



**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**

# Садржај

1. УВОД.....	8
1.1. ГОЈАЗНОСТ.....	8
1.1.1. Физиолошка и патофизиолошка улога адипозног ткива.....	9
1.1.2. Гојазност и инсулинска резистенција.....	11
1.1.3. Инфламација адипозног ткива изазвана гојазношћу.....	12
1.2. НЕАЛКОХОЛНА МАСНА БОЛЕСТ ЈЕТРЕ.....	17
1.2.1. Стеатоза јетре.....	17
1.2.2. Неалкохолни стеатохепатитис.....	20
1.2.3. Фиброза јетре.....	21
1.2.4. Инфламација у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре.....	23
1.3. IL-33/ST2 СИГНАЛНИ ПУТ.....	26
1.3.1. ST2 молекула - грађа и функција.....	26
1.3.2. IL-33 - структура и функција.....	28
1.3.3. IL-33 - улога у патологији јетре и гојазности.....	30
2. ЦИЉ СТУДИЈЕ.....	34
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	37
3.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ.....	37
3.1.1. Поступак добијања VALB/c мишева са циљаном делецијом гена за ST2 молекула.....	37
3.2. ИНДУКЦИЈА ГОЈАЗНОСТИ ПРИМЕНОМ РЕЖИМА ИСХРАНЕ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ.....	39

3.3. ПРАЋЕЊЕ МЕТАБОЛИЧКИХ ПАРАМЕТАРА .....	41
3.4. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦИТОКИНА У ХОМОГЕНАТУ ТКИВА ЈЕТРЕ И СЕРУМУ .....	42
3.5. АНАЛИЗА МОНОНУКЛЕАРНЕ ПОПУЛАЦИЈЕ ЋЕЛИЈА ВИСЦЕРАЛНОГ АДИПОЗНОГ ТКИВА И ЈЕТРЕ МЕТОДОМ ПРОТОЧНЕ ЦИТОМЕТРИЈЕ .....	43
3.5.1. Изолација ћелија стромалне васкуларне фракције из висцералног адипозног ткива.	44
3.5.2. Изолација мононуклеарних ћелија из јетре.....	44
3.6. ФЕНОТИПСКА И ФУНКЦИОНАЛНА АНАЛИЗА ИЗОЛОВАНИХ МОНОНУКЛЕАРНИХ ЋЕЛИЈА .....	45
3.6.1. Бојење мембранских маркера .....	46
3.6.2. Бојење интрацелуларних маркера и цитокина .....	47
3.7. ХИСТОПАТОЛОШКА АНАЛИЗА ТКИВА ЈЕТРЕ .....	48
3.7.1. Фиксација и дехидратација поступком смрзавања ткива .....	48
3.7.3. Бојење хематоксилином и еозином .....	49
3.7.4. Бојење липида Oil-red O методом .....	50
3.7.5. Бојење колагена Sirius red методом.....	50
3.7.6. Бојење колагена трихромном методом по Masson-у .....	51
3.7.7. Квантификација и скорирање патохистолошких промена у јетри.....	52
3.8. ИМУНОХИСТОХЕМИЈА .....	53
3.9. АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈА ГЕНА У ТКИВУ ЈЕТРЕ МЕТОДОМ КВАНТИТАТИВНЕ ЛАНЧАНЕ РЕАКЦИЈЕ ПОЛИМЕРАЗЕ У РЕАЛНОМ ВРЕМЕНУ .....	55

3.9.1. Изолација RNA из ткива јетре миша.....	55
3.9.2. Реверзна транскрипција RNA у комплементарну DNA .....	56
3.9.3. Квантификација експресије гена .....	56
3.11. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА .....	58
4. РЕЗУЛТАТИ.....	59
4. 1. ИМУНОМЕТАБОЛИЧКИ ФЕНОТИП МИШЕВА ЧИСТОГ СОЈА C57Bl/6 И BALB/c НА СТАНДАРДНОЈ ИСХРАНИ И ИСХРАНИ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ	59
4.1.1.Телесна тежина мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c.....	59
4.1.2. Гликорегулација код мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c .....	60
4.1.3. Карактеристике висцералног масног ткива и липидни профил код мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c .....	64
4.1.4. Фенотипска анализа имунских ћелија у висцералном масном ткиву мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c .....	68
4.1.5. Стеатоза јетре код мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c .....	70
4.1.6. Лобуларна инфилтрација јетре код мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c .....	72
4.1.7. Фиброза јетре код мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c.....	75
4.1.8. Фенотипска анализа имунских ћелија у јетри мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c .....	78
4.1.9. Експресија гена укључених у метаболизам липида и стеатофиброзу у јетри мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c.....	85
4.1.10. Цитокински профил у серуму и јетри мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c .....	88

4. 2. УЛОГА IL-33/ST2 СИГНАЛНОГ ПУТА У ИМУНОМЕТАБОЛИЧКОМ ФЕНОТИПУ BALB/c МИШЕВА СА ДОМИНАНТНИМ ТИП 2 ИМУНСКИМ ОДГВОРОМ НА ИСХРАНИ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ: ПОРЕЂЕЊЕ ИМУНОМЕТАБОЛИЧКИХ ПАРАМЕТАРА ИЗМЕЂУ ДИВЉЕГ СОЈА (енг. wild type- WT) И ST2 ДЕФИЦИЈЕНТНИХ (ST2 <sup>-/-</sup> ) BALB/c МИШЕВА .....	90
4.2.1. Телесна тежина WT и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева .....	90
4.2.2. Гликорегулација код WT и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева.....	91
4.2.3. Карактеристике висцералног масног ткива и липидни профил WT и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева.....	92
4.2.4. Фенотипска анализа имунских ћелија у висцералном масном ткиву код WT и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева .....	94
4.2.5. Стеатоза јетре код WT и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева .....	98
4.2.6. Лобуларна инфилтрација јетре код WT и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева.....	99
4.2.7. Фиброза јетре код BALB/c мишева дивљег соја и ST2 <sup>-/-</sup> мишева.....	102
4.2.8. Фенотипска анализа имунских ћелија у јетри код WT и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева ....	104
4.2.9. Експресија гена укључених у метаболизам липида и стеатофиброзу у јетри код WT и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева.....	107
4.2.10. Цитокински профил у серуму и јетри WT и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева.....	109
4. 3. УЛОГА IL-33/ST2 СИГНАЛНОГ ПУТА У ИМУНОМЕТАБОЛИЧКОМ ФЕНОТИПУ BALB/c МИШЕВА СА ДОМИНАНТНИМ ТИП 2 ИМУНСКИМ ОДГВОРОМ НА ИСХРАНИ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ И ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ ФРУКТОЗЕ: ПОРЕЂЕЊЕ ИМУНОМЕТАБОЛИЧКИХ ПАРАМЕТАРА У ДИВЉЕГ СОЈА (енг. wild type-WT) И ST2 ДЕФИЦИЈЕНТНИХ (ST2 <sup>-/-</sup> ) BALB/c МИШЕВА .....	111

4.3.1. Телесна тежина WT и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева .....	111
4.3.2. Гликорегулација код WT и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева на комбинованом режиму исхране .....	112
4.3.3. Карактеристике висцералног масног ткива WT и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева на комбинованом режиму исхране .....	113
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 .....	116
4.3.5. Стеатоза јетре BALB/c мишева дивљег соја и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева на комбинованом режиму исхране .....	120
4.3.6. Лобуларна инфилтрација јетре код BALB/c мишева дивљег соја и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева на комбинованом режиму исхране .....	121
4.3.7. Фиброза јетре код BALB/c мишева дивљег соја и ST2 <sup>-/-</sup> BALB/c мишева на комбинованом режиму исхране .....	123
5. ДИСКУСИЈА.....	129
5.1. ИМУНОМЕТАБОЛИЧКИ ФЕНОТИП МИШЕВА СА ДОМИНАНТНИМ ТИП 1 И ТИП 2 ИМУНСКИМ ОДГОВОРОМ.....	129
5.1.1. Анализа параметара промене телесне тежине и гликорегулације .....	130
5.1.2. Анализа карактеристика висцералног адипозног ткива и липидног профила.....	131
5.1.2. Инфламација и фенотип имунских ћелија у висцералном адипозном ткиву.....	132
5.1.3. Специфичности соја мишева у развоју стеатозе јетре и метаболизма липида у јетри	133
5.1.4. Специфичности соја мишева у развоју лобуларне инфилтрације јетре и хепатоцелуларног оштећења.....	135

5.1.5 Специфичности соја мишева у развоју фиброзе јетре.....	135
5.1.6 Фенотипска и функционална анализа имунских ћелија у јетри.....	137
5.2. УЛОГА IL-33/ST2 СИГНАЛНОГ ПУТА У ИМУНОМЕТАБОЛИЧКОМ ФЕНОТИПУ BALB/c МИШЕВА СА ДОМИНАНТНИМ ТИП 2 ИМУНСКИМ ОДГВОРОМ НА ИСХРАНИ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ .....	138
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 .....	141
6. ЗАКЉУЧЦИ .....	145
7. ЛИТЕРАТУРА .....	148

## 1. УВОД

Гојазност је хронично обољење које карактерише прекомерно и ектопично накупљање масног ткива у организму и које претставља 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 молекуларни механизми нису довољно разјашњени. У физиолошким условима у масном ткиву преодминира антиинфламаторни М2/Th2 тип имунског одговора, док у гојазном масном ткиву преодминира 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 квадратном 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 огран сачињен од различитих одељака који укључују субкутани депо и антра-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 субкутаним 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 односно липидним капима. Раст адипозног ткива се одвија механизмом хиперплазије ћелија, односно увећањем броја адипоцита 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, односно 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, које 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 резистениција (15). Анатомска локализација висцералног адипозног ткива у великој мери утиче на његову улогу у метаболичким поремећајима. Захваљујући локализацији метаболита, 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). Позитивн енергетски баланс, односно повећани унос нутритијената је праћен 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 се додатно увећава липолиза што додатно 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 и индукује инсулинску резистенцију (26-28). Повећана концентрација циркулишућих слободних масних киселина такође може бити узрочник инсулинске резистенције у периферним ткивима што је показано и код људи 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 липопротеина, стимулацију липогенезе и инхибирање липолизе (15, 32). Метаболички ефекти инсулина су посредовани комплексном мрежом сигналних путева. У овој мрежи све 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 суптимира механизам глуконеогенезе док исти процес додатно појачавају слободне масне

киселине (36). Даљу прогресију инсулинске резистенције прати акумулација липида у хепатоцитима односно стеатозе 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 међи којима су хормони (адипонектин, лептин, резистин и др.) и цитокине као што су интерлеукин-6 (енгл. *interleukin-6*, IL-6), 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 нутритивних стимулуса стимулише продукцију хемокина у адипоцитима висцералног масног ткива међу којима су најзначајнији MCP-1 (енгл. *monocyte chemotactic protein-1*) и LTB<sub>4</sub> (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 поларизују стечени имунски одговор у Th1 правцу (51). Ову популацију макрофага одликује продукција проинфламаторних цитокина 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 MHC молекуле (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 ткива мишева нормалне телесне тежине експримирају гене који одговарају M2 статусу активације, док макрофаги адипозног ткива гојазних мишева карактерише повећана

експресија маркера проинфламаторног, M1 статуса. Ови резултати указују да резидентни макрофази гојазном адипозном ткиву мењају свој поларизациони статус као одговор на промене микросредине ткива (55). у висцералном адипозном ткиву, обе популације макрофага, и M1 и M2, експримирају F4/80 и CD11b маркере, при чему M1 макрофази додатно експримирају и CD11c интегрин (54, 56). У нормалном висцералном адипозном ткиву преовладавају резидентни M2 макрофази који су CD11c<sup>-</sup> и испољавају M2 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 ткиво инфилтрирају M1 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 ткива представљају основни извор проинфламаторних медијатора који узрокују локалне и системске метаболичке поремећаје као и стање системске инфламације. Присуство проинфламаторних макрофага односно поларизација у M1 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, а испитивања инфламације у раном фази гојазности узроковане исхраном са високим садржајем масти су показала да инфилтрација адипозног ткива лимфоцитима претходи моноцитној инфилтрацији, односно да имају улогу у иницијацији инфламације масног ткива (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 пре свега продукција IFN- $\gamma$  и Th2 субпопулацију која продукује IL-4 и IL-13 (62). У адипозном ткиву 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>Т лимфоцита опада.

Показано је и да инфилтрација CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита претходи регрутовању макрофага у развоју инфламације адипозног ткива (60). CD8<sup>+</sup> Т цитотоксични лимфоцити који инфилтрирају адипозно ткиво, затим продукцијом проинфламаторних цитокина стимулишу миграцију и активацију макрофага. Самтра се да CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити имају улогу у иницијацији 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 Т 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 преаћена 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 Т лимфоцита и еозинофила, а истовремено и пораст неутрофила, мастоцита, проинфламаторних Th1 интерферон- $\gamma$  продукујућих лимфоцита и CD8<sup>+</sup> Т цитотоксичних лимфоцита. Хемокини и проинфламаторни цитокини делују

аутокрينو, паракрино и ендокрино и промовишу инфламацију и инсулинску резистенцију у адипозном и другим ткивима (66) (Схема 1).

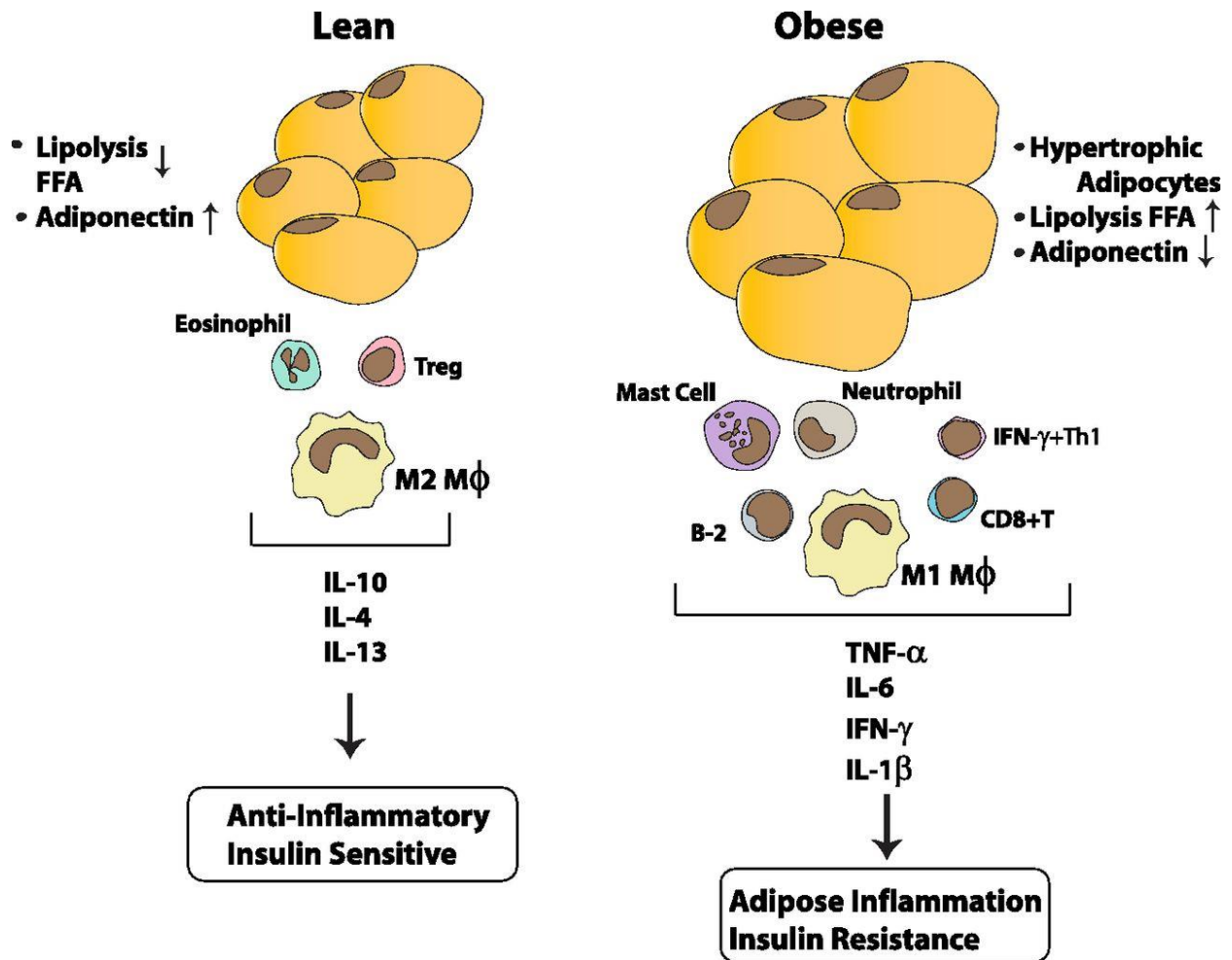


Схема 1. Инфламаторни миље у висцералном адипозном ткиву у физиолошким условима и инфламацији индукованој гојазношћу (кориговано према: Samad F, Ruff W. *Inflammation, obesity, and thrombosis. Blood.* 2013;122(20):3415-22.)



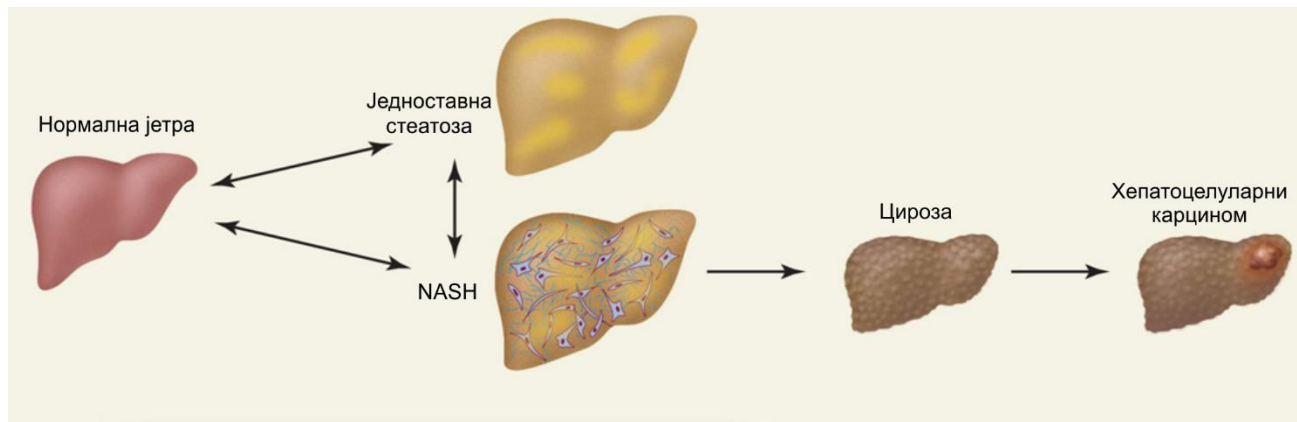
## 1.2. НЕАЛКОХОЛНА МАСНА БОЛЕСТ ЈЕТРЕ

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 хепатичком манифестацијом овог синдрома (71). Појам неалкохолни стеатохепатитис је уведен 1980. године да би описао клинички ентитет који по биохемијски 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, након тога и фиброзу, настаје под утицајем различитих фактора. Сматра се да су најзначајнији фактори оксидативни стрес као последица митохондријалне  $\beta$ -оксидације масних киселина, продукција проинфламаторних цитокина и адипокина од стране висцералног адипозног ткива, ендотоксин из бактерија пореклом из гастроинтестиналног тракта, активација инфламазома (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 једнооставна стеатоза јетре. Стеатоза јетре представља скумулацију 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 у 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

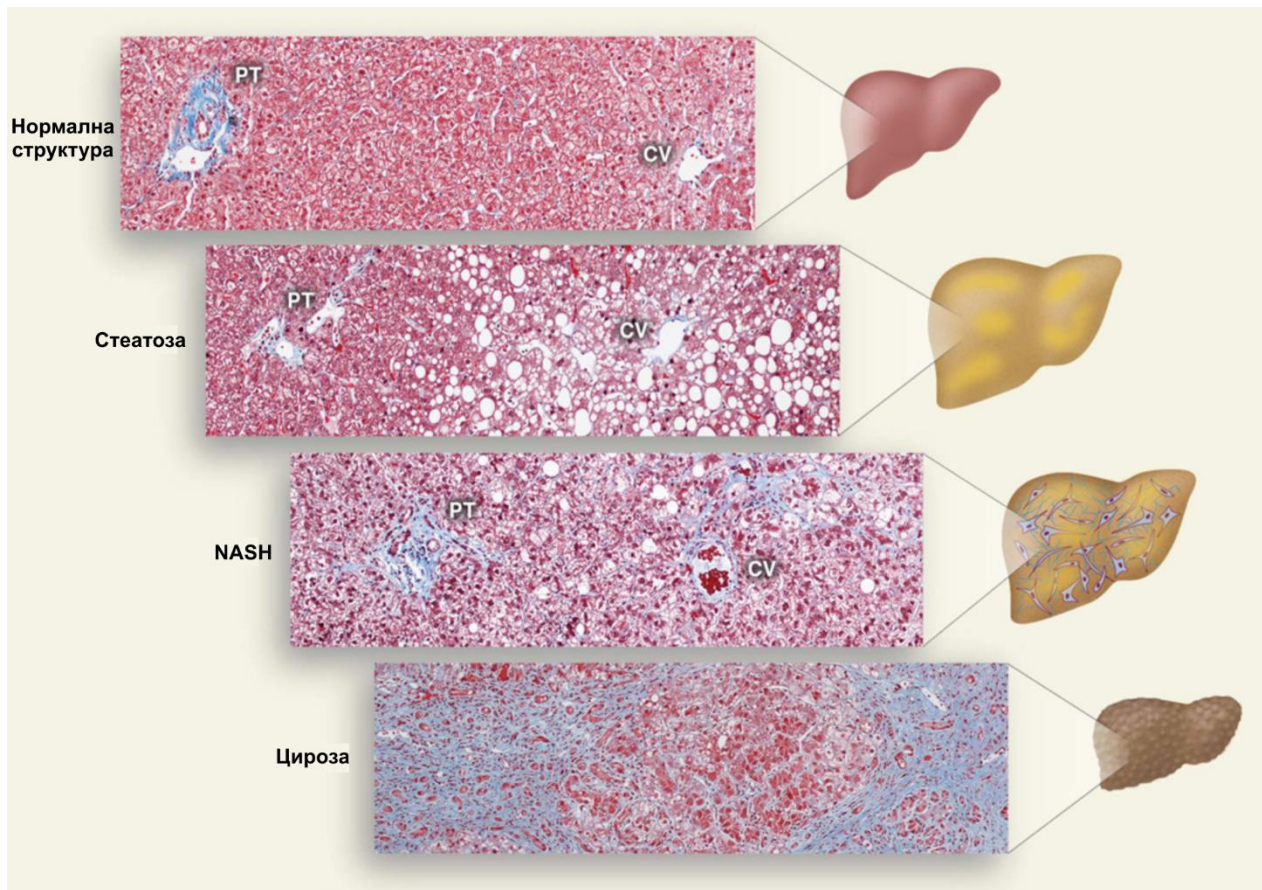
масне киселине које учествују у синтези триглицерида у јетри потичу из три извора, исхране, *de novo* синтезе и из адипозног ткива (68).

Раније је поменуто да постоје различита мишљења у пореклу слободних масних киселина из адипозног ткива. Преовладава мишљење да у развоју 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 овоим 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 наком 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 липипротеин липазом, причему 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 сиглане 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 тазлику 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 и последични знаци репарације ткива односно фиброзе јетре (Схема 3) (84). За постављање дијгнозе 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 балонирани 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 *Mallory-eva* хијалинска телашца (87). У јетри је такође присутан и лобуларни инфилтрат мононуклеарни 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 налаз 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 и развити фиброзу 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 перисинусоидно и перипортално депоновање колегених 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, које синтетишу компоненте екстрацелуларног матрикса и које 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 (енгл. *interleukin-13*, IL-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 процес је 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 је у мњувремену проширен у хипотезу „мултиплих паралелних удараца“ по којој велики број различитих механизма доприноси настанку инфламације у јетри (102). Медијатори запаљења, поготово из висцералног адипозног ткива и црева, иако су 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 и цитокини и механизми имунског одговора (102).

Јетру можемо сматрати 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 велик 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 су

моноцити јетре још у фази ембрионалног развоја населили 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 (енгл. *Lipopolysaccharide*) 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 (енгл. *reactive oxygen species*, ROS) 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- $\alpha$  (енгл. *tumour necrosis factor- $\alpha$* ). 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, деплација 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 андукација активности Купферових ћелија (109, 110).

Макрофаги 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- $\gamma$  (енгл. *Interferon- $\gamma$* , IFN- $\gamma$ ) 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 коју омогућава континуирану продукцију проинфламаторним 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 садржајем 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 ћелије повећава са прогресијом стеатохепатитиса, али да ове ћелије спречавају настанак фиброзе продукцијом IFN $\gamma$  (118). NKT (енгл. *Natural Killer T Cells*) 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 INF- $\gamma$ , 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 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 (енгл. *Forkhead box P3*, FoxP3), 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 генкодира 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-термину (129, 130, 133). Шмиц и сарадници (*Schmitz et al.*) су 2005. године анализирајући чланове IL-1 фамилије цитокина идентификовали лиганд за, до тада, *orphan* ST2 рецептор 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, макрофагима, дендритским ћелијама, базофилним и еозинофилним гранулоцитима, NK и NKT 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 ST2LmRNA конститутивно експримиран у мишијој Th2 ћелијској линији док је у Th1 ћелијској линији одсутан, 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 погоршавати 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 молекула 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 молекула који је представљао лиганд за ST2 рецептор и доделили су му назив интерлеукин 33 (IL-33). Тек након тога је установљено да је овај молекула 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). IL-33.

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-κB (енгл. *nuclear factor-κB*) (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, 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-κB, инхибитор NF-κB-α (IκBα), eRK1 (енгл. *extracellular signal-regulated kinase 1*, eRK1), eRK2, p38 и JNK (енгл. *c-Jun N-terminal kinase*, JNK). Активација NF-κB индукује продукцију IL-1β, 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).

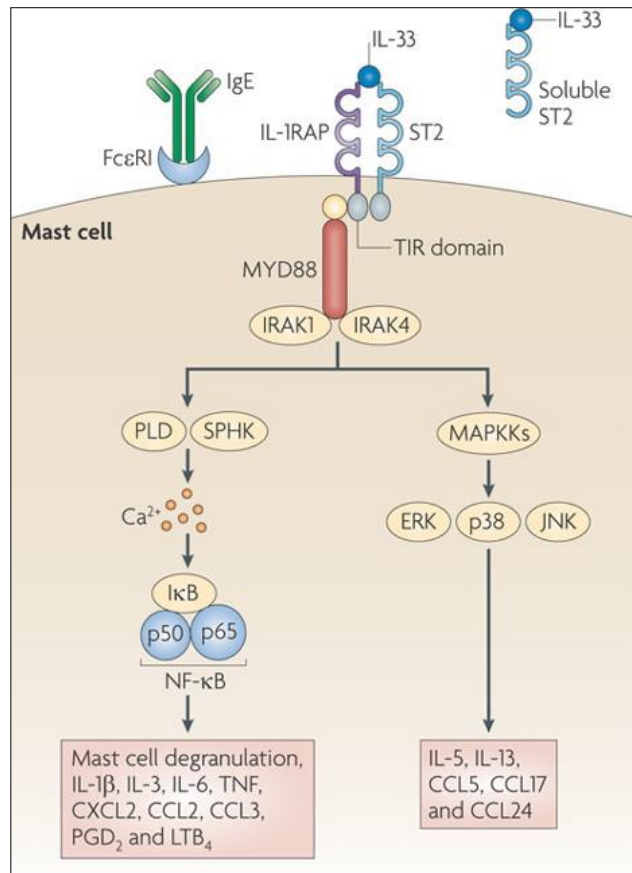


Схема 4. IL-33/ ST2 сигнални пут. (Кориговано према: Liew FY. et al. Nat Rev Immunol. 2010;10(2):103-110.)

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 (енгл. *single Ig IL-1Rrelated molecule*, SIGGR), 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 понављањем применом  $\text{CCl}_4$ , 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 (енгл. *Carbon tetrachloride*,  $\text{CCl}_4$ ) 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 посредована 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 интрахепатично 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 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 (CCL4). 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).

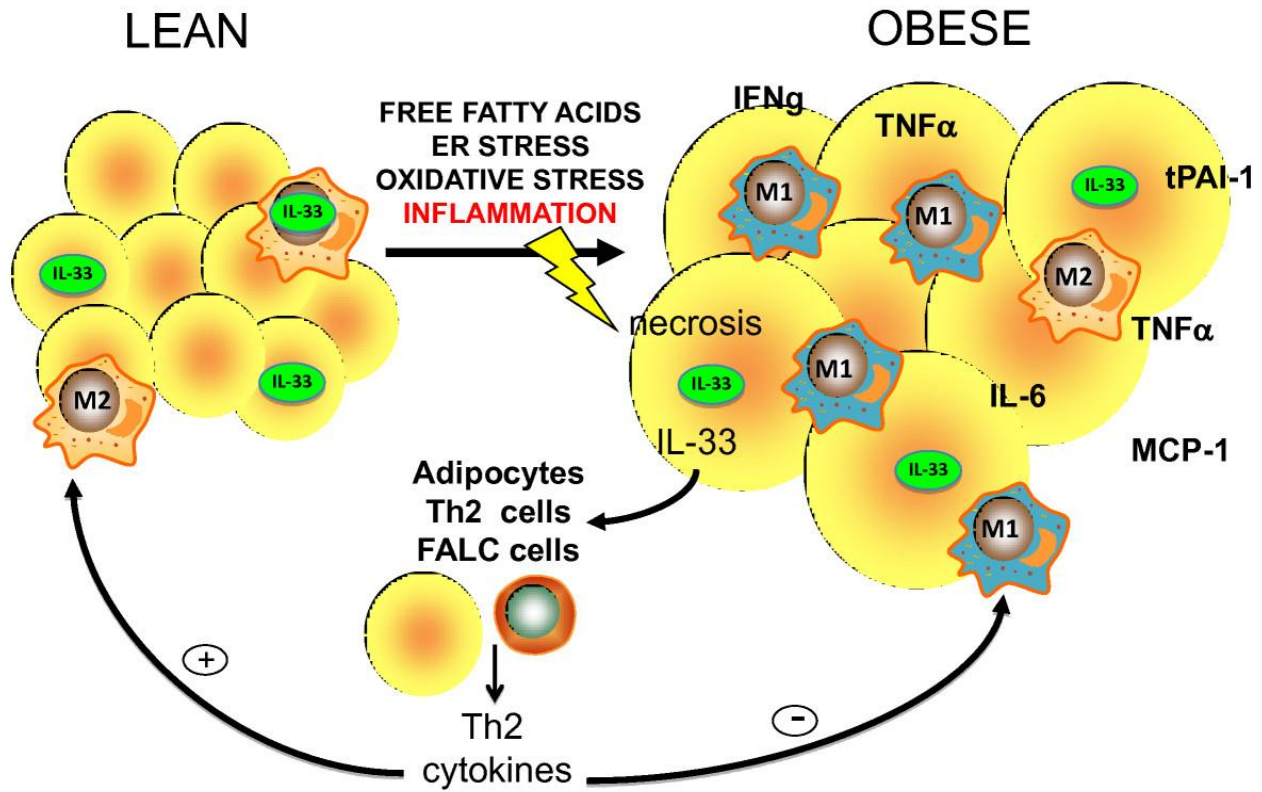


Схема 5. Антиинфламаторна улога IL-33 у инфламацији адипозног ткива. (Кориговано према: Miller MA. et al. *J Inflamm.* 2011;8(1):1-12.)

## 2. ЦИЉ СТУДИЈЕ

### Главни циљеви испитивања:

- 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 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 дијете са високим садржајем масти 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 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 методом квантитативне ланчане реакције полимеразе;

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-/- BALB/c мишева коришћењем селективног хистохемијског бојења. Одредити нивое експресије гена значајних за фиброзу у јетри WT BALB/c и ST2-/- 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 испитивања:**

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*).

Мишеви су одгајани 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.

Спроведено истраживање одобрено је 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. Генетска рекомбинација којом се замењују генетске секвенце између два слична или идентична молекула дезоксирибонуклеинске киселине назива се хомолога рекомбинација. Овим поступком могуће је функционални ген заменити некодирајућим геном, чиме се у потпуности елиминише функција 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 првоуграђује у вектор који 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 убацује у културу ћелија чији медијум садржи неомицин као 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 којима је дошло до случајне интеграције вектора у геном резистентне су на неомицин, али су осетљиве на присуство ганцикловира или FIAU. Супротно, ћелије у којима се одиграла хомолога рекомбинација резистентне су како на неомицин тако и на ганцикловир или FIAU, јер се у њима *TK* ген не инкорпорира у геном. Ова селекција омогућава одабир само преживелих ћелија које носе 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 тако дизајниран 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'-CTTCTTTCTAGATTATTCAGTTGGGGCTATTAAAAGAAGCC, а хомологи 3' крај помоћу нуклеотида: 5'-CCACCGGATCCTTCACAGTTGAAGGTAAGCTCTTGGCTTCAACAAGGG и 5'-GGAAGGAAAAAAGCGGCCGCGATCTCGCTCCACAGAGATGAGGAACGGCC.

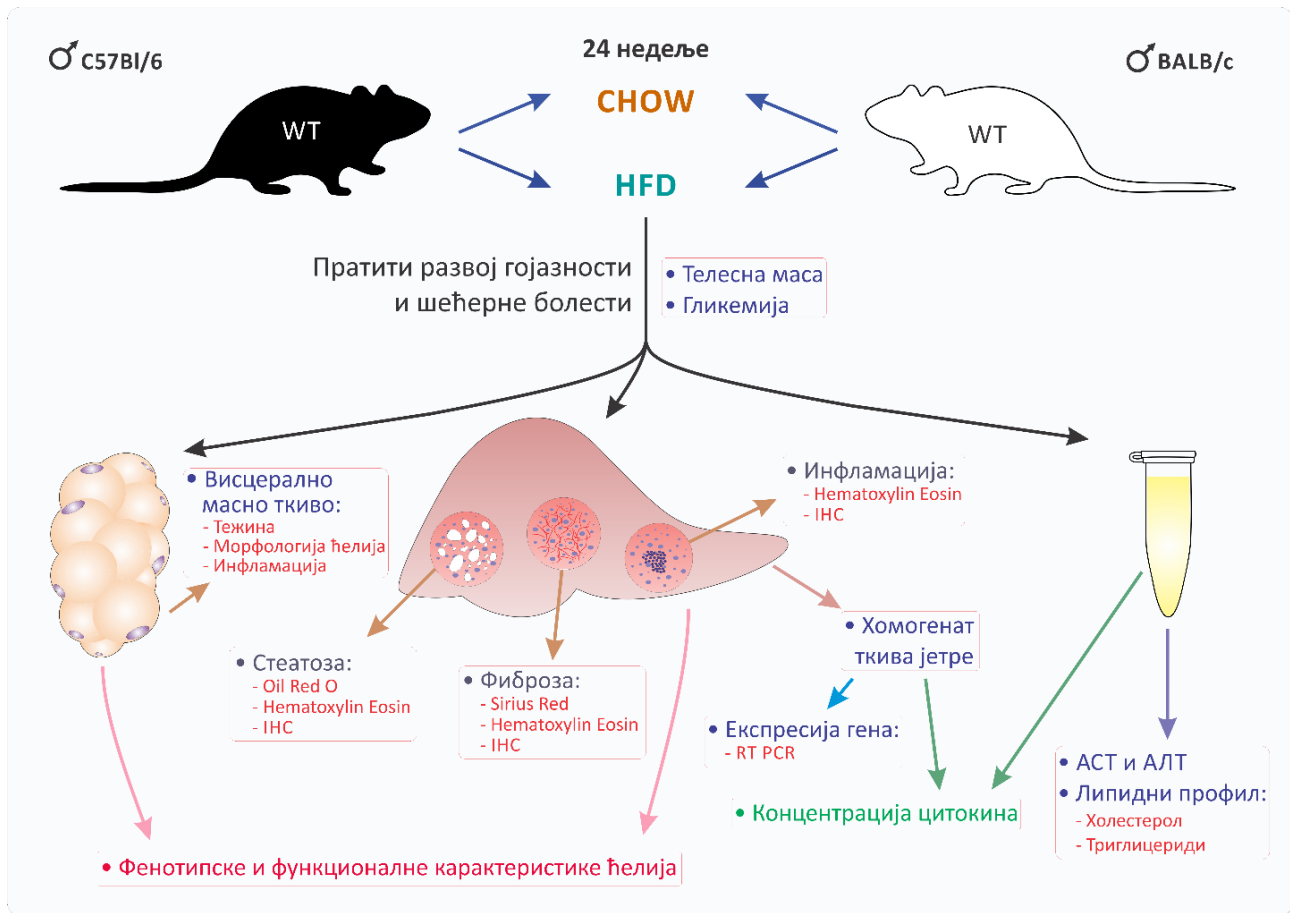
Линеаризован вектор је уграђен у мишије матичне ћелије (E14.1), а хомолога рекомбинација у трансфектованим ћелијама резистентним на аминокликозидни антибиотик, генетицин (G418) је детектована помоћу две технике: PCR (енгл. *Polymerase Chain Reaction*) и *Southern blot* техником. Од 1600 G418 резистентних 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'-TACGTAACCTCCCA-TGTGCAGTCCTTGCTGCC и 5'-GTCACATCA-CAGGCATGAGGG. Један од добијених клонова ембрионалних матичних ћелија у коме се десила хомолога рекомбинација је најпре пропагиран, а затим су добијене ћелије убризгане у 3,5 дана старе бластоцисте BALB/с мишева.

На овакав начин добијени химерични мишеви, хетерозиготни за T1/ST2 ген су потом укрштани са BALB/с 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 профилу 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*

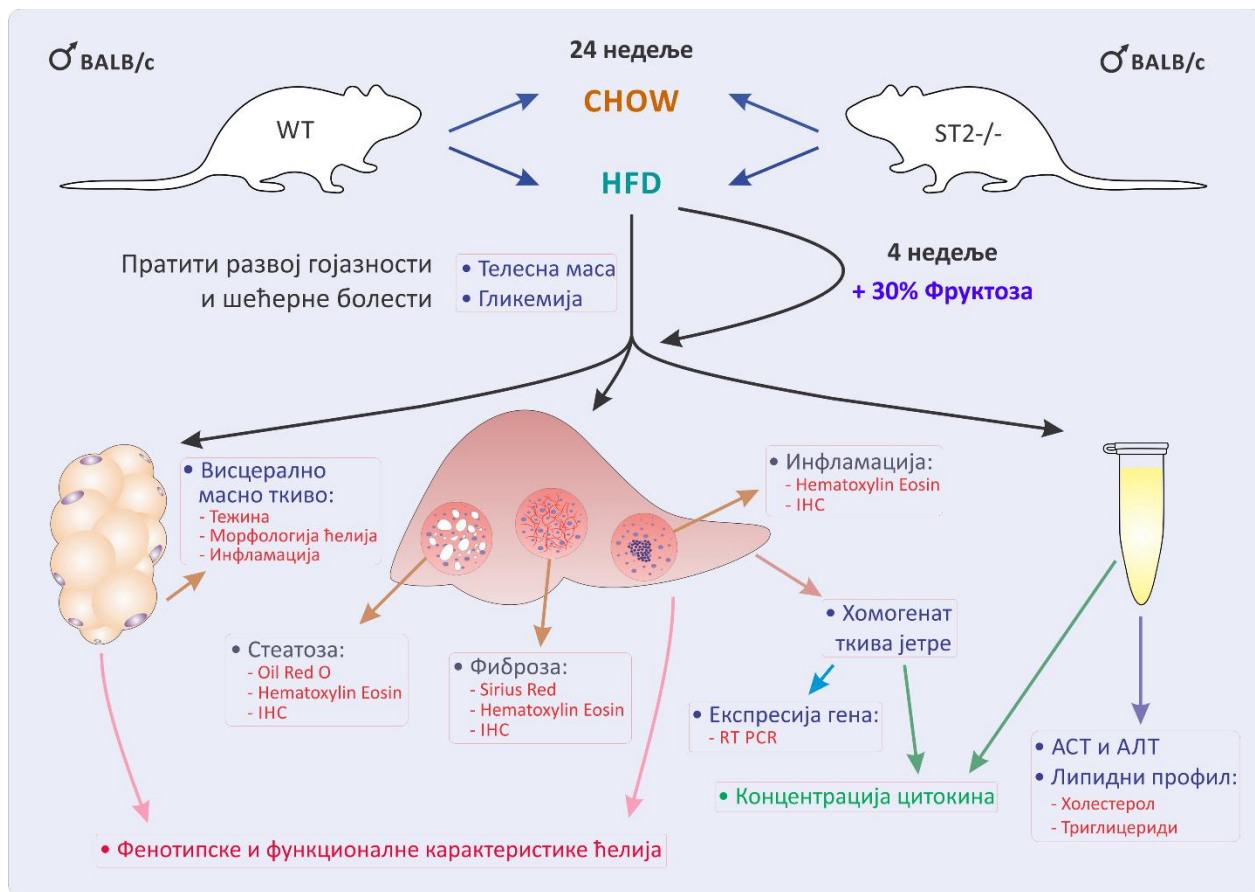
Гојазност код мишева је индукована применом дијете са високим садржајем масти (енгл. *High-fat diet*, HFD, 60% kcal из масти, *Mucedola, Milano, Italy*) у трајању од 24 недеље, почев од 8 недеље старости мишева. Контролна група животиња је стављена на режим исхране стандардном храном (енгл. *Standard-fat 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 (*BETAHEM, 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.** Индуција 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

Сваке четврте недеље, од почетка експеримента, мерено је увећање телесне тежине мерењем сваког појединачног миша као и мерење вредности глукозе у пуној крви. Крв за анализу 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 наносена на тест траку за мерење гликемије (*Accu-Chek Performa Test Strips, Roche, Germany*), а потом је вредност гликемије очитавана на глукомеру (*Accu-Chek Performa, Roche, Germany*) за сваког миша појединачно.

Концентрација секретованог инсулина наште одређивана је након 4 сата гладовања уз помоћ ELISA теста (*Alpco, Salem, NH, USA*) према упутству произвођача. На основу

измерених вредности гликемије наше 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:

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

Серумске концентрације липида (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

Део левог режња изоловане јетре (100 mg) механички је хомогенизован у 0,5 ml PBS-а (енгл. *Phosphate Buffered Saline*) (pH=7,2). Супернатант је издвојен центрифугирањем (10 минута на 4000 rpm) и замрзнут на -20°C за даљу анализу.

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

Према упутству произвођача, стандарди су растворени у PBS-у, тако да почетна концентрација буде 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 припремљених 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) у циљу конструисања стандардне криве и одређивања једначине праве, према којој су израчунате концентрације мерених цитокина.

У бунарчиће микротитар плоча (енгл. *Microtiter plate*) са 96 бунарчића са равним дном (*Sarsted, Germany*) сипано је по 100  $\mu$ l радне концентрације везујућег антитела (енгл. *Capture Antibody*). Плоче су прелепљене адхезивном фолијом (енгл. *ELISA Plate Sealers*) и остављене

преко ноћи на собној температури, након чега су бунарчићи испрани пуфером за испирање (енгл. *Wash buffer*). Затим је у све бунарчиће додат блокирајући пуфер (енгл. *Block Buffer, PBS ca1%-тним BSA*) финалног волумена 300  $\mu$ l и плоче су остављене један сат на собној температури, након чега су опране пуфером за испирање.

Сви узорци су претходно разблажени 10 пута у дејонизованој води. Разблажени узорци и припремљени стандарди су сипани у микротитар плочу, прекривени адхезивном фолијом и остављени два сата на собној температури. Након инкубације и испирања микротитар плоча, у све бунарчиће је додато 100  $\mu$ l радне концентрације антитела за детекцију (енгл. *Detection Antibody*). Плоче су обложене адхезивном фолијом и поново остављене два сата на собној температури. Плоче су потом испране и у бунарчиће је сипано 100  $\mu$ l радне концентрације *Streptavidin-HRP* (енгл. *Streptavidin horseradish peroxidase*). Инкубација на собној температури без директног излагања светлости прекинута је након 20 минута, испирањем микротитар плоча. Затим је у бунарчиће сипано 100  $\mu$ l раствореног супстрата (енгл. *Substrate solution: Color reagent A + Color reagent B*, у размери 1:1). Двадесет минута касније, додато је 50  $\mu$ 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 Mylti-Mode-Detektor, Anthos, Austria*).

Све вредности су умањене за вредности абсорбанце слепе пробе (дејонизована вода). Стандардна крива направљена на основу измерених вредности стандарда коришћена је за израчунавање вредности за сваки појединачни узорак. Мерење свих узорака урађено је у трипликату.

### **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 недење специјалног режима исхране. Мононуклеарне ћелије су изоловане из висцералног адипозног ткива и јетре, а потом су анализирани методом проточне цитометрије. Анализирани су апсолутни број,

процентуална заступљеност, фенотипске и функционалне карактеристике различитих популација ћелија.

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

Тотално висцерално адипозно ткиво је изоловано из перитонеалне шупљине екцизијом из пери-епидидималних и пери-реналних депоа. Изоловано ткиво је у 3 ml PBS-а уситњено маказицама а потом додатно опрано у истом волумену. Након испирања, ткиво је пребачено у епрувету од 50 ml и додато је 4 ml раствора за дигестију: 1 mg/ml колагеназе тип 2 (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) у RPMI-1640 медијуму са 2% BSA (*Sigma Aldrich*). Ткиво је дигестирано у трајању од 1h на 37°C у воденом купатилу уз константно мешање у шејкеру на 100 rpm, а затим пропуштено кроз ћелијско сито величине 40  $\mu\text{m}$  (*BD Biosciences, San Jose, CA, USA*). Добијена ћелијска суспензија је центрифугирана (5 минута 1800 rpm), 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 потом неутрализован са 2 ml RPMI-1640 медијума са 10% FBS-а (енгл. *Fetal bovine serum*). 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 и избројане.

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

За изолацију моноклеара из јетре коришћена је метода механичке разградње јетре. Непосредно преизолације јетре, уклонили смо жучну кесу и урадили перфузију ткива јетре кроз *v.portae* апликовањем 7 ml PBS-а. Јетру смо затим изоловали, уситнили маказицама и нежно је здробили кроз челичну мрежу 200  $\mu\text{m}$ , користећи „полугу“ шприца. Потом смо добијену суспензију пропустили кроз ћелијско сито величине 70  $\mu\text{m}$  (*Cell strainer, BD Pharmingen, USA*) и добијени садржај ресуспендовали у 15 ml RPMI-1640 медијума са 10% FBS-а и два пута центрифугирали на 507 rpm 1 минут на собној температури, без наглог кочења центрифуге (енгл. *with off break settings*). Супернатант који је садржао непаренхимске интрахепатичне ћелије, пребацили смо у нову епрувету и центрифугирали на 1433 rpm 8 минута, на собној температури, са активираним опцијом наглог кочења (енгл.

*with high break settings*). Добијени талог ресуспендовали смо 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, и онда центрифугирали на 1907 грм 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. Након инкубације пуфер за лизирање је неутрализован са 5 ml RPMI-1640 медијума са 10% FBS-а (енгл. *Fetal bovine serum*). Ћелије су потом центрифугиране (10 минута 1400 грм) са активираним опцијом наглог кочења и два пута опране у 4 ml RPMI медијума са 10% FBS-а. Након другог прања, ћелије су ресуспендоване у 1ml RPMI медијума са 10% FBS-а и избројане.

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

У циљу дефинисања фенотипских и функционалних карактеристика различитих субпопулација мононуклеарних ћелија изолованих из висцералног адипозног ткива и јетре, коришћена су анти-мишија моноклонска антитела специфична за различите површинске и интрацелуларне молекуле. За сваку анализу коришћено је  $5 \times 10^5$  ћелија ресуспендованих у 50  $\mu$ 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	Cl: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

Моноклонска антителиа која су коришћена за површинско бојење била су у таквим концентрацијама да њихово финално разблажење у суспензији била у опсегу 1:200. У 50  $\mu$ l претходно растворених антителиа додато је  $5 \times 10^5$  ћелија ресуспендованих у 50  $\mu$ l пуфера за бојење. Након краткотрајног вортексовања узорци су инкубирани 20 минута на температури од +4°C у одсуству светлости. По истеку инкубације, додавањем 2 ml хладног пуфера за бојење и центрифугирањем 5 минута на 1400 rpm, ћелије су опране. Након прања, супернатант је одливан, а ћелије су ресуспендоване у 350  $\mu$ l пуфера за бојење. Након завршеног бојења мембранских маркера ћелије су анализирани на проточном цитометру

*FACSCalibur* (BD Biosciences). За све цитометријске анализе коришћен је регион (енгл. *Gate*) мононуклеарних ћелија у FSC/SSC (енгл. *Forward scattered light/Side-scattered light*) плоту. Током сваке цитометријске анализе, регистровано је најмање 30000 догађаја. Подаци су анализирани помоћ *FlowJo* (*Tree star*) софтвера.

### 3.6.2. Бојење интрацелуларних маркера и цитокина

Бојење интрацелуларних молекула и цитокина изведено је по протоколу *BD Cytofix/Cytoperm*<sup>TM</sup> методе. За стимулацију ћелија коришћени су форбол миристат ацетат (енгл. *Phorbol 12-myristate 13-acetate*, PMA; *Sigma Aldrich*) и јономицин (енгл. *ionomycin*, *Sigma Aldrich*) (Pala P, Hussel T, Openshaw PJM. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Meth* 2000; 243: 107-124). Поменути стимулатори покрећу активност протеин киназе C (енгл. *Protein Kinase C*, PKC) и инфлукс јона калцијума у ћелију, што индукује повећану експресију одређених интрацелуларних молекула и цитокина у ћелији. Оптимално трајање стимулације за већину цитокина износи од 4 до 6 часова, обзиром да дужа инкубација може бити удружена са испољавањем цитотоксичних ефеката поменутих стимулатора.

У току *in vitro* стимулације ћелија коришћени су инхибитори интрацелуларног транспорта протеина, *BD GolgyStop*<sup>TM</sup> BD (садржи моненсин) и *GolgyPlug*<sup>TM</sup> (садржи брефелдин А). Поменути инхибиторима блокира се интрацелуларни транспорт и повећава акумулација цитокина у ендоплазматском ретикулуму и Голџи комплексу, што омогућава интраћелијску детекцију цитокина. Ћелије су инкубиране 6 часова, обзиром да моненсин и брефелдин испољавају дозно и временски завистан цитотоксичан ефекат, па се излагање ћелија овим агенсима мора ограничити.

Након истека времена предвиђеног за активацију, ћелије ( $5 \times 10^5$ ) су центрифугиране 5 минута на 1400 rpm и ресуспендоване у пуферу за бојење. Потом је уследило бојење мембранских маркера према претходно описаној процедури. Ћелије су инкубиране са моноклонским антителима специфичним за површинске маркере 20 минута на температури од +4°C у одсуству светлости. После истека инкубације ћелије су опране у 2 ml хладног пуфера за бојење 5 минута на 1400 rpm. Ћелије су потом фиксиране и пермеабелизоване коришћењем 250 µl раствора за фиксацију и пермеабелизацију (енгл.

*Fixation/Permeabilisation solution, BD Biosciences*) у трајању 20 минута на +4°C. Претходно и пошто је додат раствор за фиксацију и пермеабилizацију сви узорци су добро вортексовани. Након истека инкубације, ћелије су опране у 2 ml 10%-ног пуфера за пермеабилizацију (енгл. *Perm/Wash<sup>TM</sup>, BD Biosciences*) 5 минута на 1400 rpm. Пошто је супернатант одливен, на ћелије су додата антитета за интрацелуларно бојење цитокина растворена у 10%-ном пуферу за пермеабилizацију и инкубирана 30 минута на +4°C. Примарно коњуговано анти мишије антители за IL-13 примењено је да тако да финално разблажење буде 1:100, навести концентрацију. Примарна коњугована анти-мишија антитета за NLRP3 и IL-1 $\beta$  примењена су у финалној концентрацији 1:200, навести концентрацију. 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%-ног пуфера за пермеабилizацију 5 минута на 1400 rpm, ћелије су ресуспендоване у 350  $\mu$ l пуфера за бојење. Непосредно након завршеног бојења ћелије су анализирани 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. Од парафинских калупа направљени су пресеци дебљине 5  $\mu$ m који су бојени хематоксилином и еозином за процену стеатозе и инфилтрације моноклеарних 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. Фиксација и дехидратација поступком смрзавања ткива

Селективна хистохемијска техника, бојење по методи *Oil-Red O* Озахтева примену хистолошких препарата добијених техником смрзнутих резова. *Oil-Red O* бојење се



примењује за детекцију унутарткивних и интрацелуларних масти које се класичним поступком фиксације и дехидратације разлажу. Овај поступак фиксације ткива је брз пошто се њиме избегава класична фиксација формалдехидом и хемијски поступци који је прате. Поступком смрзавања ткива на температури од  $-25^{\circ}\text{C}$  постиже се истовремена фиксација и дехидратација ткива. Техника је такође погодна и за имунохистохемијско бојење. Недостатак технике је оштећење ткива које настаје услед брзе кристализације воде. 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 5-10  $\mu\text{m}$ . Пресеци су нанешени на предметна стакла и складиштени на температури од  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.7.3. Бојење хематоксилином и еозином

Парафински исечци који су претходно загрејани у термостату на  $+56^{\circ}\text{C}$  у трајању од 45 минута су потопљени у ксилол са циљем да се уклони парафин. Затим је урађен 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. Након серије испирања препарати су бојени *Mayer*-овим хематоксилином (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) 10 минута а затим су испрани најпре дестилованом а потом и текућом водом 5 минута. Затим су препарати бојени алкохолним еозином (*Sigma Aldrich*) 2 минута. Након истека времена урађен је поступак дехидратације и просветљивања препарата. За процес дехидратације сада су коришћене 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. На крају је на ткивне исечке нанет канада балзам (*Canada balsam, Centrohem, Србија*) и прекривени су покровним стаклима. Након 24-часовног сушења препарати су анализирани и израђене су фотомикрографијена светлосном микроскопу (*BX51, Olympus, Japan*).

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

Бојење липида на криостатским исечцима ткива јетре миша урађено је *Oil-Red O* методом. Исечци дебљине 5  $\mu\text{m}$  исечени на криотому остављени су да се осуше 30 до 60 минута на собној температури, а потом су фиксирани у 10% формалину 10 минута. Потом су препарати поново осушени на собној температури и затим пажљиво опрани прво у дестилованој а потом и текућој води. Након тога су препарати опрани у 60% изопропранолу (*Isoprpanol, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) и бојени 15 минута у свеже припремљеном 0,5% *Oil-red O* раствору (енгл. *Oil-red O working solution, Sigma Aldrich*). Након бојења препарати су опрани у 60% изопропранолу и обојени *Mayer*-овим хематоксилином (*Sigma Aldrich*) 30 секунди, а затим су испрани текућом водом 3 минута. Препарати су покривени медијумом на бази воде (глицеролом) и покровним стаклима, остављени да се осуше а потом анализирани помоћу светлосног микроскопа (*BX51, Olympus, Japan*) помоћу ког су израђене и фотомикрографије.

#### 3.7.5. Бојење колагена Sirius red методом

Парафински исечци ткива јетре на којима је урађен поступак депарафинизације и рехидратације ткива, испирањем у падајућим концентрацијама алкохола, као што је претходно описано, коришћени су за бојење колагена. Препарати су најпре бојени свеже припремљеним раствором *Weigert*-овог хематоксилина (*Weigert's hematoxylin, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) 8 минута, а затим интензивно опрани најпре 10 минута у текућој а потом и у дестилованој води. Радни раствор *Weigert*-овог хематоксилина добијен је мешањем једнаке количине раствора А и раствора Б (енгл. *Weigert's Iron hematoxylin Set (Solution A & B), Sigma Aldrich*). Након прања у текућој води препарати су бојени *Picro-Sirius red* раствором не краће од 1 сата. Радни раствор *Picro-Sirius red* за бојење добијен је мешањем 0,5 g *Sirius red* боје (енгл. *Direct Red 80, Sigma Aldrich*) и 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). Након прања урађен је поступак дехидратације, у три измене апсолутног алкохола и просветљивања препарата, 5 минута у ксилолу. На крају је на ткивне исечке нанет канада балзам (*Canada balsam, Centrohem, Србија*) и прекривени су покровним стаклима. Крајњи резултат бојења су црвено пребојена колагена влакна и жуто пребојена позадина док се једра боје смеђе до браон. Након 24-часовног сушења препарати су анализирани и усликани на светлосном микроскопу (*BX51, Olympus, Japan*).

### 3.7.6. Бојење колагена трихромном методом по Masson-у

Парафински исечци ткива јетре на којима је урађен поступак депарафинизације и рехидратације ткива, као што је претходно описано, коришћени су за бојење колагена овом методом. Препарати су најпре фиксирани 15 минута у претходно загрејаном на 56°C Буеновом раствору (енгл. *Bouins solution, Sigma Aldrich*). Након фиксације препарати су опрани у текућој води и бојени свеже припремљеним раствором *Weigert*-овог хематоксилина као што је претходно описано. Препарати су затим интензивно опрани најпре 10 минута у текућој, а потом и у дестилованој води. Препарати су затим бојени 10 минута киселим фуксином (енгл. *Biebrich Scarlet Acid Fuchsin, Sigma Aldrich*) и опрани у дестилованој води. Потом су препарати диферентовани у раствору који је добијен мешањем једнаких количина 5%-раствора фосфо-молибденске (енгл. *Phosphomolybdic acid, Sigma Aldrich*) и фосфо-тунгстичне киселине (енгл. *Phosphotungstic acid, Sigma Aldrich*) 5 до 10 минута. Затим се препарати, директно без претходног прања, боје 5 минута раствором плавог анилина (енгл. *Aniline blue Solution, Sigma Aldrich*). Након прања у дестилованој води препарати се диферентују у 1%-ом раствору сирћетне киселине од 2 до 5 минута. Након прања, урађен је поступак дехидратације, у две измене по 5 минута, прво 96%-им а затим и апсолутним алкохолем, након чега је уследило просветљивање препарата 5 минута у ксилолу. На крају је на ткивне исечке нанет канада балзам (*Canada balsam, Centrohem, Србија*) и прекривени су покровним стаклима. Крајњи резултат бојења су плаво пребојена колагена влакна, црвено пребојена цитоплазма, док се једра боје црно. Након 24-часовног сушења препарати су анализирани и усликани на светлосном микроскопу (*BX51, Olympus, Japan*).

### 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. Ми смо се одлучили за коришћење система скорирања и квантификације који је предложен 2005. године од стране *Kleiner*-а и сарадника. 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). Балонирање хепатоцита повезано је са прогресијом болести и једна је од најважнијих патохистолошких карактеристика стеатохепатитиса. Скорирање балонираних хепатоцита је урађено на следећи начин: 0: нема балонираних хепатоцита; 1: присутно неколико балонираних хепатоцита; 2: присуство балонираних хепатоцита изражено. Лобуларни инфилтрат састоји се од мононуклеарних ћелија и обично је благог степена, док је присуство израженијег инфилтрата у корелацији са тежим обликом и прогресијом болести. Скорирање лобуларног инфилтрата је урађено 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. Иако присуство фиброзе није неопходно да би се поставила дијагноза стеатохепатитиса, њено присуство указује на могућност настанка компликација и тежу форму болести. Скорирање фиброзе је урађено 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 2. Додатно је квантификација урађена коришћењем комерцијалног програма *ImageJ* којим је израчунат проценат паренхима који је захваћен стеатозом и фиброзом.

**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 (увеличање x20) 2: 2-4 фокуса (увеличање x20) 3: >4 фокуса (увеличање 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 урађено је коришћењем *Mouse Specific HRP/DAB Detection IHC Kit (Abcam, Cambridge, UK)* за бојење CD68 и  $\alpha$ -SMA према препорученом протоколу.

Парафински исечци ткива јетре дебљине 5  $\mu$ m на којима је урађен поступак депарафинизације и рехидратације ткива, као што је претходно описано, коришћени су за имунохистохемијско бојење. Након завршеног поступка депарафинизације ткивни исечци

су најпре кувани 21 минут у 10mM Na-цитрату, а након хлађења интензивно испрани три пута у PBS-у. На ткивне исечке је потом додато 2-3 капи *Hydrogen Peroxide Block-a* са циљем да се инактивишу ендogene пероксидазе 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 су потом додато 150 µl примарног антитела (у разблажењу 1:200): мишијег анти-мишијег CD68 (*Abcam*) и мишијег анти-мишијег α-SMA (*Abcam*) навести концентрације. Сва примарна антитела су растворена у PBS-у са 1% BSA. Након инкубације са примарним антителима 1 сат у влажној комори на собној температури, препарати су опрани 3 пута по 5 минута у PBS-у са 0,005% Tween-a (*Tween-20, Sigma Aldrich*). Затим су ткивни исечци на којима смо бојили CD68 и α-SMA, инкубирани 30 минута на собној температури у присуству биотинизованог козјег анти-мишијег антитела (енгл. *Biotinylated goat anti mouse IgG*). Након инкубације, препарати су опрани 3 пута по 5 минута у PBS-у са 0,005% Tween-a. 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 µl DAB Chromagen-a у 1ml DAB Substrate-a пуфера. После истека 6 минута, време које је било потребно да се боја развије, препарати су испрани три пута у дестилованој води.

Након испирања, ткивни исечци су бојени хематоксилином по *Mayer-у* 2 минута, а затим интензивно опрани текућом водом. Обојени исечци су покривени воденим медијумом за покривање и покровном љуспицом. Након сушења у трајању од 48h, интензитет и дистрибуција бојења су анализирани и израђене су фотомикрографије помоћу светлосног микроскопа (*BX51, Olympus, Japan*). Број позитивно обојених ћелија израчунали смо након бројања 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

Изолација укупне рибонуклеопротеинске киселине (енгл. *Ribonucleic acid, RNA*) из ткива јетре миша урађена је употребом тризол реагенса, који представља раствор фенола и гуанидин изотиоцианата, а којим се разграђује биолошки материјал и денатуришу протеини.

Део изолованог ткива јетре миша (100 mg) је најпре исецкан маказицама, а потом потпуно механички хомогенизован у 1 ml тризола (енгл. *TRI Reagent® Solution, Applied Biosystems, Foster city, CA, USA*) помоћу ручног хомогенизатора. Хомогенат је потом пребачен у нове епрувете величине 1,5 ml (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) инкубирани 5 минута на собној температури, а потом центрифугиран 10 минута на 12000 rpm на +4°C. У следећем кораку на супернатант је додато 100 µl бромхлорпропана (енгл. *1-Bromo-3-chloropropane, BCP, Sigma Aldrich*), узорци су потом добро вортексовани, инкубирани 15 минута на собној температури и потом центрифугирани 20 минута на 12000rpm на +4°C. Након центрифугирања јасно се раздвајају три слоја, горњи провидни слој, у којем се налази RNA, доњи у којем се налазе протеини и прстен DNA који се налази између њих. Горњи провидни слој је пребачен у нове епрувете у које је додато 500 µl расхлађеног изопропил алкохола чиме је урађена 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. Талог је потом растворен 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 коришћењем 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 урађен је коришћењем кита *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*Applied Biosystems, Foster City, California, USA*), према упутству произвођача. Препис је урађен по следећој процедури: 10 µl узорка који садржи 2 µg укупне RNA изоловане из јетре инкубиран је са 10 µl мастер микса.

Мастер микс је направљен на леду и садржао је: 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*). У епрувете које су садржале RNA додат је мастер микс, садржај је лагано промешан и инкубиран 10 минута на 25°C, затим 120 минута на 37°C, потом је реакција заустављена грејањем 5 минута на 85°C и узорци су потом охлађени на +4°C (*Mastercycler® ep realplex, Eppendorf, Hamburg, Germany*). Овако добијена cDNA коришћена је за квантификацију експресије гена.

### 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 урађена у *Mastercycler® ep realplex* апарату (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) у 96-коморним плочама (*Twin.tec. real time PCR plates 96, Eppendorf*). Волумен од 20 µl реакционе смеше по комори, садржао је: 2 µl узорка cDNA, 10 µl мастер микса (*Power SYBR Green PCR Master Mix(2x), Applied Biosystems*), 2 µl смеше парова прајмера за ген од интереса („*forward*“ и „*reverse*“) и 6 µl воде која не садржи нуклеазе. Финалне концентрације прајмера претходно су оптимизоване за сваки ген. Плоче су потом 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*). Температурни профил реакције qRT-PCR апарат био је: 4 минута



на 95°C, затим 50 циклуса у трајању од по 15 секунди на 95°C и по минут на 62°C. Затим су са циљем одређивања специфичности и идентитета PCR продукта подешени 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. Есеј је рађен у дупликату за сваки узорак. Прајмери за коришћени за амплификацију секвенце гена од интереса приказани су у табели (Табела 5).

**Табела 5. 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

Компаративном  $C_T$  (енгл. *Cycle threshold*,  $C_T$ ) методом ( $\Delta\Delta C_T$ ) одређује се релативна квантификација експресије циљног гена у односу на експресију референте контроле. Ниво експресије анализираних гена нормализован је у односу на ниво експресије гена за β-актин као референтног гена детектованог у идентичном узорку. Као калибратор изабран је један узорак из контролне групе који је био најприближнији средњој вредности свих узорака

контролне групе. Коначан резултат израчуан је у релативним јединицама као N-пута (енгл. *Fold change*) у односу на калибратор према следећој једначини.

$$N_{\text{узорка}} = 2^{-\Delta\Delta\text{СТ}}$$
$$\Delta\Delta\text{СТ} = \Delta\text{СТ}_{\text{узорка}} - \Delta\text{СТ}_{\text{калибратора}}$$
$$\Delta\text{СТ}_{\text{узорка}} = \text{СТ}_{\text{узорка}} - \text{СТ}_{\beta\text{-актина}}$$
$$\Delta\text{СТ}_{\text{калибратора}} = \text{СТ}_{\text{калибратора}} - \text{СТ}_{\beta\text{-актина}}$$

### 3.11. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Подаци су анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 22. Пре статистичке обраде података испитана је правилност расподеле добијених вредности. Ако је број вредности био мањи од 50 за проверу смо користили *Shapiro-Wilk* тест, а за узорак већи од 50 користили смо *Kolmogorov-Smirnov* тест. Уколико су вредности имале правилну расподелу користили смо параметарски *Student*-ов t тест, док смо у случају неправилне расподеле користили 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

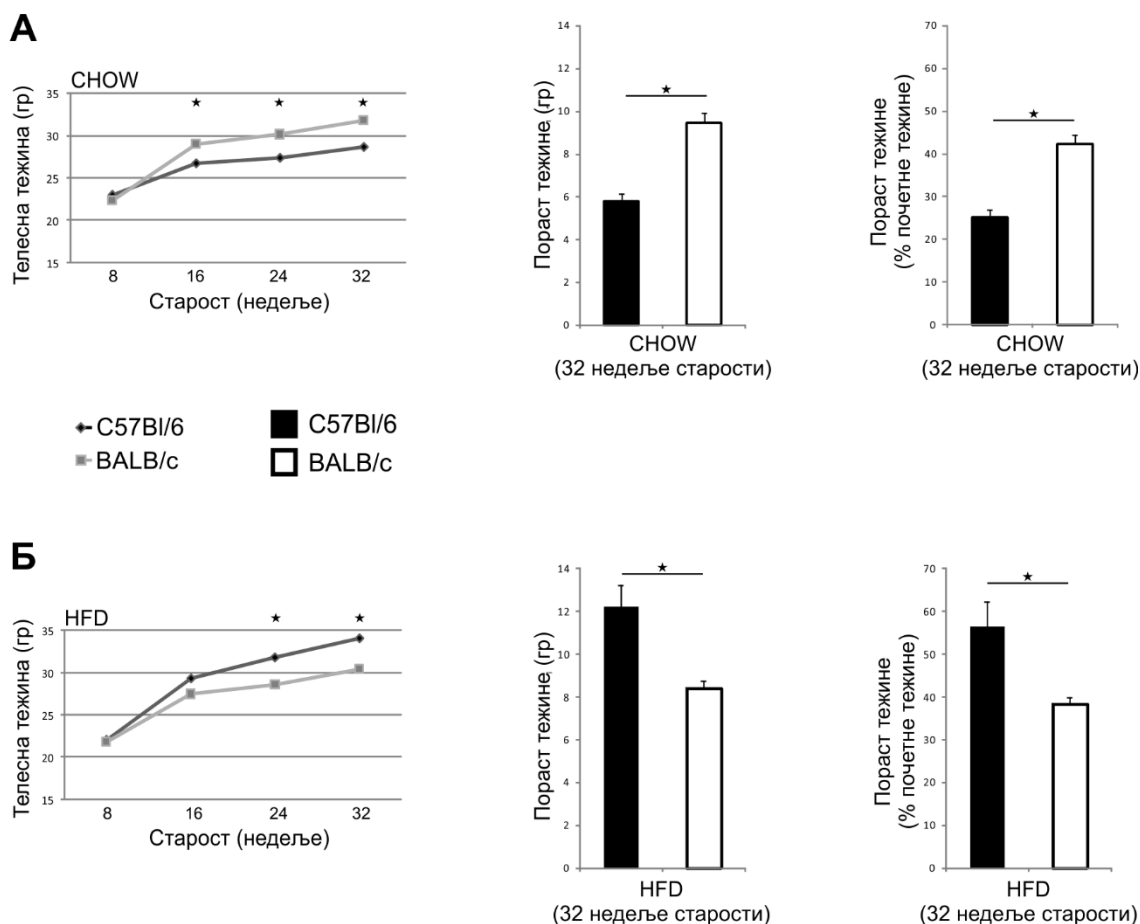
### 4. 1. ИМУНОМЕТАБОЛИЧКИ ФЕНОТИП МИШЕВА ЧИСТОГ СОЈА C57Bl/6 И BALB/c НА СТАНДАРДНОЈ ИСХРАНИ И ИСХРАНИ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ

#### 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, односно мишеви старости 32. недеље, C57Bl/6 соја храњени стандардном лабораторијском 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 старости 32. недеље, односно након 24 недеље храњења храном са високим садржајем масти, мишеви C57Bl/6 соја су имали значајно већу телесну тежину ( $p = 0.039$ ) у односу на BALB/c мишеве на истом режиму исхране. C57Bl/6 мишеви на храни са високим садржајем масти 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

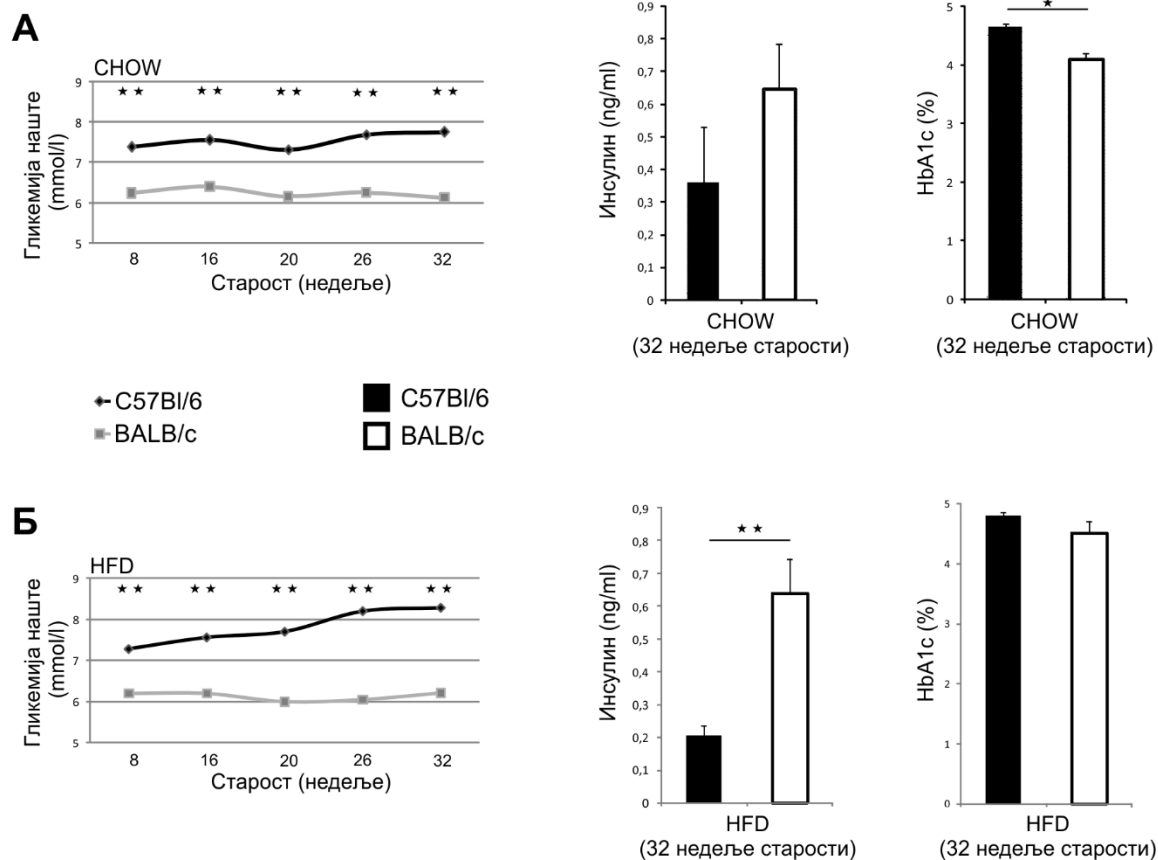
#### 4.1.2. Гликорегулација код мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c

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 стандардном лабораторијском 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 гликолизованог хемоглобина, HbA1c, је био значајно већи у C57Bl/6 мишева у поређењу са BALB/c мишевима на стандардној исхрани ( $p = 0.021$ ) (Слика 2А).

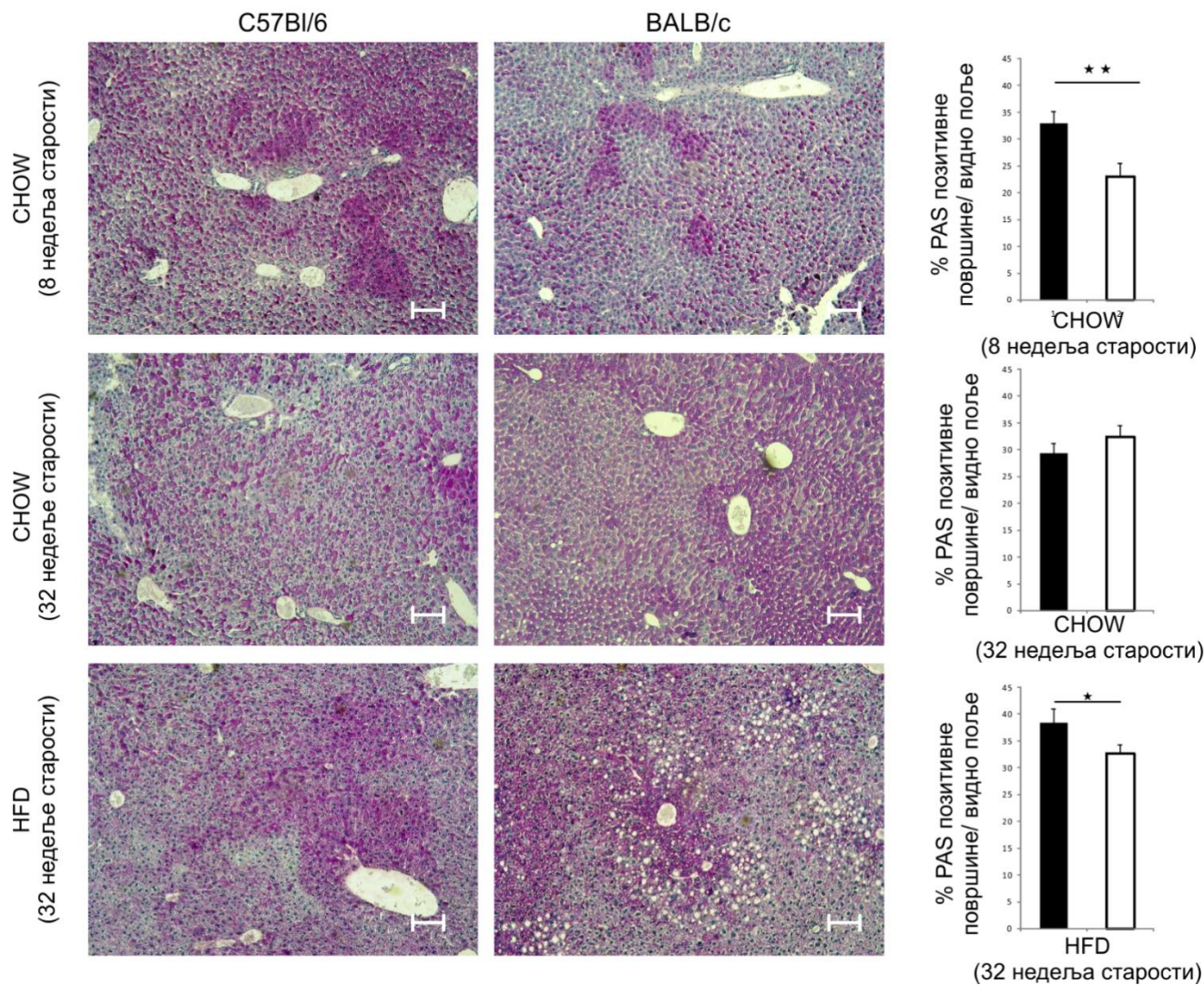
Праћењем параметара гликорегулације у групи мишева храњених храном са високим садржајем масти, показали смо да је гликемија наше такође значајно већа код C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c сој. У групи C57Bl/6 мишева вредности гликемије наше су у току трајања експеримента постепено расле, док тај тренд није примећен у групи BALB/c мишева. Након жртвовања животиња, у 32. недељи старости, мерење серумске концентрације инсулина показало значајно већу концентрацију 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

Интрацелуларну акумулацију гликогена у ћелијама јетре експерименталних животиња испитали смо 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 храњења стандардном лабораторијском храном, у 32. недељи живота, није било разлике у количини акумулираног гликогена у јетри. Код експерименталних животиња храњених храном са високим садржајем масти, 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  $\times 10$ , размера=100 $\mu\text{m}$ ). 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  $\pm$  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, показали смо значајно већу количину висцералног масног ткива у C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c мишеве ( $p = 0.003$ ). У 32. недељи живота C57Bl/6 мишеви храњени стандардном 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 тиква је била још израженија код животиња храњених храном са високим садржајем масти ( $p = 0.008$ ). Процент висцералног масног ткива у односу на телесну тежину је такође био значајно већи код мишева C57Bl/6 соја храњених храном са високим садржајем масти у односу на BALB/c сој ( $p = 0.05$ ) (Табела 6).

Одређивање липидног профила је показало 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 храном стандардном 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 храном са високим садржајем масти ( $p = 0.012$ ,  $p = 0.029$ )(Табела 6).



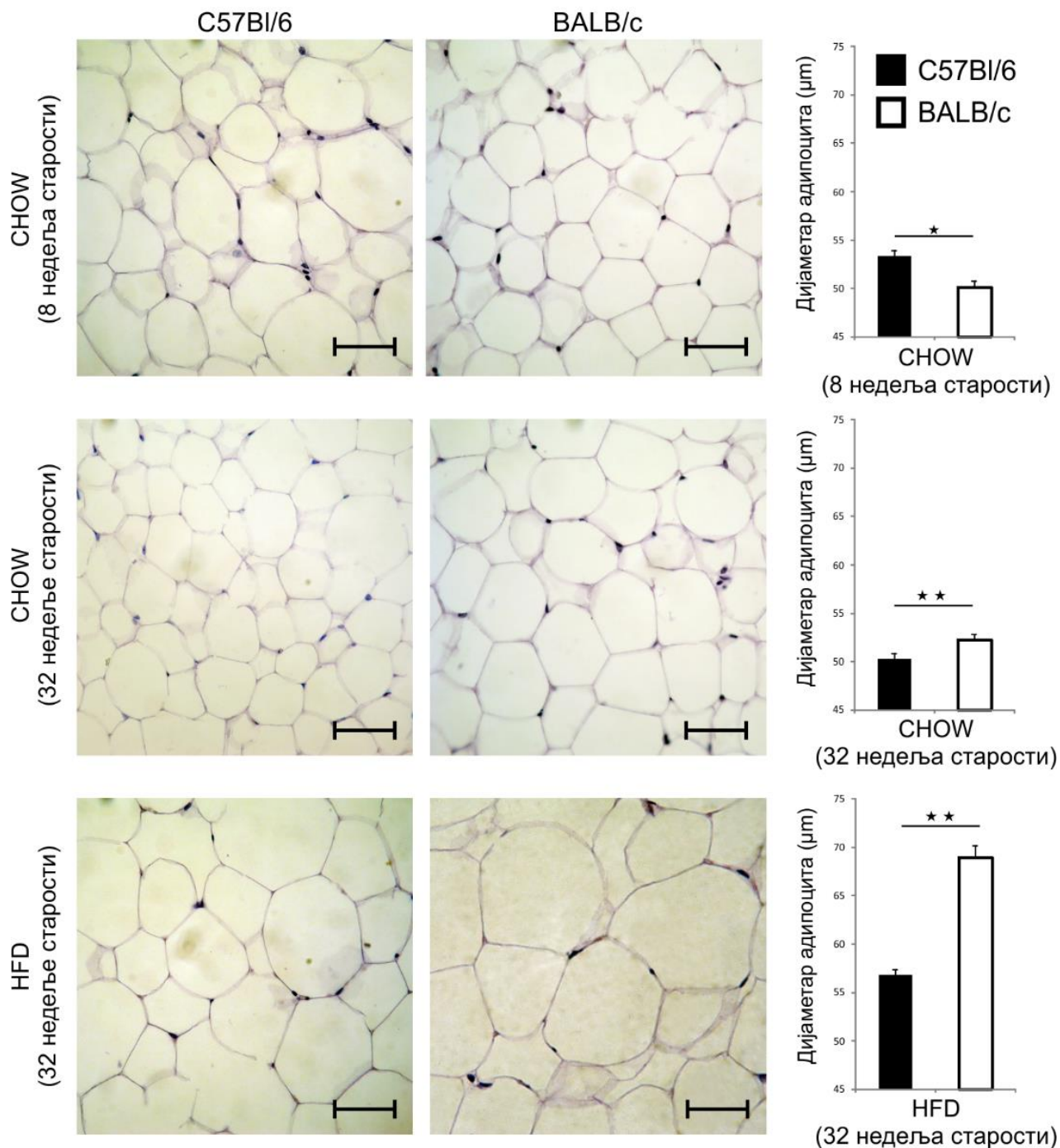
	CHOW 8 недеља старости		CHOW 32 недеље старости		HFD 32 недеље старости	
	C57Bl/6	BALB/c	C57Bl/6	BALB/c	C57Bl/6	BALB/c
Висцерално адипозно ткиво (g)	0,23 ± 0,03	0,17 ± 0,06**	0,46 ± 0,02	0,34 ± 0,04**	1,74 ± 0,24	0,70 ± 0,08**
Висцерално адипозно ткиво(% телесне тежине)	0,98 ± 0,13	0,70 ± 0,23	1,53 ± 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 6. 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

Испитивали смо и морфолошке карактеристике висцералног адипозног ткива експерименталних животиња мерењем величине адипоцита на парафинским исечцима бојеним хематоксилин еозином. Приближну величину адипоцита одредили смо 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 стандардном лабораторијском 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 храном са повећаном количином масти. 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 храном са високим садржајем масти 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, 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).

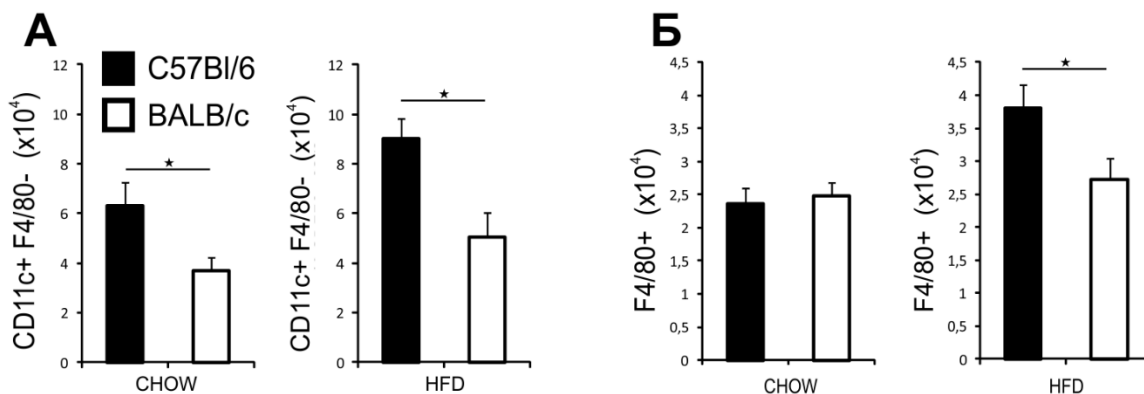


**Слика 4. Морфологија висцералног адипозног ткива C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја.** Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака висцералног масног ткива обојених ХЕ (хематоксилин-еозин) техником (увеличање x40, размера=50µm. Графички су приказане средње вредности дијаметра адипоцита. Представљени 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

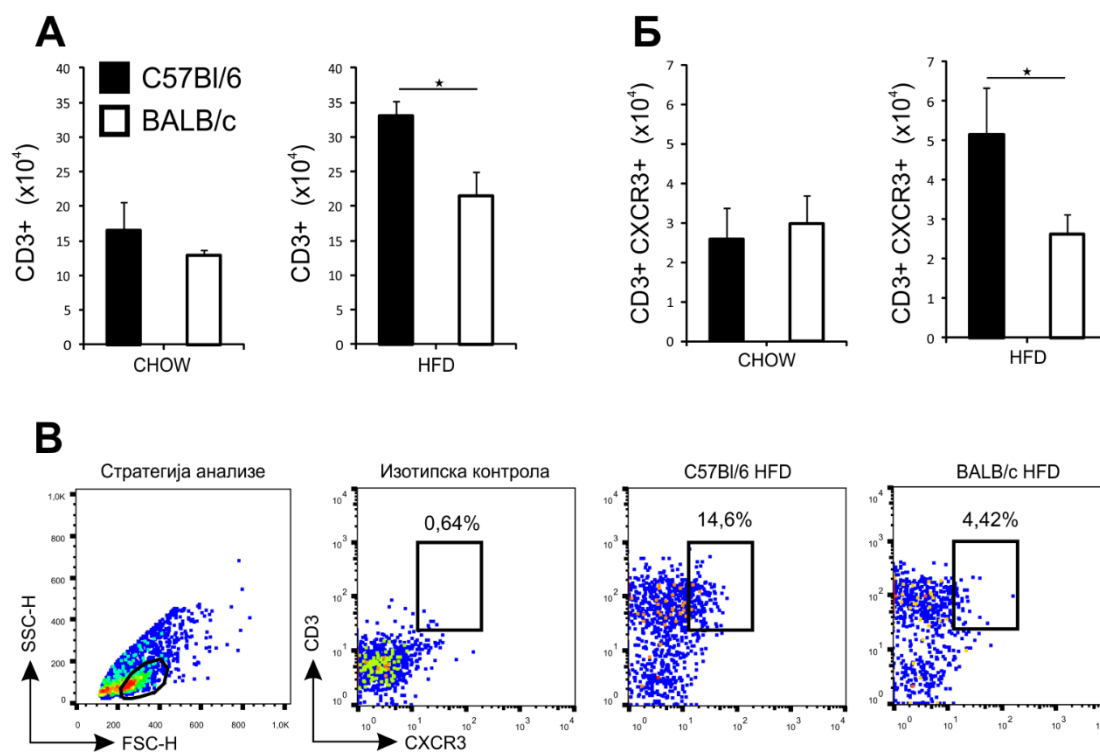
Након 24 недеље специјалног режима исхране, из висцералног масног ткива експерименталних животиња изолована је стромална васкуларна фракција ћелија. Методом проточне цитометрије испитивали смо фенотипске карактеристика имунских ћелија у циљу доказивања присуства, степена и природе запаљења висцералног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

Испитивањем ћелија урођене имуности, показали смо 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 храном са високим садржајем масти 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 стандардном лабораторијском храном. Међутим, код животиња на специјалном 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 смо затим испитивали фенотипске карактеристике ћелија стечене имуности изолованих из стромалне васкуларне фракције висцералног адипозног ткива експерименталних животиња након 24 недеље исхране. Након 24 недеље на стандардној исхрани, није било разлике у апсолутном броју CD3<sup>+</sup> лимфоцита између два соја мишева. Код мишева храњених храном са високим садржајем масти, 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 стандардној исхрани је био приближно једнак, али је код животиња храњених храном са високим садржајем масти, апсолутни број CD3<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> лимфоцита био значајно већи у код C57Bl/6 мишева у поређењу са мишевима BALB/c соја (Слика 6Б).

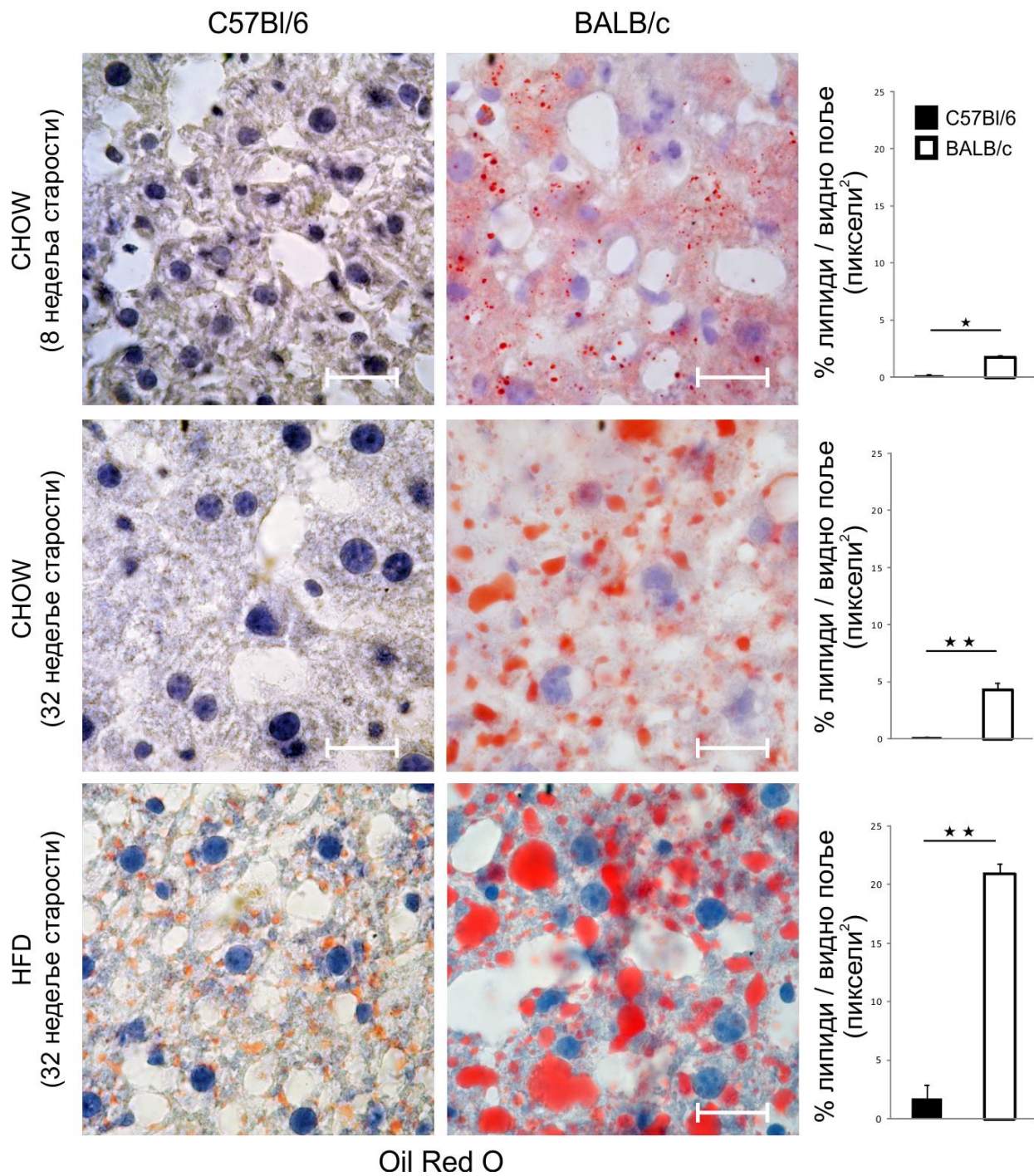


**Слика 6. Фенотипска анализа ћелија стечене имуности у висцералном адипозном ткиву C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја.** Мононуклеарне ћелије изоловане из стромалне васкуларне фракције висцералног масног ткива анализирани су методом проточне цитометрије. (А) Апсолутни број CD3<sup>+</sup> лимфоцита. (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 користили смо специфичну хистохемијску технику бојења, *Oil Red O*. Ова техника се заснива на коришћењу лизохрома односно *Oil Red Обоје* која је солубилна у липидима и боји липиде црвеном бојом. За бојење смо користили смрзнуте 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 стандардном 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 Обојењем* 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, утврдили смо 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*

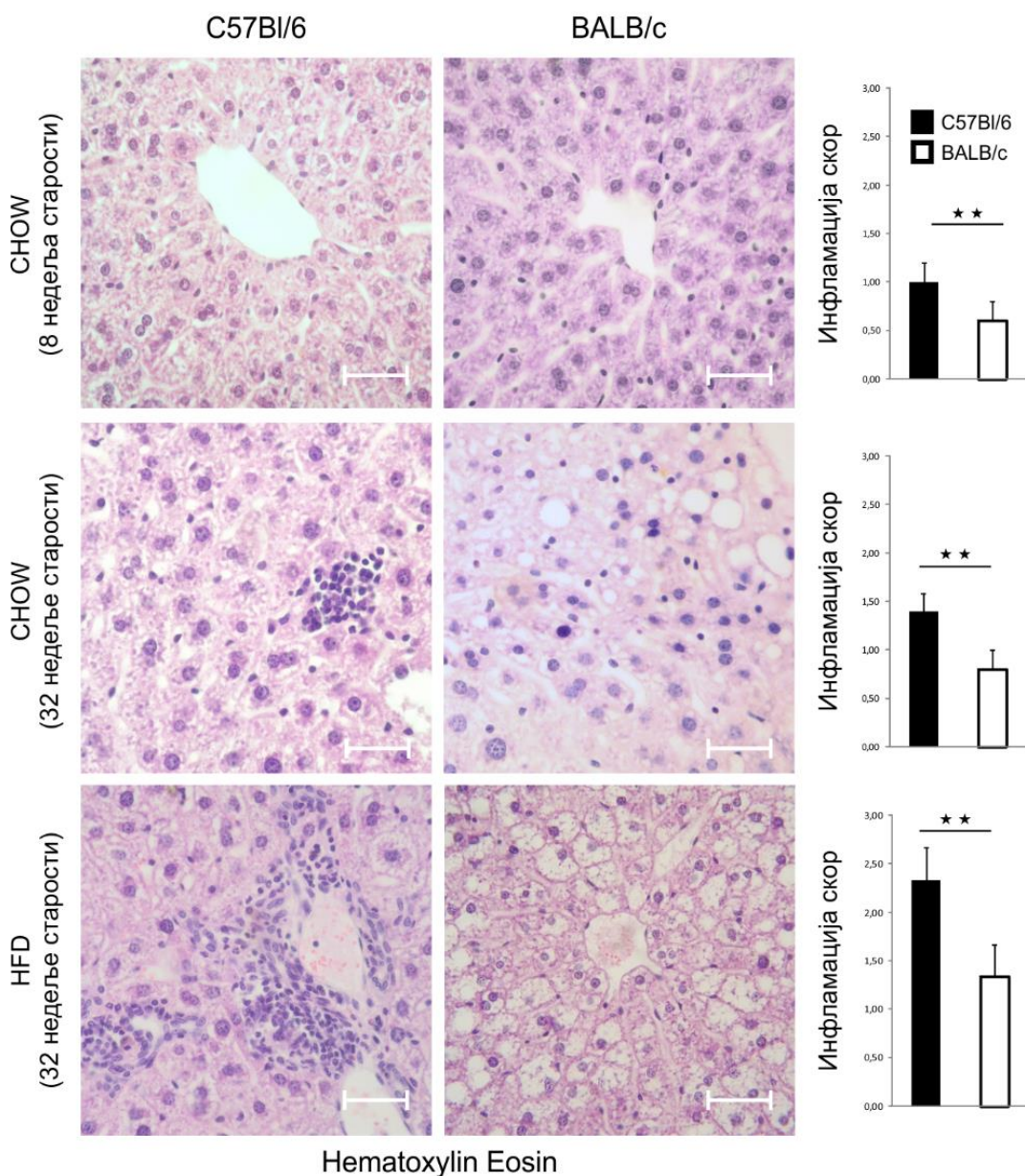
Неалкохолна масна болест јетре представља значајну компликацију метаболичког синдрома те се сматра хепатичком манифестацијом овог синдрома. У постављању клиничке дијагнозе обољења јетре у склопу метаболичког синдрома неопходна је хистопатолошка анализа ткива јетре. Поред стеатозе јетре, код стеатохепатитиса 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 смо извршили патохистолошким анализом парафинских исечака ткива обојених хематоксилин еозином. За квантификовање смо користили NAFLD скор систем (Kleiner DE. et al. Hepatology 2005; 41:1313-21.), коригован и прилагођен експерименталном анималном моделу болести. Показали смо 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 стандардном лабораторијском 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 стандардној исхрани. У групи мишева храњених храном са високим

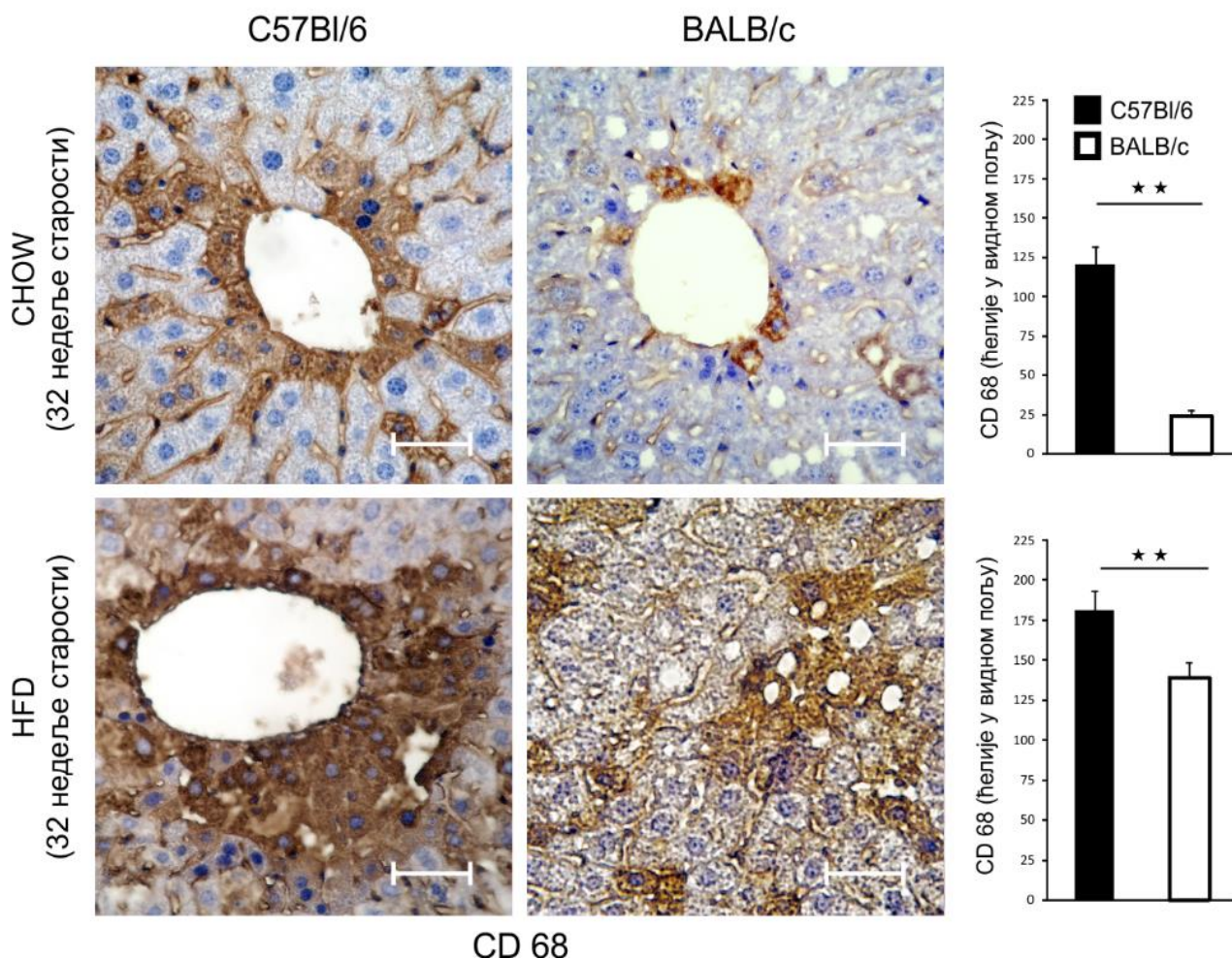


садржајем масти, серумска активност АСТ и АЛТ су биле значајно веће код C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c мишеве ( $p=0.013$ ;  $p=0.04$ ).



**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 скова инфламације. Представљени резултати два експеримента,  $n=9-10$  животиња по групи, средња вредност  $\pm$  SE, \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$

Патохистолошку анализу инфламације јетре смо такође извршили имунохистохемијским бојењем CD 68<sup>+</sup> маркера који се у највећој мери експримира на макрофазима. Анализа је показала да је, у складу са претходно показаним 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 стандардној исхрани ( $p=0.001$ ), као и на исхрани храном са високим садржајем масти ( $p=0.001$ ) (Слика 9).



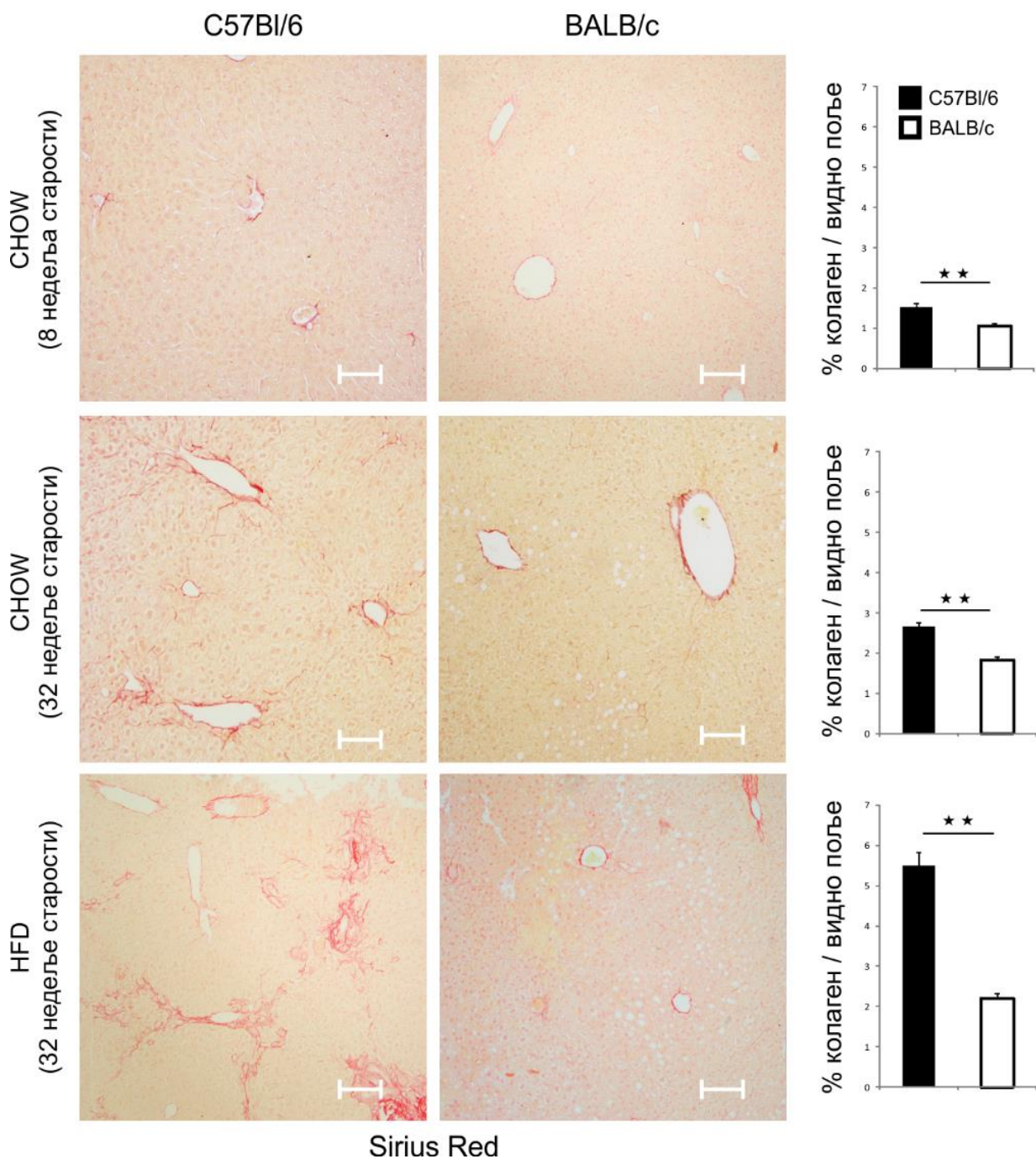
**Слика 9. Имунохистохемијско бојење CD68 маркера у ткиву јетре C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја.** Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака ткива јетре обојених имунохистохемијском техником. (увеличање x40, размера=50µm. Графички је приказана средња вредност броја CD68 позитивних ћелија 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, перипортално односно перисинусоидално (Histopathology of alcoholic liver disease, Neil D Theise). 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 паренхиме, 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 смо за верификацију и квантификавање фиброзе јетре користили селективну хистохемијску технику *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 стандардном храном током 24 недеље, јасни су били хистопатолошки знаци прогресије фиброзе. Депоновање колагена је било претежно перисинусоидално и перипортално са јасним знацима настанка *chicken-wire fence* фиброзе. Код BALB/c мишева истог узраста и на истој дијети, осим изолованих ретких фокуса перипорталног депоновања колагена, било је мало доказа о развоју стеатофиброзе. Семиквантитативном анализом смо показали да је количина депонованих колагених влакана значајно већа у јетрама C57Bl/6 мишева ( $p=0.000$ ). C57Bl/6 мишеви храњени храном са високим садржајем масти 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

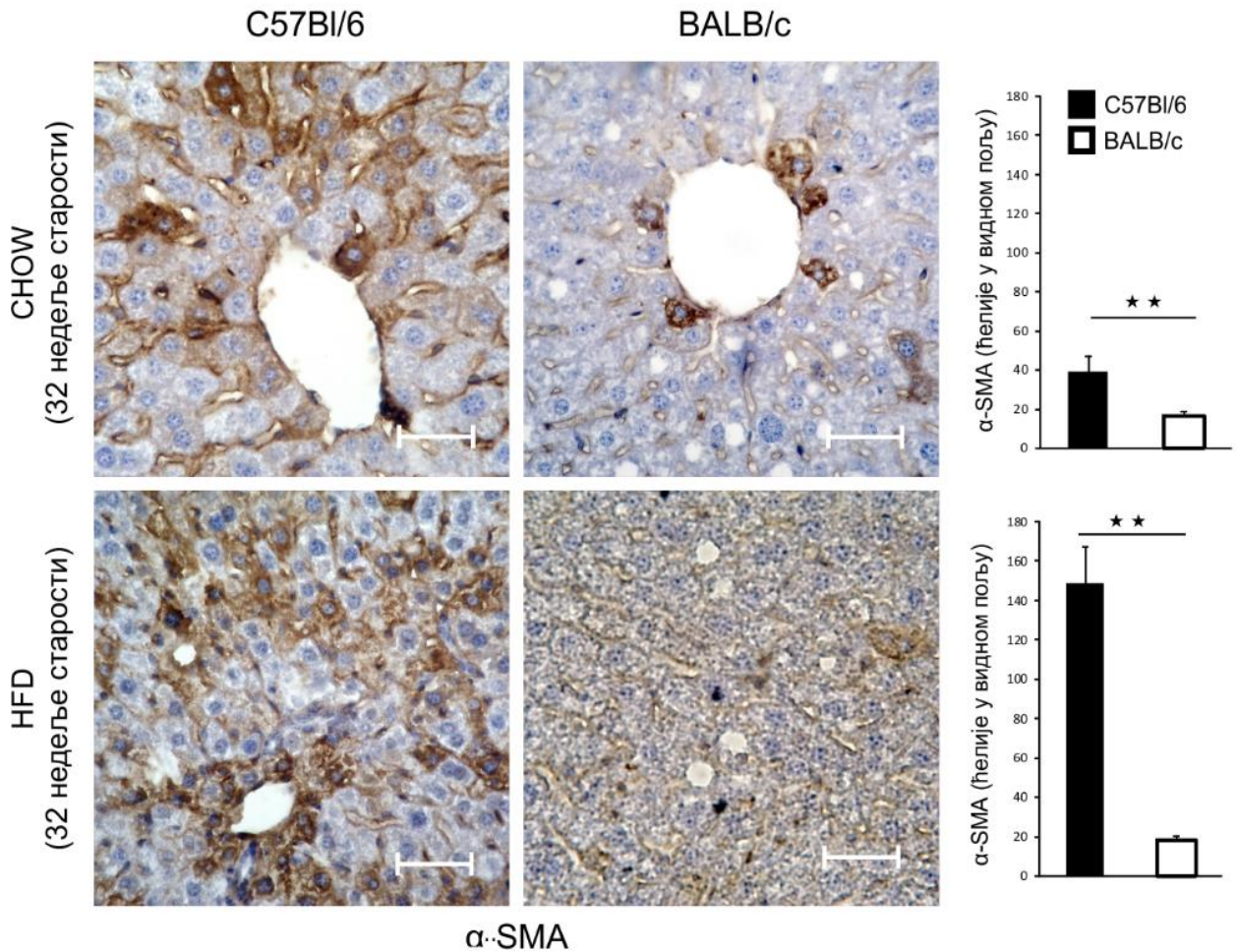
истом дијетом, није било јасних хистопатолошких знакова стеатофиброзе. Количина колагених влакана је била значајно већа у групи C57Bl/6 мишева ( $p=0.000$ ) (Слика 10).



**Слика 10. Фиброза јетре C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја.** Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака ткива јетре обојених Sirius Red техником (увеличање x10, размера=100 $\mu$ 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, испитивали смо присуство  $\alpha$ -SMA у ткиву јетре.

У складу са резултатима добијеним хистопатолошким 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 стандардној храни, а такође и код C57Bl/6 мишева храњених храном са високим садржајем масти ( $p = 0.000$ ), у поређењу са BALB/c мишевима на одговарајућем режиму исхране (Слика 11).



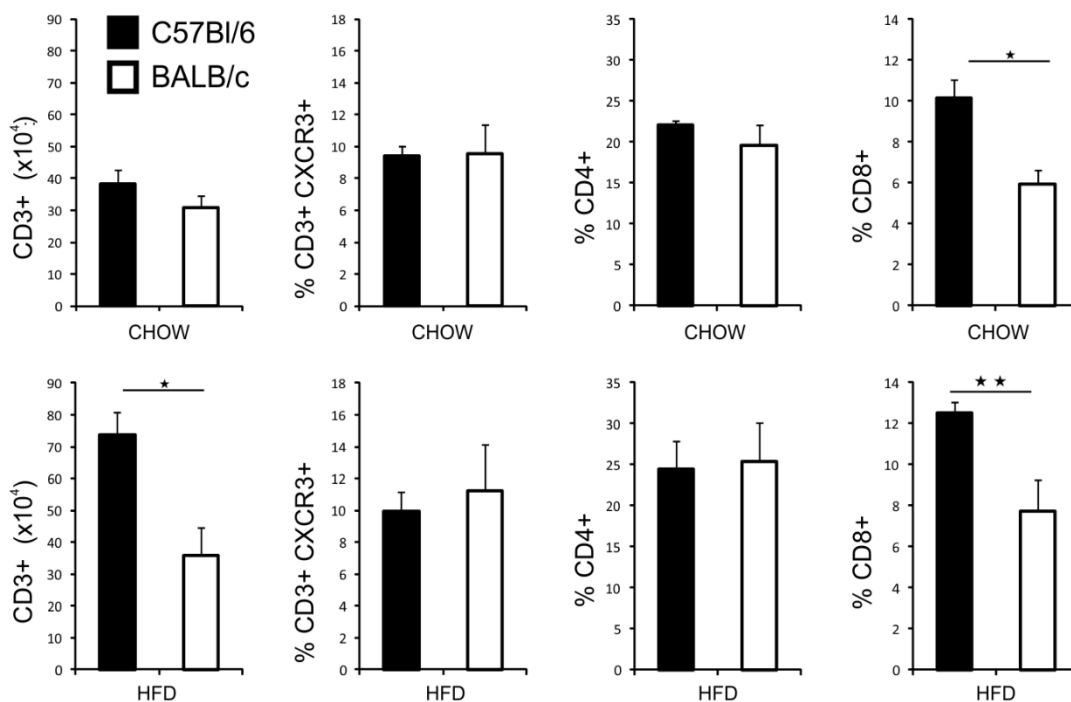
**Слика 11. Имунохистохемијско бојење  $\alpha$ -SMA маркера у ткиву јетре C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја.** Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака ткива јетре обојених имунохистохемијском техником. (увеличање  $\times 40$ , размера=50 $\mu$ m. Графички је приказана средња вредност 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, изоловали смо фракцију непаренхимских ћелија. Природу

инфламације јетре и фенотипске и функционалне карактеристике мононуклеарних ћелија инфилтратата смо испитивали методом проточне цитометрије.

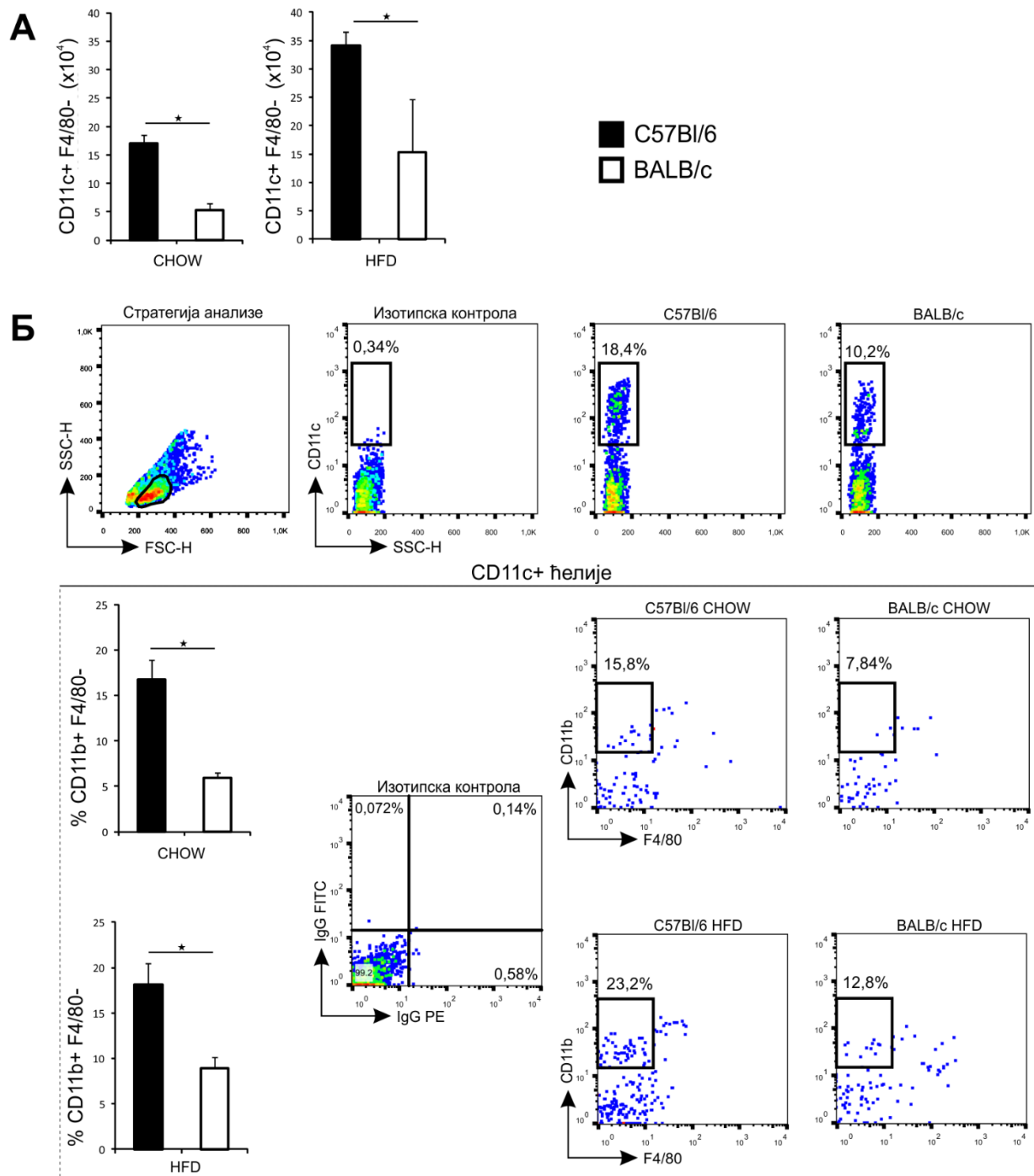
У групи мишева који су храњени стандардном лабораторијском храном није било разлике у апсолутном броју CD3<sup>+</sup>T лимфоцита, док је у групи храњеној храном са високим садржајем масти апсолутни број CD3<sup>+</sup>T лимфоцита био значајно већи у јетри C57Bl/6 мишева. Без обзира на режим исхране, 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 стандардној исхрани, као и на исхрани храном са високим садржајем масти (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

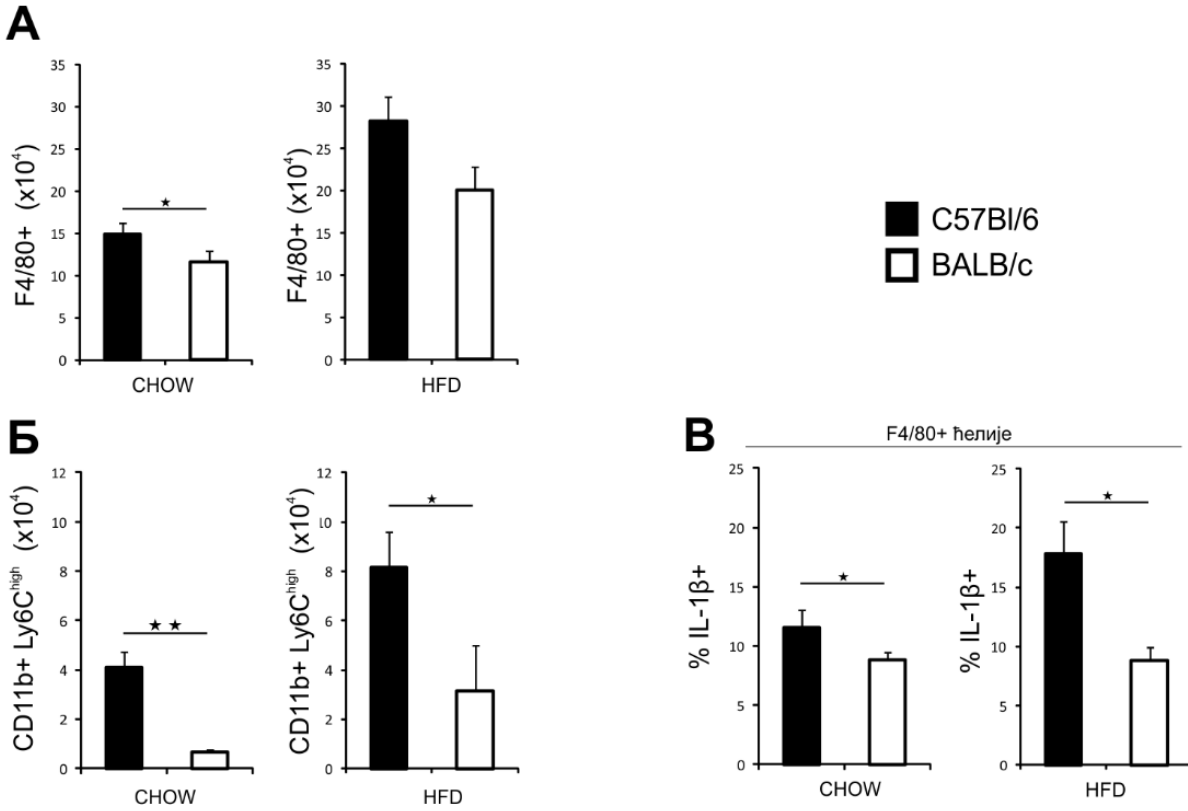
У групи мишева који су храњени стандардном лабораторијском храном показали смо повећан апсолутни број  $CD11c^+F4/80^-$  дендритичних ћелија у јетри C57Bl/6 мишева. Код мишева храњених храном са високим садржајем масти апсолутни број  $CD11c^+F4/80^-$  дендритичних ћелија је порастао у оба соја, али је поново био већи у јетри C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c мишове (Слика 13А). Процент  $CD11c^+CD11b^+F4/80^-$  мијелоидних дендритичних ћелија је био значајно већи у јетри C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c мишове у групи животиња на стандардној исхрани, као и у групи животиња на исхрани са високим садржајем масти (Слика 13Б).





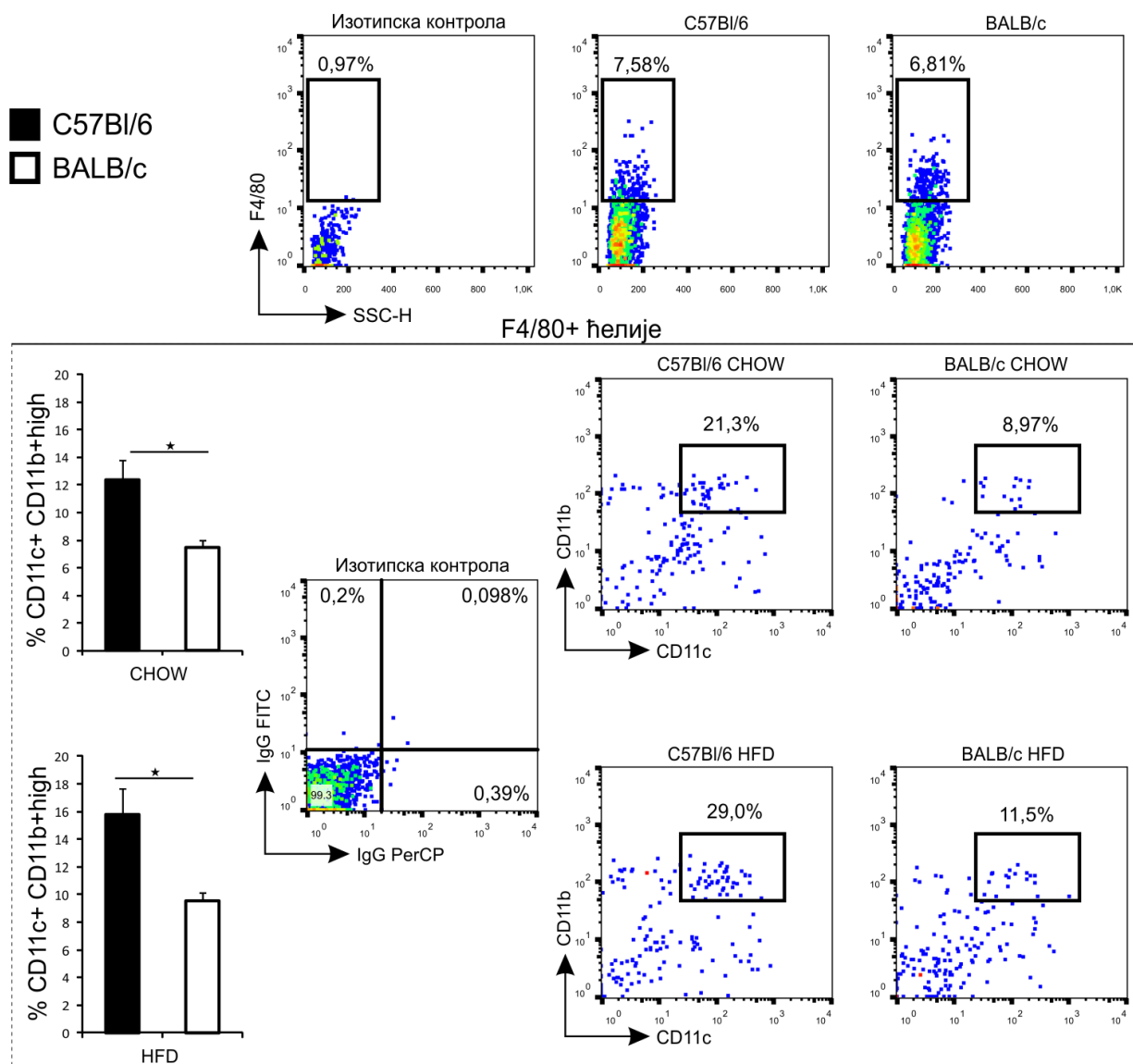
**Слика 13. Фенотипска анализа дендритичних ћелија у јетри C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја.** Мононуклеарне ћелије изоловане из непаренхимске фракције јетре анализирани су методом проточне цитометрије. (А)Приказан је апсолутни број CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> дендритичних ћелија (Б) Стратегија 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 стандардном лабораторијском 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 храном са високим садржајем масти 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 стандардној храни. У групи мишева на храни са високим садржајем масти, 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 стандардној 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 специјалном 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 специјални режим исхране није имао такав ефекат.



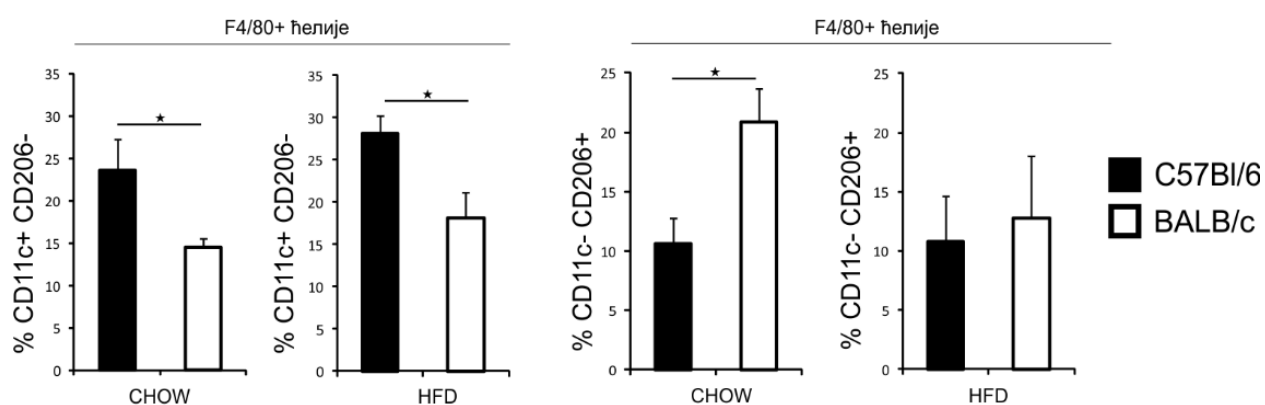
**Слика 14. Фенотипска анализа макрофага у јетри C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја.** Мононуклеарне ћелије изоловане из непаренхимске фракције јетре анализирани су методом проточне цитометрије. (А) Приказан је апсолутни број F4/80<sup>+</sup> макрофага (Б) Приказан је апсолутни број CD11b<sup>+</sup>Ly6C<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 стандардној дијети, као и на дијети са високим садржајем масти (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<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD206<sup>-</sup> ћелије, била је значајно већа у јетри C57Bl/6 мишева на стандардној исхрани у односу на BALB/c мишеве. Ова разлика у корист C57Bl/6 мишева је уочена и у групи животиња храњених храном са високим садржајем масти. Насупрот томе, проценат M2 макрофага, дефинисаних као F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>CD206<sup>+</sup> ћелије, био је значајно мањи код C57Bl/6 мишева на стандардној дијети у односу на BALB/c сој. У групи животиња храњених храном са високим саржајем масти није било разлике у процентуалној заступљености F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>CD206<sup>+</sup> M2 макрофага између два соја мишева (Слика 16).



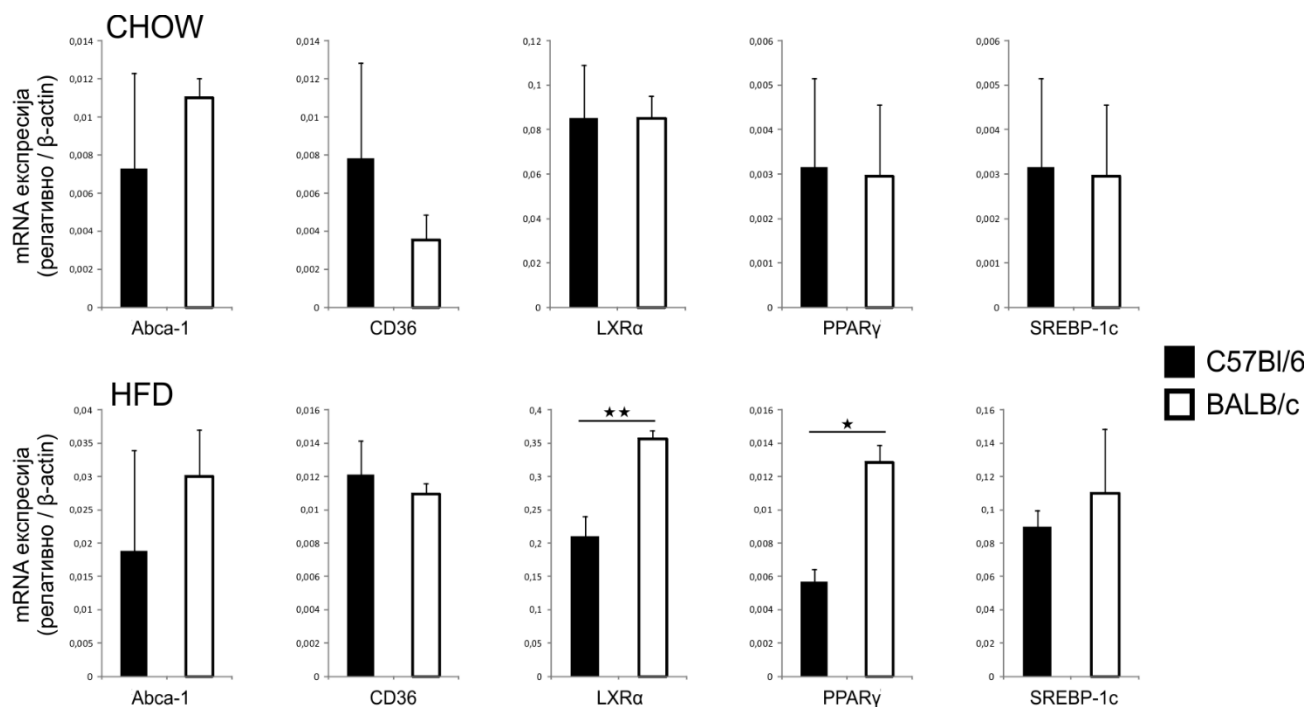
**Слика 16. Фенотипска анализа M1 и M2 макрофага у јетри C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја.** Мононуклеарне ћелије изоловане из непаренхимске фракције јетре анализирани су методом проточне цитометрије. Приказан је проценат селектованих F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD206<sup>-</sup> M1 макрофага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

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

Патохистолошком анализом смо утврдили 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.

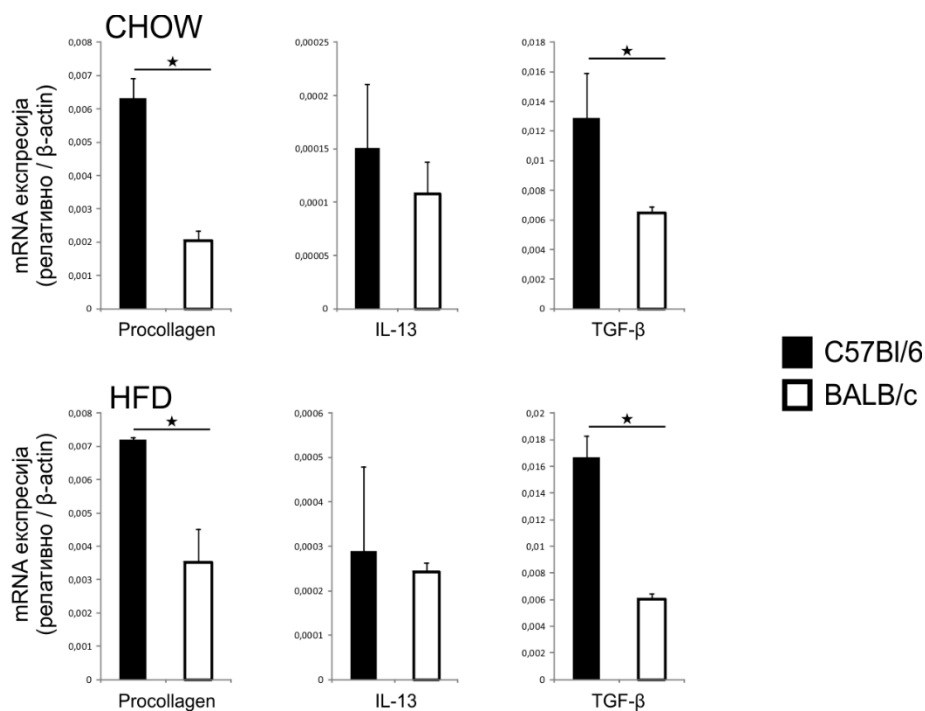
Методом ланчане реакције полимеризације у реалном времену испитивали смо експресију гена у јетри који кодирају кључне молекуле укључене у метаболизам липида.

Показали смо да није било разлике између два соја мишева, и на стандардној и на специјалној 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 специјалном режиму исхране. Код мишева на стандардној 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 специјалном 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 стандардној храни, док је код мишева на храни са високим садржајем масти експресија била значајно мања у јетри C57Bl/6 мишева. Анализирали смо и експресију 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 нисмо уочили 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 смо такође испитивали експресију гена који кодирају молекуле значајне за развој фиброзе у јетри. Хистопатолошким анализом смо утврдили да је фиброза јетре изражена у јетри C57Bl/6 мишева, док су код BALB/c мишева знаци фиброзе одсутни, односно веома дискретни на специјалном 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 стандардној исхрани. Ова разлика је показана и у јетри животиња на исхрани са високим садржајем масти. 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

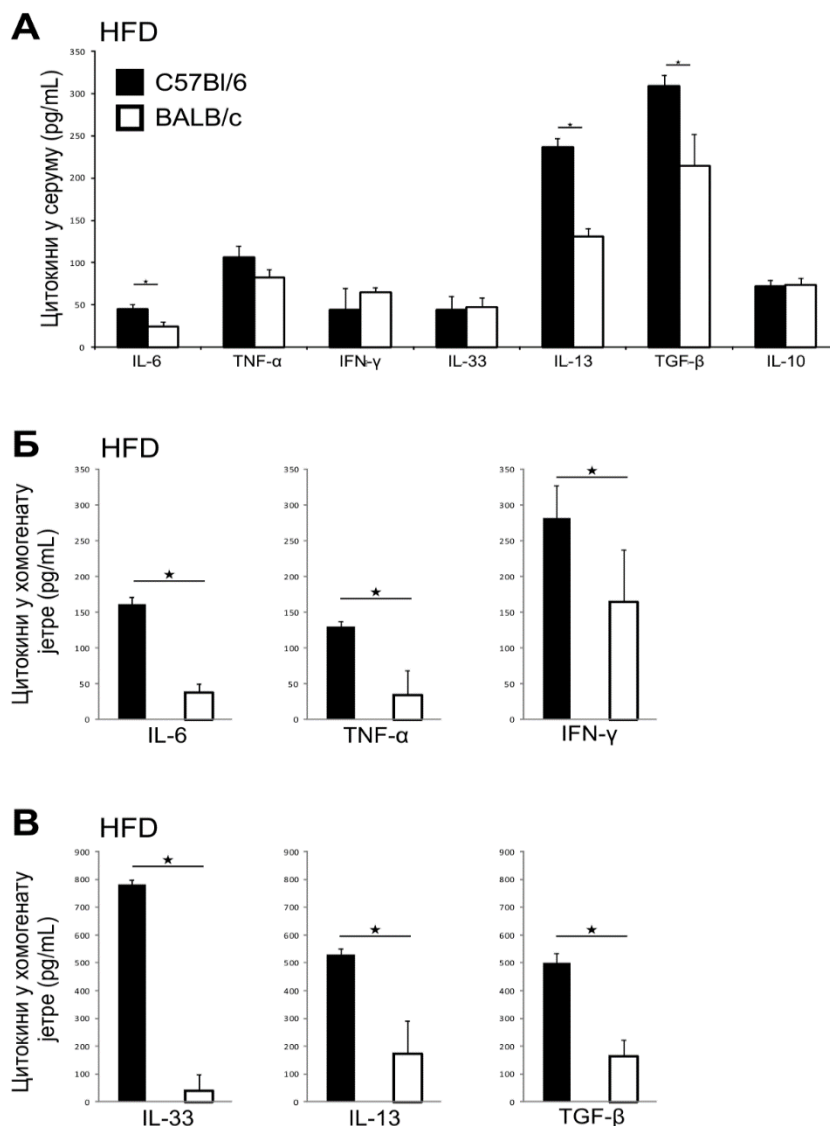
#### 4.1.10. Цитокински профил у серуму и јетри мишева чистог соја C57Bl/6 И BALB/c

Параметре системске инфламације испитивали смо мерењем нивоа проинфламаторних и профиброгених цитокина у серуму експерименталних животиња након 24 недеље исхране храном са високим садржајем масти. Параметре ткивне инфламације испитивали смо мерењем концентрације проинфламаторних и профиброгених цитокина у хомогенизованом ткиву јетре након 24 недеље специјалног режима исхране.

У серуму C57Bl/6 мишева на исхрани храном са високим садржајем масти, 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 профиброгених 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).



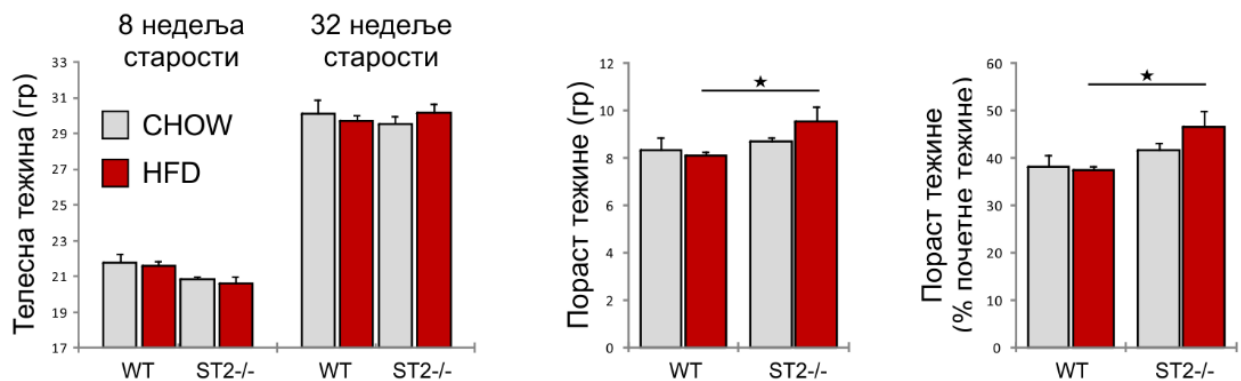
**Слика 19. Концентрација проинфламаторних и профиброгених цитокина у серуму и јетри C57Bl/6 и BALB/c мишева чистог соја.** Нивои цитокина у серуму (А) и хомогенату јетре (Б,В) мерени су ELISA техником. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност  $\pm$  SE, \* 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 ОДГОВОРНОМ НА ИСХРАНИ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ: ПОРЕЂЕЊЕ ИМУНОМЕТАБОЛИЧКИХ ПАРАМЕТАРА ИЗМЕЂУ ДИВЉЕГ СОЈА (енг. *wild type-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 испитивали смо коришћењем експерименталног модела гојазности, односно храњењем експерименталних животиња храном са високим садржајем масти (60% kcal из масти, HFD, енгл. *High fat diet*) у трајању од 24 недеље. Контролне групе животиња су истовремено биле на режиму исхране стандардном лабораторијском храном (CHOW, 10% kcal из масти), такође 24 недеље. Користили смо ST2 дефицијентне BALB/c мишеве (ST2<sup>-/-</sup>) и BALB/c мишеве чистог соја (WT, енгл. *wild type*). 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 грамама, као и пораст телесне тежине изражен као проценат почетне тежине су били значајно већи у групи ST2<sup>-/-</sup> мишева на храни са високим садржајем масти у односу на WT мишеве на истој исхрани (Слика 20).

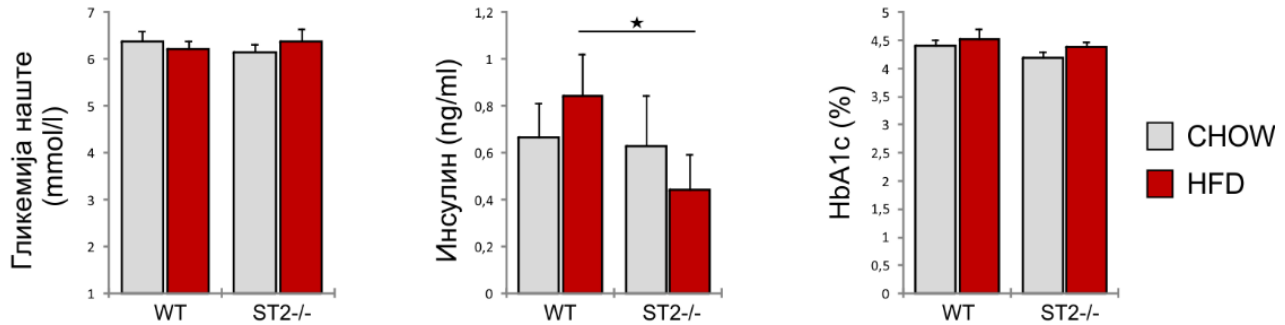


**Слика 20. Промене телесне тежине BALB/cWT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишеванакон 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти.** Телесна тежина експерименталних животиња мерена је сваке 4 недеље током трајања експеримента. Телесна тежина у 8. недељи старости и 32. недељи старости. 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 на режиму исхране, односно 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, показали смо да није постојала значајна разлика у вредностима гликемије наште без обзира на режим исхране. Међутим након 24 храњења храном са високим садржајем масти, 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).

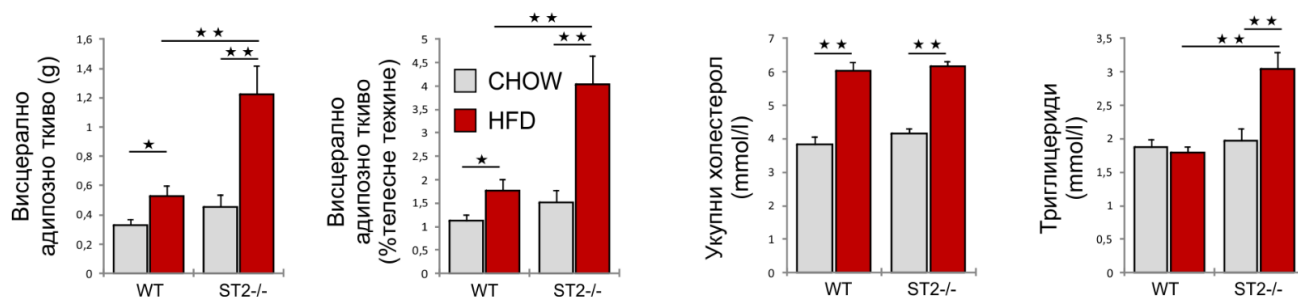


**Слика 21. Гликорегулација BALB/cWT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишеванакон 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти.** Вредности гликемије наште из пуне капи крви мерене су периодично у току 24 недеље храњења. Након жртвовања мишева, у 32. недељи старости, одређен је проценат 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

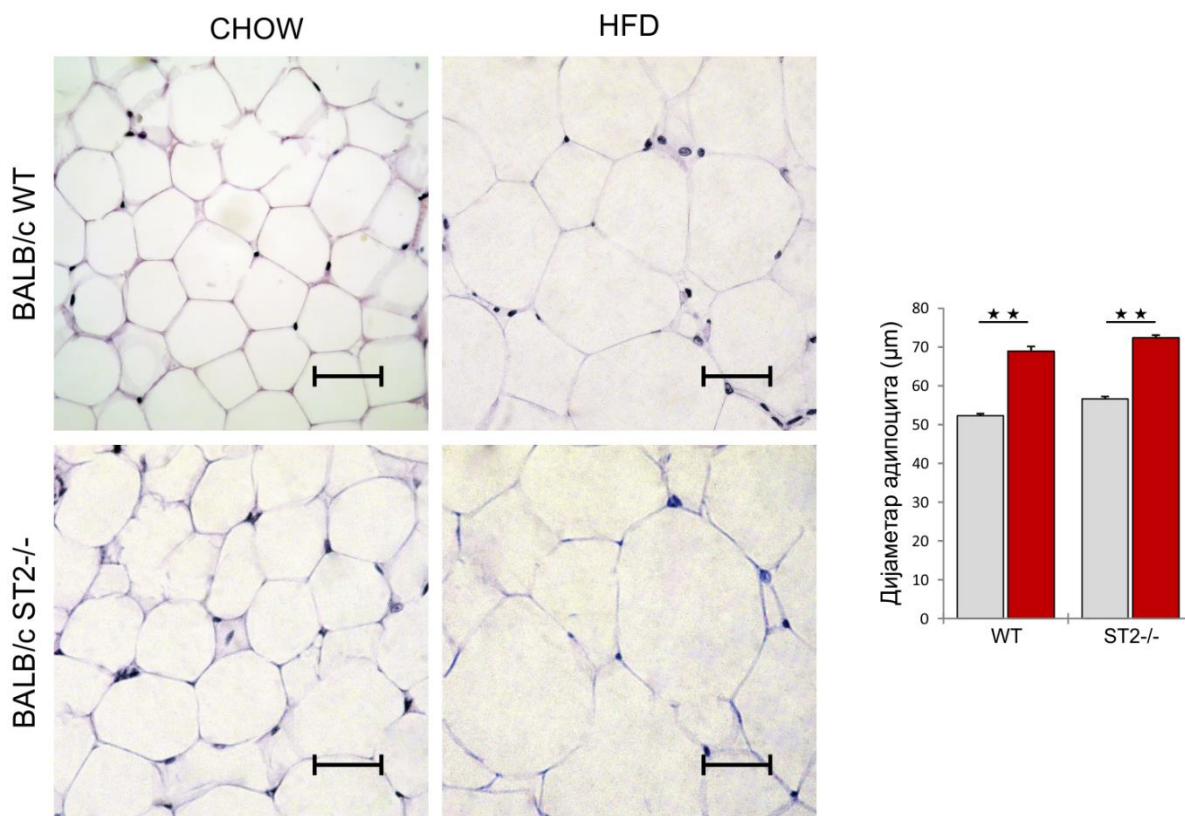
Испитивали смо величину перигонадалних и периреналних депоа висцералног масног ткива код WT и ST2<sup>-/-</sup> мишеванакон 24 недеље храњења. Тежина висцералног масног ткива је била значајно већа код WT мишева на храни са високим садржајем масти у односу на WT мишеве на стандардној исхрани. Такође, тежина висцералног адипозног ткива ST2<sup>-/-</sup> мишева на храни са високим садржајем масти је била значајно већа у односу на ST2<sup>-/-</sup> мишеве храњене стандардном храном, као и у односу на WT мишеве храњене храном са високим садржајем масти. Тежина висцералног масног ткива изражена као проценат укупне телесне тежине је такође била већа код WT мишева на храни са високим садржајем масти у односу на WT мишеве на стандардној храни, док је код ST2<sup>-/-</sup> мишева на храни са високим садржајем масти била већа у односу на ST2<sup>-/-</sup> мишеве на стандардној храни и у односу на WT мишеве на храни са високим садржајем масти. Концентрација укупног холестерола у серуму је била значајно већа код WT мишева на храни са високим садржајем масти у односу на WT мишеве на стандардној исхрани. Вредности укупног холестерола су биле значајно веће и код ST2<sup>-/-</sup> мишева на исхрани богатој мастима у поређењу са ST2<sup>-/-</sup> мишевима на стандардној 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 храни са високим

садржајем масти у поређењу са  $ST2^{-/-}$  мишевима на контролној храни и у односу на WT мишеве на исхрани са високим садржајем масти (Слика 22).



**Слика 22. Тежина висцералног адипозног ткива и липидни профил BALB/c WT и BALB/c  $ST2^{-/-}$  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 триглицериди у серуму. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност  $\pm$  SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01**

Испитивали смо такође и микроморфолошке карактеристике висцералног адипозног ткива мерењем величине адипоцита на парафинским исечцима бојеним хематоксилин еозином. Дијаметар адипоцита BALB/c мишева чистог соја на исхрани са високим садржајем масти био је значајно већи у односу на дијаметар адипоцита мишева који су храњени стандардном храном. Адипоцити  $ST2^{-/-}$  мишева храњених храном са високим садржајем масти је такође био значајно већи у односу на адипоците животиња истог генотипа које су храњене стандардном 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 исхрани са високим садржајем масти доминирали су знаци хипотрофије ћелија док су знаци хиперплазије били слабије присутни. У висцералном масном ткиву  $ST2^{-/-}$  мишева храњених храном са високим садржајем масти, такође су доминирали хипертрофични адипоцити.



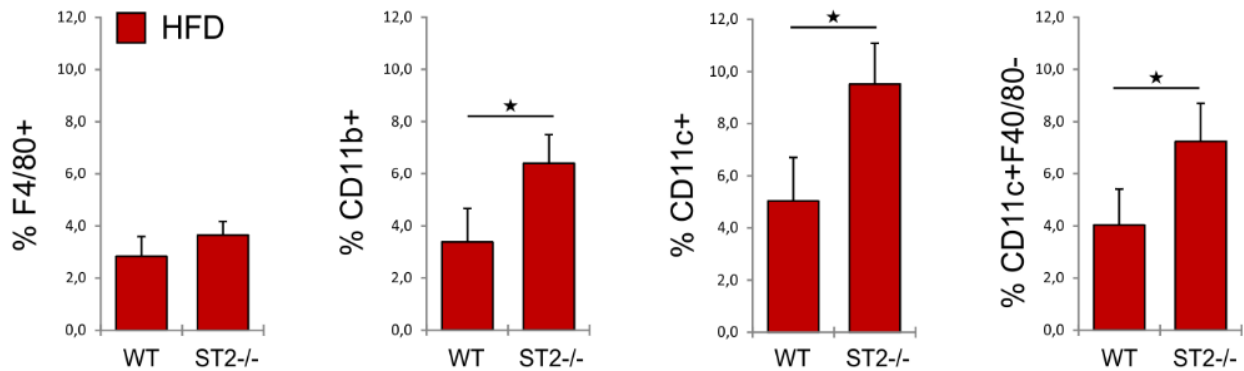
**Слика 23. Морфологија висцералног адипозног ткива BALB/c WT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишева након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти. Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака висцералног масног ткива обојених ХЕ (хематоксилин-еозин) техником (увеличање  $\times 40$ , 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 испитивали смо фенотипске карактеристика имунских ћелија стромалне васкуларне фракције ћелија изоловане из висцералног масног ткива након 24 недеље специјалног режима исхране.

Испитивали смо ћелије урођене имуности и показали да нема разлике у пропорционалној заступљености F4/80<sup>+</sup> макрофага у висцералном адипозном ткиву BALB/c мишева дивљег

соја и ST2<sup>-/-</sup>мишева који су храњени храном са високим садржајем масти. Међутим, у висцералном масном ткиву ST2<sup>-/-</sup>мишева храњених храном са високим садржајем масти је био присутан значајно већи проценат CD11b<sup>+</sup> мијелоидних ћелија, CD11c<sup>+</sup> и CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> дендритичних ћелија (Слика 24).



**Слика 24. Фенотипска анализа имунских ћелија 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. Процент F4/80<sup>+</sup> макрофага. Приказан је проценат CD11b<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup> и CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> дендритичних ћелија. Представљени резултати два експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

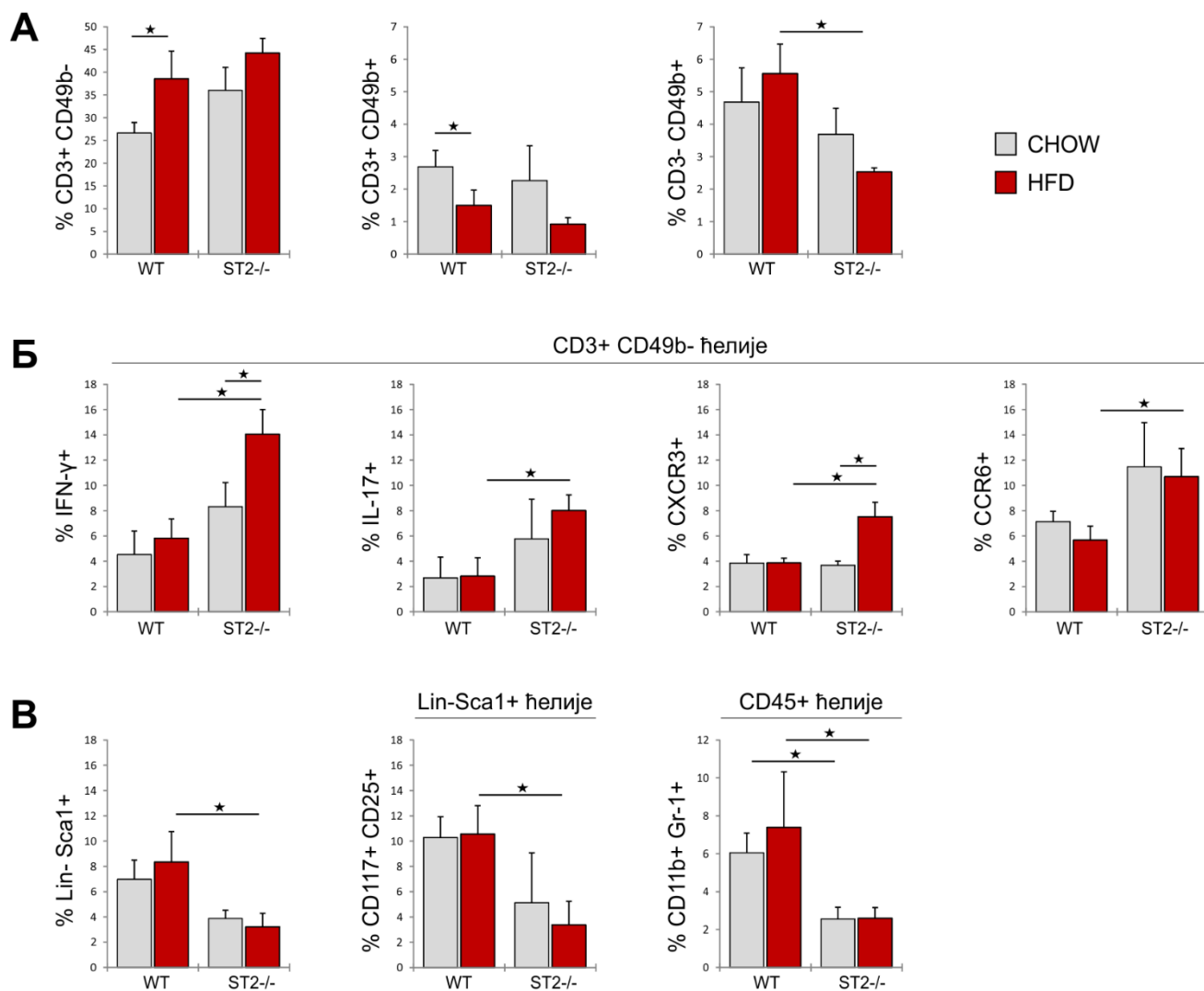
Анализом фенотипских карактеристика ћелија стечене имуности у висцералном масном ткиву, установили смо да код примене хране са високим садржајем масти постоји тенденција пораста процентуалне заступљености CD3<sup>+</sup> CD49b<sup>-</sup> лимфоцитау оба генотипа, при чему је само код WT мишева достигнута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

Између мишева дивљег соја на различитим режимима исхране није било разлике у процентуалној заступљености CD3<sup>+</sup> CD49b<sup>-</sup> лимфоцита који продукују IFN-γ. Насупрот, код ST2<sup>-/-</sup> мишева храњених храном са високим садржајем масти проценат CD3<sup>+</sup> CD49b<sup>-</sup> IFN-

$\gamma^+$ лимфоцита је био значајно већи у односу на мишева истог генотипа на стандардној исхрани као и у поређењу са WT животињама на храни са високим садржајем масти. Истовремено је проценат  $CD3^+ CD49b^- IL-17^+$  лимфоцита био значајно већи у групи  $ST2^{-/-}$  мишева храњених храном са високим садржајем масти 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 исхрани са високим садржајем масти у односу на мишеве истог соја на стандардној исхрани, као и у поређењу са WT мишевима на исхрани са високим садржајем масти. Такође је процентуална заступљеност  $Th17 (CD3^+ CD49^- CCR6^+)$  лимфоцита била значајно већа у висцералном масном ткиву  $ST2^{-/-}$  мишева на исхрани са високим садржајем масти у поређењу са WT животињама на истом режиму исхране (Слика 25Б).

Установили смо и да је проценат  $Lin^- Sca1^+$  ћелија значајно већи у висцералном масном ткиву WT животиња на исхрани са високим садржајем масти у односу на  $ST2^{-/-}$  мишеве на истој исхрани. У висцералном масном ткиву  $ST2^{-/-}$  животиња установили смо значајно мању процентуалну заступљеност лимфоидних ћелија природне имуности (innate lymphoid cells)  $Lin^- Sca1^+ CD117^+ CD25^+$  и мијелоидних супресорских ћелија (myeloid derived suppressor cells)  $CD45^+ CD11b^+ Gr-1^-$  ћелија (Слика 25В).



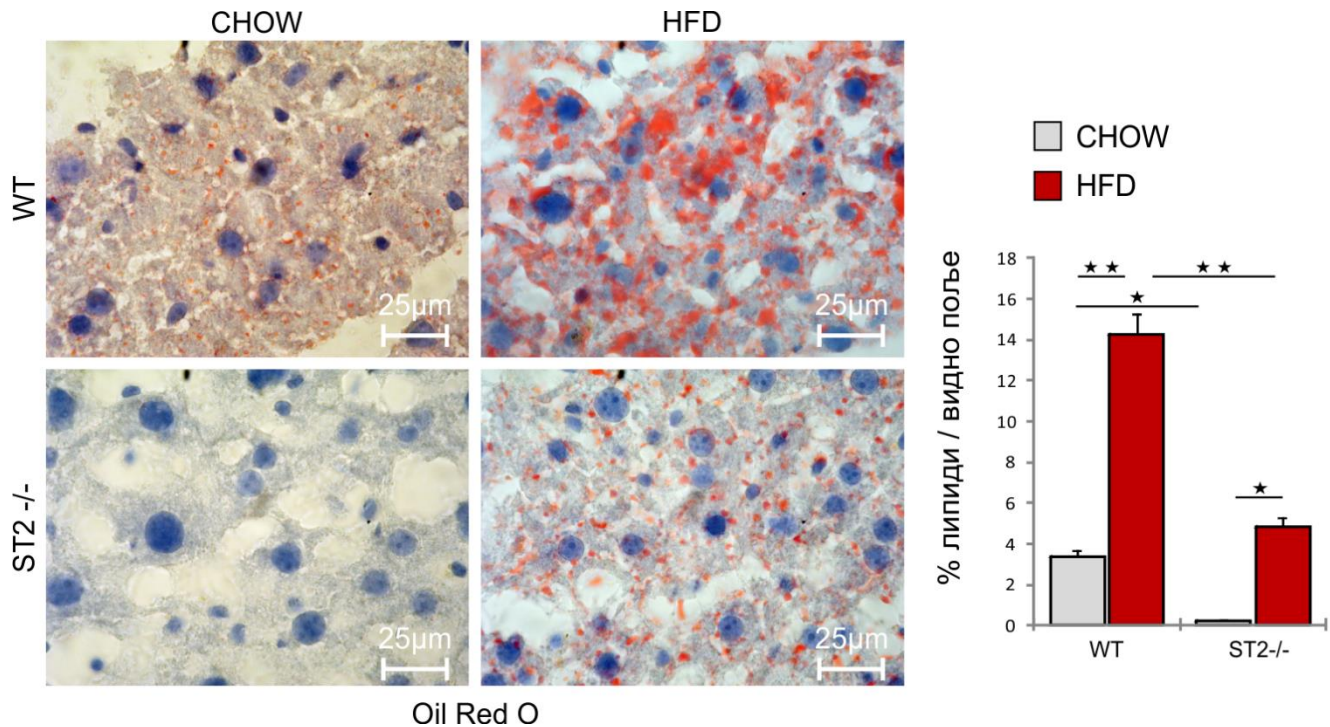


**Слика 25. Фенотипска анализа ћелија стечене имуности у висцералном масном ткиву BALB/cWT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишеванакон 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти. Мононуклеарне ћелије изоловане из стромалне васкуларне фракције висцералног адипозног ткива анализирани 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-Sca1<sup>+</sup> ћелија, Lin-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 користили смо специфичну хистохемијску технику бојења, *Oil Red O* која се заснива на коришћењу солубилног лизохрома који се раствара у липидима и пребојава их црвеном бојом. Користили смо крио исечке ткива, а семиквантитативну анализу смо извршили 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 стандардном храном. ST2<sup>-/-</sup> мишеви на стандардној 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 храном са високим садржајем масти, 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 стандардном храном у односу на животиње храњене храном са високим садржајем масти (Слика 26).

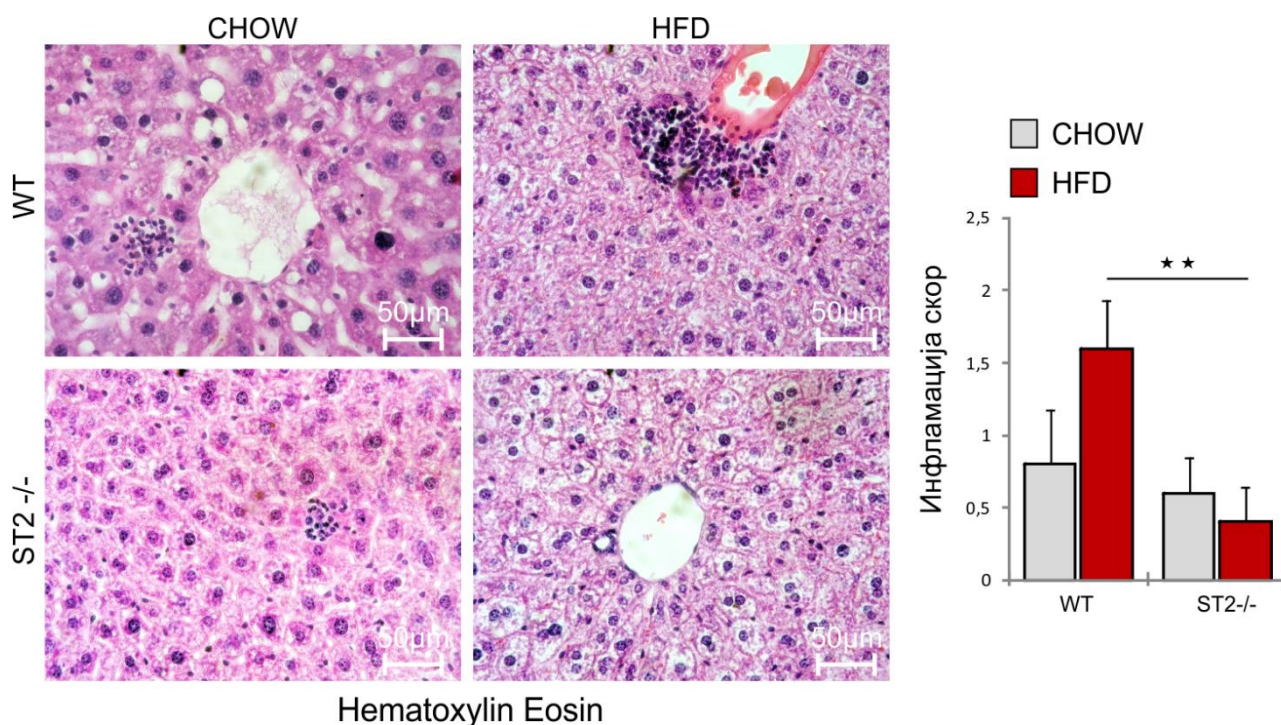


**Слика 26. Стеатоза јетре BALB/cWT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишеванакон 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти.** Репрезентативне фотомикрографије смрзнутих исечака ткива јетре обојених Oil Red O техником (увеличање x100, размера=25µm). Графички су приказане средње вредности 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 смо извршили патохистолошком анализом парафинских исечака ткива обојених хематоксилин еозином. За патохистолошку квантификацију смо користили NAFLD скор систем (Kleiner DE. et al. Hepatology 2005; 41:1313-21.), коригован и прилагођен експерименталном анималном моделу болести. Такође смо након жртвовања животиња испитали и тежину јетре као и активност јетриних ензима у серуму.

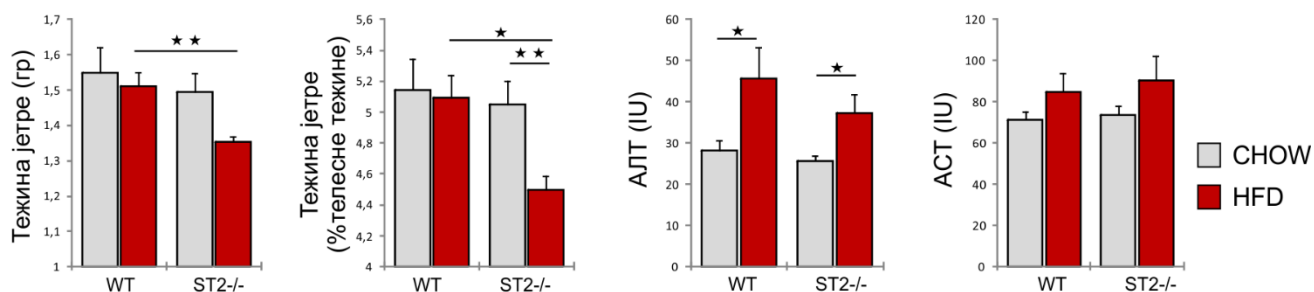
Хистопатолошком анализом јетри WT и ST2<sup>-/-</sup> мишева храњених стандардном лабораторијском храном смо показали да не постоји разлика у инфламаторном скору. У јетрама обе групе животиња уочени су ретки лобуларни инфилтрати мононуклеарних ћелија, малог промера, који нису нарушавали архитектуру ткива. Поређењем експерименталних животиња које су 24 недеље биле на исхрани храном са високим садржајем масти, показали смо 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

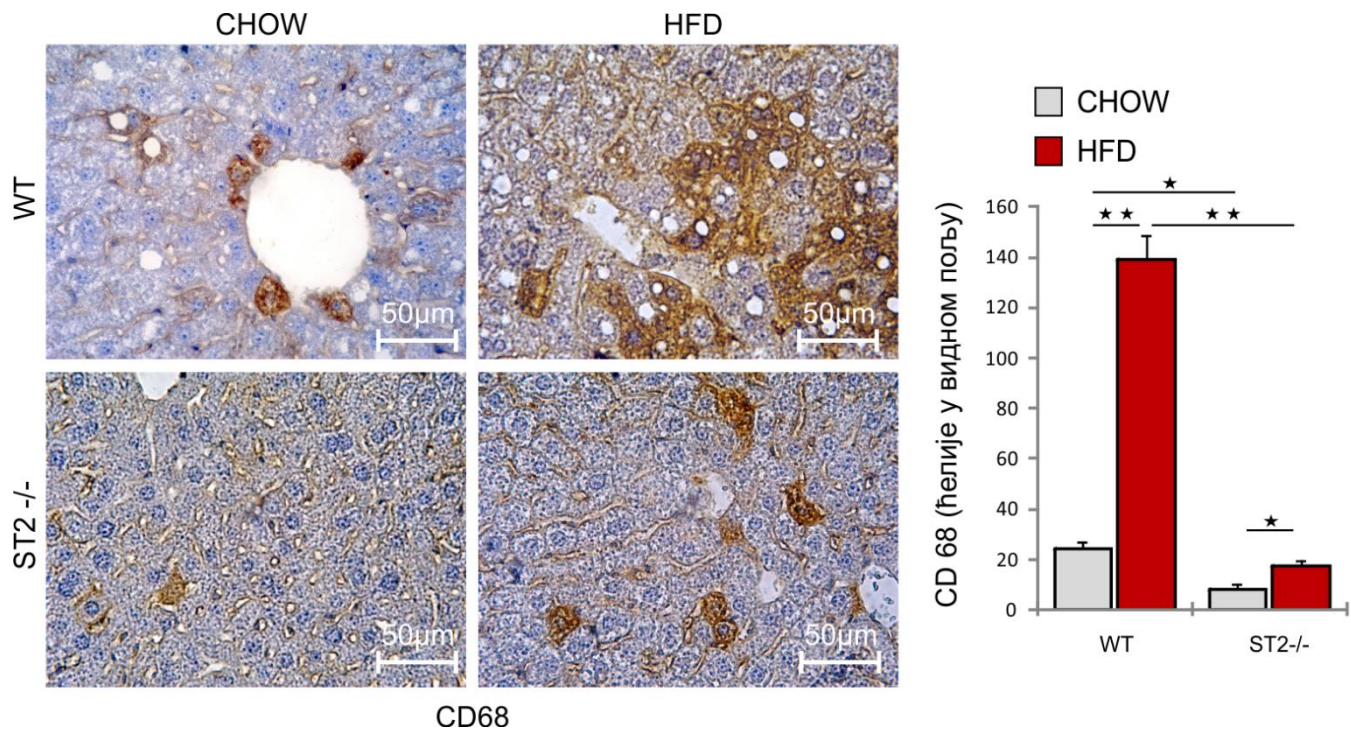
Након жртвовања животиња, у 32. недељи старости, одредили смо тежину јетре. Показали смо да је тежина јетре изражена у грамима значајно мања код ST2<sup>-/-</sup> мишева на храни са високим садржајем масти у односу на WT мишеве на истој исхрани. Тежина јетре изражена као проценат телесне тежине је такође била значајно мања код ST2<sup>-/-</sup> мишева на специјалном режиму исхране у односу на WT мишеве, и значајно мања у односу на ST2<sup>-/-</sup>

мишеве на контролној храни. Патохистолошку анализу инфламације јетре смо допунили биохемијском анализом активности аспартат трансминазе (АСТ) и аланин трансминазе (АЛТ) у серуму. Показали смо да је активност АЛТ била значајно већа код WT, као и код ST2<sup>-/-</sup> мишева на специјалној исхрани у односу на мишеве одговарајућег генотипа на стандардној 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

Патохистолошку анализу инфламације јетре смо такође извршили имунохистохемијским бојењем CD68 маркера који је експримиран на макрофагима. Резултати су показали да је број CD68<sup>+</sup> проинфламаторних макрофага значајно мањи у јетри ST2<sup>-/-</sup> мишева на стандардној исхрани у поређењу са WT мишевима на стандардној исхрани. Такође, број CD 68<sup>+</sup> позитивних макрофага је био значајно мањи у јетри ST2<sup>-/-</sup> мишева на дијети са високим садржајем масти у односу на WT мишеве на истој исхрани. Показали смо такође, у оба генотипа мишева, да је бројCD 68<sup>+</sup> позитивних макрофага значајно већи код животиња храњених храном са високим садржајем масти у односу на животиње храњене контролном храном(Слика 29).

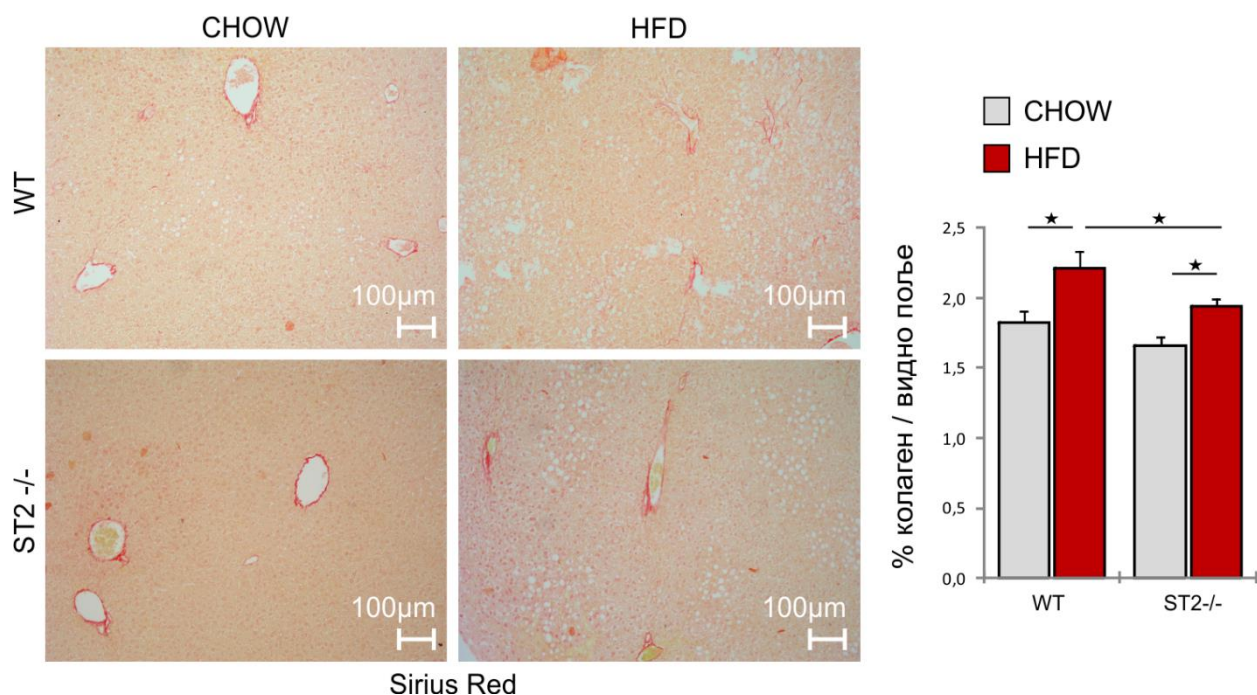


**Слика 29. Имунохистохемијско бојење CD68 маркера у ткиву јетре BALB/cWT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишева.** Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака ткива јетре обојених имунохистохемијском техником. (увеличање x40, размера=50µm. Графички је приказана средња вредност броја CD68 позитивних 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

Испитивали смо утицај аблације ST2 гена на развој фиброзе јетре у мишијем моделу гојазности изазване храном са високим садржајем масти. За хистопатолошку анализу смо користили парафинске исечке ткива јетре обојене *Sirius Red* хистохемијском техником помоћу које се селективно боје колагена влакна. Квантификовање колагена депонованог у ткиву јетре смо извршили анализом фотомикрографија у рачунарском програму *ImageJ*. Хистопатолошком анализом смо утврдили да су знаци фиброзе у свим групама мишева били дискретни и указивали су на почетне фазе развоја фиброзе. У оба генотипа, код животиња на исхрани са високим садржајем масти, хистопатолошки знаци развоја фиброзе су били израженији у односу на контролне мишеве одговарајућег генотипа. Они су обухватили

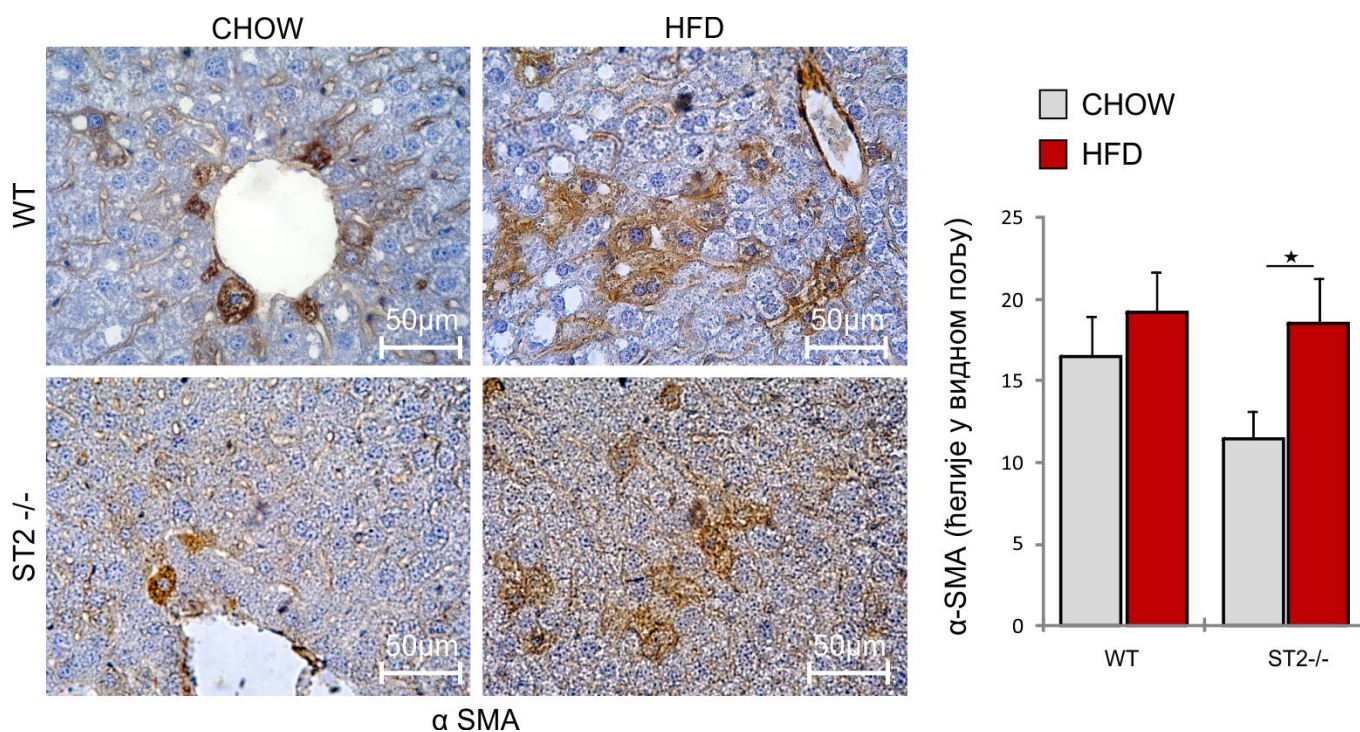
перисинусоидално и перицелуларно депоновање колагена са знацима настанка *chicken-wire fence* фиброзе. Утврдили смо да је количина колагених влакана, у оба генотипа мишева значајно већа у јетри мишева храњених храном са високим садржајем масти у односу на мишеве храњене контролном храном. Количина депонованог колагена у јетри ST2<sup>-/-</sup> мишева који су храњени храном са високим садржајем масти је била значајно мања у односу на WT мишеве на истој исхрани (Слика 30).



**Слика 30. Фиброза 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 Sirius Red техником (увеличање x10, 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 ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01

Методом имунохистохемијског бојења на парафинским исечцима, испитивали смо присуство α-SMA, маркера који је поуздан знак активације стелатних ћелија и индикатор развоја стеатофиброзе у ткиву јетре. Утврдили смо да је број α-SMA позитивних ћелија значајно већи у јетри ST2<sup>-/-</sup> мишева на храни са високим садржајем масти у односу на ST2<sup>-/-</sup>

мишеве који су били на контролној храни. Није било разлике 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 стандардном и специјалном режиму исхране (Слика 31).



**Слика 31.** Имунохистохемијско бојење  $\alpha$ -SMA маркера у ткиву 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 имунохистохемијском техником. (увеличање  $\times 40$ , 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 $ST2^{-/-}$ BALB/c мишева

Из јетре експерименталних животиња које су 24 недеље биле на посебном режиму исхране или на стандардном режиму, изоловали смо обогаћену фракцију непаренхимских



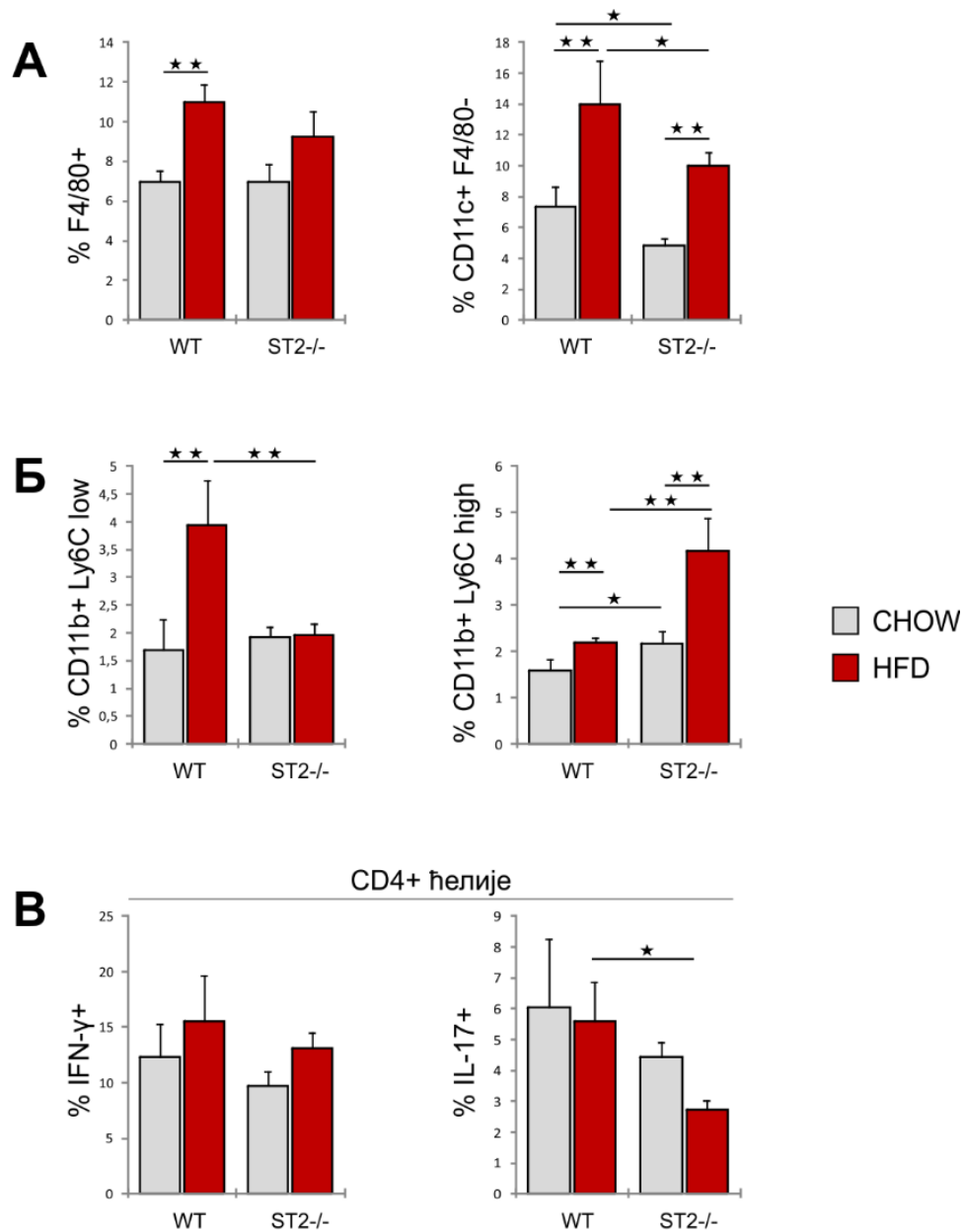
ћелија, а затим смо методом проточне цитометрије испитали фенотипске и функционалне карактеристике мононуклеарних ћелија јетре .

Испитивали смо 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 мишеве 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<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> дендритичних ћелија је био значајно већи у оба генотипа мишева на исхрани са високим садржајем масти у поређењу са мишевима на стандардној исхрани. Процент CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> дендритичних ћелија је био значајно мањи у јетри ST2<sup>-/-</sup> мишева и на стандардном и на специјалном режиму исхране, у поређењу са WT мишевима на одговарајућим дијеталним режимима (Слика 32А).

Процент профибротских CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>low</sup> моноцита је био значајно мањи у јетри ST2<sup>-/-</sup> мишева на храни са високим садржајем масти у односу на WT мишеве на истој исхрани. Процент CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>low</sup> моноцита у јетри WT мишева на специјалном режиму исхране је био већи у односу на WT мишеве на стандардној храни. Исхрана храном са високим садржајем масти је у оба генотипа повећала заступљеност CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup> проинфламаторних моноцита. Процент CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup> проинфламаторних моноцита је био знатно већи код ST2<sup>-/-</sup> 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<sup>+</sup> Т лимфоцита који продукују IFN- $\gamma$ . Међутим, процентуална заступљеност CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> лимфоцита је била значајно мања у јетри ST2<sup>-/-</sup> мишева на дијети са високим садржајем масти у односу на WT мишеве на истој исхрани (Слика 32В).

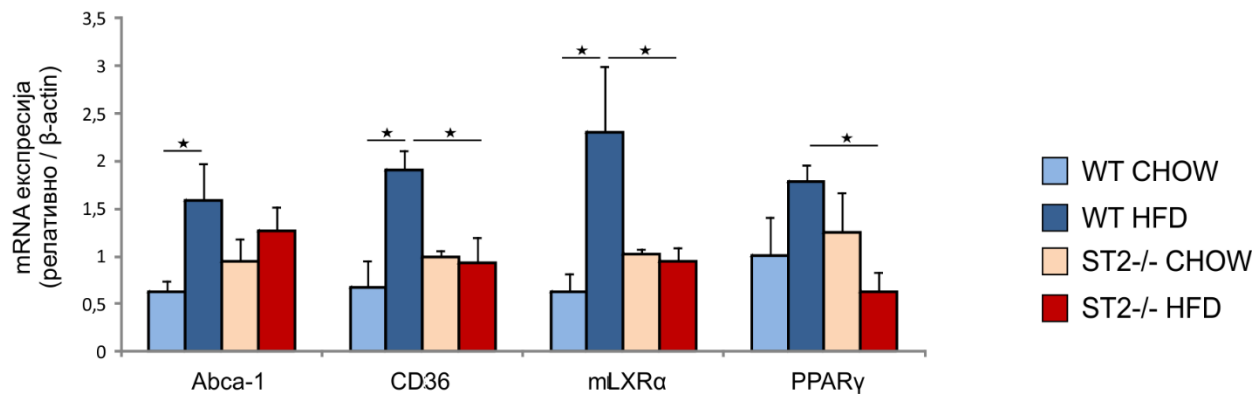


**Слика 32. Фенотипска анализа имунских ћелија у јетри BALB/cWT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишеванакон 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти.** Мононуклеарне ћелије изоловане из непаренхимске фракције јетре анализирани су методом проточне цитометрије. (А) Процент F4/80<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 смо утврдили да је стеатоза јетре унутар генотипа мишева израженија код животиња на исхрани са високим садржајем масти у поређењу са мишевима на стандардној исхрани. Такође смо утврдили да је стеатоза јетре значајно мања код ST2<sup>-/-</sup> мишева у односу на WT мишове. 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 испитивали смо експресију гена у јетри који кодирају кључне молекуле укључене у метаболизам липида.

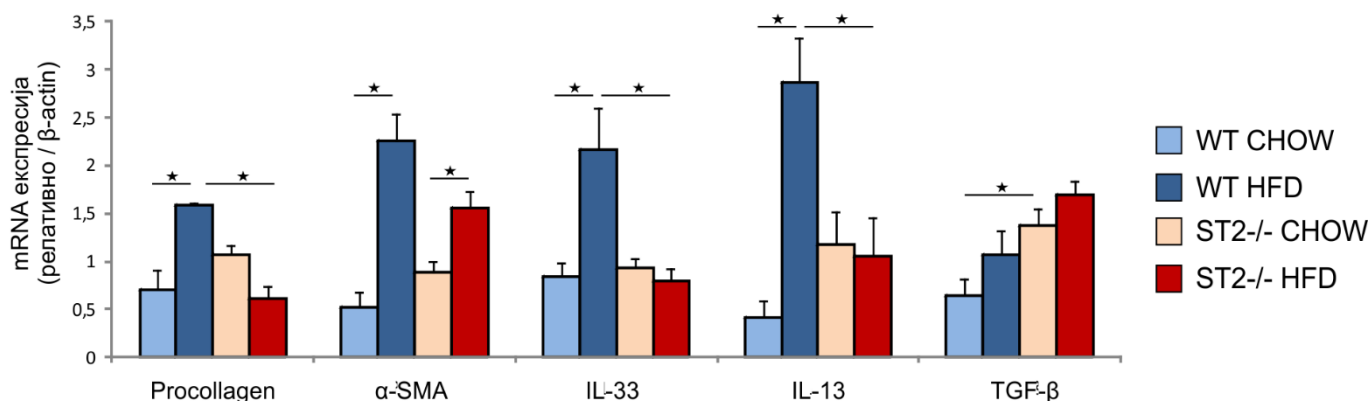
Експресија гена који кодира ABCA1, транспортни протеин који представља главни регулатор хомеостазе целуларног холестерола и фосфолипида, је била већа у јетри WT мишева на храни са високим садржајем масти у односу на WT мишове на стандардној храни. У групи ST2<sup>-/-</sup> мишева није било разлике у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



**Слика 33.** Експресија гена укључених у метаболизам липида 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 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 смо испитивали експресију гена који кодирају молекуле значајне за развој фиброзе у јетри. Хистопатолошким анализом смо утврдили да је у оквиру оба генотипа фиброза јетре била израженија код мишева који су били на исхрани са високим садржајем масти у поређењу са мишевима на стандардној исхрани. Такође смо показали да је количина депонованог колагена значајно мања код *ST2<sup>-/-</sup>* мишева на специјалном 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 исхрани са високим садржајем масти у поређењу са *ST2<sup>-/-</sup>* мишевима на истој исхрани као и *WT* мишевима на стандардној исхрани. Експресија гена за α-SMA, маркер активираних хепатичних стелатних ћелија, је била значајно већа код мишева оба генотипа на исхрани са високим садржајем масти 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 исхрани са високим садржајем масти у поређењу са *ST2<sup>-/-</sup>* мишевима на истом режиму исхране, као и у поређењу са *WT* мишевима на стандардној исхрани. Повећана експресије гена за профиброгени TGF-β је показана у јетри *ST2<sup>-/-</sup>* мишева на стандардној исхрани у односу на

WT мишеве на истом дијеталном режиму, док није било разлике у експресији овог гена између два генотипа мишева на исхрани богатој мастима (Слика 34).

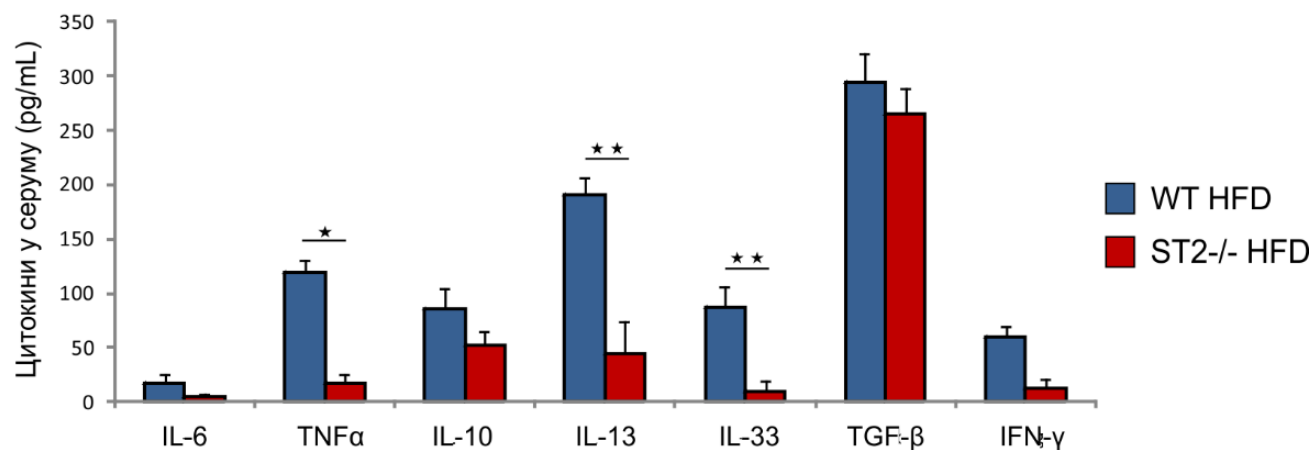


**Слика 34.** Експресија гена укључених у развој фиброзе у јетри BALB/cWT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишеванакон 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти. Методом ланчане полимеризације у реалном времену испитали смо експресију гена важних за развој фиброзе у јетри. Приказана 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

Параметре системске инфламације испитивали смо мерењем нивоа проинфламаторних и антиинфламаторних цитокина у серуму и одредили серумске концентрације профиброгених цитокина у експерименталних животиња након 24 недеље исхране храном са високим садржајем масти.

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 исхрани са високим садржајем масти 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 исхрани са високим садржајем масти. Концентрација профиброгеног TGF-β се није разликовала између два генотипа мишева (Слика 35).



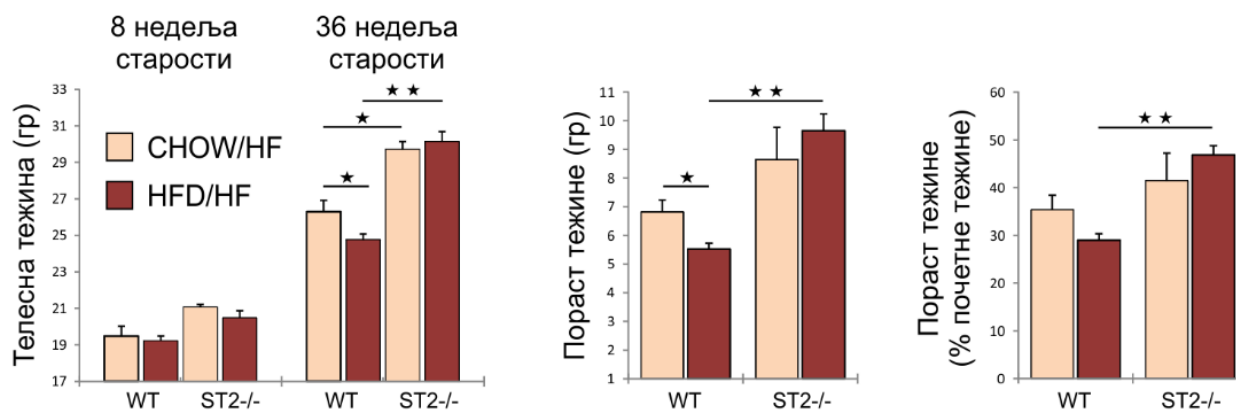
**Слика 35. Концентрација проинфламаторних и профиброгених цитокина у серуму BALB/cWT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишеванакон 24 недеље на исхрани са високим садржајем масти. Нивои цитокина у серуму мерени су ELISA техником. Представљени резултати два експеримента, n=9-10 животиња по групи, средња вредност ± 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 (енг. *wild type-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 смо такође испитивали користећи експериментални 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 храњени 24 недеље стандардном храном и 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**

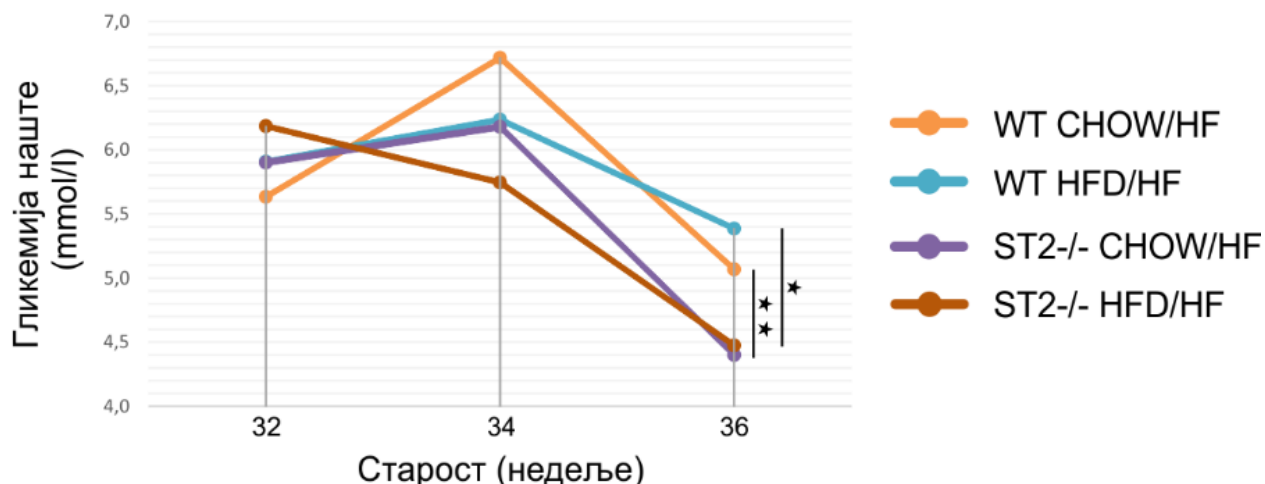
#### 4.3.2. Гликорегулација код WT и ST2<sup>-/-</sup> BALB/c мишева на комбинованом режиму исхране

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).



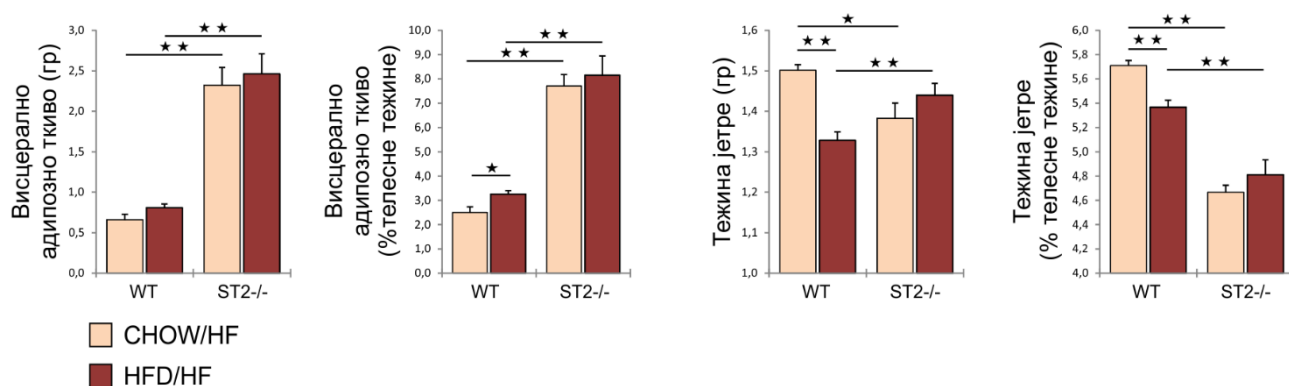
Слика 37. Гликорегулација  $BALB/c$  WT и  $BALB/c$   $ST2^{-/-}$  мишева након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти и 4 недеље на комбинованој исхрани. Вредности гликемије наште из пуне капи крви мерене су периодично. Представљени резултати једног експеримента,  $n=5-10$  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 испитивали смо величину 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 мишеве 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 грамама 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  $ST2^{-/-}$

$^{-/-}$  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  $ST2^{-/-}$  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  $ST2^{-/-}$  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  $ST2^{-/-}$  мишевима на истом режиму (Слика 38).

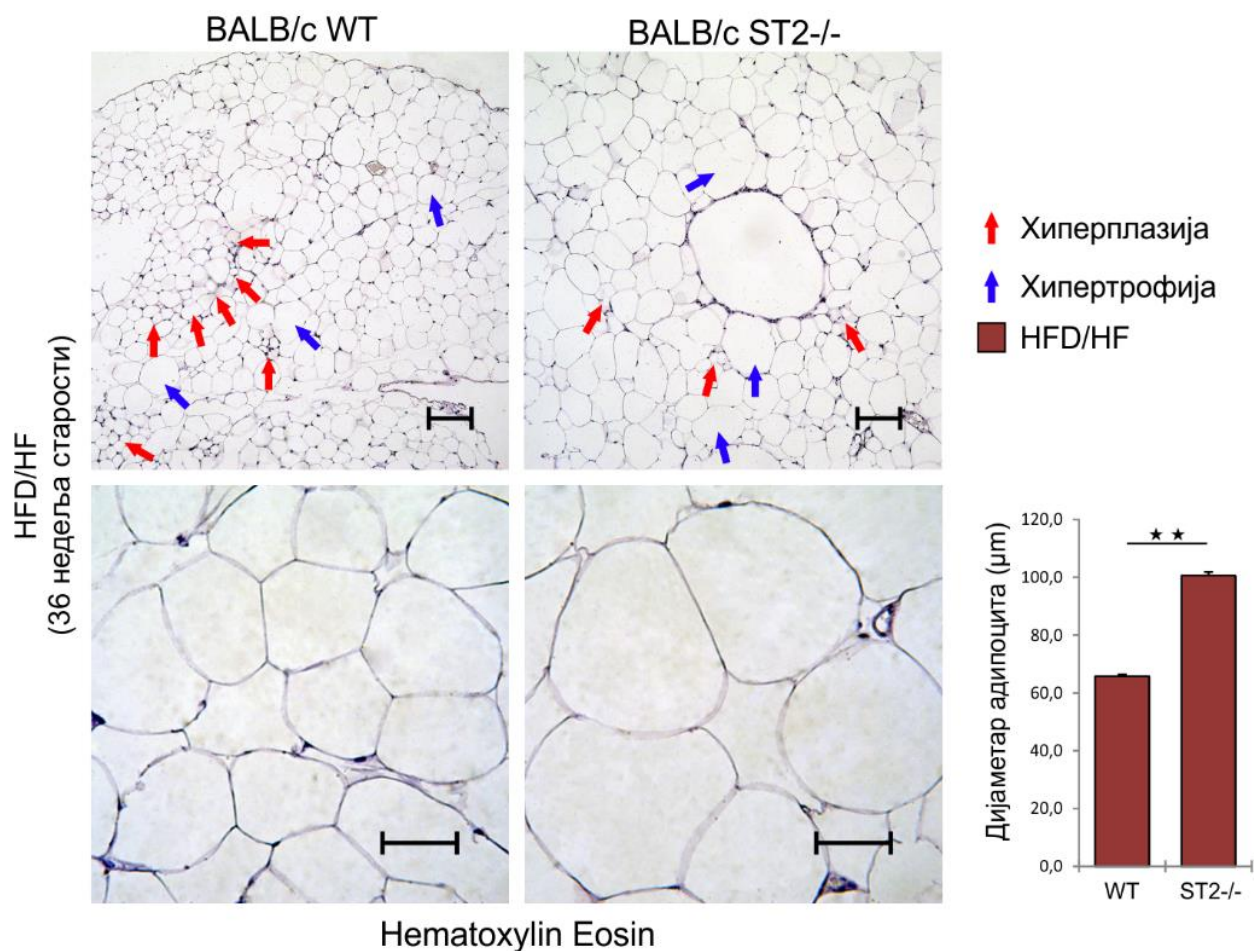


**Слика 38. Тежина висцералног адипозног ткива и тежина јетре BALB/c WT и BALB/c  $ST2^{-/-}$  мишева након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти и 4 недеље на комбинованој исхрани. Тежина висцералног адипозног ткива, проценат висцералног масног ткива у односу на телесну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

Испитивали смо и морфолошке карактеристике висцералног масног ткива. На парафинским исечцима обојеним хематоксилин еозином, мерили смо дијаметар адипоцита при чему смо приближну величину ћелија масног ткива одредили мерењем највећег и најмањег пречника ћелије.

Дијаметар адипоцита висцералног масног ткива  $ST2^{-/-}$  мишева на HFD/HF исхрани је био значајно већи у односу на дијаметар адипоцита мишева дивљег соја на истој исхрани (Слика 39). Претходно смо показали, у експерименту у ком су BALB/c 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).

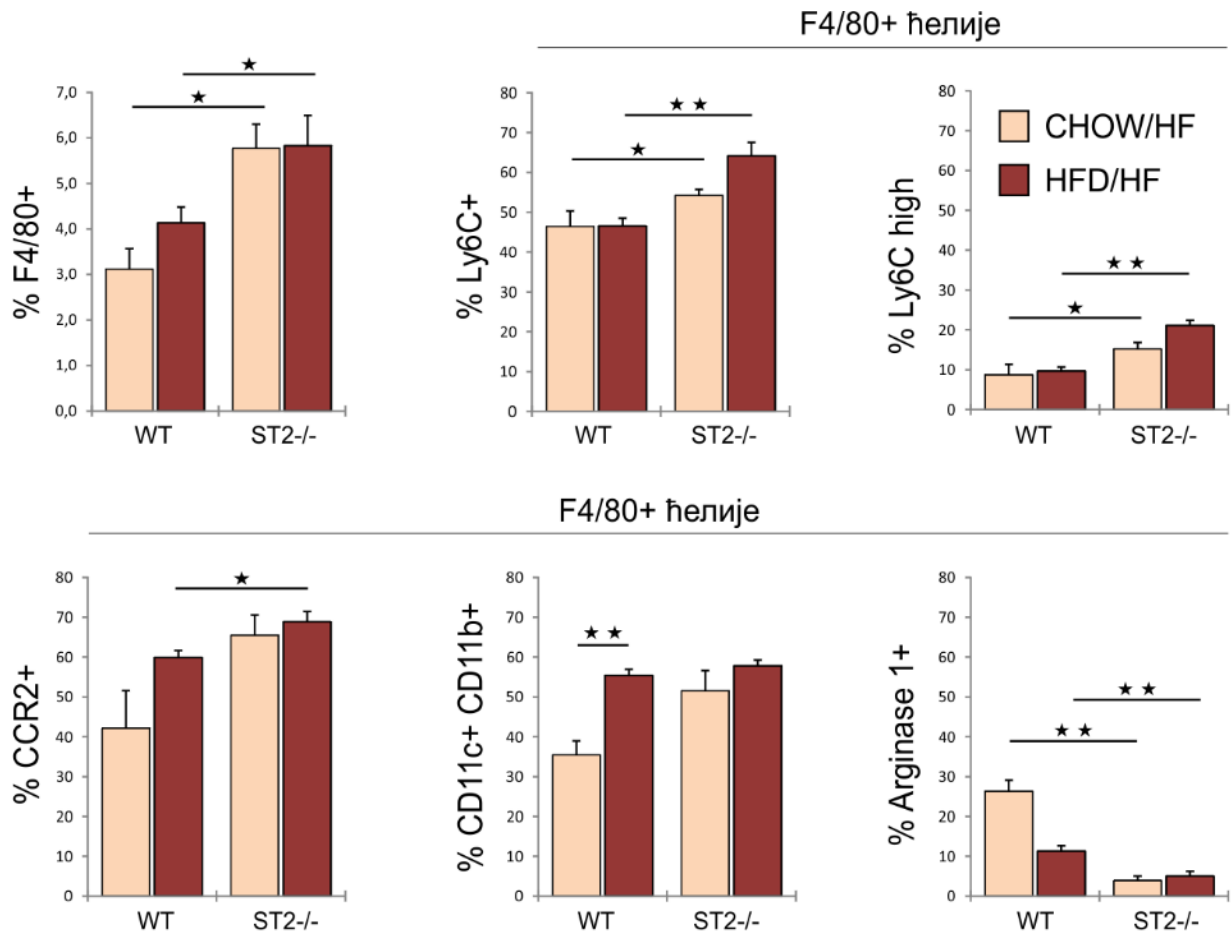


**Слика 39. Морфологија висцералног адипозног ткива BALB/c WT и BALB/c  $ST2^{-/-}$  мишева након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти и 4 недеље на комбинованој исхрани.** *Горе:* Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака висцералног масног ткива обојених ХЕ (хематоксилин-еозин) техником (увеличање  $\times 10$ , 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  $\times 40$ , размера=50µm). Графички су приказане средње вредности дијаметра адипоцита. Представљени резултати једног експеримента,  $n=5-10$  животиња по групи, средња вредност  $\pm$  SE, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$

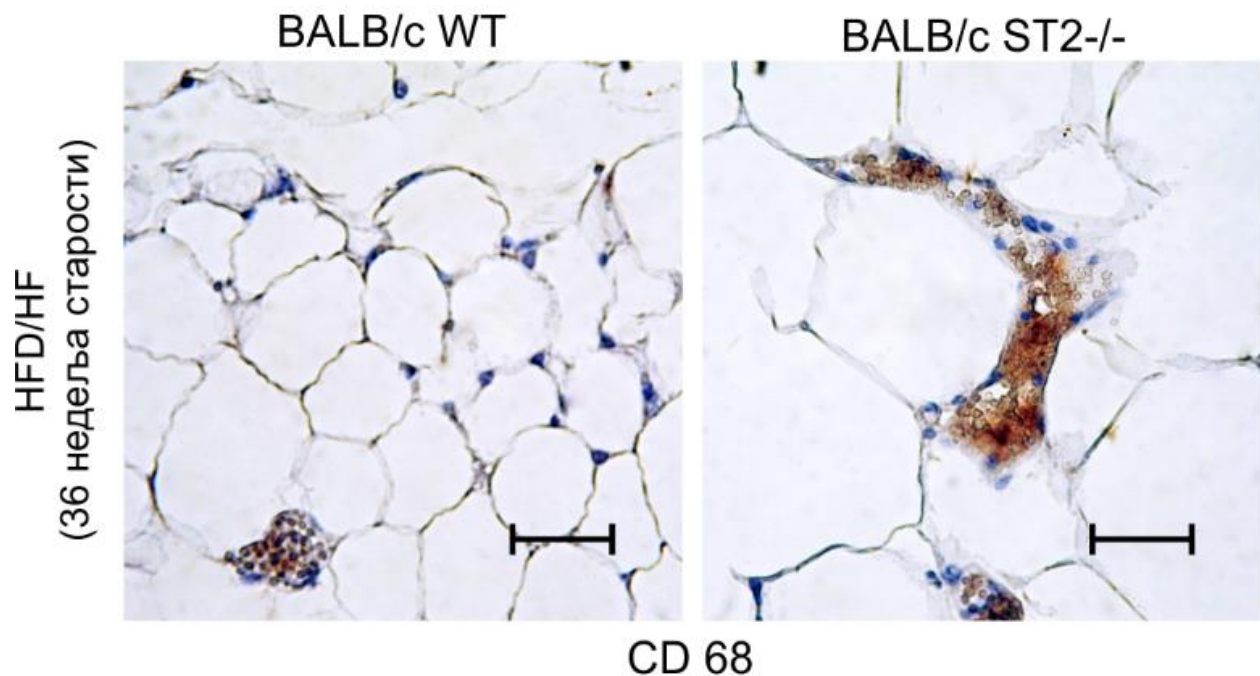
#### *4.3.4. Фенотипска анализа имунских ћелија у висцералном масном ткиву BALB/c мишева дивљег соја и ST2<sup>-/-</sup>BALB/c мишева на комбинованом режиму исхране*

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

Показали смо 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 смо такође показали 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. Показали смо и да је проценат F4/80<sup>+</sup>Arginase 1<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 смо потврдили патохистолошком анализом имунохистохемијског бојења поменутог маркера у ткиву (Слика 41).



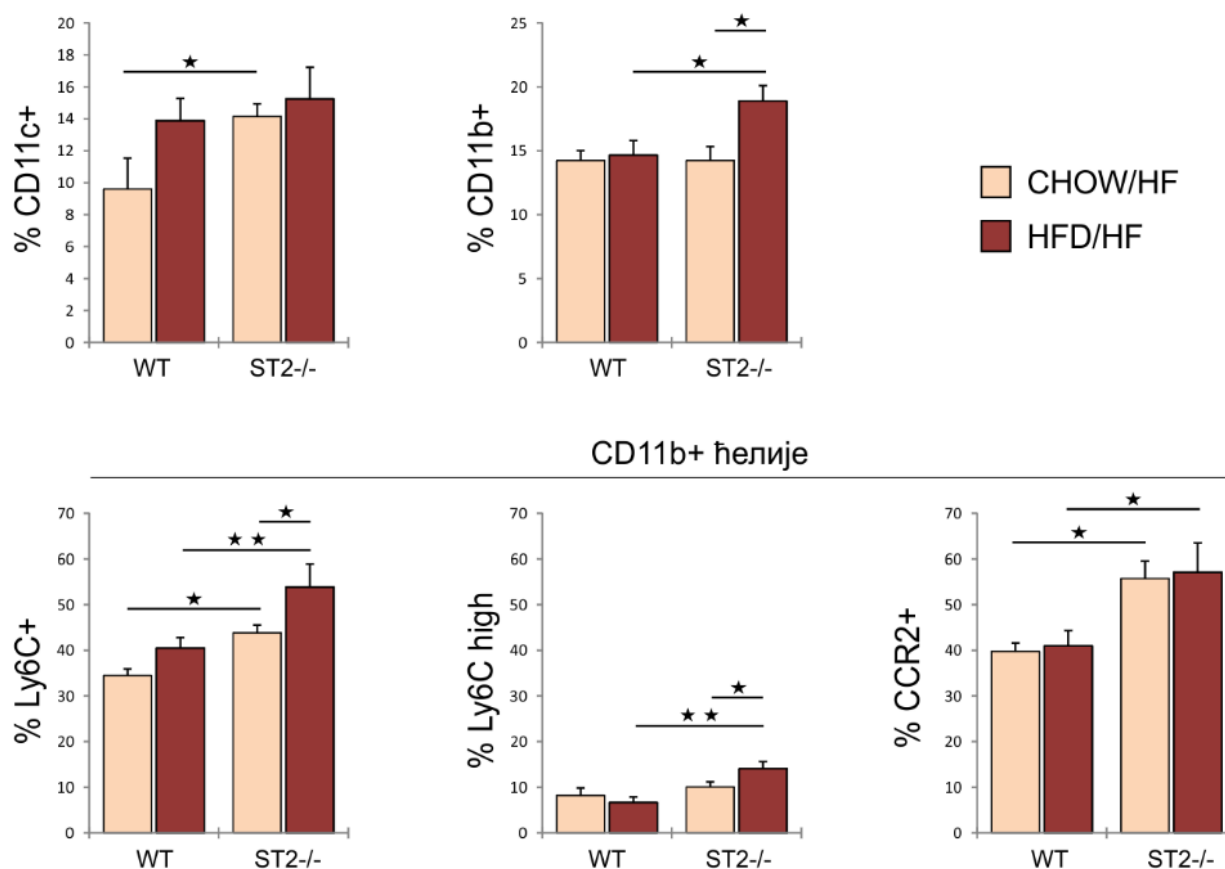
**Слика 40.** Фенотипска анализа макрофага у висцералном масном ткиву BALB/c WT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишева након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти и 4 недеље на комбинованој исхрани. Мононуклеарне ћелије изоловане из стромалне васкуларне фракције висцералног 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, установили смо 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).



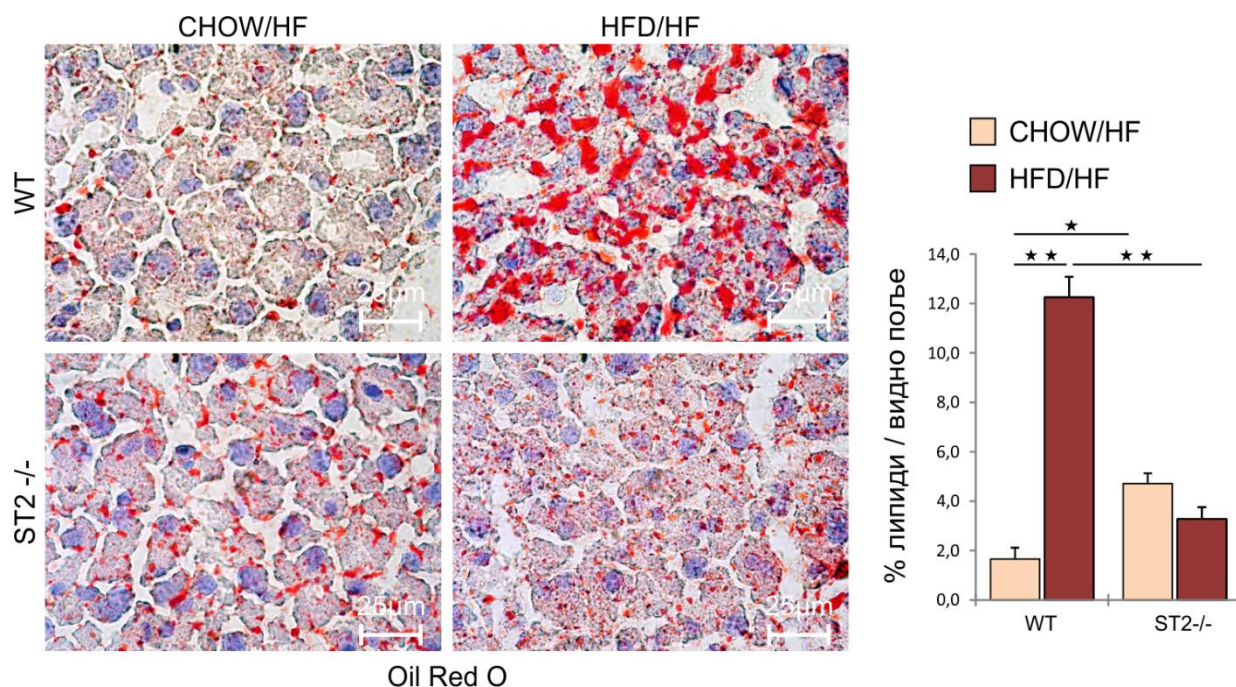
**Слика 42. Фенотипска анализа ћелија урођене имуности у висцералном масном ткиву BALB/c WT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишева након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти и 4 недеље на комбинованој исхрани.** Мононуклеарне ћелије изоловане из стромалне васкуларне фракције 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 смо испитивали користећи специфичну хистохемијску технику бојења, *Oil Red O*. Испитивање смо вршили користећи смрзнуте резове ткива дебљине 5 до 7  $\mu\text{m}$ , а семиквантитативну анализу смо извршили 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).





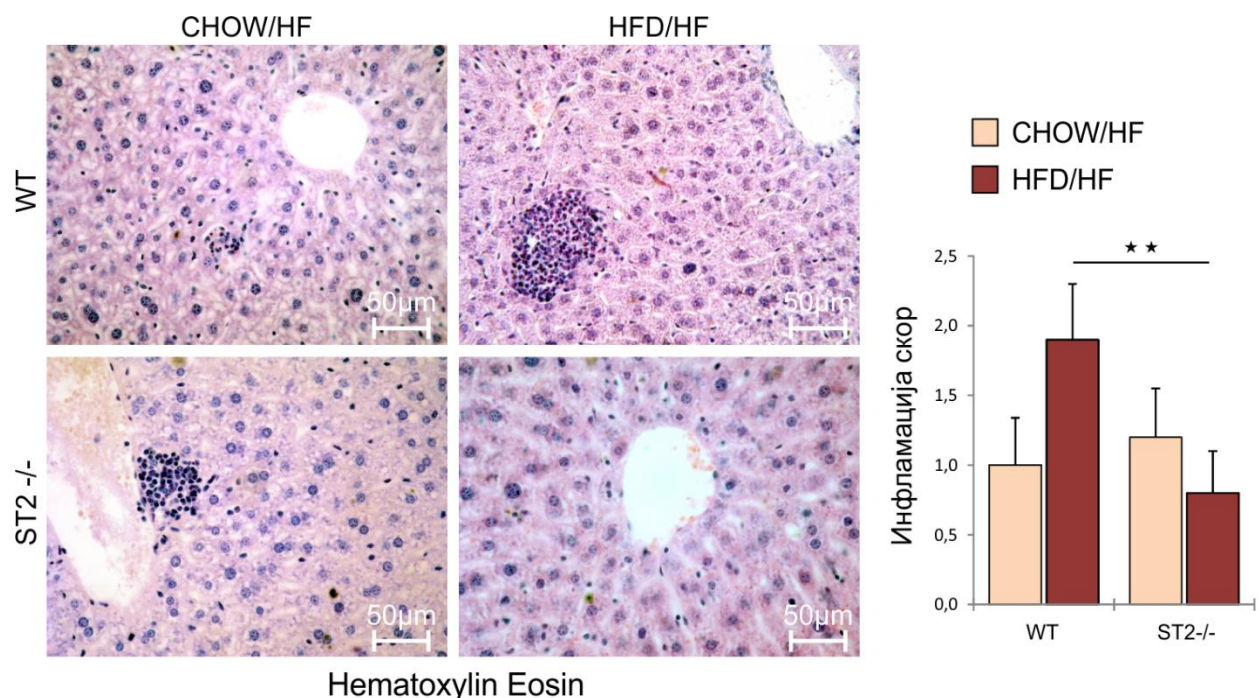
**Слика 43.** Стеатоза јетре BALB/c WT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишева након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти и 4 недеље на комбинованој исхрани. Репрезентативне фотомикрографије смрзнутих исечака ткива јетре обојених Oil Red O техником (увеличање x100, размера=25µm). 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 смо извршили квантификовање лобуларног инфилтрата ткива јетре. За квантификацију смо користили NAFLD скор систем (Kleiner DE. et al. *Hepatology* 2005; 41:1313-21.), коригован и прилагођен експерименталном анималном моделу болести.

Утврдили смо да, поређењем WT и ST2<sup>-/-</sup> група на CHOW/HF исхрани, 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

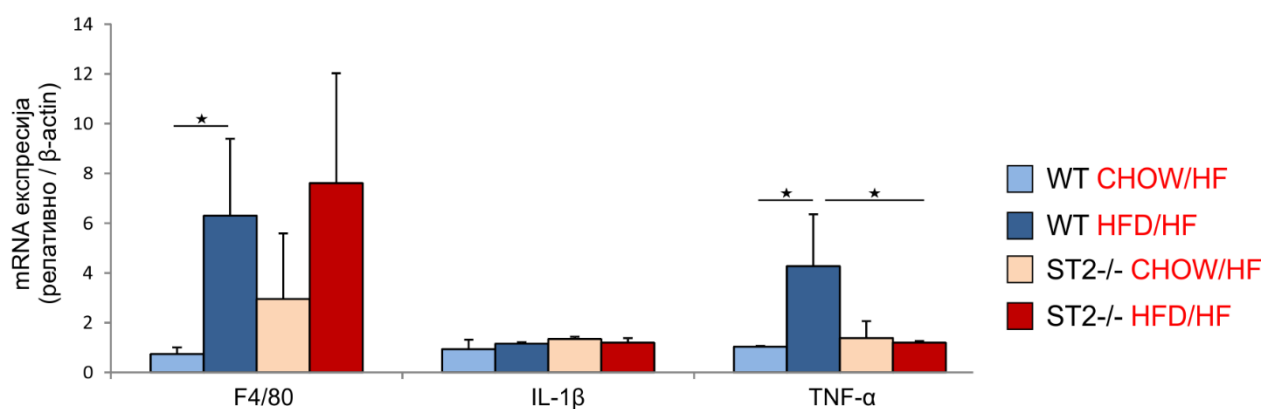
и који нису имали уједначену локализацију. Патохистолошком анализом ткива животиња на HFD/HF исхрани, показали смо да постоји значајно већа инфилтрација у јетри WT животиња у поређењу са ST2<sup>-/-</sup> животињама. У јетри WT мишева на HFD/HF исхрани, били су присутни организовани запаљенски инфилтрати,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



**Слика 44.** Инфилтрација ткива јетре VALB/c WT и VALB/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 смо такође испитивали и методом ланчане полимеризације у реалном времену при чему смо испитивали експресију гена у јетрикоји кодирају молекуле укључене у развој запаљења. Показали смо 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  $ST2^{-/-}$  мишева на HFD/HF исхрани али разлика није достигла статистичку значајност. Поређењем све четири експерименталне групе, установили смо 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  $ST2^{-/-}$  мишевима на HFD/HF дијети (Слика 45).



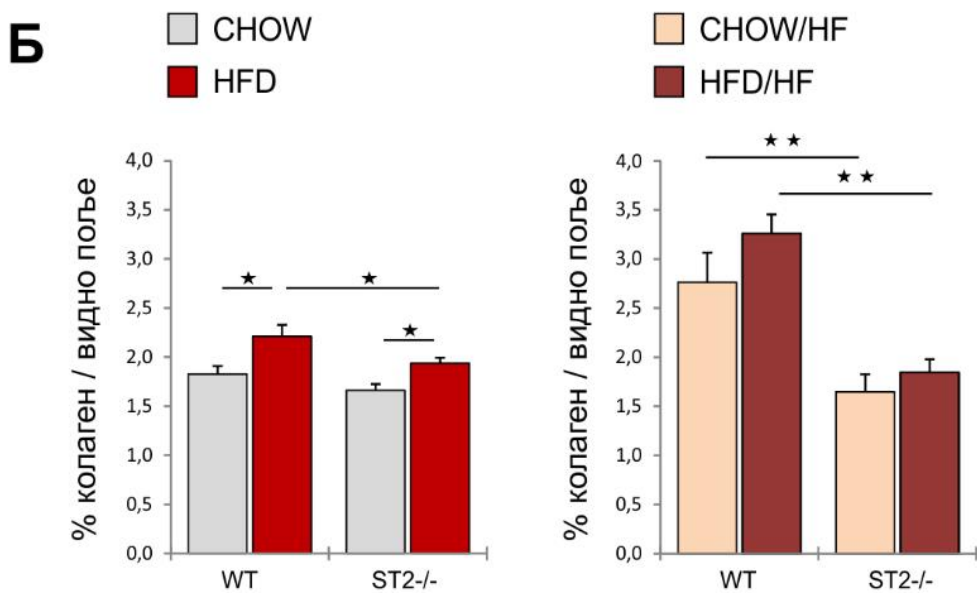
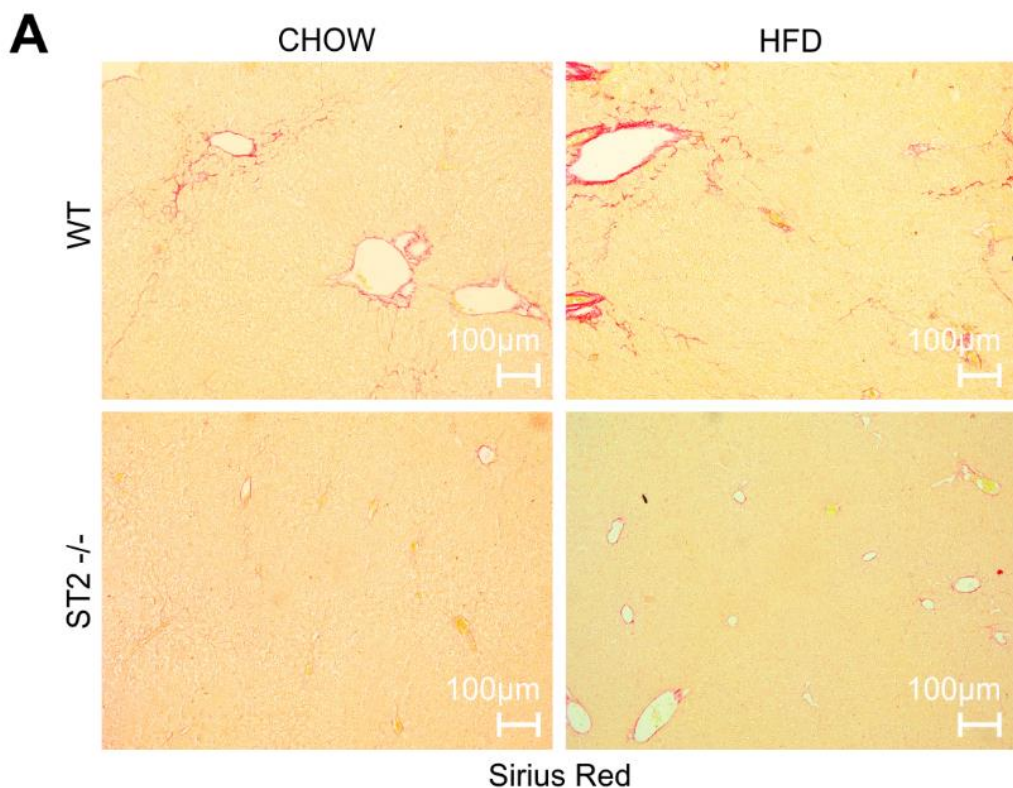
**Слика 45.** Експресија гена укључених у инфламацију у јетри BALB/c WT и BALB/c  $ST2^{-/-}$  мишева након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти и 4 недеље на комбинованој исхрани. Методом ланчане полимеризације у реалном времену испитали смо експресију гена укључених 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 $ST2^{-/-}$ -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 испитивали смо патохистолошком анализом парафинских исечака ткива јетре обојене *Sirius Red* хистохемијском техником.

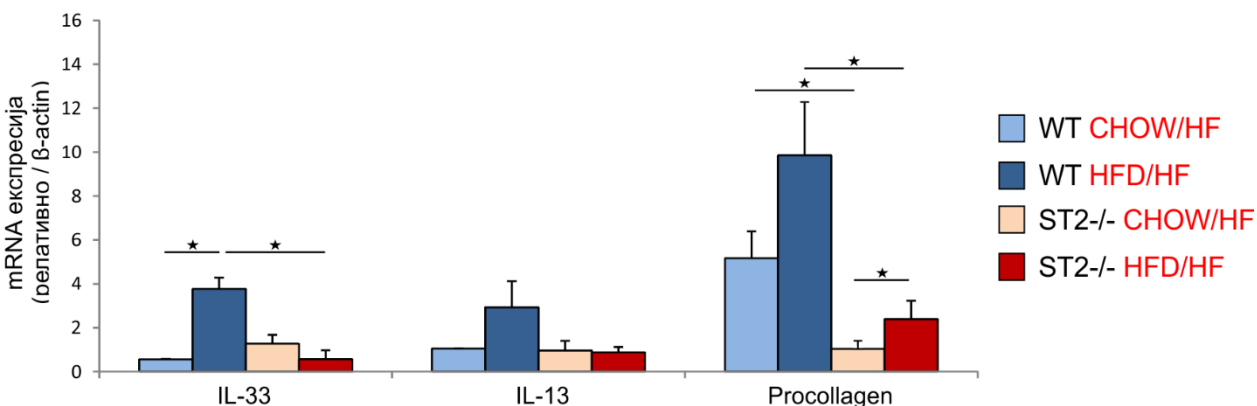
Примена високе концентрације раствора фруктозе у исхрани имала је изражен утицај на развој фиброзе јетре у групама животиња дивљег соја. Рачунарском анализом

фотомикрографија смо утврдили 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 смо утврдили да су 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 смо испитивали експресију 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, основну јединицу грађе колагеног влакна, 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).



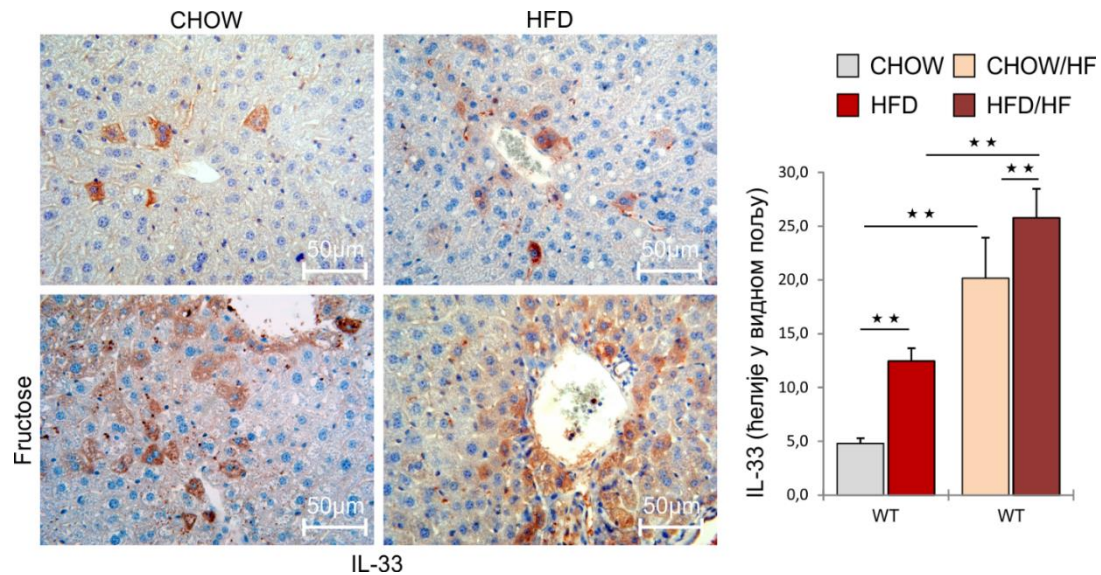
**Слика 48.** Експресија гена укључених у развој фиброзе у јетри BALB/c WT и BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишева након 24 недеље на стандардној исхрани и исхрани са високим садржајем масти и 4 недеље на комбинованој исхрани. Методом ланчане полимеризације у реалном времену испитали смо експресију гена за 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, испитивали смо заступљеност ћелија у јетри које експримирају IL-33, као и ћелија које експримирају рецептор за IL-33 (ST2). Пошто смо претходно показали да додавање високе концентрације

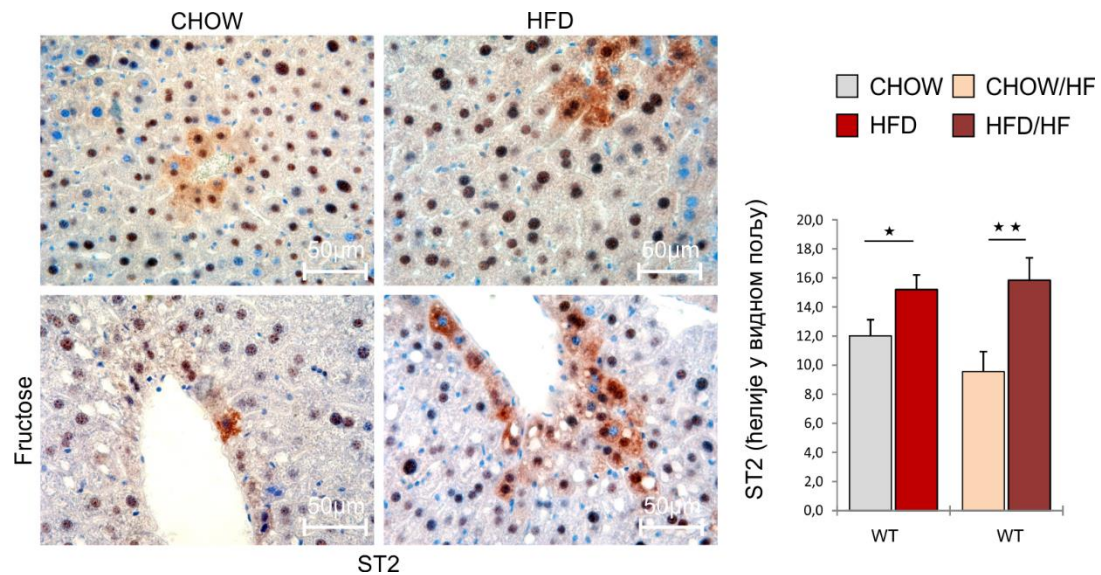
фруктозе исхрани са високим садржајем масти погоршава одређене метаболичке поремећаје, посебно фиброзу јетре, у овој анализи смо међусобно упоредили ткива јетре WTживотиња које су биле на HFD исхрани и ткива WTживотиња које су биле на комбинованој HFD/HF исхрани.

Установили смо да је број ћелија јетре које експримирају IL-33 значајно већи у групама WTживотиња које су биле на HFD односно HFD/HF исхрани у поређењу са својим контролним групама. Такође смо показали да је увођење фруктозе у исхрану значајно повећало број ћелија које експримирају IL-33, како у групама на стандардној исхрани, тако и у групама на исхрани храном са високим садржајем масти (Слика 49).

Поређењем броја ћелија јетре које експримирају ST2 молекулу, показали смо да је примена HFD односно HFD/HF исхране изазвала значајан пораст броја ST2 позитивних ћелија у односу на контролне групе. Такође смо показали да је број ST2 позитивних ћелија у јетри значајно већи код животиња на CHOW исхрани у односу на животиње на CHOW/HF исхрани(Слика 50).



**Слика 49.** 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 50.** 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 (177). У испитивању метаболичких обољења повезаних са гојазношћу користе се различити сојеи мишева, као и нокаут (енг: *knockout*) и трансгени мишеви. Сојно зависне разлике у развоју неалкохолног стеатохепатитиса и фиброзе јетре (178) 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 (179). 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 (180-182). У ова два соја мишева, поред разлике у типу Т ћелијском имунском одговору, показана је разлика у одговору макрофага на различите стимулусе (183). 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 смо показали урођене и разлике индуковане применом дијете са високим садржајем масти у имунометаболичком фенотипу између сојева мишева са доминантним тип 1 и тип 2 имунским одговором. Показали смо разлику 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 смо установили 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. Закључили смо 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 стандардном лабораторијском 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 храном са високим садржајем масти, мишеви C57Bl/6 соја су имали значајно већу телесну тежину у односу на BALB/c мишеве 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 храни са високим садржајем масти 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 (184, 185), док би према нашим резултатима овај сој мишева био отпоран на развој гојазности у овом експерименталном моделу.

Праћењем параметара гликорегулације показали смо, 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 значајн веће код мишева C57Bl/6 соја у току целокупног трајања експеримента. У току развоја гојазности који смо показали 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). Закључили смо 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, показали смо значајно већу количину 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 храном са високим садржајем масти (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.

Испитивали смо и морфолошке карактеристике висцералног адипозног ткива експерименталних животиња мерењем величине адипоцита. Код животиња старих 8 недеља адипоцити су били значајно већи са већом варијабилности у величини код C57Bl/6 соја у односу на BALB/c сој. Након 24 недеље исхране стандардном лабораторијском 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 храном са повећаном количином масти, 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, 186, 187). 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 је 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 смо показали да је 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 била значајно већа 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 (184, 188, 189).

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

Испитивањем ћелија урођене имуности, показали смо да је број  $CD11c^+F4/80^-$  дендритичних ћелија значајно већи у висцералном адипозном ткиву C57Bl/6 мишева на стандардном и на специјалном режиму исхране. Број  $F4/80^+$  макрофага се није разликовао између два соја на стандардној исхрани али је исхрана са високим садржајем масти значајно повећала број ових ћелија код C57Bl/6 мишева. Анализирали смо и ћелије стечене имуности и показали да се апсолутни број  $CD3^+$  лимфоцита и апсолутни број  $CD3^+CXCR3^+$  лимфоцита не разликују код мишева на стандардној исхрани, док су ове ћелије значајно бројније у висцералном адипозном ткиву C57Bl/6 мишева на исхрани са високим садржајем масти. CXCR3 хемокински рецептор је молекул који је у највећој мери експримиран на активираним Т лимфоцитима, претежно Th1 ћелијама, али може бити експримиран и на NKT ћелијама (190, 191). 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, 192-194). 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,  $CD11c^+F4/80^-$  дендритичних ћелија и  $F4/80^+$  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. Наши резултати су показали 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). Наши 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 (184). 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 (195). 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 смо ми користили храну 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 испитивали смо експресију гена у јетри који кодирају кључне молекуле укључене у метаболизам липида. Експресија гена за ABCA1 у јетри (енгл. *ATP-binding cassette transporter*), транспортни протеин који представља главни регулатор хомеостазе целуларног холестерола и фосфолипида (196) није се разликовала између два соја мишева. Такође није било разлике у експресији гена за CD36/FAT (енгл. *fatty acid translocase*), молекул који је одговоран за преузимање и унос слободних масних киселина у ћелију (197) 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 (198). 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 стандардној 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 специјалном режиму исхране експресија овог гена била значајно већа у јетри BALB/c соја. 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 стандардној храни, док је исхрана са високим садржајем масти 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 (199, 200). Иако LXR $\alpha$  има улогу у регулацији експресије гена за SREBP-1c (енгл. *sterol regulatory element-binding*

*protein 1*), није било разлике у експресији овог гена између сојева, али је храна са високим садржајем масти 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. Патохистолошким анализом смо показали 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 храном са високим садржајем масти 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 стандардној исхрани као и на исхрани храном са високим садржајем масти. 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 би је могли 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 стандардном 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 стандардној храни, а такође и код C57Bl/6 мишева храњених храном са високим садржајем масти, у поређењу са BALB/c мишевима на одговарајућем режиму исхране. Методом ланчане реакције полимеризације у реалном времену смо такође испитивали експресију 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 мишеве 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 мишеве на оба режима исхране. Анализом цитокина у серуму и хомогенизованом ткиву јетре смо показали 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 мишеве.

Ови резултати указују да показана је 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 (201). 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 нашим резултатима (202). Насупрот томе, у токсичним моделу оштећења јетре угљен тетра хлоридом (енгл. *carbon tetrachloride*, CCl<sub>4</sub>), BALB/c сој је, за разлику од C57Bl/6 соја био изузетно подложен развоју фиброзе јетре (203).

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

Апсолутни број CD3<sup>+</sup>T лимфоцита је био значајно већи у јетри C57Bl/6 мишева на исхрани са високим садржајем масти у односу на BALB/c сој. Није утврђена разлика у проценту CD4<sup>+</sup>T лимфоцита на оба режима исхране, али је проценат CD8<sup>+</sup>T лимфоцита био значајно већи у јетри C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c мишеве на стандардној исхрани, као и на исхрани храном са високим садржајем масти. Није постојала разлика у проценту CD3<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> лимфоцита у јетри C57Bl/6 и BALB/c мишева на оба режима исхране. Апсолутни број CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> дендритичних ћелија је био значајно већи код C57Bl/6 мишева на стандардној хрни у односу на BALB/c мишеве. Код исхране на храни са високим садржајем масти, апсолутни број CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> дендритичних ћелија је порастао у оба соја, и поново је био већи у јетри C57Bl/6 мишева. 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 на оба режима исхране. На исхрани стандардном лабораторијском храном апсолутни број F4/80<sup>+</sup> макрофага је био значајно већи у јетри C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c. На исхрани стандардном лабораторијском храном апсолутни број F4/80<sup>+</sup> макрофага је био значајно већи у јетри C57Bl/6 мишева у односу на BALB/c мишеве. На исхрани храном са високим садржајем масти апсолутни број F4/80<sup>+</sup> макрофага је порастао у оба соја али није било статистички значајне разлике између сојева мишева.. Апсолутни број CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup> проинфламаторних моноцитаје био значајно већи у јетри C57Bl/6 мишева на оба типа исхране. Процент F4/80<sup>+</sup> макрофага који продукују IL-1 $\beta$  као и троструко позитивних проинфламаторних F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>high</sup>CD11c<sup>+</sup> макрофага је био значајно већи код C57Bl/6 мишева у поређењу са BALB/c мишевима на оба типа исхране. Процентуална заступљеност F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD206<sup>-</sup> M1 макрофага, била је значајно већа у јетри C57Bl/6 мишева на стандардној исхрани и на исхрани са повећаним садржајем масти у односу на BALB/c мишеве. Насупрот томе, проценат F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>CD206<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>T лимфоцити инфилтрирају јетру и својим проинфламаторним цитокинима стимулишу регрутовање макрофага (121), су и наши резултати који значајну улогу CD8<sup>+</sup>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 испитивали смо 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 (енгл. *innate lymphoid cells*) 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, користили смо ST2 дефицијентне BALB/c мишеве (ST2<sup>-/-</sup>) и BALB/c мишеве дивљег соја.

Иако су мишеви BALB/c соја релативно резистентни на индукцију гојазности храном са високим садржајем масти (195), 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, 204). У складу са овим студијама ми смо такође показали да је количина висцералног масног ткива већа код ST2<sup>-/-</sup> мишева на исхрани са високим садржајем масти.

Наши резултати показују да је степен стеатозе код ST2<sup>-/-</sup> мишева на исхрани са високим садржајем масти био значајно мањи у поређењу са WT мишевима. Степен стеатозе јетре је такође био значајно мањи и код ST2<sup>-/-</sup> мишева на стандардној дијети у поређењу са WT мишевима на истој дијети. Недостатак IL-33/ST2 сигналног пута код ST2<sup>-/-</sup> мишева на исхрани са високим садржајем масти 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 (205, 206). Наши резултати показују да се протективни ефекат IL-33 у гојазности не односи и на стеатозу јетре. Недавна студија сугерише да IL-33/ST2 експресија може промовисати липолизу у адипозном ткиву трудница (207). Можемо 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 смо показали да WT мишеви на исхрани са високим садржајем масти 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 смо

показали 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 (208, 209). За разлику од ST2<sup>-/-</sup> мишева, WT мишеви на исхрани са високим садржајем масти су имали значајно већу експресију гена за PPAR $\gamma$ , молекул чија је повећана експресија у хепатоцитима удружена са егзацербацијом стеатозе (210).

Наши резултати су указали на значајну улогу IL-33/ST2 сигналног пута у измењеном метаболизму липида у јетри у току развоја гојазности. Скорашња студија је показала да је за развој стеатозе јетре неопходна активација IL-1 сигналног пута (211). 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, ми смо показали да је број CD4<sup>+</sup>T лимфоцита који продукују IL-17 значајно мањи у јетри ST2<sup>-/-</sup> мишева на исхрани са високим садржајем масти у поређењу са WT мишевима. Инфламација јетре је била мање изражена код ST2<sup>-/-</sup> мишева на исхрани са високим садржајем масти у односу на WT мишеве, што смо показали хистопатолошким 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 исхрани са високим садржајем масти. 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 смо показали да је број CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>low</sup> моноцита знатно већи у јетри WT мишева на исхрани са високим садржајем масти. Ове ћелије имају профибротску функцију промовишући поларизацију M2 макрофага у јетри (212-214).

### 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

Улогу IL-33/ST2 сигналног пута у развоју гојазности и метаболичког синдрома смо такође испитали користећи експериментални модел 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 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*) (215). 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 (216).

Фруктоза је моносахарид који се примарно метаболише у јетри и која контролом активности глукокиназе утиче на преузимање глукозе у јетри и синтезу гликогена (216). 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 (217, 218).

Показали смо да су након 28 недеља исхране ST2<sup>-/-</sup> мишеви на оба типа исхране имали значајно већу телесну тежину у поређењу са мишевима дивљег соја на одговорајућем типу исхране. Праћењем вредности гликемије нашег уочили смо 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 (219-221). Након 4 недеље примене фруктозе,  $ST2^{-/-}$  мишеви на оба типа исхране су имали значајно мање вредности гликемије наше 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 смо показали да је примена фруктозе, што нисмо уочили у претходној студији у којој смо користили само HFD храну, 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 смо показали да су проценат  $F4/80^{+}$  макрофага као и проценти  $F4/80^{+}Ly6C^{+}$  ћелија и  $F4/80^{+}Ly6C^{high}$  ћелија значајно већи у висцералном масном ткиву  $ST2^{-/-}$  мишева. Такође смо показали да је проценат  $F4/80^{+}Arginase\ 1^{+}$  M2 макрофага значајно мањи у групама  $ST2^{-/-}$  мишева резултат који 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  $CD11b^{+}Ly6C^{high}$  проинфламаторних моноцита била значајно већа у висцералном масном ткиву  $ST2^{-/-}$  мишева на HFD/HF исхрани у поређењу са  $ST2^{-/-}$  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 смо користили (222). Анализирали смо и патохистолошке карактеристике стеатозе јетре и показали 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 (223, 224). 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.

Показали смо такође, патохистолошком 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. Показали смо 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 (225-227).

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<sup>-/-</sup>мишева примена фруктозе није имала утицај на развој фиброзе. Разлике у степену фиброзе јетре између мишева дивљег соја и ST2<sup>-/-</sup>мишева на исхрани са високим садржајем фруктозе смо потврдили испитивањем експресије гена који у јетри кодира синтезу проколагена. Значај IL-33 у настанку фиброзе јетре који прати развој гојазности смо показали 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 храном са високим садржајем масти 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 молекула, разлика узрокована исхраном је и даље била изражена.

Из наведених резултата смо закључили 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 смо утврдили 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

Показали смо и описали 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.

Анализирали смо и улогу IL-33/ST2 сигналног пута и показали да ова сигнална осовина има многоструке улоге у метаболичким поремећајима изазваним гојазношћу. IL-33/ST2 сигналнои 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, извели смо следеће закључке:

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 исхрани са високим садржајем масти 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 исхрани са високим садржајем масти 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 исхрани са високим садржајем масти 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 исхрани са високим садржајем масти 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 исхрани са високим садржајем масти у поређењу са BALB/c мишевима. Концентрације проинфламаторних IL-6, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ , као и профиброгенних IL-33, IL-13 и TGF- $\beta$  су знатно веће у хомогенату ткива јетре C57Bl/6 мишева на исхрани са високим садржајем масти 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 мишјем 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.

## 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. *Am J Clin Nutr.* 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.* 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. *Mol Genet Genomics.* 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. *J Clin Endocrinol Metab.* 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. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(11):5098-103.

9. Bjorntorp P. "Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis*. 1990;10(4):493-6.
10. Kissebah AH, Krakower GR. Regional adiposity and morbidity. *Physiol Rev*. 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. *J Clin Endocrinol Metab*. 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. *Obes Rev*. 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. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 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, Pirskhalava 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. *Obes Res*. 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. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 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. *J Clin Invest*. 1993;92(1):91-8.
30. Nielsen S, Guo Z, Johnson CM, Hensrud DD, Jensen MD. Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest*. 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. *N Engl J Med*. 1993;329(27):1988-92.
32. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000;106(4):473-81.
33. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest*. 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. *J Clin Invest*. 1988;82(5):1503-9.

35. Svedberg J, Bjorntorp P, Smith U, Lonnroth 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. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 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. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 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. *Curr Pharm Des*. 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. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 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. *J Clin Invest*. 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. *J Clin Invest*. 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. *J Lipid Res.* 2005;46(11):2347-55.
46. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol.* 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. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 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. *Int J Obes (Lond).* 2005;29(1):146-50.
50. Gordon S. Macrophage heterogeneity and tissue lipids. *J Clin Invest.* 2007;117(1):89-93.
51. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 2008;13:453-61.
52. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol.* 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. *J Clin Invest*. 2007;117(1):175-84.
56. Nguyen MT, Favelyukis 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. *J Biol Chem*. 2007;282(48):35279-92.
57. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(1):23-35.
58. Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, Ikutani 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. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 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. *Nat Med*. 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. *Nat Med*. 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. *J Immunol.* 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. *Nat Med.* 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.* 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. *Nat Med.* 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. *Nat Med.* 2012;18(3):363-74.
68. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science.* 2011;332(6037):1519-23.
69. Erickson SK. Nonalcoholic fatty liver disease. *J Lipid Res.* 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.* 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.* 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 Clin Proc.* 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. *J Gastroenterol.* 2012;47(3):215-25.
76. Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis and the metabolic syndrome. *Am J Med Sci.* 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. *J Clin Invest.* 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 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. *J Clin Invest.* 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 metabolism.* 2006;4(2):107-10.

82. Tappy L, Le KA. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev.* 2010;90(1):23-46.
83. Day CP, James OFW. Steatohepatitis: A tale of two &#x201c;hits&#x201d;? *Gastroenterology.* 114(4):842-5.
84. Burt AD, Mutton A, Day CP. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Semin Diagn Pathol.* 1998;15(4):246-58.
85. Tiniakos DG. Nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis: histological diagnostic criteria and scoring systems. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 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. *Am J Clin Pathol.* 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.* 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. *J Gastroenterol Hepatol.* 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. *Dig Liver Dis.* 2005;37(5):349-56.
94. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 2005;115(2):209-18.
95. Jou J, Choi SS, Diehl AM. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis.* 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. *Nat Med.* 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. *J Cell Mol Med.* 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. *Immunol Res.* 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. *Circ Res.* 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*. 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*. 2006;43(2 Suppl 1):S54-62.
105. Thomson AW, Knolle PA. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol*. 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. *J Surg Res*. 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. *J Biol Chem*. 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. *J Hepatol*. 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 Mol Med*. 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*. 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<sup>+</sup> 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*. 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*. 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*. 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. *Eur J Immunol*. 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*. 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. *Clin Exp Immunol*. 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*. 2014;59(5):1830-9.
124. Maher JJ, Leon P, Ryan JC. Beyond insulin resistance: Innate immunity in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 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 Lett.* 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. *Biochim Biophys 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. *Eur J Biochem.* 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. *J Biol Chem.* 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. *Nat Rev Immunol.* 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. *Biochem Biophys Res Commun.* 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. *EMBO J.* 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, Lecointe 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. *Eur J Immunol.* 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 Rev.* 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. *J Biochem.* 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. *J Exp Med.* 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 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. *Infect Immun*. 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. *J Immunol*. 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. *Eur J Immunol*. 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. *Eur J Immunol*. 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. *J Immunol*. 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. *Ann N Y Acad Sci*. 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. *Eur J Immunol*. 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. *J Immunol*. 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. *Immunol Lett*. 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. *Am J Pathol.* 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. *J Cereb Blood Flow Metab.* 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. *J Biol Chem.* 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. *Curr Opin Immunol.* 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 Int.* 2012;32(8):1200-10.
157. Harris HE, Raucchi 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. *J Immunol.* 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. *Ann Rheum Dis*. 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. *J Cell Mol Med*. 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. *Eur J Immunol*. 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. *J Hepatol*. 2012;56(1):26-33.
165. Erhardt A, Tiegs G. IL-33--a cytokine which balances on a knife's edge? *J Hepatol*. 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. *J Immunol*. 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. *Clin Rheumatol*. 2011;30(6):825-30.
168. Miller AM. Role of IL-33 in inflammation and disease. *J Inflamm*. 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. *Biochem Biophys Res Commun*. 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. the mouse genome. *Nature*. 2002;420(6915):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. *J Exp Med*. 2000;191(6):1069-76.
177. 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.

178. 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 Int.* 2013.
179. 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.
180. 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. *J Exp Med.* 1989;169(1):59-72.
181. Hsieh CS, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM. T cell genetic background determines default T helper phenotype development in vitro. *J Exp Med.* 1995;181(2):713-21.
182. 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.* 2002;18(4):342-7.
183. Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock.* 2004;22(5):460-6.
184. NISHIKAWA. Involvement of Sex, Strain and Age Factors in High Fat Diet-Induced Obesity in C57BL/6J and BALB/cA Mice. *Exp Anim.*
185. Alexander J, Chang GQ, Dourmashkin JT, Leibowitz SF. Distinct phenotypes of obesity-prone AKR/J, DBA2J and C57BL/6J mice compared to control strains. *Int J Obes (Lond).* 2006;30(1):50-9.
186. Herberg L, Doppen W, Major E, Gries FA. Dietary-induced hypertrophic--hyperplastic obesity in mice. *J Lipid Res.* 1974;15(6):580-5.



187. 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.
188. 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. *Toxicol Pathol*. 2008;36(6):850-7.
189. Lin X, Yue P, Chen Z, Schonfeld G. Hepatic triglyceride contents are genetically determined in mice: results of a strain survey. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288(6):G1179-89.
190. Groom JR, Luster AD. CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res*. 2011;317(5):620-31.
191. 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.
192. Lumeng CN, Maillard I, Saltiel AR. T-ing up inflammation in fat. *Nat Med*. 2009;15(8):846-7.
193. 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. *Circ Res*. 2008;103(5):467-76.
194. Stolarczyk E, Lord GM, Howard JK. The immune cell transcription factor T-bet. *Adipocyte*. 2014;3(1):58-62.
195. 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.

196. 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. *J Lipid Res.* 2003;44(2):296-302.
197. 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. *J Biol Chem.* 2007;282(27):19493-501.
198. 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. *J Biol Chem.* 2015.
199. 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 Dev.* 2000;14(22):2819-30.
200. Yoshikawa T, Shimano H, Amemiya-Kudo M, Yahagi N, Hasty 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. *Mol Cell Biol.* 2001;21(9):2991-3000.
201. 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-.
202. 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. *J Hepatol.* 2007;46(1):134-41.

203. Shi Z, Wakil AE, Rockey DC. Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(20):10663-8.
204. Pantic J, Pejnovic N, Radosavljevic G, Jovanovic I, Djukic AL, Arsenijevic N, et al. Delecija gena za ST2 promoviše 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.
205. Ferre P, Fofelle F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2010;12 Suppl 2:83-92.
206. 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. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1343-51.
207. 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.
208. Grefhorst A, Parks EJ. Reduced insulin-mediated inhibition of VLDL secretion upon pharmacological activation of the liver X receptor in mice. *J Lipid Res*. 2009;50(7):1374-83.
209. 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 metabolism*. 2013;18(1):106-17.
210. 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 J*. 2011;25(8):2538-50.
211. 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.
212. 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. *J Immunol*. 2009;183(10):6733-43.
213. Karlmark KR, Weiskirchen R, Zimmermann HW, Gassler N, Ginhoux F, Weber C, et al. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology*. 2009;50(1):261-74.
214. 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.
215. 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. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;302(2):G225-35.
216. 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.
217. 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. *J Hepatol*. 2008;48(6):993-9.

218. 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*. 2010;51(6):1961-71.
219. 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. *Behav Brain Res*. 2007;178(1):139-45.
220. 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.
221. 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. *Nutr Metab*. 2015;12(1):1-11.
222. 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;21:453-65.
223. 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*. 2009;50(4):1094-104.
224. 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*. 2014;60(5):1581-92.

225. 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.
226. Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF- $\alpha$ -induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(4):G583-9.
227. Distler JHW, Schett G, Gay S, Distler O. The controversial role of tumor necrosis factor  $\alpha$  in fibrotic diseases. *Arthritis Rheum*. 2008;58(8):2228-35.