CD49b^{-} IFN-\gamma^{+}$  лимфоцита је био значајно већи у односу на мишева истог генотипа на CHOW исхрани као и у поређењу са WT животињама на HFD храни. Истовремено је проценат  $CD3^{+} CD49b^{-} IL-17^{+}$  лимфоцита



био значајно већи у групи  $ST2^{-/-}$  мишева храњених HFD храном у поређењу са мишевима дивљег соја на истој исхрани. Процент  $Th1$  ( $CD3^{+}CD49^{-}CXCR3^{+}$ ) лимфоцита је био значајно већи у висцералном масном ткиву  $ST2^{-/-}$  мишева на HFD исхрани у односу на мишеве истог соја на CHOW исхрани, као и у поређењу са WT мишевима на HFD исхрани. Такође је процентуална заступљеност  $Th17$  ( $CD3^{+}CD49^{-}CCR6^{+}$ ) лимфоцита била значајно већа у висцералном масном ткиву  $ST2^{-/-}$  мишева на HFD исхрани у поређењу са WT животињама на истом режиму исхране (Слика 25Б).

Установљено је и да је проценат  $Lin^{-}Sca1^{+}$  ћелија значајно већи у висцералном масном ткиву WT животиња на HFD исхрани у односу на  $ST2^{-/-}$  мишеве на истој исхрани. У висцералном масном ткиву  $ST2^{-/-}$  животиња установљена је значајно мања процентуална заступљеност лимфоидних ћелија природне имуности (енгл. *innate lymphoid cells*),  $Lin^{-}Sca1^{+}CD117^{+}CD25^{+}$  и мијелоидних супресорских (енгл. *myeloid derived suppressor cells*)  $CD45^{+}CD11b^{+}Gr-1^{-}$  ћелија (Слика 25В).

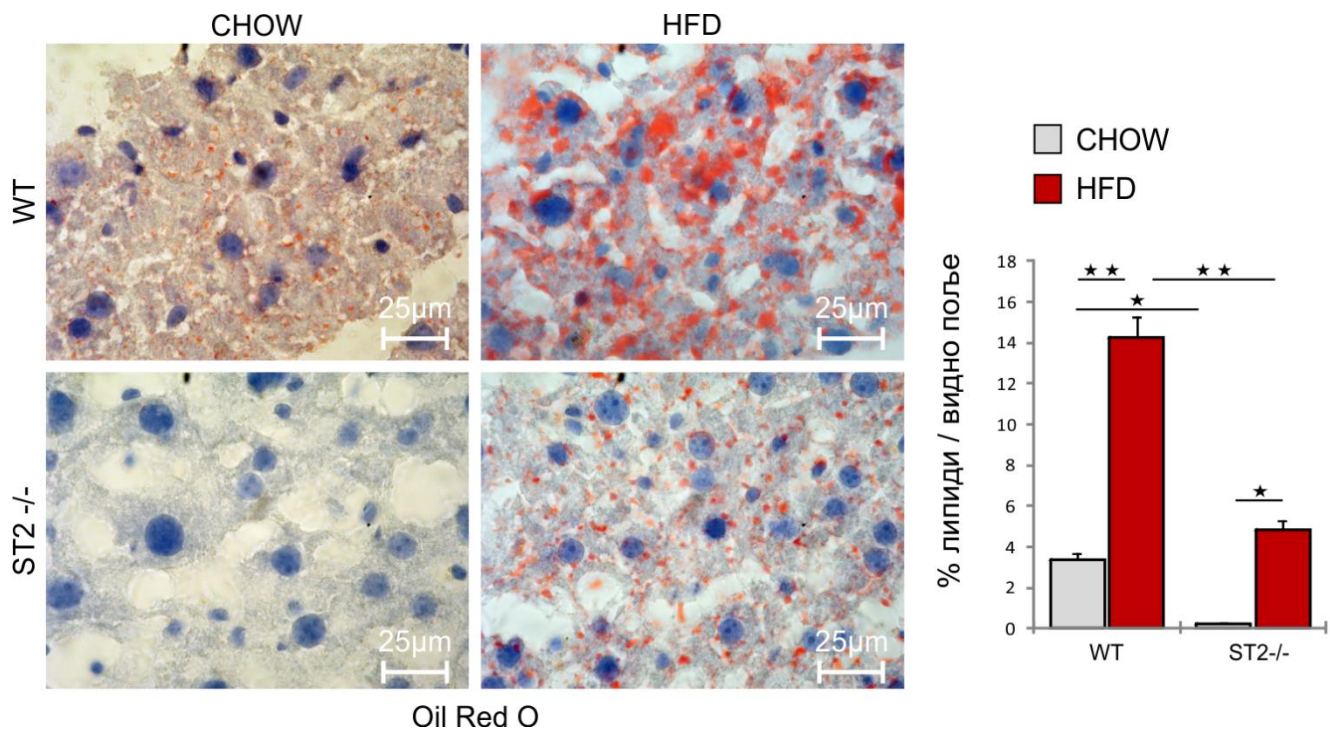


**Слика 25. Фенотипска анализа ћелија стечене имуности у висцералном масном ткиву BALB/cWT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишеванакон 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти. Мононуклеарне ћелије изоловане из стромалне васкуларне фракције висцералног адипозног ткива анализирани су методом проточне цитометрије. (А) Приказан је проценат CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup> лимфоцита, CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> NKT ћелија и CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup> NK ћелија. (Б) Приказан је проценат CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>IFN-γ<sup>+</sup> лимфоцита, CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>IL-17<sup>+</sup> лимфоцита, проценат CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>CXCR3<sup>+</sup> Th1 лимфоцита и проценат CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>CXCR3<sup>+</sup> Th17 лимфоцита. (В) Приказан је проценат Lin<sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup> ћелија, Lin<sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> и CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> ћелија. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01**

#### 4.2.5. Стеатоза јетре код WT и ST2<sup>-/-</sup>BALB/c мишева

За патохистолошко испитивање присуства масти у хепатоцитима коришћена је специфична хистохемијска техника бојења, *Oil Red O* која се заснива на коришћењу солубилног лизохрома који се раствара у липидима и пребојава их црвеном бојом. Коришћени су крио исечци ткива, а семиквантитативна анализа је извршена коришћењем *ImageJ* рачунарског програма.

Количина акумулираних масти у хепатоцитима је била значајно мања код ST2<sup>-/-</sup> мишева у поређењу са WT мишевима у групи животиња које су храњене CHOW храном. ST2<sup>-/-</sup> мишеви на CHOW исхрани у ткиву нису имали видљиве знаке стеатозе, док су WT мишеви на истој исхрани имали јасне знаке микровезикуларног депоновања липида у хепатоцитима. У групи мишева храњених HFD храном, такође је количина акумулираних липида била значајно мања код ST2<sup>-/-</sup> мишева, који су имали знаке микровезикуларне стеатозе, у односу на WT мишеве који су на овом режиму исхране развили убедљиву стеатозу са доминантном макровезикуларном компонентом. Очекивано, у оба генотипа мишева, количина акумулираних липида у јетри је била значајно мања у животиња храњених CHOW храном у односу на животиње храњене HFD храном (Слика 26).

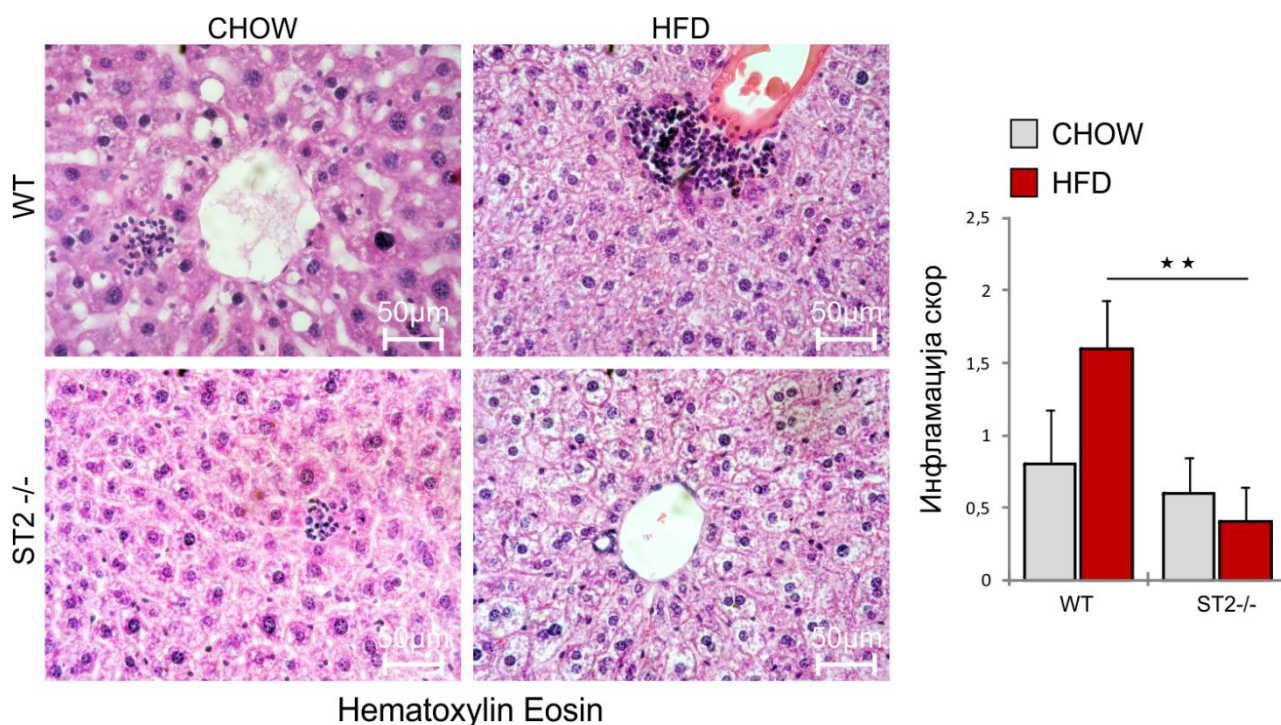


**Слика 26. Стеатоза јетре BALB/cWT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишеванакон 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти.** Репрезентативне фотомикрографије смрзнутих исечака ткива јетре обојених Oil Red O техником (увеличање x100, размера=25µm). Графички су приказане средње вредности површине обојене црвено у односу на површину видног поља. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

#### 4.2.6. Лобуларна инфилтрација јетре код WT и ST2<sup>-/-</sup> BALB/c мишева

Квантификовање лобуларног инфилтрата ткива јетре је извршено патохистолошком анализом парафинских исечака ткива обојених хематоксилин еозином. За патохистолошку квантификацију је коришћен NAFLD скор систем (177) коригован и прилагођен експерименталном анималном моделу болести. Такође је након жртвовања животиња испитана и тежина јетре као и активност јетриних ензима у серуму.

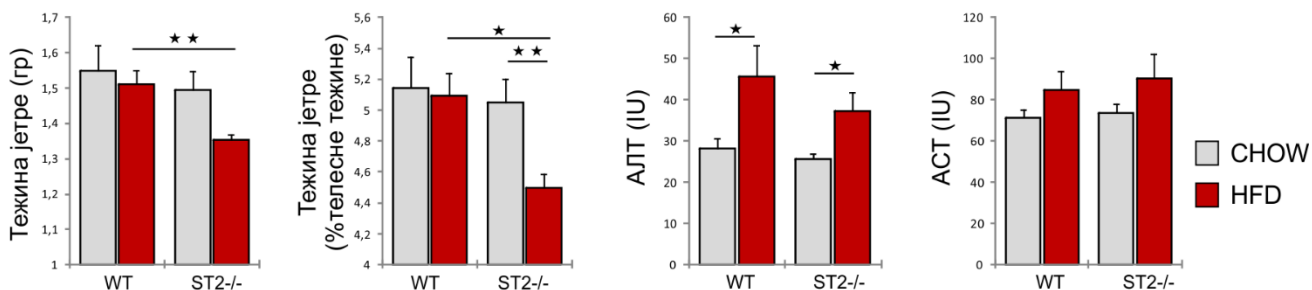
Хистопатолошким анализом јетри WT и ST2<sup>-/-</sup> мишева храњених CHOW храном показано је да не постоји разлика у инфламаторном скору. У јетрама обе групе животиња уочени су ретки лобуларни инфилтрати мононуклеарних ћелија, малог промера, који нису нарушавали архитектуру ткива. Поређењем експерименталних животиња које су 24 недеље биле на исхрани HFD храном, показан је значајно нижи инфламаторни скор код ST2<sup>-/-</sup> мишева у односу на WT мишеве (Слика 27).



**Слика 27. Инфилтрација ткива јетре мононуклеарним ћелијама код BALB/cWT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишеванакон 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти.** Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака ткива јетре обојених ХЕ (хематоксилин-еозин) техником (увеличање x40, размера=50µm. Графички су приказане средње вредности скорa инфламације. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

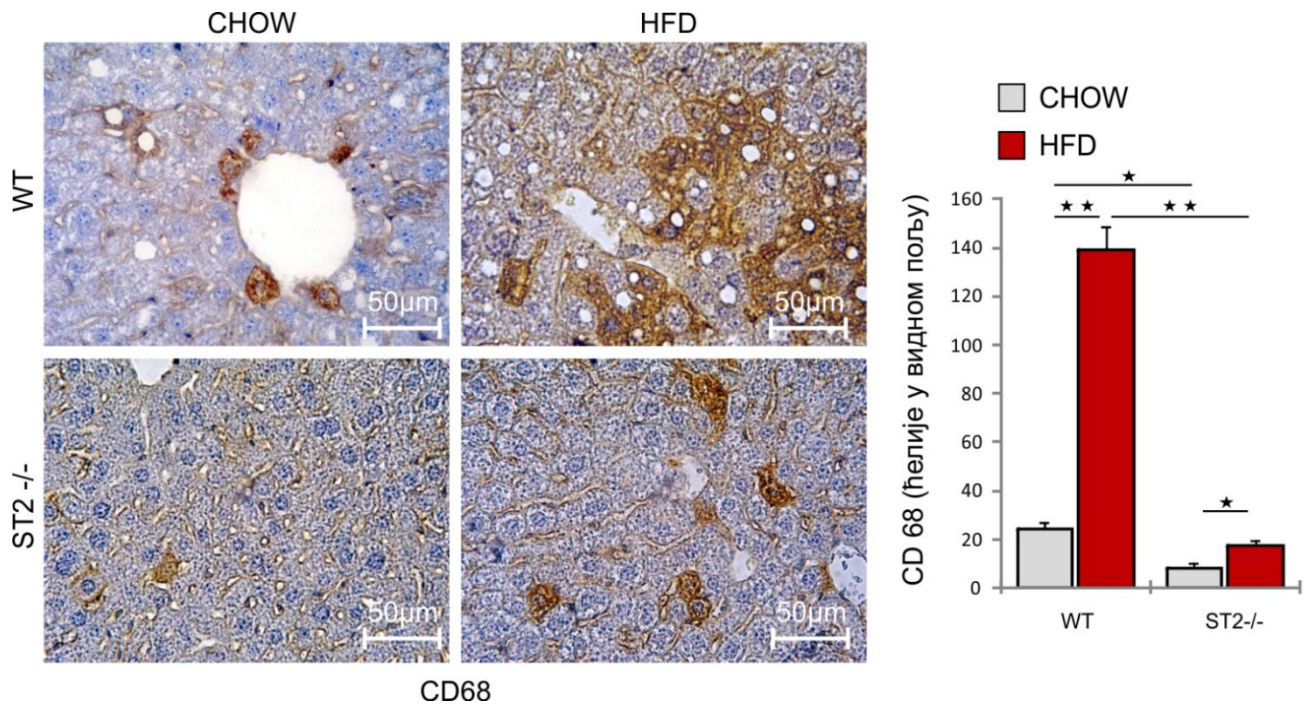
Након жртвовања животиња, у 32. недељи старости, одређена је тежина јетре. Показано је да је тежина јетре изражена у грамима значајно мања код ST2<sup>-/-</sup> мишева на HFD храни у односу на WT мишеве на истој исхрани. Тежина јетре изражена као проценат телесне тежине је такође била значајно мања код ST2<sup>-/-</sup> мишева на HFD режиму исхране у односу на WT мишеве, и значајно мања у односу на ST2<sup>-/-</sup> мишеве на контролној храни. Патохистолошка анализа инфламације јетре је допуњена биохемијском анализом

активности аспартат трансминазе (АСТ) и аланин трансминазе (АЛТ) у серуму. Показано је да је активност АЛТ била значајно већа код WT, као и код ST2<sup>-/-</sup> мишева на HFD исхрани у односу на мишеве одговарајућег генотипа на CHOW исхрани, али да није било разлике између ST2<sup>-/-</sup> и WT мишева. Није било значајне разлике у активности АСТ између два генотипа мишева на оба режима исхране (Слика 28).



**Слика 28. Промене тежине јетре и активност ензима јетре код BALB/cWT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишеванакон 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти.** Тежина јетре након 24 недеље исхране. Тежина јетре изражена као проценат телесне тежине. Активност АЛТ и АСТ у серуму мишева након 24 недеље исхране. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \* p<0.05, \*\* p<0.01

Патохистолошка анализа инфламације јетре је такође извршена имунохистохемијским бојењем CD68 маркера који је експримиран на макрофазима. Резултати су показали да је број CD68<sup>+</sup> проинфламаторних макрофага значајно мањи у јетри ST2<sup>-/-</sup> мишева на CHOW исхрани у поређењу са WT мишевима на CHOW исхрани. Такође, број CD 68<sup>+</sup> позитивних макрофага је био значајно мањи у јетри ST2<sup>-/-</sup> мишева на HFD дијети у односу на WT мишеве на истој исхрани. Показано је такође, у оба генотипа мишева, да је број CD 68<sup>+</sup> позитивних макрофага значајно већи код животиња храњених HFD храном у односу на животиње храњене CHOW храном (Слика 29).

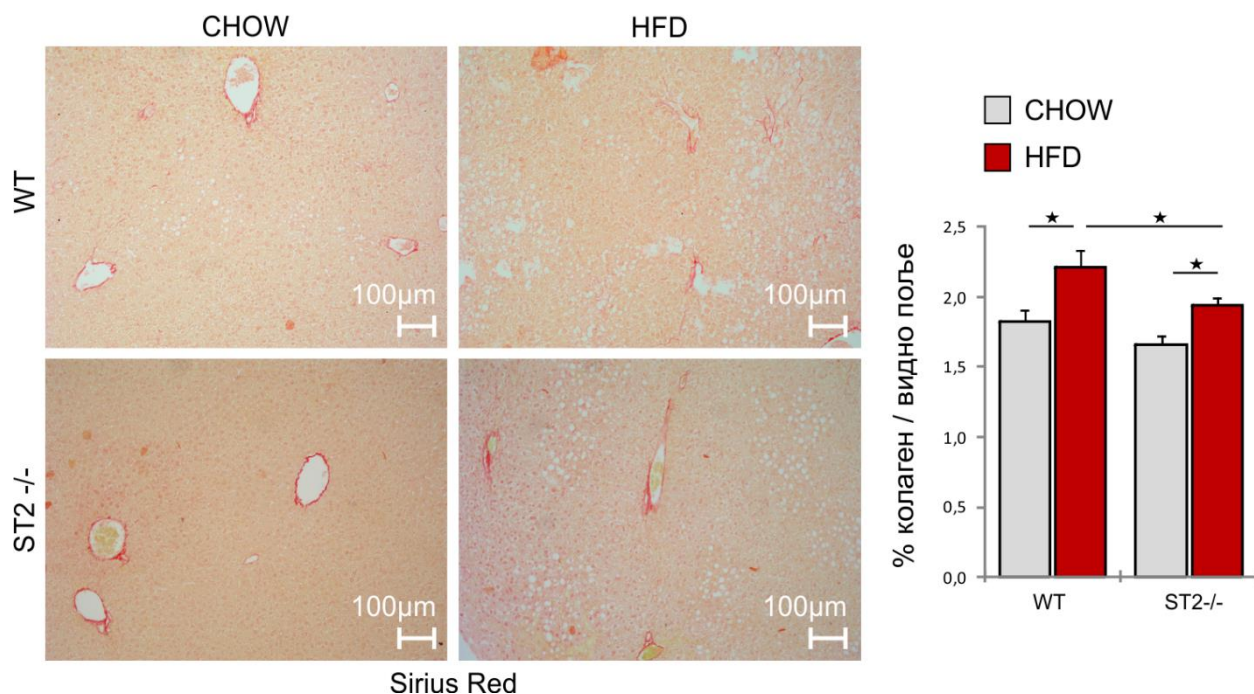


**Слика 29. Имунохистохемијско бојење CD68 маркера у ткиву јетре BALB/cWT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишева.** Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака ткива јетре обојених имунохистохемијском техником. (увеличање x40, размера=50μm. Графички је приказана средња вредност броја CD68 позитивних ћелија по видном пољу. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

#### 4.2.7. Фиброза јетре код BALB/c мишева дивљег соја и ST2<sup>-/-</sup> мишева

Испитиван је утицај аблације ST2 гена на развој фиброзе јетре у мишијем моделу гојазности изазване храном са високим садржајем масти. За хистопатолошку анализу су коришћени парафински исечци ткива јетре обојени *Sirius Red* хистохемијском техником помоћу које се селективно боје колагена влакна. Квантификовање колагена депонованог у ткиву јетре је извршено анализом фотомикрографија помоћу рачунарског програма *ImageJ*. Хистопатолошком анализом је утврђено да су знаци фиброзе у свим групама мишева били дискретни и указивали су на почетне фазе развоја фиброзе. У оба генотипа, код животиња на HFD исхрани, хистопатолошки знаци развоја фиброзе су били израженији у односу на контролне мишеве одговарајућег генотипа. Они су обухватили перисинусоидално и перичелуларно депоновање колагена са знацима настанка *chicken-wire fence* фиброзе. Утврђено је да је количина колагених влакана, у оба генотипа мишева значајно већа у јетри мишева храњених HFD храном у односу на мишеве храњене CHOW храном. Количина

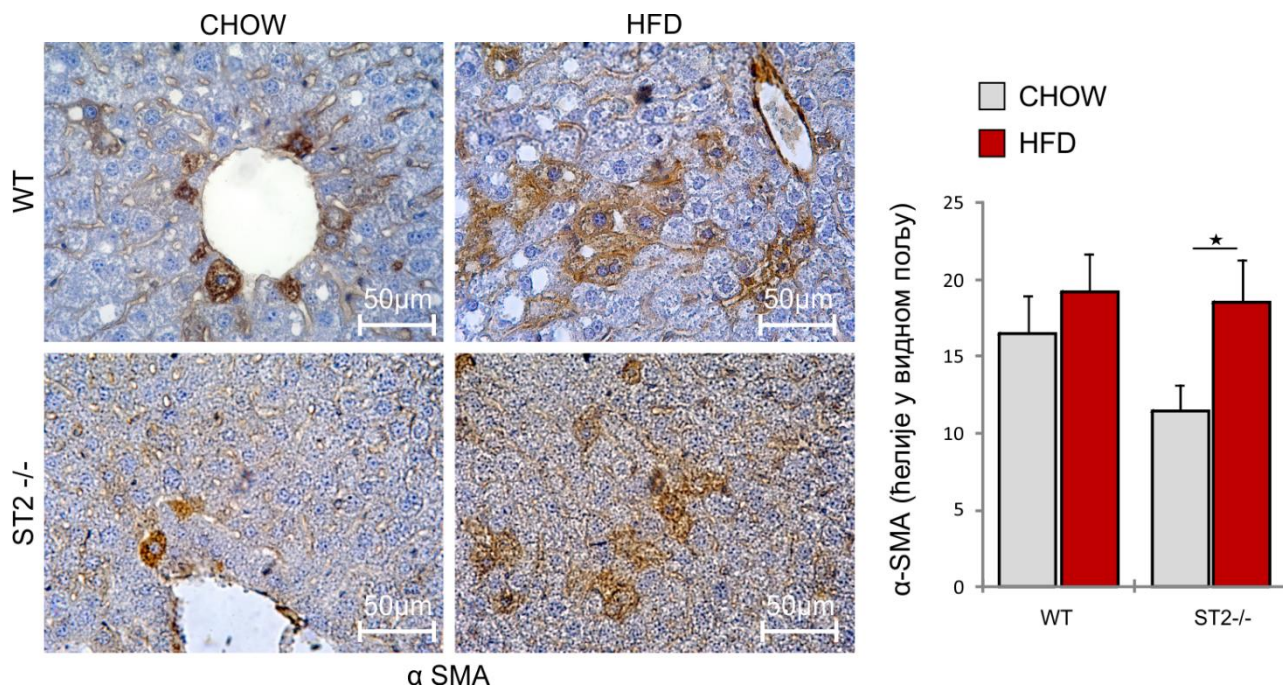
депонованог колагена у јетри  $ST2^{-/-}$  мишева који су храњени HFD храном је била значајно мања у односу на WT мишеве на истој исхрани (Слика 30).



**Слика 30. Фиброза јетре BALB/cWT и BALB/c  $ST2^{-/-}$  мишеванакон 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти.** Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака ткива јетре обојених Sirius Red техником (увеличање  $\times 10$ , размера=100µm). Графички су приказане средње вредности површине обојене црвено у односу на површину видног поља. Представљени резултати два експеримента,  $n=9-10$  животиња по групи, средња вредност  $\pm$  SE, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$

Методом имунохистохемијског бојења на парафинским исечцима, испитивано је присуство  $\alpha$ -SMA, маркера који је поуздан знак активације стелатних ћелија и индикатор развоја стеатофиброзе у ткиву јетре. Утврђено је да је број  $\alpha$ -SMA позитивних ћелија значајно већи у јетри  $ST2^{-/-}$  мишева на HFD храни у односу на  $ST2^{-/-}$  мишеве који су били на контролној храни. Није уочена разлика у броју  $\alpha$ -SMA позитивних ћелија између  $ST2^{-/-}$  мишева и WT мишева на оба режима исхране. Такође, није било разлике у броју  $\alpha$ -SMA позитивних ћелија ни између WT мишева на CHOW и HFD режиму исхране (Слика 31).





**Слика 31.** Имунохистохемијско бојење  $\alpha$ -SMA маркера у ткиву јетре BALB/cWT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишеванакон 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти. Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака ткива јетре обојених имунохистохемијском техником. (увеличање x40, размера=50 $\mu$ m. Графички је приказана средња вредност броја  $\alpha$ -SMA позитивних ћелија по видном пољу. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност  $\pm$  SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

#### 4.2.8. Фенотипска анализа имунских ћелија у јетри код WT и ST2<sup>-/-</sup> BALB/c мишева

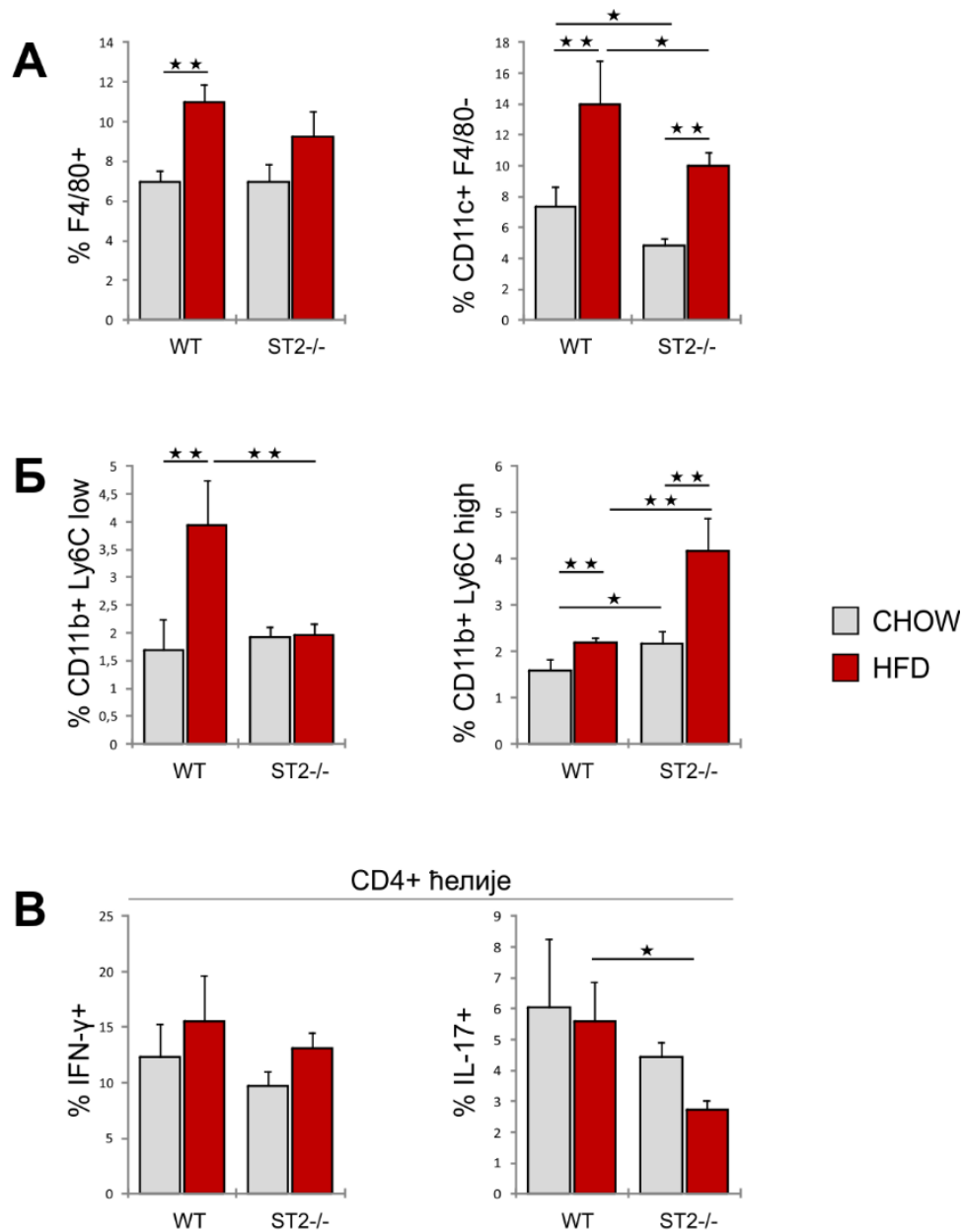
Из јетре експерименталних животиња које су 24 недеље биле на посебном режиму исхране или на стандардном режиму, изолована је обогаћена фракција непаренхимских ћелија, а затим су методом проточне цитометрије испитане фенотипске и функционалне карактеристике мононуклеарних ћелија јетре .

Испитане су популације ћелија урођене имуности, као и субпопулације Т лимфоцита. Исхрана са високим садржајем масти је изазвала пораст процентуалне заступљености F4/80<sup>+</sup> макрофага у јетри WT мишева у односу на мишове на контролној исхрани. Међутим, није било значајне разлике у проценту ових ћелија између WT и ST2<sup>-/-</sup> мишева, као ни између ST2<sup>-/-</sup> мишева на различитим режимима исхране.

Процент  $CD11c^+F4/80^-$  дендритичних ћелија је био значајно већи у оба генотипа мишева на HFD исхрани у поређењу са мишевима на стандардној исхрани. Процент  $CD11c^+F4/80^-$  дендритичних ћелија је био значајно мањи у јетри  $ST2^{-/-}$  мишева и на стандардном и на HFD режиму исхране, у поређењу са WT мишевима на одговарајућим дијеталним режимима (Слика 32А).

Процент профибротских  $CD11b^+Ly6C^{low}$  моноцита је био значајно мањи у јетри  $ST2^{-/-}$  мишева на HFD храни у односу на WT мишеве на истој исхрани. Процент  $CD11b^+Ly6C^{low}$  моноцита у јетри WT мишева на HFD режиму исхране је био већи у односу на WT мишеве на стандардној храни. Исхрана HFD храном је у оба генотипа повећала заступљеност  $CD11b^+Ly6C^{high}$  проинфламаторних моноцита. Процент  $CD11b^+Ly6C^{high}$  проинфламаторних моноцита је био знатно већи код  $ST2^{-/-}$  мишева на оба режима исхране у поређењу са одговарајућим групама WT мишева (Слика 32Б).

Добијени резултати показују да није постојала разлика између група мишева у процентуалној заступљености  $CD4^+$  Тлимфоцита који продукују IFN- $\gamma$ . Међутим, процентуална заступљеност  $CD4^+IL-17^+$  лимфоцита је била значајно мања у јетри  $ST2^{-/-}$  мишева на дијети са високим садржајем масти у односу на WT мишеве на истој исхрани (Слика 32В).

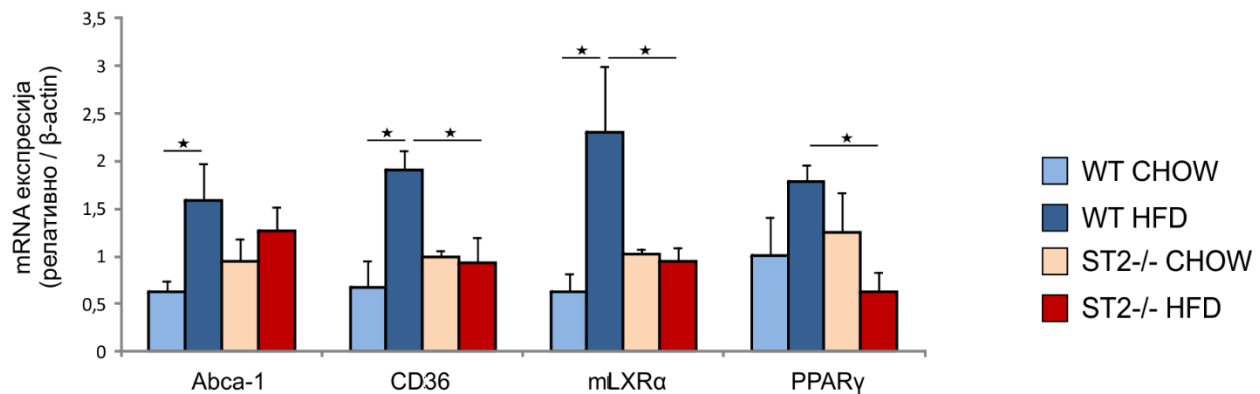


**Слика 32. Фенотипска анализа имунских ћелија у јетри BALB/cWT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишеванакон 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти. Мононуклеарне ћелије изоловане из непаренхимске фракције јетре анализирани су методом проточне цитометрије. (А) Процент F4/80<sup>+</sup> макрофага. Приказан је процент CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> дендритичних ћелија (Б) Процент CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>low</sup> моноцита и процент CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup> моноцита. (В) Процент CD4<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup> лимфоцита и CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> лимфоцита. Представљени резултати два експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01**

#### *4.2.9. Експресија гена укључених у метаболизам липида и стеатофиброзу у јетри код WT и ST2<sup>-/-</sup> BALB/c мишева*

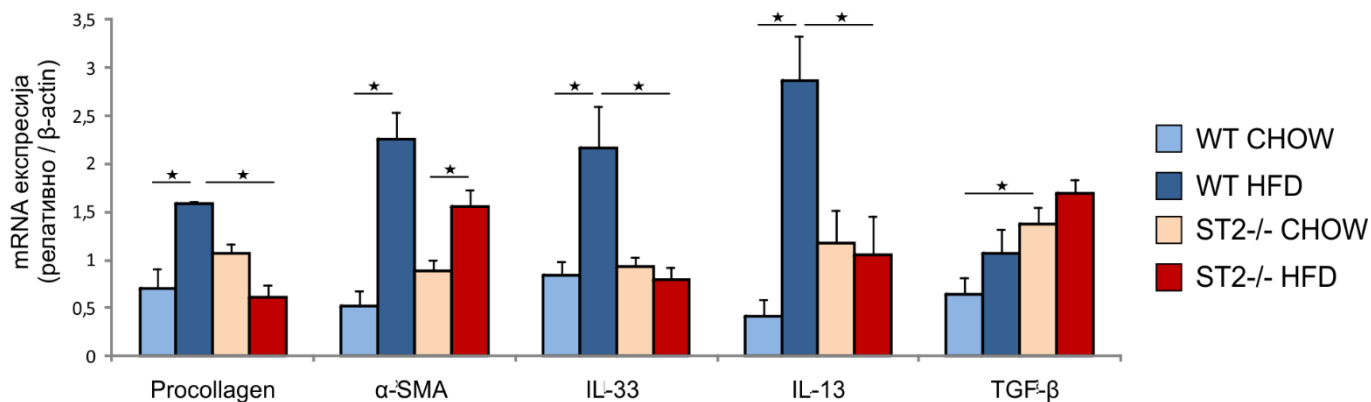
Патохистолошком анализом је утврђено да је стеатоза јетре унутар генотипа мишева израженија код животиња на HFD исхрани у поређењу са мишевима на CHOW исхрани. Такође је утврђено да је стеатоза јетре значајно мања код ST2<sup>-/-</sup> мишева у односу на WT мишеве. Пошто повећана акумулација липида у хепатоцитима настаје као последица поремећаја и нарушавања равнотеже у процесима преузимања, синтезе и елиминације триглицерида, методом ланчане полимеризације у реалном времену испитана је експресија гена у јетри који кодирају кључне молекуле укључене у метаболизам липида.

Експресија гена који кодира ABCA1, транспортни протеин који представља главни регулатор хомеостазе целуларног холестерола и фосфолипида, је била већа у јетри WT мишева на HFD храни у односу на WT мишеве на CHOW храни. У групи ST2<sup>-/-</sup> мишева није било разлике у експресији овог гена. Експресија гена за CD36/FAT молекул који је одговоран за преузимање и унос слободних масних киселина у ћелију је била значајно већа код WT мишева на HFD режиму исхране у односу на WT мишеве на стандардној исхрани, као и у односу на ST2<sup>-/-</sup> мишеве на HFD исхрани. Експресија гена за LXR $\alpha$ , молекул који има регулаторну улогу у метаболизму холестерола и липида, је такође била значајно већа у јетри WT мишева на HFD храни у односу на ST2<sup>-/-</sup> мишеве на истој исхрани и у односу на WT мишеве на CHOW исхрани. Ген који кодира PPAR $\gamma$ , који такође има контролну улогу у метаболизму холестерола и липида у јетри, је значајно више експримиран у јетри WT мишева на HFD исхрани у поређењу са ST2<sup>-/-</sup> мишевима на истом режиму исхране (Слика 33).



**Слика 33.** Експресија гена укључених у метаболизам липида у јетри *BALB/c*WT и *BALB/c* ST2<sup>-/-</sup> мишеванакон 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти. Методом ланчане полимеризације у реалном времену испитали смо експресију гена важних у метаболизму липида у јетри. Приказана је релативна експресија mRNA у односу на β-актин. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

Методом ланчане полимеризације у реалном времену је испитана експресија гена који кодирају молекуле значајне за развој фиброзе у јетри. Хистопатолошким анализом је утврђено да је у оквиру оба генотипа фиброза јетре била израженија код мишева који су били на HFD исхрани у поређењу са мишевима на CHOW исхрани. Такође је показано да је количина депонованог колагена значајно мања код ST2<sup>-/-</sup> мишева на HFD режиму исхране у односу на WT мишеве на истом дијеталном режиму. Експресија гена за проколаген, основну јединицу грађе колагеног влакна, је била значајно већа у јетри WT мишева на HFD исхрани у поређењу са ST2<sup>-/-</sup> мишевима на истој исхрани као и WT мишевима на CHOW исхрани. Експресија гена за α-SMA, маркер активираних хепатичних стелатних ћелија, је била значајно већа код мишева оба генотипа на HFD исхрани у поређењу са мишевима на контролној исхрани, али није било разлике између два генотипа мишева. Експресија гена за профиброгене цитокине, IL-13 и IL-33 је била значајно већа у јетри WT мишева на HFD исхрани у поређењу са ST2<sup>-/-</sup> мишевима на истом режиму исхране, као и у поређењу са WT мишевима на CHOW исхрани. Повећана експресија гена за профиброгени TGF-β је показана у јетри ST2<sup>-/-</sup> мишева на CHOW исхрани у односу на WT мишеве на истом дијеталном режиму, док није било разлике у експресији овог гена између два генотипа мишева на HFD исхрани (Слика 34).

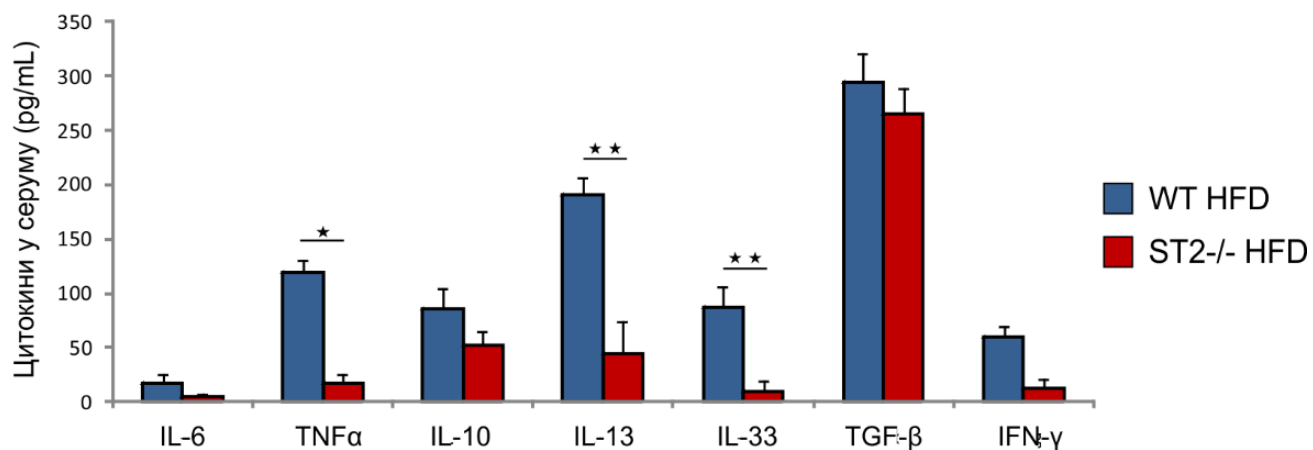


**Слика 34.** Експресија гена укључених у развој фиброзе у јетри BALB/cWT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишеванакон 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти. Методом ланчане полимеризације у реалном времену испитали смо експресију гена важних за развој фиброзе у јетри. Приказана је релативна експресија mRNA у односу на β-актин. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

#### 4.2.10. Цитокински профил у серуму и јетри WT и ST2<sup>-/-</sup> BALB/c мишева

Параметри системске инфламације испитивани су мерењем нивоа проинфламаторних и антиинфламаторних цитокина у серуму, а одређене су и серумске концентрације профиброгених цитокина у експерименталних животиња након 24 недеље исхране HFD храном.

У серуму мишева оба генотипа није постојала разлика у нивоу проинфламаторног IL-6, као ни у концентрацијама IFN-γ и IL-10. Међутим, серумска концентрација TNF-α је била значајно нижа код ST2<sup>-/-</sup> мишева на HFD исхрани у односу на WT мишеве. Такође су и концентрације профиброгених цитокина IL-33 и IL-13, биле значајно ниже у серуму ST2<sup>-/-</sup> мишева у односу на WT мишеве на HFD исхрани. Концентрација профиброгеног TGF-β се није разликовала између два генотипа мишева (Слика 35).



**Слика 35. Концентрација проинфламаторних и профиброгенних цитокина у серуму BALB/cWT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишеванакон 24 недеље на исхрани са високим садржајем масти. Нивои цитокина у серуму мерени су ELISA техником. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01**

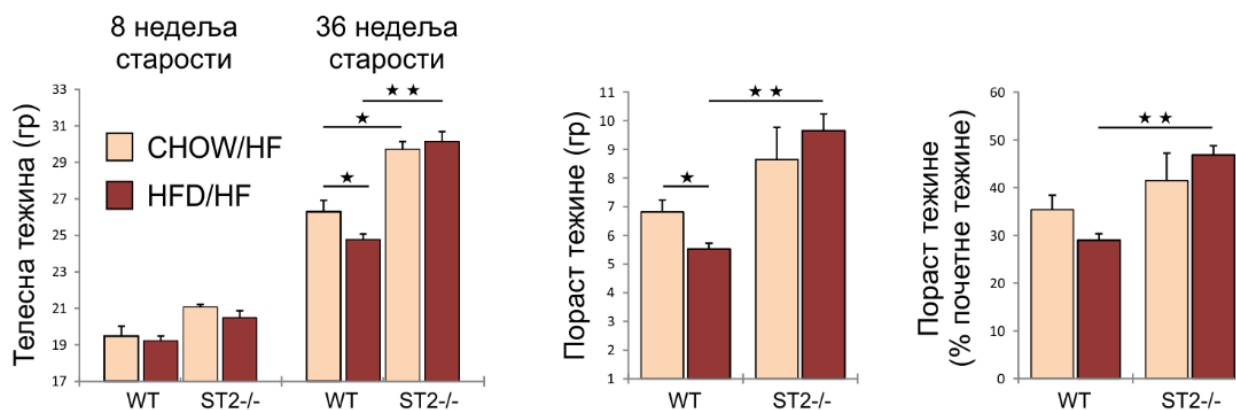
#### 4. 3. УЛОГА IL-33/ST2 СИГНАЛНОГ ПУТА У ИМУНОМЕТАБОЛИЧКОМ ФЕНОТИПУ BALB/c МИШЕВА СА ДОМИНАНТНИМ ТИП 2 ИМУНСКИМ ОДГОВОРОМ НА ИСХРАНИ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ И ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ ФРУКТОЗЕ: ПОРЕЂЕЊЕ ИМУНОМЕТАБОЛИЧКИХ ПАРАМЕТАРА У ДИВЉЕГ СОЈА (WT) И ST2 ДЕФИЦИЈЕНТНИХ (ST2<sup>-/-</sup>) BALB/c МИШЕВА

##### 4.3.1. Телесна тежина WT и ST2<sup>-/-</sup>BALB/c мишева

Значај IL-33/ST2 сигналног пута у развоју гојазности, метаболичког синдрома и његових хепатичних манифестација је такође испитивана коришћењем експерименталног модел гојазности који се заснива на примени комбиноване исхране која садржи висок садржај масти (60% kcal из масти) и висок садржај фруктозе (30% раствор фруктозе). Животиње BALB/c дивљег соја и ST2<sup>-/-</sup> на BALB/c основи су храњене 24 недеље стандардном CHOW храном и HFD храном са високим садржајем масти. Након 24 недеље, свим групама животиња је на основну дијету, као замена за воду дат 30% раствор фруктозе *ad libitum*. Животиње су биле 4 недеље на комбинованом режиму исхране, након чега су жртвоване.

Након 28 недеља исхране, у 36. недељи старости, мишеви чистог соја на HFD/HF (енгл. *High fat diet/high fructose diet*) су имали значајно мању телесну тежину у односу на мишеве истог генотипа који су били на CHOW/HF (енгл. *Chow/high fructose diet*) исхрани. ST2<sup>-/-</sup> мишеви на оба типа исхране су имали значајно већу телесну тежину у поређењу са мишевима чистог соја на одговарајућем типу исхране. Пораст телесне тежине изражен као проценат почетне телесне тежине је био значајно већи код ST2<sup>-/-</sup> мишева на HFD/HF исхрани у односу на WT мишеве на истој исхрани (Слика 36).





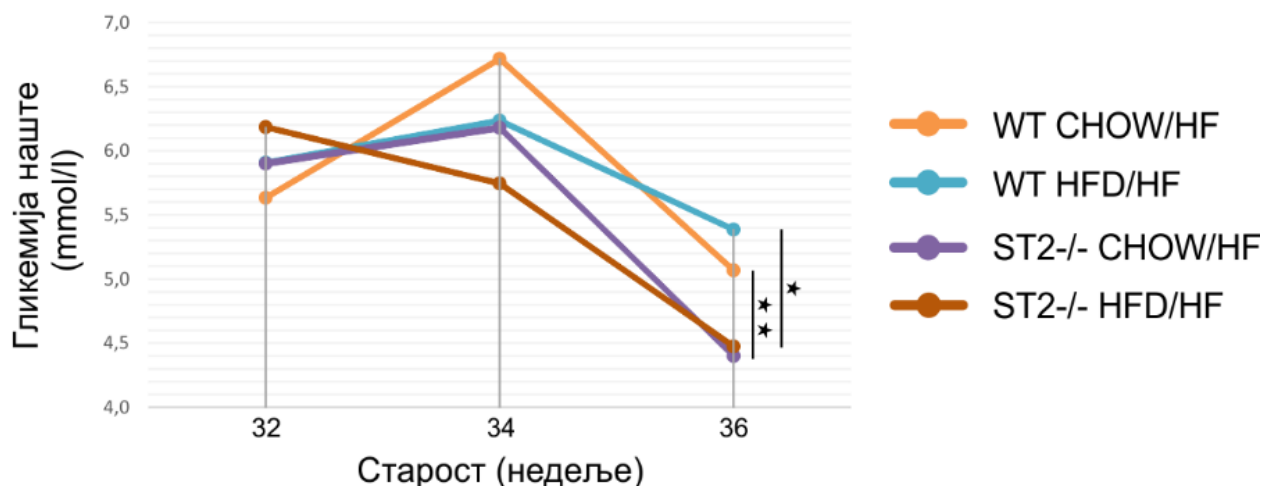
**Слика 36. Промене телесне тежине BALB/cWT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишеванакон 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти и 4 недеље на комбинованој исхрани. Телесна тежина у 8. недељи старости и 36. недељи старости, односно након 28 недеља исхране. Пораст тежине у грамама у 36. недељи старости у односу на тежину у 8. недељи старости и пораст тежине изражен као % повећања у односу на тежину у 8. недељи старости, Представљени резултати једног експеримента, n=5-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01**

#### 4.3.2. Гликорегулација код WT и ST2<sup>-/-</sup> BALB/c мишева на комбинованом режиму исхране

У току трајања експеримента праћени су параметри гликорегулације. Мишевима је периодично мерена гликемија наште након четворочасовног гладовања. Пошто су мишеви од 24. до 28. недеље храњени комбинованом исхраном која је садржала и 30% раствор фруктозе, четири сата пре мерења гликемије мишевима је склоњена и храна и вода.

У 32. недељи старости, односно након 24 недеље исхране није било значајних разлика у вредностима гликемије у свим експерименталним групама. У 34. недељи старости, након две недеље исхране са комбинованом CHOW/HF односно HFD/HF дијетом, у свим експерименталним групама је уочен благи пораст вредности гликемије изузев у групи ST2<sup>-/-</sup> мишева који су храњени HFD/HF дијетом у којој је уочен незнатан пад вредности гликемије. Иако је уочен поменути тренд, није било значајне разлике у вредности између експерименталних група мишева. Тенденција опадања вредности гликемије је показана у свим групама и у 36. недељи старости, након 24 недеље исхране и додатне 4 недеље исхране комбинованом дијетом. На крају експеримента, у 36. недељи старости, вредности гликемије

у групи  $ST2^{-/-}$  мишева на HFD/HF исхрани су биле значајно мање у поређењу са WT мишевима на истој исхрани. Такође, вредности гликемије у групи  $ST2^{-/-}$  мишева на CHOW/HF исхрани су биле значајно мање у односу на вредности мишева чистог соја на истом режиму исхране (Слика 37).



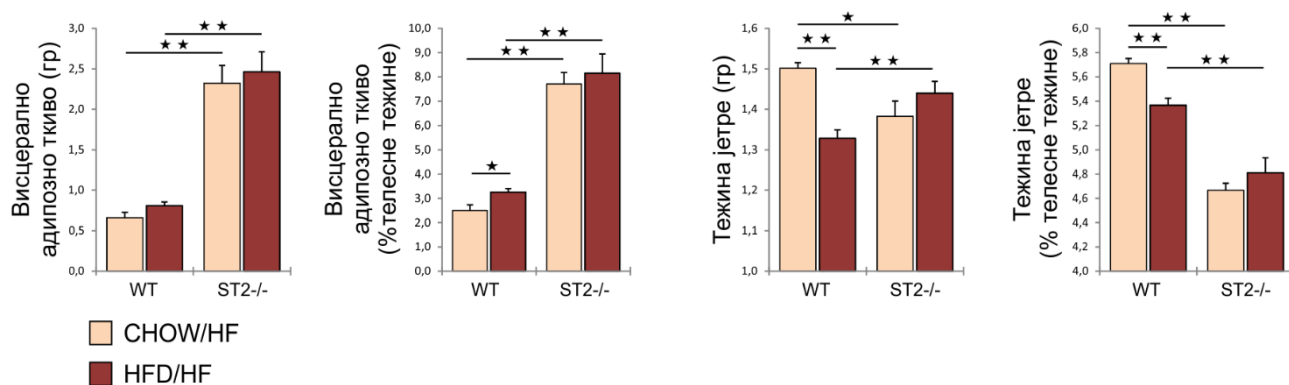
**Слика 37.** Гликорегулација BALB/c WT и BALB/c  $ST2^{-/-}$  мишева након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти и 4 недеље на комбинованој исхрани. Вредности гликемије наشته из пуне капи крви мерене су периодично. Представљени резултати једног експеримента,  $n=5-10$  животиња по групи, средња вредност  $\pm$  SE, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$

#### 4.3.3. Карактеристике висцералног масног ткива WT и $ST2^{-/-}$ BALB/c мишева на комбинованом режиму исхране

У 36. недељи старости, након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти и 4 недеље на комбинованој исхрани испитивана је величина перигонадалних и периреналних депоа висцералног масног ткива. Примена фруктозе је у обе групе  $ST2^{-/-}$  мишева изазвала велики пораст тежине висцералног масног ткива и ове вредности су биле значајно веће у поређењу са групама мишева дивљег соја на одговарајућој исхрани. Тежина висцералног масног ткива изражена као проценат телесне тежине је такође била значајно већа код  $ST2^{-/-}$  мишева у односу на WT мишове на одговарајућој исхрани. Истовремено је и тежина висцералног масног ткива изражена као проценат телесне тежине

била значајно већа у групи WT мишева на HFD/HF исхрани у односу на WT мишеве на CHOW/HF исхрани (Слика 38).

Тежина јетре изражена у грамима је била значајно већа у групи WT мишева на CHOW/HF исхрани у поређењу са WT мишевима на HFD/HF исхрани као и у односу на ST2<sup>-/-</sup> мишеве на CHOW/HF исхрани. Такође је тежина јетре изражена у грамима била значајно мања у групи животиња чистог соја на HFD/HF исхрани у односу на ST2<sup>-/-</sup> мишеве на истом режиму храњења. Тежина јетре изражена као проценат телесне тежине је била значајно већа у групи WT мишева на CHOW/HF дијети у поређењу са WT мишевима на HFD/HF дијети као и у односу на ST2<sup>-/-</sup> мишеве на CHOW/HF режиму исхране. Такође је тежина јетре изражена као проценат телесне тежине била значајно већа у групи животиња чистог соја на HFD/HF исхрани у поређењу са ST2<sup>-/-</sup> мишевима на истом режиму (Слика 38).

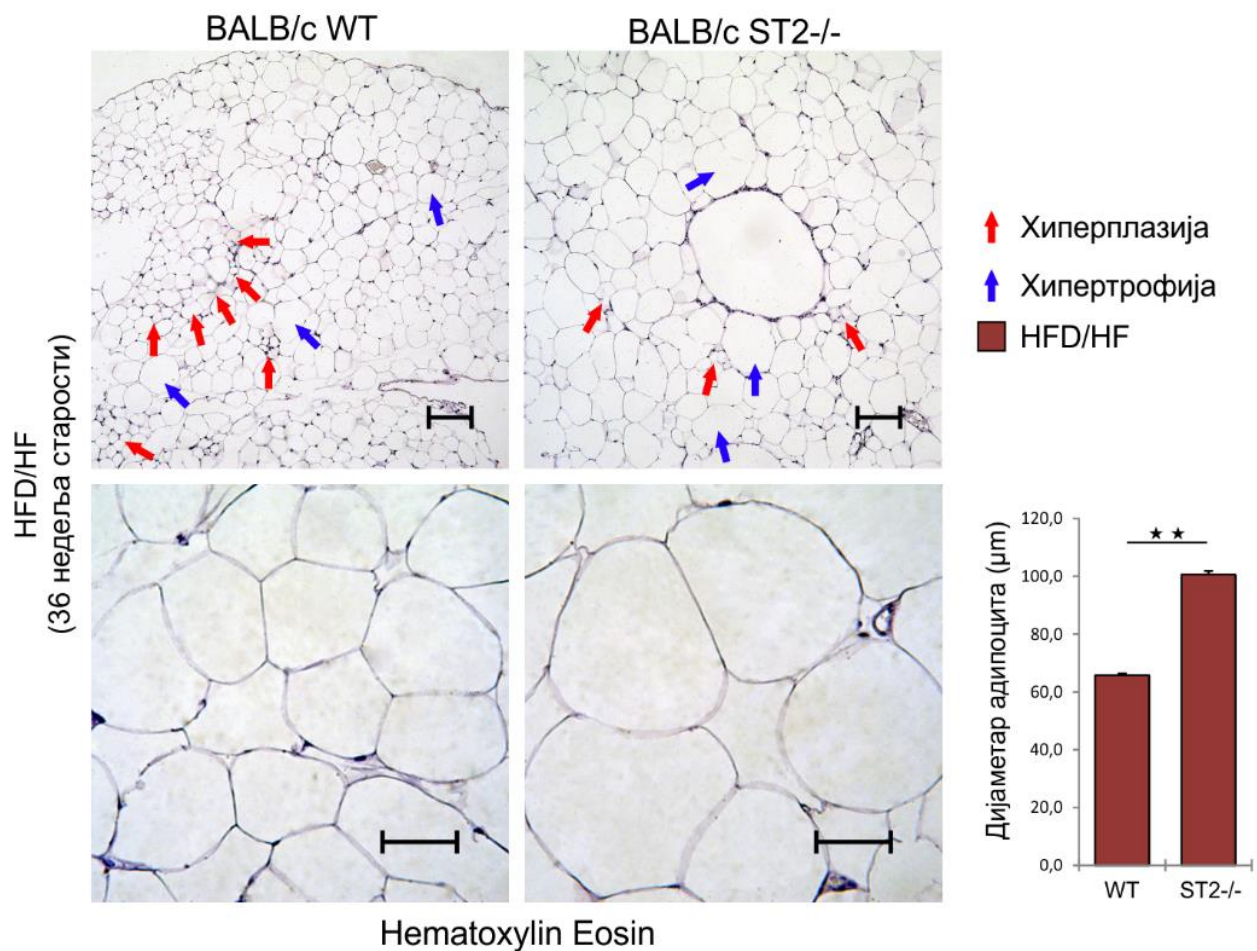


**Слика 38. Тежина висцералног адипозног ткива и тежина јетре BALB/c WT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишева након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти и 4 недеље на комбинованој исхрани.** Тежина висцералног адипозног ткива, проценат висцералног масног ткива у односу на телесну тежину, тежина јетре и тежина јетре изражена као проценат телесне тежине. Представљени резултати једног експеримента, n=5-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01

Испитиване су и морфолошке карактеристике висцералног масног ткива. На парафинским исечцима обојеним хематоксилин еозином, мерен је дијаметар адипоцита при чему је приближна величина ћелија масног ткива одређена мерењем највећег и најмањег пречника ћелије.

Дијаметар адипоцита висцералног масног ткива ST2<sup>-/-</sup> мишева на HFD/HF исхрани је био значајно већи у односу на дијаметар адипоцита мишева дивљег соја на истој исхрани

(Слика 39). Претходно је показано, у експерименту у ком су BALB/с животиње храњене 24 недеље, да је увећање адипозног масног ткива узроковано применом хране са високим садржајем масти у највећој мери настало процесом хипертрофије адипоцита, при чему су знаци хиперплазије ткива били мање изражени. Увођење фруктозе у исхрану животиња које су храњене храном са високим садржајем масти, проузроковало је код  $ST2^{-/-}$  мишева веома изражено повећање количине висцералног адипозног ткива. Морфолошка анализа је показала да су у висцералном масном ткиву  $ST2^{-/-}$  мишева на HFD/HF исхрани, поред изражене хипертрофије адипоцита, присутни и јасни знаци хиперплазије ткива. Иако пораст тежине висцералног масног ткива код мишева дивљег соја на HFD/HF исхрани није било тако изражен, такође су постојали јасни знаци хиперплазије адипоцита (Слика 39).

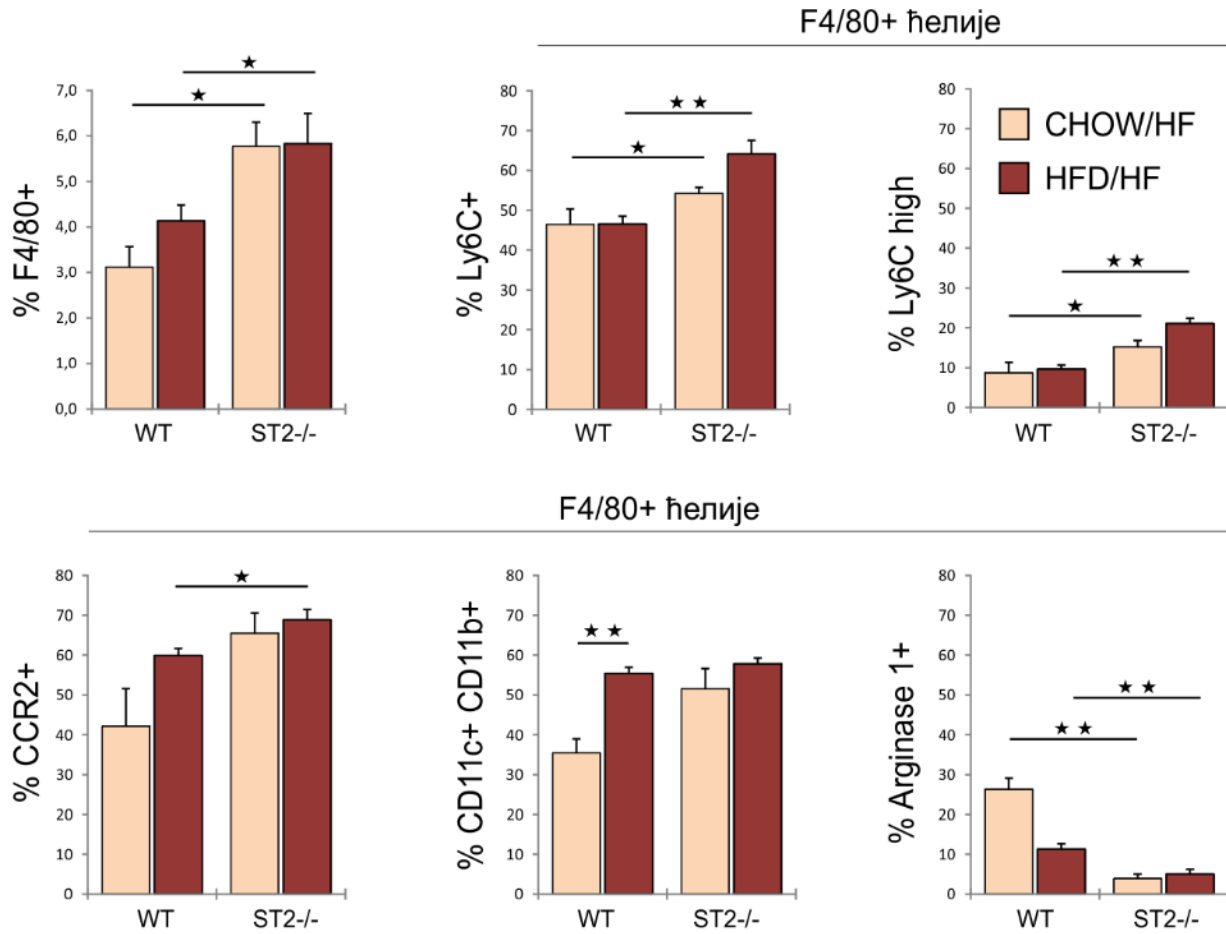


**Слика 39. Морфологија висцералног адипозног ткива BALB/c WT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишева након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти и 4 недеље на комбинованој исхрани.** *Горе:* Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака висцералног масног ткива обојених ХЕ (хематоксилин-еозин) техником (увеличање x10, размера=100µm). Црвене стрелице означавају поља хиперплазије, плаве стрелице означавају хипертрофичне адипоците. *Доле:* Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака висцералног масног ткива обојених ХЕ (хематоксилин-еозин) техником (увеличање x40, размера=50µm). Графички су приказане средње вредности дијаметра адипоцита. Представљени резултати једног експеримента, n=5-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

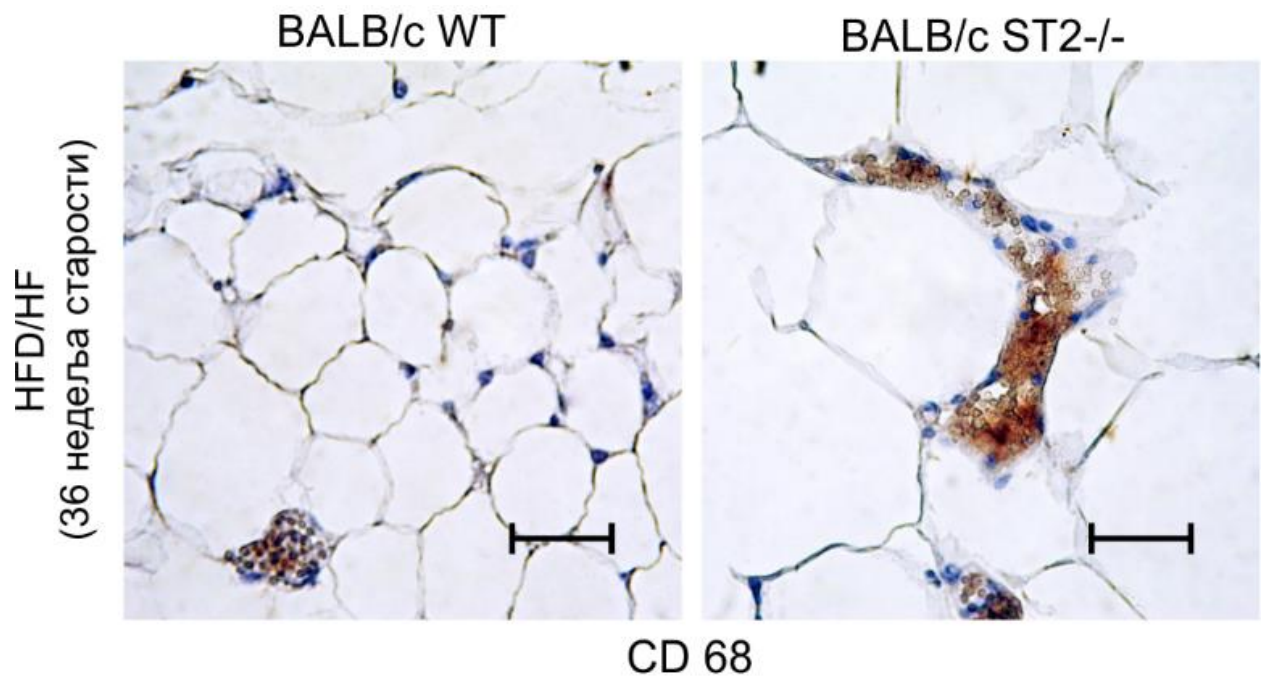
#### *4.3.4. Фенотипска анализа имунских ћелија у висцералном масном ткиву BALB/c мишева дивљег соја и ST2<sup>-/-</sup>BALB/c мишева на комбинованом режиму исхране*

Фенотипске карактеристике имунских ћелија висцералног адипозног ткива испитиване су методом проточне цитометрије. У 36. недељи живота, животиње су жртвоване и из висцералног адипозног ткива изолована је стромална васкуларна фракција ћелија које су потом анализирани.

Показано је да је проценат F4/80<sup>+</sup> макрофага значајно већи у висцералном масном ткиву ST2<sup>-/-</sup> мишева на CHOW/HF и на HFD/HF исхрани у поређењу са одговарајућим групама мишева дивљег соја. Фенотипском анализом ћелија урођене имуности је такође показано да је проценат F4/80<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> ћелија као и проценат F4/80<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup> ћелија значајно већи у висцералном масном ткиву ST2<sup>-/-</sup> мишева на CHOW/HF и HFD/HF исхрани у односу на мишеве чистог соја на одговарајућој исхрани. Процентуална заступљеност F4/80<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup> ћелија је била значајно већа у висцералном масном ткиву ST2<sup>-/-</sup> мишева на HFD/HF исхрани у односу на WT мишеве на истом режиму исхране. Међутим, проценат проинфламаторних троструко позитивних F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> макрофага је био значајно већи у групи WT мишева на HFD/HF исхрани у односу на WT мишеве на CHOW/HF, док у групи ST2<sup>-/-</sup> мишева статистички значајна разлика није постигнута. Показано је и да је проценат F4/80<sup>+</sup>Arginase1<sup>+</sup> M2 макрофага значајно мањи у групама ST2<sup>-/-</sup> мишева на CHOW/HF и HFD/HF исхрани у односу на мишеве чистог соја на одговарајућем дијеталном режиму (Слика 40). У прилог повећаној инфламацији у висцералном масном ткиву ST2<sup>-/-</sup>животиња на HFD/HF исхрани у односу на WT мишеве, иде и податак о већој заступљености CD68<sup>+</sup> макрофага који је потврђен патохистолошком анализом имунохистохемијског бојења поменутог маркера у ткиву (Слика 41).



**Слика 40. Фенотипска анализа макрофага у висцералном масном ткиву BALB/c WT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишева након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти и 4 недеље на комбинованој исхрани.** Мононуклеарне ћелије изоловане из стромалне васкуларне фракције висцералног масног ткива анализирани су методом проточне цитометрије. Приказан је проценат F4/80<sup>+</sup> макрофага. Приказана је процентуална заступљеност F4/80<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> ћелија као и проценат F4/80<sup>+</sup> Ly6C<sup>high</sup> ћелија. Приказана је процентуална заступљеност F4/80<sup>+</sup> CCR2<sup>+</sup> ћелија, F4/80<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> макрофага и F4/80<sup>+</sup> Arginase 1<sup>+</sup> M2 макрофага. Представљени резултати једног експеримента, n=5-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

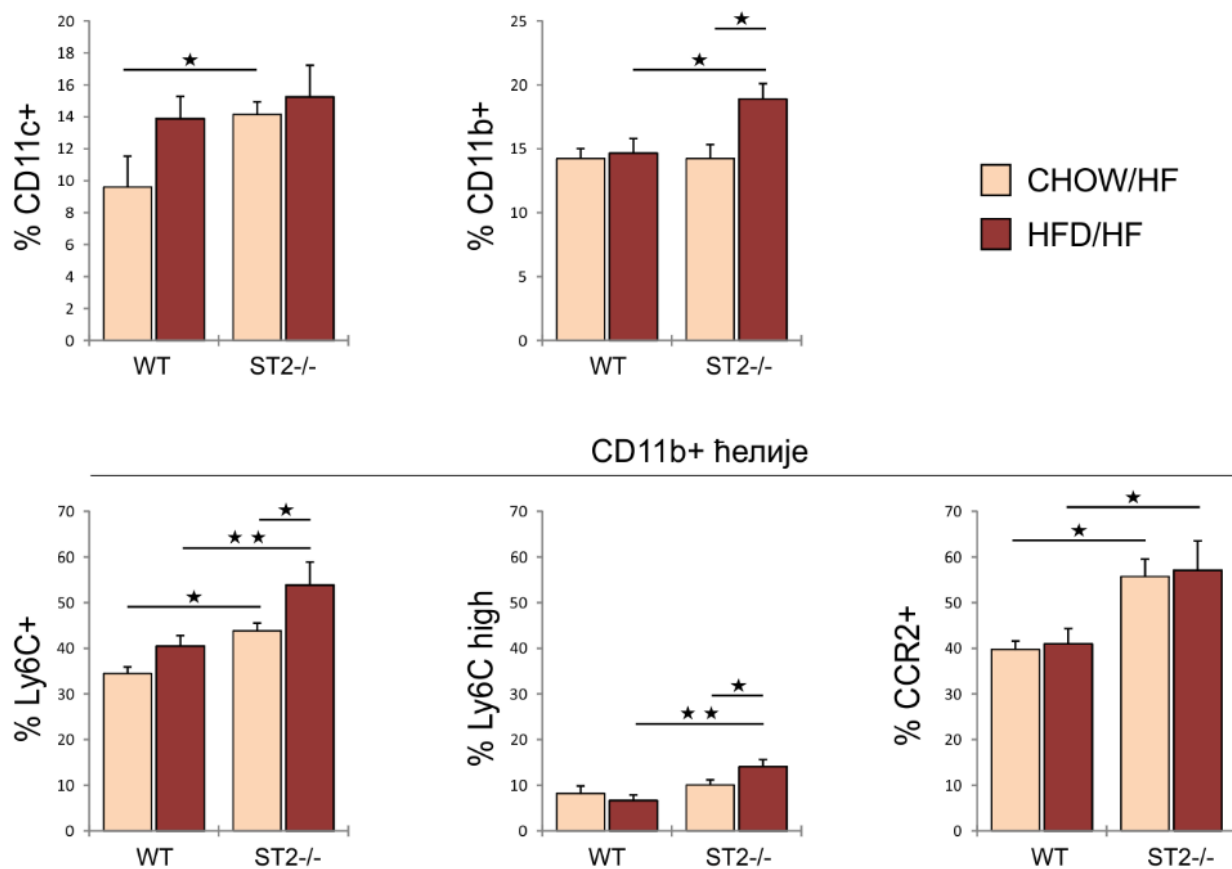


Слика 41. Имунохистохемијско бојење CD68 маркера у у висцералном масном ткиву BALB/c WT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишева након 24 недеље на исхрани са високим садржајем масти и 4 недеље на комбинованој исхрани. Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака висцералног масног ткива са присутним CD68 позитивним ћелијама (браон) . (увеличање x40, размера=50µm. Представљени резултати једног експеримента, n=5-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

Фенотипском анализом ћелија урођене имуности, установљено је да је процентуална заступљеност CD11c<sup>+</sup> дендритских ћелија значајно већа у групи ST2<sup>-/-</sup> мишева који су храњени CHOW/HF храном у односу на мишеве дивљег соја на истој исхрани. Процент CD11b<sup>+</sup> мијелоидних ћелија је био значајно већи у висцералном масном ткиву ST2<sup>-/-</sup> мишева на HFD/HF исхрани у поређењу са мишевима истог генотипа на CHOW/HF исхрани, као и у поређењу са WT мишевима на HFD/HF исхрани. Такође је процентуална заступљеност CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> моноцита била значајно већа у групама ST2<sup>-/-</sup> мишева на CHOW/HF и HFD/HF исхрани у поређењу са WT мишевима на одговарајућој исхрани. HFD/HF исхрана је у ST2<sup>-/-</sup> мишева проузроковала пораст процента CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> моноцита. Истовремено је проценат CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup> проинфламаторних моноцита био значајно већи у висцералном масном ткиву ST2<sup>-/-</sup> мишева на HFD/HF исхрани у поређењу са ST2<sup>-/-</sup> мишевима на CHOW/HF



исхрани, као и у поређењу са мишевима дивљег соја на HFD/HF режиму исхране. Процентуална заступљеност CD11b<sup>+</sup> CCR2<sup>+</sup> моноцита је била значајно већа у обе групе ST2<sup>-/-</sup> мишева у поређењу са мишевима чистог соја на одговарајућој исхрани (Слика 42).

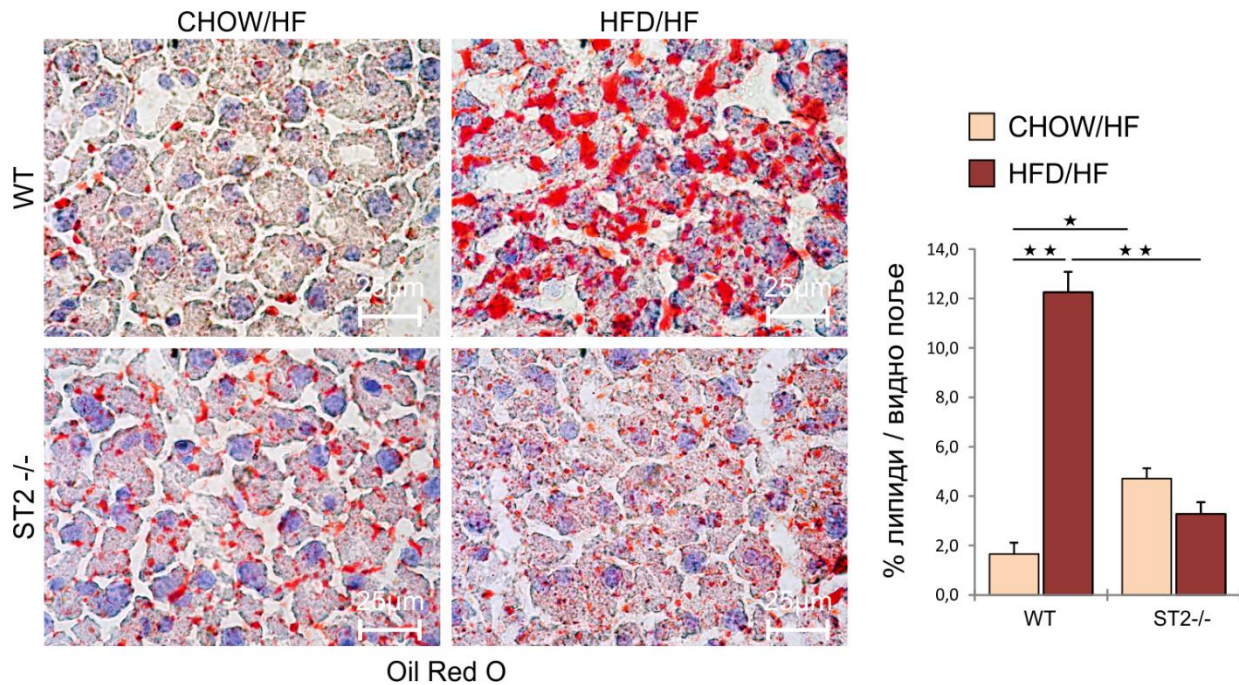


**Слика 42. Фенотипска анализа ћелија урођене имуности у висцералном масном ткиву BALB/c WT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишева након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти и 4 недеље на комбинованој исхрани.** Мононуклеарне ћелије изоловане из стромалне васкуларне фракције висцералног масног ткива анализирани су методом проточне цитометрије. Приказан је проценат CD11c<sup>+</sup> дендритских ћелија. Приказана је процентуална заступљеност CD11b<sup>+</sup> мијелоидних ћелија. Приказана је процентуална заступљеност CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> моноцита, CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>high</sup> проинфламаторних моноцита и CD11b<sup>+</sup> CCR2<sup>+</sup> моноцита. Представљени резултати једног експеримента, n=5-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

#### 4.3.5. Стеатоза јетре BALB/c мишева дивљег соја и ST2<sup>-/-</sup>-BALB/c мишева на комбинованом режиму исхране

Присуство масних капи у хепатоцитима је испитивано коришћењем селективне хистохемијске технике бојења, *Oil Red O*. Испитивање је изведено на смрзнутим резovima ткива дебљине 5 до 7  $\mu\text{m}$ , а семиквантитативна анализа је извршена коришћењем *ImageJ* рачунарског програма.

Примена високог процента фруктозе у исхрани није у већој мери утицала на развој стеатозе у оба генотипа. Количина акумулираних масти у ћелијама јетре је била значајно мања код ST2<sup>-/-</sup> мишева на HFD/HF исхрани у односу на WT мишеве храњене истом дијетом. Управо у групи WT мишева на CHOW/HF исхрани, количина акумулираних масти је била највећа, значајно већа и у поређењу са WT мишевима на CHOW/HF дијети. Интересантно је да је примена фруктозе имала највећи утицај на ST2<sup>-/-</sup> мишеве на CHOW/HF исхрани и количина акумулираних масти у хепатоцитима је у овој групи била значајно већа у односу на мишеве дивљег соја на истој исхрани. У свим експерименталним групама је патохистолошком анализом утврђена стеатоза јетре са доминантном микровезикуларном компонентом, изузев WT групе на HFD/HF исхрани, у којој су били видљиви знаци макровезикуларне стеатозе (Слика 43).



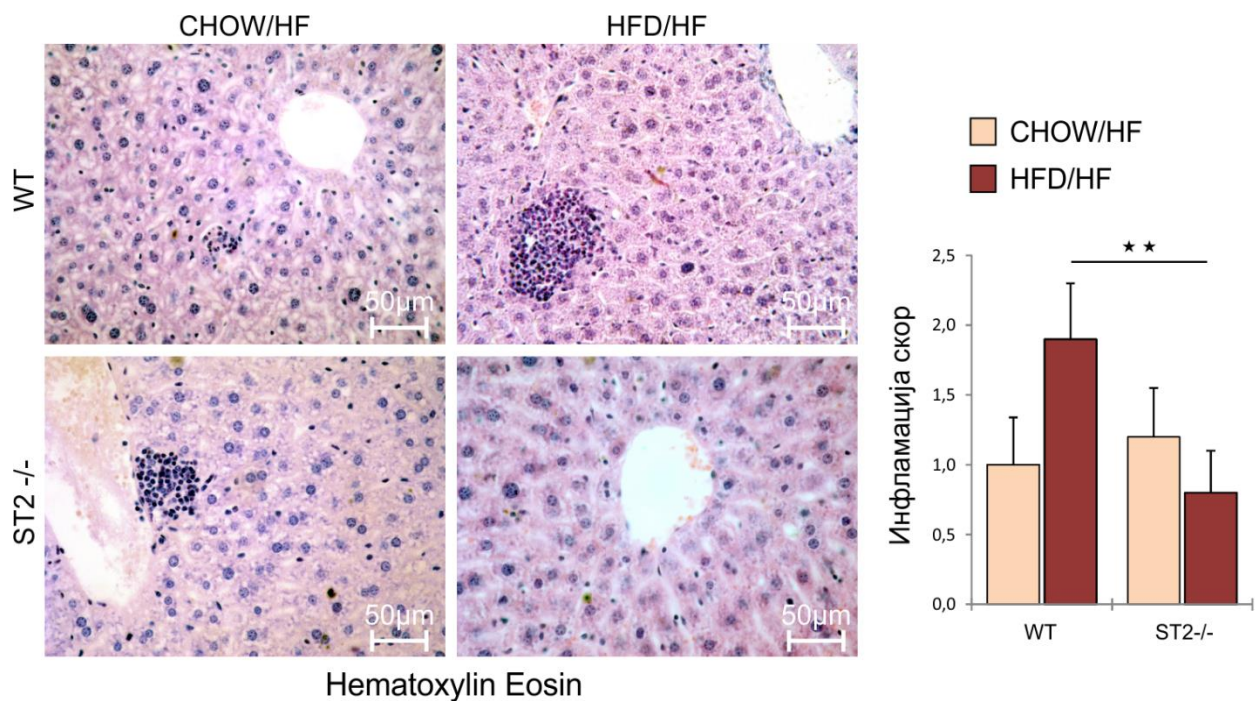
**Слика 43.** Стеатоза јетре BALB/c WT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишева након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти и 4 недеље на комбинованој исхрани. Репрезентативне фотомикрографије смрзнутих исечака ткива јетре обојених Oil Red O техником (увеличање x100, размера=25µm). Графички су приказане средње вредности површине обојене црвено у односу на површину видног поља. Представљени резултати једног експеримента, n=5-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

#### 4.3.6. Лобуларна инфилтрација јетре код BALB/c мишева дивљег соја и ST2<sup>-/-</sup> BALB/c мишева на комбинованом режиму исхране

Патохистолошком анализом парафинских исечака ткива обојених хематоксилин еозином извршено је квантификовање лобуларног инфилтрата ткива јетре. За квантификацију је коришћен NAFLD скор систем (177), коригован и прилагођен експерименталном анималном моделу болести.

Утврђено је, поређењем WT и ST2<sup>-/-</sup> група на CHOW/HF исхрани, да не постоји значајна разлика у инфламаторном скору. У ткиву јетре обе групе, били су присутни организовани инфилтрати малог промера који нису значајно нарушавали архитектуру ткива и који нису имали уједначену локализацију. Патохистолошком анализом ткива животиња

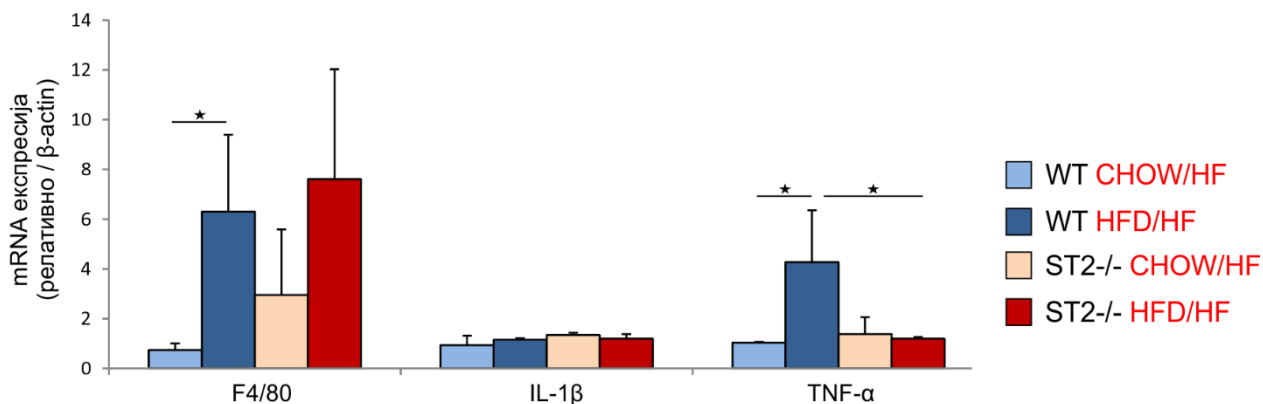
на HFD/HF исхрани, показано је да постоји значајно већа инфилтрација у јетри WT животиња у поређењу са ST2<sup>-/-</sup> животињама. У јетри WT мишева на HFD/HF исхрани, били су присутни организовани запаљенски инфилтрати, локализовани интралобуларно који нису значајно нарушавали архитектуру ткива (Слика 44).



**Слика 44.** Инфилтрација ткива јетре BALB/c WT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишева након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти и 4 недеље на комбинованој исхрани. Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака ткива јетре обојених ХЕ (хематоксилин-еозин) техником (увеличање x40, размера=50µm). Графички су приказане средње вредности скорa инфламације. Представљени резултати једног експеримента, n=5-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

Присуство инфламације у јетри експерименталних животиња је такође испитивано и методом ланчане полимеризације у реалном времену при чему је испитивана експресија гена у јетри који кодирају молекуле укључене у развој запаљења. Показано је да је експресија гена који кодира F4/80, молекула који је експримиран на популацијама мишијих макрофага, значајно већа у јетри WT животиња на HFD/HF исхрани у односу на WT мишеве на CHOW/HF исхрани. Тенденција пораста експресије гена који кодира F4/80 је уочена и у групи ST2<sup>-/-</sup> мишева на HFD/HF исхрани али разлика није достигла статистичку значајност.

Поређењем све четири експерименталне групе, установљено је да не постоји значајна разлика у експресији гена у јетри који кодира проинфламаторни цитокин IL-1 $\beta$ . Међутим, експресија гена у јетри који кодира проинфламаторни TNF- $\alpha$  била је значајно већа у групи WT мишева на HFD/HF исхрани у поређењу са WT мишевима на CHOW/HF исхрани као и у поређењу са ST2<sup>-/-</sup> мишевима на HFD/HF дијети (Слика 45).



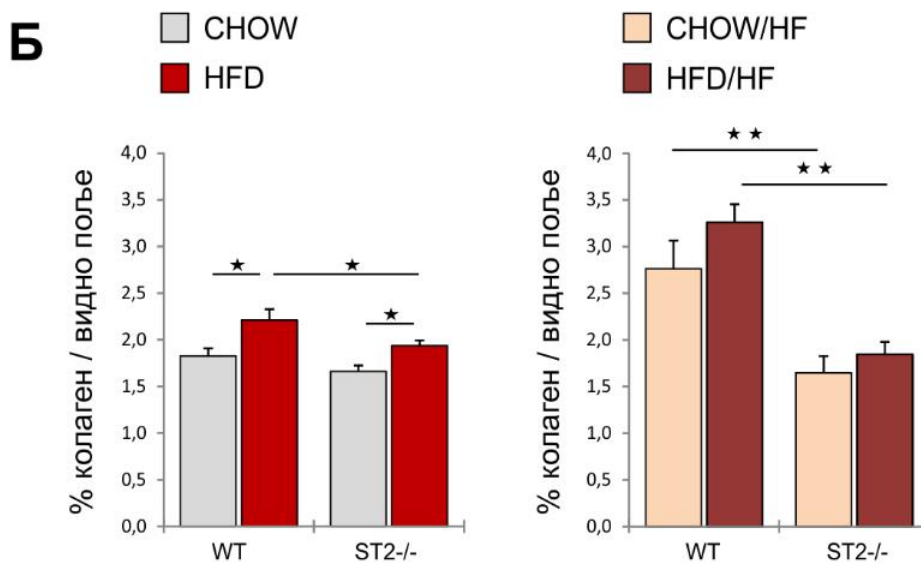
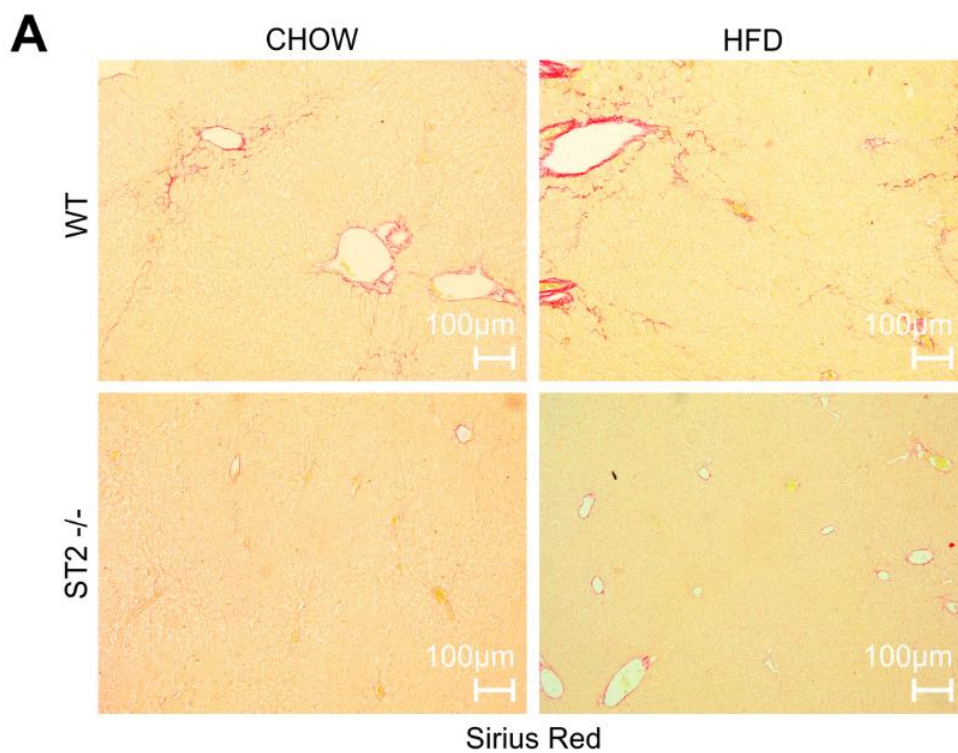
**Слика 45.** Експресија гена укључених у инфламацију у јетри BALB/c WT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишева након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти и 4 недеље на комбинованој исхрани. Методом ланчане полимеризације у реалном времену испитали смо експресију гена укључених у запаљенски процес у јетри. Приказана је релативна експресија mRNA у односу на  $\beta$ -актин. Представљени резултати једног експеримента, n=5-10 животиња по групи, средња вредност  $\pm$  SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

#### 4.3.7. Фиброза јетре код BALB/c мишева дивљег соја и ST2<sup>-/-</sup>-BALB/c мишева на комбинованом режиму исхране

Степен фиброзе јетре и утицај аблације ST2 гена на њен развој у моделу гојазности изазване применом комбиноване исхране са високим садржајем масти и високим садржајем фруктозе испитиван је патохистолошком анализом парафинских исечака ткива јетре обојене *Sirius Red* хистохемијском техником.

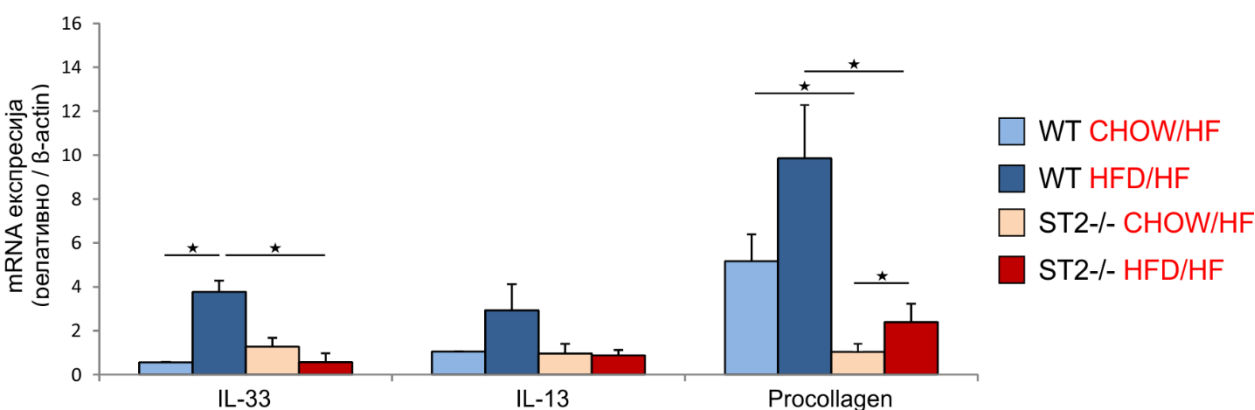
Примена високе концентрације раствора фруктозе у исхрани имала је изражен утицај на развој фиброзе јетре у групама животиња дивљег соја. Рачунарском анализом

фотомикрографија је утврђено да је количина депонованих колагених влакана у ткиву јетре значајно већа код мишева дивљег соја у поређењу са ST2<sup>-/-</sup> мишевима на оба типа исхране. Патохистолошком анализом је утврђено да је у јетри мишева дивљег соја присутно перисинусоидално и перицелуларно депоновање колагена са знацима настанка *chicken-wire fence* фиброзе. У јетри мишева дивљег соја на HFD/HF исхрани су такође били присутни и знаци развоја интерлобуларне *bridging* фиброзе. У јетри ST2<sup>-/-</sup> мишева, депоновање колагена је било дискретно, претежно перисинусоидално и није указивало на значајно оштећење ткива (Слика 46).



**Слика 46. Фиброза јетре BALB/c WT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишева након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти и 4 недеље на комбинованој исхрани. (А) Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака ткива јетре обојених Sirius Red техником (увеличање x10, размера=100µm). (Б) Графички су приказане средње вредности површине обојене црвено у односу на површину видног поља у групама које су храњене храном са високим садржајем масти (лево) и групама које су биле на комбинованој исхрани (десно). Представљени резултати једног експеримента, n=5-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \* p<0.05, \*\* p<0.01**

Методом ланчане полимеризације у реалном времену је испитана експресија гена у јетри који кодирају молекуле значајне за процес фиброгенезе. Експресија гена за профиброгени цитокин IL-33 била је значајно већа у групи животиња дивљег соја на HFD/HF исхрани у односу на животиње чистог соја на CHOW/HF исхрани, као и у поређењу са ST2<sup>-/-</sup> мишевима на HFD/HF исхрани. Између група није постојала значајна разлика у експресији гена који кодира профиброгени IL-13, иако је у групи WT мишева на HFD/HF исхрани постојала тенденција раста експресије у односу на мишеве на стандардној исхрани. Експресија гена за проколаген је била значајно већа у групама WT мишева у поређењу са ST2<sup>-/-</sup> мишевима на одговарајућој исхрани. Такође, експресија гена за проколаген је била значајно већа код ST2<sup>-/-</sup> мишева на HFD/HF исхрани у поређењу са ST2<sup>-/-</sup> мишевима на CHOW/HF исхрани (Слика 47).



**Слика 47.** Експресија гена укључених у развој фиброзе у јетри BALB/c WT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишева након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти и 4 недеље на комбинованој исхрани. Методом ланчане полимеризације у реалном времену испитали смо експресију гена за молекуле који учествују у развоју фиброзе у јетри. Приказана је релативна експресија mRNA у односу на β-актин. Представљени резултати једног експеримента, n=5-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

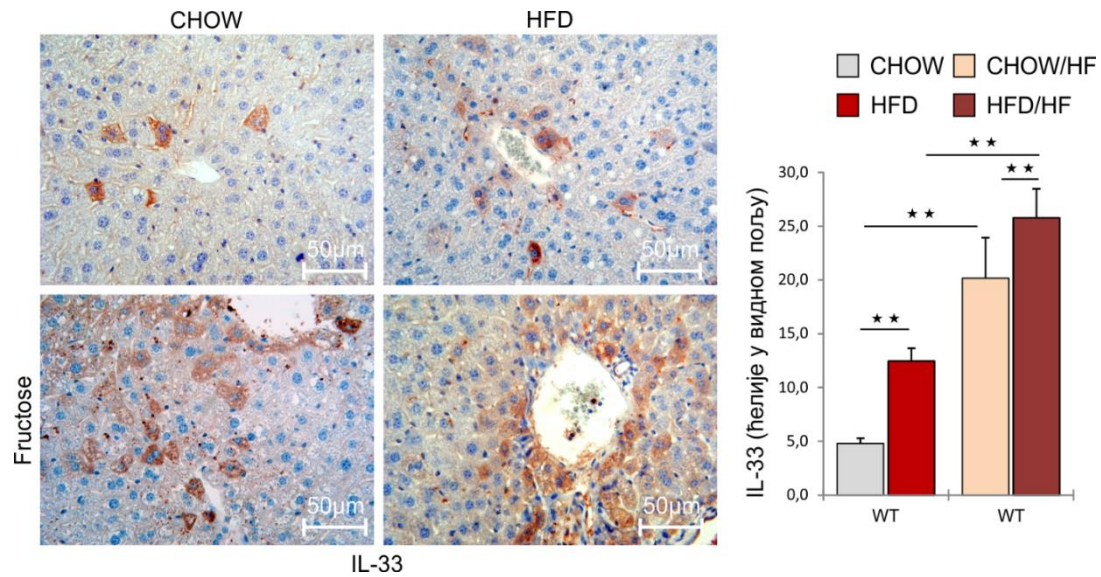
Методом имунохистохемијског бојења на парафинским исечцима, испитивана је заступљеност ћелија у јетри које експримирају IL-33, као и ћелија које експримирају рецептор за IL-33 (ST2). Пошто је претходно показано да додавање високе концентрације фруктозе исхрани са високим садржајем масти погоршава одређене метаболичке поремећаје, посебно фиброзу јетре, у овој анализи су међусобно упоређена ткива јетре WT



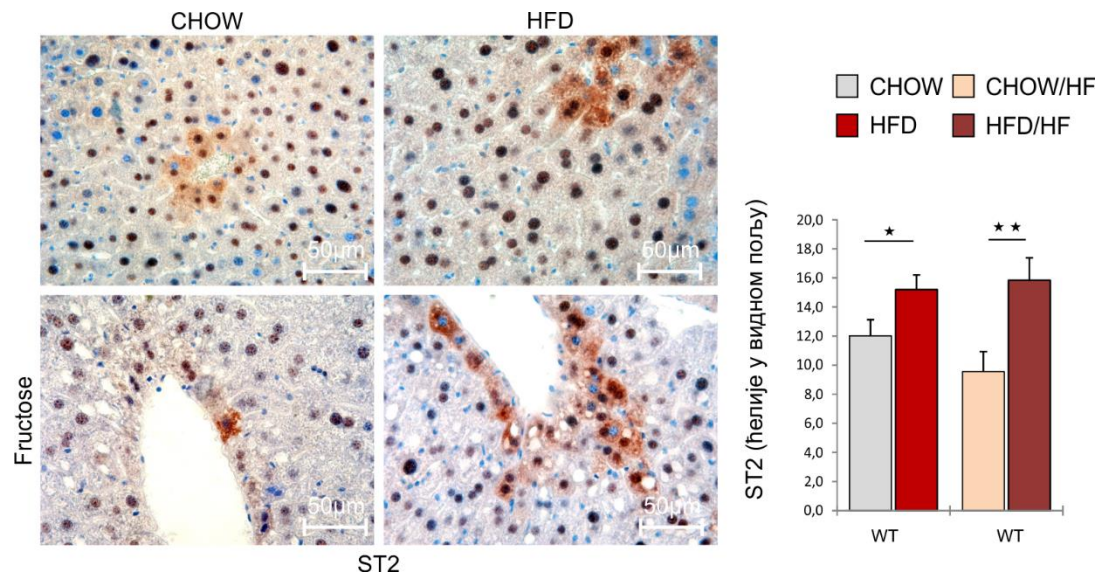
животиња које су биле на HFD исхрани и ткива WT животиња које су биле на комбинованој HFD/HF исхрани.

Установљено је да је број ћелија јетре које експримирају IL-33 значајно већи у групама WT животиња које су биле на HFD односно HFD/HF исхрани у поређењу са својим контролним групама. Такође је показано да је увођење фруктозе у исхрану значајно повећало број ћелија које експримирају IL-33, како у групама на CHOW исхрани, тако и у групама на HFD исхрани (Слика 48).

Поређењем броја ћелија јетре које експримирају ST2 молекул, показано је да је примена HFD односно HFD/HF исхране изазвала значајан пораст броја ST2 позитивних ћелија у односу на контролне групе. Такође је показано да је број ST2 позитивних ћелија у јетри значајно већи код животиња на CHOW исхрани у односу на животиње на CHOW/HF исхрани (Слика 49).



**Слика 48.** Имунохистохемијско бојење IL-33 у ткиву јетре BALB/cWT мишеванакон 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти и након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти и 4 недеље на комбинованој исхрани. Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака ткива јетре обојених имунохистохемијском техником. (увеличање x40, размера=50µm. Графички је приказана средња вредност броја IL-33 позитивних ћелија по видном пољу. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01



**Слика 49.** Имунохистохемијско бојење ST2 у ткиву јетре BALB/cWT мишеванакон 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти и након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти и 4 недеље на комбинованој исхрани. Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака ткива јетре обојених имунохистохемијском техником. (увеличање x40, размера=50µm. Графички је приказана средња вредност броја ST2 позитивних ћелија по видном пољу. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

## 5. ДИСКУСИЈА

### 5.1. ИМУНОМЕТАБОЛИЧКИ ФЕНОТИП МИШЕВА СА ДОМИНАНТНИМ ТИП 1 И ТИП 2 ИМУНСКИМ ОДГОВОРОМ

Експериментални анимални модел који у потпуности одражава комплексне имунске механизме који учествују у развоју метаболичких поремећаја повезаних са гојазношћу још увек није дефинисан (178). У испитивању метаболичких обољења повезаних са гојазношћу користе се различити сојеви мишева, као и нокаут (енг: *knockout*) и трансгени мишеви. Сојно зависне разлике у развоју неалкохолног стеатохепатитиса и фиброзе јетре (179) могу бити повезане са различитим имунским и инфламаторним одговором на "метаболичке молекуле опасности" (енг: *metabolic danger molecules*). Постоје докази да активација имунских ћелија утиче на хроничну инфламацију изазвану гојазношћу, инсулинску резистенцију и дијабетес (180). C57Bl/6 и BALB/c мишеви представљају сојеве мишева који се користе у испитивању имунорегулаторних механизма. На основу предиспозиције ка развоју Th1 имунског одговора код C57Bl/6 мишева и Th2 одговора код BALB/c мишева, сматрају се доминантним Th1 односно Th2 сојем (181-183). У ова два соја мишева, поред разлике у типу Т ћелијском имунском одговору, показана је разлика у одговору макрофага на различите стимулусе (184). Све је више доказа да је баланс између M1 и M2 макрофага, као и Th1 и Th2 лимфоцита од кључног значаја за исход многих обољења, укључујући метаболичке поремећаје повезане са гојазношћу (55).

У нашем истраживању су показане урођене разлике и разлике индуковане применом дијете са високим садржајем масти у имунометаболичком фенотипу између сојева мишева са доминантним тип 1 и тип 2 имунским одговором. Показана је разлика у заступљености различитих популација имунских ћелија у висцералном адипозном ткиву и јетри, развоју гојазности и количини масног ткива, инфламацији јетре, стеатози и фибрози јетре. Такође је установљено да C57Bl/6 и BALB/c мишеви, у одговору на исхрану са високим садржајем масти, различито регулишу експресију гена за молекуле који учествују у метаболизму липида у јетри и молекуле укључене у фиброгенезу. Закључено је да се урођене метаболичке карактеристике и карактеристике имунског одговора, које зависе од генетске основе соја

морају имати у виду при дизајну метаболичких студија, поготово студија које испитују NAFLD и NASH.

### *5.1.1 Анализа параметара промене телесне тежине и гликорегулације*

Након 24 недеље мишеви C57Bl/6 соја храњени CHOW храном су имали значајно мању телесну тежину у поређењу са мишевима BALB/c соја на истом режиму исхране. И остали параметри промене телесне тежине, пораст телесне тежине у односу на почетну тежину, као и пораст тежине изражен као проценат почетне тежине, такође су били значајно нижи код мишева C57Bl/6 соја (Слика 1А). Супротно томе, након 24 недеље исхране HFD храном, мишеви C57Bl/6 соја су имали значајно већу телесну тежину у односу на BALB/c мишове на истом режиму исхране, а такође су имали већи пораст телесне тежине, као и већи пораст тежине изражен као проценат почетне тежине (Слика 1Б). Овај резултат показује да осим тога што постоји јасна генетски условљена разлика у расту у стандардним условима, постоји и разлика у склоности ка гојењу. Уколико упоредимо телесну тежину унутар сваког соја понаособ, можемо закључити да су мишеви C57Bl/6 соја изразито склони развоју гојазности, пошто је њихова телесна тежина приближно два пута већа уколико користе храну са високим садржајем масти у односу на стандардну храну. Насупрот томе, код мишева BALB/c соја је телесна тежина била непромењена у групи на HFD храни у односу на стандардну исхрану. Овај податак указује да су мишеви BALB/c соја отпорни на развој гојазности у експерименталном моделу гојазности изазване храном са високим садржајем масти. Подаци из претходних студија показују да је BALB/c сој мишева умерено резистентан на индукцију гојазности (185, 186), док би према нашим резултатима овај сој мишева био отпоран на развој гојазности у овом експерименталном моделу.

Праћењем параметара гликорегулације показано је, у групи животиња на стандардној исхрани, да су вредности гликемије наше у току целог трајања експеримента биле значајно веће код мишева C57Bl/6 соја. У току трајања експеримента, вредности гликемије су код оба соја биле у физиолошким границама и није било разлике у вредности на почетку храњења и након 24 недеље унутар соја. Вредности инсулина у серуму у 24. недељи храњења се нису значајно разликовале између C57Bl/6 и BALB/c соја (Слика 2А). Код животиња храњених храном са високим садржајем масти, вредности гликемије наше су биле значајно веће код мишева C57Bl/6 соја у току целокупног трајања експеримента. У току развоја гојазности

који је показан код C57Bl/6 соја, приметно је и постепено повећање вредности гликемије наше, што може указати на развој инсулинске резистенције. Међутим, концентрација инсулина у серуму након 24 недеље храњења код C57Bl/6 соја није порасла у поређењу са вредностима на стандардној исхрани. Насупрот томе, у серуму мишева BALB/c соја концентрација инсулина је била значајно већа у поређењу са C57Bl/6 мишевима иако су вредности гликемије у току трајања експеримента биле у физиолошким границама код BALB/c мишева (Слика 2Б). Закључак је да постоје значајне разлике у параметрима гликорегулације између два соја мишева и да развој гојазности значајно више утиче на гликорегулацију код C57Bl/6 мишева, али да нема довољно доказа који би потврдили развој инсулинске резистенције.

### *5.1.2 Анализа карактеристика висцералног адипозног ткива и липидног профила*

Код животиња старости 8 недеља, иако није било разлике у телесној тежини, показана је значајно већа количина висцералног масног ткива у C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c мишеве. C57Bl/6 мишеви храњени стандардном храном су такође имали значајно већу тежину висцералног масног ткива као и проценат висцералног масног ткива у односу на телесну тежину у поређењу са мишевима BALB/c соја. Уочене разлике у тежини висцералног адипозног ткива су биле још израженије код животиња храњених HFD храном (Табела 6). Ови подаци потврђују да су мишеви C57Bl/6 соја подложни развоју гојазности и да имају и конститутивно значајно већу количину висцералног адипозног ткива. Иако је телесна тежина BALB/c мишева на стандардној исхрани била већа у односу на мишеве C57Bl/6 соја, мања количина висцералног масног ткива иде у прилог резистенцији BALB/c мишева на развој гојазности.

Испитиване су и морфолошке карактеристике висцералног адипозног ткива експерименталних животиња мерењем величине адипоцита. Код животиња старих 8 недеља адипоцити су били значајно већи са већом варијабилношћу у величини код C57Bl/6 соја у односу на BALB/c сој. Након 24 недеље исхране CHOW храном тежина висцералног адипозног ткива је увећана два пута у оба соја мишева, а адипоцити мишева C57Bl/6 соја су имали значајно мању просечну величину у односу на адипоците BALB/c мишева, при чему су, као и у 8. недељи, показали јасну хетерогеност у морфологији. Код мишева који су 24

недеље храњени HFD храном, тежина висцералног масног ткива је код C57Bl/6 соја била 7,5 пута већа у односу на мишеве старе 8 недеља, док је код мишева BALB/c соја увећање тежине било четвороструко. Дијаметар адипоцита је био значајно мањи код C57Bl/6 мишева храњених храном са високим садржајем масти у односу на BALB/c мишеве (Слика 4).

Раст адипозног ткива се одвија механизмом хиперплазије ћелија, односно увећањем броја адипоцита и механизмом хипертрофије, увећањем величине и капацитета постојећих адипоцита (16). Хипертрофија адипоцита најчешће претходи хиперплазији која је индукована синтезом аутокриних и паракриних фактора раста у адипозном ткиву (16, 187, 188). Раније је постојало уверење да је број адипоцита одређен до краја адолесценције и да затим остаје непромењен у старијем животном добу (17) али скорашње студије су показале да је адипозно ткиво у хуманој популацији много комплексније грађе, као и да се хиперплазије под одређеним условима може јавити и код људи старије доби (18). Наши резултати указују да у испитиваним сојевима мишева постоји генетски дефинисана разлика у динамици раста висцералног адипозног ткива. Можемо закључити да висцерално масно ткиво C57Bl/6 мишева показује знакове динамичног раста које се превасходно одвија процесом хиперплазије адипоцита, док код BALB/c соја мишева увећање адипозног ткива настаје хипертрофијом већ постојећих ћелија. Овај податак такође иде у прилог отпорности BALB/c соја на индукцију гојазности.

Одређивањем липидног профила мишева показано је да су и код младих животиња старости 8 недеља, и код животиња које су храњене 24 недеље стандардним и специјалним режимом исхране, концентрација укупног холестерола у серуму као и концентрација триглицерида биле значајно веће код BALB/c соја мишева (Табела 6). Наши резултати су у складу са резултатима претходних студија које су показале да мишеви BALB/c соја имају веће вредности параметара липидног профила у односу на друге сојеве мишева (185, 189, 190).

### *5.1.2 Инфламација и фенотип имунских ћелија у висцералном адипозном ткиву*

Испитивањем ћелија урођене имуности, показано је да је број CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> дендритичних ћелија значајно већи у висцералном адипозном ткиву C57Bl/6 мишева на

SHOW и на HFD режиму исхране. Број F4/80<sup>+</sup> макрофага се није разликовао између два соја на стандардној исхрани али је HFD исхрана значајно повећала број ових ћелија код C57Bl/6 мишева. Анализирани су и ћелије стечене имуности и показано је да се апсолутни број CD3<sup>+</sup> лимфоцита и апсолутни број CD3<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> лимфоцита не разликују код мишева на стандардној исхрани, док су ове ћелије значајно бројније у висцералном адипозном ткиву C57Bl/6 мишева на HFD исхрани. CXCR3 хемокински рецептор је молекула који је у највећој мери експримиран на активираним T лимфоцитима, претежно Th1 ћелијама, али може бити експримиран и на NKT ћелијама (191, 192). Наши резултати потврђују присуство инфламације у висцералном адипозном ткиву C57Bl/6 мишева и у складу су са студијама које показују да се у адипозном ткиву у току гојазности имунски одговор поларизује у Th1 правцу (61, 193-195). Такође у прилог повећаној инфламацији која се развија у адипозном ткиву C57Bl/6 мишева у току развоја гојазности иде и повећан број ћелија урођене имуности, CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> дендритичних ћелија и F4/80<sup>+</sup> макрофага, чији број није био повећан код BALB/c мишева.

### *5.1.3 Специфичности соја мишева у развоју стеатозе јетре и метаболизма липида у јетри*

Стеатоза јетре је основна патохистолошка карактеристика неалкохолне масне болести јетре, при чему се у хепатоцитима, масти могу акумулирати у виду микро или макровезикула, што заједно са бројем захваћених ћелија указује на степен развоја болести. Резултати полазују да је код младих животиња количина акумулиране масти била значајно мања код C57Bl/6 мишева док су код BALB/c мишева били видљиви знакови макровезикуларне стеатозе. Након 24 недеље исхране стандардном храном, C57Bl/6 мишеви нису имали знаке стеатозе јетре, док су код мишева BALB/c соја били изражени знаци мешовите, микро и макровезикуларне стеатозе. Исхрана са високим садржајем масти је изазвала благу макровезикуларну стеатозу код мишева C57Bl/6 соја, док су мишеви BALB/c соја развили изражену стеатозу са доминантним макровезикулама у ткиву јетре (Слика 7). Ови резултати који показују изражену стеатозу у јетри BALB/c мишева су у складу са претходним студијама које су показале да је овај сој изразито подложен стеатози код примене дијете са високим садржајем масти (185). За разлику од наше и других студија, Монтгомери и сарадници су показали да BALB/c мишеви нису у стању да акумулирају

липиде у јетри код исхране храном са високим садржајем масти и претпоставили су да је то механизам који може објаснити изостанак поремећаја гликорегулације и очувану функцију ендокриног панкреаса (196). Међутим, потребно је нагласити да су Монтгомери и сарадници користили значајно различит модел гојазности при чему су користили храну са 45% калорија из масти, а дужина храњења је била 8 недеља, док је у овој студији коришћена храна са 60% калорија из масти у периоду од 24 недеље.

Повећана акумулација липида настаје као последица оштећења и дисбаланса у процесима синтезе и елиминације триглицерида. Методом ланчане реакције полимеризације у реалном времену испитивана је експресија гена у јетри који кодирају кључне молекуле укључене у метаболизам липида. Експресија гена за ABCA1 у јетри, транспортни протеин који представља главни регулатор хомеостазе целуларног холестерола и фосфолипида (197) није се разликовала између два соја мишева. Такође није било разлике у експресији гена за CD36/FAT, молекула који је одговоран за преузимање и унос слободних масних киселина у ћелију (198) иако је исхрана са високим садржајем масти повећала експресију у оба соја. Сматра се да хиперинсулинемија повећава експресију CD36 у јетри и да преко тог механизма стимулише развој стеатозе и инсулинске резистенције (199). Наши резултати показују да се код BALB/c соја мишева развија стеатоза јетре у значајном обиму уз висок ниво инсулина и повећану експресију CD36 али без знакова инсулинске резистенције. Код мишева на CHOW исхрани није било разлике у експресији гена за LXR $\alpha$ , молекула који има контролну улогу у метаболизму холестерола и липида, али је код мишева на HFD режиму исхране експресија овог гена била значајно већа у јетри BALB/c соја. Експресија гена за PPAR $\gamma$ , који такође има контролну улогу у метаболизму холестерола и липида у јетри, се није разликовала код мишева на стандардној храни, док је HFD исхрана у значајно повећала експресију овог гена у јетри BALB/c соја. LXR $\alpha$  и PPAR $\gamma$  су укључени у контролу метаболизма холестерола и липида у јетри и њихова повећана експресија је удружена са проминентном стеатозом у јетри BALB/c мишева (200, 201). Иако LXR $\alpha$  има улогу у регулацији експресије гена за SREBP-1c, није било разлике у експресији овог гена између сојева, али је HFD храна изазвала пораст експресије овог гена у оба соја.



#### 5.1.4 Специфичности соја мишева у развоју лобуларне инфилтрације јетре и хепатоцелуларног оштећења

Поред стеатозе јетре, код стеатохепатитиса у јетри је присутно и хепатоцелуларно оштећење праћено лобуларном инфилтрацијом. Током прогресије болести, лобуларни инфилтрат се увећава и присуство израженог инфилтрата корелира са тежим обликом болести. Патохистолошком анализом је показано да већ у 8. недељи старости C57Bl/6 мишеви за разлику од BALB/c мишева, у јетри имају присутне знакове инфламације. Након 24 недеље исхране стандардном лабораторијском храном C57Bl/6 мишеви су имали јасно изражене лобуларне фокусе мононуклеарних ћелија и инфламаторни скор је био значајно већи у односу на BALB/c мишеве. Код мишева храњених HFD храном анализа је показала присуство великих сливених инфилтрата локализованих интерлобуларно у јетрама C57Bl/6 мишева, док су у јетрама BALB/c мишева били присутни ретки, појединачни инфилтрати мале величине. Маркери оштећења јетре, серумска активност аспартат трансминазе (АСТ) и аланин трансминазе (АЛТ) се нису разликовали код мишева старости 8 недеља, као ни код мишева старости 32 недеље на стандардној исхрани, док су код мишева храњених храном са високим садржајем масти, серумске активности АСТ и АЛТ биле значајно веће код C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c мишеве. Имунохистохемијска анализа присуства CD 68<sup>+</sup> макрофага у јетри је показала да је, у складу са претходно приказаним резултатима број CD 68<sup>+</sup> проинфламаторних макрофага значајно већи код C57Bl/6 на CHOW исхрани као и на HFD исхрани. Ови резултати указују на то да су Th1 C57Bl/6 мишеви конститутивно подложни инфламацији јетре за разлику од BALB/c мишева. Храна са високим садржајем масти код C57Bl/6 мишева изазива патохистолошку слику стеатохепатитиса, при чему је инфламаторна компонента израженија од стеатозе. Насупрот томе, неалкохолна масна болест јетре код BALB/c мишева има веома изражену стеатозу са ретким знацима инфилтрације, па се може окарактерисати као благ облик стеатохепатитиса

#### 5.1.5 Специфичности соја мишева у развоју фиброзе јетре

Хистопатолошка анализа ткива младих животиња старих 8 недеља је показала да се већ у овом узрасту у јетри C57Bl/6 мишева могу уочити почетни знаци фиброзе. Код C57Bl/6 мишева храњених CHOW храном постојали су хистопатолошки знаци перисинусоидално и перицелуларно локализованог депоновања колагена са јасним знацима настанка *chicken-*

*wire fence* фиброзе. Код BALB/c мишева истог узраста и на истој дијети, знаци развоја фиброзе су били веома дискретни. Храна са високим садржајем масти је у јетри C57Bl/6 мишева изазвала прогресију фиброзе са јасним интралобуларним и интерлобуларним септама које одговарају патохистолошком налазу *bridging* фиброзе, док су јетри BALB/c мишева није било јасних хистопатолошких знакова стеатофиброзе. Имунохистохемијска анализа присуства  $\alpha$ -SMA позитивних активираних стелатних ћелија је, у складу са претходним резултатима, показала значајно веће присуство ових ћелија у јетри C57Bl/6 мишева на CHOW храни, а такође и код C57Bl/6 мишева HFD храном, у поређењу са BALB/c мишевима на одговарајућем режиму исхране. Методом ланчане реакције полимеризације у реалном времену је такође испитивана експресија гена који кодирају молекуле значајне за развој фиброзе у јетри. Експресија гена за проколаген је била значајно већа у јетри мишева C57Bl/6 соја у односу на BALB/c мишове на оба режима исхране. Иако није било разлике у експресији гена за IL-13 између два соја мишева на оба типа исхране, експресија гена за профиброгени TGF- $\beta$  је била значајно већа у јетри C57Bl/6 у односу на BALB/c мишове на оба режима исхране. Анализом цитокина у серуму и хомогенизованом ткиву јетре је показано да је у серуму C57Bl/6 мишева на исхрани храном са високим садржајем масти значајно већа концентрација профиброгених цитокина IL-13 и TGF- $\beta$ , а такође су и концентрације профиброгених цитокина IL-33, IL-13 и TGF- $\beta$ , биле значајно веће у хомогенату јетре C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c мишове.

Ови резултати указују да је показана разлика у лобуларној инфилтрацији јетре повезана са различитим степеном фиброзе јетре. C57Bl/6 мишеви су у овом моделу гојазности показали склоност развоју фиброзе јетре за разлику од BALB/c мишева који су резистентни на развој фиброзе. Ова два соја мишева су и раније коришћена у испитивању фиброзе јетре и других органа и досадашње студије су показале веома различите резултате (202). BALB/c мишеви се сматрају резистентним на развој фиброзе јетре у експерименталном моделу у ком је примењена холин дефеицијентна дијета, што је у складу са добијеним резултатима (203). Насупрот томе, у токсичним моделу оштећења јетре угљен тетра хлоридом, BALB/c сој је, за разлику од C57Bl/6 соја био изузетно подложен развоју фиброзе јетре (204).

### 5.1.6 Фенотипска и функционална анализа имунских ћелија у јетри

Апсолутни број  $CD3^+T$  лимфоцита је био значајно већи у јетри C57Bl/6 мишева на HFD исхрани у односу на BALB/c сој. Није утврђена разлика у проценту  $CD4^+T$  лимфоцита на оба режима исхране, али је проценат  $CD8^+T$  лимфоцита био значајно већи у јетри C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c мишеве на CHOW исхрани, као и на HFD исхрани. Није постојала разлика у проценту  $CD3^+CXCR3^+$  лимфоцита у јетри C57Bl/6 и BALB/c мишева на оба режима исхране. Апсолутни број  $CD11c^+F4/80^-$  дендритичних ћелија је био значајно већи код C57Bl/6 мишева на CHOW храни у односу на BALB/c мишеве. Код исхране на HFD храни, апсолутни број  $CD11c^+F4/80^-$  дендритичних ћелија је порастао у оба соја, и поново је био већи у јетри C57Bl/6 мишева. Процент  $CD11c^+CD11b^+F4/80^-$  мијелоидних дендритичних ћелија је био значајно већи у јетри C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c на оба режима исхране. На исхрани CHOW храном апсолутни број  $F4/80^+$  макрофага је био значајно већи у јетри C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c мишеве. На исхрани HFD храном апсолутни број  $F4/80^+$  макрофага је порастао у оба соја али није било статистички значајне разлике између сојева мишева.. Апсолутни број  $CD11b^+Ly6C^{high}$  проинфламаторних моноцита је био значајно већи у јетри C57Bl/6 мишева на оба типа исхране. Процент  $F4/80^+$  макрофага који продукују  $IL-1\beta$  као и троструко позитивних проинфламаторних  $F4/80^+CD11b^{+high}CD11c^+$  макрофага је био значајно већи код C57Bl/6 мишева у поређењу са BALB/c мишевима на оба типа исхране. Процентуална заступљеност  $F4/80^+CD11c^+CD206^-M1$  макрофага, била је значајно већа у јетри C57Bl/6 мишева на стандардној исхрани и на HFD исхрани у односу на BALB/c мишеве. Насупрот томе, проценат  $F4/80^+CD11c^+CD206^+M2$  макрофага, био је значајно мањи код C57Bl/6 мишева на стандардној дијети у односу на BALB/c сој.

Анализа фенотипских и функционалних имунских ћелија у јетри ова два соја мишева потврђује разлике у степену инфилтрације јетре показане патохистолошком анализом. Иако се сматра да популација  $CD3^+T$  лимфоцита у току развоја стеатохепатитиса остаје релативно стабилна (114), код C57Bl/6 мишева је уочен пораст броја ових ћелија у току развоја гојазности. У складу са резултатима претходних студија које су показале да у току прогресије стеатохепатитиса цитотоксични  $CD8^+T$  лимфоцити инфилтрирају јетру и својим проинфламаторним цитокинима стимулишу регрутовање макрофага (121), су и наши резултати који значајну улогу  $CD8^+T$  лимфоцита у прогресији болести. Интересантно је да, за разлику од висцералног адипозног ткива, у јетри C57Bl/6 мишева нема повећаног броја

Th1 CD3<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> лимфоцита. Можемо да закључимо да је инфламација у јетри C57Bl/6 мишева у највећој мери посредована M1 макрофагама који секретују проинфламаторне цитокине и хемокине, и тиме стимулишу даљу хемотаксу проинфламаторних моноцита у ткиво јетре. У јетри BALB/c мишева, одсуство инфламације је било повезано са већим присуством M2 макрофага.

## *5.2. УЛОГА IL-33/ST2 СИГНАЛНОГ ПУТА У ИМУНОМЕТАБОЛИЧКОМ ФЕНОТИПУ BALB/c МИШЕВА СА ДОМИНАНТНИМ ТИП 2 ИМУНСКИМ ОДГОВОРОМ НА ИСХРАНИ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ*

Значај IL-33/ST2 пута у развоју гојазности, метаболичког синдрома и његових хепатичних компликација испитивана је коришћењем истог експерименталног модела, односно храњењем експерименталних животиња храном са високим садржајем масти у трајању од 24 недеље. IL-33 припада породици IL-1 цитокина и представља мултифункционалан цитокин који је укључен у патогенезу различитих инфламаторних и аутоимунских болести (99). IL-33 остварује своје дејство везивањем за рецепторски комплекс на плазма мембрани ћелија који се састоји од ST2 молекула и IL-1R аксесорног протеина. IL-33 има протективну улогу у гојазности и атеросклерози (100). У јетри IL-33 има профиброгену улогу коју остварује активацијом и експанзијом резидентних ILC ћелија типа 2 које продукују профиброгени IL-13 у моделу токсичног оштећења јетре (101). Улога IL-33/ST2 сигналног пута у метаболичким поремећајима изазваним гојазношћу није довољно испитана. У циљу испитивања његове улоге у развоју стеатозе, инфламације и фиброзе јетре у овом моделу гојазности, коришћени су ST2 дефицијентни BALB/c мишеви (ST2<sup>-/-</sup>) и BALB/c мишеви дивљег соја.

Иако су мишеви BALB/c соја релативно резистентни на индукцију гојазности храном са високим садржајем масти (196), ST2<sup>-/-</sup> мишеви су имали значајно већу телесну тежину у поређењу са WT мишевима. Можемо да закључимо да делеција гена за ST2 молекула може атенуирати отпорност на развој гојазности индуковане храном са високим садржајем масти. Овај резултат је у складу са претходним студијама које су показале за IL-33 има протективну улогу у развоју гојазности (100). Милер и сарадници су претходно показали да егзогено

апликован IL-33 има протективан ефекат у развоју гојазности и инфламације, док су Пантић и сарадници показали да делеција ST2 гена повећава количину висцералног адипозног ткива и инфламацију код BALB/c мишева (100, 205). У складу са овим студијама такође је показано да је количина висцералног масног ткива већа код ST2<sup>-/-</sup> мишева на исхрани са високим садржајем масти.

Добијени резултати показују да је степен стеатозе код ST2<sup>-/-</sup> мишева на HFD исхрани био значајно мањи у поређењу са WT мишевима. Степен стеатозе јетре је такође био значајно мањи и код ST2<sup>-/-</sup> мишева на CHOW дијети у поређењу са WT мишевима на истој дијети. Недостатак IL-33/ST2 сигналног пута код ST2<sup>-/-</sup> мишева на HFD исхрани је изазвао повећање тежине висцералног масног ткива и пораст концентрације триглицерида у серуму, а истовремено је био смањен степен стеатозе јетре. Овај резултат је донекле неочекиван јер је познато да је повећана липолиза која настаје у увећаном адипозном ткиву у гојазности фактор који у највећој мери доприноси развоју стеатозе јетре (206, 207). Наши резултати показују да се протективни ефекат IL-33 у гојазности не односи и на стеатозу јетре. Недавно објављена студија сугерише да IL-33/ST2 експресија може промовисати липолизу у адипозном ткиву трудница (208). Може се спекулисати да несклад између протективне улоге и повећања стеатозе јетре може бити повезан са претпоставком да IL-33 промовише липолизу у масном ткиву и “премештање” масних киселина у јетру. Такође је показано да WT мишеви на HFD исхрани имају повећану експресију гена укључених у метаболизам липида. Експресија CD36/FAT транслоказе масних киселина је била значајно већа у јетри WT мишева на исхрани са високим садржајем масти у односу на ST2<sup>-/-</sup> мишеве. Такође је показано да је експресија LXR $\alpha$  значајно мања у јетри ST2<sup>-/-</sup> мишева у поређењу са WT мишевима. LXR $\alpha$  представља нуклеарни рецептор експримиран у јетри и другим ткивима, који има улогу у регулацији липогенезе. Студије су показале да његова активација може изразито повећати стеатозу јетре и инсулинску резистенцију (209, 210). За разлику од ST2<sup>-/-</sup> мишева, WT мишеви на HFD исхрани су имали значајно већу експресију гена за PPAR $\gamma$ , молекула чија је повећана експресија у хепатоцитима удружена са егзацербацијом стеатозе (211).

Добијени резултати су указали на значајну улогу IL-33/ST2 сигналног пута у измењеном метаболизму липида у јетри у току развоја гојазности. Недавно објављена

студија је показала да је за развој стеатозе јетре неопходна активација IL-1 сигналног пута (212). Пошто IL-33/ST2 осовина дели исте нисходне интраћелијске молекуле са IL-1 сигналним путем, може се претпоставити да је улога овог сигналног пута значајна у хепатичној липогенези. Студије су показале значајну улогу IL-17 у стеатози и фибрози јетре (122). У складу са овим резултатима, показано је да је број CD4<sup>+</sup>T лимфоцита који продукују IL-17 значајно мањи у јетри ST2<sup>-/-</sup> мишева на HFD исхрани у поређењу са WT мишевима. Инфламација јетре је била мање изражена код ST2<sup>-/-</sup> мишева на HFD исхрани у односу на WT мишеве, што је показано хистопатолошком анализом и имунохистохемијском анализом CD68<sup>+</sup> макрофага. Број CD11c<sup>+</sup> дендритичних ћелија је такође био значајно мањи код ST2<sup>-/-</sup> мишева на HFD храни. Знаци фиброзе јетре иако дискретни, били су израженији код WT мишева у поређењу са ST2<sup>-/-</sup> мишевима. У поређењу са ST2<sup>-/-</sup> мишевима, експресија гена за проколаген, IL-33 и профибротски IL-13 је била значајно већа у јетри WT мишева на специјалном режиму исхране што потврђује профибротску улогу IL-33/ST2 сигналног пута у јетри. Овај резултат је пратило повећано депоновање колагена у јетри WT мишева, као и повећане серумске вредности IL-33 и IL-13. Такође је показано да је број CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>low</sup> моноцита знатно већи у јетри WT мишева на HFD исхрани. Ове ћелије имају профибротску функцију промовишући поларизацију M2 макрофага у јетри (213-215).

### *5.2.1. Улога IL-33/ST2 сигналног пута у имунометаболичком фенотипу BALB/C мишева са доминантним тип 2 имунским одговором на исхрани са високим садржајем масти и високим садржајем фруктозе*

Улога IL-33/ST2 сигналног пута у развоју гојазности и метаболичког синдрома је такође испитана коришћењем експерименталног модела гојазности која је изазвана применом комбиноване исхране која садржи висок садржај масти (60% kcal из масти) и висок садржај фруктозе (30% раствор фруктозе). Животиње су 24 недеље храњене храном са високим садржајем масти, након чега је у исхрану у трајању од 4 недеље уместо чисте воде, уведен 30% раствор фруктозе. Контролној групи животиња које су користиле стандардну храну, такође је додат високопроцентни раствор фруктозе. Овакав модел

исхране у значајној мери опонаша широко распрострањену исхрану људи односно коришћење “брзе хране”, те стога носи назив Западњачка дијета (енгл. *Western diet*) (216). Упоредне анализе различитих експерименталних модела гојазности су показале да примена ове комбиноване дијете осим тога што верније одражава хумани модел исхране, такође изазива и значајне хепатичке манифестације метаболичког поремећаја (217).

Фруктоза је моносахарид који се примарно метаболише у јетри и која контролом активности глукокиназе утиче на преузимање глукозе у јетри и синтезу гликогена (217). Прекомерно конзумирање фруктозе, која је последњих деценија у великој мери присутна у исхрани људи, је удружено са повећаном тежином стеатозе и фиброзе јетре у хуманој патологији (218, 219).

Показано је да су након 28 недеља исхране  $ST2^{-/-}$  мишеви на оба типа исхране имали значајно већу телесну тежину у поређењу са мишевима дивљег соја на одговарајућем типу исхране. Праћењем вредности гликемије наште уочено је да након две недеље од увођења фруктозе у исхрану код свих група животиња започиње постепен развој хипогликемије. Можемо индиректно претпоставити да је за овај феномен одговорна хиперинсулинемија која се развија услед примене фруктозе у исхрани. Досадашње студије су показале да коришћење фруктозе у анималних моделима гојазности има значајан утицај на механизме гликорегулације, али су такође показале и да ефекат у великој мери зависи од дужине исхране као и од животињске врсте која је коришћена (220-222). Након 4 недеље примене фруктозе,  $ST2^{-/-}$  мишеви на оба типа исхране су имали значајно мање вредности гликемије наште у поређењу са контролним групама те можемо закључити да је IL-33 у значајној мери допринео смањењу оваквог поремећаја гликорегулације.

Анализа висцералног масног ткива након примене фруктозе је показала веома изражено повећање тежине масног ткива код  $ST2^{-/-}$  мишева. Можемо закључити да је раније поменут пораст телесне тежине у ових група мишева у највећој мери резултат увећања висцералног масног ткива. Такође је потврђена протективна улога IL-33 у развоју гојазности и увећања висцералног масног ткива (100, 168). Мофролошком анализом висцералног масног ткива показано је да је примена фруктозе, што није уочено у претходној студији у којој је коришћена само HFD храна, активирала механизме хиперплазије висцералног масног ткива што је у великој мери утицало на његов пораст.

Испитивањем фенотипских карактеристика имунских ћелија присутних у висцералном масном ткиву показано је да су проценат F4/80<sup>+</sup> макрофага као и проценти F4/80<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> ћелија и F4/80<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup> ћелија значајно већи у висцералном масном ткиву ST2<sup>-/-</sup> мишева. Такође је показано да је проценат F4/80<sup>+</sup>Arginase 1<sup>+</sup> M2 макрофага значајно мањи у групама ST2<sup>-/-</sup> мишева. Овај резултат указује да IL-33 промовише поларизацију макрофага у M2 смеру и тако испољава протективни ефекат у развоју инфламације адипозног ткива у гојазности. У прилог протективном дејству IL-33 иде и податак да је заступљеност CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup> проинфламаторних моноцита била значајно већа у висцералном масном ткиву ST2<sup>-/-</sup> мишева на HFD/HF исхрани у поређењу са ST2<sup>-/-</sup> мишевима на CHOW/HF исхрани, као и у поређењу са мишевима дивљег соја на HFD/HF режиму исхране.

У постојећој литератури има веома мало података о експресији IL-33 у јетри и његовој улози у механизмима развоја стеатофиброзе у експерименталном моделу гојазности који је коришћен (223). Анализиране су и патохистолошке карактеристике стеатозе јетре и показано је да код BALBc мишева примена фруктозе не утиче у значајној мери на развој овог феномена. Студије на другим анималним моделима су показале да примена фруктозе погоршава стеатозу јетре (224, 225). Иако степен стеатозе јетре није погоршан применом фруктозе у односу на стеатозу уочену код мишева на храни богатој мастима, резултати су потврдили да делеција ST2 гена има протективан ефекат на развој овог феномена у јетри. Мишеви дивљег соја храњени комбинованом исхраном су имали значајно израженију стеатозу јетре у поређењу са ST2<sup>-/-</sup> мишевима на истом типу исхране.

Показано је такође, патохистолошким анализом, да је степен инфилтрације јетре знатно израженији код мишева дивљег соја на комбинованој HFD/HF исхрани у поређењу са ST2<sup>-/-</sup> мишевима на истом типу исхране. Није било разлике у експресији гена у јетри који кодира F4/80 молекула, маркер макрофага. Показано је међутим да је експресија гена који кодира проинфламаторни TNF- $\alpha$  у јетри значајно већа код мишева дивљег соја на HFD/HF исхрани у поређењу са ST2<sup>-/-</sup> мишевима. Овај податак иде у прилог повећаној инфламацији уоченој у јетри мишева дивљег соја, али, имајући у виду комплексну улогу коју TNF- $\alpha$  има у јетри, његова активност може допринети и развоју фиброзе (226-228).

Примена високе концентрације раствора фруктозе у исхрани имала је изражен утицај на развој фиброзе јетре у животиња дивљег соја. Степен фиброзе је био израженији код



мишева дивљег соја у односу на студију у којој је коришћена само храна са високим садржајем масти. Истовремено, код  $ST2^{-/-}$  мишева примена фруктозе није имала утицај на развој фиброзе. Разлике у степену фиброзе јетре између мишева дивљег соја и  $ST2^{-/-}$  мишева на исхрани са високим садржајем фруктозе су потврђене испитивањем експресије гена који у јетри кодира синтезу проколагена. Значај IL-33 у настанку фиброзе јетре који прати развој гојазности је показана имунохистохемијским испитивањем његове експресије у ткиву јетре као и испитивањем експресије гена који га кодира. Број ћелија које експримирају IL-33, а које морфолошки одговарају хепатоцитима је био знатно израженији код животиња дивљег соја које су храњене HFD храном у односу на контролне групе. Примена фруктозе је изазвала значајан пораст IL-33 позитивних ћелија у ткиву јетре и код контролних и код експерименталних група животиња дивљег соја. Истовремено је број ћелија јетре које показују цитоплазматску експресију  $ST2$  рецептора био значајно већи код животиња дивљег соја које су храњене HFD односно HFD/HF храном у поређењу са контролном исхраном. Иако примена фруктозе није значајно повећала број ћелија које експримирају  $ST2$  молекулу, разлика узрокована исхраном је и даље била изражена.

Из наведених резултата је закључено да је улога IL-33 веома изражена и комплексна у развоју гојазности и метаболичких поремећаја који је прате. Иако је IL-33 показао протективан ефекат у развоју гојазности и инфламације висцералног адипозног ткива, његов ефекат у јетри је био супротан. IL-33 је значајно допринео развоју и погоршању стеатозе јетре механизмом који је тек потребно расветлити али који највероватније укључује модулацију експресије гена за молекуле који су одговорни за метаболизам липида у јетри. Такође је утврђено и да је његово присуство неопходно за развој фиброзе као и да директно утиче на погоршање фиброзе у јетри мишева са доминантним тип 2 имунским одговором.

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

Показане су и описане значајне разлике у имунометаболичком фентипу мишева са доминантним тип 1 и тип 2 одговором. Већи пораст телесне тежине, већа количина масног ткива, виша гликемија, инфламација и фиброза јетре у C57Bl/6 мишева је повезана са већом заступљеношћу Th1 ћелија у масном ткиву, проинфламаторних ћелија природне имуности, проинфламаторних и профиброгених цитокина у јетри. Постоји изражена дисоцијација стеатозе и фиброзе јетре у C57Bl/6 и BALB/c мишева, где Th2 доминантан сој има изражену стеатозу јетре праћену повећаном експресијом гена који учествују у метаболизму масти, док Th1 сој има изражену фиброзу јетре, посебно изражену на исхрани богатој мастима.

Анализирана је и улога IL-33/ST2 сигналног пута и показано је да ова сигнална осовина има многоструке улоге у метаболичким поремећајима изазваним гојазношћу. IL-33/ST2 сигнални пут смањује количину висцералног масног ткива и инфламацију у висцералном масном ткиву, али промовише развој стеатозе јетре, инфламације и фиброзе, највероватније модулацијом регрутације ћелија и метаболичких путева који повезују висцерално адипозно ткиво и ткиво јетре у току развоја гојазности.

У складу са задатим циљевима, изведени су следећи закључци:

1. Постоје значајне разлике у имунометаболичком фентипу мишева са доминантним тип 1 и тип 2 имунским одговором. C57Bl/6 мишеви са доминантним Th1 имунским одговором на HFD исхрани у поређењу са BALB/c мишевима са доминантним Th2 имунским одговором на истом режиму исхране су развили:
  - 1.1. Већу гојазност, већи пораст телесне тежине и већу количину висцералног масног ткива;
  - 1.2. Значајно веће вредности гликемије наше и значајно ниже концентрације инсулина у серуму;
  - 1.3. Изражену инфламација у висцералном адипозном ткиву која је посредована је M1/Th1 ћелијама;

2. Постоји изражена дисоцијација стеатозе и фиброзе јетре у C57Bl/6 и BALB/c мишева, где Th2 доминантан сој има изражену стеатозу јетре праћену повећаном експресијом гена који учествују у метаболизму масти, док Th1 сој има изражену фиброзу јетре, посебно изражену на исхрани богатој мастима. Израженију стеатозу јетре прати повећана експресија гена за LXR $\alpha$  и PPAR $\gamma$  у јетри BALB/c мишева на HFD исхрани у поређењу са C57Bl/6 мишевима на истом режиму исхране. BALB/c мишеви без обзира на старост и на тип исхране имају значајно веће серумске концентрације укупног холестерола и триглицерида у поређењу са C57Bl/6 мишевима.
3. Неалкохолни стеатохепатитис је израженији код C57Bl/6 мишева на исхрани са високим садржајем масти у односу на BALB/c мишеве и имунске ћелије Th1 имунског одговора посредују у инфламацији јетре која је знатно израженија код C57Bl/6 мишева на HFD исхрани у поређењу са BALB/c мишевима.
4. C57Bl/6 мишеви развијају значајно израженију фиброзу јетре у односу на BALB/c мишеве. Израженију фиброзу јетре C57Bl/6 мишева на HFD исхрани прати повећана хепатична експресија гена који кодирају профиброгене молекуле, проколаген и TGF- $\beta$ .
5. Серумске концентрације IL-6, IL-13 и TGF- $\beta$  су значајно веће код C57Bl/6 мишева на HFD исхрани у поређењу са BALB/c мишевима. Концентрације проинфламаторних IL-6, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ , као и профиброгених IL-33, IL-13 и TGF- $\beta$  су знатно веће у хомогенату ткива јетре C57Bl/6 мишева на HFD исхрани у поређењу са BALB/c мишевима.
6. IL-33/ST2 сигнални пут има значајну улогу у метаболичким поремећајима изазваним гојазношћу. IL-33/ST2 сигнални пут има протективну улогу у развоју гојазности и повећања висцералног масног ткива и развоју метаболичке инфламације у висцералном масном ткиву
7. IL-33/ST2 сигнални пут има утицај на механизме гликорегулације у мишћем моделу гојазности индуковане исхраном са високим садржајем масти и фруктозе. Делеција ST2 је удружена за значајно нижим вредностима гликемије наше код мишева на исхрани са високим садржајем масти.

8. IL-33/ST2 сигнални пут има протективну улогу у развоју метаболичке инфламације у висцералном масном ткиву.
9. IL-33/ST2 сигнални пут промовише развој стеатозе јетре у мишјем моделу гојазности индуковане исхраном са високим садржајем масти и фруктозе. Израженију стеатозу јетре прати повећана експресија гена за LXR $\alpha$ , CD36 и PPAR $\gamma$  у јетри WT BALB/c мишева на исхрани са високим садржајем масти у поређењу са ST2<sup>-/-</sup> BALB/c мишевима на истом режиму исхране.
10. IL-33/ST2 сигнални пут промовише развој инфламације јетре у мишјем моделу гојазности индуковане исхраном са високим садржајем масти и фруктозе.
11. IL-33/ST2 сигнални пут промовише развој фиброзе јетре у мишјем моделу гојазности индуковане исхраном са високим садржајем масти и фруктозе при чему је повећана експресија гена у јетри који кодирају проколаген, IL-33 и IL-13. Присуство IL-33 је неопходно за развој фиброзе јетре и значајно поспешује фиброзу у јетри мишева са доминантним тип 2 имунским одговором.
12. IL-33/ST2 сигнални пут промовише присуство проинфламаторних ћелија природне и стечене имуности у јетри у мишјем моделу гојазности индуковане исхраном са високим садржајем масти и фруктозе.

## СКРАЋЕНИЦЕ

<b>ABCA1</b>	енгл. <i>ATP-binding cassette transporter 1</i>
<b>ALT</b>	аланин трансминаза (енгл. <i>alanine aminotransferase</i> )
<b>AST</b>	аспартат трансминаза (енгл. <i>aspartate transaminase</i> )
<b>Bcl-2</b>	енгл. <i>B-cell lymphoma 2</i>
<b>BCP</b>	1-бромо-3-хлоропропан (енгл. <i>1-bromo-3-chloropropane</i> )
<b>BMI</b>	индекс телесне масе (енгл. <i>body mass index</i> )
<b>BSA</b>	албумин телећег серума (енгл. <i>bovine serum albumin</i> )
<b>C/EBP<math>\alpha</math>,</b>	енгл. <i>CCAAT-enhancer-binding proteins</i>
<b>CCL</b>	енгл. <i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>
<b>CCR</b>	енгл. <i>C-C chemokine receptor</i>
<b>CD</b>	енгл. <i>cluster of differentiation</i>
<b>CD36/FAT</b>	енгл. <i>fatty acid translocase</i>
<b>cDNA</b>	комплементарна дезоксирибонуклеинска киселина (енгл. <i>complementary DNA</i> )
<b>CHOW</b>	енгл. <i>standard-fat diet</i>
<b>CHOW/HF</b>	енгл. <i>Chow/high fructose diet</i>
<b>CHREBP</b>	енгл. <i>carbohydrate response element binding protein</i>
<b>CoA</b>	ацетил коензим А (енгл. <i>acetyl-coenzyme A</i> )
<b>ConA</b>	конкавалино А (енгл. <i>concanavalin A</i> )

<b>CT</b>	енгл. <i>cycle treshold</i>
<b>CXCL</b>	енгл. <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
<b>DCs</b>	дендритичне ћелије (енгл. <i>dendritic cells</i> )
<b>DMEM</b>	енгл. <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
<b>DNA</b>	дезоксирибонуклеинска киселина (енгл. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>ELISA</b>	енгл. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>eRK1</b>	енгл. <i>extracellular signal-regulated kinase 1</i>
<b>ECM</b>	екстрацелуларни матрикс (енгл. <i>extracellular matrix</i> )
<b>EMT</b>	епително мезенхимна транзиција (енгл. <i>epithelial-mesenchymal transition</i> )
<b>FAS</b>	енгл. <i>fatty acyl synthase</i>
<b>FALC</b>	енгл. <i>fat-associated lymphoid cluster cells</i>
<b>FBS</b>	фетални телећи серум (енгл. <i>fetal bovine serum</i> )
<b>FFAs</b>	слободне масне киселина (енгл. <i>free faty acids</i> )
<b>FFPE</b>	енгл. <i>formalin-fixed and paraffin-embedded</i>
<b>FoxP3</b>	енгл. <i>forkhead box P3</i>
<b>FSC/SSC</b>	енгл. <i>forward scattered light/Side-scattered light</i>
<b>HBSS</b>	енгл. <i>Hank's balanced salt solution</i>
<b>HDL</b>	липопротеини велике густине (енгл. <i>high density lipoprotein</i> )

<b>HFD</b>	дијета са високим садржајем масти (енгл. <i>high-fat diet</i> )
<b>HFD/HF</b>	дијета са високим садржајем масти и фруктозе (енгл. <i>High fat diet/high fructose diet</i> )
<b>HOMA-IR</b>	енгл. <i>homeostasis model assessment of insulin resistance</i>
<b>HSCs</b>	јетрине стелатне ћелије (енгл. <i>hepatic stellate cells</i> )
<b>HRP</b>	енгл. <i>horseradish peroxidase</i>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	интерферон- $\gamma$ (енгл. <i>Interferon-<math>\gamma</math></i> )
<b>IL</b>	интерлеукин (енгл. <i>interleukin</i> )
<b>IL-1Ra</b>	IL-1 рецептор антагонист
<b>ILCs</b>	лимфоидне ћелије природне имуности (енгл. <i>innate lymphoid cells</i> )
<b>IP-10</b>	енгл. <i>interferon <math>\gamma</math>-induced protein-10</i>
<b>IRAK1</b>	IL-1R-удружена киназа 1 (енгл. <i>IL-1R-associated kinase 1</i> )
<b>I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math></b>	инхибитор NF- $\kappa$ B- $\alpha$
<b>JNK</b>	C-Jun N-терминалне киназе (енгл. <i>C-Jun N-terminal kinase</i> )
<b>kDa</b>	килодалтона
<b>LDL</b>	енгл. <i>low-density lipoprotein</i>
<b>LPS</b>	липополисахарид (енгл. <i>lipopolysaccharide</i> )
<b>LTB4</b>	енгл. <i>Leukotriene B4</i>
<b>LXR</b>	енгл. <i>Liver X receptor</i>

<b>MAPK</b>	енгл. <i>Ras-mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MCP-1</b>	енгл. <i>monocyte chemotactic protein-1</i>
<b>MHC</b>	енгл. <i>major histocompatibility complex</i>
<b>mRNA</b>	енгл. <i>messenger RNA</i>
<b>myD88</b>	енгл. <i>myeloid differentiation primary-response protein 88</i>
<b>NAFL</b>	неалкохолна масна јетра (енгл. <i>nonalcoholic fatty liver</i> )
<b>NAFLD</b>	неалкохолна масна болест јетре (енгл. <i>nonalcoholic fatty liver disease</i> )
<b>NASH</b>	неалкохолни стеатохепатитис (енгл. <i>nonalcoholic steatohepatitis</i> )
<b>NF-HEV</b>	нуклеарни фактор венула са високим ендотелом (енгл. <i>nuclear factor of high endothelial venules</i> )
<b>NFκB</b>	нуклеарни фактор-κB (енгл. <i>nuclear factor-κB</i> )
<b>NK ћелије</b>	Урођено убилачке ћелије (енгл. <i>Natural killer cells</i> )
<b>NKT ћелије</b>	Урођено убилачке ћелије Т ћелије (енгл. <i>Natural killer T cells</i> )
<b>NO</b>	азот-моноксид (енгл. <i>nitric oxid</i> )
<b>OPN</b>	енгл. <i>Osteopontin</i>
<b>PBS</b>	енгл. <i>Phosphate Buffered Salline</i>
<b>PCR</b>	реакција ланчане полимеризације (енгл. <i>Polimerase Chain Reaction</i> )
<b>PGD2</b>	енгл. <i>Prostaglandin D<sub>2</sub></i>



<b>PI3K- AKT/PKB</b>	енгл. <i>phosphatidylinositol 3-kinase-AKT/protein kinase B</i>
<b>PKC</b>	протеин киназа С (енгл. <i>Protein Kinase C</i> )
<b>PMA</b>	енгл. <i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
<b>PPAR-<math>\gamma</math></b>	енгл. <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
<b>ROS</b>	реактивне кисеоничне врсте (енгл. <i>reactive oxygen species</i> )
<b>RPMI</b>	енгл. <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
<b>qRT-PCR</b>	квантитативна реакција ланчане полимеризације у реалном времену (енгл. <i>Quantitative Real Time-PCR</i> )
<b>SE</b>	стандардна грешка (енгл. <i>standard error</i> )
<b>Shh</b>	енгл. <i>sonic hedgehog</i>
<b>SIGIRR</b>	енгл. <i>Single Ig IL-1-related receptor</i>
<b>SREBP1c</b>	енгл. <i>sterol regulatory element-binding protein 1c</i>
<b>STAT6</b>	енгл. <i>Signal transducer and activator of transcription 6</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	трансформишући фактор раста- $\beta$ (енгл. <i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i> )
<b>Th</b>	помагачки Т лимфоцити (енгл. <i>T helper</i> )
<b>TIR8</b>	енгл. <i>Toll IL-1R-8</i>
<b>TLRs</b>	рецептори слични Toll -у (енгл. <i>Toll-like receptors</i> )
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	фактор некрозе тумора- $\alpha$ (енгл. <i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i> )
<b>TRAF6</b>	енгл. <i>tumour necrosis factor receptor-associated factor-6</i>

<b>VAT</b>	висцерално масно ткиво (енгл. <i>visceral adipose tissue</i> )
<b>VLDL</b>	енгл. <i>Very low-density lipoprotein</i>
<b>WT</b>	мишеви дивљег соја (енгл. <i>wild type</i> )
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	алфа изотип актина (енгл. <i>alpha-smooth muscle actin</i> )

## 7. ЛІТЕРАТУРА

1. Gallagher D, Heymsfield SB, Heo M, Jebb SA, Murgatroyd PR, Sakamoto Y. Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. *The American journal of clinical nutrition*. 2000;72(3):694-701.
2. Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH. Excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *Jama*. 2005;293(15):1861-7.
3. Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet (London, England)*. 2005;366(9492):1197-209.
4. Albuquerque D, Stice E, Rodriguez-Lopez R, Manco L, Nobrega C. Current review of genetics of human obesity: from molecular mechanisms to an evolutionary perspective. *Molecular genetics and genomics : MGG*. 2015;290(4):1191-221.
5. Klein S. Is visceral fat responsible for the metabolic abnormalities associated with obesity?: implications of omentectomy. *Diabetes care*. 2010;33(7):1693-4.
6. Kissebah AH, Vydelingum N, Murray R, Evans DJ, Hartz AJ, Kalkhoff RK, et al. Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1982;54(2):254-60.
7. Pouliot MC, Despres JP, Nadeau A, Moorjani S, Prud'Homme D, Lupien PJ, et al. Visceral obesity in men. Associations with glucose tolerance, plasma insulin, and lipoprotein levels. *Diabetes*. 1992;41(7):826-34.
8. Gastaldelli A, Miyazaki Y, Pettiti M, Matsuda M, Mahankali S, Santini E, et al. Metabolic effects of visceral fat accumulation in type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002;87(11):5098-103.
9. Bjorntorp P. "Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex)*. 1990;10(4):493-6.
10. Kissebah AH, Krakower GR. Regional adiposity and morbidity. *Physiological reviews*. 1994;74(4):761-811.

11. Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes care*. 2005;28(9):2289-304.
12. Mirza MS. Obesity, Visceral Fat, and NAFLD: Querying the Role of Adipokines in the Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *ISRN gastroenterology*. 2011;2011:592404.
13. Gutierrez DA, Puglisi MJ, Hasty AH. Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. *Current diabetes reports*. 2009;9(1):26-32.
14. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(6):2548-56.
15. Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(4):6184-223.
16. Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ. The biology of white adipocyte proliferation. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2001;2(4):239-54.
17. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008;453(7196):783-7.
18. Tchoukalova YD, Votruba SB, Tchkonina T, Giorgadze N, Kirkland JL, Jensen MD. Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(42):18226-31.
19. Reaven GM. Role of Insulin Resistance in Human Disease. *Diabetes*. 1988;37(12):1595-607.
20. Snijder MB, Zimmet PZ, Visser M, Dekker JM, Seidell JC, Shaw JE. Independent and opposite associations of waist and hip circumferences with diabetes, hypertension and dyslipidemia: the AusDiab Study. *International journal of obesity and related metabolic*

disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity.  
2004;28(3):402-9.

21. Snijder MB, Dekker JM, Visser M, Bouter LM, Stehouwer CDA, Yudkin JS, et al. Trunk Fat and Leg Fat Have Independent and Opposite Associations With Fasting and Postload Glucose Levels: The Hoorn Study. *Diabetes care*. 2004;27(2):372-7.
22. Tchkonina T, Tchoukalova YD, Giorgadze N, Pirtskhalava T, Karagiannides I, Forse RA, et al. Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2005;288(1):E267-E77.
23. Bergman RN. Non-esterified fatty acids and the liver: why is insulin secreted into the portal vein? *Diabetologia*. 2000;43(7):946-52.
24. Matsuzawa Y, Shimomura I, Nakamura T, Keno Y, Kotani K, Tokunaga K. Pathophysiology and pathogenesis of visceral fat obesity. *Obesity research*. 1995;3 Suppl 2:187s-94s.
25. Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*. 1997;46(1):3-10.
26. Bavenholm PN, Pigon J, Ostenson CG, Efendic S. Insulin sensitivity of suppression of endogenous glucose production is the single most important determinant of glucose tolerance. *Diabetes*. 2001;50(6):1449-54.
27. Riches FM, Watts GF, Naoumova RP, Kelly JM, Croft KD, Thompson GR. Hepatic secretion of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 studied with a stable isotope technique in men with visceral obesity. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 1998;22(5):414-23.
28. Oakes ND, Cooney GJ, Camilleri S, Chisholm DJ, Kraegen EW. Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. *Diabetes*. 1997;46(11):1768-74.

29. Kelley DE, Mokan M, Simoneau JA, Mandarino LJ. Interaction between glucose and free fatty acid metabolism in human skeletal muscle. *The Journal of clinical investigation*. 1993;92(1):91-8.
30. Nielsen S, Guo Z, Johnson CM, Hensrud DD, Jensen MD. Splanchnic lipolysis in human obesity. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(11):1582-8.
31. Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, et al. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *The New England journal of medicine*. 1993;329(27):1988-92.
32. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106(4):473-81.
33. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(9):2992-3002.
34. Freymond D, Bogardus C, Okubo M, Stone K, Mott D. Impaired insulin-stimulated muscle glycogen synthase activation in vivo in man is related to low fasting glycogen synthase phosphatase activity. *The Journal of clinical investigation*. 1988;82(5):1503-9.
35. Svedberg J, Bjorntorp P, Smith U, Lonroth P. Free-fatty acid inhibition of insulin binding, degradation, and action in isolated rat hepatocytes. *Diabetes*. 1990;39(5):570-4.
36. Oakes ND, Cooney GJ, Camilleri S, Chisholm DJ, Kraegen EW. Mechanisms of Liver and Muscle Insulin Resistance Induced by Chronic High-Fat Feeding. *Diabetes*. 1997;46(11):1768-74.
37. Heilbronn L, Smith SR, Ravussin E. Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2004;28 Suppl 4:S12-21.
38. Taskinen MR. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia*. 2003;46(6):733-49.

39. Mooradian AD. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*. 2009;5(3):150-9.
40. Melmed S, Williams RH. *Williams Textbook of Endocrinology*: Elsevier/Saunders; 2011.
41. Heilbronn LK, Campbell LV. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. *Current pharmaceutical design*. 2008;14(12):1225-30.
42. Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(5):367-77.
43. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(12):1796-808.
44. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(12):1821-30.
45. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of lipid research*. 2005;46(11):2347-55.
46. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annual review of physiology*. 2010;72:219-46.
47. Canello R, Henegar C, Viguier N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*. 2005;54(8):2277-86.
48. Bruun JM, Helge JW, Richelsen B, Stallknecht B. Diet and exercise reduce low-grade inflammation and macrophage infiltration in adipose tissue but not in skeletal muscle in severely obese subjects. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2006;290(5):E961-7.

49. Christiansen T, Richelsen B, Bruun JM. Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects. *International journal of obesity* (2005). 2005;29(1):146-50.
50. Gordon S. Macrophage heterogeneity and tissue lipids. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(1):89-93.
51. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008;13:453-61.
52. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual review of immunology*. 2009;27:451-83.
53. Biswas Subhra K, Mantovani A. Orchestration of Metabolism by Macrophages. *Cell Metabolism*.15(4):432-7.
54. Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes*. 2007;56(1):16-23.
55. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(1):175-84.
56. Nguyen MT, Faveyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, et al. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(48):35279-92.
57. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(1):23-35.
58. Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, Iikutani M, Oya T, Kanatani Y, et al. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes*. 2009;58(11):2574-82.
59. Kintscher U, Hartge M, Hess K, Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, et al. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue



- inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(7):1304-10.
60. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature medicine*. 2009;15(8):914-20.
  61. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nature medicine*. 2009;15(8):921-9.
  62. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1986;136(7):2348-57.
  63. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nature medicine*. 2009;15(8):930-9.
  64. Wu D, Molofsky AB, Liang HE, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science (New York, NY)*. 2011;332(6026):243-7.
  65. Liu J, Divoux A, Sun J, Zhang J, Clement K, Glickman JN, et al. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nature medicine*. 2009;15(8):940-5.
  66. Samad F, Ruf W. Inflammation, obesity, and thrombosis. *Blood*. 2013;122(20):3415-22.
  67. Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nature medicine*. 2012;18(3):363-74.
  68. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science (New York, NY)*. 2011;332(6037):1519-23.
  69. Erickson SK. Nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of lipid research*. 2009;50 Suppl:S412-6.

70. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* (Baltimore, Md). 2012;55(6):2005-23.
71. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* (Baltimore, Md). 2003;37(4):917-23.
72. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clinic proceedings*. 1980;55(7):434-8.
73. Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*. 2012;482(7384):179-85.
74. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-5.
75. Fujii H, Kawada N. Inflammation and fibrogenesis in steatohepatitis. *Journal of gastroenterology*. 2012;47(3):215-25.
76. Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis and the metabolic syndrome. *The American journal of the medical sciences*. 2005;330(6):326-35.
77. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *The Journal of clinical investigation*. 118(3):829-38.
78. Redgrave TG. Formation of cholesteryl ester-rich particulate lipid during metabolism of chylomicrons. *The Journal of clinical investigation*. 1970;49(3):465-71.
79. Li S, Brown MS, Goldstein JL. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(8):3441-6.

80. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(9):1125-31.
81. Uyeda K, Repa JJ. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab*. 2006;4(2):107-10.
82. Tappy L, Le KA. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiological reviews*. 2010;90(1):23-46.
83. Day CP, James OFW. Steatohepatitis: A tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 114(4):842-5.
84. Burt AD, Mutton A, Day CP. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Seminars in diagnostic pathology*. 1998;15(4):246-58.
85. Tiniakos DG. Nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis: histological diagnostic criteria and scoring systems. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2010;22(6):643-50.
86. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2010;16(42):5286-96.
87. Hubscher SG. Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Histopathology*. 2006;49(5):450-65.
88. Yeh MM, Brunt EM. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *American journal of clinical pathology*. 2007;128(5):837-47.
89. Theise ND. Histopathology of alcoholic liver disease. *Clinical Liver Disease*. 2013;2(2):64-7.
90. Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2007;45(6):1366-74.

91. Tacke F, Weiskirchen R. Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques. *Expert review of gastroenterology & hepatology*. 2012;6(1):67-80.
92. Li D, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 1999;14(7):618-33.
93. Carpino G, Morini S, Ginanni Corradini S, Franchitto A, Merli M, Siciliano M, et al. Alpha-SMA expression in hepatic stellate cells and quantitative analysis of hepatic fibrosis in cirrhosis and in recurrent chronic hepatitis after liver transplantation. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2005;37(5):349-56.
94. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(2):209-18.
95. Jou J, Choi SS, Diehl AM. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Seminars in liver disease*. 2008;28(4):370-9.
96. Liu Y, Müller A, Singer MV, Dooley S, Weng H. IL-13 induces liver fibrosis via TGF- $\beta$ -dependent and independent pathways. *Z Gastroenterol*. 2009;47(01):P1\_29.
97. Fichtner-Feigl S, Strober W, Kawakami K, Puri RK, Kitani A. IL-13 signaling through the IL-13 $\alpha$ 2 receptor is involved in induction of TGF- $\beta$ 1 production and fibrosis. *Nature medicine*. 2006;12(1):99-106.
98. Marvie P, Lisbonne M, L'Helgoualc'h A, Rauch M, Turlin B, Preisser L, et al. Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2010;14(6b):1726-39.
99. Milovanovic M, Volarevic V, Radosavljevic G, Jovanovic I, Pejnovic N, Arsenijevic N, et al. IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. *Immunologic research*. 2012;52(1-2):89-99.
100. Miller AM, Asquith DL, Hueber AJ, Anderson LA, Holmes WM, McKenzie AN, et al. Interleukin-33 induces protective effects in adipose tissue inflammation during obesity in mice. *Circulation research*. 2010;107(5):650-8.

101. McHedlidze T, Waldner M, Zopf S, Walker J, Rankin AL, Schuchmann M, et al. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. *Immunity*. 2013;39(2):357-71.
102. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2010;52(5):1836-46.
103. Vonghia L, Michielsen P, Francque S. Immunological mechanisms in the pathophysiology of non-alcoholic steatohepatitis. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(10):19867-90.
104. Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2006;43(2 Suppl 1):S54-62.
105. Thomson AW, Knolle PA. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(11):753-66.
106. Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Pina E, Geller DA. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *The Journal of surgical research*. 2008;147(1):153-9.
107. Tosello-Tramont AC, Landes SG, Nguyen V, Novobrantseva TI, Hahn YS. Kupffer cells trigger nonalcoholic steatohepatitis development in diet-induced mouse model through tumor necrosis factor-alpha production. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(48):40161-72.
108. Miura K, Kodama Y, Inokuchi S, Schnabl B, Aoyama T, Ohnishi H, et al. Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice. *Gastroenterology*. 2010;139(1):323-34.e7.
109. Rivera CA, Adegboyega P, van Rooijen N, Tagalicud A, Allman M, Wallace M. Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of hepatology*. 2007;47(4):571-9.
110. Bertola A, Bonnafous S, Anty R, Patouraux S, Saint-Paul MC, Iannelli A, et al. Hepatic expression patterns of inflammatory and immune response genes associated with obesity and NASH in morbidly obese patients. *PloS one*. 2010;5(10):e13577.

111. Baeck C, Wehr A, Karlmark KR, Heymann F, Vucur M, Gassler N, et al. Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut*. 2012;61(3):416-26.
112. Marra F, Gastaldelli A, Svegliati Baroni G, Tell G, Tiribelli C. Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Trends in molecular medicine*. 2008;14(2):72-81.
113. Choi S, Diehl AM. Role of inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. *Current opinion in gastroenterology*. 2005;21(6):702-7.
114. Henning JR, Graffeo CS, Rehman A, Fallon NC, Zambirinis CP, Ochi A, et al. Dendritic cells limit fibroinflammatory injury in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2013;58(2):589-602.
115. Stefanovic-Racic M, Yang X, Turner MS, Mantell BS, Stolz DB, Sumpter TL, et al. Dendritic cells promote macrophage infiltration and comprise a substantial proportion of obesity-associated increases in CD11c+ cells in adipose tissue and liver. *Diabetes*. 2012;61(9):2330-9.
116. Jiao J, Sastre D, Fiel MI, Lee UE, Ghiassi-Nejad Z, Ginhoux F, et al. Dendritic cell regulation of carbon tetrachloride-induced murine liver fibrosis regression. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2012;55(1):244-55.
117. Kahraman A, Schlattjan M, Kocabayoglu P, Yildiz-Meziletoglu S, Schlensak M, Fingas CD, et al. Major histocompatibility complex class I-related chains A and B (MIC A/B): a novel role in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2010;51(1):92-102.
118. Gao B, Radaeva S, Jeong WI. Activation of natural killer cells inhibits liver fibrosis: a novel strategy to treat liver fibrosis. *Expert review of gastroenterology & hepatology*. 2007;1(1):173-80.
119. Syn WK, Choi SS, Liaskou E, Karaca GF, Agboola KM, Oo YH, et al. Osteopontin is induced by hedgehog pathway activation and promotes fibrosis progression in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2011;53(1):106-15.

120. Syn WK, Witek RP, Curbishley SM, Jung Y, Choi SS, Enrich B, et al. Role for hedgehog pathway in regulating growth and function of invariant NKT cells. *European journal of immunology*. 2009;39(7):1879-92.
121. Gadd VL, Skoien R, Powell EE, Fagan KJ, Winterford C, Horsfall L, et al. The portal inflammatory infiltrate and ductular reaction in human nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2014;59(4):1393-405.
122. Tang Y, Bian Z, Zhao L, Liu Y, Liang S, Wang Q, et al. Interleukin-17 exacerbates hepatic steatosis and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical and experimental immunology*. 2011;166(2):281-90.
123. Harley IT, Stankiewicz TE, Giles DA, Softic S, Flick LM, Cappelletti M, et al. IL-17 signaling accelerates the progression of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2014;59(5):1830-9.
124. Maher JJ, Leon P, Ryan JC. Beyond insulin resistance: Innate immunity in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2008;48(2):670-8.
125. Klemenz R, Hoffmann S, Werenskiold AK. Serum- and oncoprotein-mediated induction of a gene with sequence similarity to the gene encoding carcinoembryonic antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(15):5708-12.
126. Tominaga S. A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor. *FEBS letters*. 1989;258(2):301-4.
127. Dale M, Nicklin MJ. Interleukin-1 receptor cluster: gene organization of IL1R2, IL1R1, IL1RL2 (IL-1Rrp2), IL1RL1 (T1/ST2), and IL18R1 (IL-1Rrp) on human chromosome 2q. *Genomics*. 1999;57(1):177-9.
128. Tominaga S, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Tetsuka T. Molecular cloning of the murine ST2 gene. Characterization and chromosomal mapping. *Biochimica et biophysica acta*. 1991;1090(1):1-8.
129. Iwahana H, Yanagisawa K, Ito-Kosaka A, Kuroiwa K, Tago K, Komatsu N, et al. Different promoter usage and multiple transcription initiation sites of the interleukin-1

- receptor-related human ST2 gene in UT-7 and TM12 cells. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1999;264(2):397-406.
130. Gachter T, Werenskiold AK, Klemenz R. Transcription of the interleukin-1 receptor-related T1 gene is initiated at different promoters in mast cells and fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(1):124-9.
  131. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(2):103-10.
  132. Tago K, Noda T, Hayakawa M, Iwahana H, Yanagisawa K, Yashiro T, et al. Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;285(5):1377-83.
  133. Bergers G, Reikerstorfer A, Braselmann S, Graninger P, Busslinger M. Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene Fit-1 generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor. *The EMBO journal*. 1994;13(5):1176-88.
  134. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005;23(5):479-90.
  135. Pecaric-Petkovic T, Didichenko SA, Kaempfer S, Spiegl N, Dahinden CA. Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood*. 2009;113(7):1526-34.
  136. Lecart S, Lecoite N, Subramaniam A, Alkan S, Ni D, Chen R, et al. Activated, but not resting human Th2 cells, in contrast to Th1 and T regulatory cells, produce soluble ST2 and express low levels of ST2L at the cell surface. *European journal of immunology*. 2002;32(10):2979-87.
  137. Trajkovic V, Sweet MJ, Xu D. T1/ST2--an IL-1 receptor-like modulator of immune responses. *Cytokine & growth factor reviews*. 2004;15(2-3):87-95.
  138. Yanagisawa K, Naito Y, Kuroiwa K, Arai T, Furukawa Y, Tomizuka H, et al. The expression of ST2 gene in helper T cells and the binding of ST2 protein to myeloma-derived RPMI8226 cells. *Journal of biochemistry*. 1997;121(1):95-103.



139. Xu D, Chan WL, Leung BP, Huang F, Wheeler R, Piedrafita D, et al. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. *The Journal of experimental medicine*. 1998;187(5):787-94.
140. Lohning M, Stroehmann A, Coyle AJ, Grogan JL, Lin S, Gutierrez-Ramos JC, et al. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(12):6930-5.
141. Kropf P, Herath S, Tewari R, Syed N, Klemenz R, Muller I. Identification of two distinct subpopulations of *Leishmania* major-specific T helper 2 cells. *Infection and immunity*. 2002;70(10):5512-20.
142. Peritt D, Robertson S, Gri G, Showe L, Aste-Amezaga M, Trinchieri G. Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1998;161(11):5821-4.
143. Carter RW, Sweet MJ, Xu D, Klemenz R, Liew FY, Chan WL. Regulation of ST2L expression on T helper (Th) type 2 cells. *European journal of immunology*. 2001;31(10):2979-85.
144. Kropf P, Schopf LR, Chung CL, Xu D, Liew FY, Sypek JP, et al. Expression of Th2 cytokines and the stable Th2 marker ST2L in the absence of IL-4 during *Leishmania* major infection. *European journal of immunology*. 1999;29(11):3621-8.
145. Nakamura T, Lee RK, Nam SY, Al-Ramadi BK, Koni PA, Bottomly K, et al. Reciprocal regulation of CD30 expression on CD4+ T cells by IL-4 and IFN-gamma. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1997;158(5):2090-8.
146. Mensah-Brown E, Shahin A, Parekh K, Hakim AA, Shamisi MA, Hsu DK, et al. Functional capacity of macrophages determines the induction of type 1 diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1084:49-57.
147. Jovanovic I, Radosavljevic G, Mitrovic M, Juranic VL, McKenzie AN, Arsenijevic N, et al. ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. *European journal of immunology*. 2011;41(7):1902-12.

148. Komai-Koma M, Gilchrist DS, McKenzie AN, Goodyear CS, Xu D, Liew FY. IL-33 activates B1 cells and exacerbates contact sensitivity. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011;186(4):2584-91.
149. Lu J, Kang J, Zhang C, Zhang X. The role of IL-33/ST2L signals in the immune cells. *Immunology Letters*. 2015;164(1):11-7.
150. Baekkevold ES, Roussigne M, Yamanaka T, Johansen FE, Jahnsen FL, Amalric F, et al. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *The American journal of pathology*. 2003;163(1):69-79.
151. Onda H, Kasuya H, Takakura K, Hori T, Imaizumi T, Takeuchi T, et al. Identification of genes differentially expressed in canine vasospastic cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1999;19(11):1279-88.
152. Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PloS one*. 2008;3(10):e3331.
153. Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Gabay C, Palmer G. Interleukin-33 is biologically active independently of caspase-1 cleavage. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(29):19420-6.
154. Luthi AU, Cullen SP, McNeela EA, Duriez PJ, Afonina IS, Sheridan C, et al. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity*. 2009;31(1):84-98.
155. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Current opinion in immunology*. 2005;17(4):359-65.
156. Arshad MI, Piquet-Pellorce C, Samson M. IL-33 and HMGB1 alarmins: sensors of cellular death and their involvement in liver pathology. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2012;32(8):1200-10.
157. Harris HE, Raucci A. Alarmin(g) news about danger: Workshop on Innate Danger Signals and HMGB1. *EMBO Reports*. 2006;7(8):774-8.

158. Bulek K, Swaidani S, Qin J, Lu Y, Gulen MF, Herjan T, et al. The essential role of single Ig IL-1 receptor-related molecule/Toll IL-1R8 in regulation of Th2 immune response. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2009;182(5):2601-9.
159. Moulin D, Donze O, Talabot-Ayer D, Mezin F, Palmer G, Gabay C. Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells. *Cytokine*. 2007;40(3):216-25.
160. Murphy GE, Xu D, Liew FY, McInnes IB. Role of interleukin 33 in human immunopathology. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69 Suppl 1:i43-7.
161. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(2):103-10.
162. Marvie P, Lisbonne M, L'Helgoualc'h A, Rauch M, Turlin B, Preisser L, et al. Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2010;14(6b):1726-39.
163. Arshad MI, Rauch M, L'Helgoualc'h A, Julia V, Leite-de-Moraes MC, Lucas-Clerc C, et al. NKT cells are required to induce high IL-33 expression in hepatocytes during ConA-induced acute hepatitis. *European journal of immunology*. 2011;41(8):2341-8.
164. Volarevic V, Mitrovic M, Milovanovic M, Zelen I, Nikolic I, Mitrovic S, et al. Protective role of IL-33/ST2 axis in Con A-induced hepatitis. *Journal of hepatology*. 2012;56(1):26-33.
165. Erhardt A, Tiegs G. IL-33--a cytokine which balances on a knife's edge? *Journal of hepatology*. 2012;56(1):7-10.
166. Rankin AL, Mumm JB, Murphy E, Turner S, Yu N, McClanahan TK, et al. IL-33 induces IL-13-dependent cutaneous fibrosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;184(3):1526-35.
167. Yanaba K, Yoshizaki A, Asano Y, Kadono T, Sato S. Serum IL-33 levels are raised in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *Clinical rheumatology*. 2011;30(6):825-30.

168. Miller AM. Role of IL-33 in inflammation and disease. *Journal of Inflammation*. 2011;8(1):1-12.
169. Saidi S, Bouri F, Lencel P, Duplomb L, Baud'huin M, Delplace S, et al. IL-33 is expressed in human osteoblasts, but has no direct effect on bone remodeling. *Cytokine*. 2011;53.
170. Wood IS, Wang B, Trayhurn P. IL-33, a recently identified interleukin-1 gene family member, is expressed in human adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;384.
171. Miller AM, Asquith DL, Hueber AJ, Anderson LA, Holmes WM, McKenzie AN, et al. Interleukin-33 induces protective effects in adipose tissue inflammation during obesity in mice. *Circ Res*. 2010;107.
172. Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, et al. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature*. 2010;463.
173. Vasanthakumar A, Moro K, Xin A, Liao Y, Gloury R, Kawamoto S, et al. The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue-resident regulatory T cells. 2015;16(3):276-85.
174. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*: Taylor & Francis Group; 2007.
175. Rutherford A. The life history of the mouse in genetics. *Nature* 2002; 420: 510.
176. Townsend MJ, Fallon PG, Matthews DJ, Jolin HE, McKenzie AN. T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. *The Journal of experimental medicine*. 2000;191(6):1069-76.
177. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2005;41(6):1313-21.

178. Hayashi H, Sakai T. Animal models for the study of liver fibrosis: new insights from knockout mouse models. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2011;300(5):G729-G38.
179. Farrell GC, Mridha AR, Yeh MM, Arsov T, Van Rooyen DM, Brooling J, et al. Strain dependence of diet-induced NASH and liver fibrosis in obese mice is linked to diabetes and inflammatory phenotype. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2013.
180. Pejnovic NN, Pantic JM, Jovanovic IP, Radosavljevic GD, Milovanovic MZ, Nikolic IG, et al. Galectin-3 deficiency accelerates high-fat diet-induced obesity and amplifies inflammation in adipose tissue and pancreatic islets. *Diabetes*. 2013;62(6):1932-44.
181. Heinzl FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *The Journal of experimental medicine*. 1989;169(1):59-72.
182. Hsieh CS, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM. T cell genetic background determines default T helper phenotype development in vitro. *The Journal of experimental medicine*. 1995;181(2):713-21.
183. Stewart D, Fulton WB, Wilson C, Monitto CL, Paidas CN, Reeves RH, et al. Genetic contribution to the septic response in a mouse model. *Shock (Augusta, Ga)*. 2002;18(4):342-7.
184. Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock (Augusta, Ga)*. 2004;22(5):460-6.
185. Nishikawa S, Yasoshima A, Doi K, Nakayama H, Uetsuka K. Involvement of sex, strain and age factors in high fat diet-induced obesity in C57BL/6J and BALB/cA mice. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*. 2007;56(4):263-72.
186. Alexander J, Chang GQ, Dourmashkin JT, Leibowitz SF. Distinct phenotypes of obesity-prone AKR/J, DBA2J and C57BL/6J mice compared to control strains. *International journal of obesity (2005)*. 2006;30(1):50-9.

187. Herberg L, Doppen W, Major E, Gries FA. Dietary-induced hypertrophic--hyperplastic obesity in mice. *Journal of lipid research*. 1974;15(6):580-5.
188. Jo J, Gavrilova O, Pack S, Jou W, Mullen S, Sumner AE, et al. Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput Biol*. 2009;5(3):e1000324.
189. Nishikawa S, Doi K, Nakayama H, Uetsuka K. The effect of fasting on hepatic lipid accumulation and transcriptional regulation of lipid metabolism differs between C57BL/6J and BALB/cA mice fed a high-fat diet. *Toxicologic pathology*. 2008;36(6):850-7.
190. Lin X, Yue P, Chen Z, Schonfeld G. Hepatic triglyceride contents are genetically determined in mice: results of a strain survey. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2005;288(6):G1179-89.
191. Groom JR, Luster AD. CXCR3 in T cell function. *Experimental cell research*. 2011;317(5):620-31.
192. Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, et al. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(4):746-54.
193. Lumeng CN, Maillard I, Saltiel AR. T-ing up inflammation in fat. *Nature medicine*. 2009;15(8):846-7.
194. Rocha VZ, Folco EJ, Sukhova G, Shimizu K, Gotsman I, Vernon AH, et al. Interferon-gamma, a Th1 cytokine, regulates fat inflammation: a role for adaptive immunity in obesity. *Circulation research*. 2008;103(5):467-76.
195. Stolarczyk E, Lord GM, Howard JK. The immune cell transcription factor T-bet. *Adipocyte*. 2014;3(1):58-62.
196. Montgomery MK, Hallahan NL, Brown SH, Liu M, Mitchell TW, Cooney GJ, et al. Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. *Diabetologia*. 2013;56(5):1129-39.

197. Basso F, Freeman L, Knapper CL, Remaley A, Stonik J, Neufeld EB, et al. Role of the hepatic ABCA1 transporter in modulating intrahepatic cholesterol and plasma HDL cholesterol concentrations. *Journal of lipid research*. 2003;44(2):296-302.
198. Nassir F, Wilson B, Han X, Gross RW, Abumrad NA. CD36 Is Important for Fatty Acid and Cholesterol Uptake by the Proximal but Not Distal Intestine. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(27):19493-501.
199. Steneberg P, Sykaras AG, Backlund F, Straseviciene J, Soderstrom I, Edlund H. Hyperinsulinemia enhances hepatic expression of the fatty acid transporter Cd36 and provokes hepatosteatosis and hepatic insulin resistance. *Journal of Biological Chemistry*. 2015.
200. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, et al. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes & development*. 2000;14(22):2819-30.
201. Yoshikawa T, Shimano H, Amemiya-Kudo M, Yahagi N, Hastay AH, Matsuzaka T, et al. Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(9):2991-3000.
202. Liedtke C, Luedde T, Sauerbruch T, Scholten D, Streetz K, Tacke F, et al. Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis & Tissue Repair*. 2013;6:19-.
203. Knight B, Akhurst B, Matthews VB, Ruddell RG, Ramm GA, Abraham LJ, et al. Attenuated liver progenitor (oval) cell and fibrogenic responses to the choline deficient, ethionine supplemented diet in the BALB/c inbred strain of mice. *Journal of hepatology*. 2007;46(1):134-41.
204. Shi Z, Wakil AE, Rockey DC. Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(20):10663-8.
205. Pantic J, Pejnovic N, Radosavljevic G, Jovanovic I, Djukic AL, Arsenijevic N, et al. Delecija gena za ST2 promovise gojaznost i inflamaciju u visceralnom adipoznom tkivu

- BALB/c miševa na dijeti sa visokim sadržajem masti. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*. 2013;14(4):155-60.
206. Ferre P, Foufelle F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2010;12 Suppl 2:83-92.
207. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(5):1343-51.
208. McKenna LA, Jordan F, Brown EA, Huda SS, Mackay VA, Miller AM, et al. The role of interleukin-33 and its receptor ST2 in human pregnancy. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*. 2011;96(Suppl 1):Fa98.
209. Grefhorst A, Parks EJ. Reduced insulin-mediated inhibition of VLDL secretion upon pharmacological activation of the liver X receptor in mice. *Journal of lipid research*. 2009;50(7):1374-83.
210. Beaven SW, Matveyenko A, Wroblewski K, Chao L, Wilpitz D, Hsu TW, et al. Reciprocal regulation of hepatic and adipose lipogenesis by liver X receptors in obesity and insulin resistance. *Cell Metab*. 2013;18(1):106-17.
211. Moran-Salvador E, Lopez-Parra M, Garcia-Alonso V, Titos E, Martinez-Clemente M, Gonzalez-Periz A, et al. Role for PPARgamma in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2011;25(8):2538-50.
212. Negrin KA, Roth Flach RJ, DiStefano MT, Matevossian A, Friedline RH, Jung D, et al. IL-1 signaling in obesity-induced hepatic lipogenesis and steatosis. *PloS one*. 2014;9(9):e107265.
213. Lin SL, Castano AP, Nowlin BT, Lupper ML, Jr., Duffield JS. Bone marrow Ly6Chigh monocytes are selectively recruited to injured kidney and differentiate into functionally distinct populations. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2009;183(10):6733-43.



214. Karlmark KR, Weiskirchen R, Zimmermann HW, Gassler N, Ginhoux F, Weber C, et al. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1<sup>+</sup> monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2009;50(1):261-74.
215. Tacke F. Functional role of intrahepatic monocyte subsets for the progression of liver inflammation and liver fibrosis in vivo. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5(Suppl 1 Proceedings of Fibroproliferative disorders: from biochemical analysis to targeted therapies Petro E Petrides and David Brenner):S27.
216. Mells JE, Fu PP, Sharma S, Olson D, Cheng L, Handy JA, et al. Glp-1 analog, liraglutide, ameliorates hepatic steatosis and cardiac hypertrophy in C57BL/6J mice fed a Western diet. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2012;302(2):G225-35.
217. Machado MV, Michelotti GA, Xie G, de Almeida TP, Boursier J, Bohnic B, et al. Mouse Models of Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis Reproduce the Heterogeneity of the Human Disease. *PloS one*. 2015;10(5):e0127991.
218. Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, McCall S, Bruchette JL, Diehl AM, et al. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*. 2008;48(6):993-9.
219. Abdelmalek MF, Suzuki A, Guy C, Unalp-Arida A, Colvin R, Johnson RJ, et al. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2010;51(6):1961-71.
220. Messier C, Whately K, Liang J, Du L, Puissant D. The effects of a high-fat, high-fructose, and combination diet on learning, weight, and glucose regulation in C57BL/6 mice. *Behavioural brain research*. 2007;178(1):139-45.
221. Rodrigues DF, Henriques MC, Oliveira MC, Menezes-Garcia Z, Marques PE, Souza Dda G, et al. Acute intake of a high-fructose diet alters the balance of adipokine concentrations and induces neutrophil influx in the liver. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2014;25(4):388-94.

222. Ning B, Wang X, Yu Y, Waqar AB, Yu Q, Koike T, et al. High-fructose and high-fat diet-induced insulin resistance enhances atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Nutrition & Metabolism*. 2015;12(1):1-11.
223. Jetic I, Jovicic N, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 Ablation Enhances Liver Steatosis, but Attenuates Inflammation and IL-33-Dependent Fibrosis in Obesogenic Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 2015;21:453-65.
224. Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, Haub S, Bischoff SC, Bergheim I. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2009;50(4):1094-104.
225. Sapp V, Gaffney L, EauClaire SF, Matthews RP. Fructose leads to hepatic steatosis in zebrafish that is reversed by mechanistic target of rapamycin (mTOR) inhibition. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2014;60(5):1581-92.
226. Osawa Y, Hoshi M, Yasuda I, Saibara T, Moriwaki H, Kozawa O. Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes cholestasis-induced liver fibrosis in the mouse through tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production in hepatic stellate cells. *PloS one*. 2013;8(6):e65251.
227. Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF- $\alpha$ -induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2006;290(4):G583-9.
228. Distler JHW, Schett G, Gay S, Distler O. The controversial role of tumor necrosis factor  $\alpha$  in fibrotic diseases. *Arthritis & Rheumatism*. 2008;58(8):2228-35.

## 8. ПРИЛОГ

### 8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

#### УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број:  
РБ

Идентификациони број:  
ИБР

Тип документације: Монографска публикација  
ТД

Тип записа: Текстуални штампани материјал  
ТЗ

Врста рада: Докторска дисертација  
ВР

Аутор: Немања У. Јовичић  
АУ

Ментор/коментор: Проф. др Нада Пејновић  
МН

Наслов рада: Имунометаболички фенотип мишева са  
НР доминантним тип 1 и тип 2 имунским  
одговором у експерименталном моделу  
гојазности

Језик публикације: Српски (ћирилица)  
ЈП

Језик извода: Српски/енглески  
ЈИ

Земља публикавања: Србија  
ЗП

Уже географско подручје: УГП	Србија
Година: ГО	2016.
Издавач: ИЗ	Ауторски репринт
Место и адреса: МС	34000, Крагујевац, Србија, Светозара Марковића 69
Физичи опис рада: ФО	Дисертација има 169 страна, садржи 8 поглавља, 49 слика, 5 табела, 7 схема и 228 референци
Научна област:	Медицина
Научна дисциплина: ДИ	Имунологија
Предметна одредница/ кључне речи ПО	Стеатоза јетре, гојазност, стеатохепатитис, фиброза јетре, IL-33/ST2 осовина
УДК	
Чува се: ЧУ	У библиотеци Факултета медицинских наука у Крагујевцу, 34000 Крагујевац, Србија, Светозара Марковића 69
Важна напомена: МН	
Извод: ИД	

Гојазност је хронично обољење које представља главни фактор ризика за развој метаболичких поремећаја укључујући инсулинску резистенцију, тип 2 дијабетес, неалкохолну масну болест јетре, атеросклерозу и друге болести. Истраживања су јасно показала да имунски систем има значајну улогу у метаболичким поремећајима. Ово откриће укључује и значај инфламације посредоване ћелијама урођене и стечене имуности у развоју

гојазности и метаболичког синдрома. У хуманој популацији и експерименталним животињама јасно је показано да осетљивост на велики број болести може зависити од имуногенетских фактора који поред осталог одређују и преовлађујући тип имунског одговора. Гојазност карактерише постојање инфламације у увећаном висцералном адипозном ткиву и хронична системска инфламација ниског степена, означена као метаболичка инфламација (метафламација), чији молекулски механизми настанка и деловања нису довољно разјашњени. У физиолошким условима, у масном ткиву преовлађује антиинфламаторни M2/Th2 тип имунског одговора, док у гојазном масном ткиву преовлађује проинфламаторни M1/Th1 имунски одговор.

Улога IL-33/ST2 сигналног пута у метаболичким поремећајима изазваним гојазношћу није довољно испитана. Након ослобађања из ћелије, IL-33 остварује своје функције везујући се за специфични рецептор који је по структури хетеродимер који чине ST2 молекул и IL-1R аксесорни протеин (IL-1RacP). Све више студија указује на значајну улогу IL-33 у различитим обољењима јетре. Утврђено је да су повећана експресија IL-33 и његовог рецептора ST2 у позитивној корелацији са развојем фиброзе јетре код људи али и у различитим анималним моделима болести.

Главни циљ студије је био испитивање разлика у развоју гојазности, инфламације у висцералном масном ткиву, гликорегулације, стеатозе, стеатохепатитиса и фиброзе јетре у експерименталном моделу гојазности применом дијете са високим садржајем масти (енгл. high-fat diet, HFD) у C57BL/6 мишева са доминантним Th1 и BALB/c мишева са доминантним Th2 имунским одговором. Такође је испитивана и улога IL-33/ST2 сигналног пута у метаболичким поремећајима изазваним гојазношћу у експерименталном моделу гојазности применом HFD у ST2 дефицијентних BALB/c мишева у односу на Th1 и Th2 доминантне мишеве.

Показане су и описане значајне разлике у имунометаболичком фентипу мишева са доминантним тип 1 и тип 2 одговором. Већи пораст телесне тежине, већа количина масног ткива, виша гликемија, инфламација и фиброза јетре у C57BL/6 мишева је повезана са већом заступљеношћу Th1 ћелија у масном ткиву, проинфламаторних ћелија природне имуности, проинфламаторних и профиброгенних цитокина у јетри. Постоји изражена дисоцијација стеатозе и фиброзе јетре у C57BL/6 и BALB/c мишева, где Th2 доминантан сој има изражену

стеатозу јетре праћену повећаном експресијом гена који учествују у метаболизму масти, док Th1 сој има изражену фиброзу јетре, посебно изражену на исхрани богатој мастима.

Анализирана је и улога IL-33/ST2 сигналног пута и показано је да ова сигнална осовина има многоструке улоге у метаболичким поремећајима изазваним гојазношћу. IL-33/ST2 сигнални пут смањује количину висцералног масног ткива и инфламацију у висцералном масном ткиву, али промовише развој стеатозе јетре, инфламације и фиброзе, највероватније модулацијом регрутације ћелија и метаболичких путева који повезују висцерално адипозно ткиво и ткиво јетре у току развоја гојазности.

Датум прихватања теме од стране ННВ:  
ДП

30.09.2015.

Датум одбране:  
ДО

Чланови комисије:  
КО

Председник:

**Проф. др Миодраг Л. Лукић**, професор емирутус,  
Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област  
Микробиологија и имунологија

Ментор:

**Проф. др Нада Пејновић**, ванредни професор,  
Факултета медицинских наука Универзитета у  
Крагујевцу за ужу научну област Патолошка  
Физиологија

Члан:

**Академик проф. др Небојша Лалић**, редовни  
професор, Медицинског факултета Универзитета у  
Београду за ужу научну област Интерна медицина

Члан:

**Проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор,  
Факултета медицинских наука Универзитета у  
Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и  
имунологија и Основи онкологије

Члан:

**Проф. др Ирена Танасковић**, ванредни професор,  
Факултета медицинских наука Универзитета у  
Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и  
ембриологија

Члан:

**Проф. др Дино Тарабар**, ванредни професор,  
Медицинскиг факултета ВМА Универзитета одбране  
у Београду за ужу научну област Интерна медицина

## 8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION

### UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

Accession number:  
ANO

Identification number:  
INO

Documentation type: Monographic publication  
DT

Type of record: Textual printed material  
TR

Contents code: PhD thesis  
CC

Author: Nemanja U. Jovicic  
AU

Menthor/co-menthor: Prof. dr Nada Pejnović  
MN

Title: Immunometabolic Phenotype in Prototypical Th1-  
And Th2-Type Mouse Strains in High-Fat Diet  
Induced Obesity

Language of text: Serbian (Cyrillic)  
LT

Language of abstract: Serbian/English

Country of publication: Serbia  
CP

Locality of publication: Serbia  
LP

Publication year: 2016.  
PY



Publisher:  
PU Author reprint

Publication place:  
PP 34000, Kragujevac, Serbia,  
Svetozara Markovića 69

Physical description:  
PD Thesis contains 169 pages,  
8 chapters, 49 pictures, 5 tables,  
7 schemes and 228 citations

Scientific field:  
SF Medicine

Scientific discipline:  
SD Immunology

Subject/ key words  
SKW Steatosis, obesity, steatohepatitis,  
liver fibrosis, IL-33/ST2 axis

UDC

Holding data: Library of Faculty of Medical Sciences  
Kragujevac, 34000 Kragujevac,  
Serbia, Svetozara Markovića 69

Note:  
N

Abstract:  
AB

Obesity is chronic condition which represents major risk factor for developing various metabolic disorders including insulin resistance, type 2 diabetes, NAFLD, and atherosclerosis. Studies have shown that Immune reactivity plays an important role in obesity-associated metabolic disorders. Complex immune mechanisms and cytokines orchestrate inflammatory response and metabolic disturbances in this context. It has been shown in humans and rodents that susceptibility to various diseases depends on immunogenetic factors. These factors also determines dominant type of immune response. Obesity is characterized by visceral adipose tissue inflammation and systemic low grade chronic inflammation (metaflammation). Mechanisms of metaflammation are

not completely understood. Anti-inflammatory M2/Th2 type of response dominates in lean adipose tissue, while pro-inflammatory M1/Th1 prevails in obese adipose tissue.

The IL-33/ST2 axis has a protective role in adiposity and atherosclerosis, but its role in obesity-associated metabolic disorders requires further clarification. Interleukin-33 (IL-33), binds to its plasma membrane receptor, heterodimeric complex consisted of membrane-bound ST2L and IL-1R accessory protein. Recent studies suggest that IL-33 plays an important role in liver diseases. Increased expression of IL-33 and its receptor ST2 are in positive correlation with degree of liver fibrosis.

The objective of this study was to compare development of obesity, adipose tissue and liver immunophenotype, glucoregulation, liver steatosis, inflammation and fibrosis in C57Bl/6 and BALB/c mice fed chow and high fat diet. As C57Bl/6 mice preferentially develop Th1 immune response and BALB/c mice Th2-type cytokine polarization, they are regarded as prototypic Th1 and Th2-type mouse strains, respectively. To investigate the role of IL-33/ST2 signaling in obesity-associated metabolic disorders, we used ST2-deficient (ST2) and wild type (WT) BALB/c mice maintained on a high-fat diet (HFD) for 24 weeks.

We demonstrated significant differences in immunometabolic phenotype between two mouse strains. In response to HFD C57Bl/6 mice exhibited higher weight gain, higher adiposity, increased glycemia, increased amount of visceral adipose tissue and more pronounced liver inflammation and fibrosis. These effects were associated with increased number of Th1 immune cells in visceral adipose tissue and proinflammatory cytokines in livers and sera. We show dissociation of liver steatosis and fibrosis related to Th1 and Th2 dominance in mice.

Our findings suggest that the IL-33/ST2 axis may have a complex role in obesity-associated metabolic disorders. Although it is protective in HFD-induced adiposity, the IL-33/ST2 pathway promotes hepatic steatosis, inflammation and fibrosis. IL-33/ST2 signalling attenuates adiposity and inflammation in visceral adipose tissue but promotes liver steatosis, inflammation and fibrosis, most likely by modulating cell trafficking and the metabolic pathways that link adipose and liver tissues in obesity.

Accepted by the Scientific Board on :  
ASB

30.09.2015.

Defended on:  
DE

Thesis defended board:  
(Degree/name/surname/title/faculty)  
DB

President: **Prof. dr Miodrag L. Lukić**, Professor Emeritus  
of University of Kragujevac

Menthor: **Prof. dr Nada Pejnović**, Associate professor of  
Pathophysiology, Faculty of Medical Sciences,  
University of Kragujevac

Member: **Academic, prof. dr Nebojša Lalić**, Professor  
of Internal medicine, Faculty of Medicine,  
University of Belgrade

Member: **Prof. dr Nebojša Arsenijević**, Professor of  
Microbiology and Immunology and Basic oncology,  
Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac

Member: **Prof. dr Irena Tanasković**, Associate professor of  
Histology and embriology, Faculty of Medical Sciences,  
University of Kragujevac

Member: **Prof. dr Dino Tarabar**, Associate professor  
of Internal medicine, Medical Faculty of the Military  
Medical Academy, University of Defence in Belgrade

### 8.3. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА

Др Немања Јовичић је рођен 04.04.1981. у Новом Саду, Србија. Основну школу и Другу крагујевачку гимназију је завршио са одличним успехом у Крагујевцу.

Дипломирао је 20.04.2010. године на Медицинском факултету у Крагујевцу са просечном оценом 8.71. Академске докторске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу уписао је школске 2010/2011. године, изборно подручје Молекулска медицина: имунологија, инфекција, инфламација, а усмени докторски испит је положио 17.07.2013. са оценом 9 (девет). Од 2011. године до 2013. године радио је као сарадник у настави на предмету Хистологија и ембриологија Медицинског факултета у Крагујевцу. Од новембра 2010. године до данас запослен је на Факултету медицинских наука као асистент на предмету Хистологија и ембриологија. Члан је и генерални секретар Друштва имунолога Србије као и Европског удружења за истраживање болести јетре (European Association for the Study of the Liver, EASL).

Кандидат др Немања Јовичић се активно бави научно истраживачким радом у лабораторијама Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Континуиран научно-истраживачки рад се огледа у учешћу на међународним научним пројектима:

1. Galectin-3 in the pathogenesis of type 2 diabetes: the role in  $\beta$ -cell proliferation, insulin secretion and anti-inflammatory mechanisms within islets, IZ73Z0\_152407, Joint research projects (SCOPEs)

Такође учествује као истраживач у пројектима Факултета медицинских наука у Крагујевцу:

1. „ЈП 12-14 Анализа фактора значајних у диференцијалној дијагнози узрочника фебрилних стања непознате етиологије “
2. „ЈП 02-14 Улога галектина-3 у развоју стеатохепатитиса и фиброзе јетре у експерименталном моделу гојазности“
3. „ЈП 03-14 Улога IL-33/ST2 сигналног пута у развоју стеатохепатитиса и фиброзе јетре у експерименталном моделу гојазности“
4. „МП 01/12 Имунопатологија инфламаторних, аутоимунских и малигних обољења“

Немања Јовичић је остварио 34 бода по основу радова објављених у целини у међународним или домаћим часописима, бодованих према члану 177. Статута факултета:

- 3 рада у целини публикована у часописима међународног значаја;
- 5 радова у целини публикована у националним часописима;
- 8 сажетака на међународним научним скуповима.

#### *8.4. СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА*

##### **Научни радови објављени у целини у часописима међународног значаја:**

1. **Jovicic N**, Jeftic I, Jovanovic I, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic LM, Pejnovic N. Differential Immunometabolic Phenotype in Th1 and Th2 Dominant Mouse Strains in Response to High-Fat Feeding. Plos One 2015: 10(7):e0134089; **M21=8 бодова** (IF=3,234)
2. Jeftic I\*, **Jovicic N\***, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 Ablation Enhances Liver Steatosis, but Attenuates Inflammation and IL-33 Dependent Fibrosis in Obesogenic Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. Mol Med 2015: 21:453-465 (\* први аутори - contributed equally); **M21=8 бодова** (IF=4,508)
3. Velickovic M, Pejnovic N, Mitrovic S, Radosavljevic G, Jovanovic I, Kanjevac T, **Jovicic N**, Lukic A. ST2 Deletion Increases Inflammatory Bone Destruction in Experimentally Induced Periapical Lesions in Mice. J Endod. 2015. doi: 10.1016/j.joen.2014.11.017 ; **M21=8 бодова** (IF=3,375)

##### **Научни радови објављени у целини у часописима националног значаја:**

1. Jeftic I, Miletic Kovacevic M, **Jovicic N**, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 deletion enhances visceral adipose tissue inflammation and

- dysregulates glucose metabolism in mice on high-fat diet. Ser J Exp Clin Res 2016; DOI: 10.1515/SJECR-2016-0030 (прихваћен за штампу) **M52=1,5 бодова**
2. **Jovicic N**, Jeftic I, Miletic Kovacevic M, Tanaskovic I, Arsenijevic N, Lukic L M, Pejnovic N. ST2 Deficiency Ameliorates High Fat Diet-Induced Liver Steatosis in BALB/c Mice. Serb J Exp Clin Res 2015; 16:9-20 ; **M52=1,5 бодова**
  3. **Јовичић Н**, Јефтић И, Јовичић У. Улога Б лимфоцита у развоју мултипле склерозе и експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса. PONS - медицински часопис 2013. Volumen 10 No 3; 109-118; **M53=1 бод**
  4. Милетић Ковачевић М, Илић С, Танасковић И, Росић В, **Јовичић Н**, Саздановић М. Хистолошке карактеристике и класификације коарктације аорте. Рационална терапија 2013. Volumen V No 2; 61-73; **M53=1 бод**
  5. Tanasković Stanković S, Sazdanović M, **Jovičić N**, Milovanović J, Lacković M. Modern view on the structure of the vascular extracellular matrix. Med Čas. 2015; 49(1); 13-19; doi:10.5937/mckg 49-6844; **M53=1 бод**

#### **Зборници међународних научних скупова:**

1. **Jovicic N** , Jeftic I , Miletic Kovacevic M , Tanaskovic I, Arsenijevic N , Lukic ML, Pejnovic N. ST2 deletion attenuates high fat diet-induced steatosis, inflammatory cell infiltration and collagen deposition in liver. 4th European Congress of Immunology, Vienna, Austria, September 2015. Abstract book, pp 393; **M34 = 0,5 бодова**
2. Pejnovic N, **Jovicic N**, Jeftic I, Jovanovic I, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic ML. Immunometabolic phenotype of prototypical Th1- and Th2-type mouse strains. 4th European Congress of Immunology, Vienna, Austria, September 2015. Abstract book, pp 428; **M34=0,5 бодова**

3. Jeftic I, **Jovicic N**, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 deletion attenuates inflammation and IL-33 dependent fibrosis in mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. 4th European Congress of Immunology, Vienna, Austria, September 2015. Abstract book, pp 473; **M34 = 0,5 бодова**
4. Jeftic I, **Jovicic N**, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 Ablation Increases High-Fat Diet Induced Obesity, Liver Steatosis and Metaflammation In Adipose Tissue and Pancreatic Islets. EMBO Workshop, Cell biology of animal lectins, Rehovot, Israel, June 2015. (Selected for short talk); **M34 = 0,5 бодова**
5. **Jovicic N**, Pejnovic N, Jeftic I, Jovanovic I, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic ML. Immunometabolic Differences in Prototypical Th1- And Th2-Type Mouse Strains in High-Fat Diet Induced Obesity. 3rd Belgrade EFIS Symposium on Immunoegulation, Arandjelovac, Serbia, May 2015. Abstract book, pp 53; **M34 = 0,5 бодова**
6. Jeftic I, **Jovicic N**, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 Promotes Hepatic Inflammation and Fibrosis in Obesogenic Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. 3rd Belgrade EFIS Symposium on Immunoegulation, Arandjelovac, Serbia, May 2015. Abstract book, pp 54 ; **M34 = 0,5 бодова**
7. **Jovicic N**, Pejnovic N, Jeftic I, Jovanovic I, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic L M. Differential Immunometabolic Phenotype in Th1 and Th2 Dominant Mouse Strains in Response to High-Fat Feeding. EASL Monothematic Conference: Microbiota, Metabolism and NAFLD, Innsbruck, Austria, February 2015. Abstract book, pp 114; **M34 = 0,5 бодова**
8. Jeftic I, **Jovicic N**, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 deficiency exacerbates liver steatosis but protects from steatohepatitis and IL-33/IL-

13 dependent fibrosis in HFD-induced obesity mouse model. EASL Monothematic Conference: Microbiota, Metabolism and NAFLD, Innsbruck, Austria, February 2015. Abstract book, pp 82; **M34 = 0,5 бодова**



## 8.5. THE LIST OF PUBLISHED PAPERS

### The published papers in extenso in international journals:

1. **Jovivic N**, Jeftic I, Jovanovic I, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic LM, Pejnovic N. Differential Immunometabolic Phenotype in Th1 and Th2 Dominant Mouse Strains in Response to High-Fat Feeding. Plos One 2015: 10(7):e0134089; **M21=8 points** (IF=3,234)
2. Jeftic I\*, **Jovivic N\***, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 Ablation Enhances Liver Steatosis, but Attenuates Inflammation and IL-33 Dependent Fibrosis in Obesogenic Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. Mol Med 2015: 21:453-465 (\* први аутори - contributed equally); **M21=8 points** (IF=4,508)
3. Velickovic M, Pejnovic N, Mitrovic S, Radosavljevic G, Jovanovic I, Kanjevac T, **Jovivic N**, Lukic A. ST2 Deletion Increases Inflammatory Bone Destruction in Experimentally Induced Periapical Lesions in Mice. J Endod. 2015. doi: 10.1016/j.joen.2014.11.017 ; **M21=8 points** (IF=3,375)

### The published papers in extenso in national journals:

1. Jeftic I, Miletic Kovacevic M, **Jovivic N**, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 deletion enhances visceral adipose tissue inflammation and dysregulates glucose metabolism in mice on high-fat diet. Ser J Exp Clin Res 2016; DOI: 10.1515/SJECR-2016-0030 (accepted) **M52=1,5 points**
2. **Jovivic N**, Jeftic I, Miletic Kovacevic M, Tanaskovic I, Arsenijevic N, Lukic L M, Pejnovic N. ST2 Deficiency Ameliorates High Fat Diet-Induced Liver Steatosis in BALB/c Mice. Serb J Exp Clin Res 2015; 16:9-20 ; **M52=1,5 points**

3. **Јовичић Н**, Јефтић И, Јовичић У. Улога Б лимфоцита у развоју мултипле склерозе и експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса. PONS - медицински часопис 2013. Volumen 10 No 3; 109-118; **M53=1 point**
4. Милетић Ковачевић М, Илић С, Танасковић И, Росић В, **Јовичић Н**, Саздановић М. Хистолошке карактеристике и класификације коарктације аорте. Рационална терапија 2013. Volumen V No 2; 61-73; **M53=1 point**
5. Tanasković Stanković S, Sazdanović M, **Jovičić N**, Milovanović J, Lacković M. Modern view on the structure of the vascular extracellular matrix. Med Čas. 2015; 49(1); 13-19; doi:10.5937/mckg 49-6844; **M53=1 point**

**The international congress presentations published as abstracts:**

1. **Jovicic N**, Jeftic I, Miletic Kovacevic M, Tanaskovic I, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. ST2 deletion attenuates high fat diet-induced steatosis, inflammatory cell infiltration and collagen deposition in liver. 4th European Congress of Immunology, Vienna, Austria, September 2015. Abstract book, pp 393; **M34 = 0,5 points**
2. Pejnovic N, **Jovicic N**, Jeftic I, Jovanovic I, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic ML. Immunometabolic phenotype of prototypical Th1- and Th2-type mouse strains. 4th European Congress of Immunology, Vienna, Austria, September 2015. Abstract book, pp 428; **M34=0,5 points**
3. Jeftic I, **Jovicic N**, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 deletion attenuates inflammation and IL-33 dependent fibrosis in mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. 4th European Congress of Immunology, Vienna, Austria, September 2015. Abstract book, pp 473; **M34 = 0,5 points**
4. Jeftic I, **Jovicic N**, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 Ablation Increases High-Fat Diet Induced Obesity, Liver Steatosis and Metaflammation In Adipose Tissue and Pancreatic Islets. EMBO Workshop, Cell

biology of animal lectins, Rehovot, Israel, June 2015. (Selected for short talk); **M34 = 0,5 points**

5. **Jovicic N** , Pejnovic N, Jeftic I, Jovanovic I, Radosavljevic G, Arsenijevic N , Lukic ML. Immunometabolic Differences in Prototypical Th1- And Th2-Type Mouse Strains in High-Fat Diet Induced Obesity. 3rd Belgrade EFIS Symposium on Immunoegulation, Arandjelovac, Serbia, May 2015. Abstract book, pp 53; **M34 = 0,5 points**
6. Jeftic I, **Jovicic N**, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 Promotes Hepatic Inflammation and Fibrosis in Obesogenic Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. 3rd Belgrade EFIS Symposium on Immunoegulation, Arandjelovac, Serbia, May 2015. Abstract book, pp 54 ; **M34 = 0,5 points**
7. **Jovicic N**, Pejnovic N, Jeftic I, Jovanovic I, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic L M. Differential Immunometabolic Phenotype in Th1 and Th2 Dominant Mouse Strains in Response to High-Fat Feeding. EASL Monothematic Conference: Microbiota, Metabolism and NAFLD, Innsbruck, Austria, February 2015. Abstract book, pp 114; **M34 = 0,5 points**
8. Jeftic I, **Jovicic N**, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 deficiency exacerbates liver steatosis but protects from steatohepatitis and IL-33/IL-13 dependent fibrosis in HFD-induced obesity mouse model. EASL Monothematic Conference: Microbiota, Metabolism and NAFLD, Innsbruck, Austria, February 2015. Abstract book, pp 82; **M34 = 0,5 points**

## 8.6. ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b><i>I. Аутор</i></b>
Име и презиме: Немања У. Јовичић
Датум и место рођења: 04.04.1981. године у Новом Саду
Садашње запослење: Асистент за ужу научну област Хистологија и ембриологија, Факултет медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу
<b><i>II. Докторска дисертација</i></b>
Наслов: Имунометаболички фенотип мишева са доминантним тип 1 и тип 2 имунским одговором у експерименталном моделу гојазности
Број страница: 169
Број слика: 49
Број библиографских података: 228
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Научна област (УДК): Имунологија
Ментор: Проф. др Нада Пејновић
<b><i>III. Оцена и обрана</i></b>
Датум пријаве теме: 06.03.2015.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-526/23 од 07.10.2015.
Комисија за оцену подобности теме и кандидата:
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емирутус, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник;</li> <li>2. Академик проф. Др Небојша Лалић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан;</li> <li>3. Проф. др Снежана Живанчевић Симоновић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан;</li> </ol>
Комисија за оцену докторске дисертације:
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емирутус, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник;</li> <li>2. Академик проф. Др Небојша Лалић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан;</li> <li>3. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, члан;</li> <li>4. Проф. др Ирена Танасковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан;</li> <li>5. Проф. др Дино Тарабар, ванредни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан.</li> </ol>

Комисија за одбрану докторске дисертације:

1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емирутус, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник;
2. Академик проф. Др Небојша Лалић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан;
3. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, члан;
4. Проф. др Ирена Танасковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан;
5. Проф. др Дино Тарабар, ванредни професор Медицинскиг факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан.

Датум одбране дисертације:

**ОБРАЗАЦ 1.**

**Изјава о ауторству**

Потписани-а Немања Ј. Јовичић  
број уписа 78/2010


**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом  
Инутометаболички Фетални мишева са доминантним тип 1 и тип 2 иррегуларним  
одргозом у експерименталном моделу гојазности

- 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.

У Крагујевцу, 01. 09. 2016.

**Потпис аутора**



**ОБРАЗАЦ 2.**

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

Име и презиме аутора Немања Ј. Јовичић  
Број уписа 78/2010  
Студијски програм ДОКТОРСКЕ АКАДЕМСКЕ СТУДИЈЕ  
Наслов рада Имунометаболски феноли нивоа са доминантним тип 1 и тип 2 инсулинским одговором у експерименталној мишићу говазности  
Ментор Проф. др Нада Реджовић

Потписани Немања Ј. Јовичић

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

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 Крагујевцу.

**Потпис аутора**

У Крагујевцу, 01.09.2010.

**ОБРАЗАЦ 3.**

**Изјава о коришћењу**

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Имунотетаболнички феномен мишева са доминантним тип 1 и тип 2 имунским

одговором у експерименталном моделу годности  
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 Крагујевцу 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, чији је кратак опис дат је на обрасцу број 4.).

**Потпис аутора**

У Крагујевцу, 01. 09. 2016.

