

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Marija N. Aleksić

**BIOGENEZA PEROKSIZOMA MRKOG MASNOSTI
PACOVA U HIPOTIROIDIZMU INDUKOVANOM
METIMAZOLOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Marija N. Aleksić

**BIOGENESIS OF RAT BROWN ADIPOSE TISSUE
 PEROXISOMES IN METHIMAZOLE-INDUCED
 HYPOTHYROIDISM**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

MENTORI

dr Aleksandra Korać

redovni profesor

Univerzitet u Beogradu–Biološki fakultet

dr Aleksandra Janković

naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu–Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”–Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

ČLAN KOMISIJE

dr Bato Korać

vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu–Biološki fakultet

naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu–Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”–Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

DATUM ODBRANE:_____

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena u okviru projekta 173055: „Belo ili/i mrko: značaj masnog tkiva u održanju ukupne redoks zavisne metaboličke kontrole u fiziološkim adaptacijama i metaboličkim poremećajima” Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, na Katedri za biologiju ćelija i tkiva i pri Centru za elektronsku mikroskopiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Deo ove doktorske disertacije urađen je na Odeljenju za fiziologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu.

Čast mi je i zadovoljstvo da se zahvalim svima koji su na bilo koji način doprineli izradi ove doktorske disertacije:

Prof. dr Aleksandri Korać, mentoru, na neizmernoj i nesebičnoj pomoći pri svakom koraku u toku naučnog i akademskog rada i pri pisanju disertacije. Hvala na ukazanom poverenju, usmeravanju i ohrabrenju.

dr Aleksandri Janković, mentoru, na prenesenom iskustvu, velikoj pomoći i savetima u eksperimentalnom radu.

dr Bati Koraću, mom profesoru i rukovodiocu projekta na svesrdnoj pomoći tokom svih ovih godina studija, na prenetom znanju, savetima i ukazanom poverenju.

Veliku zahvalnost dugujem i članovima Katedre za biologiju ćelija i tkiva i Centra za elektronsku mikroskopiju za pomoć u radu i podršku, *Igoru, Milici, Kseniji, Aniti, Maji i Sari*.

Mili Pajević i Mili Ljujić na velikoj pomoći u eksperimentalnom radu. Neizmerno hvala *Andeliki*, na pomoći, podršci, kolegijalnosti i drugarstvu.

Mojim prijateljima, na razumevanju, bezrezervnoj podršci, bodrenju i pomoći. Posebno hvala mojoj Biljani, što je uvek bila tu za sve. Milošu, koji je ušao u moj život pri samom kraju izrade ove disertacije, na strpljenju, podršci i pomoći.

Mojoj porodici – mami, tati, bratu, tetki i ujaku na ogromnoj i nesebičnoj podršci, razumevanju, strpljenju, bodrenju i iskrenom radovanju svakom mom uspehu postignutom tokom školovanja i u životu. Njima je ova disertacija posvećena.

Biogeneza peroksizoma mrkog masnog tkiva pacova u hipotiroidizmu indukovanom metimazolom

REZIME

Mrko masno tkivo (*eng.* BAT, brown adipose tissue) je izuzetno važno za održavanje ukupne metaboličke i energetske homeostaze. Iako su peroksizomi prepoznati kao važni partneri mitohondrija u procesu oksidacije masnih kiselina u mrkim adipocitima, još uvek nema podataka o njihovom nastanku i putevima biogeneze. Na modelu hipotiroidizma indukovano davanjem metimazola 7, 15 i 21 dan studirali smo remodeliranje peroksizoma i njihovu biogenezu u mrkim adipocitima pacova. Da bismo identifikovali peroksizome i puteve njihove biogeneze koristili smo imunofluorescentno obeležavanje katalaze i dva specifična metoda za njihovu vizualizaciju na ultrastrukturnom nivou, selektivnu citohemijsku tehniku obeležavanja peroksizoma diaminobenzidinom (DAB) i obeležavanje katalaze imunogoldom. Analizom dobijenih rezultata, otkrili smo da peroksizomi u mrkim adipocitima nastaju i kanonskim putem, od već postojećih organela rastom i deobom i *de novo*: pupljenjem samo sa glatkog endoplazminog retikuluma, samo sa spoljašnje membrane mitohondrija i hibridno – kombinacijom pupljenja sa glatkog endoplazminog retikuluma i sa mitohondrija. Svaki od puteva biogeneze zastupljen je u eutiroidnoj kontroli i intenziviran tokom hipotiroidizma na vremenski zavisani način i karakteriše se specifičnim profilima organela i setovima peroksina. Hipotiroidizam povećava broj peroksizoma za 1.8, 3.6 i 5.8 puta 7, 15. i 21. dana tretmana. Prisustvo peroksizoma, njihova distribucija i stepen sazrevanja su heterogeni u mrkim adipocitima na Harlekinu-sličan način, što odražava razlike u njihovom nastanku. Da bismo otkrili glavne molekulske igrače koji pokreću peroksizomalnu biogenezu, analizirali smo ekspresiju proteina peroksina (Pex) i membranskog transportera PMP70, uključenih u deobu peroksizoma (Pex11 β), *de novo* biogenezu peroksizoma (Pex16 i Pex19) i strukturno/funkcijsko sazrevanje peroksizoma (Pex16, Pex19, PMP70, Pex5, Pex13, Pex26, Pex6). Kanonski put biogeneze, odlikovan brojnim strukturama nalik na tegove i niske bisera, podržan visokim nivoima Pex11 β i Drp1, prevladao je 7. dana hipotiroidizma. *De novo* putevi peroksizomalne biogeneze intenziviraju se 15. dana i postaju dominantni 21. dana hipotiroidizma. Preusmeravanje biogeneze peroksizoma sa kanonskog na *de novo* put uslovljeno je povišenom ekspresijom Pex19, PMP70, Pex5S, Pex26, a karakteriše se brojnim tubularnim strukturama. Neočekivano, proteinska ekspresija Pex16 i Pex6 je bila snižena od 7. dana do kraja tretmana. Mitohondrijsko poreklo peroksizoma nije afektovano hipotiroidizmom i održava se na nivou eutiroidne kontrole. Proliferacija peroksizoma u hipotiroidizmu se odvija u dva koraka. Prvi korak, kanonskim putem se odvija 7. dana, kao brz odgovor na izmenjeni status tiroidnih hormona, a drugi korak, *de novo* putem, 21. dana, radi uspostavljanja i održavanja nove metaboličke homeostaze. Interesantno je da 15. dana dolazi do preklapanja ova dva puta. Budući da su ekspresija peroksina i proliferacija peroksizoma pod transkripcionom kontrolom receptora aktiviranih proliferatorima peroksizoma (*eng.* PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor), analizirana je ekspresija proteina PPAR α i PPAR γ , kao i koaktivatora 1 α (*eng.* PGC-1 α , PPAR γ co-activator 1 alpha). Snižena ekspresija PPAR α 15. i 21. dana, praćena izrazitim sniženjem ekspresije Pex16 verovatno ima ulogu u kontroli prekomerne proliferacije peroksizoma. Specifično peroksizomalno poreklo od mitohondrija u mrkim adipocitima, nezavisno od tiroidnog statusa, ukazuje na njihovo istovremeno i/ili čak uzajamno regulisanje u mrkim adipocitima pacova.

Još jedan aspekt povezanosti peroksizoma i mitohondrija u mrkim adipocitima ogleda se i u produkciji slobodnih radikala kao nusprodukata metaboličkih puteva koji se u njima

odvijaju, naročito tokom β -oksidacije masnih kiselina. Međutim, efekti hipotiroidizma na redoks i metaboličku homeostazu BAT takođe nisu dovoljno rasvetljeni. Da bismo istražili dinamiku ekspresije proteina, aktivnost i lokalizaciju enzima antioksidativne odbrane (*eng.* AD, antioxidative defense) u BAT pacova, primenili smo western blot analizu, analizu enzimske aktivnosti, kao i dva metoda vizualizacije enzima AD – imunofluorescentno i imunogold obeležavanje. Naši rezultati su pokazali povišenu proteinsku ekspresiju CuZn- i Mn-superoksid dismutaze, katalaze, glutamil–cistein ligaze, tioredoksina, ukupan sadržaj glutationa i aktivnost katalaze i tioredoksin reduktaze kod hipotiroidnih pacova, u poređenju sa eutiroidnom kontrolom. Istovremeno sa porastom AD, otkrili smo i novouspostavljenu nukleusnu, mitohondrijsku i peroksizomalnu lokalizaciju enzima AD. Hipotiroidizam takođe indukuje asocijaciju mitohondrija, peroksizoma i lipidnih tela (MPLB), koje kreiraju specifične strukturno-funkcijske jedinice. Šta više, hipotiroidizam indukuje i porast proteinske ekspresije i nukleusnu translokaciju glavnog regulatora redoks-metaboličke homeostaze, Nrf2 (*eng.* Nrf2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2), kao i povećanje sadržaja 4-hidroksinonenal (*eng.* 4-HNE, 4-hydroxynonenal) proteinskih adukta. Naši rezultati ukazuju na to da je vremenski i prostorno preklapanje u remodeliranju AD orkestrirano od strane Nrf2, implicirajući ulogu 4-HNE u ovom procesu i sugerišući potencijalni mehanizam redoks-strukturnog remodeliranja tokom adaptacije BAT na hipotiroidizam. Gledano sve zajedno, dobijeni rezultati – indukovana proliferacija peroksizoma i mitohondrija, intenzivna lipoliza, porast AD i formiranje MPLB jedinica, ukazuju na hipotiroidizmom indukovanu termogenu aktivaciju BAT.

Naši rezultati pokazuju da hipotiroidizam indukuje proliferaciju peroksizoma u mrkim adipocitima tako što intenzivira kanonski i *de novo* put njihove biogeneze na vremenski zavisani način. Paralelno sa proliferacijom peroksizoma, hipotiroidizam dovodi do redoks-zavisnog strukturnog remodeliranja mrkih adipocita koje se ogleda u subćelijskoj relokaciji enzima AD. Ove promene su blisko povezane sa funkcijskim udruživanjem peroksizoma sa organelama od kojih nastaju i lipidnih tela u odgovoru na izmenjeni metabolizam u uslovima hipotiroidizma.

KLJUČNE REČI: hipotiroidizam, peroksizomi, biogeneza peroksizoma, mitohondrije, lipidna tela, endoplazmin retikulum, mrki adipociti, mrko masno tkivo, redoks signalni put, antioksidativna odbrana, MPLB jedinice

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Biologija ćelija i tkiva

Biogenesis of rat brown adipose tissue peroxisomes in methimazole-induced hypothyroidism

Summary

Brown adipose tissue is especially important for maintaining overall metabolic and energy homeostasis. Even though peroxisomes are recognized as important partners of mitochondria carrying out fatty acid oxidation in the brown adipocytes (BA), there is still no evidence about their origin and pathway(s) of biogenesis. At the model of hypothyroidism induced by methimazole for 7, 15, and 21 days we studied peroxisomal remodeling and origin in the rat's brown adipocytes. To identify peroxisome and pathways of their biogenesis, we employ immunofluorescent labeling of catalase and two specific methods for their visualization at the ultrastructural level, a selective cytochemical diaminobenzidine (DAB) technique and catalase immunogold labeling. We found that peroxisomes originated by both, canonic, from pre-existing organelle by growth and division and *de novo* pathways: only from smooth endoplasmic reticulum by budding, only from the outer mitochondria membrane, and by combining budding from smooth endoplasmic reticulum and mitochondria as a hybrid in nature. Each pathway is operative in euthyroid control and intensified over the course of hypothyroidism in a time-dependent manner, and characterized by specific organellar profiles and sets of peroxins. Hypothyroidism increases the peroxisomal number by 1.8-, 3.6- and 5.8-time on days 7, 15, and 21 of treatment, respectively. Peroxisomal presence, distribution, and degree of maturation are heterogeneous in brown adipocytes in a Harlequin-like manner, reflecting the differences in their origin. To reveal the main molecular players that drive peroxisomal biogenesis we determined protein expression of peroxins (Pex) and peroxisomal membrane transporter PMP70, involved in peroxisome division (Pex11 β), *de novo* peroxisome biogenesis (Pex16 and Pex19), and peroxisome structural/functional maturation (Pex16, Pex19, PMP70, Pex5, Pex13, Pex26, Pex6). The canonic pathway, through numerous dumbbell-like and pearls on strings structures, and supported by high levels of Pex11 β and Drp1, prevailed on the 7th day of hypothyroidism. *De novo* pathways of peroxisomal biogenesis were intensified on the 15th day and become dominant on the 21st day. This redirecting of peroxisome biogenesis from canonic to *de novo* pathway is driven by increased protein expression of Pex19, PMP70, Pex5S, Pex26, and characterized by numerous tubular structures. Unexpectedly, Pex16 and Pex6 expression was decreased from day 7 until the end of the experiment. The mitochondrial origin of peroxisomes is not affected by hypothyroidism and is maintained at the level of euthyroid control. Hence, peroxisomal proliferation in hypothyroidism takes place in two steps. The first step, by the canonic pathway, occurred on the 7th day, as a fast response to the altered thyroid status, and the second step, by *de novo* pathway, occurred on the 21st day, to establish and maintain new metabolic homeostasis. It is interesting that on the 15th day, these two pathways overlap. Since Pex expression and peroxisomal proliferation are under transcriptional control of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR), the protein expression of PPAR α and PPAR γ , but also PGC-1 α (PPAR γ co-activator 1 α), were analyzed. Decreased PPAR α expression on the 15th and 21st day along with Pex16 strong downregulation, could be served to inhibit peroxisomal overproduction. The specific peroxisomal origin from mitochondria in brown adipocytes, regardless of thyroid status, indicates their simultaneous and/or even mutual regulation in rat's brown adipocytes.

One more aspect of the peroxisomes and mitochondria connection in brown adipocytes is reflected in the production of free radicals as by-products of metabolic pathways that take place in them, especially during β -oxidation of fatty acids. However, the effects of hypothyroidism on redox and metabolic homeostasis of BAT are also not sufficiently elucidated.

To investigate the dynamics of protein expression, activity, and localization of antioxidant defense (AD) enzymes in rats BAT, we applied western blot analysis, enzyme activity analysis, as well as two methods of AD enzyme visualization – their immunofluorescent and immunogold labeling. Our results showed an increased protein expression of CuZn- and Mn-superoxide dismutase, catalase, glutamyl–cysteine ligase, thioredoxin, total glutathione content, and activity of catalase and thioredoxin reductase in hypothyroid rats, compared to euthyroid control. Concomitant with the increase in AD, newly established nuclear, mitochondrial, and peroxisomal localization of AD enzymes were found. Hypothyroidism also potentiated associations between mitochondria, peroxisomes, and lipid bodies, creating specific structural-functional units. Moreover, hypothyroidism induced protein expression and nuclear translocation of a master regulator of redox-metabolic homeostasis, Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2), and an increased amount of 4-HNE (4-hydroxynonenal) protein adducts. Our results indicate that spatiotemporal overlap in the remodeling of AD is orchestrated by Nrf2, implicating the role of 4-HNE in this process and suggesting the potential mechanism of redox-structural remodeling during BAT adaptation to hypothyroidism. Taken together, induces proliferation of peroxisomes and mitochondria, intensive lipolysis increased in AD, and MPLB units forming, point out hypothyroidism induced BAT thermogenic activation.

Our results show that hypothyroidism induces peroxisome proliferation in brown adipocytes by intensifying the canonical and *de novo* pathways of their biogenesis in a time-dependent manner. In parallel with the peroxisomal proliferation, hypothyroidism leads to redox-dependent structural remodeling of brown adipocytes, which is reflected in the subcellular relocation of the AD enzymes. These changes are closely related to the functional association of peroxisomes with the organelles from which they originate and lipid bodies in response to altered metabolism under hypothyroid conditions.

KEYWORDS: hypothyroidism, peroxisomes, peroxisomal biogenesis, mitochondria, lipid bodies, endoplasmic reticulum, brown adipocytes, brown adipose tissue, redox signaling, antioxidative defense, MPLB-units

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SPECIAL TOPICS: Cell and Tissue Biology

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Peroksizomi – otkriće, struktura i funkcija	1
1.2 Biogeneza peroksizoma	3
1.2.1 Kanonski put biogeneze peroksizoma.....	3
1.2.2 <i>De novo</i> put biogeneze peroksizoma od glER	4
1.2.2.1 Peroksizomalni proteini uključeni u proces biogeneze.....	5
1.2.3 Učešće mitohondrija u <i>de novo</i> biogenezi peroksizoma.....	8
1.2.4 Regulacija biogeneze peroksizoma.....	9
1.2.5 Peksosofagija	10
1.3 Funkcije peroksizoma	10
1.3.1 Oksidacija masnih kiselina u peroksizomima.....	11
1.4 Tiroidni hormoni i hipotiroidizam.....	13
1.4.1 Receptori za tiroidne hormone	14
1.4.2 Molekulski mehanizmi delovanja tiroidnih hormona	15
1.4.3 Hipotiroidizam.....	15
1.5 Mrko masno tkivo	16
1.5.1 Mehanizam termogene aktivacije mrkog masnog tkiva i tiroidni hormoni	17
1.5.2 Hipotiroidizam, mrko masno tkivo i sistem antioksidativne odbrane	18
1.5.3 Peroksizomi u mrkom masnom tkivu.....	19
1.5.3.1 Peroksizomi i antioksidativna odbrana.....	20
2. CILJ	21
3. MATERIJAL I METODI	22
3.1 Eksperimentalne životinje.....	22
3.2 Dizajn eksperimenta	22
3.3 Žrtvovanje i izolacija tkiva.....	22
3.4 Izolacija lake mitohondrijske frakcije obogaćene peroksizomima.....	22
3.5 Priprema tkiva za analize.....	23
3.5.1 Priprema tkiva za Western Blot analizu	23
3.5.2 Priprema tkiva za svetlosnu i konfokalnu mikroskopiju	23
3.5.3 Priprema tkiva za elektronsku mikroskopiju.....	23
3.5.4 Priprema krvnog seruma i plazme.....	24
3.6 Određivanje koncentracije proteina.....	24

3.7 SDS-PAGE i Western Blot	24
3.8 Detekcija proteina nakon Western Blot analize.....	25
3.9 Određivanje aktivnosti enzima AD i ukupnog sadržaja GSH.....	26
3.9.1 Određivanje aktivnosti CuZnSOD i MnSOD	26
3.9.2 Određivanje aktivnosti CAT.....	26
3.9.3 Određivanje aktivnosti TR	26
3.9.4 Određivanje aktivnosti GR	26
3.9.5 Određivanje aktivnosti GSH-Px.....	26
3.9.6 Određivanje ukupnog sadržaja GSH u mrkom masnom tkivu	27
3.10 Određivanje koncentracije tiroidnih hormona i TSH.....	27
3.11 Određivanje koncentracije biohemijskih parametara	27
3.12 Lokalizacija proteina metodima imuno-obeležavanja.....	27
3.12.1 Imunohistohemijska lokalizacija proteina.....	27
3.12.2 Imunofluorescentna lokalizacija proteina	28
3.12.3 Imunogold lokalizacija proteina.....	28
3.13 Stereološke i morfometrijske analize	29
3.14 Statističke analize.....	30
4. REZULTATI.....	31
4.1 Analiza nivoa tiroidnih hormona i TSH u serumu.....	31
4.2 Relativan prinos telesne mase životinja.....	31
4.3 Analiza biohemijskih parametara.....	32
4.3.1 Koncentracije ukupnog holesterola, HDL, LDL i triglicerida u plazmi.....	32
4.3.2 Koncentracija glukoze, laktata, uree i kreatinina u plazmi	33
4.3.3 Koncentracija amilaze i kalcijuma u plazmi	33
4.4 Relativna masa mrkog masnog tkiva.....	34
4.5 Analiza mrkog masnog tkiva na ultrastrukturnom nivou.....	34
4.6 Promene na nivou mrkih adipocita.....	38
4.6.1 Morfometrijska i stereološka analiza mrkih adipocita	38
4.7 Promene na nivou pojedinačnih organela.....	38
4.7.1 Analiza broja i stereološka analiza peroksizoma	38
4.7.2 Analiza pozicije peroksizoma u ćeliji.....	39
4.7.3 Analiza broja i stereološka analiza mitohondrija.....	40
4.7.4 Morfometrijska analiza mitohondrija.....	40
4.7.5 Analiza broja i stereološka analiza lipidnih tela	41

4.7.6 Morfometrijska analiza lipidnih tela	42
4.7.7 Analiza broja lizozoma	43
4.8 Biogeneza peroksizoma u mrkim adipocitima	44
4.8.1 Proliferacija peroksizoma indukovana hipotiroidizmom.....	44
4.8.2 Identifikacija peroksizoma obeležavanjem katalaze imunogoldom.....	44
4.8.3 Zastupljenost peroksizomalnih struktura u mrkim adipocitima.....	47
4.9 Proteinska ekspresija molekulskih igrača biogeneze i sazrevanja peroksizoma	49
4.10 Proteinska ekspresija i imunolokalizacija Drp1, zajedničkog molekulskog igrača u deobi mitohondrija i peroksizoma.....	51
4.10.1 Mitohondrijsko poreklo peroksizoma- imunogold obeležavanje VDAC1.....	53
4.11 Analiza učesća glER u biogenezi peroksizoma.....	53
4.12 Analiza stepena zrelosti peroksizoma.....	54
4.12.1 Imunogold obeležavanje Pex16.....	54
4.12.2 Imunogold obeležavanje PMP70.....	55
4.12.3 Imunogold obeležavanje CAT.....	58
4.12.4 Imunogold obeležavanje CAT na izolovanim peroksizomima.....	60
4.12.5 Imunogold obeležavanje ACOX1 i ACOX3 – kolokalizacija	62
4.12.5.1 Pozicioniranje peroksizoma imunopozitivnih na ACOX1/ACOX3.....	64
4.13 Transkripciona regulacija biogeneze peroksizoma	66
4.13.1 Western blot analiza PPAR γ , PPAR α i PGC-1 α	66
4.14 Western blot analiza izoformi tiroidnih receptora (TR α 1, TR α 2, TR β 1), RXR α i DIO2.....	66
4.15 Imunofluorescentno obeležavanje tiroidnih receptora	68
4.15.1 Imunofluorescentna lokalizacija TR α 1.....	68
4.15.2 Imunofluorescentna lokalizacija TR α 2.....	69
4.15.3 Imunofluorescentna kolokalizacija TR α 1 i COX IV	70
4.16 Analiza efekta hipotiroidizma na sistem antioksidativne odbrane u BAT.....	71
4.16.1 Analiza proteinske ekspresije komponenti antioksidativne odbrane: CuZnSOD, MnSOD, CAT, GSH-Px, GCL i Trx.....	71
4.16.2 Analiza enzimske aktivnosti enzima antioksidativne odbrane u mrkom masnom tkivu: CuZnSOD, MnSOD, CAT, TR, GR, GSH-Px i ukupnog sadržaja GSH.....	73
4.17 Imunofluorescentna i imunogold lokalizacija enzima antioksidativne odbrane	75
4.17.1 Imunofluorescentna i imunogold lokalizacija CuZnSOD	75
4.17.2 Imunofluorescentna i imunogold lokalizacija MnSOD	76
4.17.3 Imunofluorescentna i imunogold lokalizacija CAT	79
4.17.4 Imunofluorescentna i imunogold lokalizacija GSH-Px	81

4.18 Analiza strukturne asocijacije peroksizoma sa mitohondrijama i lipidnim telima – uspostavljanje MPLB jedinica.....	83
4.19 Analiza transkripcione regulacije enzima antioksidativne odbrane.....	84
4.18.1 Western blot analiza Nrf2.....	84
4.18.2 Imunohistohemijska, imunofluorescentna i imunogold lokalizacija Nrf2.....	84
4.18.2 Imunofluorescentna i imunogold lokalizacija 4-HNE.....	87
5. DISKUSIJA	89
5.1 Hipotiroidizmom indukovane promene na nivou organizma	89
5.2 Promene na nivou tkiva, ćelija i organela indukovane hipotiroidizmom	90
5.3 Hipotiroidizam indukuje proliferaciju peroksizoma u mrkim adipocitima.....	92
5.3.1 Biogeneza peroksizoma kanonskim putem.....	92
5.3.2 <i>De novo</i> biogeneza peroksizoma.....	93
5.4 Stepen zrelosti peroksizoma mrkih adipocita	97
5.5 Transkripciona regulacija biogeneze peroksizoma.....	98
5.6 Hipotiroidizam, tiroidni receptori, RXR i DIO2	99
5.7 Hipotiroidizam indukuje promene u sistemu antioksidativne odbrane u BAT.....	100
5.7.1 Kreiranje specifičnih strukturnih jedinica u mrkim adipocitima	100
5.7.2 Uspostavljanje nove lokalizacije enzima antioksidativne odbrane.....	101
5.7.3 Transkripciona kontrola redoks remodeliranja mrkog masnog tkiva	102
5.7.4 Mehanizam redoks-strukturnog remodeliranja mrkog masnog tkiva	102
6. ZAKLJUČCI	104
LITERATURA	105
BIOGRAFIJA AUTORA.....	130

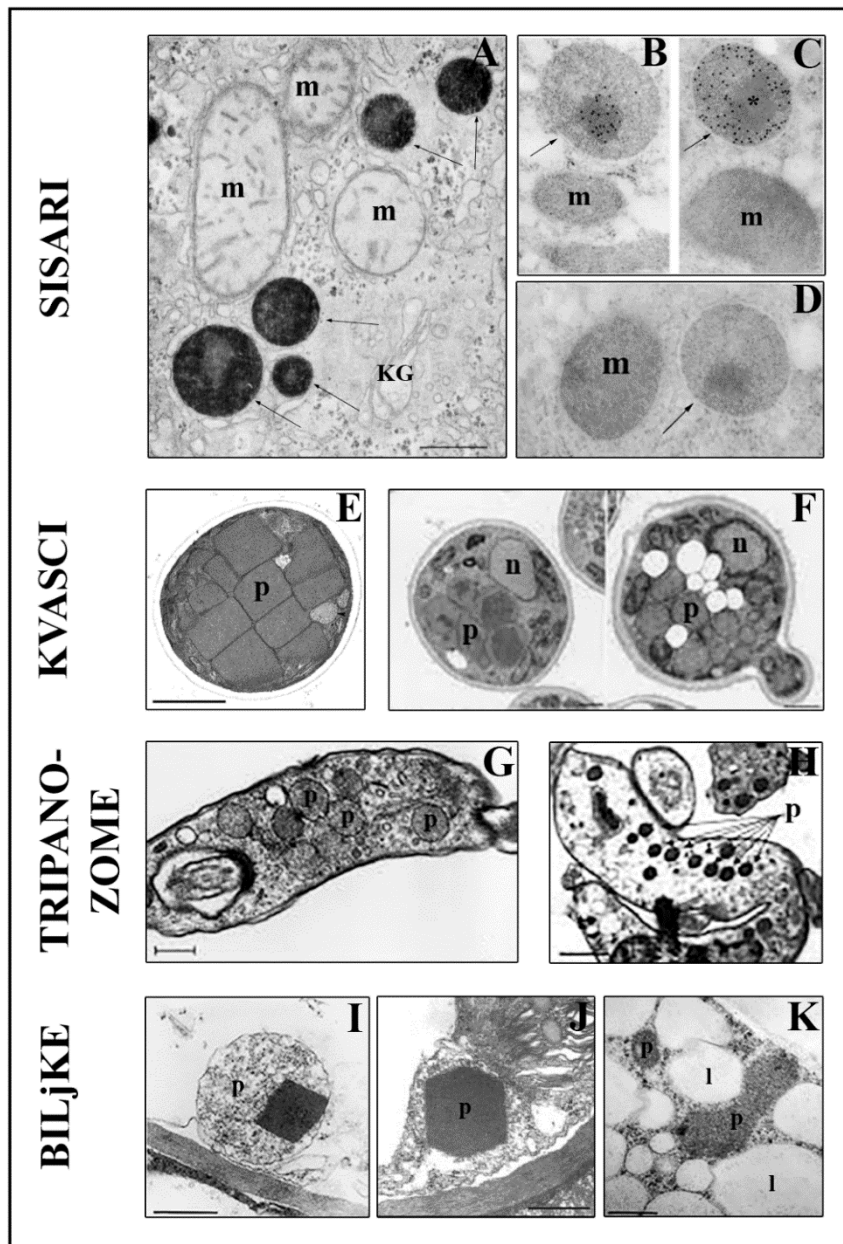
1. UVOD

1.1 Peroksizomi – otkriće, struktura i funkcija

Peroksizome je prvi put opisao Johannes Rhodin 1954. godine, tada student doktorskih studija na Karolinska institutu u Švedskoj, proučavajući ćelije proksimalnih bubrežnih tubula miševa (Rhodin, 1954). Posmatrajući ćelije na elektronskom mikroskopu, primetio je male organele sa jednom membranom i fino granulisanim matriksom, koje do tada nisu bile opisane i nazvao ih „mikrotelima”. Ubrzo potom, Rouiller i Bernhard (1956) su u ćelijama jetre pacova takođe primetili mikrotela sa gusto granulisanim i tamnim centralnim delom matriksa. S obzirom da su mikrotela u bliskom kontaktu sa mitohondrijama uočena u ćelijama jetre u procesu regeneracije, autori su ih smatrali prekursorima mitohondrija. Istovremeno, izolujući mikrotela zajedno sa lizozomskom frakcijom iz jetre pacova, Novikoff i sar. (1956) su ih smatrali delom lizozomskog sistema. Pošto njihova funkcija dugo nije bila poznata, mikrotela su smatrana „ćelijskom neobičnošću” i „ćelijskom kantom za smeće” (Schrader i Yoon, 2007; Vamecqi sar., 2014). Tek kasnije, Baudhuin i sar. (1965) su biohemijski okarakterisali ove organele. Analizom različitih frakcija organela iz jetre pacova otkrili su visok sadržaj H₂O₂-produkujućih (urat oksidaza i oksidaza D-amino kiselina), kao i H₂O₂-uklanjajućih (katalaza) enzima u matriksu mikrotela, kao i da su to organele koje se razlikuju od mitohondrija i lizozoma. Time je odbačena hipoteza da su to prekursori mitohondrija ili deo lizozomskog sistema i ove organele dobijaju naziv kakav danas nose – peroksizomi. Sedamdesetih godina dvadesetog veka, kada je upotrebom hipolipidemijskih lekova pokazana proliferacija peroksizoma u ćelijama jetre pacova i miševa, prvi put je pretpostavljena njihova uloga u metabolizmu lipida (Reddy i Krishnakantha, 1975). Ubrzo potom Lazarow i de Duve (1976) su pokazali da su peroksizomi jetre sposobni da oksiduju palmitoil-CoA, uz redukciju molekulskog kiseonika do H₂O₂, čime je pokazana fiziološka uloga peroksizoma u ćelijama sisara.

Danas peroksizome opisujemo kao membranom uspostavljene organele veoma heterogene po izgledu i veličini. To su visoko dinamične organele koje mogu veoma brzo da prilagode svoj oblik, veličinu, broj i enzimski sastav izmenjenom nutritivnom statusu i uslovima sredine (Smith i Aitchison, 2013; Vamecqi i sar., 2014). Peroksizomi su prisutni kod skoro svih eukariota i u svim ćelijama sisara (Imanaka, 2018). Jedini tip ćelija sisara kod kog nisu pronađeni peroksizomi su naravno eritrociti, koji inače ne sadrže organele (Lazarow, 1987). Broj peroksizoma u ćeliji je veoma varijabilan, njihova brojnost ukazuje na metaboličku aktivnost ćelije kao i na funkciju koju ove organele obavljaju u određenom tipu ćelije. Najbrojniji su u ćelijama tkiva koja aktivno učestvuju u metabolizmu lipida (hepatociti) i biosintezi mijelina (oligodendrociti). Nasuprot tome, u ćelijama poput fibroblasta i glatkih mišićnih ćelija peroksizomi su malobrojni (Lazarow, 1987). Veličina peroksizoma je takođe varijabilna, od sitnih mikroperoksizoma u Lajdigovim i ćelijama duodenuma (0.1-0.5 μm), do izrazito krupnih u ćelijama proksimalnih tubula bubrega (0.5-2 μm). Međutim, zbog prisustva kristaloida urat oksidaze u matriksu, peroksizomi su najuočljiviji u ćelijama jetre kičmenjaka (Slika 1), sa izuzetkom primata (Volkl i sar., 1988; Fahimi i Baumgart, 1999). Takođe, u matriksu peroksizoma u jetri glodara, može se uočiti kristaloid ksantin oksidaze (Angermüller i sar., 1987). Pored urat i ksantin oksidaza, peroksizomi u svom matriksu sadrže više od 50 enzima koji su uključeni u različite metaboličke procese u ćeliji. Njihova distribucija unutar peroksizoma nije nasumična, već su lokalizovani u okviru različitih subkompartmenata organele: submembranskom regionu, kristaloidnom jezgru ili matriksu. Prisustvo i pozicija

enzima u okviru peroksizomalnih subkompartmenata zavisi od vrste, kao i od organa u okviru iste vrste (Cancio i Cajaraville, 2000).



Slika 1. Morfološka heterogenost peroksizoma kod različitih vrsta organizama. (A-D) Peroksizomi jetre sisara sa: diaminobenzidinom (DAB) (A) i partikulama zlata (C) obeleženom katalazom, kristaloidom urat oksidaze obeleženim partikulama zlata (B) i neobeleženim kristaloidom urat oksidaze (D) u matriksu peroksizoma. (E-F) Peroksizomi kvasca: (E) *Hensula polymorpha* gajena na metanolnoj podlozi; (F) *Pishia pastoris* gajena na metanolnoj (levo) i oleatnoj podlozi (desno). (G-H) Peroksizomi *Trypanosome Brucei* – glikozomi. (I-K) Peroksizomi biljnih organa: (I, J) list paprike *Capsicum annum*, (K) kotiledon lubenice *Citrullus vulgaris*. m, mitohondrije; n, nukleus; KG, kompleks Goldži; l, lipidna tela; strelice, peroksizomi; zvezdice, kristaloid urat oksidaze. Barovi: (B-D) 0,2 μm , (A, G, H, J) 0,5 μm , (E, F, I, K) 1 μm . Preuzeto i modifikovano od: Shio i Lazarow, 1981; Volkl, i sar., 1988; van der Klei i sar., 2006; Barth i sar., 2014; Del Río i López-Huertas, 2016.

1.2 Biogeneza peroksizoma

Biogeneza peroksizoma je već duže vreme predmet istraživanja i debate u okviru naučnih krugova, ali su za nju vezani brojni kontradiktorni rezultati i zaključci pa do danas ostaje nerazjašnjena do kraja. Ono što zasigurno znamo jeste da biogeneza peroksizoma u ćeliji može da se odvija preko dva puta: kanonskog, rastom i deobom postojećih organela (Lazarow i Fujiki, 1985) i *de novo*, pupljenjem od glatkog ER (glER) (Novikoff i Novikoff, 1972). Oba puta dovode do formiranja novih peroksizoma koji se međusobno razlikuju. Biogeneza rastom i deobom brža je i energetski manje zavisna od *de novo* biogeneze. Takođe, nakon rasta i deobe postojećih peroksizoma novi sadrže i “stare” i “nove” membrane i komponente matriksa, dok kod *de novo* biogeneze novonastali peroksizomi sadrže potpuno nove (Smith i Aitchison, 2013).

1.2.1 Kanonski put biogeneze peroksizoma

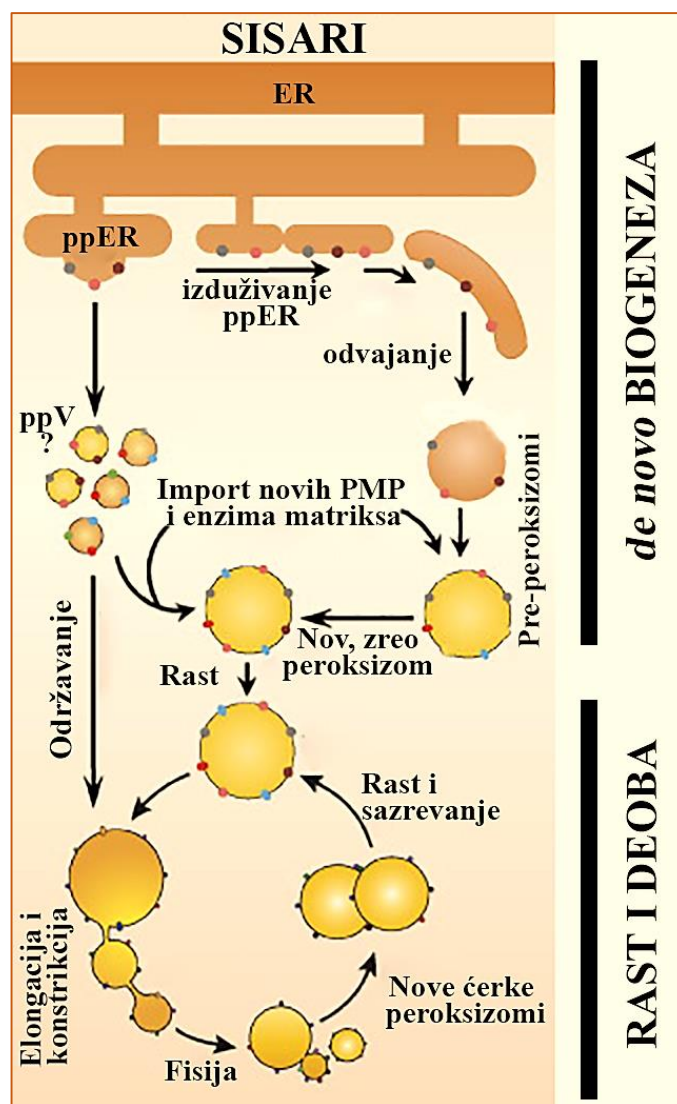
Zbog mogućnosti njihovog nastanka rastom i deobom u ćelijama u kojima već postoje, peroksizomi se, poput mitohondrija i hloroplasta, smatraju autonomnim organelama. Međutim, ta autonomija ipak nije potpuna, jer zahteva unos novih lipida i proteina membrane, koji prate rast peroksizoma pre deobe (Schrader i Fahimi, 2006). Ovaj model je dobro istražen i prihvaćen pre više od dvadeset godina. Opisan je kod kvasaca, biljaka i ćelija sisara, a podržan je otkrićem struktura koje liče na međusobno spojene tegove (*eng.* dumbbell structures), zapaženim na histološkim presecima jetre (Lodhi i Semenkovich, 2014). Biogeneza peroksizoma od postojećih organela je postepen proces koji zahteva učešće peroksizomalnih membranskih proteina – peroksina (*eng.* Pex, peroxin). Peroksin 11 (Pex11) familija se sastoji od velikog broja membranskih proteina konzerviranih kod gljiva, biljaka i sisara, koji kontrolišu proliferaciju peroksizoma i regulišu peroksizomalnu morfologiju, veličinu i broj (Li i Gould, 2002, 2003; Thoms i Erdmann, 2005; Koch i sar., 2005; Delille i sar., 2010; Koch i sar., 2010). Od tri izoforme Pex11 (α , β , γ) identifikovane kod sisara, Pex11 β je konstitutivno eksprimirana i poznato je da indukuje proliferaciju peroksizoma (Schrader i sar., 1998). Pex11 β promovise izduživanje peroksizoma, sužavanje i deobu, ali i njihovo sazrevanje, što ga čini glavnim peroksinom odgovornim za kanonski put biogeneze peroksizoma (Schrader i sar., 1998; Delille i sar., 2011). Prvi korak u ovom putu biogeneze je izduživanje postojećih organela, inicirano upravo od strane Pex11 β , a koje počinje formiranjem membranskih protruzija – peroksizomalnih nosića (Li i sar., 2002; Koch i sar., 2010). Sledeći korak se sastoji od daljeg izduživanja peroksizomalnih nosića, što je omogućeno unosom novih proteina i lipida membrane, a praćeno kretanjem Pex11 β duž nastalih tubularnih struktura (Delille i sar., 2010). Ove izdužene, tubularne strukture sadrže i neke rane peroksine odgovorne za biogenezu membrane peroksizoma, jer one u ovom koraku još uvek nisu potpuno kompetentne za unos proteina peroksizomalnog matriksa (Delille i sar. 2010). U sledećem koraku, Pex11 β homo-oligomerizacijom dovodi do formiranja konstrikcionihih mesta na tubularnim strukturama (Shema 1), što rezultira nastankom Pex11 β -bogatih domena u membrani peroksizoma (Kobayashi i sar., 2007). Pokazano je da je ovo oligomerno stanje Pex11 β redoks senzitivno i da je na taj način deoba peroksizoma u koordinaciji sa oksidativnim metabolizmom unutar samih peroksizoma (Marshall i sar., 1996). Iako Pex11 β nema sposobnost isecanja membrane odgovoran je za asembliranje ključnih komponenti peroksizomalne deobne mašinerije. Te komponente čine membranski receptorni proteini: mitohondrijski fisioni faktor – Mff (*eng.* mitochondrial fission factor) i mitohondrijski fisioni protein 1 – Fis1 (*eng.* mitochondrial fission protein 1), koji su zajednički za peroksizome i mitohondrije, a za koje je pokazano da interaguju sa Pex11 β (Kobayashi i sar., 2007; Joshi i sar., 2012). Naime, na kvascima je pokazano da fosforilacija Pex11 β reguliše njegovu interakciju sa Fis1 (Joshi i sar., 2012). Sve ove aktivnosti pokreću sledeći korak – konstrikciju membrane peroksizoma (segmentaciju tubularnih struktura), što

dovodi do nastanka struktura koje liče na tegove/mašne i niske bisera. Sledeći korak je asembliranje i/ili aktiviranje mašinerije za unos proteina i posledično unos drugih peroksizomalnih membranskih i matriksnih proteina. Na kraju, Pex11 β zajedno sa Mff i Fis1 regrutuje dinaminu sličan protein 1 – Drp1 (*eng.* dynamin-related protein 1), takođe zajednički za peroksizome i mitohondrije, čija je glavna uloga finalno isecanje membrane peroksizoma (Farré i sar., 2018). Pretpostavlja se da se paralelno sa strukturnim odvija i funkcijsko sazrevanje peroksizoma (Delille i sar., 2011), i da deobom nastaju potpuno zreli peroksizomi, sposobni da obavljaju svoje funkcije u ćeliji. Takođe, u zavisnosti od potreba ćelije u datom trenutku, peroksizomi mogu da menjaju svoj enzimski sastav favorizujući tako neku od specifičnih funkcija.

1.2.2 *De novo* put biogeneze peroksizoma od glER

Za razliku od kanonskog puta biogeneze peroksizoma, *de novo* biogeneza je u velikoj meri nepoznanica. Da su peroksizomi poluautonomne organele potvrđuje činjenica da nemaju svoj sopstveni genom, pa su svi njihovi membranski i matriksni proteini kodirani od strane nukleusnog genoma, sintetisani na polizomima u citoplazmi i potom uneti u/na peroksizome preko vezikula glER ili uz pomoć transportera (Subramani, 1998). Poreklo peroksizoma od glER pretpostavljeno je od strane Novikoff i Novikoff (1972), koji su prvi demonstrirali vezu između peroksizoma i glER. Autori su identifikovali strukture slične dršci, koje su prema njihovom mišljenju služile da pričvrste peroksizome za specijalne domene glER u ćelijama bubrežnih tubula zamoraca (Novikoff i Novikoff, 1972). Danas znamo da te strukture jesu prvi dokazi *de novo* biogeneze peroksizoma pupljenjem sa pre-peroksizomalnih tubula glER (Agrawal i Subramani, 2016; Erdmann, 2016). Pre-peroksizomalne tubule glER su specijalizovani domeni koji su bogati lipidima i proteinima peroksizomalne membrane. Prema mehanizmu koji se najčešće sreće u literaturi, pupljenjem sa njih nastaju pre-peroksizomalne vezikule, koje su kod kvasaca heterotipske (razlikuju se po sadržaju peroksizomalnih membranskih proteina) (van der Zand i sar., 2012), a njihovom fuzijom u citoplazmi nastaju potpuno novi pre-peroksizomi. Klasifikacija pre-peroksizomalnih vezikula je otkrila prisustvo elegantnog sortirajućeg mehanizma koji suprimira unos matriksnih proteina u pre-peroksizomalne vezikule pre nego što se one potpuno odvoje od glER i postanu autonomne (Smith i Aitchison, 2013). Takođe, fuzija pre-peroksizomalnih vezikula je izrazito selektivna, tako da one ne mogu da fuzionišu sa zrelim peroksizomima, što osigurava korektan molarni odnos komponenti mašinerije za unos proteina kod zrelih peroksizoma (van der Zand i sar., 2012; Smith i Aitchison, 2013; Sugiura i sar., 2014). Novonastali pre-peroksizomi unose matriksne enzime direktno iz citoplazme i tek tada dostižu potpunu strukturno/funcijsku zrelost (Changle i Suresh, 2009; Schrader i sar., 2012; Fujiki i sar., 2014; Agrawal i Subramani, 2016; Schrader i sar., 2016; Islinger i sar., 2018; Farré i sar., 2018; Fujiki i sar., 2020). Međutim, kod ćelija sisara je otkriven poseban tip vezikularnih struktura (Shema 1), koje mogu da fuzionišu sa zrelim peroksizomima. Nastaju od granulisanog ER (grER), a smatra se da je njihova uloga dopremanje novih membranskih proteina i lipida, neophodnih za rast peroksizoma (Schmidt i sar., 2012; Agrawal i Subramani, 2016).

Prema mehanizmu koji su pretpostavili Agrawal i Subramani (2016), a koji se razlikuje od mehanizama *de novo* biogeneze peroksizoma uglavnom opisanih u literaturi, peroksizomi nastaju od specijalizovanih izduženih tubula glER. Od njih se kasnije formiraju globularni pre-peroksizomi (Shema 1), koji unosom novih proteina i enzima postaju zreli peroksizomi. Međutim, tačan molekularni mehanizam koji leži u osnovi ovog puta još uvek nije dovoljno razjašnjen.



Shema 1. Pretpostavljeni mehanizam *de novo* biogeneze peroksizoma pupljenjem sa glER u ćelijama sisara, uz proliferaciju peroksizoma rastom i deobom. Prema mehanizmu koji su pretpostavili Agrawal i Subramani (2016), peroksizomi nastaju sa specijalizovanih izduženih struktura glatkog ER, poznatih kao lamelarni ER. Pokazano je da je, uz Pex3 i Pex16 koji su kotranslaciono uneti u membranu ER, Pex13 takođe sortiran na ove lamele ER, koje se kasnije odvajaju i formiraju tubularne strukture, od kojih nastaju globularni pre-peroksizomi. Nastajanje globularnih pre-peroksizoma od tubularnih struktura često liči na retikulum, koji predstavlja prolaznu fazu u sazrevanju peroksizoma. Kada se jednom formiraju, pre-peroksizomi sazrevaju Pex19-zavisnim unosom novih membranskih proteina i matriksnih enzima, što rezultira nastankom zrelih peroksizoma koji sada mogu dalje da se dele. Pre-peroksizomalne vezikule (ppV) koje nastaju od granularnog ER kod sisara još uvek nisu opisane, ali su identifikovane pre-peroksizomalne strukture koje sekvencijalno dopremaju membranske protein. Dodatno, ove pre-peroksizomalne strukture fuzionišu sa postojećim, zrelim peroksizomima, omogućavajući njihov rast koji prethodi deobi. Dakle, ovo nisu pre-peroksizomalne vezikule koje fuzijom daju peroksizome, već one služe kao izvor novih membranskih proteina i lipida. Modifikovano prema [Agrawal i Subramani, 2016](#).

1.2.2.1 Peroksizomalni proteini uključeni u proces biogeneze

Tek 1996. godine, proteini koji su odgovorni za biogenezu peroksizoma (uključujući unos peroksizomalnih matriksnih proteina, biogenezu membrane, proliferaciju i nasleđivanje peroksizoma) dobili su zajednički naziv peroksini ([Distel i sar., 1996](#)). Do danas je kod sisara otkriveno ukupno 17 peroksina i peroksizomalnih membranskih proteina (*eng.* PMP, peroxisomal membrane protein): Pex11, Pex3, Pex16, Pex19, Pex5, Pex7, Pex13, Pex14, Pex1, Pex6, Pex26, Pex2, Pex10, Pex12, Pex23 (samo kod ljudi), PMP20 i PMP70 ([Schrader i Fahimi, 2006b](#); [Smith i Aitchison, 2013](#)). Neki od njih su odgovorni za kanonski put biogeneze

(pomenuti Pex11), neki su uključeni u unos novih peroksina u membranu peroksizoma i u *de novo* biogenezu (Pex16, Pex19), dok su drugi uključeni u strukturno i funkcijsko sazrevanje peroksizoma (Pex16, Pex19, Pex5, Pex13, Pex6, Pex26 i PMP70). Mehanizmi unosa peroksizomalnih membranskih proteina i matriksnih enzima su različiti, što u velikoj meri govori o selektivnom i strogo kontrolisanom procesu nastanka i sazrevanja peroksizoma.

Svi peroksizomalni membranski proteini se sintetišu na polizomima u citoplazmi, odakle se direktno ili indirektno preko ER, upućuju u peroksizome (Changle i Suresh, 2009; Smith i Aitchison, 2013). Za sada su poznata samo tri peroksina, koji su uključeni u unos PMP – Pex3, Pex16 i Pex19. Kada je u pitanju direktno upućivanje PMP ka membrani peroksizoma, peroksini Pex3 i Pex19 su esencijalni u tom procesu (Jansen i sar., 2021). Mehanizam unosa se zasniva na pepoznavanju PMP sekvenci za unos (*eng.* mPTS, membrane protein targeting signals) i vezivanju novosintetisanih PMP od strane Pex19 u citoplazmi, gde Pex19 funkcioniše kao receptor za PMP (Sacksteder i sar., 2000; Jones i sar., 2004). Potom se nastali Pex19-PMP kompleks transportuje do membrane peroksizoma gde se PMP vezuje za dokirajući faktor Pex3 i posledično inserira u membranu (Fang i sar., 2004; Jansen i van der Klei, 2019; Jansen i sar., 2021). Dodatno, Pex19 funkcioniše kao šaperon, sprečavajući agregaciju novosintetisanih PMP, tako da je njegova uloga u unosu PMP ključna (Jones i sar., 2004; Schmidt i sar., 2012). Sam mehanizam inseriranja PMP u membranu peroksizoma nije poznat. Indirektno upućivanje PMP u membranu peroksizoma je zavisno od peroksina Pex16 i ER (Theodoulou i sar., 2013). Pokazano je da se Pex16 kotranslaciono inserira u membranu ER (Hua i Kim, 2016), odakle se preko peroksizomalne lokalizujuće sekvence na N-kraju upućuje u peroksizome (Kim i sar., 2006). Smatra se da je Pex16, u saradnji sa Pex3 i Pex19, odgovoran za regrutovanje novih PMP na membrani peroksizoma (Changle i Suresh, 2009), kao i da je ovaj peroksin master regulator *de novo* biogeneze od ER (Kim i sar., 2006; Sugiura i sar., 2017). Međutim, tačan mehanizam indirektnog unosa PMP takođe nije poznat. Postoji nekoliko modela, koji polaze od formiranja heterotipskih vezikula koje fuzionišu i formiraju pre-peroksizome (van der Zand i sar., 2012), preko ER-izvedenih struktura koje sadrže sve PMP i sazrevaju u funkcionalne peroksizome (Geuze i sar., 2003), do vezikularnog transporta PMP sa ER na peroksizome (Motley i sar., 2015). Svi pomenuti modeli su atraktivni, ali ni jedan od njih ne opisuje kako se novosintetisani PMP ugrađuju u membranu (Jansen i van der Klei, 2019).

Za razliku od unosa peroksizomalnih membranskih proteina, unos peroksizomalnih matriksnih proteina je u velikoj meri razjašnjen. Peroksizomalni matriksni proteini se sintetišu na polizomima u citoplazmi i posttranslaciono se upućuju ka peroksizomima preko jednog od ukupno dva tipa peroksizomalnih lokalizujućih signala PTS1 i PTS2 (*eng.* PTS, peroxisomal targeting signal) (Fujiki i sar., 2008). Najveći broj peroksizomalnih matriksnih proteina sadrži PTS1 tip na svom C-kraju. PTS1 se sastoji od tripeptidne sekvence (S-K-L), izuzev kod katalaze gde PTS1 sadrži četiri aminokiseline (K-A-N-L) (Purdue i Lazarow, 1996). Neki peroksizomalni matriksni proteini, poput oksidaze amina i tiolaze, sadrže PTS2 tip lokalizujuće sekvence na svom N-kraju, koja se kod viših eukariota iseca nakon unosa (Francisco i sar. 2013). Peroksizomi su sposobni da unesu matriksne proteine u potpuno savijenoj i/ili oligomernoj formi, mada preferiraju monomernu formu (Walton i sar., 2017). Kod biljaka i sisara oba tipa signala, PTS1 i PTS2, se prepoznaju od strane citoplazmatskih receptora Pex5 i Pex7 i bivaju transportovani do peroksizoma (Pieuchot i Jedd, 2012). Pex5 je monomerni protein molekulske mase 70 kDa koji egzistira u dve dominantne izoforme nastale kao rezultat alternativnog splajsovanja: duga forma – Pex5(L), koja sadrži 639 amino kiselina i kraća forma – Pex5(S), koja sadrži 602 amino kiselina (Costa-Rodrigues i sar., 2005). Dodatnih 37 amino kiselina kod Pex5(L) izoforme sadrži Pex7 vezujući epotop što pruža mogućnost Pex5(L) da deluje kao Pex7 koreceptor za PTS2 matriksne proteine (Dodt i sar., 2001). Na taj način, kod sisara, dva puta unosa peroksizomalnih matriksnih proteina konvergijaju ka Pex5(L). Vezivanje PTS1 proteina od strane Pex5 zasniva se na interakciji PTS1 sekvence ciljanog proteina i specifičnog domena

u Pex5 koji sadrži sedam tetratrikopeptidnih ponovaka (TPR), ali i drugi regioni ciljanog proteina i Pex5 su takođe uključeni u interakciju (van der Klei i Veenhuis, 2006; Walton i sar., 2017). Koliko je Pex5 važan za unos matriksnih proteina pokazuju brojne uloge koje ostvaruje: funkcioniše kao solubilni receptor koji prepoznaje peroksizomalne membranske proteine u citoplazmi, vezuje ih i stabilizuje, a potom ih transportuje do dokirajućeg/translocirajućeg kompleksa u membrani peroksizoma, gde podstiče njihovu translokaciju kroz membranu organele (Freitas i sar., 2011). Dokirajuća/translocirajuća mašinerija (DTM) u membrani peroksizoma je kompleks od 800 kDa, koji se sastoji od Pex13 i Pex14 peroksizomskih transmembranskih proteina (Fujiki i sar., 2008). DTM gradi hidrofилni kanal kroz koji se novosintetisani proteini transportuju u matriks organele. Pojedinačne komponente DTM mogu da formiraju homo-oligomere, što ih čini podobnim za formiranje struktura sličnih porama na membrani peroksizoma. Jedan od modela uključuje mehanizam invaginacije membrane i otvaranje statičke pore (McNew i Goodman, 1996; Subramani, 2002), a drugi, šire prihvaćen, sugeriše formiranje privremene pore koju grade sami receptori za unos proteina (Subramani, 2002; Erdmann i Schliebs, 2005). Veoma je važna činjenica da unos peroksizomskih matriksnih proteina ne zahteva hidrolizu ATP, niti membranski potencijal, tako da se vodeća sila za translokaciju proteina kroz membranu peroksizoma zasniva isključivo na protein-protein interakcijama (Oliveira i sar., 2003).

Nakon unosa peroksizomskih matriksnih proteina, njihove PTS sekvence se isecaju od strane ligaza lokalizovanih u membrani peroksizoma, nakon čega oni postaju biološki aktivni enzimi, a solubilni PTS receptori se eksportuju iz peroksizoma. Pretpostavlja se da Pex7 prolazi kroz membranu peroksizoma zajedno sa PTS2 proteinima, ali to još uvek nije dovoljno razjašnjeno (Nair i sar., 2004), dok se Pex5 ugrađuje u dokirajući/translocirajući kompleks i postaje transmembranski protein (Carvalho i sar., 2007). Pex5 se kratko zadržava u okviru DTM, nakon čega se translocira do kompleksa od 500 kDa koji sadrži tri peroksina Pex2, Pex10 i Pex12, gde se monoubikvitinira na evolutivno konzerviranom cisteinskom ostatku (Carvalho i sar., 2007; Platta i sar., 2007), a potom biva ekstrahovan i vraćen nazad u citoplazmu, na ATP-zavisan način (Costa-Rodrigues i sar., 2005; Platta i sar., 2007; Williams i Stanley, 2010). Konačno, u citoplazmi biva deubikvitiniran i sposoban da ponovo vezuje PTS matriksnih proteina (Grou i sar., 2012). Sama ekstrakcija Pex5 iz DTM kompleksa u membrani peroksizoma vođena je proteinskim kompleksom koji se sastoji od dve ATP-aze – Pex1 i Pex6, i njihovog membranskog partnera Pex26 (Matsumoto i sar., 2003; Tamura i sar., 2006; Fujiki i sar., 2012). Pex1 i Pex6 su članovi familije ATP-aza, koje učestvuju u različitim ćelijskim procesima koji uključuju fuziju membrane, translokaciju DNK, degradaciju proteina i mikrotubularni transport (Hanson i Whiteheart, 2005). Pex26 je integralni protein peroksizomalne membrane čiji citoplazmatski N-kraj interaguje sa Pex1/Pex6 heterodimerom direktnim vezivanjem za Pex6. Pretpostavlja se da Pex26 funkcioniše kao peroksizomski dokirajući faktor za Pex1/Pex6 heterodimer. Međutim, Tamura i sar. (2014) su pokazali da se Pex26 kod sisara direktno vezuje za Pex14 i preko njega interaguje sa Pex5. Dalja istraživanja su pokazala da N-kraj Pex26 funkcioniše kao *scaffold* protein koji regrutuje Pex14/Pex5 kompleks zajedno sa Pex1/Pex6 kompleksom (Pedrosa i sar., 2018; Gardner i sar., 2018). To bi značilo da Pex5 nakon oslobađanja liganda koji nosi izaziva konformacionu promenu Pex14, koja za posledicu ima vezivanje Pex5 za Pex1/Pex6 eksportni kompleks. Pored toga, Weller i sar. (2005) su pokazali da nedostatak Pex26 u ćeliji onemogućava unos i PTS1 i PTS2 peroksizomskih matriksnih proteina. Takođe je pokazano da hepatociti sa mutiranim genom za Pex6, izolovani iz jetre obolelih od poremećaja biogeneze peroksizoma, PBD (*eng.* peroxisomal biogenesis disorders), nisu sposobni da unesu proteine matriksa ali zadržavaju određeni kapacitet za biogenezu membrane peroksizoma (Raas-Rothschild i sar., 2002). Iz tog razloga, kod ovih pacijenata umesto peroksizoma prisutni su takozvani „peroksizomski duhovi“.

Nakon dostizanja strukturne zrelosti unosom membranskih proteina i lipida i matriksnih enzima, peroksizomi postaju i funkcijski zreli. Glavni marker funkcijske zrelosti peroksizoma je katalaza, zahvaljujući čijoj aktivnosti su peroksizomi i dobili ime. Katalaza (EC 1.11.1.6) je tetramerni enzim koji sadrži hem kao prostetičnu grupu, sintetiše se na polizomima u citoplazmi i unosi posttranslaciono u matriks peroksizoma u stabilnoj savijenoj formi (Walton i sar., 1995; Purdue i Lazarow, 1996). Sam unos katalaze u peroksizome odvija se preko PTS1 sekvence na C-kraju (Terlecky i Walton, 2005; Freitas i sar., 2011) u formi monomera, koji potom grade katalitički aktivne homotetramerne enzime (Walker i sar., 2018). Kod ljudi, katalaza je eksprimirana u svim organima, a najviši stepen njene aktivnosti izmeren je u jetri, bubrezima i eritrocitima (Glorieux i Calderon, 2017). Katalaza je primarno peroksizomalni enzim, ali je pokazana i njena lokalizacija u citoplazmi (Zhou & Kang, 2000; Raivio i sar., 2013), nukleusu (Christie i Stoward, 1979; Zhou i Kang, 2000; Raivio i sar., 2013) i mitohondrijama (Radi i sar., 1991). Katalitička reakcija katalaze je najbrža poznata enzimska reakcija u živim sistemima. Katalaza može razgraditi 12 miliona molekula H_2O_2 u sekundi, a njena brzina je direktno proporcionalna koncentraciji H_2O_2 (Nelson i Cox, 2008). Pored redukcije H_2O_2 katalaza je sposobna da oksiduje supstrate poput etanola, metanola, fenola i nitrita – peroksidazna aktivnost katalaze (Schrader i Fahimi, 2006b). Pri niskoj koncentraciji H_2O_2 i u prisustvu dostupnog donora H_2 , peroksidazna reakcija katalaze dominira nad katalitičkom. Takođe je pokazano da katalaza može biti katalitički aktivna u odsustvu H_2O_2 na šta ukazuje njena sposobnost da oksiduje neke visoko reduktivne supstrate poput benzidina, koristeći molekulski kiseonik (Gebicka i Krych-Madej, 2019). Na osnovu navedenog, katalazu s pravom možemo nazvati multifunkcijskim enzimom.

1.2.3 Učešće mitohondrija u de novo biogenezi peroksizoma

Podaci o postojanju međusobne veze i funkcijske saradnje između peroksizoma i mitohondrija, s početka oskudni, rasli su značajno poslednjih godina. Njihova metabolička saradnja u procesima β -oksidacije i uklanjanju reaktivnih vrsta kiseonika i azota (*eng.* ROS i RNS, reactive oxygen i nitrogen species) su najbolje izučeni primeri međuorganelarnog *crosstalk* (međuorganelarna saradnja) (Fransen i sar., 2012; Lismont i sar., 2015). Od posebnog značaja je i to što mitohondrije i peroksizomi dele ključne proteine deobne mašinerije (Mff, Fis1, Drp1), na osnovu čega bi se moglo pretpostaviti da i koordinisana deoba ovih organela u okviru određenih uslova i zahteva organizovano upućivanje i regrutaciju pomenutih proteina (Goldfisher i sar., 1973; Neuspiel i sar., 2008). Takođe, još jedan pokazatelj međuorganelarne saradnje jeste zajednička lokalizacija mitohondrijskog proteina – voltažno zavisnog anjonskog kanala 1, (*eng.* VDAC1, voltage-dependent anion channel 1), identifikovana kod peroksizoma kvasaca i glioksizoma biljnih semena (Messina i sar., 2012), ali ne i kod sisara (Antononkov i Hiltunen, 2006). Pored toga, peroksizomi i mitohondrije sarađuju i u anti-virusnoj signalizaciji i odbrani, a pojava oštećenih i nefunkcijskih mitohondrija u nekoliko slučajeva peroksizomalnih poremećaja je veoma dobro dokumentovana (Goldfisher i sar., 1973).

Otkrićem vezikularnog transporta između mitohondrija i peroksizoma započinje nova era u izučavanju načina komunikacije i saradnje među njima. Naime, pokazano je da vezikule izvedene od mitohondrija, koje sadrže dve membrane i mitohondrijsku protein ligazu MAPL (*eng.* mitochondrial anchored protein ligase), omogućavaju vezikularni transport od mitohondrija do peroksizoma, kod različitih ćelijskih linija (Neuspiel i sar., 2008). Dodatno, Neuspiel i sar. (2008) su pokazali da MAPL-vezikule fuzionišu sa posebnim setom peroksizoma (samo 10-20% ukupne populacije peroksizoma u ćeliji fuzioniše sa ovim vezikulama), pokazujući po prvi put direktnu vezu između mitohondrija i peroksizoma. Nadalje, Soubannier i sar. (2012) su pokazali da su vezikule izvedene od mitohondrija, MDV (*eng.* mitochondria derived vesicles) visoko selektivne prema sadržaju koji nose, mogu uključivati jednu ili obe

membrane mitohondrija i bogate su oksidovanim proteinima. Autori su takođe pokazali postojanje velike raznolikosti ovih vezikula i pretpostavili su da MDV učestvuju u kontroli kvaliteta mitohondrija tako što uklanjaju oksidovane proteine i lipide nastale u stanju oksidativnog stresa u ćeliji (Soubannier i sar., 2012). Pretpostavljeno je i da MDV služe za transport proteina, metabolita i lipida od mitohondrija do peroksizoma (Andrade-Navarro i sar., 2009). Takođe je spekulirano o tome da bi glavni sadržaj MDV mogle biti masne kiseline veoma dugog lanca ili modifikovane masne kiseline koje mogu da uđu u mitohondrije ali ne mogu da se oksiduju u njima. Ove masne kiseline bi preko MDV mogle biti transportovane do peroksizoma za oksidaciju i kao supstrat za sintezu plazmalogena. MDV bi takođe, kao transportno vozilo, mogle biti koristan izvor lipida tokom biogeneze peroksizoma po modelu rasta i deobe (Andrade-Navarro i sar., 2009). Pored vezikularnog transporta, kod kvasaca je opisan još jedan vid komunikacije između mitohondrija i peroksizoma (Mattiuzzi Ušaj i sar., 2015). Naime, pokazano je da peroksizomalni membranski protein Pex11 i mitohondrijski protein Mdm34 (*eng.* mitochondrial distribution and morphology protein 34) interaguju i na taj način omogućavaju uspostavljanje fizičkog kontakta između peroksizoma i mitohondrija (Mattiuzzi Ušaj i sar., 2015). Takođe je sugerisano da kod sisara protein adrenoleukodistrofije, ALDP (*eng.* adrenoleukodystrophy protein) ili ABCD1 (*eng.* adenosine triphosphate-binding cassette class D), omogućava interakciju između peroksizoma i mitohondrija, kao i da gubitak ove interakcije izaziva nastanak X-vezane adrenoleukodistrofije, X-ALD (*eng.* X-linked adrenoleukodystrophy), koja je asocirana sa gubitkom ABCD1 gena (McGuinness i sar., 2003).

Usled sve većeg broja dokaza o izmenjenoj morfologiji mitohondrija pri nedostatku peroksizoma u ćeliji, otkrića vezikularnog transporta i fizičkih kontaktnih mesta između peroksizoma i mitohondrija, rodila se ideja da mitohondrije mogu učestvovati u biogenezi peroksizoma (Neuspiel i sar., 2008; Horner i sar., 2011; Antonenkov i Hiltunen, 2012; Sugiura i sar., 2014). Prve pretpostavke o tome izneli su Mohanty i McBride (2013), ukazujući na mogućnost da, u svetlu vezikularne transportne rute od mitohondrija do peroksizoma, mitohondrije doprinose inicijaciji novih peroksizoma u ćelijama sisara. Isti autori su izneli i pretpostavku da pre-peroksizomalne vezikule poreklom od ER mogu fuzionisati sa pre-peroksizomalnim vezikulama nastalim od mitohondrija, čime obe organele hibridno, doprinose nastanku novih peroksizoma. Dalje dokaze o hibridnoj prirodi novonastalih peroksizoma pružili su Sugiura i sar. (2017) u ćelijskim linijama humanih fibroblasta kojima nedostaju peroksizomi, poreklom iz pacijenata sa Zellweger sindromom. Oni su pokazali da hibridna priroda novonastalih peroksizoma podrazumeva fuziju MDV, koje nose Pex13 i Pex14 i vezikula poreklom od ER koje nose Pex16, čime nastaju pre-peroksizomi kompetentni za unos matriksnih proteina. Međutim, da li peroksizomi mogu nastati *de novo* samo od mitohondrija i da li je to moguće u fiziološkim uslovima, ostaje otvoreno pitanje.

1.2.4 Regulacija biogeneze peroksizoma

Biogeneza peroksizoma je regulisana na nivou transkripcije posredstvom nukleusnih receptora aktiviranih peroksizomalnim proliferatorima, PPAR (*eng.* peroxisome proliferator-activated receptors). Ligandi koji aktiviraju PPAR transkripcione faktore su lipidi i lipofilne supstance, kao i sintetički hipolipidemijski lekovi (Thoms i Erdmann, 2005). Tri najistaknutija člana ovih nukleusnih receptora – PPAR α , PPAR γ , PPAR δ (β) pokazuju različite obrasce tkivne distribucije i profile ekspresije ciljnih gena (Berger i Moller, 2002). PPAR α je visoko eksprimiran u jetri i mrkom masnom tkivu, u kojima se smatra ključnim regulatorom oksidacije masnih kiselina. PPAR δ je ubikvitarno eksprimiran, uključen je u diferencijaciju adipocita i pokazuje značajna preklapanja funkcije sa PPAR α . PPAR γ je visoko eksprimiran u masnom tkivu i odgovoran je za regulaciju adipogeneze i ukupnog metabolizma u mrkom masnom tkivu (Guardiola-Diaz i sar., 1999; Schrader i sar., 2012; Lodhi i Semenkovich, 2014). Međutim, pored

PPAR α , PPAR γ se ističe kao potencijalni regulator biogeneze i funkcije peroksizoma u mrkom masnom tkivu (Guardiola-Diaz i sar., 1999; Hofer i sar., 2017). S obzirom na pokazanu saradnju peroksizoma i mitohondrija na različitim nivoima, na zajedničku ekspresiju mnogih proteina i enzima i na njihovu koordinisanu deobu, pretpostavlja se da je i njihova biogeneza regulisana od strane istih transkripcionih faktora. To je i pokazano u mrkom masnom tkivu miševa, u kome PGC-1 α (eng. PPAR γ co-activator 1 α), kao ključni regulator biogeneze mitohondrija i koaktivator PPAR γ , reguliše i biogenezu peroksizoma *in vitro* i *in vivo* (Ventura-Clapier i sar., 2008; Bagattin i sar., 2010).

1.2.5 Peksofagija

Nužnost svih eukariotkih ćelija da se brzo prilagode promeni različitih faktora sredine zahteva sposobnost da precizno i efikasno kontrolišu broj i funkcionalnost peroksizoma (Till i sar. 2012). Ravnoteža između biogeneze i uklanjanja (peksofagije) peroksizoma je esencijalna za održavanje peroksizomalnog pula, redoks, metaboličke i ćelijske homeotaze. Peksofagija sprečava akumulaciju funkciono kompromitovanih peroksizoma i održava redoks balans uklanjanjem oštećenih i nepotrebnih peroksizoma (Walker i sar., 2018). U ćelijama sisara, period poluživota peroksizoma je 1.5-2 dana (Nordgren i sar., 2013), a njihova selektivna degradacija uključuje tri glavna, nezavisna sistema: 1) LonP2 proteazni sistem kojim se uklanjaju pojedinačni peroksizomalni proteini; 2) sistem posredovan 15-lipooksigenazom, kojim se vrši peroksidacija lipida membrane i time njeno narušavanje dovodeći do curenja sadržaja peroksizomalnog matriksa u citoplazmu i proteaznu razgradnju membranskih i matriksnih proteina; i 3) sistem selektivne peksofagije kojim se uklanjaju cele organele (Ezaki i sar., 2011). Potreba za pojedinačnim sistemom uklanjanja i zastupljenost sva tri zavisi od metaboličkog stanja ćelije i tkiva. Tako su Yokota i Fahimi (2009) pokazali da se 70-80 % peroksizoma u jetri *atg7* nokaut miševa uklanja peksofagijom, a preostalih 20-30 % posredstvom LonP2 i 15-lipooksigenaznog sistema. Dodatno je pokazano da je ubikvitinacija peroksina takođe uključena u peksofagiju i za sada je to pokazano za Pex3 (Yamashita i sar., 2014; Schrader i Pellegrini, 2017) i Pex5 (Okumoto i sar., 2014; Walker i sar., 2018). Nepravilnosti u uklanjanju i degradaciji peroksizoma opisani su kao uzrok nekoliko humanih oboljenja, što ukazuje na važnu ulogu peksofagije u ćeliji (Terlecky, 2012).

1.3 Funkcije peroksizoma

U zavisnosti od vrste, organizma, uslova spoljašnje sredine, tipa ćelije, mikrosredine u kojoj se ćelije i peroksizomi nalaze, peroksizomi vrše različite funkcije. Najznačajnije od njih su: oksidacija masnih kiselina, biosinteza lipida kod sisara (plazmalogen, holesterol), sinteza žučnih kiselina, oksidacija alkohola i amina kod ćelija sisara i kvasaca, fotorespiracija i glioksilatni ciklus kod biljaka, biosinteza penicilina kod gljiva, glikoliza kod tripanozoma, sinteza enzima luciferaze kod svitaca, uklanjanje ROS i RNS, učešće u transportu metabolita i signalnim putevima u ćeliji, i mnoge druge (Alberts i sar., 2008; Fransen i sar., 2012; Wanders, 2014; Lodhi i Semenkovich, 2014; Erdmann, 2016). Međutim, u ćelijama sisara, najvažnije metaboličke funkcije peroksizoma uključuju: β -oksidaciju masnih kiselina dugog lanca, α -oksidaciju granatih masnih kiselina, sintezu fosfolipida, holesterola, oksidaciju holesterola do žučnih kiselina, metabolizam glioksilata, katabolizam amino kiselina, učešće u putu pentozo fosfata, oksidaciju poliamina, kao i produkciju i uklanjanje H₂O₂ i drugih ROS i RNS (Krisans, 1992; Fransen i sar., 2012; Lodhi i Semenkovich, 2014).

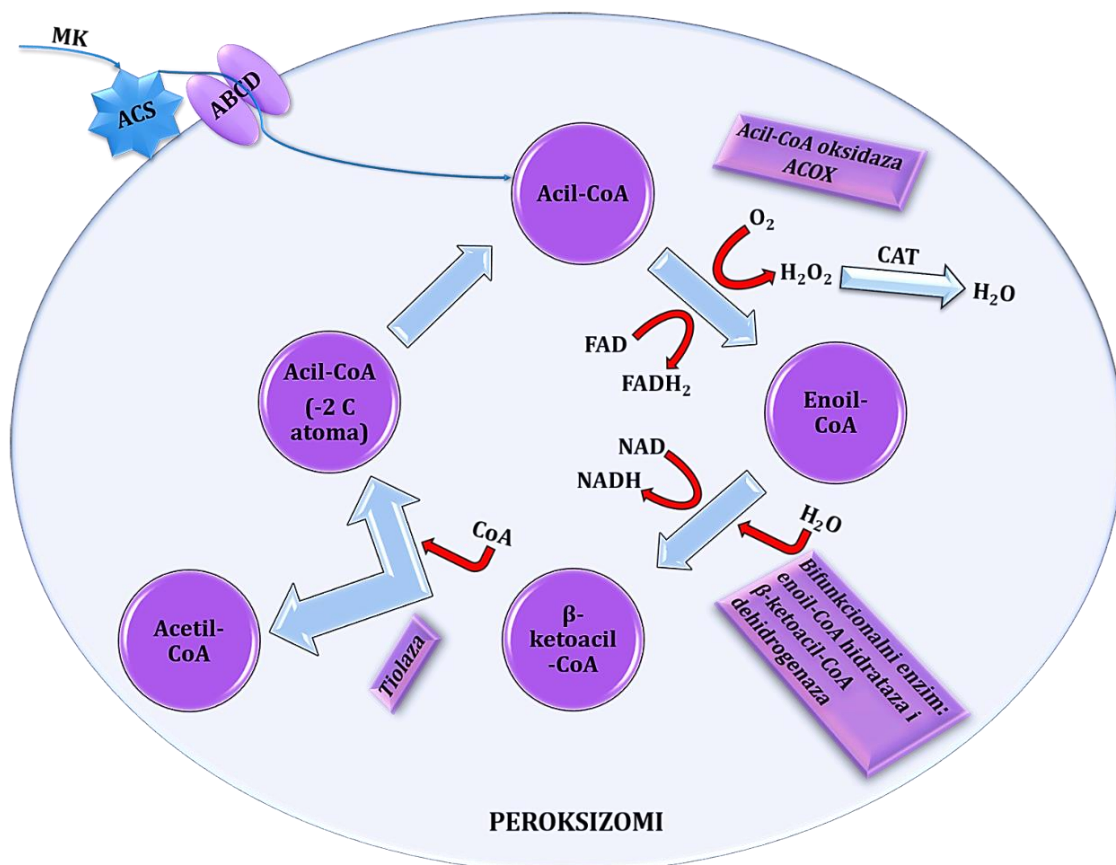
1.3.1 Oksidacija masnih kiselina u peroksizomima

Za razliku od svih drugih funkcija, β -oksidacija masnih kiselina je univerzalna uloga peroksizoma u mnogim organizmima, ali ipak ne u svim (Wanders i Waterham, 2006). Kod kvasaca i biljaka, peroksizomi su jedino mesto β -oksidacije masnih kiselina, dok se kod sisara ovaj proces odvija u peroksizomima i mitohondrijama. Time se ističe značaj peroksizoma u katabolizmu lipida, jer se u njima prevashodno oksiduju masne kiseline veoma dugog lanca (sadrže više od 22 C atoma), masne kiseline razgranatog lanca (2-metil- i 3-metil-), dikarboksilne masne kiseline, polinezasićene masne kiseline dugog i veoma dugog lanca, ali i eikozanoidi poput leukotriena, tromboksana, prostaglandina, zatim, karboksilni derivati ksenobiotika, vitamini rastvorljivi u mastima, intermedijeri žučnih kiselina, pristanske kiseline (Mannaerts i sar., 2000; Poirier i sar., 2006). Međutim, oksidacija masnih kiselina u peroksizomima ne odvija se u potpunosti (Nelson i Cox, 2008). Zato kažemo da je β -oksidacija u peroksizomima pomoćni mehanizam kojim se masne kiseline skraćuju da bi mogle da se potpuno oksiduju u mitohondrijama. Nedostatak ili nefunkcionost peroksizoma, prevashodno u hepatocitima kod čoveka, dovodi do nemogućnosti iskorišćavanja masnih kiselina dugog i/ili granatog lanca i time poremećaja u lipidnom statusu krvi. To je i pokazala studija na pacijentima sa PBD koji su imali znatno povišene nivoe veoma dugih i granatih masnih kiselina u serumu (Poulos i sar., 1986; Stradomska i sar., 2020).

Masne kiseline za oksidaciju u peroksizomima mogu da se unesu u ćeliju ili da nastanu unutar ćelije razgradnjom depoa triglicerida. Proces β -oksidacije masnih kiselina započinje njihovom aktivacijom (Shema 2), za koju je odgovoran enzim acil-CoA sintetaza smešten na spoljašnjoj strani peroksizomalne membrane (Lageweg i sar., 1991; Watkins, 1997). Potom se aktivirane masne kiseline (acil-CoA) transportuju kroz membranu peroksizoma u matriks gde ulaze u proces β -oksidacije koji se, kao i kod mitohondrija, sastoji iz četiri koraka, dehidrogenacije, hidratacije, ponovne dehidrogenacije i tiolitičkog isecanja (Shema 2).

Prvi i limitirajući enzim u procesu β -oksidacije u peroksizomima je acil-CoA oksidaza – ACOX (*eng.* Acyl-CoA oxidase) (Osumi i sar., 1980). Svi poznati peroksizomalni ACOX enzimi su dimeri koji sadrže FAD kao prostetičnu grupu, a pripadaju istoj superfamiliji enzima kao i tetramer acil-CoA dehidrogenaza (*eng.* ACADM, acyl-CoA dehydrogenase medium chain) u mitohondrijama (Poirier i sar., 2006). Tri izolovane izoforme ovog enzima, lokalizovane u matriksu peroksizoma, veoma su specifične prema supstratu, a razlikuju se kod pacova i kod ljudi (Osumi i sar., 1980; Van Veldhoven i sar., 1994; Watkins i sar., 1996; Poirier i sar., 2006; Zhang i sar., 2016). Kod pacova ACOX1 (palmitoil-CoA oksidaza) i ACOX3 (pristanoil-CoA oksidaza), prisutne su u ekstrahepatičnim peroksizomima, dok je ACOX2 (holestanoil-CoA oksidaza) prisutna u peroksizomima jetre i specifično interaguje samo sa intermedijerima žučnih kiselina (Wanders i Waterham, 2006). Kod pacova, ACOX1 je aktivna sa CoA estrima: monokarboksilnih i dikarboksilnih masnih kiselina ravnog lanca, prostaglandina, masnih kiselina veoma dugog lanca i ksenobiotika, dok je ACOX3 aktivna sa masnim kiselinama 2-metil-granatih lanaca, ali takođe i sa masnim kiselinama dugog i veoma dugog lanca (Wanders i Waterham, 2006). Pokazano je da je u jetri pacova samo ACOX1 inducibilna od strane peroksizomalnih proliferatora (Poirier i sar., 2006; Wanders i Waterham, 2006). Zanimljivo je da peroksizomi kod ljudi sadrže samo dve izoforme ove oksidaze, ACOX1 sa sličnim spektrom supstrata kao kod pacova i ACOX2 koja oksiduje 2-metil-granate masne kiseline, ali i masne kiseline veoma dugog lanca i estre prekursora žučnih kiselina (Wanders i Waterham, 2006). Gen koji kodira enzim homolog pacovskoj ACOX3 je takođe identifikovan u humanom genomu, ali se smatra nefunkcionim jer njegova proteinska ekspresija do sada nije detektovana u humanim tkivima (Van Veldhoven i Mannaerts, 1999).

U prvom koraku β -oksidacije ACOX katalizuje stvaranje dvostruke veze na β ugljenikovom atomu masnih kiseina što dovodi do nastanka enoil-CoA i prenosa elektrona preko FAD na molekularni kiseonik, pa kao produkt reakcije nastaje i H_2O_2 (Shema 2) koji odmah biva uklonjen od strane katalaze (Osumi i sar., 1980; Bhaumik i sar., 2005; Nelson i Cox, 2008). Drugi i treći korak β -oksidacije su objedinjeni, a katalizuje ih enzim specifičan za peroksizome, koji se sastoji se od jednog polipeptidnog lanca koji poseduje aktivnost i enoil-CoA hidrataze i β -hidroksiacil-CoA dehidrogenaze, zbog čega se naziva bifunkcionalnim enzimom (Mannaerts i sar., 2000). Kao produkt reakcije nastaje β -ketoacil-CoA uz redukciju NAD^+ u NADH. U četvrtom koraku β -ketoacil-CoA podleže tiolitičkom isecanju od strane tiolaze na acetil-CoA (2 C atoma) i acil-CoA (kraći za 2 C atoma). Acil-CoA ponovo prolazi ciklus β -oksidacije dok se ne skрати dovoljno da može da se transportuje do mitohondrija. Neki autori smatraju da je oktanoil-CoA granica na kojoj se ciklus zaustavlja, jer je enzim karnitin oktanoil transferaza pronađen u peroksizomima (Bieber i sar., 1981) i pretpostavlja se da on omogućava transport do mitohondrija (Reddy i Hashimoto, 2001; Poirier i sar., 2006). Drugi su pak pokazali da u peroksizomima jetre pacova skraćivanje masnih kiselina u procesu β -oksidacije ide čak do 6 C atoma (heksanoil-CoA) (Nelson i Cox, 2008). Međutim, tačan mehanizam transporta skraćenih masnih kiselina iz peroksizoma u mitohondrije još uvek nije poznat.



Shema 2. β -oksidacija masnih kiselina u peroksizomima. Masne kiseline (MK), aktivirane od strane acil-CoA sintetaze (ACS), se transportuju uz pomoć ABCD transportera u matriks peroksizoma, gde podležu procesu oksidacije. Prvi korak katalizuje enzim acil-CoA oksidaza (ACOX), pri čemu nastaje enoil-CoA, jedan molekul $FADH_2$ (energija koja se oslobađa u vidu toplote) i molekul H_2O_2 koji se odmah redukuje od strane katalaze. U objedinjenom drugom i trećem koraku bifunkcioni enzim prevodi enoil-CoA u β -ketoacil-CoA pri čemu nastaje i jedan molekul NADH koji biva eksportovan u citoplazmu. U poslednjem, četvrtom koraku, tiolaza vrši isecanje β -ketoacil-CoA na acetil-CoA (koji se koristi za sintezu) i acil-CoA (kraći za 2 C atoma, koji ponovo ulazi u ciklus oksidacije). Shematizovano prema Nelson i Cox, 2008.

U ćelijama sisara, biljaka i kvasaca, peroksizomi vrše i α -oksidaciju masnih kiselina veoma dugih i granatih lanaca koje imaju metil grupu na trećem, α , ugljenikovom atomu (Miura, 2013). Ovakve masne kiseline se prvo aktiviraju i prevode u acil-CoA estar acil-CoA sintetazom pridruženom spoljašnjoj ili matriksnoj strani membrane peroksizoma kao periferni membranski protein (Lageweg i sar., 1991; Watkins i sar., 1996, 1997). Primer α -masnih kiselina je fitinska kiselina koja nastaje od fitola, granatog alkohola masnih kiselina, prisutnog u esterifikovanoj formi u hlorofilu. Zbog prisustva 3-metil grupe na α ugljenikovom atomu masnokiselinskog lanca, ova kiselina ne može da se oksiduje procesom β -oksidacije. Zato podleže procesu α -oksidacije, odnosno oksidativnoj dekarboksilaciji, pri čemu nastaju CO₂ i pristanska kiselina, koja sada može da prođe kroz proces skraćivanja β -oksidacijom. Ovaj način oksidacije masnih kiselina odvija se samo u peroksizomima, a o značaju α -oksidacije masnih kiselina u ćeliji govori i njihovo nagomilavanje u serumu obolelih od Refsumove bolesti, koja dovodi do disfunkcije perifernih nerava, paralize mišića i poremećaja vidnog polja kod obolelih (Mannaerts i sar., 2000).

Supstrati α - i β -oksidacije dospevaju u matriks peroksizoma posredstvom peroksizomalnih membranskih proteina, koji pripadaju ABC superfamiliji klasi D (*eng.* ABCD, adenosine triphosphate-binding cassette class D) transportnih proteina. Ovi proteini predstavljaju molekulske pumpe, koje funkcionišu tako što energiju dobijenu hidrolizom ATP koriste za transport supstrata kroz biološke membrane (Guimarães i sar., 2004). Kod sisara četiri ovakva polustransportera lokalizovana su u membrani peroksizoma, i to: protein adrenoleukodistrofije (ALDP ili ABCD1), protein sličan ALDP (ALDPR ili ABCD2), peroksizomalni membranski protein molekulske mase 70 kDa (PMP70 ili ABCD3) i protein sličan PMP70 (PMP70R ili ABCD4) (Van Roermund i sar., 2014). Pokazano je da ovi transporteri postaju funkcioni nakon dimerizacije i uglavnom grade homodimere, mada mogu graditi i heterodimere (Dean i sar., 2001). PMP70 predstavlja glavnu komponentu membrane peroksizoma u kojoj je prisutan uglavnom u formi homodimera ili retko u formi oligomera (Imanaka i sar., 2000). Njegova uloga je transport hidrofilnih nezasićenih masnih kiselina dugog lanca, granatih masnih kiselina i dikarboksilnih masnih kiselina dugog lanca iz citoplazme u matriks peroksizoma za oksidaciju (Van Roermund i sar., 2014). PMP70 je jedan od prvih peroksizomalnih membranskih proteina lokalizovanih u peroksizomalnom retikulumu, čime je potvrđeno učešće ER u proliferaciji peroksizoma (Geuze i sar., 2003). Njegova ekspresija je indukovana kod glodara nakon primene hipolipidemijskih lekova, paralelno sa proliferacijom peroksizoma i indukcijom peroksizomalnih enzima β -oksidacije masnih kiselina (Imanaka i sar., 2000). U jetri pacova i H-4-II-E ćelijama, sadržaj PMP70 u membrani peroksizoma je skoro deset puta veći u odnosu na ostale transportere ABCD klase (Imanaka i sar. 2000), što ukazuje na značaj ovog transportera u metabolizmu lipida kako u samim peroksizomima, tako i u ćeliji uopšte.

1.4 Tiroidni hormoni i hipotiroidizam

Folikularne ćelije štitaste žlezde, tirociti, vrše biosintezu, deponovanje i sekreciju tiroidnih hormona. Tiroidni hormoni se sintetišu u ER tirocita u formi prekursora – tiroglobulina koji prolazi obradu u kompleksu Goldži i egzocitozom se sekretuje i deponuje u lumenu tiroidnog folikula kao koloid. Na zahtev organizma, a posredstvom tirostimulišućeg hormona (TSH), koloid se endocitozom unosi u tirocite i tiroglobulini se obrađuju u lizozomskom sistemu do tiroksina (T₄ ili L-3,5,3,5-tetraiodotironin) i trijodtironina (T₃ ili L-3,5,3 – trijodtironin) (Yen, 2001). T₄ i T₃ se putem monokarboksilatnih transportera transportuju u cirkulaciju gde se vezuju za proteinske nosače i prenose do svih tkiva (Friesema i sar., 2010). T₄ je glavni produkt tirocita, tako da je njegova ukupna koncentracija u serumu i do 40 puta veća u odnosu na T₃ (Yen, 2001), a njegov polужivot u serumu pacova je između 12-

24 h, dok je period poluživota T3 samo 6 h (Santini i sar., 2014). U humanom serumu, period poluživota T4 je do 7 dana, a T3 1 dan (Bianco i Larsen, 2005).

Na nivou tkiva, posredstvom aktivnosti enzima dejodinaze, DIO (*eng.* deiodinase), T4 se dejodinacijom prevodi u biološki potentniji T3 (Bianco i Larsen, 2005). Dejodinaze su prisutne kod svih kičmenjaka u nekoliko tipova i predstavljaju ključnu komponentu u održavanju homeostaze tiroidnih hormona. Tri dejodinaze DIO1, DIO2 i DIO3, pokazuju visoku tkivnu i supstratnu specifičnost, a njihova subćelijska lokalizacija i period poluživota su takođe različiti. DIO1 je integralni protein ćelijske membrane i membrane ER, visoko je eksprimiran u jetri, bubrezima i štitastoj žlezdi, a period njegovog poluživota iznosi 10-12 h. Ovaj enzim vrši dejodinaciju i spoljašnjeg i unutrašnjeg prstena T4, T3 i reverznog T3 (rT3). DIO2 je integralni protein membrane ER, visoko je eksprimiran u hipofizi, mozgu i mrkom masnom tkivu, a period poluživota ovog proteina je oko 40 minuta. Uloga DIO2 je dejodinacija samo spoljašnjeg prstena T4, pri čemu nastaje aktivna forma hormona – T3 (Arrojo i Bianco, 2011). DIO3 je kao i DIO1, integralni protein ćelijske membrane, ali je njegov katalitički centar vanćelijski orijentisan. Eksprimiran je u mozgu, masnom tkivu, placenti i koži. Uloga DIO3 je dejodinacija unutrašnjeg prstena T3 i T4, čime se tiroidni hormoni ireverzibilno inaktiviraju, pa se smatra da je osnovna uloga DIO3 zapravo sprečavanje ulaska tiroidnih hormona u ćelije (Bianco i Larsen, 2005).

Važno je istaći da se u tkivima pored T4 i T3 susreću još dve forme tiroidnih hormona, već pomenuti rT3 i diiodotironin (T2). Konverzija T4 u rT3, kao biološki neaktivnu formu predstavlja vid kontrole liganada dostupnih za receptore u ciljanim ćelijama i ključni mehanizam u regulaciji pravovremenog odgovora ćelija na tiroidne hormone (Williams i Bassett, 2011). Poslednjih godina sve je više podataka da T2 takođe poseduje biološku aktivnost. Naime, pokazano je da T2 stimuliše porast ukupne metaboličke stope kod pacova i na taj način sprečava razvoj gojaznosti kod životinja koje su konzumirale hranu sa visokim sadržajem masti (Lombardi i sar., 2015). Studije na jetri i skeletnim mišićima su pokazale da T2 na nivou mitohondrija indukuje brzi porast stope respiracije, porast stope oksidacije masnih kiselina i aktivaciju termogenog procesa. Dodatno je pokazano da tretman sa T2 kod hipotiroidnih pacova aktivira termogenezu u mrkom masnom tkivu (Lombardi i sar., 2015).

1.4.1 Receptori za tiroidne hormone

Tiroidni hormoni modulišu ekspresiju gena u gotovo svim tkivima kičmenjaka. Njihove aktivnosti su fino podešene, usaglašene i vođene nizom konzerviranih puteva, koji orkestriraju početak ključnih fizioloških i biohemijskih procesa odgovornih za normalan razvoj, rast i energetske metabolizam (Mendoza i Hollenberg, 2017). U toku fetalnog i neonatalnog perioda života aktivnost tiroidnih hormona je usmerena prvenstveno na regulaciju proliferacije i diferencijacije ćelija, što omogućava formiranje tkiva i organa (Williams i Bassett, 2011). Međutim, u toku života adulta, aktivnost tiroidnih hormona usmerena je na održavanje energetske homeostaze kroz regulaciju metabolizma lipida, ugljenih hidrata, proteina, elektrolita i minerala (Obregon, 2008; Yao i sar., 2014). Iz tog razloga najveći efekat ostvaruju pri regulaciji funkcije metabolički izrazito aktivnih tkiva poput jetre, pankreasa, mišića, belog i mrkog masnog tkiva (Shema 3) (Nayer, 1987; Obregon, 2008).

Svoju funkciju u ciljnim tkivima tiroidni hormoni ostvaruju putem tiroidnih receptora (TR). Tiroidni receptori su transkripcioni faktori koji pripadaju steroidno/tiroidnoj superfamiliji nukleusnih receptora (Lazar, 1993). Kod sisara, tiroidni receptori su kodirani od strane dva gena koji su kod ljudi lokalizovani na hromozomima 17 i 3 (Lazar, 1993; Brent, 1994). Alternativno splajsovane iRNK transliraju se u različite izoforme TR (O'Shea i Williams, 2002). Dominantne izoforme eksprimirane u tkivima sisara su TR α 1, TR α 2, TR α 3, TR β 1, TR β 2, TR β 3, međutim samo tri od njih imaju sposobnost da vežu T3 – TR α 1, TR β 1 i TR β 2

(Ortiga-Carvalho i sar., 2014). Interesantno je da izoforme TR koje nemaju sposobnost da vezuju T3 imaju funkciju antagonista T3-vezujućih TR, što predstavlja dodatni mehanizam regulacije aktivnosti tiroidnih hormona (O'Shea i Williams, 2002).

Izoforme TR su tkivno specifične, razvojno regulisane i mogu imati različite uloge (Vaitkus i sar., 2015). Sve T3-vezujuće izoforme TR u svojoj strukturi sadrže više funkcijskih domena koji uključuju domen za vezivanje za DNK (*eng.* DBD, DNA-binding domain) na C-kraju i domen za vezivanje liganda (*eng.* LBD, ligand-binding domain) na N-kraju. DBD je visoko konzerviran i interaguje sa sekvencom za odgovor na tiroidne hormone – TRE sekvencom (*eng.* thyroid hormone-response element) (Mendoza i Hollenberg, 2017). Tiroidni receptori mogu da postoje i ostvaruju funkciju kao monomeri, homodimeri ili heterodimeri. Heterodimere mogu da grade sa retinoidnim X receptorom (*eng.* RXR, retinoid X receptor), receptorom retinoične kiseline (*eng.* RAR, retinoic acid receptor), kao i sa receptorima iz PPAR familije (Xiao-kun Zhang i sar., 1992; Vaitkus i sar., 2015). Iako se klasifikuju kao nukleusni receptori, izuzev nukleusno lokalizovanih, otkriveni su i tiroidni receptori u ćelijskoj membrani, citoplazmi, endoplazminom retikulumu i mitohondrijama (Maxfield i sar., 1981; Cheng i sar., 1987; Wrutniak i sar., 1995; Davis i Davis, 1996).

1.4.2 Molekulski mehanizmi delovanja tiroidnih hormona

Dejstvo koje tiroidni hormoni ostvaruju na nivou ćelija može biti neposrednim ili posrednim putem. Neposredno delujući, tiroidni hormoni utiču na signalne puteve u nivou ćelijske membrane povećavajući njenu permeabilnost ili na metaboličke puteve u ćeliji povećavajući unos kiseonika. Posredno delovanje tiroidni hormoni mogu ostvarivati genomskim ili negenomskim putem (Vaitkus i sar., 2015).

Genomski put tiroidni hormoni ostvaruju u nukleusu gde u zavisnosti od toga da li mogu da vežu T3 ili ne, funkcionišu kao aktivatori ili represori transkripcije ciljnih gena (Vella i Hollenberg, 2017). Interesantno je da i sami TR, bez vezanog hormona, mogu da funkcionišu kao transkripcioni faktori (Cvoro i sar., 2016).

Negenomski put delovanja tiroidnih hormona je najčešće povezan sa koordinacijom pravilnog rasta i metabolizma. Ostvaruje se najčešće u citoplazmi i ćelijskoj membrani, gde regulišu rad jonskih kanala i promenu koncentracije jona natrijuma, kalijuma i kalcijuma, nivo cAMP, aktivnost protein kinaza i remodeliranje citoskeleta (Davis i Davis, 1996). Takođe je pokazano i da negenomskim putem tiroidni hormoni moduliraju oksidativnu fosforilaciju u mitohondrijama regulišući njihovu biogenezu kao i transkripciju mitohondrijskih gena (Almeida i sar., 1995; Casas i sar., 1999; Enríquez i sar., 1999; Casas i sar., 2009; Carazo i sar., 2012; Pessemesse i sar., 2014).

1.4.3 Hipotiroidizam

Hipotiroidizam je poremećaj koji nastaje kao rezultat nedostatka tiroidnih hormona ili poremećaja u njihovoj aktivnosti (Hallengren, 1998). U literaturi je klasifikovan prema vremenu pojavljivanja – kongenitalni i stečeni, nivou na kome se dešava – primarni (poremećaj u funkciji štitaste žlezde) i sekundarni/centralni (poremećaj na nivou hipotalamusa i/ili hipofize), težini kliničke slike – klinički i subklinički (blagi) (Trbojević i sar., 2008).

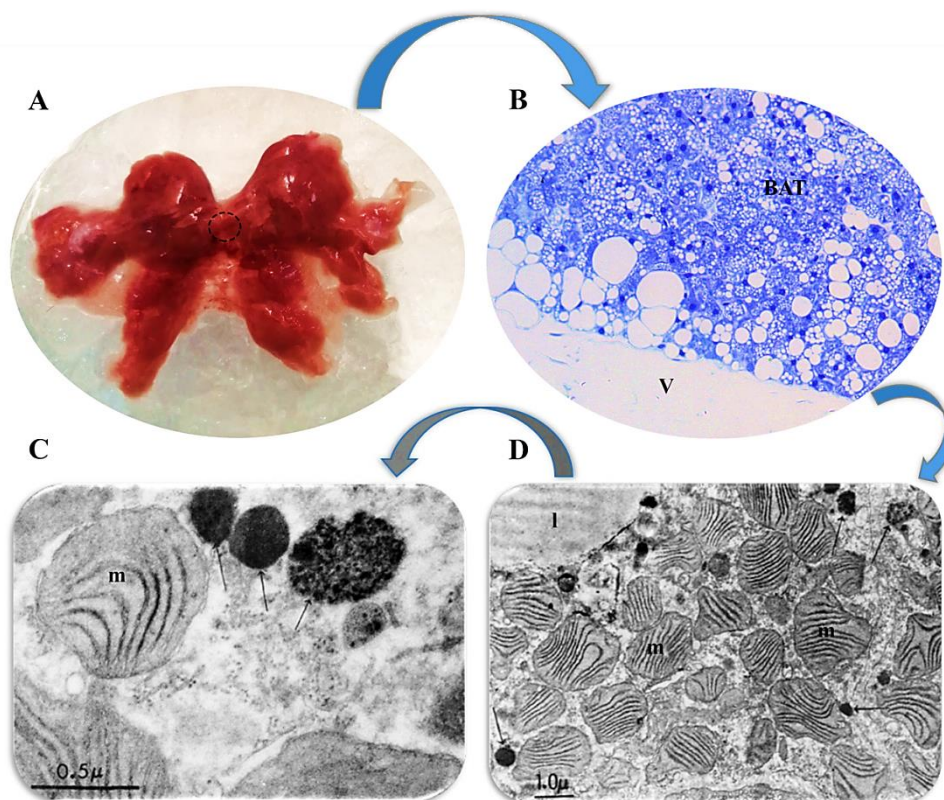
U cilju istraživanja hipotiroidizam se eksperimentalno može indukovati fizičkom (hirurško odstranjivanje štitaste žlezde) i hemijskom (tretman antitiroidnim lekovima poput propiltiouracila i metimazola) tiroidektomijom. Za indukciju hipotiroidizma u trudnoći, kod majke i potomaka, najčešće se koristi propiltiouracil, dok se za indukciju hipotiroidizma kod

adultnih životinja najče koristi metimazol. Metimazol (1-metil-2-merkaptimidazol), je antitiroidni lek koji se široko koristi u tretmanu hipertiroidizma kod ljudi. Metimazol sprečava biosintezu tiroidnih hormona jer deluje kao lažni supstrat za peroksidazu i ne dozvoljava dalju jodinaciju tirozinskih ostataka u tiroglobulinu. Apsorbuje se preko sluzokože tankog creva, u vrlo maloj meri se vezuje za proteine plazme, najvišu koncentraciju u plazmi dostiže nakon 1-2 h, a koncentriše se u štitastoj žlezdi gde i ostvaruje svoje dejstvo. Period poluživota metimazola je 4-6 sati, nakon čega se metaboliše u jetri, a njegovi metaboliti kao i deo netransformisanog leka izlučuju se putem urina (Farwell i Braverman, 1996). Takođe, metimazol ne blokira rad dejodinaza u perifernim tkivima za razliku od propiltiouracila.

Hipotiroidizam je odavno povezan sa brojnim poremećajima metabolizma, a pre svega sa poremećajima metabolizma lipida (Mason i sar., 1930). Literaturno je pokazano da indukuje porast ukupnog holesterola, LDL holesterola, apolipoproteina B, i lipoproteina u krvnom serumu pacijenata (Pearce, 2012). Poremećaj katabolizma proteina i ukupnog metabolizma azota su takođe zapaženi kod pacijenata sa hipotiroidizmom (Marti i sar., 1988; Sidhu i sar., 2016). Pored toga, hipotiroidizam utiče na metabolizam ugljenih hidrata u jetri, kao i promet glukoze u perifernim tkivima, skeletnim mišićima i masnom tkivu kod različitih animalnih modela (Cettour-Rose i sar., 2005; Yao i sar., 2014; Martinez i Ortiz, 2017). Hipokalcemija u hipotiroidizmu je takođe opisana u brojnim studijama kod ljudi i kod životinja (Baltaci i sar., 2013; Sridevi i sar., 2016). Usled brojnih poremećaja do kojih dovodi, hipotiroidizam je prepoznat kao jedan od faktora rizika za razvoj nealkoholne masne bolesti jetre (*eng.* NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease), udruženo sa hiperlipidemijom, gojaznošću i insulinskom rezistencijom (Brenta, 2011; Chung i sar., 2012; Sinha i sar., 2014; Martinez i Ortiz, 2017).

1.5 Mrko masno tkivo

Mrko masno tkivo, BAT (*eng.*, brown adipose tissue) je termogeni organ prisutan kod hibernatora, glodara i novorođenih sisara koji energiju uskladištenu u obliku lipida koristi za produkciju toplote – termogenezu bez drhtanja (Cannon i Nedergaard, 2004). Spada u specijalizovana vezivna tkiva, a osnovna uloga mu je održanje telesne temperature i telesne mase. Odlikuju ga visoka stopa respiracije i izuzetno visoka metabolička, antioksidativna i endokrina aktivnost. BAT ima ulogu u regulaciji energetske homeostaze organizma (Cannon i Nedergaard, 2004; Petrović i sar., 2006; 2010). Kod pacova, mrko masno tkivo je prisutno na više lokacija, najveći depo je lokalizovan na leđima između skapula (interskapularno BAT). Izuzetno je dobro prokrvljeno i inervisano je vlaknima simpatičkog nervnog sistema (Suter, 1969a; Cannon i Nedergaard, 2004). Osnovne funkcijske jedinice mrkog masnog tkiva su mrki adipociti – ćelije koje se odlikuju velikim brojem mitohondrija i lipidnih tela različitih veličina, cisternama glatkog endoplazminog retikuluma, polizomima, kao i ponekim lizozomom i peroksizomom (Slika 2). Svoju ulogu u produkciji toplote mrko masno tkivo ostvaruje zahvaljujući prisustvu dekuplujućeg proteina 1 (*eng.* UCP1, uncoupling protein 1) koji je lokalizovan u unutrašnjoj membrani mitohondrija. UCP1 dekupluje oksidativnu fosforilaciju omogućavajući alternativni put za vraćanje protona iz međumembranskog prostora mitohondrija u matriks i na taj način se energija elektrohemijskog potencijala oslobađa kao toplota (Cannon i Nedergaard, 2004).



Slika 2. Anatomija (A), morfologija (B) i ultrastruktura (C, D) interskapularnog mrkog masnog tkiva pacova (BAT). Anatomski, BAT podseća na leptira raširenih krila spojenih u predelu istmusa (krug) (A). Na polutankom preseku tkiva obojenom toluidinom uočavaju se brojni mrki adipociti tamnih nukleusa. Na periferiji lobusa mrkog masnog tkiva uočavaju se ćelije sa krupnim lipidnim telima slične belim adipocitima, kao i vezivna septa (V) izgrađena od retikularnih i kolagenih vlakana (B). Ultrastrukturno, u mrkom adipocitu se uočavaju brojne mitohondrije različitog oblika (m), lipidna tela (l) kao i peroksizomi obeleženi metodom DAB citohemije (strelice) (C, D). Originalna fotografija BAT nastala odmah po izolaciji tkiva (A); originalno uvećičanje 20x (B); elektron mikrofografije preuzete i modifikovane iz prve ultrastrukturne studije peroksizoma u mrkim adipocitima nakon izlaganja hladnoći (C, D) (Ahlabo i Barnard, 1971).

1.5.1 Mehanizam termogene aktivacije mrkog masnog tkiva i tiroidni hormoni

Termogeneza u mrkom masnom tkivu može se indukovati hladnoćom (fakultativna termogeneza) i povećanim unosom hrane (dijetom indukovana termogeneza). Prilikom izlaganja hladnoći aktivacija mrkog masnog tkiva od strane simpatičkog nervnog sistema, zasniva se na oslobađanju noradrenalina sa nervnih završetaka, koji se vezuje za $\beta 3$ adrenergičke receptore na membrani mrkih adipocita (Ricquier i sar., 1986). To dalje dovodi do aktivacije adenilat ciklaze i povišenog nivoa cikličnog adenozin monofosfata (cAMP) u ćelijama. Povišen nivo cAMP aktiviranjem protein kinaze A (PKA) dalje aktivira hormon senzitivnu lipazu (HSL), što posledično dovodi do lipolize lipidnih tela i oslobađanja masnih kiselina. Slobodne masne kiseline u mrkim adipocitima služe kao supstrat za oksidaciju a prepostavlja se da imaju ulogu i u aktivaciji UCP1 (Cannon i Nedergaard, 2004; Fedorenko i sar., 2012). Samu ekspresiju proteina UCP1, pored noradrenalina, stimulišu cAMP, tiroidni hormoni i retinoidi (Silva i Rabelo, 1997; Cannon i Nedergaard, 2004). Termogeni kapacitet mrkog masnog tkiva je determinisan ukupnim sadržajem UCP1. Eksperimentalno je pokazano da se transkripcija *Ucp1* gena odvija ubrzo nakon stimulacije noradrenalinom ili izlaganja hladnoći (Ricquier i sar., 1986). Prvobitno je pokazano da T3 pojačava postojeću adrenergičku stimulaciju transkripcije *Ucp1* (Bianco i sar., 1988; David i sar., 1992), ali otkriće TRE u promotorskom regionu ovog gena (Rabelo, 1995) je ukazalo na neophodnost T3 u procesu termogeneze u mrkom masnom tkivu. Pored uloge u indukciji UCP1 ekspresije na

transkripcionom nivou, T3 ima važnu ulogu i na posttranslacionom nivou gde učestvuje u stabilizaciji iRNK za UCP1 (Hernández i Obregón 2000).

Mrki adipociti sadrže oko 8000 tiroidnih receptora po ćeliji, što je izrazito visoka koncentracija, ekvivalentna onoj u hepatocitima (Bianco i Silva, 1987). Obe izoforme tiroidnih receptora TR α i TR β su eksprimirane u mrkim adipocitima i posreduju u različitim signalnim putevima. TR α posreduje u sinergizmu signalnih puteva tiroidnih hormona i simpatičkog nervnog sistema (Ribeiro i sar., 2001; Marrif i sar., 2005), dok TR β posreduje u T3 regulaciji ekspresije gena za UCP1 (Ribeiro i sar., 2010). Ono što je važno da se istakne je da su obe izoforme receptora neophodne za odvijanje termogeneze (Bianco i McAninch, 2013).

Još jedan od pokazanih posrednika adrenergičke stimulacije mrkog masnog tkiva je DIO2. Kod *Dio2* nokaut miševa pokazano je da je nivo serumskog T3 normalan, ali da je termogena u mrkom masnom tkivu ugrožena (De Jesus i sar., 2001). Sveže izolovani mrki adipociti iz *Dio2* nokaut miševa pokazuju smanjenu lipogenezu, generišu manje cAMP i nemaju sposobnost da povećaju stopu metabolizma u odgovoru na adrenergičku stimulaciju (Christoffolete i sar., 2004). Zanimljivo je da *Dio2* nokaut miševi mogu da prežive na hladnoći usled povećanja simpatičke aktivnosti u mrkom masnom tkivu, ali razvijaju drhtanje kao dodatni mehanizam za održavanje telesne temperature i obrazac ponašanja koji nije primećen kod kontrolnih miševa izloženih hladnoći (Christoffolete i sar., 2004). Još jedna karakteristika *Dio2* nokaut miševa jeste da su podložniji razvoju gojaznosti usled ishrane obogaćene mastima (Hall i sar., 2010). Takođe, inhibicija DIO2 jopanoičnom kiselinom *in vivo* i *in vitro* smanjuje adrenergičku stimulaciju transkripcije *Ucp1* i lipogenezu (Bianco i McAninch, 2013). Koliko je uloga DIO2 važna u termogenoj funkciji mrkog masnog tkiva govori činjenica da je čak i u hipotiroidnim uslovima koncentracija T3 u mrkim adipocitima relativno nezavisna od koncentracije cirkulišućih tiroidnih hormona (Silva i Larsen, 1983). Hipotiroidizam, slično hladnoći, dovodi do pojačane adrenergičke stimulacije mrkog masnog tkiva što rezultira porastom ekspresije i aktivnosti DIO2 i povišenom lokalnom produkcijom T3 (Bianco i McAninch, 2013; Santini i sar., 2014; Lombardi i sar., 2015).

1.5.2 Hipotiroidizam, mrko masno tkivo i sistem antioksidativne odbrane

Otkriće postojanja aktivnog mrkog masnog tkiva kod odraslih ljudi (Nedergaard i sar., 2007) postavlja pitanje njegove uloge u regulaciji ukupne energetske homeostaze i ističe njegov potencijal u prevenciji i kontroli metaboličkih oboljenja poput gojaznosti, insulinske rezistencije, dijabetesa tipa 2 (Ghorbani i Himms-Hagen, 1997; Rothwell i Stock, 1997; Carey i Kingwell, 2013; Saito, 2014). Svi važni aspekti funkcije mrkog masnog tkiva su regulisani od strane tiroidnih hormona, uključujući regulaciju genske ekspresije, dostupnost nutrijenata, lipogenezu, lipolizu, termogenezu, biogenezu mitohondrija i peroksizoma i antioksidativnu odbranu (Mory i sar., 1981; Rubio, Raasmaja i Silva 1995; Silva 1995; Bianco i McAninch 2013). Termogena aktivacija mrkog masnog tkiva i povećanje produkcije toplote u uslovima hipertiroidizma su dobro poznati (Silva, 1995; Yau i sar., 2019), dok se o njima u uslovima hipotiroidizma malo zna. Lombardi i sar., (2015) su pokazali da hipotiroidizam suprimira maksimalni oksidativni kapacitet mrkog masnog tkiva i termogenezu kod pacova, što je posledica funkcijskih i strukturnih promena mrkih adipocita. Takođe je dobro poznato da hipotiroidni pacovi aklimatizovani na hladnoću pokazuju neotpornost na hladnoću u različitom stepenu (Hsieh i Carlson, 1956; Abelenda i Puerta, 1990; Zaninovich i sar., 2002; Laurberg i sar., 2005). Međutim, brojne studije pokazuju da kod pacova aklimatizovanih na sobnu temperaturu, hipotiroidizam u mrkom masnom tkivu delimično podražava efekte hroničnog izlaganja hladnoći (termogeneza indukovana hladnoćom) (Hsieh i Carlson, 1956; Mory i sar., 1981; Abelenda i Puerta, 1990; Dicker i sar., 1992). Termogena aktivacija mrkog masnog tkiva i porast metaboličke aktivnosti tkiva praćena je redoks remodeliranjem (Petrović i sar., 2005;

2006; 2010; Lettieri-Barbato 2019). Naime, aktivacija mrkog masnog tkiva nesumnjivo dovodi do produkcije ROS i RNS za koje se zna da učestvuju u brojnim redoks-senzitivnim signalnim putevima uključenim u povećanje prokrvljenosti tkiva, remodeliranje kapilarne mreže, proliferaciju i diferencijaciju mrkih adipocita, apoptozu, biogenezu mitohondrija i peroksizoma (Suter, 1969b; Dicker i sar., 1992; Korac i sar., 2008; Petrović i sar., 2008; Petrović i sar., 2010; Lapa i sar., 2015).

Kao odgovor na povećane metaboličke zahteve i signalizaciju posredovanu reaktivnim vrstama, dobro koordinisan sistem antioksidativne odbrane, AD (*eng.* antioxidative defence) održava redoks homeostazu i čuva strukturni i funkcijski integritet tkiva. Međutim, gotovo da nema podataka o dinamici osnovnih promena redoks regulacije u mrkom masnom tkivu nakon metaboličkog i strukturnog remodeliranja stimulisanog hipotiroidizmom. Sistem AD u mrkom masnom tkivu čine brojni enzimi i neenzimske komponente, koji uklanjaju ROS i RNS, nastale kao nusprodukti intenzivnog metabolizma u termogeno aktiviranom mrkom masnom tkivu. Najznačajniji od njih su: CuZn superoksid dismutaza (CuZnSOD) i Mn superoksid dismutaza (MnSOD), koji uklanjaju superoksid anjon radikal (Benedito Pereira i sar., 1995; Fukai i Ushio-Fukai, 2011); katalaza (CAT), čija je glavna uloga uklanjanje H₂O₂ (Vetrano i sar., 2005; Glorieux i Calderon, 2017; Gebicka i Krych-Madej, 2019); glutation (GSH), ubikvitarni, neenzimski antioksidant koji ima ulogu u uklanjanju H₂O₂ i lipidnih peroksida (Andrisic i sar., 2018); γ-glutamil cistein ligaza (GCL), prvi i limitirajući enzim u sintezi GSH (Lu, 2014); glutation peroksidaza (GSH-Px), koji redukuje H₂O₂ i organske peroksidge i glutation reduktaza (GR) koja redukuje oksidovani GSH (Sies, 1999); tioredoksin (Trx) i tioredoksin reduktaza (TR), koji imaju ulogu u redukciji disulfidnih veza, a neizostavni su u biosintezi nukleinskih kiselina (Nordberg i Arnér, 2001; Holmgren i Sengupta, 2010).

Glavni transkripcioni faktor i master regulator redoks homeostaze je Nrf2 (*eng.* nuclear factor erythroid 2-related factor 2). Nrf2 reguliše ekspresiju gena uključenih u fazu II detoksifikacije i antioksidativne odbrane, među kojima su i geni za antioksidativne enzime i neenzimske komponente AD, uključujući CuZnSOD, MnSOD, CAT, GSH-Px, GCL i Trx (Girnun i sar., 2002; Milani i sar., 2011; Kim i sar., 2017; Tonelli i sar., 2018; Rani i sar., 2016). Nrf2 je takođe, kroz regulaciju ekspresije gena uključenih u intermedijerni metabolizam, proces transkripcije, mitohondrijsku funkciju, imunski odgovor, ćelijsku proliferaciju, signalizaciju, preživljavanje i ćelijski ciklus, odgovoran za integraciju redoks i metaboličke homeostaze (Lee i sar., 2003; Suh i sar., 2004; Ryoo i Kwak 2018; Schmidlin i sar., 2019; Aleksic i sar., 2021). U poslednje vreme sve je više dokaza o aktivaciji Nrf2 posredstvom signalizacije putem sekundarnih glasnika. Interesantno je da se i 4-hiroksinonenal (4-HNE), krajnji produkt lipidne peroksidacije, ističe kao jedan od potencijalnih sekundarnih glasnika signalizacije Nrf2 aktivacije (Zhang i sar., 2010; Huang i sar., 2012; Chapple i sar., 2013; López-Bernardo i sar., 2015). Formiranje 4-HNE adukta proteina omogućava 4-HNE da učestvuje u višestepenoj regulaciji metaboličkih puteva u ćeliji, koji uključuju transkripciju antioksidativnih enzima, proinflatornih faktora i anti-apoptotskih proteina (Andringa i sar., 2014). Najšire opisane uloge 4-HNE u signalnim putevima ćelije povezane su sa njegovom aktivacijom kinaza, kao i faktora transkripcije koji su odgovorni za redoks homeostazu (Zhang i Forman, 2015; Castro i sar., 2017; Łuczaj i sar., 2017). U zavisnosti od koncentracije 4-HNE ali i od stanja ćelije on može imati štetne ili zaštitne efekte, što ga čini ključnim igračem u održavanju redoks homeostaze (Ayala i sar., 2014).

1.5.3 Peroksizomi u mrkom masnom tkivu

Iako su ove multifunkcijske organele prisutne u skoro svim ćelijama sisara, literaturni podaci koji se odnose na prisustvo i funkciju peroksizoma u mrkom masnom tkivu su malobrojni. U mrkim adipocitima peroksizomi su prvi put pokazani na ultrastrukturnom nivou

od strane Ahlaba i Barnard (1971). Opisani su kao organele koje nemaju kristaloid u svom matriksu i koje pokazuju peroksidaznu aktivnost, a čiji broj u ćeliji raste nakon izlaganja hladnoći. Nešto kasnije, Pavelka i sar. (1976) su takođe u mrkom masnom tkivu pacova izlaganih hladnoći pokazali porast ukupne aktivnosti CAT. Sve dalje studije pretežno su se fokusirale na ulogu peroksizoma u metabolizmu lipida i njihovu saradnju sa mitohondrijama u β -oksidaciji masnih kiselina tokom termogeneze, verovatno zbog toga što su u ćeliji prisutni u manjem obimu u poređenju sa mitohondrijama i lipidnim telima. U skladu sa tim, peroksizomalna proliferacija kao odgovor na izlaganje hladnoći podržava termogenezu kroz povećanje aktivnosti enzima za β -oksidaciju, zajedno sa proteinskom ekspresijom i aktivnošću CAT (Ahlaba i Barnard, 1971; Nedergaard i sar., 1980; Petrović i sar., 2006; Bagattin i sar., 2010). Uprkos pokazanoj izuzetno važnoj ulozi peroksizoma u metabolizmu mrkog masnog tkiva (Nedergaard i sar., 1980; Cannon i sar., 1982) i posebno u metabolizmu lipida u termogeno aktiviranom mrkom masnom tkivu, poreklo peroksizoma i putevi njihove biogeneze ostali su neistraženi. Takođe, saradnja peroksizoma sa drugim organelama u mrkim adipocitima izuzev mitohondrija nije istraživana.

1.5.3.1 Peroksizomi i antioksidativna odbrana

Pored mitohondrija, glavnih producera reaktivnih vrsta, peroksizomi su još jedno *hot spot* mesto u ćeliji kada je u pitanju produkcija, ali i razgradnja ROS i RNS (Del Río i sar., 1996, 2002; Schrader i Fahimi, 2004; Schrader i Fahimi, 2006b; Bonekamp i sar., 2009; Del Río i López-Huertas, 2016; Walker i sar., 2018; Antonenkov i sar., 2010; Liu i sar., 2019; Fransen i Lismont, 2019). De Duve i Baudhuin (1966) su prvi otkrili da oksidativni procesi u peroksizomima vode produkciji H_2O_2 . Najveća produkcija H_2O_2 kod sisara odvija se u peroksizomima hepatocita, gde čini oko 35 % ukupnog H_2O_2 nastalog u jetri (Schrader i Fahimi, 2006b). Ukoliko je u ćeliji prisutan u višku H_2O_2 narušava biomembrane, tako što vrši lipidnu peroksidaciju. Pored toga što je poznat po narušavanju biomembrana, H_2O_2 se ističe i kao redoks signalni molekul u mnogim biološkim procesima kao što su proliferacija i diferencijacija ćelija, regeneracija tkiva, inflamacija, cirkadijalni ritam i starenje (Sies, 2014; 2017). Signalna svojstva H_2O_2 mogu se pripisati njegovoj relativnoj stabilnosti, difuzibilnosti i selektivnoj reaktivnosti. Međutim, da li H_2O_2 deluje kao signalni molekul ili dovodi do oksidativnog oštećenja biomolekula zavisi od ćelijskog konteksta, njegove lokalne koncentracije, kao i kinetike njegove proizvodnje i eliminacije (Auten i Davis 2009). Najveći produceri ROS i RNS u peroksizomima sisara su: acil-CoA oksidaze, urat oksidaza, ksantin oksidaza, oksidaze amino kiselina, oksidaze poliamina, sintaze azot oksida (Schrader i Fahimi, 2006b). Enzimi koji uklanjaju ROS i RNS u peroksizomima su CAT, GSH-Px, CuZnSOD, MnSOD, epoksid hidrolaze, ali i komponente AD poput peroksiredoksina 1 (Prdx1). Interesantno je da PMP20 takođe može da učestvuje u uklanjanju H_2O_2 (Schrader i Fahimi, 2006b; Lismont i sar., 2019). Od svih pomenutih CAT zauzima centralno mesto u uklanjanju H_2O_2 u peroksizomima. Ono što je takođe važno napomenuti jeste da su u mrkom masnom tkivu i oksidativni i antioksidativni kapacitet peroksizoma zavisni od tiroidnih hormona (Cannon i sar., 1982; Giacobino i sar., 1989; Obregon, 2014; Weiner i sar., 2016).

2. CILJ

Mrko masno tkivo je glavno mesto regulacije ukupne energetske homeostaze. Predstavlja visoko specijalizovan organ koji koristi energiju uskladištenu u formi lipida za produkciju toplote u procesu termogeneze. Novije studije pokazale su prisustvo mrkog masnog tkiva i kod odraslih ljudi što je otvorilo pitanje njegove uloge u regulaciji energetskeg metabolizma i etiologiji metaboličkih oboljenja poput gojaznosti, dijabetesa tipa 2 i insulinske rezistencije. Svi važni aspekti funkcije mrkog masnog tkiva, genska ekspresija, dostupnost nutrijenata, lipogeneza/lipoliza, termogeneza, antioksidativna odbrana, biogeneza organela, regulisani su tiroidnim hormonima.

Dobro je poznato da hipotiroidni pacovi tokom aklimacije na hladnoću pokazuju neotpornost u različitom stepenu. Sa druge strane, u mrkom masnom tkivu pacova hipotiroidizam delimično podražava efekte hroničnog izlaganja hladnoći. Termogena aktivacija mrkog masnog tkiva je izuzetno složen proces koji se odlikuje povećanom metaboličkom aktivnošću tkiva, prokrvljenošću, remodeliranjem kapilarne mreže, proliferacijom/diferencijacijom mrkih adipocita i remodeliranjem organela. Iako se zna da hipotiroidizam indukuje proliferaciju peroksizoma u jetri, podaci o prisustvu i funkciji peroksizoma u mrkom masnom tkivu su malobrojni. Objavljene studije su uglavnom ispitivale ulogu peroksizoma u lipidnom metabolizmu i njihovoj saradnji sa mitohondrijama u procesu β -oksidacije masnih kiselina tokom termogeneze. Međutim, poreklo peroksizoma i putevi njihove biogeneze u mrkim adipocitima su nerazjašnjeni.

Imajući to u vidu, ciljevi ove doktorske disertacije su:

- Ispitivanje uticaja sistemskog hipotiroidizma na remodeliranje mrkog masnog tkiva i mrkih adipocita;
- Praćenje dinamike peroksizoma koja podrazumeva biogenezu peroksizoma i njihovo odstranjivanje;
- Ispitivanje načina na koji dolazi do biogeneze peroksizoma u uslovima hipotiroidizma;
- Ispitivanje puteva biogeneze peroksizoma u mrkim adipocitima;
- Razmatranje strukturne i funkcijske povezanosti peroksizoma sa drugim organelama u mrkim adipocitima (mitohondrije, endoplazmin retikulum, lipidne tela);
- Rasvetljavanje promena antioksidativne odbrane i molekularnih mehanizama u njihovoj osnovi;
- Rasvetljavanje uticaja hipotiroidizma na termogenu aktivaciju mrkog masnog tkiva.

3. MATERIJAL I METODI

3.1 Eksperimentalne životinje

U eksperimentu su korišćeni mužjaci pacova Wistar soja, starosti oko dva meseca. Po odvajanju u kaveze, životinjama je izmerena telesna masa, a gajene su u uslovima konstantne vlažnosti i temperature od 22 ± 1 °C, kao i dnevno-noćnog režima od 12 sati svetlosti i 12 sati mraka. U toku eksperimenta, životinje su imale pristup standardnoj briketiranoj hrani za pacove *ad libitum*. Sve navedene procedure na životinjama odobrene su od strane Etičke komisije za rad sa životinjama Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a potvrđene od strane Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine (broj dozvole: 323-07-07505/2015-05/4).

3.2 Dizajn eksperimenta

Eksperimentalne životinje, težine 330 ± 30 g, podeljene su u četiri grupe od po osam životinja. Tri grupe životinja pile su 0.04 % rastvor metimazola (Methimazole crystalline M8506, Sigma, Nemačka) u česmenskoj vodi 7 (M7), 15 (M15) ili 21 (M21) dan. Životinje iz četvrte grupe pile su česmensku vodu i služile su kao eutiroidna kontrola.

Za izolaciju lake mitohondrijske frakcije obogaćene peroksizomima iz mrkog masnog tkiva takođe su korišćeni mužjaci pacova Wistar soja, starosti oko dva meseca i telesne težine 320 ± 30 g. Životinje su podeljene u dve grupe od po devet životinja. Jedna grupa životinja je pila 0.04 % rastvor metimazola u česmenskoj vodi 21 dan, a druga – kontrolna grupa je pila česmensku vodu.

3.3 Žrtvovanje i izolacija tkiva

Sve životinje su žrtvovane u jednom danu, dekapitacijom bez anestezije. Pre žrtvovanja, životinjama je izmerena telesna masa, a odmah po žrtvovanju pristupilo se prikupljanju krvi za izolaciju krvnog seruma/plazme za biohemijske i hormonske analize. Potom je izolovan interskapularni depo mrkog masnog tkiva, očišćen od vezivnog tkiva i mišića i pripremljen za odgovarajuće metode.

3.4 Izolacija lake mitohondrijske frakcije obogaćene peroksizomima

Za izolaciju lake mitohondrijske frakcije obogaćene peroksizomima korišćen je ceo interskapularni depo mrkog masnog tkiva od svih devet životinja iz svake grupe. Nakon žrtvovanja, izolovani depo mrkog masnog tkiva je očišćen od vezivnog, okolnog belog masnog tkiva i mišića, a zatim pulovan u medijumu za homogenizaciju – HM (0.25 M saharoza, 1 mM EDTA, 20 mM HEPES pufer; pH 7.4). Nakon homogenizacije tkiva u ručnom homogenizeru, usledilo je centrifugiranje homogenata 5 min. na 1000 g na 4 °C. Po uklanjanju belog filma lipida i pažljivom odlivanju supernatanta, talog je resuspendovan u 10 ml HM, homogenizovan i opet centrifugiran (5 min, 1000 g, 4 °C). Nakon odlivanja supernatanta, talog je ponovo resuspendovan u 10 ml HM, pa centrifugiran (10 min, 3000 g, 4 °C). Dobijeni supernatant je aspiriran i sačuvan na ledu, a postupak resuspenzije taloga ponovljen još jednom, nakon čega je laka mitohondrijska frakcija obogaćena peroksizomima ostala u supernatantu. Tako dobijen

supernatant je spojen sa onim sačuvanim u prethodnom koraku i centrifugiran (15 min, 17000 *g*, 4 °C). Nakon centrifugiranja, supernatant je odliven, a talog je stavljen u 2 % agar (skuvan u 0.1 M fosfatnom puferu u mikrotalasnoj pećnici). Nakon polimerizacije, deo agara u kome se nalazio talog isečen je na kockice i fiksiran u 2.5 % glutaraldehydu u 0,2M fosfatnom puferu, 15 minuta na 4 °C. Posle ispiranja postfiksiran u 1% OsO₄ u istom puferu 1 h, u mraku, na sobnoj temperaturi. Nakon dehidratacije u seriji etanola rastuće koncentracije rutinski je ukalupljen u Araldit (Sigma, Nemačka).

3.5 Priprema tkiva za analize

3.5.1 Priprema tkiva za Western Blot analizu

Desna polovina BAT je odmah po izolaciji zamrznuta na -80 °C. Nakon odmrzavanja, uzorci tkiva su očišćeni od preostalog vezivnog tkiva i izmereni. Potom su macerirani uz dodavanje 500 µl saharoznog pufera (0.25 M saharoza, 0.05 M Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4), a zatim su homogenizovani uz pomoć homogenizera (Ultra-Turrax® T18, Ika, Nemačka) tri puta po deset sekundi, sa po deset sekundi pauze. Dobijeni homogenati su sonifikovani na 10 kHz, tri puta po deset sekundi, sa po deset sekundi pauze. Svi navedeni koraci su rađeni na ledu. Od dobijenih homogenata tkiva po 50 µl je alikvotirano u posebno obeležene ependorfe sa već dodatom sulfosalicilnom kiselinom za određivanje ukupnog sadržaja GSH u tkivu (videti podpoglavlje 3.9). Homogenati su potom centrifugirani na 37.000 *g* sat i po vremena, na 4 °C (ultracentrifuga Optima L-100 XP, rotor Ti 50). Nakon centrifugiranja, pipetom je pažljivo aspiriran supernatant i zamrznut na -20 °C. Dobijeni supernatanti su korišćeni za Western Blot analizu i za određivanje aktivnosti enzima.

3.5.2 Priprema tkiva za svetlosnu i konfokalnu mikroskopiju

Leva polovina BAT je fiksirana u 4% paraformaldehidu u fosfatnom puferu (pH 7.4). Nakon 12 sati fiksacije, uzorci su ispirani u česmenskoj vodi preko noći, dehidratirani kroz seriju etanola rastuće koncentracije, prosvetljeni u ksilolu i ukalupljeni u parafin. Ukalupljeni uzorci tkiva su isečeni na rotacionom mikrotomu (Reichert, Austrija) na preseke debljine 5 µm i montirani na mikroskopske pločice.

3.5.3 Priprema tkiva za elektronsku mikroskopiju

Region istmusa BAT je izdvojen i isečen na komadiće veličine oko 1 mm³. Zarad obeležavanja peroksizoma diaminobenzidinom, uzorci tkiva su fiksirani u smesi rastvora 2% paraformaldehida i 2% glutaraldehyda u 0.1M fosfatnom puferu, sat vremena na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja u fosfatnom puferu, uzorci su preinkubirani u 0.1% diaminobenzidinu (DAB, Sigma Aldrich, Nemačka) u 0.1M fosfatnom puferu, 30 min, na sobnoj temperaturi, u mraku (LeHir i sar., 1979). Potom je u preinkubacioni medijum dodat H₂O₂ (finalno 0.01%) i uzorci su dalje inkubirani sat vremena u mraku, na 37 °C. Uzorci su potom ispirani u fosfatnom puferu i postfiksirani sat vremena u 1% OsO₄ u mraku, na sobnoj temperaturi. Zatim su dehidratirani u seriji etanola rastuće koncentracije i rutinski ukalupljeni u Araldit (Sigma, Nemačka). Kalupi tkiva su potom sečeni na ultramikrotomu (UC6, Leica Microsystems, Nemačka) na ultratanke preseke, 70-100 nm, koji su montirani na bakarne ili niklovane mrežice i dalje korišćeni za ultrastrukturne analize i imunogold metod. Polutanki preseki tkiva, debljine 2 µm, montirani su na predmetne pločice i dalje korišćeni za histološke analize i metod imunofluorescentnog obeležavanja ciljanog antigena.

Ukalupljeni uzorci lake mitohondrijske frakcije su takođe isečeni na ultramikrotomu, na preseke debljine 70-100 nm, montirani na niklovane mrežice i dalje korišćeni za imunogold metode i ultrastrukturnu analizu.

3.5.4 Priprema krvnog seruma i plazme

Odmah po žrtvovanju, krv od svake životinje je sakupljena paralelno u dve epruvete, za izolaciju krvnog seruma i krvne plazme. U jednu epruvetu, nakon sakupljanja krvi, dodat je stakleni štapić, radi brže koagulacije i lakše izolacije krvnog seruma. U drugu epruvetu dodato je 200 µl heparina, radi sprečavanja brze koagulacije i bolje izolacije krvne plazme. Tako pripremljena krv je potom centrifugirana (3000 rpm, 15 minuta). Nakon centrifugiranja, supernatanti su pažljivo aspirirani i alikvotirani u unapred pripremljene ependorfe, a potom zamrznuti na -20 °C. Iz krvnog seruma su određene koncentracije tiroidnih hormona i tirostimulirajućeg hormona (TSH), a iz krvne plazme biohemijski parametri.

3.6 Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina je određivana po metodu Lowry i saradnika (Lowry i sar., 1951). Metod se zasniva na reakciji peptidnih veza i Cu^{2+} jona u alkalnoj sredini i reakciji Folin-Ciocalteu reagensa sa aromatičnim aminokiselinama (Trp i Tyr) u polipeptidnim lancima. Nastalo kompleksno jedinjenje, plave boje, ima maksimum apsorpcije na 500 nm. Intenzitet boje je proporcionalan koncentraciji proteina, koja se očitava sa standardne krive, konstruisane merenjem apsorbanca rastvora goveđeg serumskog albumina (*eng.* BSA, bovine serum albumin), poznate koncentracije na 500 nm. Koncentracija proteina je izražena u mg/ml.

3.7 SDS-PAGE i Western Blot

Proteini su razdvajani na osnovu njihove molekulske mase na Na^+ -dodecil sulfat-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) u Bio-Rad Mini-PROTEAN III sistemu. Korišćeni gelovi za razdvajanje su bili različite procentnosti u zavisnosti od molekulske mase proteina od interesa. Polimerizacija gela je vršena dodavanjem 0.05% amonijum persulfata (APS) i 0.033% N,N,N',N'-tetraetilendiamina (TEMED). U određenu zapreminu proteinskog rastvora dodata je odgovarajuća zapremina (2 µl pufera na 10 µl uzorka) pufera za uzorke (4% SDS, 20% glicerol, 10% β -merkaptoetanol, 0.125 M Tris, pH 6.8, i 0.025% bromofenol plavo), a zatim su uzorci kratko vorteksovani, pa kuvani 5 minuta i potom prebačeni na led. Na gelove je nanošen i proteinski marker radi određivanja molekulskih masa (Thermo Fisher Scientific, #26616, SAD). Elektroforeza je trajala do 120 minuta pri konstantnom naponu od 120 V. Potom je vršen transfer proteina sa gelova na poliviniliden fluorid membranu (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech, UK). Membrane su aktivirane u 100% metanolu, 10 sekundi, potom su isprane u dH_2O , 5 minuta i prebačene u pufer za transfer do upotrebe. Membrane i gelovi su spakovani u sendvič i prebačeni u rezervoare sa transfer puferom (0.192 M glicin, 20% metanol, 0.025 M Tris, pH 8.3). Prenos proteina sa gelova na membrane odvijao se pri konstantnom naponu od 100 V, 60 minuta. Uspešnost transfera je proveravana bojenjem membrane 5% Ponceau S bojom, rastvorenom u sirćetnoj kiselini. Potom su membrane inkubirane sat vremena na sobnoj temperaturi u serumu za blokiranje nespecifičnog vezivanja – 5% BSA u TBS-T, na šejkeru.

3.8 Detekcija proteina nakon Western Blot analize

Nakon blokiranja, membrane su inkubirane sa odgovarajućim primarnim antitelima rastvorenim u 5% BSA u TBS-T, preko noći, na 4 °C. Razblaženja primarnih antitela data su u Tabeli 1. Nakon inkubacije i ispiranja nevezanog primarnog antitela, membrane su inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelima, koja su konjugovana sa peroksidazom rena (*eng.* HRP, horseradish peroxidase), dobijenih imunizacijom kože na IgG zeca (1:3000, ab6721, UK), odnosno miša (1:2000, ab6789, UK), dva sata, na sobnoj temperaturi, na šejkeru. Nakon inkubacije, membrane su ispirane TBS-T puferom, najmanje 60 minuta.

Za vizualizaciju proteina, membrane su inkubirane u hemiluminiscentnom supstratu, smeša luminola i kumarinske kiseline, uz dodatak vodonik peroksida, u trajanju od tri minuta. Potom su rentgen filmovi (Hyperfilm, Amersham Pharmacia Biotech, UK) izlagani ekscitovanom luminolu sa membrana u trajanju od 3 do 10 minuta. Filmovi su razvijani, osušeni, obeleženi i skenirani. Dobijeni skenovi su korišćeni za kvantifikaciju proteinskih traka.

Kvantifikacija proteinskih traka je rađena u ImageJ softveru (ImageJ 1.52p, USA). Za analizu je korišćena srednja vrednost kvantifikacije traka iz tri nezavisna eksperimenta. Dobijeni rezultati normalizovani su u odnosu na *housekeeping* protein, u ovom slučaju na β -actin. Vrednosti ekspresije proteina su izražene u procentima, a na grafikonima su predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM.

Tabela 1. Primarna antitela korišćena u Western Blot analizi

<i>Antigen</i>	<i>Kataloški broj</i>	<i>Proizvođač</i>	<i>Poreklo</i>	<i>Klonalnost</i>	<i>Razblaženje</i>
Pex11β	ab74507	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:1000
Pex19	ab137072	Abcam, UK	zečje	monoklonalno	1:2000
PMP70	ab74507	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:1000
Pex16	sc-398189	Santa Cruz, US	mišje	monoklonalno	1:500
Pex5	sc-137103	Santa Cruz, US	mišje	monoklonalno	1:1000
Pex13	sc-271477	Santa Cruz, US	mišje	monoklonalno	1:1000
Pex26	sc-376817	Santa Cruz, US	mišje	monoklonalno	1:500
Pex6	sc-271813	Santa Cruz, US	mišje	monoklonalno	1:500
β-actin	ab3280	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	1:2000
Drp1	ab93942	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:1000
Calnexin	ab22595	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:1000
PPARγ	ab19481	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:400
PPARα	ab8934	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:2000
PGC-1α	ab54481	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:1000
TRα1	PA1-211A	Thermo Fisher, US	zečje	poliklonalno	1:200
TRα2	PA1-216	Thermo Fisher, US	zečje	poliklonalno	1:200
TRβ1	sc-738	Santa Cruz, US	mišje	monoklonalno	1:200
RXRα	sc-553	Santa Cruz, US	zečje	poliklonalno	1:500
DIO2	sc-98716	Santa Cruz, US	zečje	poliklonalno	1:2000
CuZnSOD	ab-13498	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:10000
MnSOD	ab-13533	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:4000

CAT	ab1877	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:800
GSH-Px	ab-59546	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:1000
GCL	ab17926	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:1000
Trx	ab-26320	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:1000
Nrf2	ab-31163	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:1000

3.9 Određivanje aktivnosti enzima AD i ukupnog sadržaja GSH

3.9.1 Određivanje aktivnosti CuZnSOD i MnSOD

Ukupna aktivnost SOD je izmerena prema modifikovanom protokolu koji su uspostavili Misra i Fridovich ([Misra i Fridovich, 1972](#)). Metod se zasniva na principu inhibicije autooksidacije epinefrina pri određenim uslovima (pH 10.2).

Za određivanje aktivnosti MnSOD primenjen je isti princip kao i za određivanje ukupne aktivnosti SOD, ali tek nakon preikubacije sa 4 mM KCN, u cilju inhibicije CuZnSOD. Enzimaska aktivnost predstavljena je kao U mg⁻¹ proteina, gde je jedinica definisana kao količina enzima koja inhibira autooksidaciju epinefrina za 50% pod određenim reakcionim uslovima. Enzimaska aktivnost CuZnSOD izračunata je kao razlika između ukupne aktivnosti SOD i aktivnosti MnSOD.

3.9.2 Određivanje aktivnosti CAT

Aktivnost CAT određena je prema preporuci proizvođača (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Metod se zasniva na sprektrofotometrijskom praćenju promena apsorbance uzorka na talasnoj dužini od 230 nm. Do promena apsorbance dolazi usled razgradnje H₂O₂ standardne koncentracije od strane katalaze. Na pomenutoj talasnoj dužini H₂O₂ ima maksimum apsorpcije. Aktivnost CAT izražena je kao mM H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteina.

3.9.3 Određivanje aktivnosti TR

Aktivnost TR je određena prema protokolu koji su uspostavili Luthman i Holmgren ([Luthman i Holmgren, 1982](#)). TR katalizuje reakciju redukcije disulfidne veze u DTNB (5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoeva kiselina) sa NADPH. Metod se zasniva na praćenju promene apsorbance NADPH, čiji maksimum apsorpcije na 412 nm. Aktivnost enzima izražena je u nmol NADPH min⁻¹ mg⁻¹ proteina.

3.9.4 Određivanje aktivnosti GR

Aktivnost GR je određena prema protokolu koji su uspostavili Glatzle i saradnici ([Glatzle i sar., 1974](#)). Metod se zasniva na praćenju promene apsorbance koja je direktno proporcionalna koncentraciji NADPH, koji se oksiduje u reakciji redukcije oksidovanog GSSG do redukovanog GSH (glutaciona) koju katalizuje GR. Aktivnost enzima izražena je u nmol NADPH min⁻¹ mg⁻¹ proteina.

3.9.5 Određivanje aktivnosti GSH-Px

Aktivnost GSH-Px je određena prema protokolu koji su uspostavili Paglia & Valentine ([Paglia i Valentine, 1967](#)). GSH-Px katalizuje reakciju uklanjanja H₂O₂ i drugih hidroperoksida.

Kao supstrat korišćen je t-butilhidroperoksid. Aktivnost enzima izražena je u nmol NADPH min⁻¹ mg⁻¹ proteina.

3.9.6 Određivanje ukupnog sadržaja GSH u mrkom masnom tkivu

Ukupan sadržaj GSH u mrkom masnom tkivu određen je prema protokolu koji je uspostavio Owner Griffith ([Griffith, 1980](#)), a nakon deproteinizacije sulfosalicilnom kiselinom. Metod se zasniva na procesu recikliranja u kome se naizmenično vrši oksidacija GSH sa DTNB (5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoevom kiselinom) i redukcija GSSG sa NADPH u prisustvu GR. Brzina formiranja 2-nitro-5-tiobenzoeve kiseline koja nastaje u toku oksidacije GSH prati se merenjem apsorbanca na 412 nm. Ukupan sadržaj GSH izražen je u nmol GSH g⁻¹ tkiva.

3.10 Određivanje koncentracije tiroidnih hormona i TSH

Koncentracija tiroidnih hormona T3 i T4 u serumu pacova određena je RIA metodom (*eng.* radio immuno assay) na Institutu za primenu nuklearne energije – INEP (Zemun, Srbija). Dobijene vrednosti izražene su u nmol/L.

Koncentracija TSH određena je uz pomoć komercijalnog ELISA kita za određivanje koncentracije TSH iz seruma pacova (CSB E05115r, Cusabio, USA). Dobijene vrednosti izražene su u mIU/L.

3.11 Određivanje koncentracije biohemijskih parametara

Koncentracije biohemijskih parametara određivane su uz pomoć komercijalnih kitova (BioSystems S.A., Spain), iz krvne plazme pacova, na standardnom analizeru IL ILab 300 Plus Chemistry Analyzer (Diamond Diagnostics, USA). Dobijene vrednosti izražene su u: mmol/L (za koncentraciju ukupnog holesterola, HDL (*eng.* high density lipoprotein), LDL (*eng.* low density lipoprotein), triglicerida, glukoze, uree, kalcijuma), IU/L (za koncentraciju laktata i amilaze), μmol/L (za koncentraciju kreatinina).

3.12 Lokalizacija proteina metodima imuno-obeležavanja

Za lokalizaciju proteina metodima imuno-obeležavanja korišćeni su parafinski preseci debljine 5 μm i aralditski polutanki preseci debljine 2 μm.

3.12.1 Imunohistohemijska lokalizacija proteina

Nakon deparafinizacije i rehidratacije parafinskih preseka tkiva, vršeno je otkrivanje epitopa antigena procedurom toplotom indukovano otkrivanja epitopa (*eng.* HIER, heat-induced epitope retrieval), i to inkubacijom u citratnom puferu (pH 6.0), u trajanju od 21 minut u mikrotalasnoj pećnici na 800 W. Potom su preseci inkubirani sa anti-Nrf2 primarnim antitelom (1:100; ab31163, Abcam, UK). Imunohistohemijska reakcija je razvijena korišćenjem komercijalnog kita (Thermo Scientific Lab Vision Quanto HRP DAB TL-125-QHD) sa diaminobenzidinom (DAB) kao hromogenom. Reakcija je prekinuta ispiranjem česmenskom vodom, a kontrastiranje je izvršeno Majerovim hematoksilinom. Nakon rutinske dehidratacije, napravljeni su trajni preparati montiranjem u DPX medijumu (Mounting medium for histology, Sigma).

Uzorci su potom analizirani i slikani svetlosnim mikroskopom DMLB koji je opremljen DFC295 digitalnom kamerom (Leica Microsystems, Germany).

3.12.2 Imunofluorescentna lokalizacija proteina

Imunofluorescentna lokalizacija proteina urađena je na parafinskim (TR α 1, TR α 2, COXIV, CAT) i na polutankim presecima tkiva (CuZnSOD, MnSOD, GSH-Px, Nrf2, 4-HNE), nakon uklanjanja parafina/smole, rehidratacije, otkrivanja epitopa antigena i ispiranja u TBS-T (*eng.* Tris buffered saline, 0.1 % Tween 20, pH 7.4). Preseci su potom inkubirani u 10 % normalnom kozjem serumu i 5 % BSA u TBS-T, radi blokiranja nespecifičnog vezivanja, sat vremena na sobnoj temperaturi, a zatim sa odgovarajućim primarnim antitelima (Tabela 2) preko noći na 4 °C. Posle ispiranja u TBS-T, preseci su inkubirani sa odgovarajućim sekundarnim kozjim antitelima, konjugovanim sa fluorohromima, sat vremena na sobnoj temperaturi, u mraku. Prethodno ispirani u TBS-T, preseci su potom inkubirani sa fluorescentnim nukleusnim bojama – DAPI (1:1000; SigmaAldrich) ili Sytox Orange (1:1000; S11368, Life Technologies, SAD) pet minuta. Konačno, preseci su isprani u TBS i montirani u Mowiolu (SigmaAldrich).

Za kolokalizacione analize, a na osnovu porekla primarnih antitela, korišćen je metod dvojne simultane imunofluorescencije. Vizuelizacija je vršena korišćenjem Leica konfokalnog mikroskopa TCS SP5 II (Leica Microsystems) u sekvencijalnom modu da bi se izbeglo preklapanje između odgovarajućih kanala. Dvojno obojeni uzorci su bili ekscitovani Ar laserom talasne dužine od 488 nm i HeNe laserom talasne dužine od 633 nm, a nukleusne boje su ekscitovane korišćenjem UV lasera talasne dužine 405 nm (za DAPI) ili HeNe lasera talasne dužine od 543 nm (za Sytox orange). Negativna kontrola dobijena je izostavljanjem primarnih antitela.

Analiza uzoraka urađena je korišćenjem komercijalog softvera LAS-AF (LAS-AF-Lite 2.6.3 8173).

Tabela 2. Primarna antitela korišćena pri imunofluorescentnoj lokalizaciji proteina.

<i>Antigen</i>	<i>Kataloški broj</i>	<i>Proizvođač</i>	<i>Poreklo</i>	<i>Klonalnost</i>	<i>Razblaženje</i>
TRα1	PA1-211A	Thermo Fisher, US	Zečje	poliklonalno	1:100
TRα2	PA1-216	Thermo Fisher, US	Zečje	poliklonalno	1:100
COXIV	ab-14744	Abcam, UK	Mišje	monoklonalno	1:150
CuZnSOD	ab-13498	Abcam, UK	Zečje	poliklonalno	1:50
MnSOD	ab-13533	Abcam, UK	Zečje	poliklonalno	1:100
CAT	ab1877	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:250
GSH-Px	ab-59546	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:100
Nrf2	ab-31163	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:50
4HNE	ab-48506	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	1:50

3.12.3 Imunogold lokalizacija proteina

Za lokalizaciju proteina na nivou elektronske mikroskopije korišćeni su ultratanki preseci (70-100 nm) tkiva/izolovanih frakcija ukalpljeni u Aralditu, koji su montirani na niklovane mrežice presvučene olovkom (Coat-Quick "G", Agar Scientific Ltd, UK). Nakon otkrivanja epitopa antigena urađeno je blokiranje nespecifičnog vezivanja antitela inkubacijom u 5% BSA u TBS-T, sat vremena na sobnoj temperaturi. Mrežice su potom nanete na kap

primarnog antitela odgovarajućeg razblaženja i inkubirane preko noći na 4 °C. Nakon ispiranja u TBS-T prebačene su na kap odgovarajućeg sekundarnog antitela, zapreminskog razblaženja 1:20, obeleženog česticama zlata dijametra 10 ili 20 nm i inkubirane sat vremena na sobnoj temperaturi. Mrežice su zatim ispirane u TBS-T i redestilovanoj vodi. U slučaju lokalizacije dva proteina, korišćen je metod simultanog imunogold obeležavanja. Prvo je vršena inkubacija sa oba primarna, a potom oba sekundarna antitela. Primarna i sekundarna antitela korišćena za imunogold lokalizaciju proteina su prikazana u Tabeli 3.

Nakon sušenja mrežice su posmatrane i slikane na Philips/FEI CM12 transmisionom elektronskom mikroskopu (FEI, Holandija).

Tabela 3. Primarna i sekundarna antitela korišćena za imunogold obeležavanje proteina.

<i>Antigen</i>	<i>Kataloški broj</i>	<i>Proizvođač</i>	<i>Poreklo</i>	<i>Klonalnost</i>	<i>Razblaženje</i>
Primarna antitela					
PMP70	ab-74507	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:400
Pex16	sc-398189	Santa Cruz, US	mišje	monoklonalno	1:500
Drp1	ab-93942	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:70
VDAC1	ab-34726	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:50
ACOX1	ab-184032	Abcam, UK	zečje	monoklonalno	1:50
ACOX3	sc-373977	Santa Cruz, US	mišje	monoklonalno	1:50
CuZnSOD	ab-13498	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:50
MnSOD	ab-13533	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:100
CAT	ab-1877	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:500
GSH-Px	ab-59546	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:200
Nrf2	ab-31163	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:30
4-HNE	ab-48506	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	1:1000
Sekundarna antitela					
Goat anti-mouse IgG (10 nm gold)	ab-27241	Abcam, UK	kozje	poliklonalno	1:20
Goat anti-rabbit IgG (10 nm gold)	ab-27234	Abcam, UK	kozje	poliklonalno	1:20
Goat anti-rabbit IgG (20 nm gold)	ab-27237	Abcam, UK	kozje	poliklonalno	1:20

3.13 Stereološke i morfometrijske analize

Stereološke i morfometrijske analize mrkih adipocita rađene su na presecima tkiva ukalupljenih u Araldit, debljine 70-100 nm koji su naneti na bakarne mrežice i snimani na Philips/FEI CM12 transmisionom elektronskom mikroskopu (FEI, Holandija). Analizirano je 40 ćelija po grupi, presečenih u nivou nukleusa. Volumenska gustina mrkih adipocita i pojedinačnih ćelijskih kompartmenta određena je Weibel metodom (Weibel i sar., 1969) u ImageJ softveru (Image J, 1.52p, Wayne Rasband National Institutes of Health, USA). Volumenska gustina (V_v) lipidnih tela, mitohondrija, peroksizoma i citoplazme izračunata je kao odnos zbira svih tačaka koje padaju na određeni ćelijski kompartment (P_x) i ukupnog broja tačaka koje padaju na mrki adipocit (P_{total}): $V_v = P_x/P_{total}$.

Relativan broj mitohondrija i peroksizoma izračunat je prema sledećoj formuli: $N = (N_{\text{total}}/P_{\text{cell}}) * 100 \mu\text{m}^2$, gde $N_{\text{total}}/P_{\text{cell}}$ predstavlja odnos ukupnog broja organela od interesa po ćeliji i površine te ćelije, a relativizacija je urađena na $100 \mu\text{m}^2$ površine ćelije. Broj lizozoma predstavljen je kao apsolutan broj lizozoma po ćeliji, po grupi.

Srednji dijametar mitohondrija i lipidnih tela izračunat je kao srednja vrednost dužeg i kraćeg dijametara mitohondrija/lipidnih tela jedne ćelije, u okviru svake grupe. Srednja vrednost srednjeg dijametara mitohondrija/lipidnih tela predstavljena je kao srednja vrednost svih srednjih dijametara mitohondrija/lipidnih tela po grupi.

Površina mrkih adipocita izmerena je i predstavljena kao srednja vrednost apsolutne površine ćelija po grupi. Površina mitohondrija/lipidnih tela je izmerena, zatim izračunata srednja vrednost površine organela po ćeliji u okviru svake grupe i relativizirana na $100 \mu\text{m}^2$ površine ćelija.

Broj MPLB jedinica izračunat je kao ukupan broj jedinica po grupi, a potom je relativiziran na $100 \mu\text{m}^2$ površine ćelija.

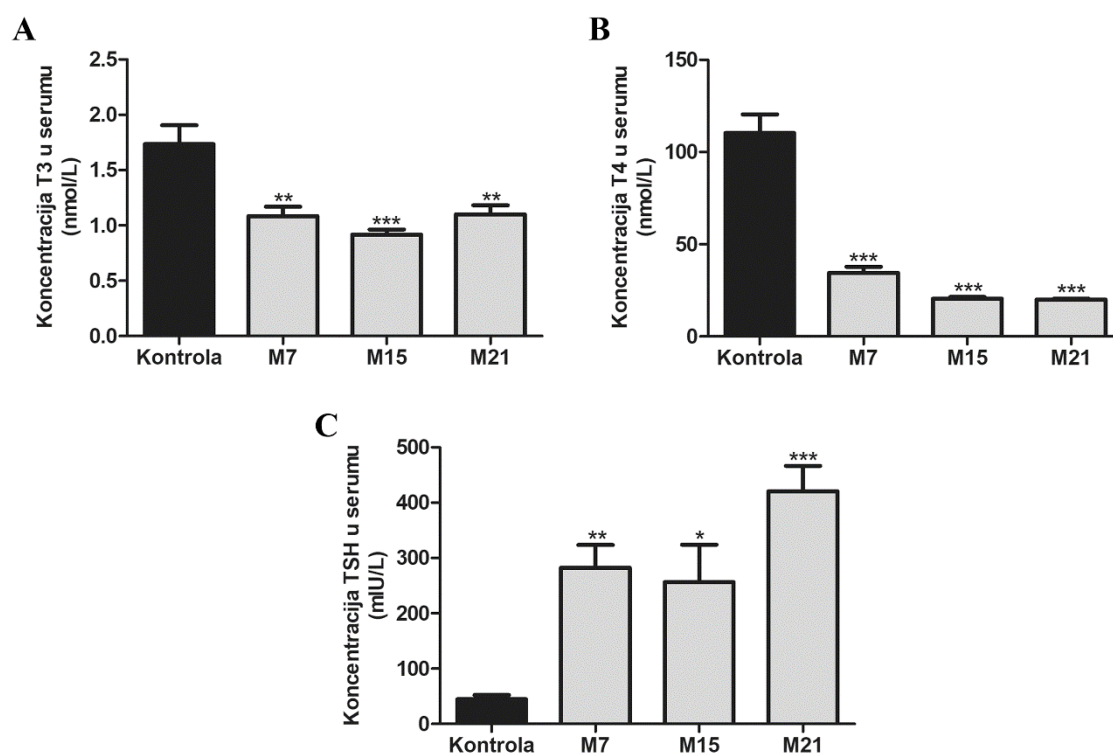
3.14 Statističke analize

Svi dobijeni rezultati analizirani su u GraphPad Prism softveru (GraphPad Prism, Version 5.03, SAD). Normalna distribucija je testirana korišćenjem D'Agustino i Pearson testa. Ukoliko su kriterijumi normalnosti ispunjeni, razlike između grupa su testirane jednosmernim (*eng.* one-way) ANOVA, a potom Tukey testom. Ukoliko kriterijumi normalnosti nisu ispunjeni, primenjen je Kruskal-Wallis neparametrijski test. Za najniži stepen značajnosti uzeta je $p < 0.05$.

4. REZULTATI

4.1 Analiza nivoa tiroidnih hormona i TSH u serumu

Hipotiroidizam u odnosu na kontrolu snižava nivo T3 i T4, a povišava nivo TSH, kao glavnih pokazatelja tiroidnog statusa u krvnom serumu životinja (Grafik 1). Nivo T3 značajno opada već sedmog dana tretmana (M7), najniži je petnaestog dana (M15) i zadržava se na niskom nivou do kraja tretmana (M21) (Grafik 1A). Nivo T4 značajno opada već sedmog dana tretmana (M7), a taj pad se nastavlja petnaestog (M15) i dvadeset prvog (M21) dana (Grafik 1B). U poređenju sa kontrolom, nivo TSH značajno je povišen u hipotiroidnim grupama već sedmog dana (M7) i zadržava se na visokom nivou do kraja tretmana (Grafik 1C).



Grafik 1. Promene nivoa tiroidnih hormona T3 i T4 i TSH u kontroli i hipotiroidnim grupama. Koncentracija T3 izražena u nmol/L (A), T4 u nmol/L (B) i TSH u mIU/L (C) u krvnom serumu životinja. * poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.2 Relativan prinos telesne mase životinja

Analiza merenja telesne mase životinja hipotiroidnih grupa u poređenju sa odgovarajućom kontrolom, ukazuje na smanjen relativan dnevni prinos telesne mase sa dužinom tretmana (Tabela 4). U grupi M21 dnevni prinos telesne mase je najniži u poređenju sa odgovarajućom kontrolom.

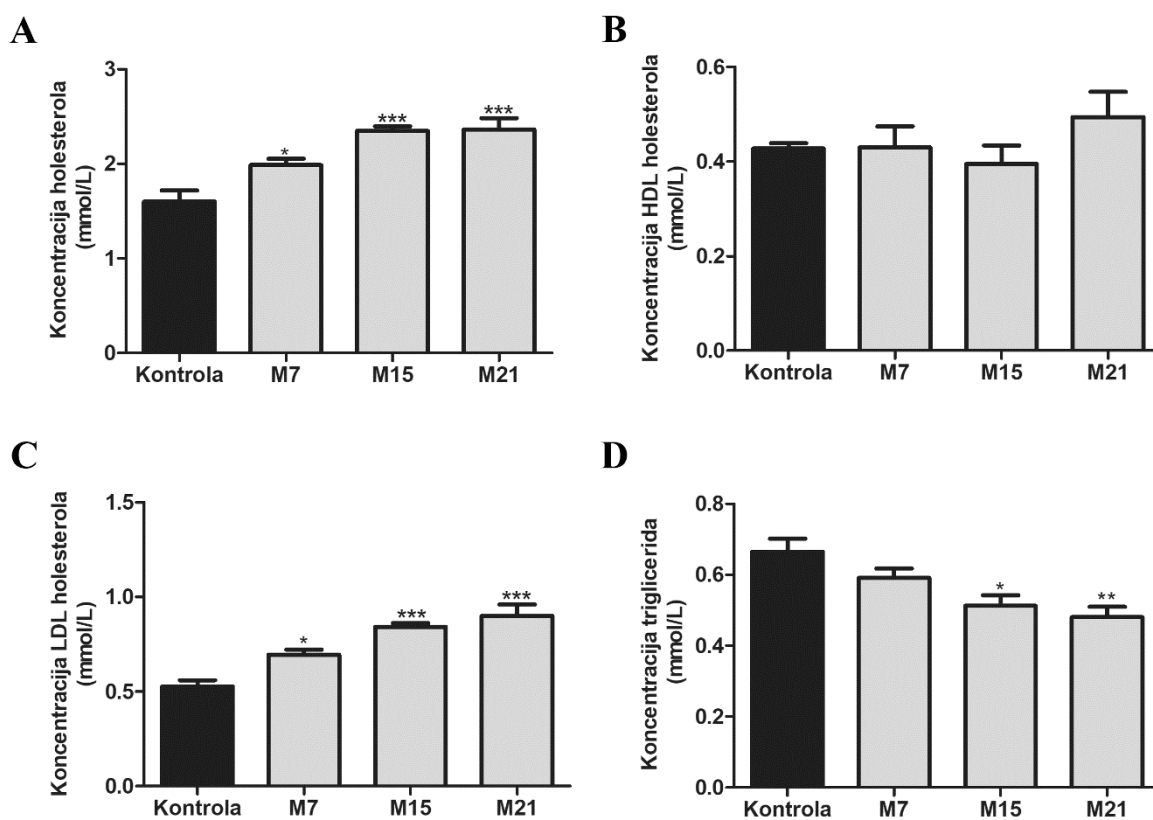
Tabela 4. Relativan dnevni prinos telesne mase životinja izražen u procentima.

<i>ODGOVARAJUĆE KONTROLE</i>		<i>HIPOTIROIDNE GRUPE</i>	
K7	+ 3,34%	M7	+ 2,93%
K15	+ 3,58%	M15	+ 1,24%
K21	+ 1,14%	M21	+ 0,19%

4.3 Analiza biohemijskih parametara

4.3.1 Koncentracije ukupnog holesterola, HDL, LDL i triglicerida u plazmi

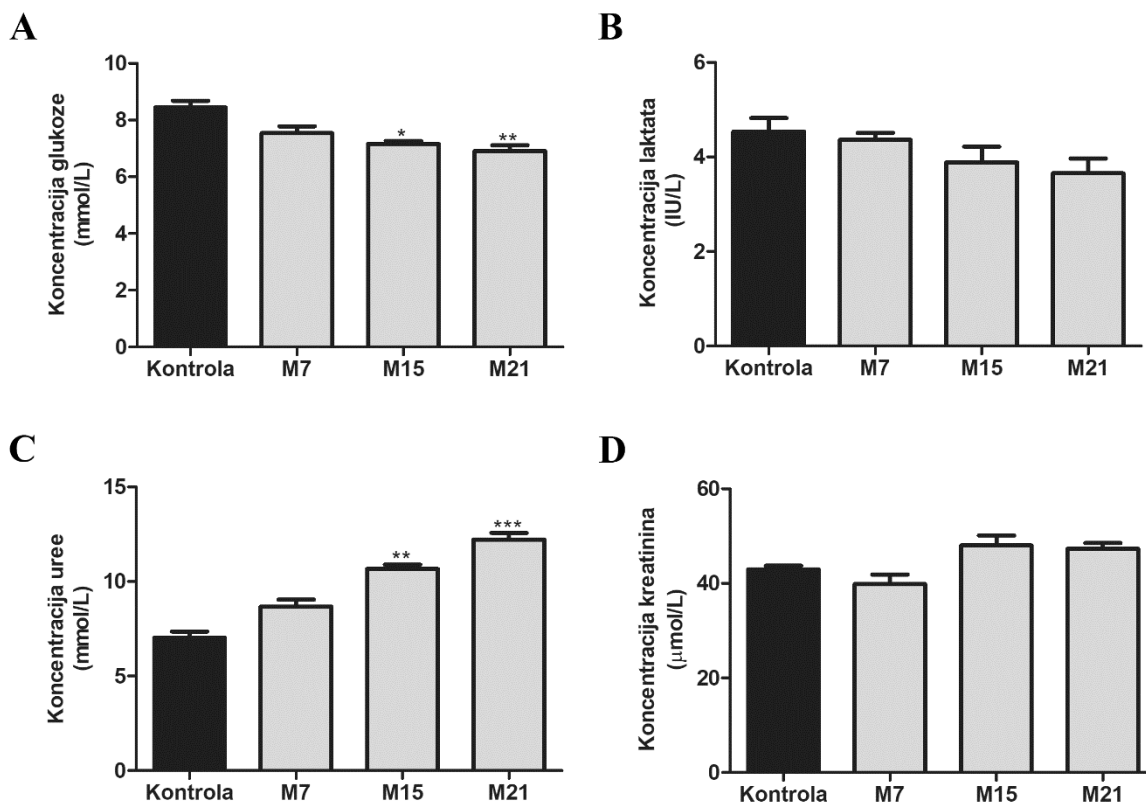
Analizom biohemijskih parametara iz krvne plazme životinja pokazano je da u poređenju sa kontrolnom grupom hipotiroidizam menja lipidni status krvi (Grafik 2). Ukupni i LDL holesterol značajno je povišen u hipotiroidnim grupama već sedmog dana (M7) i zadržava se na visokom nivou do kraja tretmana (M21) (Grafik 2A i 2C), dok je nivo HDL holesterola nepromenjen (Grafik 2B). Nivo triglicerida snižen je od petnaestog dana (M15) i zadržava se na nižem nivou do kraja tretmana (M21) (Grafik 2D).



Grafik 2. Analiza biohemijskih parametara iz krvne plazme životinja. Koncentracija ukupnog holesterola (A), koncentracija HDL (B), koncentracija LDL (C), koncentracija triglicerida (D). Vrednosti za date parametre izražene su u mmol/L. * poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.3.2 Koncentracija glukoze, laktata, uree i kreatinina u plazmi

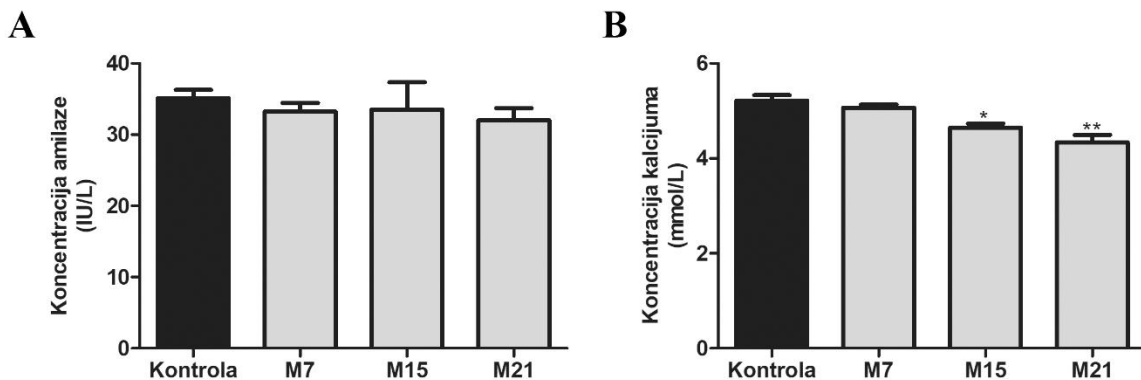
Koncentracija glukoze u krvnoj plazmi hipotiroidnih životinja snižena je od petnaestog dana (M15) i zadržava se na nižem nivou do kraja tretmana (M21) (Grafik 3A), dok je nivo uree povišen od petnaestog dana (M15) i zadržava se na višem nivou do kraja tretmana (M21), u poređenju sa kontrolom (Grafik 3C). Hipotiroidizam nije uticao na nivo laktata i kreatinina, koji su ostali nepromenjeni u odnosu na kontrolu (Grafik 3B i 3D).



Grafik 3. Analiza biohemijskih parametara iz krvne plazme životinja. Koncentracija glukoze (A), koncentracija laktata (B), koncentracija uree (C), koncentracija kreatinina (D). Vrednosti za date parametre izražene su u mmol/L (A,C), IU/L (B), μmol/L (D). * poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.3.3 Koncentracija amilaze i kalcijuma u plazmi

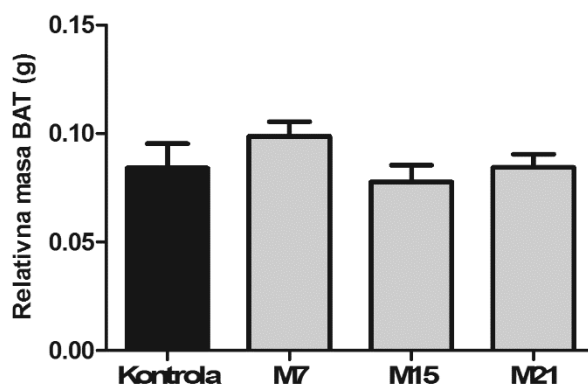
Koncentracija amilaze u krvnoj plazmi životinja se ne menja kod hipotiroidnih grupa u odnosu na kontrolu (Grafik 4A), dok je koncentracija kalcijuma snižena od petnaestog dana (M15) i ostaje snižena do kraja tretmana (M21) (Grafik 4B).



Grafik 4. Analiza biohemijskih parametara iz krvne plazme životinja. Koncentracija amilaze (A), koncentracija kalcijuma (B). Vrednosti za date parametre izražene su u IU/L (A) i mmol/L (B). * poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.4 Relativna masa mrkog masnog tkiva

Hipotiroidizam nije uticao na relativnu masa mrkog masnog tkiva, ona je ostala nepromenjena tokom tretmana u odnosu na kontrolnu grupu (Grafik 5).



Grafik 5. Relativna masa (g) mrkog masnog tkiva životinja.

4.5 Analiza mrkog masnog tkiva na ultrastrukturnom nivou

Ultrastrukturna analiza interskapularnog depoa mrkog masnog tkiva kontrolne grupe životinja pokazala je sledeće – ćelije su krupne, sa krupnim lipidnim telima koja zauzimaju centralni deo ćelije dok je nukleus pomeren ka periferiji, bliže ćelijskoj membrani (Slika 3A). Mitohondrije su takođe krupne, sa lepim, pravilnim kristama koje su u pojedinim ćelijama gušće upakovane. Najčešće su lokalizovane uz membranu ćelije i u delovima citoplazme između lipidnih tela. Cisterne glatkog endoplazminog retikuluma su takođe smeštene u citoplazmatskom prostoru oko mitohondrija i vrlo često su u kontaktu sa njima. U nekim ćelijama uočeno je prisustvo sekundarnih lizozoma. Potvrđeno je prisustvo peroksizoma koji

se lako uočavaju kao DAB obojeni. Lokalizovani su uglavnom među mitohondrijama, blisko njihovim membranama i uz lipidna tela. Čest je slučaj lokalizacije peroksizoma u prostoru između mitohondrija i gLER, pa sa njima čine „trijadu“ organela. Veličina i oblik peroksizoma u kontroli variraju, ali je njihov okruglasti oblik dominantan.

U grupi M7, na nivou ultrastrukture, uočavaju se dva tipa mrkih adipocita, koji se razlikuju po veličini (Slika 3B):

- a) Sitniji, sa krupnim lipidnim telima i sitnim, gusto pakovanim mitohondrijama koje odlikuju jako izražene, pravilne kriste;
- b) Krupniji, sa krupnim lipidnim telima, ali i sa krupnim mitohondrijama, čije kriste iz specijalizovanog lamelnog tipa (karakterističnog za mrke adipocite) prelaze u tubularni tip.

Takođe u ovoj grupi primećen je izvestan broj nabubrelih mitohondrija kod kojih je struktura kristi izmenjena, a matriks prosvetljen. U jednoj od ćelija uočeni su i autofagozomi formirani oko mitohondrija. I u ovoj grupi, kao i kod kontrole, nukleus je kod većine ćelija, pomeren prema ćelijskoj membrani. U citoplazmi, između mitohondrija je prisutan veliki broj cisterni gLER. Takođe, uočeni su sekundarni lizozomi lokalizovani u neposrednoj blizini mitohondrija. Zapažena karakteristika mrkih adipocita iz ove grupe je dosta citoplazme, odnosno citoplazmatskih domena bez vidljivih organela. Peroksizomi su u ovoj grupi brojniji u odnosu na kontrolnu grupu, različite veličine i stepena DAB obojenosti.

U grupi M15 ćelije su znatno sitnije u poređenju sa grupom M7 i sa kontrolnom grupom (Slika 3C). Jasno se izdvajaju dve populacije mrkih adipocita:

- a) Tamni sa sitnim, gusto upakovanim mitohondrijama i slabo uočljivim peroksizomima;
- b) Svetli sa krupnim mitohondrijama, fino raspoređenim u citoplazmi i jasno uočljivim, brojnim peroksizomima.

Lipidna tela u ćelijama ove eksperimentalne grupe su mnogo sitnija u poređenju sa kontrolnom grupom. Brojna su, i različitih dimenzija a nukleus polako zauzima centralnu poziciju u citoplazmi ćelije. Mitohondrije u svetloj populaciji mrkih adipocita su pravilnog oblika sa jasno izraženim, dugim, paralelno postavljenim lamelnim kristama. Vrlo retko se uočavaju mitohondrije sa prosvetljenim matriksom, čije kriste gube pravilnost u pogledu oblika i strukture. Uočava se i veliki broj cisterni gLER kao i sekundarnih lizozoma. Peroksizomi u svetloj populaciji mrkih adipocita su izrazito brojni, različitog oblika i veličine. Lokalizovani su uglavnom oko lipidnih tela i to veći broj njih oko jednog lipidnog tela, naslonjeni na njegovu polumembranu. Ređe su lokalizovani među mitohondrijama.

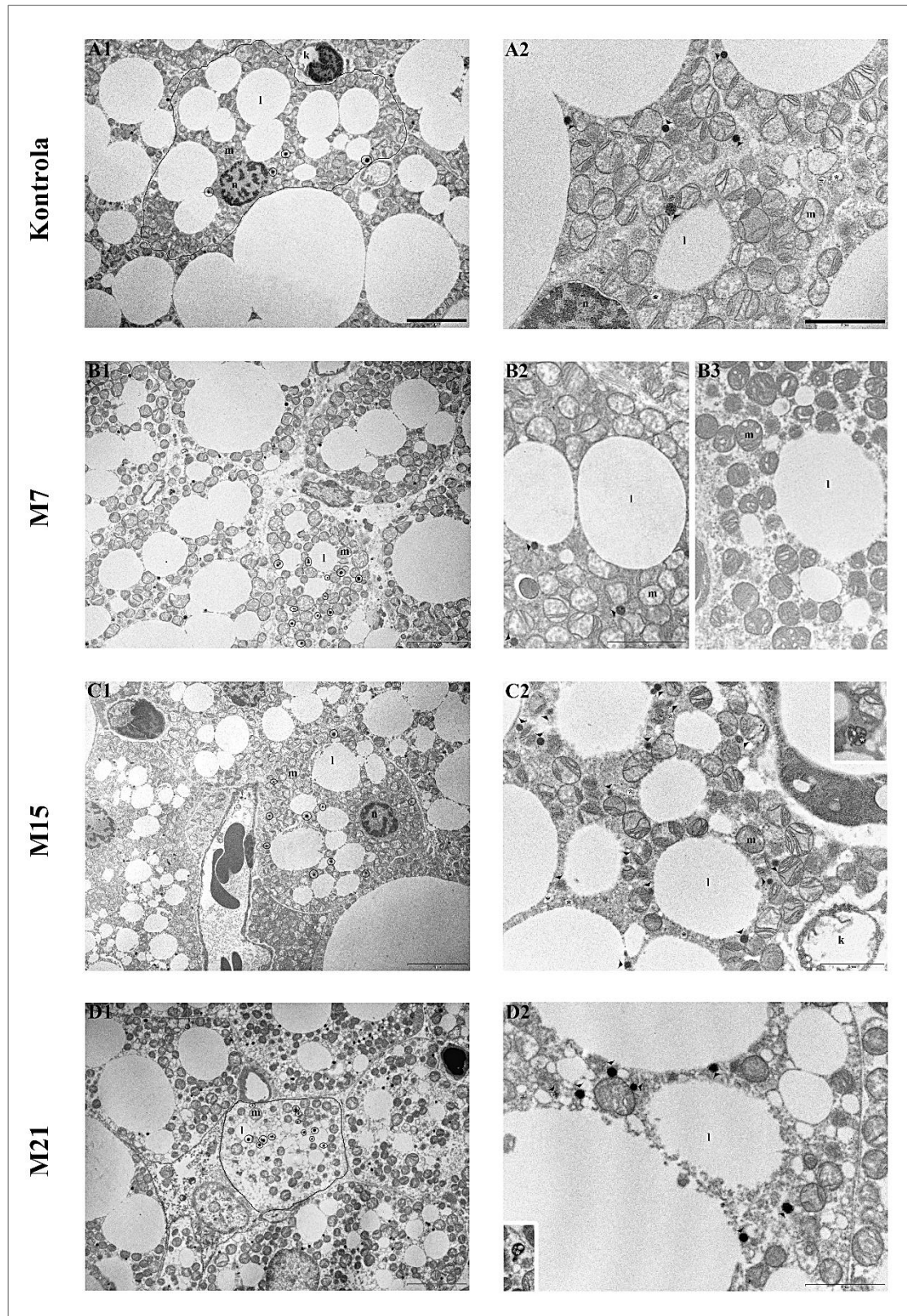
U grupi M21 ćelije su sitne kao i u grupi M15, i pozicionirane su između krupnih adipocita koji liče na adipocite belog masnog tkiva (Slika 3D). Osim što se i ovde uočavaju dve već opisane populacije mrkih adipocita, u ovoj eksperimentalnoj grupi zapaža se i treća populacija koja se po svojim odlikama može nazvati prelaznom između prethodne dve:

- a) Jako tamne ćelije koje se odlikuju sitnim, gusto pakovanim, tamnim mitohondrijama i kod kojih se ne uočavaju peroksizomi;
- b) Svetlije ćelije sa malo krupnijim, gusto pakovanim mitohondrijama i u kojima se uočavaju peroksizomi;
- c) Svetle ćelije sa krupnijim mitohondrijama, lepo raspoređenim u citoplazmi i jasno uočljivim peroksizomima.

Lipidna tela su u ćelijama ove eksperimentalne grupe jako sitna i mnogobrojna, lokalizovana u svim delovima citoplazme. Nukleus zadržava svoje centralno mesto, a

mitohondrije su okrugle, lepo raspoređene u predelu citoplazme oko nukleusa i lipidnih tela, zajedno sa cisternama glER a ne retko i u kontaktu sa njima. Oko mitohondrija zapažene su sitne vezikule koje su iste obojenosti i teksture kao i matriks mitohondrija uz koje su priljubljene. Uočljivo je i prisustvo nekoliko mitohondrija u deobi. U nekim od ćelija zapažaju se i sekundarni lizozomi. Uočena karakteristika pojedinih mrkih adipocita iz ove grupe je dosta citoplazme, odnosno domena bez vidljivih organela. Peroksizomi su u ovoj eksperimentalnoj grupi izrazito brojni, DAB obojeni i lako uočljivi. Lokalizovani su uz lipidna tela, mitohondrije i cisterne glER kao pojedinačne organele ili u grupama i nizovima.

U kontroli i u hipotiroidnim grupama oko svake ćelije na preseku tkiva uočena su najmanje dva kapilara sa membranskim protruzijama endotelskih ćelija koje se pružaju kako ka unutrašnjosti prema lumenu kapilara, tako i ka spoljašnjosti prema ćelijama. Takođe, uočeni su i nervi simpatičkog nervnog sistema, veliki broj mastocita, kao i brojna poprečno presečena kolagena i retikularna vlakna u međućelijskom prostoru.



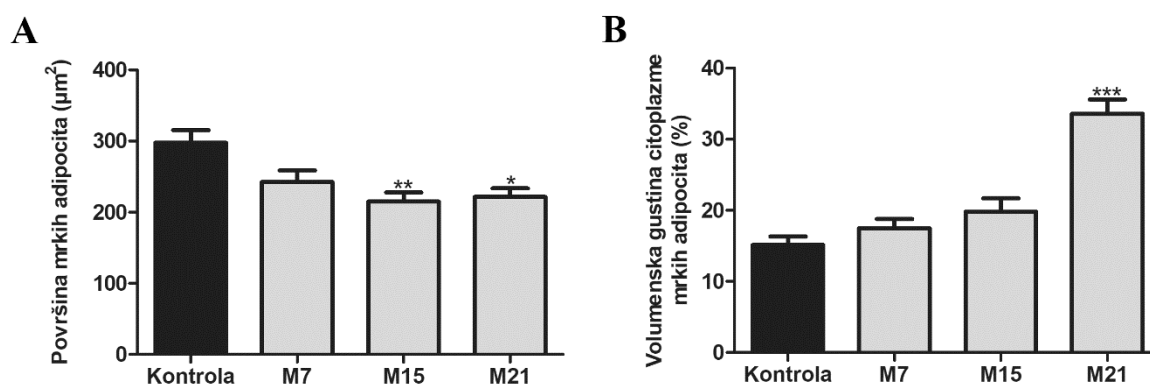
Slika 3. Prikaz ultrastrukture mrkog masnog tkiva i mrkih adipocita. Kontrola (A), grupa M7 (B), grupa M15 (C), grupa M21 (D). Na elektron-mikrografijama jasno se uočava smanjenje površine mrkih adipocita u grupi M21 (D1) u odnosu na kontrolu (A1) – uokvirene ćelije. Takođe, prikazani su tipovi mrkih adipocita u grupi M7 (B2 i B3); kao i povećanje broja peroksizoma po ćeliji sa dužinom tretmana. l, lipidno telo; m, mitohondrija; n, nukleus; elipse (A1-D1) i crne strelice (B2-D2), peroksizomi; crne zvezdice, cisterne glER; bele zvezdice, lizozomi (C2 i D2, inserti). Bar 5 μm (levo), 2 μm (desno).

4.6 Promene na nivou mrkih adipocita

4.6.1 Morfometrijska i stereološka analiza mrkih adipocita

Sve promene zapažene studiranjem ultrastrukturnih promena mrkih adipocita u hipotiroidnim grupama životinja u odnosu na kontrolnu dodatno su kvantifikovane morfometrijski i stereološki.

Površina mrkih adipocita hipotiroidnih grupa u odnosu na kontrolu smanjuje se od petnaestog dana (M15) i ostaje smanjena i u grupi M21 (Grafik 6A). Opadanje površine ćelija praćeno je istosmernim promenama volumenske gustine njihove citoplazme (Grafik 6B).

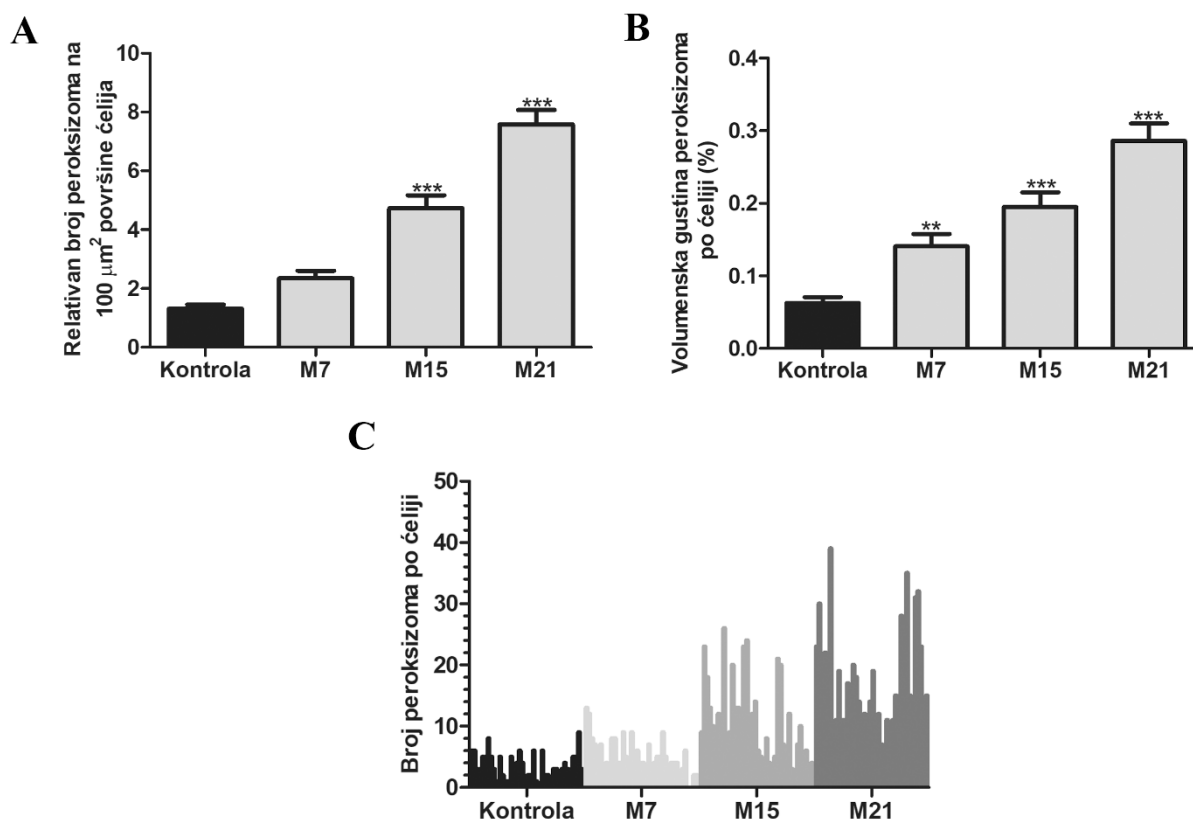


Grafik 6. Promena površine mrkih adipocita i volumenske gustine citoplazme sa dužinom tretmana. Površina mrkih adipocita izražena u μm^2 (A), volumenska gustina citoplazme mrkih adipocita izražena u procentima (B). * poredenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.7 Promene na nivou pojedinačnih organela

4.7.1 Analiza broja i stereološka analiza peroksizoma

U odnosu na kontrolu relativan broj peroksizoma u hipotiroidizmu raste od petnaestog dana (M15) i ostaje na visokom nivou do kraja tretmana (M21) (Grafik 7A). To je praćeno povećanjem volumenske gustine peroksizoma već od sedmog dana (M7) koje se zadržava do kraja tretmana (M21) (Grafik 7B). Međutim, broj peroksizoma u velikoj meri varira između ćelija što dovodi do njihove nejednake distribucije u susednim mrkim adipocitima (Grafik 7C).



Grafik 7. Promene relativnog broja peroksizoma, volumenske gustine peroksizoma i distribucije u mrkim adipocitima. Relativan broj peroksizoma (A), volumenska gustina peroksizoma izražena u procentima (B), distribucija peroksizoma po ćeliji (C). * poređenje sa kontrolnom grupom; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.7.2 Analiza pozicije peroksizoma u ćeliji

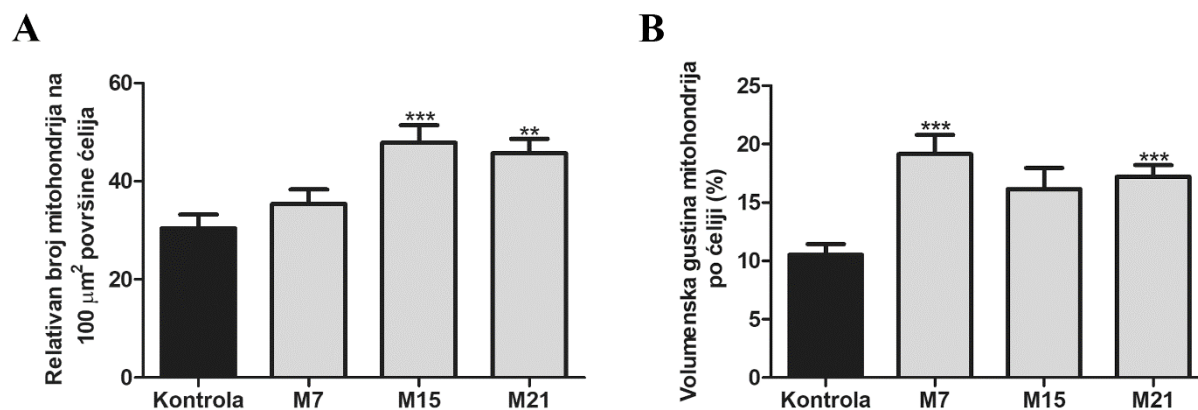
Detaljnijom analizom pozicije peroksizoma u mrkim adipocitima utvrdili smo da je najveći broj peroksizoma lokalizovan uz lipidna tela, potom uz mitohondrije, a zatim kao slobodne organele u citoplazmi. Ovakvo pozicioniranje peroksizoma karakteristično je kako za kontrolu, tako i za hipotiroidne grupe. Hipotiroidizam osim povećavanja broja i volumenske gustine peroksizoma u mrkim adipocitima dovodi do promene u udruživanju sa lipidnim telima i mitohondrijama (Tabela 5).

Tabela 5. Broj peroksizoma pozicioniran uz lipidna tela, mitohondrije i u citoplazmi mrkih adipocita. Date vrednosti u tabeli predstavljaju apsolutne vrednosti broja peroksizoma po ćeliji i po ispitivanoj grupi.

GRUPE	Peroksizomi uz lipidna tela	Peroksizomi uz mitohondrije	Peroksizomi u citoplazmi	Ukupno
K	77	58	10	145
M7	122	60	8	358
M15	216	162	21	744
M21	333	188	129	849
Ukupno	751	468	168	1387

4.7.3 Analiza broja i stereološka analiza mitohondrija

Analiza relativnog broja mitohondrija (Grafik 8A) pokazuje da on raste u hipotiroidizmu u odnosu na kontrolu od petnaestog dana (M15) i zadržava se na visokom nivou do kraja tretmana (M21). Analiza rezultata merenja volumenske gustine mitohondrija (Grafik 8B) pokazuje da ona raste već sedmog dana tretmana (M7), zatim se vraća na kontrolni nivo petnaestog dana (M15), i ponovo raste do kraja tretmana (M21).

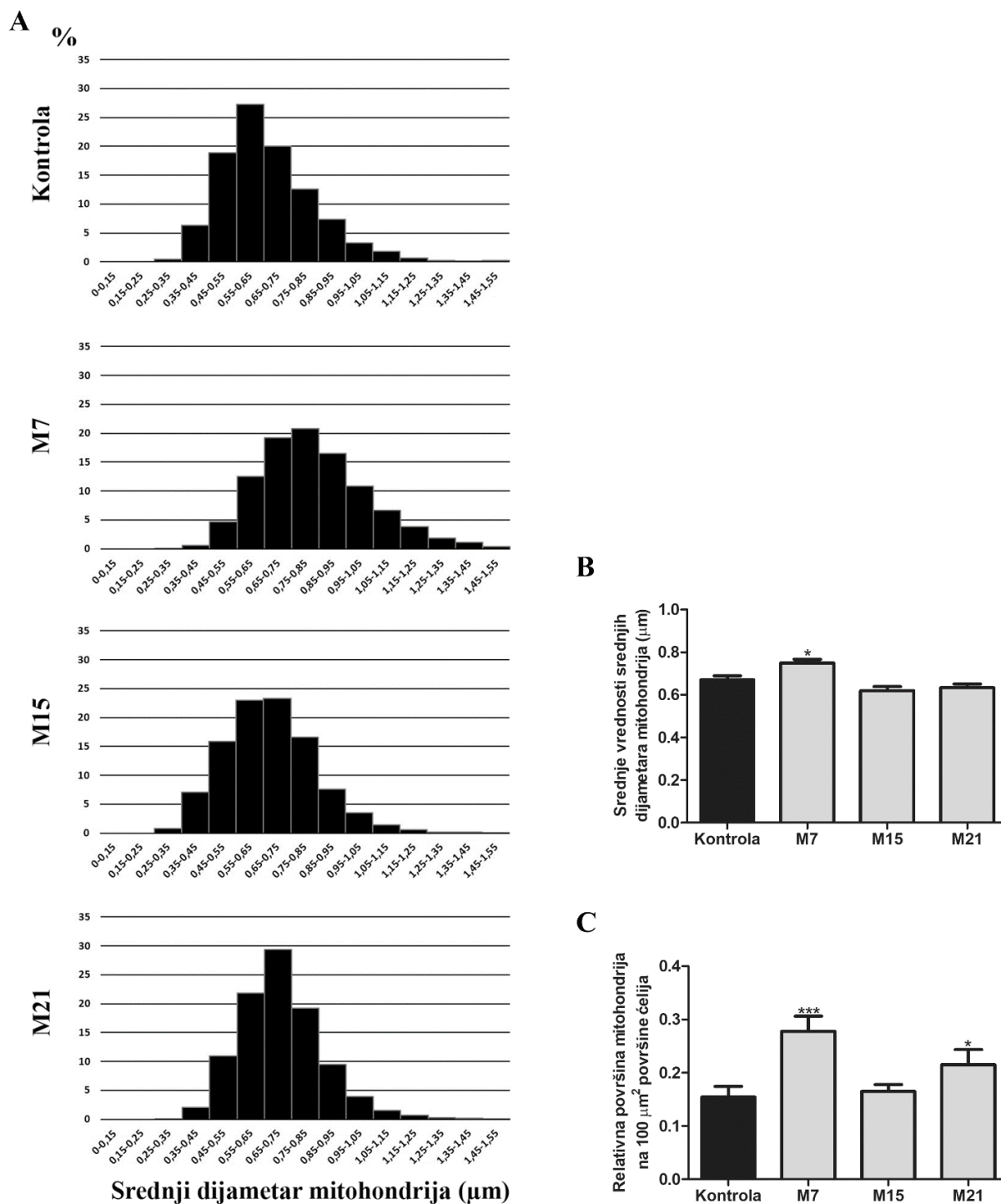


Grafik 8. Promene relativnog broja i volumenske gustine mitohondrija mrkih adipocita. Relativan broj mitohondrija (A), volumenska gustina mitohondrija izražena u procentima (B). * poređenje sa kontrolnom grupom; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.7.4 Morfometrijska analiza mitohondrija

Analiza rezultata merenja srednjeg dijametra mitohondrija (Grafik 9) pokazuje da vrednosti srednjih dijametara mitohondrija na početku tretmana rastu (M7) a zatim se vraću na kontrolni nivo (Grafik 9B). To je praćeno promenom distribucije vrednosti srednjih dijametara mitohondrija koje se u grupi M7 pomeraju ka većoj zastupljenjosti krupnih mitohondrija da bi se zatim u grupi M15 vraćale ka kontrolnom nivou, a u grupi M21 ponovo grupisale ka višim vrednostima (Grafik 9A).

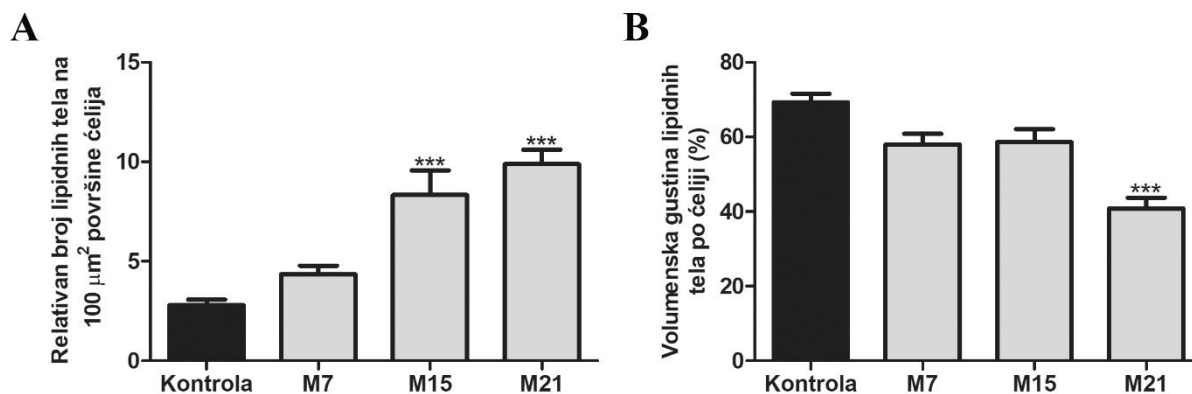
Analiza merenja relativne površine mitohondrija pokazuje da je relativna površina mitohondrija kod eksperimentalnih grupa u porastu u odnosu na kontrolu u grupi M7 i M21 (Grafik 9C), kao potvrda prethodno zapaženih promena.



Grafik 9. Rezultati morfometrijske analize mitohondrija. Promene vrednosti srednjeg dijametara mitohondrija izraženih u µm (A), srednje vrednosti srednjeg dijametara mitohondrija izraženih u µm (B), relativne površine mitohondrija izražene u µm² (C). * poređenje sa kontrolnom grupom; * p < 0.05, *** p < 0.001.

4.7.5 Analiza broja i stereološka analiza lipidnih tela

Naši rezultati pokazuju da u hipotiroidizmu, u odnosu na kontrolu, relativan broj lipidnih tela (Grafik 10A) raste od petnaestog dana (M15) i ostaje visok do kraja tretmana (M21). Za razliku od relativnog broja lipidnih tela njihova volumenska gustina niža je samo u grupi M21 u poređenju sa kontrolnom (Grafik 10B).

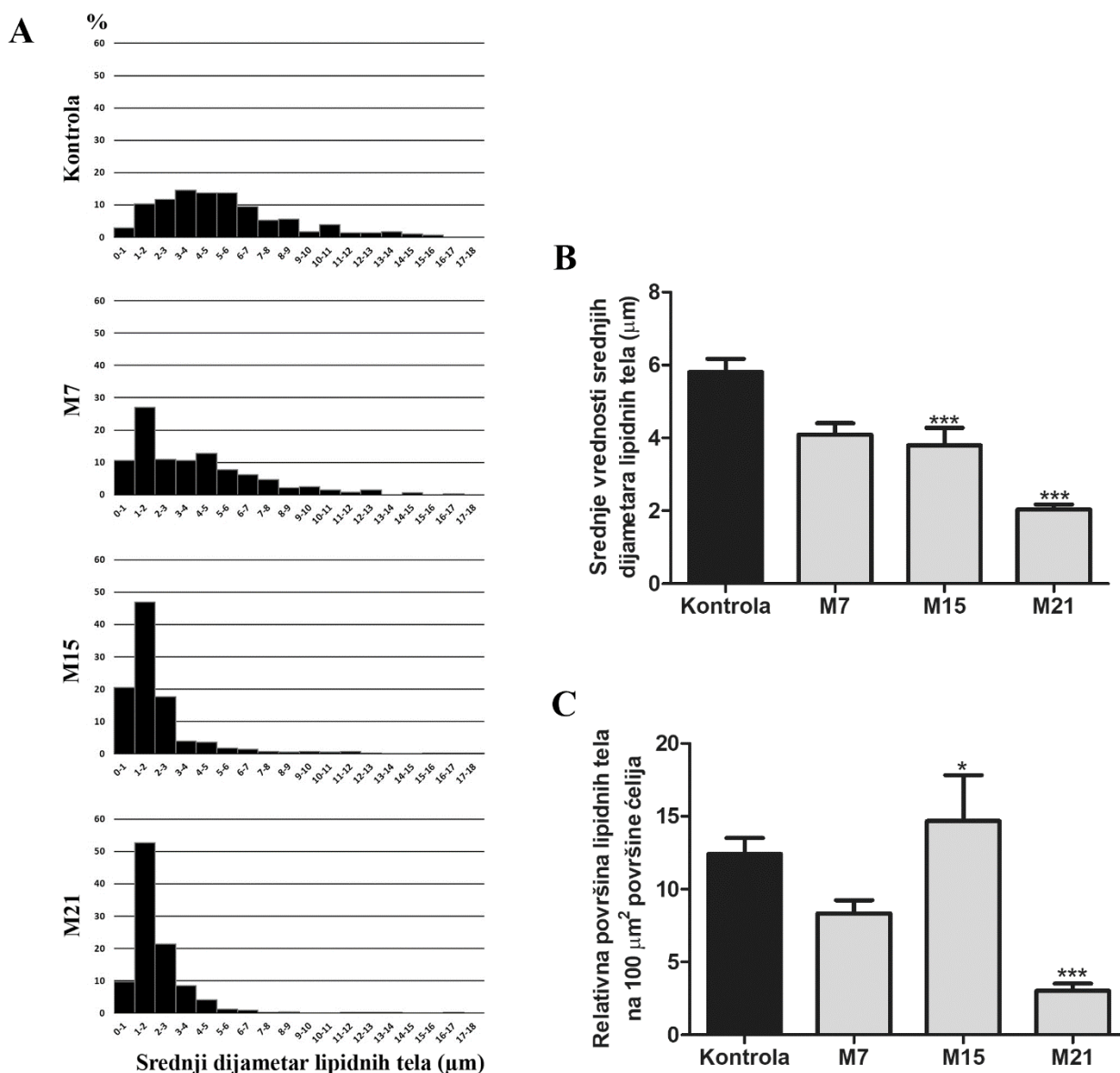


Grafik 10. Promene relativnog broja i volumenske gustine lipidnih tela mrkih adipocita. Relativan broj lipidnih tela izražen na 100 μm^2 površine ćelija (A), volumenska gustina lipidnih tela izražena u procentima (B). * poredenje sa kontrolnom grupom; *** $p < 0.001$.

4.7.6 Morfometrijska analiza lipidnih tela

Srednji dijametar lipidnih tela (Grafik 11B) manji je u grupama M15 i M21 u poređenju sa kontrolom, odnosno, u mrkim adipocitima se pod delovanjem hipotiroidizma povećava broj sitnijih lipidnih tela. Za razliku od njih, u grupi M7 se relativno zadržavaju kontrolne vrednosti (Grafik 11A).

To je u saglasnosti sa rezultatima merenja relativne površine lipidnih tela koji pokazuju porast u grupi M15, a potom pad u grupi M21 u odnosu na kontrolu (Grafik 11C).



Grafik 11. Rezultati morfometrijske analize lipidnih tela. Promene vrednosti srednjeg dijametara lipidnih tela izraženih u μm (A), srednje vrednosti srednjeg dijametara lipidnih tela izraženih u μm (B), relativne površine lipidnih tela izražene u μm^2 (C). * poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

4.7.7 Analiza broja lizozoma

Apsolutan broj lizozoma po ćeliji menja se sa dužinom tretmana. U odnosu na kontrolu, u grupi M7 apsolutan broj lizozoma opada, u grupi M15 ima izrazit porast, dok u grupi M21 ponovo opada (Tabela 6).

Tabela 6. Apsolutan broj lizozoma po ćeliji, po grupi.

GRUPA	Kontrola	M7	M15	M21
BROJ LIZOZOMA	14	8	23	6

4.8 Biogeneza peroksizoma u mrkim adipocitima

4.8.1 Proliferacija peroksizoma indukovana hipotiroidizmom

S obzirom na to da naši prethodni rezultati pokazuju da hipotiroidizam indukuje proliferaciju, zanimalo nas je poreklo, odnosno putevi kojima se njihov broj povećava u mrkim adipocitima. Detaljnom ultrastrukturnom analizom peroksizomalnog pula mrkih adipocita nakon specifičnog DAB bojenja, uočili smo više različitih puteva biogeneze peroksizoma. Takođe, uočili smo i da ti putevi uključuju i druge organele, glER i mitohondrije.

Pre svega, uočili smo veliki broj peroksizoma koji se odlikuju prisustvom kratkih tubularnih produžetaka u vidu peroksizomalnih nosića (Slika 4A, 1-3). Formiranje peroksizomalnih nosića je proces koji prethodi njihovoj elongaciji i konstrikciji, nakon čega nastaju novi peroksizomi po modelu rasta i deobe. Peroksizomi sa nosićima zapaženi su u kontroli i u grupi M7, u kojima su najbrojniji, a lokalizovani su u blizini mitohondrija i lipidnih tela. Karakterišu se tamno obojenim, uglavnom homogenim globularnim delom i nosićem koji nije DAB obojen. U grupi M7 su primećene i brojne strukture u obliku tegova, odnosno mašni (Slika 4A, 4-7). One zapravo predstavljaju deobu peroksizoma na dve organele, sa prisutnim centralnim suženjem. Čerka peroksizom je uglavnom manja od majke i slabije je DAB obojena.

Takođe, u grupi M7 primećene su strukture koje podsećaju na nisku bisera ili nisku perli (Slika 4A, 4-7). Prvi peroksizom u tom nizu je najveći i tamno obojen, dok su ostali peroksizomi od njega manji i slabije DAB obojeni. Pored toga, strukturna asocijacija peroksizoma sa tubulama glER je veoma česta pojava, kako u kontroli tako i u svim hipotiroidnim grupama, ali je najčešća u mrkim adipocitima iz grupe M21. Ova strukturna asocijacija ogleda se u postojanju membranskog mostića koji povezuje membranu peroksizoma sa membranom glER, što svedoči o nastanku peroksizoma *de novo*, pupljenjem sa membrane endoplazminog retikuluma (Slika 4A, 9-14). Takođe, primetili smo strukture slične cvetovima koji sadrže cisterne glER i peroksizom u centru (Slika 4A, 10).

Daljom analizom, uočili smo da su brojni peroksizomi u kontaktu i sa cisternama glER i sa mitohondrijama, čineći tako trijadu organela (Slika 4A, 15-19). Često se između organela uočava membranski mostić koji ukazuje na blisku strukturnu povezanost triju organela, jer se mostić uočava kako između peroksizoma i glER tako i između peroksizoma i mitohondrija. Trijade su uočene u kontroli i svim hipotiroidnim grupama, međutim, njihov broj raste sa dužinom tretmana, tako da su najbrojnije u grupi M21. Ovi rezultati mogu biti dokaz hibridnog porekla novonastalih peroksizoma u mrkim adipocitima, od glER i mitohondrija.

Nadalje, primetili smo peroksizome koji su lokalizovani veoma blizu mitohondrija, a čija je membrana u kontinuitetu sa spoljašnjom mitohondrijskom membranom (Slika 4A, 20-26), odnosno da pupe sa nje (Slika 4A, 25-26). Peroksizomi nastali na ovaj način su takođe DAB obojeni, uočeni su i u kontroli i u svim hipotiroidnim grupama iako nisu česta pojava. One predstavljaju jednomembranske vezikule poreklom od mitohondrija, a čitav fenomen ukazuje na to da i u eutiroidnim i u hipotiroidnim uslovima peroksizomi u mrkim adipocitima mogu nastati i od mitohondrija.

4.8.2 Identifikacija peroksizoma obeležavanjem katalaze imunogoldom

Katalaza je glavni marker peroksizoma. Obeležavanjem CAT imunogoldom želeli smo da utvrdimo da li su sve ove DAB obeležene strukture pozitivne i na katalazu i ako jesu, u kom delu i u kojoj meri. Naši rezultati pokazuju da su peroksizomi sa nosićima pozitivni na CAT samo u svom globularnom delu, koji je takođe i DAB obojen, ali ne i u predelu nosića (Slika 4B, 1-7).

Strukture u obliku mašni, koje ukazuju na deobu peroksizoma na dve nove organele, pozitivne su na CAT u oba svoja globularna dela, kao i u predelu suženja između njih (Slika 4B, 8-12).

Daljom analizom, u mrkim adipocitima su zapažene vrlo neobične izdužene strukture koje su takođe pozitivne na katalazu, pozicionirane uglavnom oko lipidnih tela i u njihovoj neposrednoj blizini, a u kontaktu sa cisternama gLER (Slika 4B, 13-19). Ove strukture se uočavaju petnaestog dana tretmana i jako su brojne, a pored njih uočeni su i peroksizomi koji nastaju pupljenjem sa membrane gLER. Oni su pozitivni na CAT u svom globularnom delu ali ne i u predelu membranskog mostića koji povezuje dve organele (Slika 4B, 18). Sve ove izdužene DAB i CAT pozitivne strukture pripadaju *de novo* putu biogeneze peroksizoma od gLER u mrkim adipocitima.

Obeležavanjem CAT imunogoldom potvrdili smo da su i peroksizomi u sklopu trijada pozitivni na ovaj enzim (Slika 4B, 20-23). Imunopozitivnost na CAT kod ovih peroksizoma uočena je u njihovom globularnom delu, dok su delovi mostića koji peroksizome povezuju sa prestale dve organele u trijadi CAT negativni.

Od izuzetne važnosti je zapažanje i potvrda da su DAB pozitivni peroksizomi koji nastaju pupljenjem sa spoljašnje mitohondrijske membrane takođe pozitivni na CAT u svom glavnom, globularnom delu (Slika 4B, 24-28). Deo membranskog mostića koji obezbeđuje kontinuitet spoljašnje mitohondrijske membrane i peroksizomalne membrane je negativan na CAT. Pored toga, daljom analizom, oko pojedinih mitohondrija primećene su veoma sitne jednomembranske vezikule čiji je matriks po boji i konzistenciji jednak matriksu mitohondrije pored koje su lokalizovane, ali ove vezikule nisu DAB obojene, niti pozitivne na CAT.

Nadalje, pored peroksizoma, imunopozitivna reakcija na CAT lokalizovana je u mitohondrijama i u nukleusu, u kojima je veoma slaba kako u kontroli, tako i u hipotiroidnim grupama. Imunopozitivna reakcija na CAT pojavljuje se i u citoplazmi od petnaestog dana i njen intenzitet raste do kraja tretmana.

Takođe, uočen je i izvestan broj peroksizoma koji su DAB obojeni i CAT negativni koji se javljaju u kontroli i u grupi M15. Pored njih, u mrkim adipocitima, uočene su vezikule oko mitohondrija koje nisu DAB obojene, a CAT pozitivne i javljaju se u grupi M7.

MODEL RASTA I DEOBE

de novo BIOGENEZA

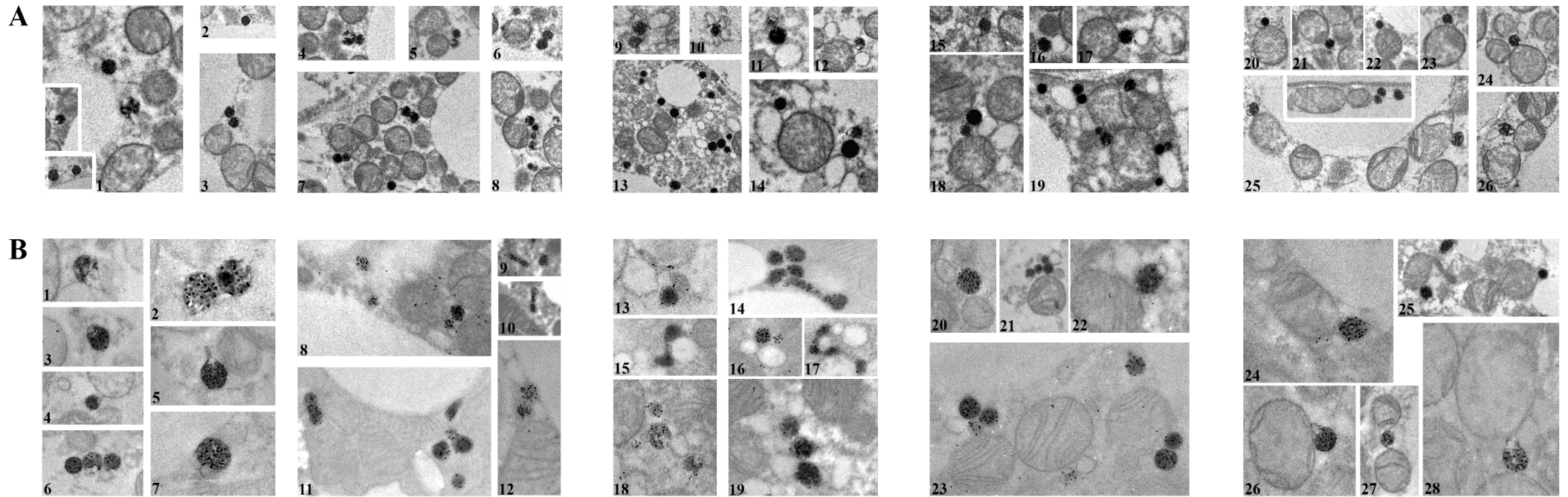
Formiranje nosića

Izduživanje i deoba

Nastanak od ER

ER + mitohondrije

Nastanak od mitohondrija



Slika 4. Proliferacija peroksisoma u mrkom masnom tkivu. DAB obeleženi peroksisomi (A), peroksisomi obeleženi DAB + imunogold na CAT (B). Na figuri je prikazana postupna biogeneza peroksisoma od već postojećih organela u ćeliji po modelu rasta i deobe, kao i *de novo* biogeneza peroksisoma, od pupljenja peroksisoma sa membrane glER, preko hibridnog porekla peroksisoma od glER i mitohondrija – trijade, do nastanka peroksisoma pupljenjem sa spoljašnje mitohondrijske membrane. Uveličanje 17 000x (A) i 22 000x (B).

4.8.3 Zastupljenost peroksizomalnih struktura u mrkim adipocitima

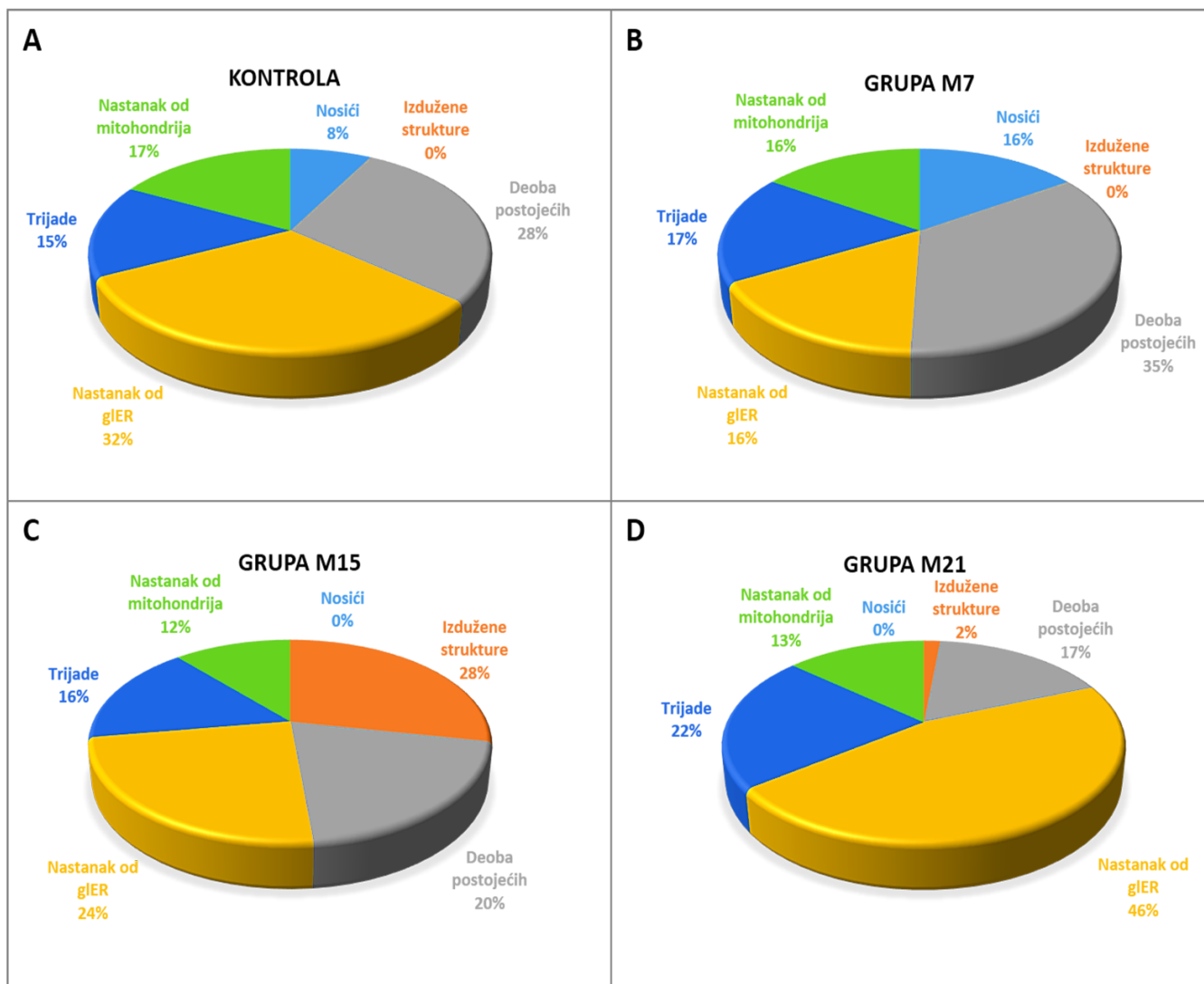
Rezultati analize broja pojedinačnih peroksizomalnih figura koje se uočavaju u mrkim adipocitima pokazuju da su peroksizomalni nosioci prisutni samo u kontroli i u grupi M7, u kojoj su najbrojniji (Slika 5). Pojava raznih izduženih struktura karakteristična je za grupu M15, u kojoj su ove strukture najbrojnije, kao i za grupu M21 u kojoj su one malobrojne, dok se u kontroli i u grupi M7 ne uočavaju.

Nastanak peroksizoma po modelu rasta i deobe, odnosno deobom postojećih organela, kao i strukture u obliku mašni koje odlikuju ovaj put biogeneze peroksizoma dominantni su u grupi M7, u kojoj je broj ovih struktura veći nego u kontroli. Sa dužinom tretmana, broj struktura u obliku mašni opada, kako u odnosu na kontrolu, tako i u odnosu na grupu M7.

Naši rezultati pokazuju da je nastanak peroksizoma pupljenjem sa membrane glER dominantan put *de novo* biogeneze peroksizoma, kako u kontroli, tako i u hipotiroidnim grupama M15 i M21. Ovaj put biogeneze peroksizoma ne dominira jedino u grupi M7, u kojoj primat u biogenezi peroksizoma preuzima deoba već postojećih organela u ćeliji (Slika 5).

Zatim, trijade organela, koje čine mitohondrije, peroksizomi i cisterne glER, a koje su odlika hibridne prirode novonastalih peroksizoma su najbrojnije u grupi M21. Broj trijada u M7 i M15 je na nivou kontrolne grupe.

Takođe, naši rezultati pokazuju da je biogeneza peroksizoma pupljenjem sa spoljašnje mitohondrijske membrane jedan od puteva *de novo* biogeneze peroksizoma koji se javlja i u eutiroidnim i u hipotiroidnim uslovima. Peroksizomi čija je membrana u kontinuitetu sa spoljašnjom mitohondrijskom membranom najbrojniji su u kontroli, a njihov broj je nešto manji u grupama M15 i M21.



Slika 5. Zastupljenost peroksizomalnih figura u mrkim adipocitima. Kontrola (A), grupa M7 (B), grupa M15 (C), grupa M21 (D). Broj pojedinačnih struktura izražen je u procentima. Nosići – peroksizomalni nosići; izdužene strukture – brojne izdužene strukture; deoba postojećih – deoba postojećih peroksizoma u ćeliji, odnosno strukture u obliku mašni; nastanak od glER – nastanak peroksizoma pupljenjem sa membrane glER; trijade – strukturna asocijacija peroksizoma, mitohondrija i cisterni glER; nastanak od mitohondrija – peroksizomi čija je membrana u kontinuitetu sa spoljašnjom mitohondrijskom membranom.

4.9 Proteinska ekspresija molekularnih igrača biogeneze i sazrevanja peroksizoma

U cilju rastvetljavanja događaja na molekularskom nivou koji leže u osnovi procesa biogeneze peroksizoma analizirali smo proteinsku ekspresiju glavnih peroksizomskih markera koji učestvuju u sticanju kako morfoloških, tako i funkcijskih kompetencija peroksizoma: deoba peroksizoma (Pex11 β), *de novo* biogeneza peroksizoma (Pex16 i Pex19) i sazrevanje peroksizoma (Pex16, Pex19, PMP70, Pex5, Pex13, Pex26, Pex6) (Slika 6).

Naši rezultati pokazuju da je ekspresije Pex11 β , peroksina odgovornog za deobu peroksizoma, u poređenju sa kontrolom značajno povišena već od sedmog dana (M7) i zadržava se na tako visokom nivou do kraja tretmana (M21) (Slika 6A).

Proteinska ekspresija Pex19, solubilnog šaperona odgovornog za vezivanje i transport peroksizomskih membranskih proteina, u poređenju sa kontrolom povišena je petnaestog dana (M15) i ostaje povišena do kraja tretmana (M21) (Slika 6B).

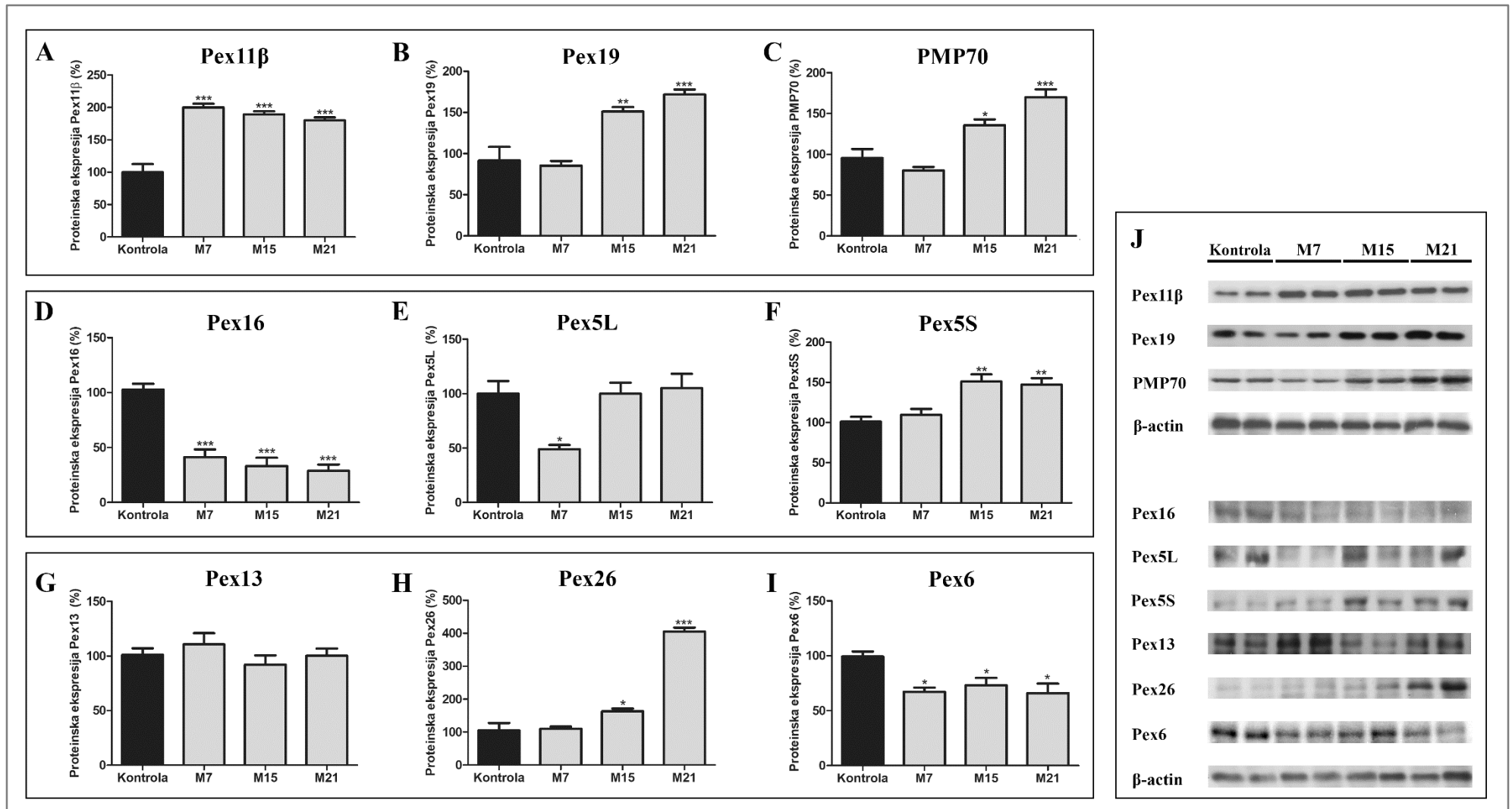
Nadalje, ekspresija Pex16, peroksizomskog membranskog proteina koji funkcioniše kao glavni peroksin odgovoran za ugrađivanje drugih peroksina u membranu peroksizoma, značajno je snižena već u grupi M7 i zadržava se na tako niskom nivou do kraja tretmana (M21) (Slika 6D).

U poređenju sa kontrolom, ekspresija PMP70, peroksizomskog membranskog transportera za masne kiseline dugog lanca, povišena je od petnaestog dana (M15) i zadržava se na tako visokom nivou do kraja tretmana (M21) (Slika 6C).

Peroksin Pex5 je takođe solubilni šaperon, ali je odgovoran za vezivanje, stabilizaciju i unos peroksizomskih matriksnih proteina. Postoje dve izoforme ovog peroksina: Pex5L (duga izoforma) koji prepoznaje PTS1 i PTS2, i Pex5S (skraćena izoforma) koji prepoznaje samo PTS1 signalne sekvence peroksizomskih matriksnih proteina. Naši rezultati pokazuju da je proteinska ekspresija Pex5L u poređenju sa kontrolom značajno snižena sedmog dana (M7) tretmana, a potom se vraća na kontrolni nivo (Slika 6E). Suprotno tome, proteinska ekspresija Pex5S se ne menja sedmog dana (M7), a zatim raste od 15 dana (M15) do kraja tretmana (M21) (Slika 6F).

Ekspresija Pex13, peroksizomskog membranskog transportera koji ima ulogu u transportu peroksizomskih matriksnih proteina kroz membranu peroksizoma, u odnosu na kontrolu, u hipotiroidnim grupama ostaje nepromenjen (Slika 6G).

Nakon unosa peroksizomskih matriksnih proteina, recikliranje receptora je neophodan korak. Glavni molekularni igrači u procesu recikliranja receptora su Pex26 i Pex6. Ekspresija Pex26, u poređenju sa kontrolom, povišena je od petnaestog dana (M15) i ostaje na visokom nivou do kraja tretmana (M21) (Slika 6H). Međutim, ekspresija Pex6 značajno je snižena već od sedmog dana (M7) i ostaje na niskom nivou do kraja tretmana (M21) (Slika 6I).

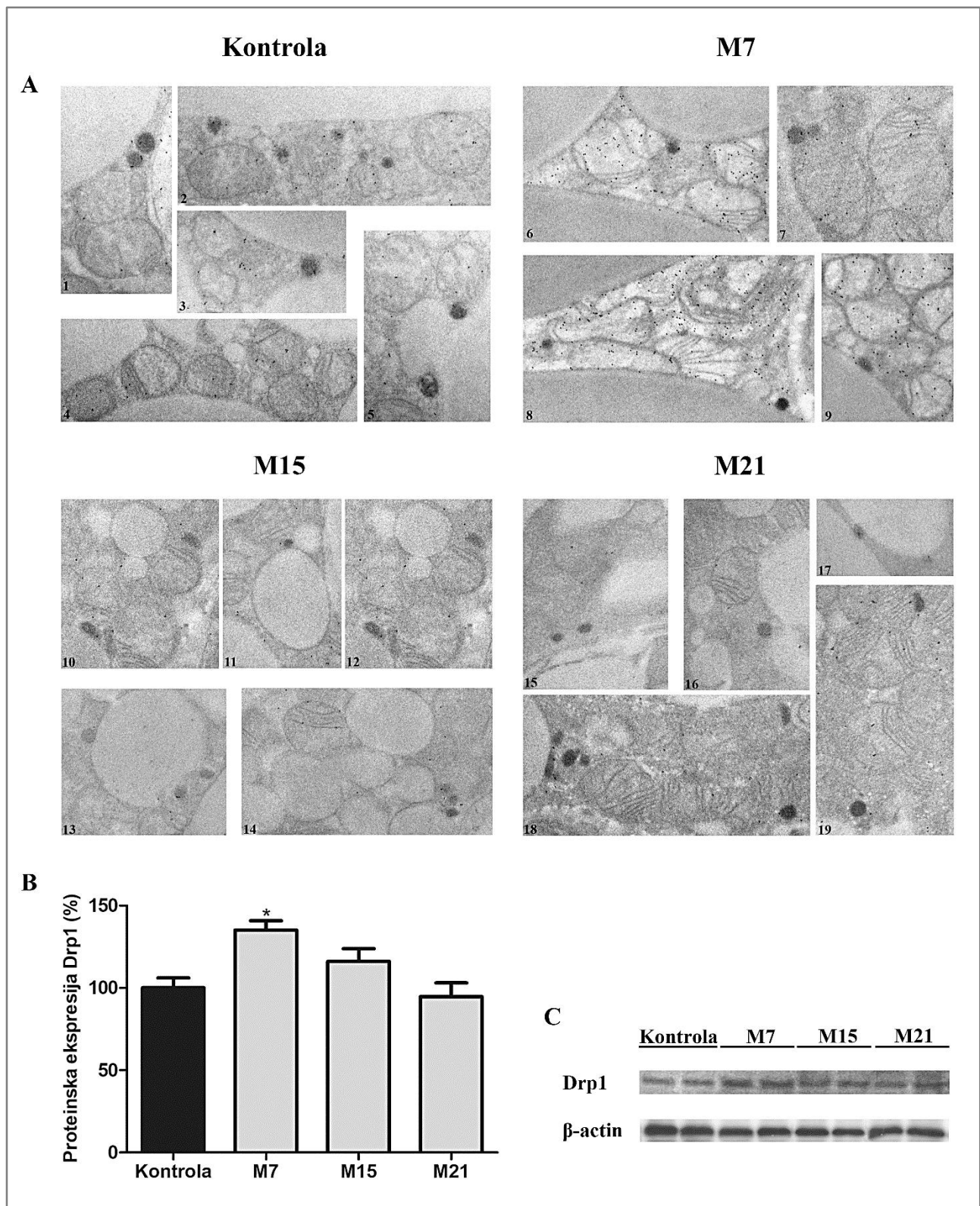


Slika 6. Promena ekspresije proteina koji čine molekulska osnovu procesa biogeneze i sazrevanja peroksizoma. Pex11β (A), Pex19 (B), PMP70 (C), Pex16 (D), Pex5L (E), Pex5S (F), Pex13 (G), Pex26 (H), Pex6(I), slike reprezentativnih traka iz tri nezavisna eksperimenta (J). Vrednosti ekspresije proteina su izražene u procentima. * poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.10 Proteinska ekspresija i imunolokalizacija Drp1, zajedničkog molekuskog igrača u deobi mitohondrija i peroksizoma

Pored Pex11 β , jedan od glavnih učesnika u deobi peroksizoma je Drp1 i kao takav, zajednički je molekulski igrač u deobi mitohondrija i peroksizoma. Analiza rezultata ekspresije Drp1 pokazuje da je nivo ovog proteina u poređenju sa kontrolom značajno viši sedmog dana (M7) tretmana, a potom se vraća na kontrolni (Slika 7B).

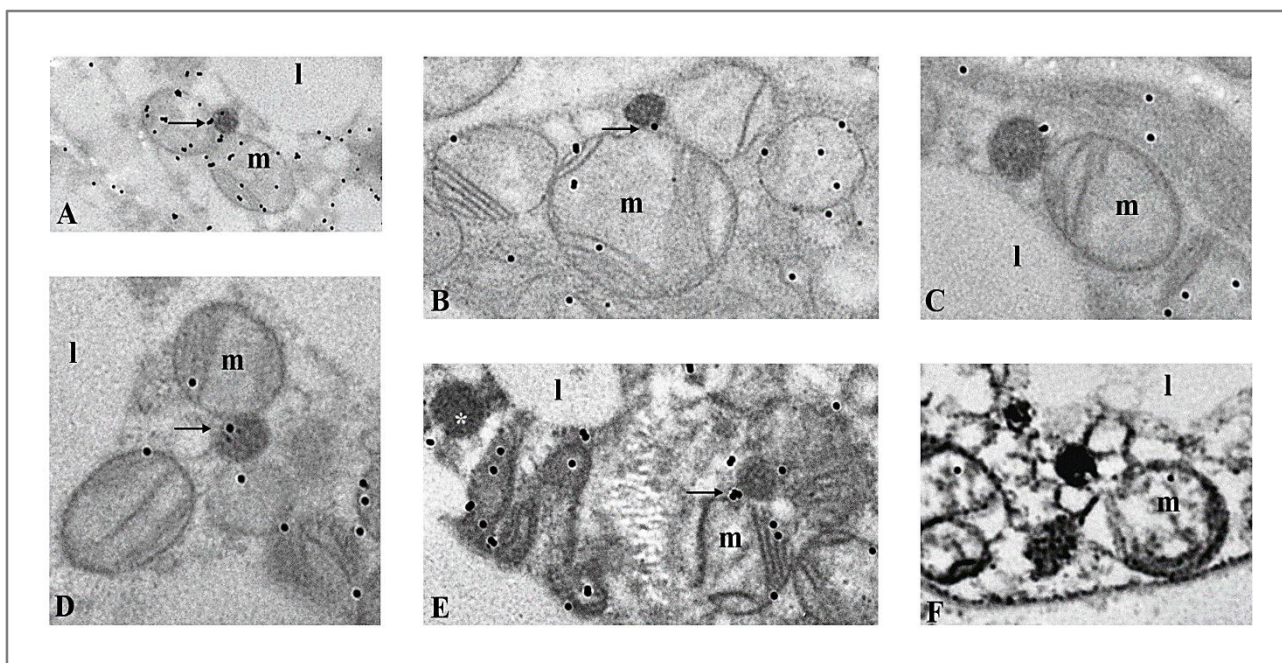
Obeležavanjem Drp1 imunogoldom (Slika 7A) pokazali smo njegovu lokalizaciju na spoljašnjoj membrani mitohondrija, na kristama mitohondrija i na membrani pojedinih peroksizoma. Kada je peroksizomalna lokalizacija u pitanju, zapaženo je da je uglavnom više partikula zlata grupisano i lokalizovano u nizu, jedna do druge, na membrani organele. U poređenju sa kontrolnom grupom intenzitet imunocitohemijske reakcije je najviši u grupi M7 (Slika 7A, 6-9), a potom se vraća na nivo kontrole (Slika 7A, 15-19).



Slika 7. Promena proteinske ekspresije i imunogold obeležavanje Drp1. Imunocitohemisjka lokalizacija Drp1 u mrkim adipocitima (A): kontrolna grupa (A1-5), grupa M7 (A6-9), grupa M15 (A10-14), grupa M21 (A15-19), proteinska ekspresija Drp1 izražena u procentima (B), slike reprezentivnih traka iz tri nezavisna eksperimenta (C). Uveličanje je 17 000x za sve elektron mikrofografije. * poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0.05$.

4.10.1 Mitohondrijsko poreklo peroksizoma- imunogold obeležavanje VDAC1

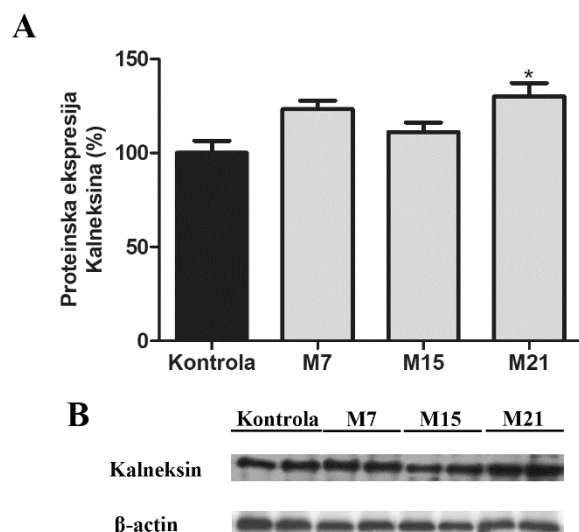
Imunogold obeležavanjem VDAC1, voltažno zavisnog anjonskog kanala koji je primarno mitohondrijski protein, pokazali smo njegovu lokalizaciju na: ćelijskoj membrani, spoljašnjoj membrani mitohondrija, kristama mitohondrija, membrani pojedinih peroksizoma (Slika 8). Posebno je zanimljiva činjenica da su neki tamniji peroksizomi (izrazito DAB obojeni) imunopozitivni na VDAC1, dok svetliji peroksizomi (slabije DAB obojeni) nisu imunopozitivni na ovaj protein. Pored toga, VDAC1 pozitivni peroksizomi su lokalizovani uglavnom u blizini mitohondrija ili u bliskom kontaktu sa njima. Takođe, veoma zanimljiva činjenica je zapaženo prisustvo imunopozitivne reakcije baš na mestu kontakta spoljašnje mitohondrijske i peroksizomalne membrane (strelice). Pored tamno DAB obojenih peroksizoma koji su imunopozitivni na VDAC1, uočeni su pojedini koji su negativni na prisustvo ovog proteina (Slika 8E, zvezdica). Razlika u intenzitetu imunopozitivnosti između kontrole i hipotiroidnih grupa nije primećena.



Slika 8. Reprezentativne fotografije imunogold obeležavanja VDAC1. Peroksizomi koji su imunopozitivni na VDAC1 lokalizovani su uglavnom u blizini mitohondrija ili u bliskom kontaktu sa njima. Strelice pokazuju prisustvo imunopozitivne reakcije na mestima kontakta spoljašnje mitohondrijske membrane i peroksizomalne membrane (A, B, D, E). l, lipidna tela; m, mitohondrije; zvezdica, tamno obojen peroksizom koji nije imunopozitivan na VDAC1. Uveličanje je 17 000x za sve elektron mikrofografije.

4.11 Analiza učesća gLER u biogenezi peroksizoma

Ekspresije kalneksina, markera gLER, značajno je povišena tek dvadeset prvog dana (M21) tretmana, dok u grupama M7 i M15 nema promene u poređenju sa kontrolom (Slika 9).

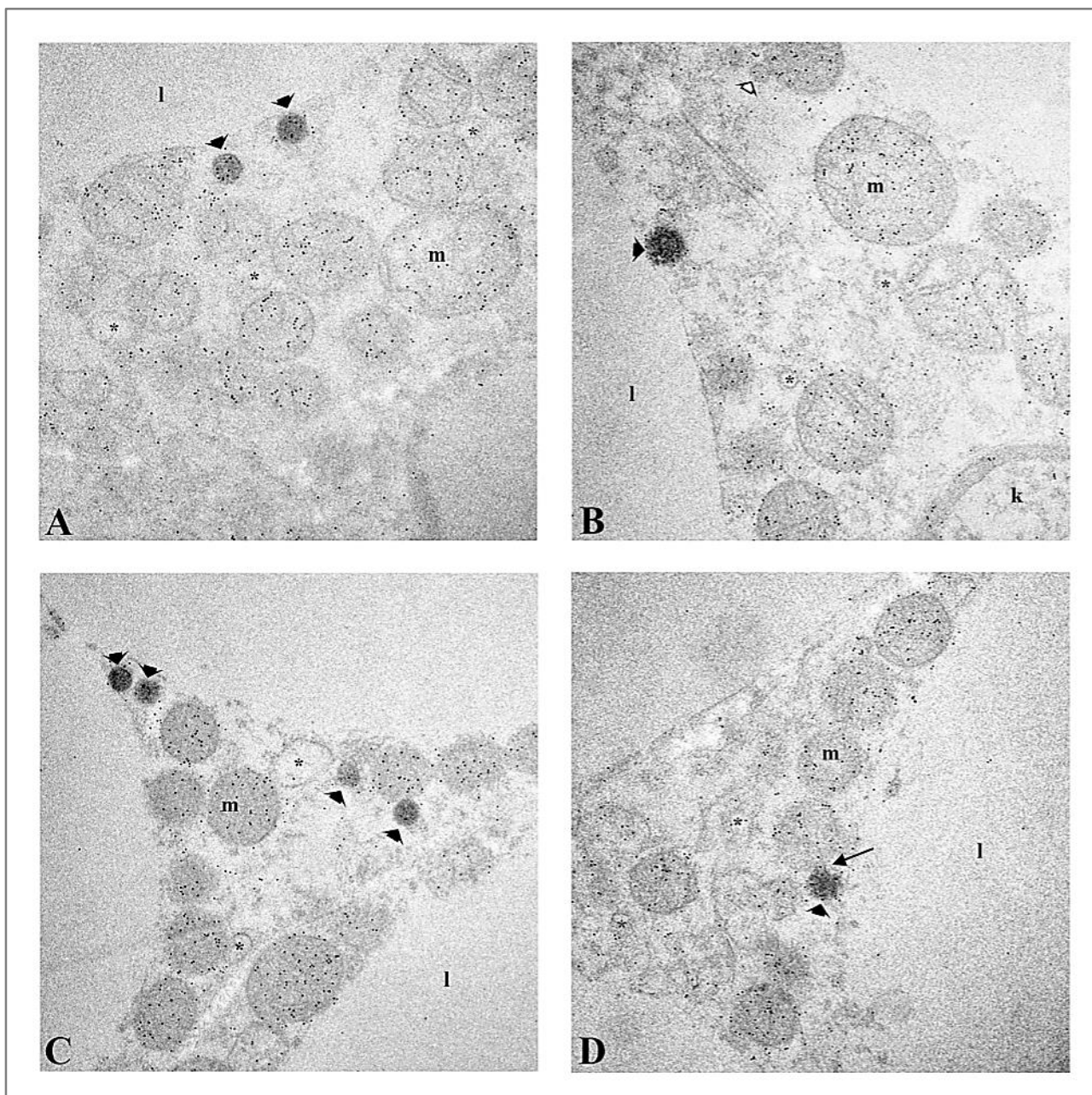


Slika 9. Promena proteinske ekspresije kalneksina (A), slike reprezentativnih traka iz tri nezavisna eksperimenta (B). Vrednosti ekspresije proteina su izražene u procentima. * poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0.05$.

4.12 Analiza stepena zrelosti peroksizoma

4.12.1 Imunogold obeležavanje Pex16

Pex16 je peroksizomalni membranski protein odgovoran za ugradnju drugih peroksina u membranu peroksizoma što ga čini jednim od glavnih proteina koji učestvuju u strukturnom sazrevanju peroksizoma. Rezultati analize obeležavanja ovog peroksina imunogoldom na presecima BAT pokazuju njegovu lokalizaciju na membrani peroksizoma, ali i u njihovom matriksu (Slika 10). Od izuzetne važnosti je prisustvo imunopozitivne reakcije u oblasti membranskog mostića, koji spaja peroksizom sa mitohondrijom i to tako da obezbeđuje kontinuitet spoljašnje mitohondrijske i peroksizomalne membrane (Slika 10D). Potom, imunopozitivna reakcija uočava se na spoljašnjoj i na unutrašnjoj membrani mitohondrija. Veoma je zanimljiva pojava pozicioniranja partikula zlata u nizu na kristama mitohondrija (Slika 10A). Imunopozitivna reakcija na Pex16 uočava se čak i u malim vezikulama lokalizovanim oko pojedinih mitohondrija (Slika 10B). Pex16 je takođe sporadično lokalizovan u citoplazmi i na membrani pojedinih cisterni glER (Slika 10C i D). Imunopozitivna reakcija zapažena je i u nukleusima mrkih adipocita, kao i u eritrocitima krvnih kapilara.



Slika 10. Obeležavanje peroksina Pex16 imunogoldom na presecima mrkog masnog tkiva, reprezentativne elektron mikrografije, grupa M21. l, lipidna tela; m, mitohondrije; zvezdice, cisterne gLER; crna glava strelice, peroksizomi; bela glava strelice, vezikule oko mitohondrija imunopozitivne na Pex16; strelica, imunopozitivna reakcija u oblasti membranskog mostića koji spaja peroksizom sa mitohondrijom. Uveličanje 17 000x za sve elektron mikrografije.

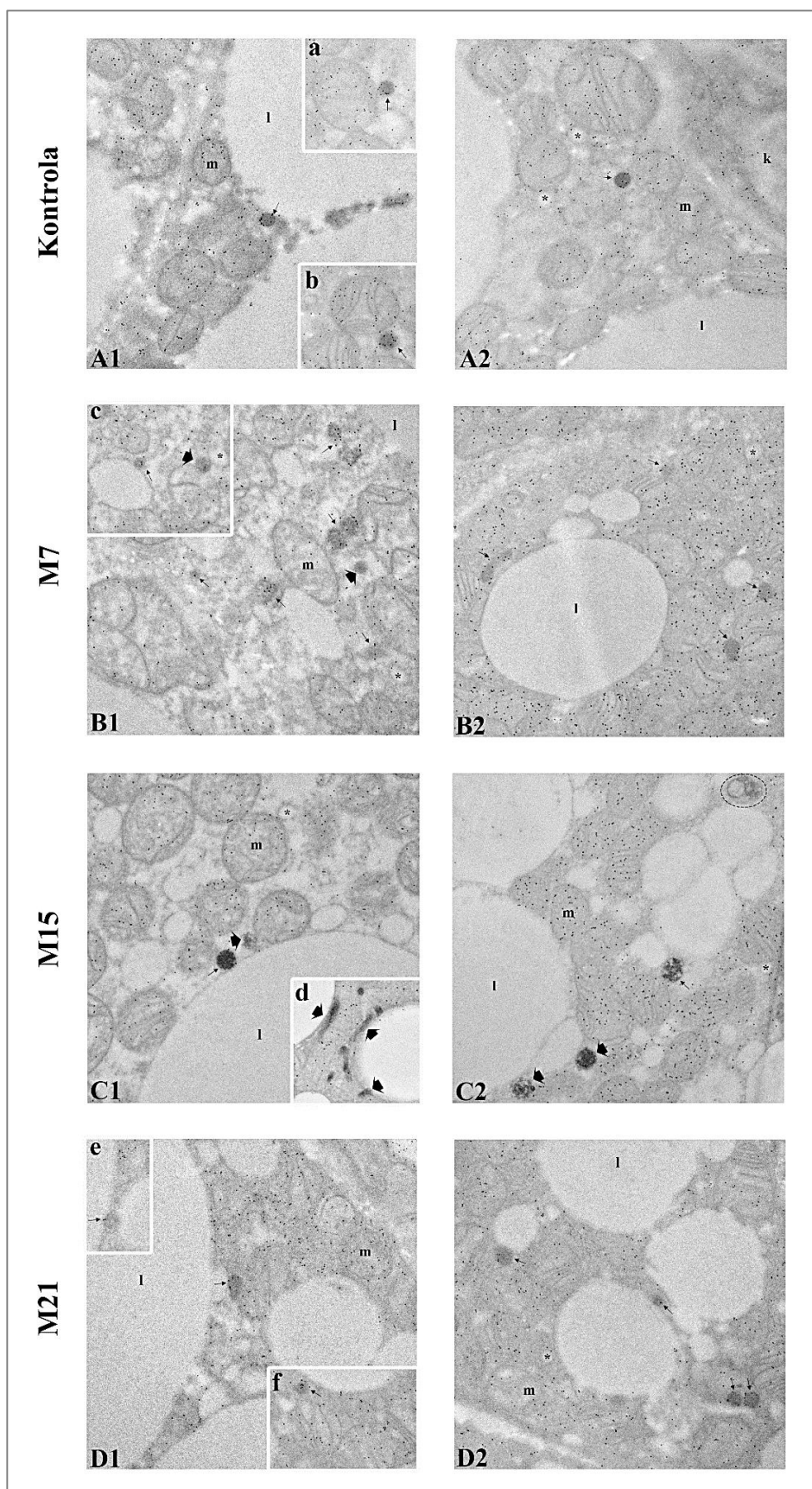
4.12.2 Imunogold obeležavanje PMP70

Uloga peroksizomalnog membranskog proteina PMP70 je transport nezasićenih masnih kiselina dugog lanca, granatih masnih kiselina i dikarboksilnih masnih kiselina za oksidaciju iz citoplazme u matriks peroksizoma. Stoga je prisustvo PMP70 na membrani peroksizoma još jedan od parametara koji ukazuje na stepen strukturne i funkcijske zrelosti peroksizoma.

Analiza rezultata obeležavanja ovog peroksina imunogoldom pokazuje prisustvo PMP70 na membrani peroksizoma, na spoljašnjoj i posebno na unutrašnjoj membrani mitohondrija,

kao i na membrani pojedinih cisterni glER (Slika 11). U kontrolnoj grupi, imunopozitivna reakcija uočava se u vidu partikula zlata koje su u nizu, jedna do druge, poređane na membrani peroksizoma. Imunopozitivna reakcija u ovoj grupi uočava se na membrani svih peroksizoma u ćelijama, tako da nema peroksizoma koji nije imunopozitivan na PMP70 (Slika 11A, 1 i 2). U grupi M7, imunopozitivna reakcija uočava se na membrani velikog broja peroksizoma i na membranama mitohondrija (Slika 11B, 1 i 2). Međutim, pojedini peroksizomi u ovoj grupi nisu imunopozitivni na PMP70 (Slika 11B, 1 i insert c, glava strelice). U grupi M15 primećen je veliki broj peroksizoma koji nisu imunopozitivni na PMP70 (Slika 11C, 1 i 2, glava strelice). Odustvo imunopozitivnosti na ovaj peroksin posebno je karakteristično za brojne izdužene strukture koje se javljaju u ovoj grupi, u kojoj su i najbrojnije (Slika 11C, 1 insert d, glava strelice). Za razliku od velikog broja peroksizoma, spoljašnja i unutrašnja membrana peroksizoma, u ovoj grupi, su imunopozitivne na PMP70 (Slika 11C, 2). Imunopozitivna reakcija na mitohondrijama uočava se u vidu partikula zlata poređanih u nizu duž kristi mitohondrija. U grupi M21 svi uočeni peroksizomi su imunopozitivni na PMP70 (Slika 11D, 1 i 2), a imunopozitivna reakcija je izrazita na membrani peroksizoma. U ovoj grupi je posebno zanimljivo uočeno prisustvo imunopozitivne reakcije na membrani peroksizoma, na mestu kontakta sa lipidnim telom (Slika 11D, 1 i insert e, strelice). Što se mitohondrija tiče, u ovoj grupi imunopozitivna reakcija je intenzivnija na njihovoj spoljašnjoj membrani, gde se uočava u vidu partikula zlata organizovanih u niz ili u krug (Slika 11D, 1 insert f i 2).

Razlika u intenzitetu imunopozitivnosti na PMP70 u hipotiroidnim grupama u odnosu na kontrolu nije primećena.



Slika 11. Obeležavanje peroksina PMP70 imunogoldom na presjecima mrkog masnog tkiva. Kontrola (A1-2), grupa M7 (B1-2), grupa M15 (C1-2), grupa M21 (D1-2). l, lipidna tela; m, mitohondrije; zvezdice, cisterne glER; crna glava strelice, peroksizomi koji nisu imunopozitivni na PMP70; strelica, peroksizomi imunopozitivni na PMP70; elipsa na slici C2, sekundarni lizozom. Veličina partikula zlata 10 nm, uveličanje 17 000x za sve elektron mikrofografije.

4.12.3 Imunogold obeležavanje CAT

Stepen zrelosti peroksizoma je direktno proporcionalan stepenu njihove funkcije, a glavni marker zrelosti peroksizoma je katalaza. DAB bojenje i imunogold obeležavanje katalaze u peroksizomima mrkih adipocita su nam omogućili da indirektno odredimo stepen zrelosti, a time i stepen funkcije novonastalih peroksizoma (Slika 12).

Analiza elektron mikrografija iz kontrolne grupe pokazuje da je najveći broj peroksizoma u ovoj grupi pravilnog, globularnog oblika, različitih dimenzija, različitog intenziteta DAB obojenosti i sa visokom imunopozitivnošću na CAT i to uglavnom u centralnom matriksnom delu (Slika 12, 1-4). Peroksizome koji su slabije DAB obojeni karakteriše niži stepen imunopozitivnosti na CAT, dok peroksizome koji su intenzivnije DAB obojeni karakteriše viši stepen imunopozitivnosti na CAT (Slika 12, 1-4). Oblasti peroksizomalnih nosića, kao što je već rečeno, nisu DAB obojene, a ni imunopozitivne na CAT (Slika 12, 3). Isti obrazac obojenosti i imunopozitivnosti primećujemo i u oblasti membranskih mostića (Slika 12, 2 i 4).

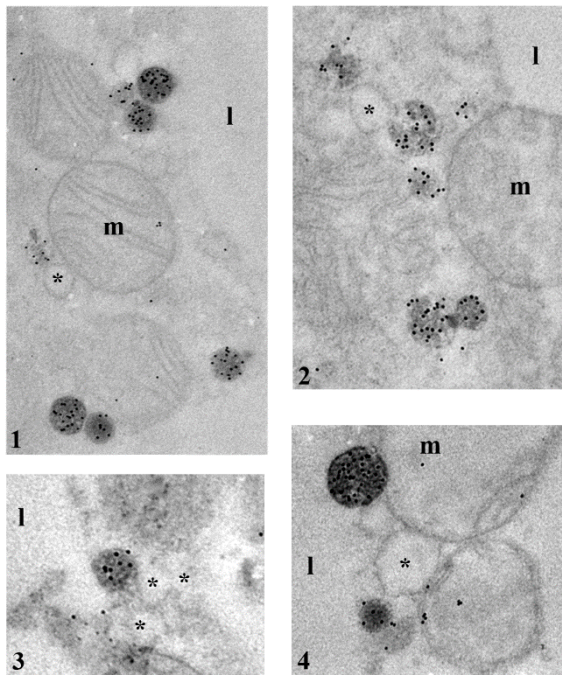
Analiza elektron mikrografija iz grupe M7 pokazuje da su peroksizomi u ovoj hipotiroidnoj grupi slabije DAB obojeni, ali ih odlikuje visok stepen imunopozitivnosti na CAT (Slika 12, 5-7). Uglavnom su globularnog oblika, mada se kod pojedinih peroksizoma peroksizomalna membrana jasno ne uočava pa je teško odrediti njihov oblik (Slika 12, 5).

Analizom elektron mikrografija iz grupe M15 uočili smo veliki broj izduženih struktura koje možemo definisati kao peroksizomalne strukture nastale od cisterni gLER (Slika 12, 8-12). Pored ranije pomenutih kašikastih i kobasičastih struktura (Videti 4.8.2), u grupi M15 uočene su brojne, veoma izdužene, strukture koje su imunopozitivne na CAT, ali uglavnom slabije DAB obojene (Slika 12; 9, 11, 12). Ove strukture su najčešće lokalizovane oko lipidnih tela, a često pozicionirane jedna uz drugu, dok se pojedine čak i granaju. Neke od njih su imunopozitivne na CAT samo u svom početnom, globularnom delu, dok je tubularni deo strukture CAT negativan (Slika 12; 12). U ovoj hipotiroidnoj grupi najintenzivnije DAB obojeni jesu pravi, globularni peroksizomi kod kojih je intenzitet imunopozitivnosti na CAT najviši (Slika 12; 8).

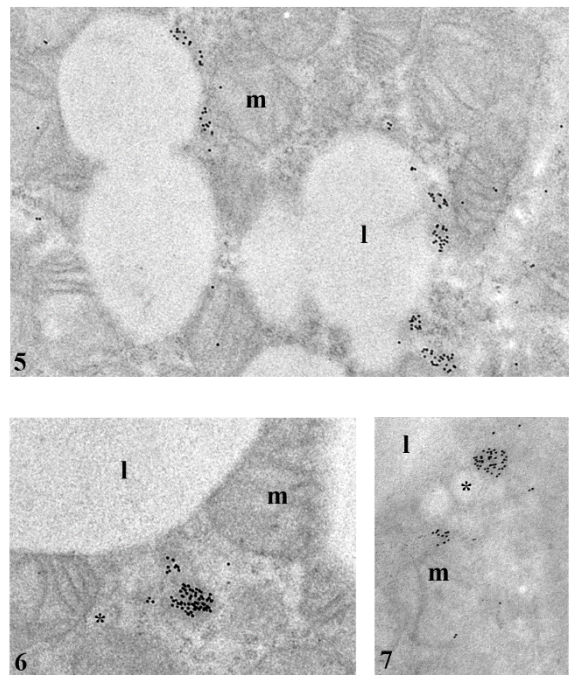
Analizom elektron mikrografija iz grupe M21 zapazili smo strukture koje liče na nisku bisera (Slika 12, 13-15). One zapravo predstavljaju peroksizome nastale od cisterni gLER koji još uvek nisu potpuno odvojeni (ili bar većina njih nije), pa se uočavaju kao pozicionirani svi u jednoj liniji (Slika 12; 13 i 15). Ovakve strukture su lokalizovane u blizini lipidnih tela i u bliskom kontaktu sa mitohondrijama mrkih adipocita. Intenzitet DAB obojenosti peroksizoma u okviru ovih struktura je nizak, a stepen imunopozitivnosti na CAT je takođe niži.

Veoma zanimljiva činjenica je da intenzitet imunopozitivne reakcije na CAT raste sa dužinom tretmana, u poređenju sa kontrolnom grupom. Stepenn imunopozitivnosti na CAT zavisi od eksperimentalne grupe, kao i od puta biogeneze peroksizoma. Najviši stepen imunopozitivnosti uočen je u pravim, globularnim, pojedinačnim peroksizomima. Nešto niži stepen imunopozitivnosti uočen je u veoma izduženim peroksizomalnim strukturama koje nastaju od cisterni gLER, a koje su negativne u svojim krajnjim, užim delovima. Takođe niži stepen imunopozitivnosti odlikuje i peroksizome koji se uočavaju u grupi M21 kao niske bisera. Najniži stepen imunopozitivnosti uočava se u kontrolnoj grupi u pojedinim peroksizomima nastalim pupljenjem sa membrane gLER koji su veoma slabo DAB obojeni. Svakako veoma zanimljiva pojava je odsustvo imunopozitivne reakcije na CAT kod peroksizoma koji su DAB obojeni, a koji se uočavaju u kontroli i u grupi M15. Stepenn imunopozitivnosti na CAT direktno je proporcionalan stepenu kako strukturne, tako i funkcijske zrelosti peroksizoma.

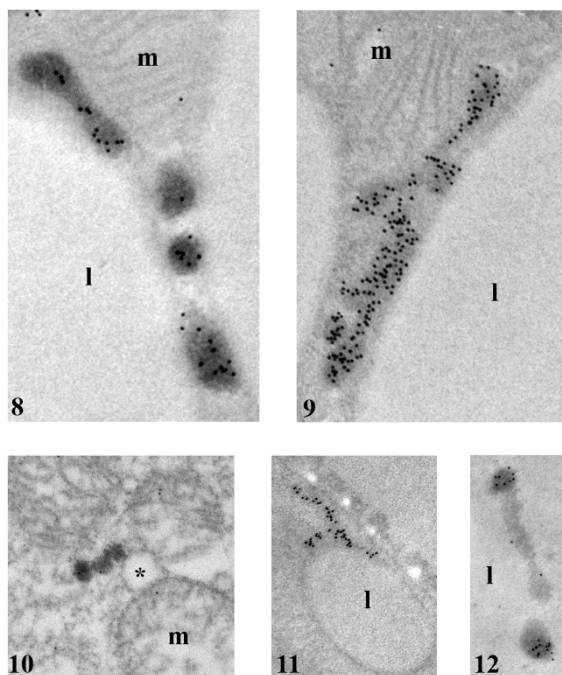
Kontrola



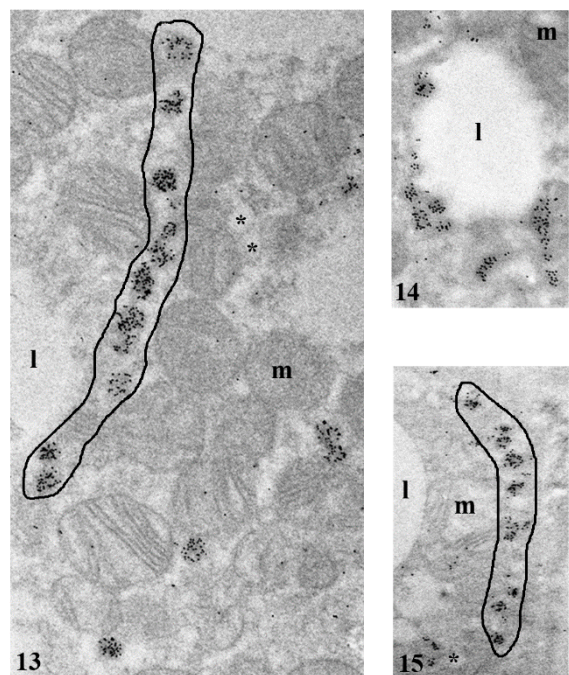
M7



M15



M21



Slika 12. Indirektna procena stepena zrelosti peroksizoma DAB bojenjem i obeležavanjem CAT imunogoldom. Kontrola (1-4), grupa M7 (5-7), grupa M15 (8-12), grupa M21 (13-15). Visok stepen imunopozitivnosti na CAT odgovara visokom stepenu strukturne i funkcijske zrelosti peroksizoma. l, lipidno telo; m, mitohondrija; zvezdica, gLER. Veličina partikula zlata 10 nm, uveličanje 17 000x za sve elektron mikrofografije.

4.12.4 Imunogold obeležavanje CAT na izolovanim peroksizomima

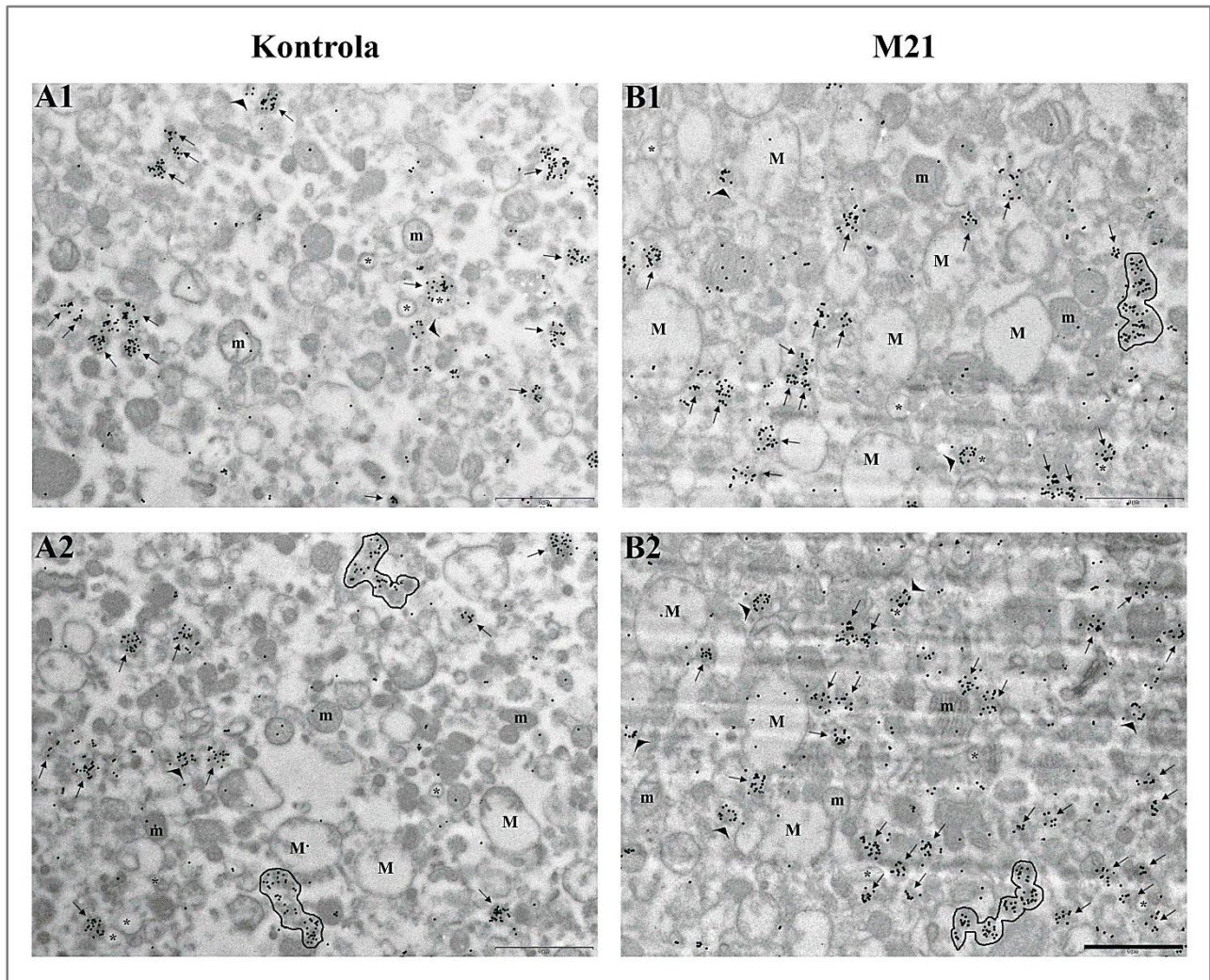
Izolacija lake mitohondrijske frakcije obogaćene peroksizomima iz mrkog masnog tkiva omogućila nam je da bliže odredimo razliku u obliku, veličini i broju peroksizoma u grupi M21 u odnosu na kontrolu, kao i uvid u odnos peroksizoma sa mitohondrijama i cisternama glER.

Analiza elektron mikrografija nam ukazuje na dominantno prisustvo globularnih peroksizoma i u kontroli i u grupi M21 (Slika 13). Takođe, u obe grupe zapaženi su i ovalni peroksizomi, ali i peroksizomi koji nemaju jasno definisan oblik jer se njihova membrana ne vidi. Veoma je zanimljiva pojava peroksizomalnih struktura koje liče na niske bisera (Slika 13A, B1, B2 – uokvirene strukture) koje su takođe zapažene i u kontroli i u grupi M21. Veličina peroksizoma varira u obe grupe, od jako malih do veoma krupnih, a broj peroksizoma je značajno veći u grupi M21 u odnosu na kontrolu.

S obzirom na to da smo izolovali laku mitohondrijsku frakciju obogaćenu peroksizomima, prisustvo mitohondrija u izolatu je neizostavno. Na fotografijama se uočavaju brojne sitne mitohondrije koje imaju jasno definisane kriste i oblik specifičan za mrke adipocite (Slika 13, m). Međutim, pored njih, posebno u grupi M21 uočavaju se brojne krupne i prosvetljene mitohondrije sa dezorganizovanim kristama (Slika 13, M). Posebna strukturna veza peroksizoma sa mitohondrijama u izolovanim frakcijama nije zapažena.

Analizom elektron mikrografija uočene su i brojne cisterne glER različitog oblika i dimenzija, koje su često pozicionirane oko peroksizoma ili u neposrednom kontaktu sa njima (Slika 13, zvezdice). Pored njih, na mikrografijama su uočene i brojne vezikule koje za sada ostaju neidentifikovane.

Analizom imunogold obeležavanja katalaze na presecima izolovanih frakcija, zapazili smo izraženu imunopozitivnu reakciju u pravim globularnim peroksizomima, ali i u ovalnim, izduženim, sitnim pa i u peroksizomalnim strukturama koje liče na nisku bisera. Veoma je važno zapažanje da se CAT u izolovanim peroksizomima lokalizuje centralno, u matriksu peroksizoma (Slika 13, strelice) i periferno, submembranski (Slika 13, glava strelice). Pored peroksizoma, imunopozitivna reakcija na CAT uočena je i na spoljašnjoj membrani i kristama mitohondrija, kao i na membrani pojedinih cisterni glER.



Slika 13. Izolovana laka mitohondrijska frakcija obogaćena peroksizomima i imunogold obeležavanje CAT. Kontrola (A1-2), grupa M21 (B1-2). M, krupne, nabubrele, prosvetljene mitohondrije sa dezorganizovanim kristama; m, mitohondrije lake mitohondrijske frakcije, karakteristične za mrke adipocite; zvezdice, cisterne gER; strelice, peroksizomi sa centralnom, matriksnom, ekspresijom CAT; glava strelice, peroksizomi sa perifernom, submembranskom, ekspresijom CAT. Uveličanje 17 000x za sve elektron mikrografije, bar 1 μ m.

4.12.5 Imunogold obeležavanje ACOX1 i ACOX3 – kolokalizacija

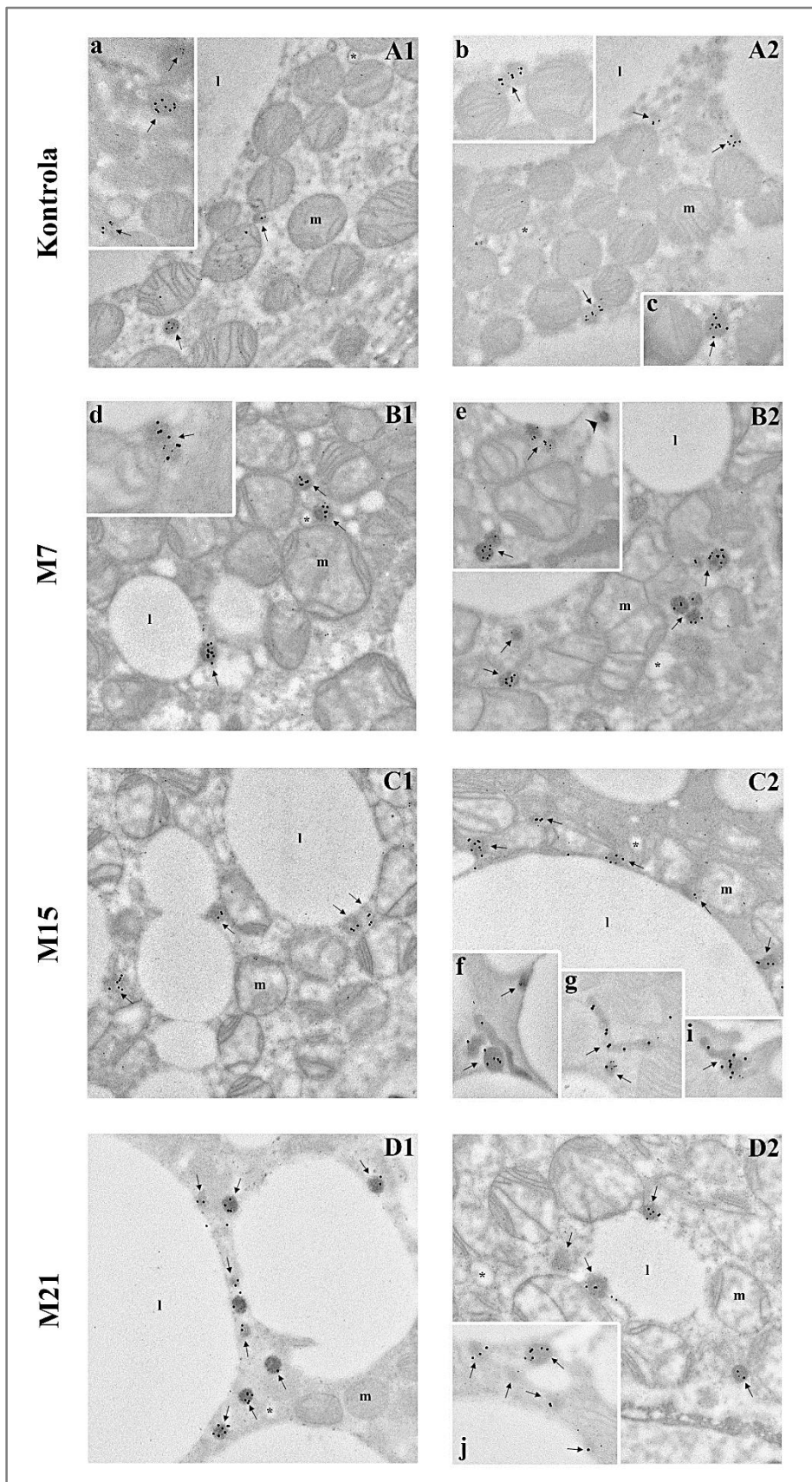
Acil-CoA oksidaza (ACOX) je enzim peroksizomalnog matriksa koji učestvuje u prvom koraku β -oksidacije masnih kiselina u peroksizomima. Kolokalizacijom dve izoforme ovog enzima, ACOX1 i ACOX3 na tankim presecima mrkog masnog tkiva pokazali smo njihovu pojedinačnu lokalizaciju, ali i kolokalizaciju u peroksizomima mrkih adipocita. Analiza rezultata ukazuje na peroksizome kao glavno i jedino mesto lokalizacije obe izoforme ovog enzima (Slika 14).

U kontrolnoj grupi u kojoj su najzastupljeniji pravi, globularni peroksizomi obe izoforme ovog enzima su lokalizovane u njihovom matriksu, dok je periferna lokalizacija ređa (Slika 14A, 1 i 2). Iako su obe izoforme najčešće prisutne istovremeno, u pojedinim peroksizomima uočava se lokalizacija samo ACOX1 ili samo ACOX3 (Slika 14, insert a i A2). Kada poredimo zastupljenost pojedinačnih izoformi ovog enzima u peroksizomima, u kontrolnoj grupi najzastupljenija je ACOX1.

U peroksizomima mrkih adipocita iz grupe M7 takođe su prisutne obe izoforme ovog enzima (Slika 14B, 1 i 2). Njihova lokalizacija je centralna, u matriksu peroksizoma ali su veoma često i periferno pozicionirane, pogotovu ACOX3. Pored toga što je periferno pozicionirana u peroksizomima, ACOX3 često i odsustvuje tako da je ACOX1 dominantna izoforma i u grupi M7. Takođe, u ovoj grupi zapaženi su pojedini peroksizomi koji nisu imunopozitivni ni na jednu izoformu ovog enzima (Slika 14, insert e, glava strelice).

U grupi M15, u kojoj se pojavljuju izdužene i nepravilne peroksizomalne strukture, ACOX1 je takođe dominantna izoforma ovog enzima (Slika 14C, 1 i 2). Šta više, ACOX3 je retko prisutna izoforma, javlja se isključivo u pravim, globularnim peroksizomima dok je u izduženim peroksizomalnim strukturama nema (Slika 14, inserti f, g, i). Međutim, uočeni su i peroksizomi u kojima je lokalizovana samo ACOX3 izoforma (Slika 14, insert f – gornji desni ugao).

U grupi M21, ACOX1 izoforma je najzastupljenija (Slika 14D, 1) i ACOX3 se uočava samo u pojedinim globularnim peroksizomima (Slika 14D, 2 i insert j). Svi ACOX1 imunopozitivni peroksizomi u ovoj grupi pozicionirani su oko i između lipidnih tela, a imunopozitivna reakcija uočava se i u centralnom, matriksnom i u perifernom regionu peroksizoma.



Slika 14. Kolokalizacija ACOX1 i ACOX3 izoformi u peroksizomima mrkih adipocita. Kontrola (A1-2), grupa M7 (B1-2), grupa M15 (C1-2), grupa M21 (D1-2). Streljice pokazuju imunopozitivne peroksizome, a glava streljice peroksizom koji nije pozitivan ni na jednu izoformu ovog enzima. l, lipidna tela; m, mitohondrije; zvezdice, cisterne glER. Veličina partikula zlata: ACOX1 – 20 nm, ACOX3 – 10 nm. Uveličanje 17 000x za osnovne elektron mikrografije, 28 000x za sve inserte.

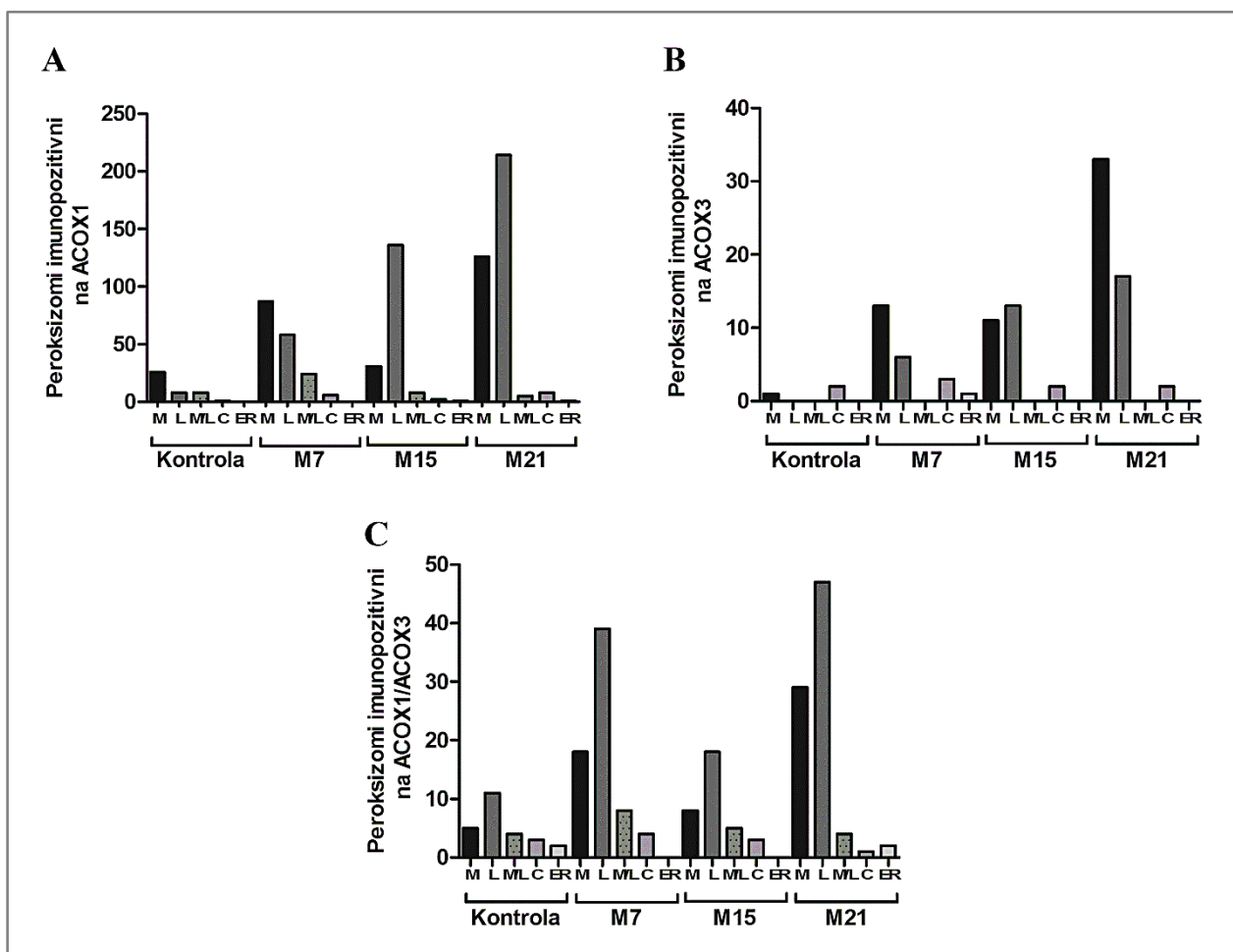
4.12.5.1 Pozicioniranje peroksizoma imunopozitivnih na ACOX1/ACOX3

Rezultati analize pozicije peroksizoma imunopozitivnih na ACOX1 u mrkim adipocitima pokazuju da su u kontroli najbrojniji imunopozitivni peroksizomi lokalizovani uz mitohondrije (Grafik 12A). U grupi M7 su takođe najbrojniji uz mitohondrije, ali raste i broj imunopozitivnih peroksizoma lokalizovanih uz lipidna tela, koji u grupi M15 preuzimaju primat i postaju dominantni. U grupi M21 peroksizomi lokalizovani uz lipidna tela su i dalje dominantni, njihov broj znatno raste u ovoj grupi, ali raste i broj imunopozitivnih peroksizoma lokalizovanih uz mitohondrije.

Kada je u pitanju imunopozitivnost peroksizoma mrkih adipocita na ACOX3 (Grafik 12B), ona je dosta niža u odnosu na ACOX1. U kontrolnoj grupi najviše ACOX3 imunopozitivnih peroksizoma ima u citoplazmi, dok se u grupi M7 njihova pozicija u ćelijama menja tako da je najveći broj imunopozitivnih peroksizoma lokalizovan uz mitohondrije, a zatim uz lipidna tela. U grupi M15, imunopozitivni peroksizomi lokalizovani uz lipidna tela postaju dominantni, ali je broj peroksizoma lokalizovanih uz mitohondrije takođe visok. U grupi M21 raste broj i jednih i drugih, međutim, u ovoj grupi imunopozitivni peroksizomi lokalizovani uz mitohondrije ponovo postaju dominantni.

Kada uporedimo imunopozitivnosti peroksizoma na ACOX1 i ACOX3 možemo da vidimo da su u kontroli najbrojniji peroksizomi imunopozitivni na ACOX1 lokalizovani uz mitohondrije, dok su peroksizomi imunopozitivni na ACOX3 najbrojniji u citoplazmi. U grupi M7 najbrojniji peroksizomi imunopozitivni na obe izoforme ove oksidaze lokalizovani su uz mitohondrije. U grupi M15, ACOX1 i ACOX3 imunopozitivni peroksizomi pozicionirani su uz lipidna tela, s tim da je visok i broj peroksizoma imunopozitivnih na ACOX3 pozicioniranih uz mitohondrije. U grupi M21 dolazi do inverzije brojnosti imunopozitivnih peroksizoma lokalizovanih uz lipidna tela i mitohondrije. Najveći broj peroksizoma imunopozitivnih na ACOX1 lokalizovan je sada uz lipidna tela uz visok broj peroksizoma koji su lokalizovani i uz mitohondrije, dok je najveći broj peroksizoma imunopozitivnih na ACOX3 lokalizovan uz mitohondrije, ali je veliki broj i onih koji su lokalizovani uz lipidna tela.

Što se tiče peroksizoma u kojima dolazi do kolokalizacije ACOX1 i ACOX3, u kontroli ali i u svim hipotiroidnim grupama najbrojniji su peroksizomi lokalizovani uz lipidna tela (Grafik 12C). Takođe i u kontroli i u svim hipotiroidnim grupama visok je i broj imunopozitivnih peroksizoma lokalizovanih uz mitohondrije. Ono što je posebno zanimljivo kod kolokalizacije ACOX izoformi je porast broja imunopozitivnih peroksizoma pozicioniranih uz mitohondrije i lipidna tela istovremeno, kako u kontroli, tako i u svim hipotiroidnim grupama.

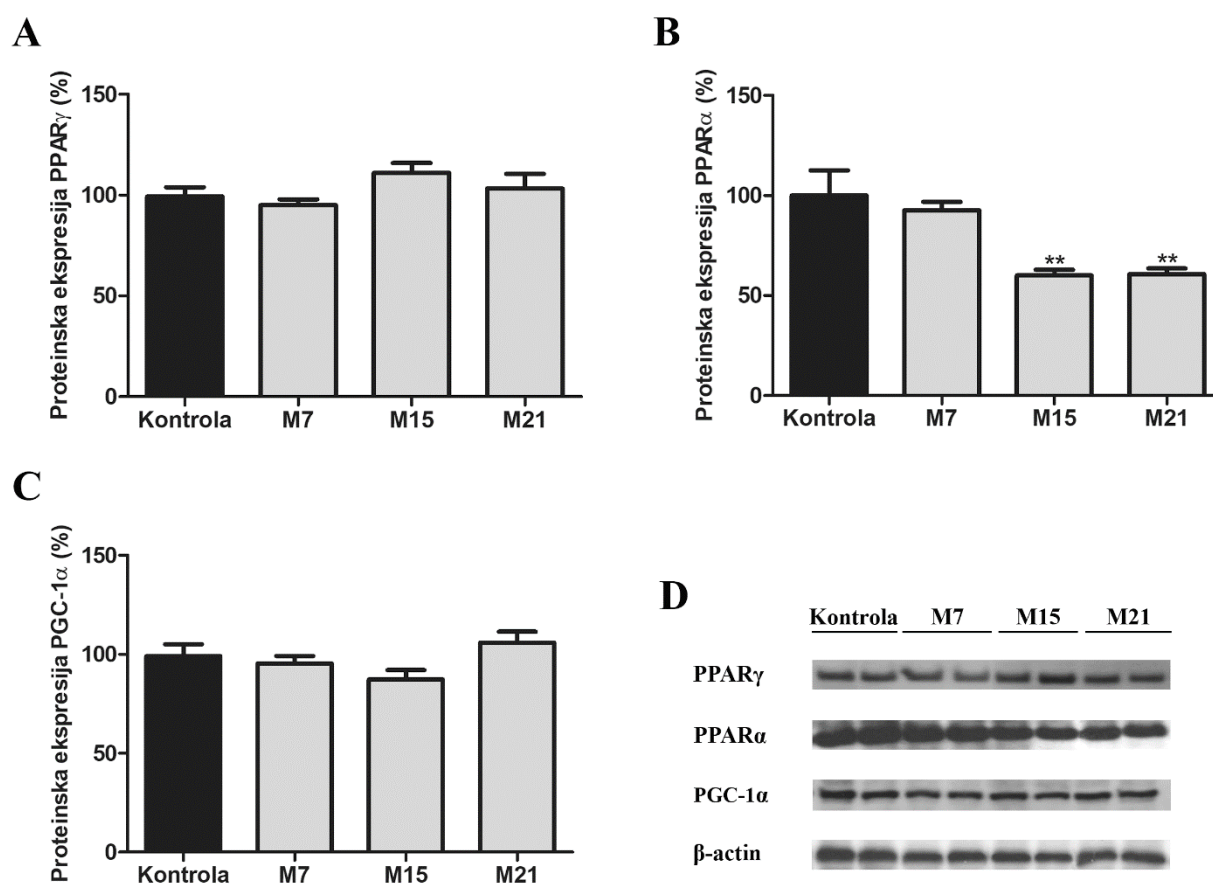


Grafik 12. Pozicioniranje i broj peroksisoma imunopozitivnih na ACOX1 (A), ACOX3 (B) i na obe izoforme istovremeno (C) u mrkim adipocitima. Date vrednosti predstavljaju apsolutan broj imunopozitivnih peroksisoma u ćelijama. M, imunopozitivni peroksisomi lokalizovani uz mitohondrije; L, imunopozitivni peroksisomi lokalizovani uz lipidna tela; M/L imunopozitivni peroksisomi lokalizovani između mitohondrija i lipidnih tela; C, imunopozitivni peroksisomi lokalizovani u citoplazmi; ER, imunopozitivni peroksisomi lokalizovani uz cisterne glER.

4.13 Transkripciona regulacija biogeneze peroksizoma

4.13.1 Western blot analiza PPAR γ , PPAR α i PGC-1 α

Transkripcioni nivo biogeneze peroksizoma regulisan je PPAR γ , PPAR α i PGC-1 α faktorima. Proteinska ekspresija PPAR γ se u hipotiroidizmu ne menja, na nivou je kontrolne (Slika 15A). Ekspresije PPAR α u odnosu na kontrolu snižena je petnaestog dana (M15) i ostaje na tom nivou do kraja tretmana (M21) (Slika 15B). Nivo proteinske ekspresije PGC-1 α , ko-aktivatora PPAR transkripcionih faktora takođe ostaje nepromenjen u hipotiroidizmu (Slika 15C).



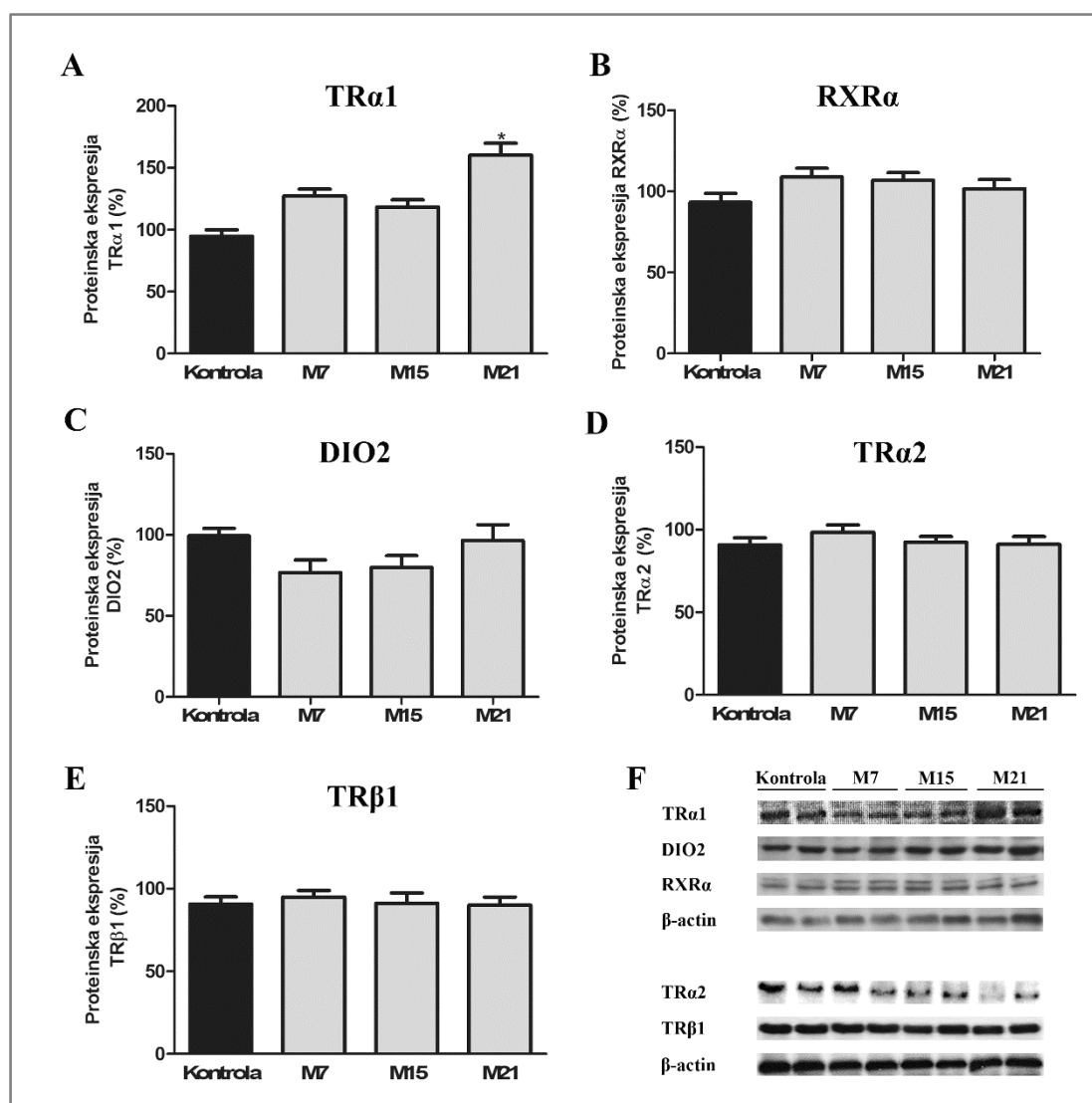
Slika 15. Promena ekspresije transkripcionih faktora koji regulišu biogenezu peroksizoma. PPAR γ (A), PPAR α (B), PGC-1 α (C), slike reprezentativnih traka iz tri nezavisna eksperimenta (D). Vrednosti ekspresije proteina su izražene u procentima. * poređenje sa kontrolnom grupom; ** $p < 0.01$.

4.14 Western blot analiza izoformi tiroidnih receptora (TR α 1, TR α 2, TR β 1), RXR α i DIO2

Tiroidni hormoni igraju centralnu ulogu u održavanju metaboličke homeostaze mrkog masnog tkiva, a svoju funkciju ostvaruju preko tiroidnih receptora.

Nivo proteinske ekspresije TR α 1 u hipotiroidizmu se ne menja u grupama M7 i M15, dok je u grupi M21 viši u poređenju sa kontrolom (Slika 16A). Nivoi proteinske ekspresije tiroidnih receptora TR α 2 i TR β 1 u poređenju sa kontrolom ostaju nepromenjeni do kraja tretmana (Slika 16D i E). Proteinska ekspresije RXR α , partnera tiroidnih receptora u regulaciji ekspresije ciljnih gena takođe ostaje na nivou kontrole u svim hipotiroidnim grupama (Slika 16B).

Koncentracija tiroidnih hormona u ćelijama modulirana je aktivnošću dejodinaza. Radom DIO2 mrkih adipocita obezbeđuje se lokalna konverzija T4 u aktivnu T3 formu tiroidnih hormona. Na taj način, termogeni odgovor i metabolizam mrkih adipocita ne moraju da zavise od njihove trenutne sistemske koncentracije. Proteinska ekspresije DIO2 ostaje na nivou kontrole u svim hipotiroidnim grupama (Slika 16B).

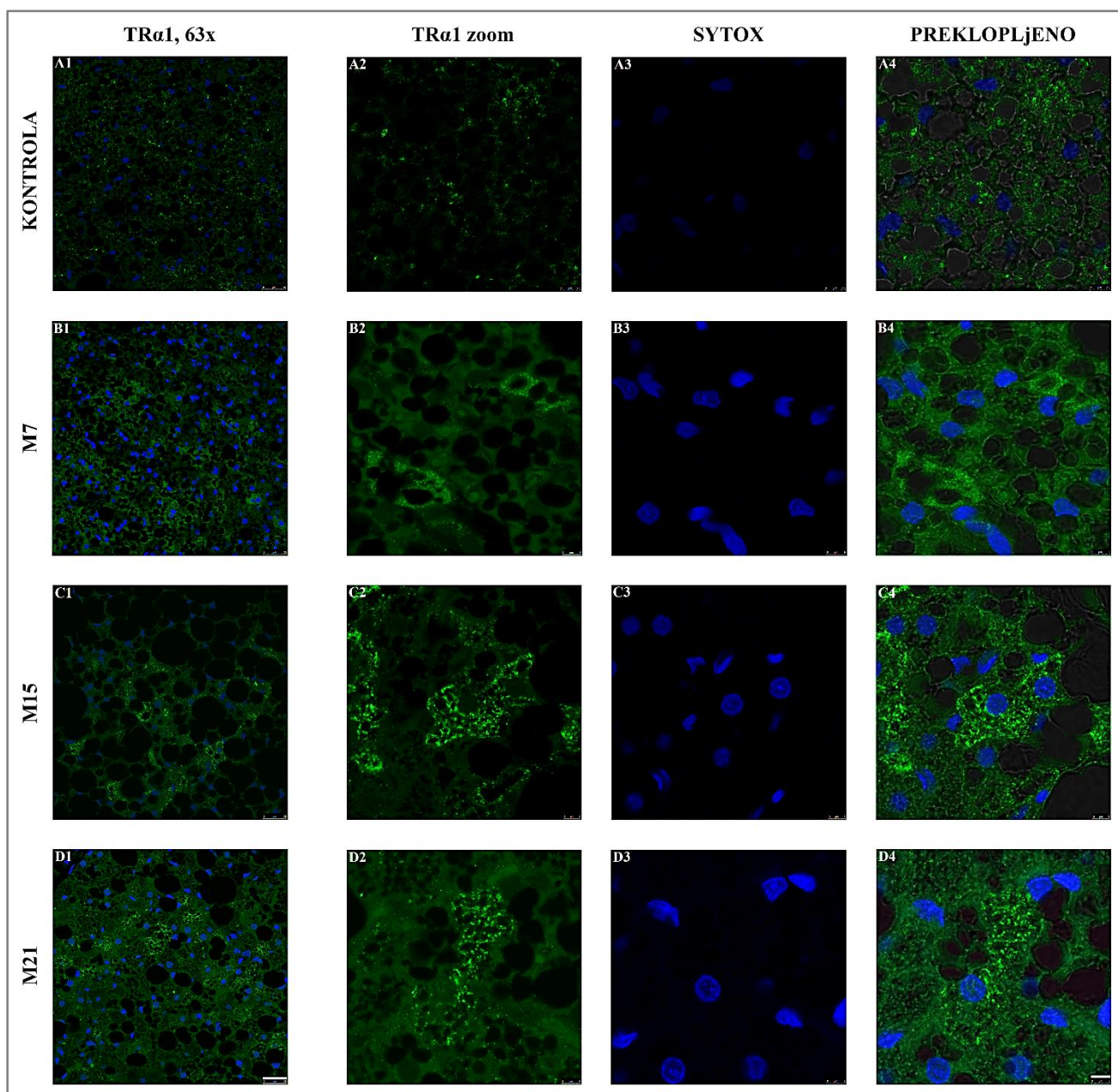


Slika 16. Promena ekspresije izoformi tiroidnih receptora, RXR α i DIO2 u mrkom masnom tkivu. TR α 1 (A), RXR α (B), DIO2 (C), TR α 2 (D), TR β 1 (E), slike reprezentativnih traka iz tri nezavisna eksperimenta (F). Vrednosti ekspresije proteina su izražene u procentima. * poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0.05$.

4.15 Imunofluorescentno obeležavanje tiroidnih receptora

4.15.1 Imunofluorescentna lokalizacija TR α 1

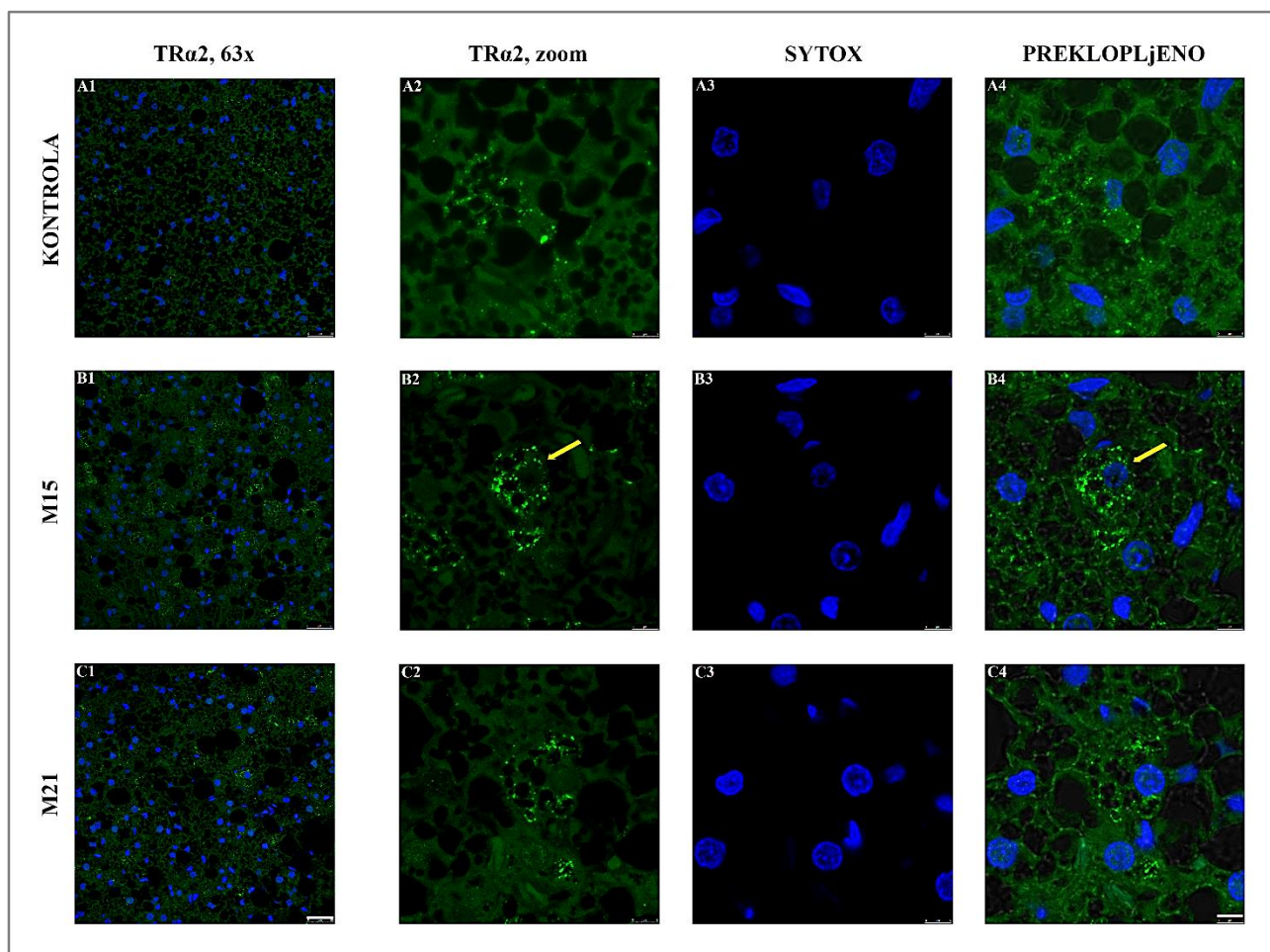
Rezultati analize imunofluorescentnog obeležavanja TR α 1 na parafinskim presecima mrkog masnog tkiva pokazuju da hipotiroidizam potencira Harlekin efekat pri ekspresiji ovog tiroidnog receptora (Slika 17). Broj mrkih adipocita imunopozitivnih na TR α 1 raste sa dužinom tretmana, u poređenju sa kontrolom, a intenzitet imunofluorescencije je najjači u grupi M15. Na nivou ćelije, imunopozitivna reakcija prisutna je prevashodno u mitohondrijama dok nukleusna imunopozitivnost nije uočena.



Slika 17. Imunofluorescentna lokalizacija TR α 1 na presecima mrkog masnog tkiva. Kontrola (A1-4), grupa M7 (B1-4), grupa M15 (C1-4), grupa M21 (D1-4); TR α 1 – zeleni signal, kontrastno bojenje nukleusa Sytox orange – plavo. Originalno uveličanje 63x (A1-D1), bar 25 μ m; zoom 5x, bar 5 μ m.

4.15.2 Imunofluorescentna lokalizacija TR α 2

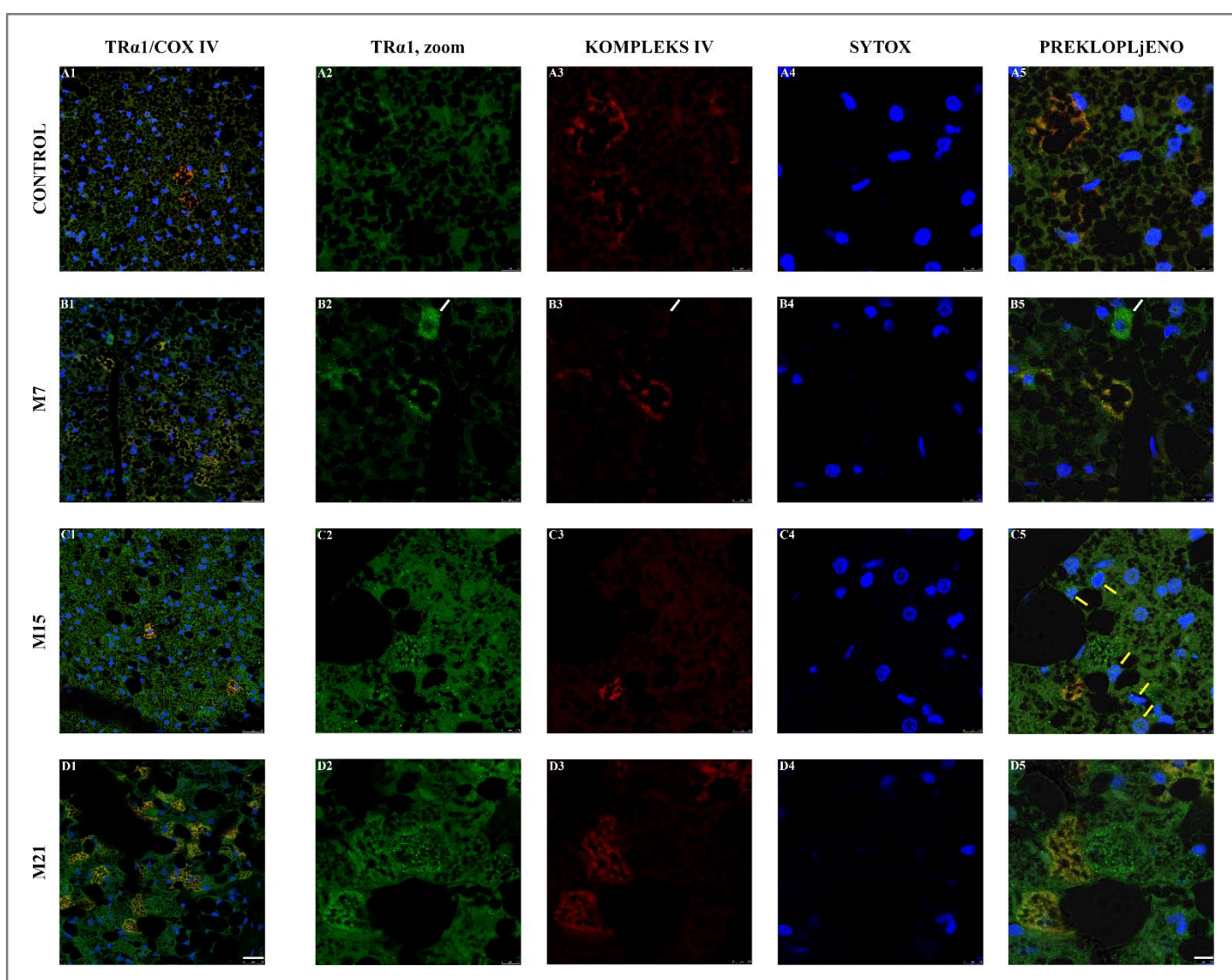
Rezultati analize imunofluorescentnog obeležavanja TR α 2 na presecima mrkog masnog tkiva pokazuju da hipotiroidizam takođe potencira Harlekin efekat pri ekspresiji i ove izoforme TR α (Slika 18). Broj mrkih adipocita imunopozitivnih na TR α 2 raste u grupi M15, u poređenju sa kontrolom, a intenzitet imunofluorescencije je takođe najjači u ovoj hipotiroidnoj grupi. Na nivou ćelije, imunopozitivna reakcija prisutna je u mitohondrijama. Nukleusna imunopozitivnost nije uočena, već samo perinukleusna lokalizacija TR α 2 u grupi M15 (Slika 18B, 2-4, strelica).



Slika 18. Imunofluorescentna lokalizacija TR α 2 na presecima mrkog masnog tkiva. Kontrola (A1-4), grupa M15 (B1-4), grupa M21 (C1-4); TR α 2 – zeleni signal, kontrastno bojenje nukleusa Sytox orange – plavo. Strelice pokazuju perinukleusnu lokalizaciju TR α 2. Originalno uveličanje 63x (A1-C1), bar 25 μ m; zoom 5x, bar 5 μ m.

4.15.3 Imunofluorescentna kolokalizacija TR α 1 i COX IV

Rezultati analize dvojnog imunofluorescentnog obeležavanja na presecima mrkog masnog tkiva pokazuju da u pojedinim mrkim adipocitima TR α 1 i COX IV kolokalizuju, kao potvrda mitohondrijske lokalizacije TR α 1 (Slika 19). I TR α 1 i COX IV takođe pokazuju specifičan način ekspresije – Harlekin efekat, kako u kontroli tako i u hipotiroidnim grupama. Broj mrkih adipocita u kojima su TR α 1 i COX IV kolokalizovani raste sa dužinom tretmana. Međutim, kada se posmatraju odvojeni signali, broj ćelija imunopozitivnih na TR α 1 (Slika 19 A2-D2) je veći od broja ćelija imunopozitivnih na COX IV (Slika 19 A3-D3). Intenzitet imunopozitivnosti na oba proteina je najjači u grupi M15. Na nivou ćelija, imunopozitivna reakcija na oba proteina prisutna je u mitohondrijama, dok se imunopozitivna reakcija na TR α 1 u grupi M15 uočava i u nukleusima (Slika 19 C5 - strelice).

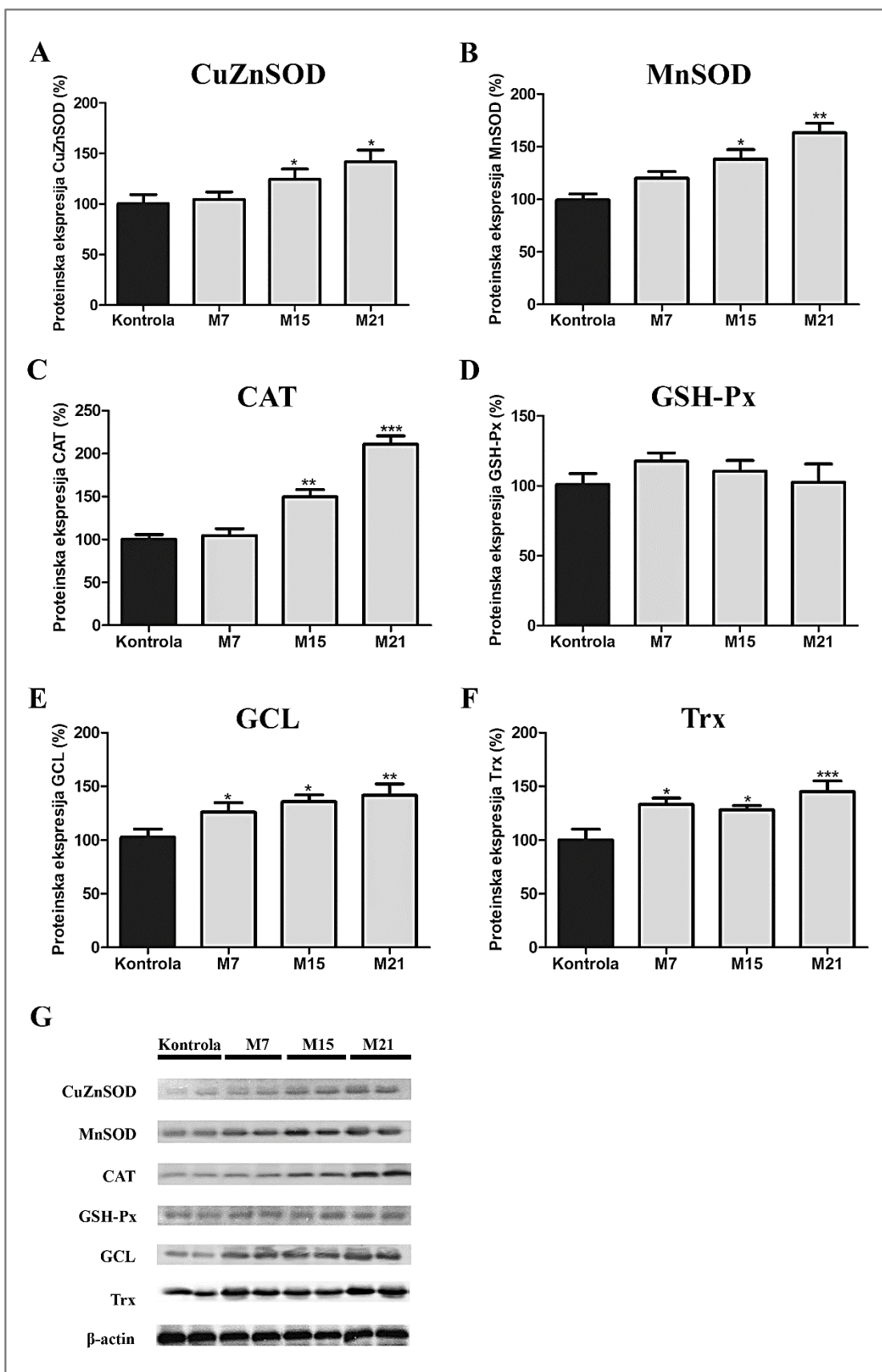


Slika 19. Imunofluorescentna lokalizacija TR α 1 i COX IV na presecima mrkog masnog tkiva. Kontrola (A1-5), grupa M7 (B1-5), grupa M15 (C1-5), grupa M21 (D1-5); TR α 1 – zeleni signal, COX IV – crveni signal, kontrastno bojenje nukleusa Sytox orange – plavo. Bele strelice pokazuju ćeliju izrazito imunopozitivnu na TR α 1, dok žute strelice ukazuju na njegovu nukleusnu lokalizaciju. Originalno uveličanje 63x (A1-D1), bar 25 μ m; zoom 5x, bar 5 μ m.

4.16 Analiza efekta hipotiroidizma na sistem antioksidativne odbrane u BAT

4.16.1 Analiza proteinske ekspresije komponenti antioksidativne odbrane: CuZnSOD, MnSOD, CAT, GSH-Px, GCL i Trx

Analiza rezultata proteinske ekspresije enzima antioksidativne odbrane u mrkom masnom tkivu pacova pokazuje da je proteinska ekspresija CuZnSOD, MnSOD i CAT u odnosu na kontrolu povišena od petnaestog dana (M15) i ostaje povišena do kraja tretmana (M21) (Slika 20A-C); proteinska ekspresija GSH-Px se u hipotiroidizmu ne menja, ostaje na nivou kontrole (Slika 20D); ekspresija GCL i Trx, u odnosu na kontrolu, značajno raste već od sedmog dana (M7) i ostaje povišena do kraja tretmana (M21) (Slika 20E i F).



Slika 20. Rezultati western blot analize proteinske ekspresije komponenti antioksidativne odbrane u mrkom masnom tkivu. CuZnSOD (A), MnSOD (B), CAT (C), GSH-Px (D), GCL (E), Trx (F), slike reprezentivnih traka iz tri nezavisna eksperimenta (G). Vrednosti ekspresije proteina su izražene u procentima. * poređenje sa kontrolnom grupom; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

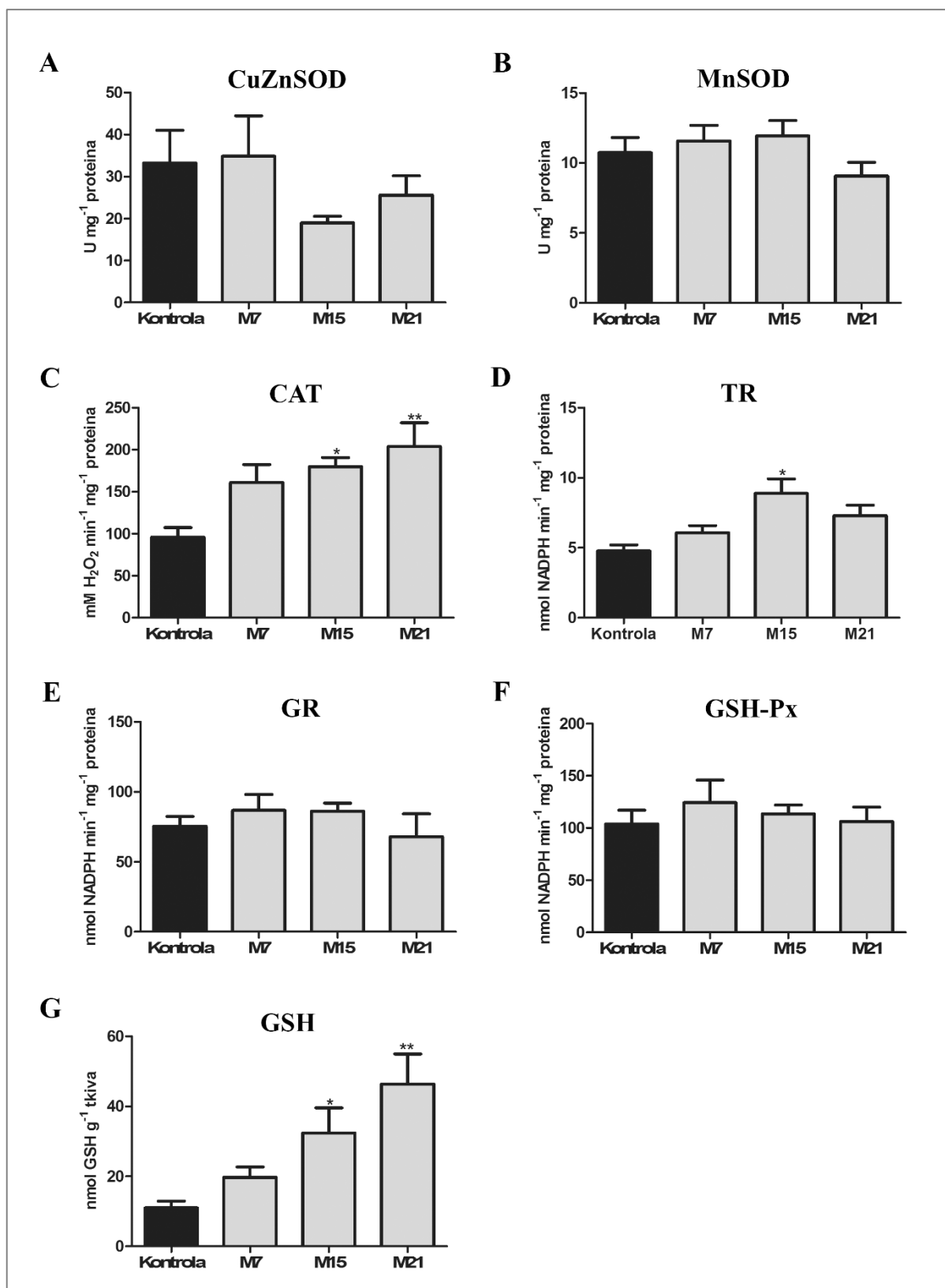
4.16.2 Analiza enzimske aktivnosti enzima antioksidativne odbrane u mrkom masnom tkivu: CuZnSOD, MnSOD, CAT, TR, GR, GSH-Px i ukupnog sadržaja GSH

Analiza rezultata enzimske aktivnosti pokazuje da se aktivnost CuZnSOD, MnSOD, GR i GSH-Px u hipotiroidnim grupama ne menja u odnosu na kontrolnu (Grafik 13A, B, D i F).

Aktivnost CAT u odnosu na kontrolu raste od petnaestog dana (M15) i ostaje visoka do kraja tretmana (M21) (Grafik 13C).

Aktivnost TR u poređenju sa kontrolom pokazuje porast jedino nakon petnaest dana tretmana (M15), dok je u grupama M7 i M21 nepromenjena (Grafik 13D).

U poređenju sa kontrolom ukupni GSH povećan je od petnaestog dana (M15) i ostaje povećan do kraja tretmana (Grafik 13G).



Grafik 13. Rezultati analize enzimске aktivnosti enzima antioksidativne odbrane i ukupnog sadržaja GSH u mrkom masnom tkivu. CuZnSOD (A), MnSOD (B), CAT (C), TR (D), GR (E), GSH-Px (F) i GSH (G). Enzimска aktivnost/proteinski sadržaj je izražen kao: apsolutna jedinica U mg⁻¹ proteina (A, B), mM H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteina (C), nM NADPH min⁻¹mg⁻¹ proteina (D, E, F), nmol GSH g⁻¹ tkiva (G). Vrednosti na grafikonima su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna greška. * poređenje sa kontrolnom grupom, *p < 0.05, **p < 0.01.

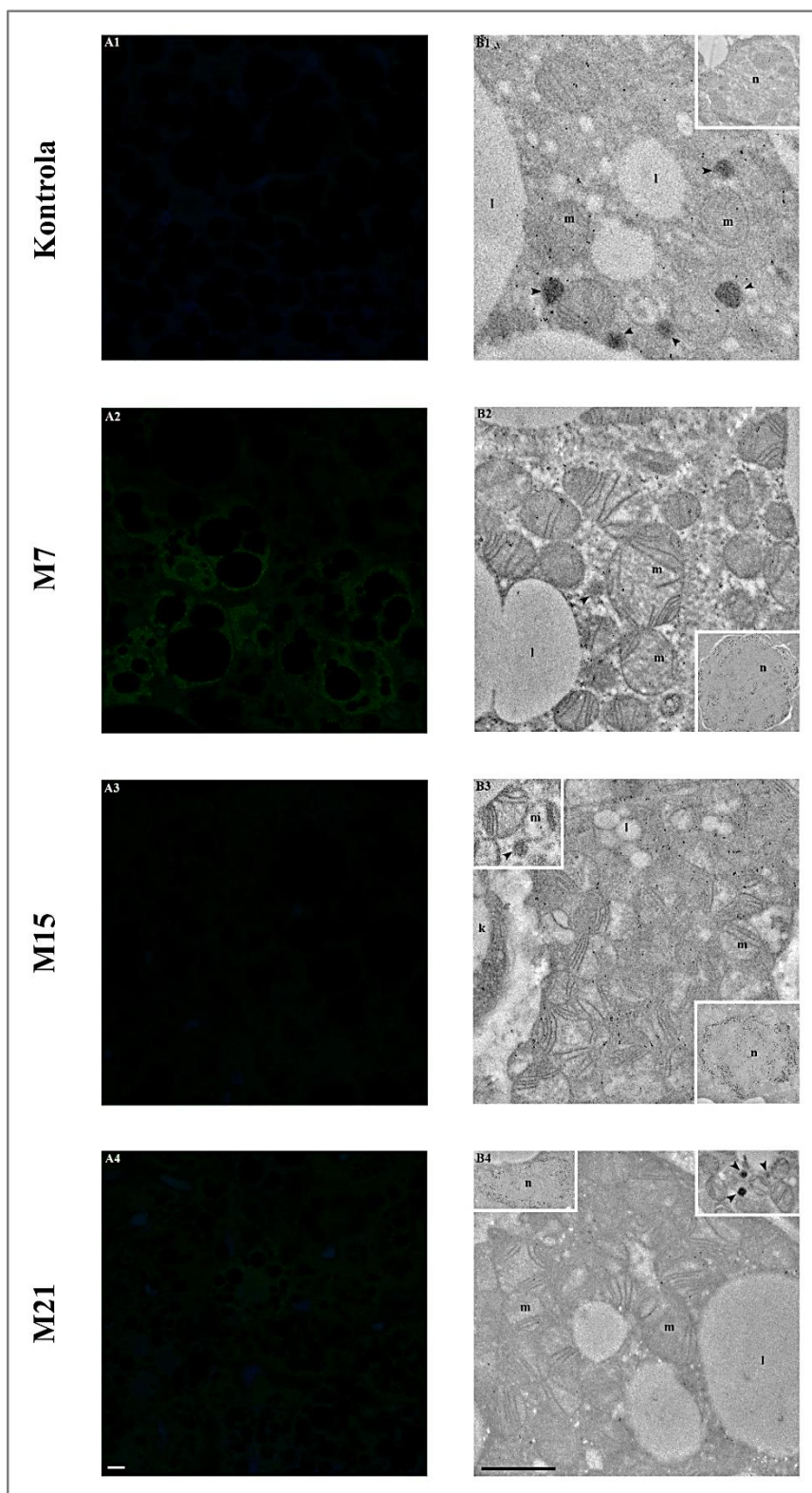
4.17 Imunofluorescentna i imunogold lokalizacija enzima antioksidativne odbrane

4.17.1 Imunofluorescentna i imunogold lokalizacija CuZnSOD

Analiza rezultata imunofluorescentnog obeležavanja CuZnSOD (Slika 21A) pokazala je da u kontrolnoj grupi imunopozitivna reakcija na ovaj enzim odsustvuje osim sporadično citoplazmatske u ćeliji (Slika 21, A1). U grupi M7 intenzitet imunopozitivnosti raste u odnosu na kontrolu (Slika 21, A2). Zapažen je veći broj ćelija koje odlikuje srednji stepen imunopozitivnosti na CuZnSOD. Na nivou pojedinačnih ćelija, imunopozitivna reakcija se uočava u citoplazmi i u mitohondrijama. U ovoj grupi nije zapažena nukleusna lokalizacija CuZnSOD. Grupu M15 karakteriše nizak stepen imunopozitivnosti na CuZnSOD, ali je broj imunopozitivnih ćelija veći nego u grupi M7 (Slika 21, A3). Na nivou ćelije, imunopozitivna reakcija se uočava u citoplazmi i u mitohondrijama, dok u nukleusu odsustvuje. U grupi M21 se kao i u kontroli ne uočava imunopozitivna reakcija na CuZnSOD (Slika 21, A4).

Metodom imunogold obeležavanja CuZnSOD želeli smo da detaljnije istražimo lokalizaciju ovog enzima na nivou mrkih adipocita (Slika 21B). Analiza rezultata pokazuje da kontrolnu grupu odlikuje veoma nizak stepen imunopozitivnosti (Slika 21, B1). Imunopozitivna reakcija se javlja u citoplazmi; u nukleusima, kako mrkih adipocita, tako i endotelskih ćelija, i to u regionu heterohromatina (kao oreol oko euhromatina); na kristama mitohondrija; na membranama pojedinih peroksizoma. U grupi M7 stepen imunopozitivnosti je viši nego u kontroli, ali je i dalje nizak (Slika 21, B2). Imunopozitivna reakcija se javlja: u citoplazmi, u kojoj su partikule zlata organizovane u grupice; zatim, u nukleusima mrkih adipocita i endotelskih ćelija, takođe periferno, u regionu heterohromatina; na kristama mitohondrija i u mitohondrijskom matriksu. Grupu M15 odlikuje viši stepen imunopozitivnosti nego u grupi M7, koji se može okarakterisati kao srednji (Slika 21, B3). Imunopozitivna reakcija se javlja u citoplazmi i vrlo je intenzivna u ovom ćelijskom kompartmentu; u nukleusima, kako mrkih adipocita, tako i endotelskih ćelija, u regionu heterohromatina ali i u regionu euhromatina; na kristama mitohondrija; na membranama pojedinih peroksizoma. Stepen imunopozitivnosti u grupi M21 je veoma nizak, približno je jednak stepenu imunopozitivnosti u kontrolnoj grupi (Slika 21, B4). Veoma slaba imunopozitivna reakcija uočena je u citoplazmi; nešto intenzivnija u nukleusima, u regionu heterohromatina (u ovom kompartmentu ćelije je zapravo i najintenzivnija, insert); na kristama mitohondrija; na membrani pojedinih peroksizoma; u eritrocitima u kojima se partikule zlata organizuju u male grupe.

Stepen imunopozitivnosti na CuZnSOD u odnosu na kontrolu raste od sedmog (M7) do petnaestog dana (M15) gde je i najviši, a potom opada, vraća se na kontrolni nivo u M21. Imunopozitivna reakcija je najintenzivnija u nukleusima a onda u citoplazmi, na kristama mitohondrija i membrani peroksizoma.



Slika 21. Imunofluorescentno (A) i imunogold (B) obeležavanje CuZnSOD na presecima mrkog masnog tkiva. Kontrola (A1, B1), grupa M7 (A2, B2), grupa M15 (A3, B3), grupa M21 (A4, B4). l, lipidna tela; m, mitohondrije; n, nukleus; k, krvni kapilar; glava strelice, peroksizomi imunopozitivni na SOD1. Konfokalna mikroskopija: lokalizacija SOD1 – zeleno, kontrastno bojenje nukleusa Sytox orange – plavo; bar 5 μm . Transmisiona elektronska mikroskopija: veličina partikula zlata 10 nm; bar 1 μm .

4.17.2 Imunofluorescentna i imunogold lokalizacija MnSOD

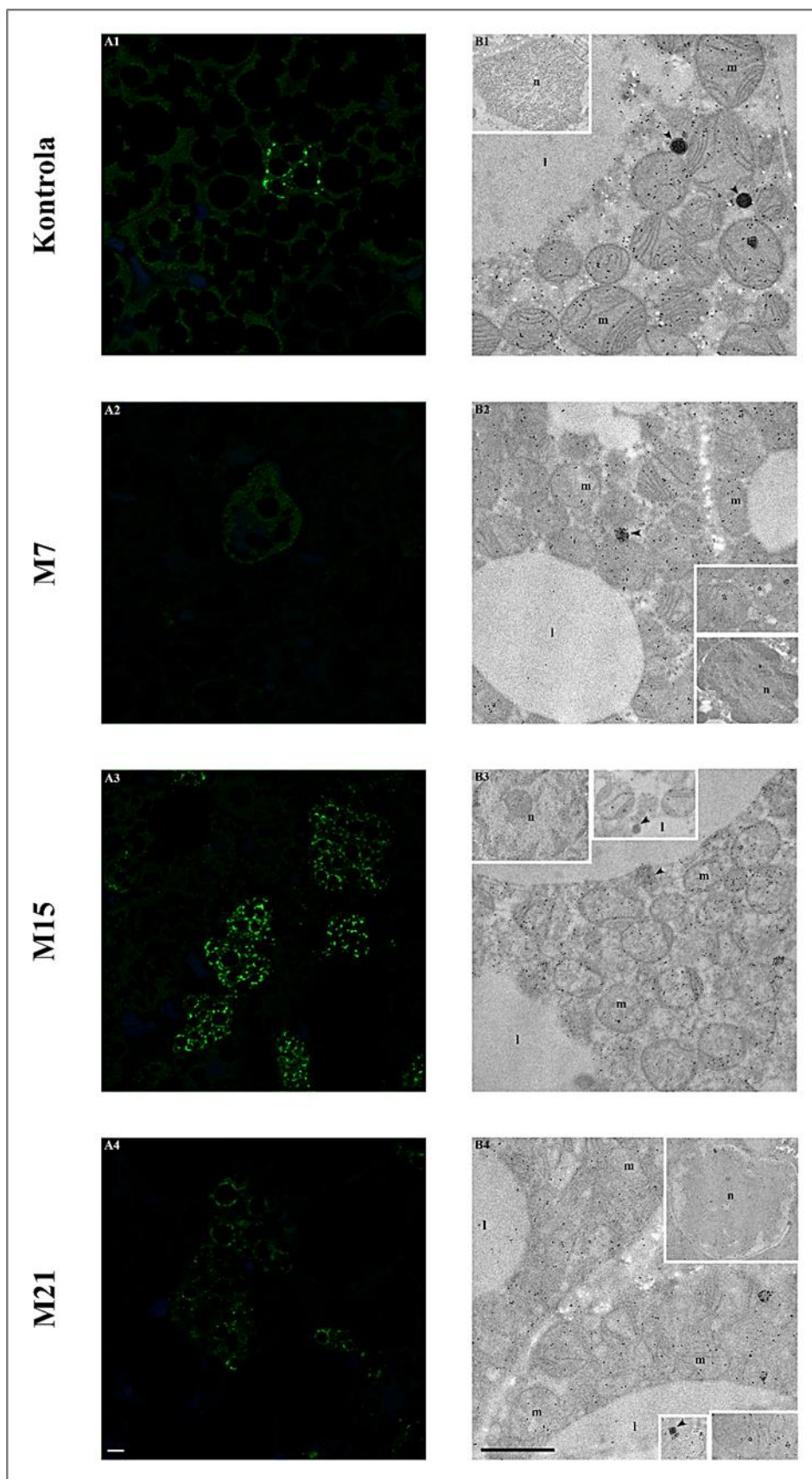
Analiza rezultata imunofluorescentnog obeležavanja MnSOD pokazuje da je u kontroli intenzitet imunofluorescentne reakcije izuzetno slab osim sporadične ćelije koju odlikuje

visok stepen imunopozitivnosti na MnSOD (Slika 22, A1). Na ćelijskom nivou, imunopozitivna reakcija je lokalizovana u mitohondrijama. U grupi M7 intenzitet imunopozitivnosti raste u odnosu na kontrolu (Slika 22, A2). Zapažen je veći broj ćelija koje su imunopozitivne na MnSOD, kao i veći broj ćelija koje odlikuje visok stepen imunopozitivnosti. Na nivou ćelije, imunopozitivna reakcija je lokalizovana u mitohondrijama. U grupi M15 zapažen je jako veliki broj ćelija visoko imunopozitivnih na MnSOD, kao i veliki broj ćelija koje odlikuje veoma visok stepen imunopozitivnosti (Slika 22, A3). Na nivou ćelije, imunopozitivna reakcija je lokalizovana u mitohondrijama, pogotovu u mitohondrijama lokalizovanim oko lipidnih tela. U grupi M21 intenzitet imunopozitivnosti na MnSOD slabi u odnosu na prethodne dve hipotiroidne grupe, a opada i broj imunopozitivnih ćelija (Slika 22, A4). Zapažen je mali broj ćelija koje odlikuje visok stepen imunopozitivnosti na MnSOD. Na nivou ćelije, imunopozitivna reakcija lokalizovana je u mitohondrijama, naročito onim koje su pozicionirane oko lipidnih tela.

Posmatrano sve zajedno, intenzitet imunofluorescence u odnosu na kontrolu raste do petnaestog dana, kada je najjači, a potom slabi dvadeset prvog dana. Izrazito imunopozitivne mitohondrije lokalizovane oko lipidnih tela javljaju se u M15 i M21 grupama. Metodom imunofluorescentnog obeležavanja MnSOD nismo zapazili njegovu nukleusnu lokalizaciju.

Da bismo detaljnije istražili lokalizaciju MnSOD na ćelijskom nivou obeležili smo ovaj enzim imunogoldom i naši rezultati su pokazali sledeće – u kontrolnoj grupi, imunopozitivna reakcija uočena je na spoljašnjoj, unutrašnjoj membrani i u matriksu mitohondrija (Slika 22, B1). Posebno je zanimljiva kružna organizacija imunogold partikula u pojedinim mitohondrijama. Pored mitohondrija, imunopozitivna reakcija na MnSOD uočena je u nukleusima mrkih adipocita i malom broju peroksizoma. U grupi M7 imunopozitivna reakcija takođe je uočena na spoljašnjoj, unutrašnjoj membrani i u matriksu mitohondrija (Slika 22, B2). I u ovoj grupi uočava se kružna organizacija imunogold partikula u pojedinim mitohondrijama (Slika 22, B2 – mali insert). Imunopozitivna reakcija na MnSOD ovde je uočena u nukleusima mrkih adipocita, kao i veoma intenzivna imunopozitivna reakcija lokalizovana u peroksizomima. U grupi M15 intenzitet imunopozitivnosti je jači u odnosu na kontrolu (Slika 22, B3). Imunopozitivna reakcija je uočena na spoljašnjoj membrani mitohondrija, na njihovoj unutrašnjoj membrani, u matriksu, ali i u citoplazmi oko mitohondrija. Specifična kružna organizacija imunogold partikula lokalizovana u pojedinim mitohondrijama prisutna je i u ovoj grupi (Slika 22, B3 – mali insert). Pored toga, imunopozitivna reakcija je zapažena i u nukleusu, kao i na membrani i u matriksu peroksizoma. U grupi M21 intenzitet imunopozitivnosti je slabiji u poređenju sa grupom M15 (Slika 22, B3). Imunopozitivna reakcija se javlja na spoljašnjoj, unutrašnjoj membrani i u matriksu mitohondrija, nukleusu i nukleusnim porama, kao i u peroksizomima koje odlikuje veoma visok stepen imunopozitivnosti na MnSOD. Kružna organizacija imunogold partikula u mitohondrijama prisutna je i u ovoj hipotiroidnoj grupi (Slika 22, B4 – srednji insert).

Intenzitet imunopozitivnosti na MnSOD u odnosu na kontrolu, raste do petnaestog dana a potom opada dvadeset prvog dana, što je u korelaciji sa rezultatima koje smo dobili metodom imunofluorescentnog obeležavanja ovog enzima. Metodom imunogold obeležavanja MnSOD smo pokazali postojanje nukleusne lokalizacije ovog enzima. Pored toga, pokazali smo da u mrkim adipocitima hipotiroidizam dovodi do translokacije MnSOD u peroksizome, što do sada nije uočeno. Specifična, kružna organizacija imunogold partikula u mitohondrijama zapažena je u kontroli i svim hipotiroidnim grupama.



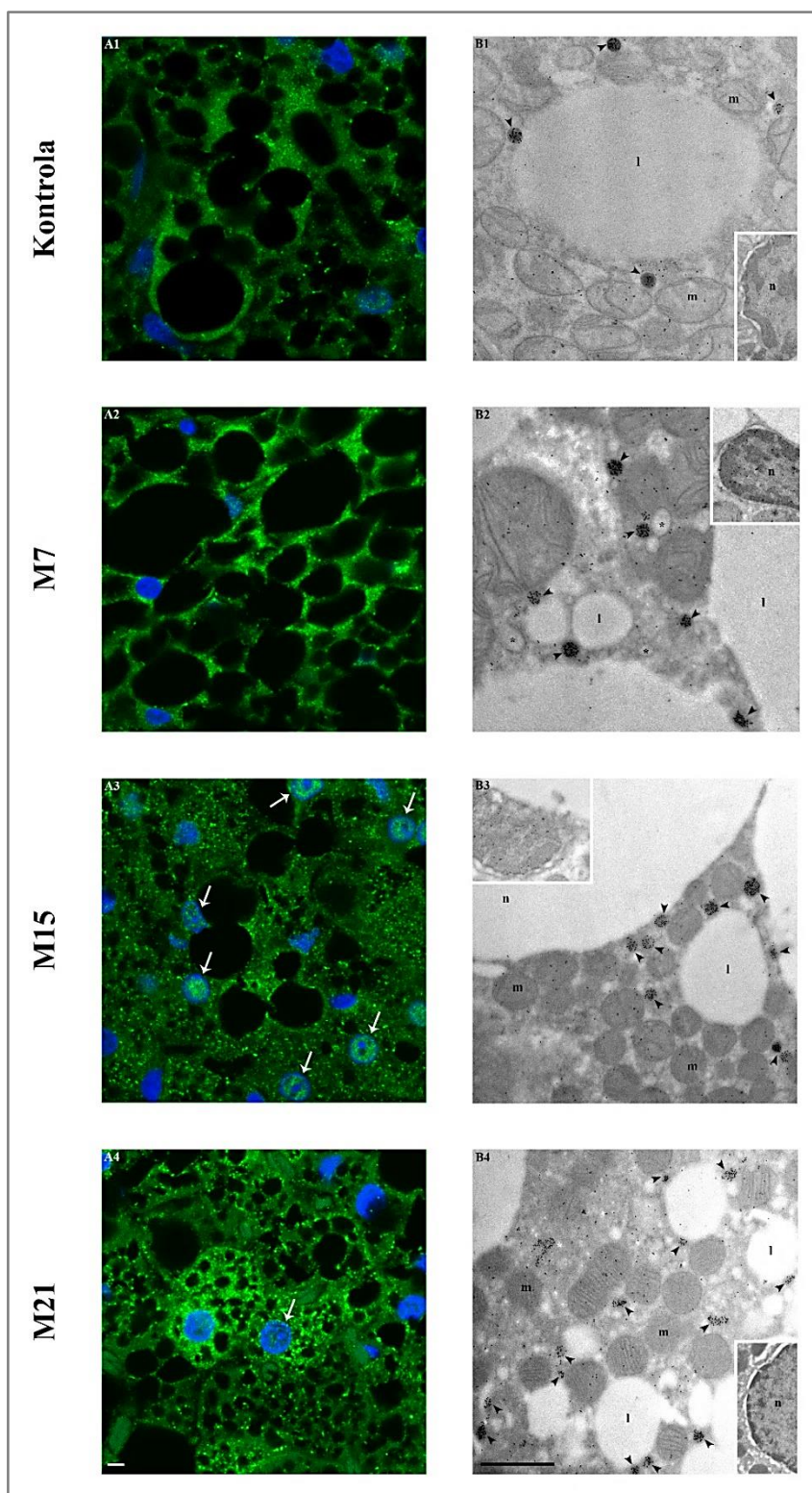
Slika 22. Imunofluorescentno (A) i imunogold (B) obeležavanje MnSOD na presecima mrkog masnog tkiva. Kontrola (A1, B1), grupa M7 (A2, B2), grupa M15 (A3, B3), grupa M21 (A4, B4). l, lipidna tela; m, mitohondrije; n, nukleus; glava strelice, peroksizomi imunopozitivni na SOD2. Konfokalna mikroskopija: lokalizacija MnSOD – zeleno, kontrastno bojenje nukleusa Sytox orange – plavo; bar 5 μm . Transmisiona elektronska mikroskopija: veličina partikula zlata 10 nm; bar 1 μm .

4.17.3 Imunofluorescentna i imunogold lokalizacija CAT

Analiza rezultata imunofluorescentnog obeležavanja CAT pokazuje da je u kontroli intenzitet imunopozitivnosti veoma slab i da je jako mali broj ćelija imunopozitivan na CAT (Slika 23, A1). Na nivou ćelije, imunopozitivna reakcija na CAT se uočava u citoplazmi, oko lipidnih tela, u mitohondrijama, peroksizomima i u ponekom nukleusu. U grupi M7 broj ćelija koje su imunopozitivne na CAT raste, uporedo sa porastom intenziteta imunofluorescence (Slika 23, A2). Na nivou ćelije, imunopozitivna reakcija na CAT uočava se u citoplazmi, oko lipidnih tela, u mitohondrijama, peroksizomima, oko nukleusa i u malom broju njih. Imunopozitivnost u nukleusima mrkih adipocita u ovoj grupi zapaža se u dva domena: perifernom, uz nukleusni ovoj i centralni, u samom njegovom središtu. U grupi M15 zapažen je jako veliki broj ćelija koje su imunopozitivne na CAT (Slika 23, A3). Imunopozitivna reakcija se javlja u svim ćelijskim kompartmentima: citoplazmi, oko lipidnih tela, u mitohondrijama, peroksizomima, oko nukleusa i u njima u vidu jasnih, tačkastih signala. Broj nukleusa koji su imunopozitivni na CAT je takođe veliki, a dominiraju nukleusi koji su imunopozitivni u svom centralnom delu (Slika 23, A3 – bele strelice). U grupi M21 skoro sve ćelije na preseku tkiva su imunopozitivne na CAT a intenzitet imunopozitivnosti je izuzetno jak (Slika 23, A4). Na nivou ćelije, imunopozitivna reakcija na CAT se uočava u citoplazmi, oko lipidnih tela, u mitohondrijama, peroksizomima i nukleusima. Imunopozitivna reakcija u nukleusima takođe je lokalizovana u dva domena, perifernom i centralnom, pri čemu je periferna imunopozitivnost dominantna (Slika 23, A4 – bela strelica).

Da bismo utvrdili lokalizaciju CAT na ćelijskom nivou, obeležili smo je imunogoldom. Naši rezultati su pokazali da je u kontrolnoj grupi, u matriksu peroksizoma uočen visok stepen imunopozitivnosti na CAT, dok se vrlo slaba imunopozitivna reakcija uočava u pojedinim mitohondrijama (na spoljašnjoj membrani i u matriksu) i u nukleusima mrkih adipocita (Slika 23, B1). Peroksizomi imunopozitivni na CAT, se razlikuju po intenzitetu imunopozitivnosti (od izuzetno pozitivnih, tamnih peroksizoma do negativnih). Grupu M7 odlikuje jaka imunopozitivna reakcija na katalazu uočena u peroksizomima, dok se vrlo slaba reakcija uočava u pojedinim mitohondrijama i u nukleusima mrkih adipocita (Slika 23, B2). U grupi M15 intenzitet imunopozitivnosti na CAT jači je nego u grupi M7 (Slika 23, B3). Uočena imunopozitivna reakcija lokalizovana je u peroksizomima, mitohondrijama, nukleusu i sporadično u citoplazmi. Neobične izdužene strukture koje najviše karakterišu ovu grupu su takođe imunopozitivne na CAT i pozicionirane su uglavnom oko lipidnih tela ili u njihovoj neposrednoj blizini. U grupi M21 intenzitet imunopozitivnosti na CAT jači je nego kod ostalih eksperimentalnih grupa (Slika 23, B4). Imunopozitivna reakcija na CAT se javlja u peroksizomima, mitohondrijama, nukleusu i citoplazmi. I u ovoj grupi se uočavaju izdužene strukture nalik na tubule koje su CAT pozitivne iako su pojedinačno prisutne i one koje su CAT negativne.

Intenzitet CAT imunopozitivnosti raste sa dužinom tretmana, prevashodno u peroksizomima i raznim izduženim strukturama. Jako je zanimljiva reakcija na CAT u pojedinim peroksizomima gde se imunopozitivnost primećuje u submembranskom regionu peroksizoma čineći oreol oko peroksizomalnog matriksa. Imunopozitivna reakcija lokalizovana u mitohondrijama i nukleusu je vrlo slaba kako u kontroli, tako i u eksperimentalnim grupama, dok se reakcija u citoplazmi pojavljuje tek od petnaestog dana i njen intenzitet raste do kraja tretmana.



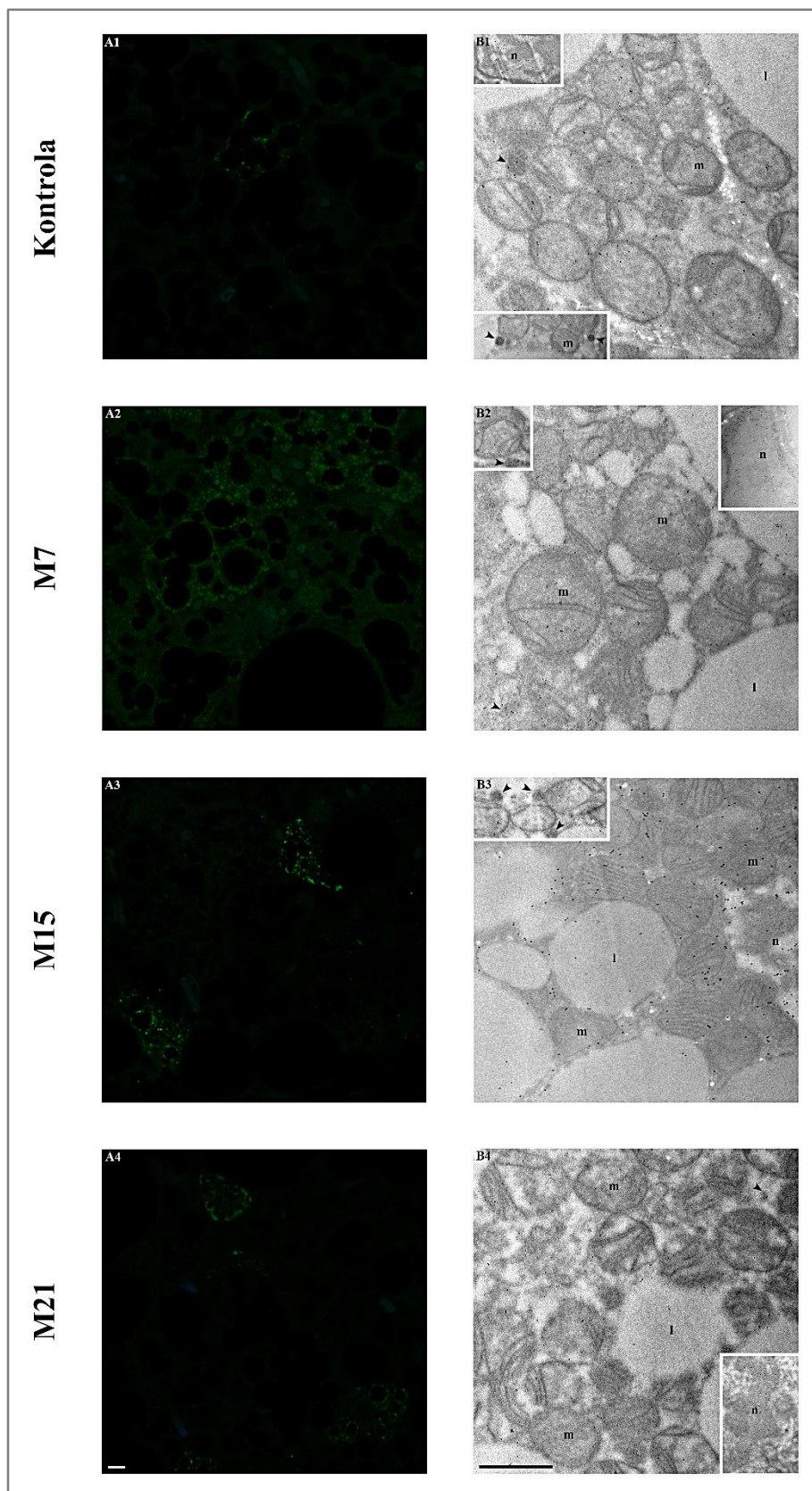
Slika 23. Imunofluorescentno (A) i imunogold (B) obeležavanje CAT na presecima mrkog masnog tkiva. Kontrola (A1, B1), grupa M7 (A2, B2), grupa M15 (A3, B3), grupa M21 (A4, B4). l, lipidna tela; m, mitohondrije; n, nukleusi; crna zvezdica, glER; bela zvezdica, izduzene peroksizomalne strukture; glava strelice, peroksizomi imunopozitivni na CAT; bela strelica, nukleusi imunopozitivni na CAT. Konfokalna mikroskopija: lokalizacija CAT – zeleno, kontrastno bojenje nukleusa Sytox orange – plavo; bar 5 μm . Transmisiona elektronska mikroskopija: veličina partikula zlata 10 nm; bar 1 μm .

4.17.4 Imunofluorescentna i imunogold lokalizacija GSH-Px

Analiza rezultata imunofluorescentnog obeležavanja GSH-Px pokazuje da je intenzitet imunofluorescence u kontrolnoj grupi veoma slab (Slika 24, A1). Broj imunopozitivnih ćelija je mali a stepen imunopozitivnosti je veoma nizak. Samo jednu ćeliju na preseku odlikuje srednji stepen imunopozitivnosti na ovaj enzim. Na nivou ćelije, imunopozitivna reakcija je zapažena u citoplazmi. U grupi M7 intenzitet imunofluorescence je slab kao i u kontrolnoj grupi (Slika 24, A2). Broj imunopozitivnih ćelija je veći u poređenju sa kontrolnom grupom, ali je stepen imunopozitivnosti nizak. Na nivou ćelije, imunopozitivna reakcija je uočena u citoplazmi, mitohondrijama, oko lipidnih tela i pojedinih nukleusa. U grupi M15 intenzitet imunofluorescence je i dalje slab, ali je jači nego u kontroli i u grupi M7 (Slika 24, A3). Broj imunopozitivnih ćelija raste, kao i broj ćelija koje odlikuje srednji stepen imunopozitivnosti na ovaj enzim. Na nivou ćelije, imunopozitivna reakcija je uočena u citoplazmi, mitohondrijama i oko lipidnih tela, dok se perinukleusna imunopozitivnost primećena u grupi M7 u ovoj grupi relokalizuje u nukleus. U grupi M21 intenzitet imunofluorescence je slab, ali je u poređenju sa kontrolom i ostalim hipotiroidnim grupama u ovoj grupi najjači (Slika 24, A4). Stepenn imunopozitivnosti je nizak iako je broj imunopozitivnih ćelija veliki, kao i broj ćelija koje odlikuje srednji stepen imunopozitivnosti. Imunopozitivna reakcija je lokalizovana u citoplazmi, mitohondrijama, oko lipidnih tela, oko nukleusa i u njima.

Imunogold obeležavanjem GSH-Px pokušali smo da ispitamo njegovu (re)lokalizaciju u mrkim adipocitima u uslovima hipotiroidizma. Naši rezultati su pokazali da je intenzitet imunopozitivnosti u kontroli veoma nizak (Slika 24, B1). Imunopozitivna reakcija se javlja u citoplazmi, mitohondrijama (spoljašnja, unutrašnja membrana i matriks), pojedinim peroksizomima, na lipidnim telima i u nukleusima u regionu euhromatina. Grupu M7 karakteriše nizak intenzitet imunopozitivnosti (Slika 24, B2). Imunopozitivna reakcija javlja se u citoplazmi, mitohondrijama (spoljašnja, unutrašnja membrana i matriks), pojedinim peroksizomima, nukleusima i na lipidnim telima. U grupi M15 intenzitet imunopozitivnosti na GSH-Px je viši, kako u odnosu na kontrolu tako i u odnosu na grupu M7 (Slika 24, B3). Imunopozitivna reakcija se javlja u citoplazmi, mitohondrijama (spoljašnja i unutrašnja membrana), pojedinim peroksizomima, nukleusima i na lipidnim telima. U grupi M21 intenzitet imunopozitivnosti na GSH-Px je nizak kao u kontroli (Slika 24, B4). Imunopozitivna reakcija lokalizovana je u citoplazmi, mitohondrijama (spoljašnja, unutrašnja membrana i matriks), pojedinim peroksizomima, nukleusima, na lipidnim telima i oko njih.

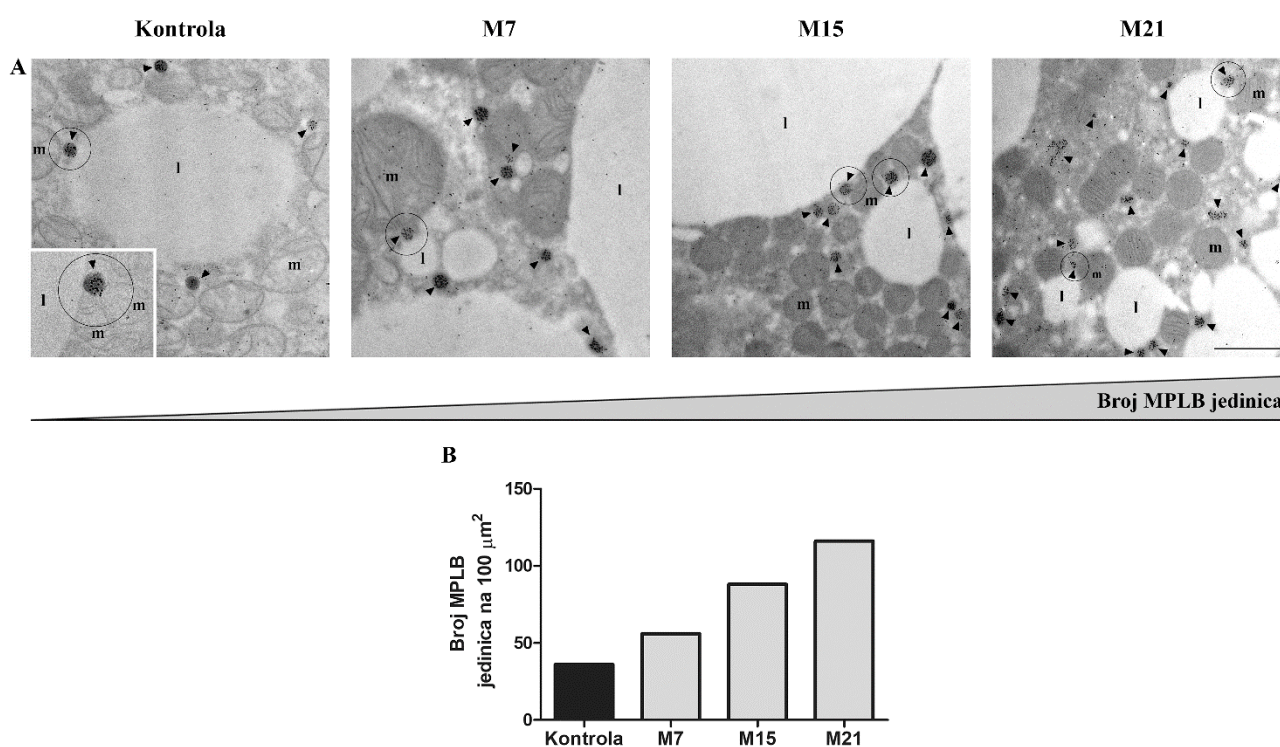
Intenzitet imunopozitivnosti na GSH-Px se u poređenju sa kontrolom ne menja u grupama M7 i M21, dok u grupi M15 blago raste. Veoma je zanimljiva lokalizacija ovog enzima oko lipidnih tela koja se javlja od petnaestog dana i zahteva dodatna istraživanja.



Slika 24. Imunofluorescentno (A) i imunogold (B) obeležavanje GSH-Px na presecima mrkog masnog tkiva. Kontrola (A1, B1), grupa M7 (A2, B2), grupa M15 (A3, B3), grupa M21 (A4, B4). l, lipidna tela; m, mitohondrije; n, nukleusi; glava strelice, peroksizomi imunopozitivni na GSH-Px. Konfokalna mikroskopija: lokalizacija GSH-Px – zeleno, kontrastno bojenje nukleusa Sytox orange – plavo; bar 5 μm . Transmisiona elektronska mikroskopija: veličina partikula zlata 10 nm; bar 1 μm .

4.18 Analiza strukturne asocijacije peroksizoma sa mitohondrijama i lipidnim telima – uspostavljanje MPLB jedinica

Pažljivom analizom lokalizacije peroksizoma u mrkim adipocitima uočili smo njihovu blisku strukturnu asocijaciju sa mitohondrijama i lipidnim telima istovremeno. Ovaj tip udruživanja mitohondrija, peroksizoma i lipidnih tela nazvali smo MPLB (*eng.* mitochondria-peroxisome-lipid body) jedinice (Slika 25). MPLB jedinice su prisutne u kontrolnoj i u svim hipotiroidnim grupama, ali hipotiroidizam povećava njihov broj za 1.55, 2.44, i 3.22 puta nakon 7, 15, i 21 dana tretmana metimazolom.

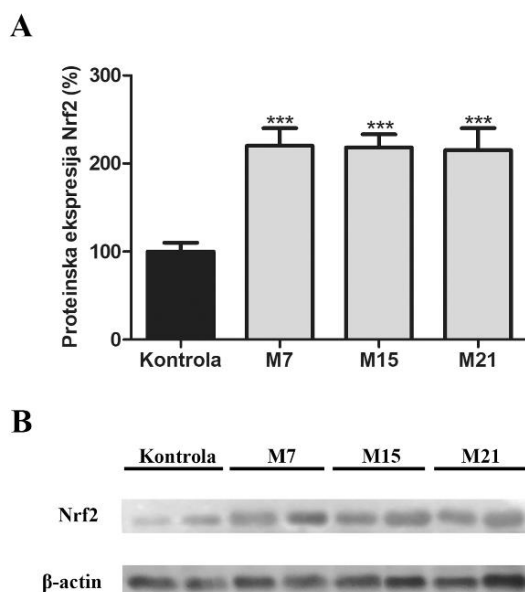


Slika 25. Bliska strukturna asocijacija mitohondrija, peroksizoma i lipidnih tela – MPLB jedinice u mrkim adipocitima kontrolne i u hipotiroidnim grupama M7, M15 i M21. MPLB jedinice su na elektron mikrografijama označene crnim krugovima (A), a njihov broj predstavljen je kao relativan u odnosu na 100 μm^2 površine ćelija (B). Imunogold obeležavanje CAT. l, lipidna tela; m, mitohondrije; n, nukleus; glava strelice, peroksizomi. Veličina partikula zlata 10 nm; bar 1 μm .

4.19 Analiza transkripcione regulacije enzima antioksidativne odbrane

4.18.1 Western blot analiza Nrf2

Analiza proteinske ekspresije Nrf2, glavnog transkripcionog faktora koji reguliše ekspresiju gena za enzime antioksidativne odbrane, pokazuje da je ekspresija Nrf2 u odnosu na kontrolu značajno povišena već sedmog dana (M7) i da ostaje povišena do kraja tretmana (M21) (Slika 26).



Slika 26. Promena proteinske ekspresije Nrf2 (A), slike reprezentativnih traka iz tri nezavisna eksperimenta (B). Vrednosti ekspresije proteina su izražene u procentima. * poređenje sa kontrolnom grupom; *** $p < 0.001$.

4.18.2 Imunohistohemijska, imunofluorescentna i imunogold lokalizacija Nrf2

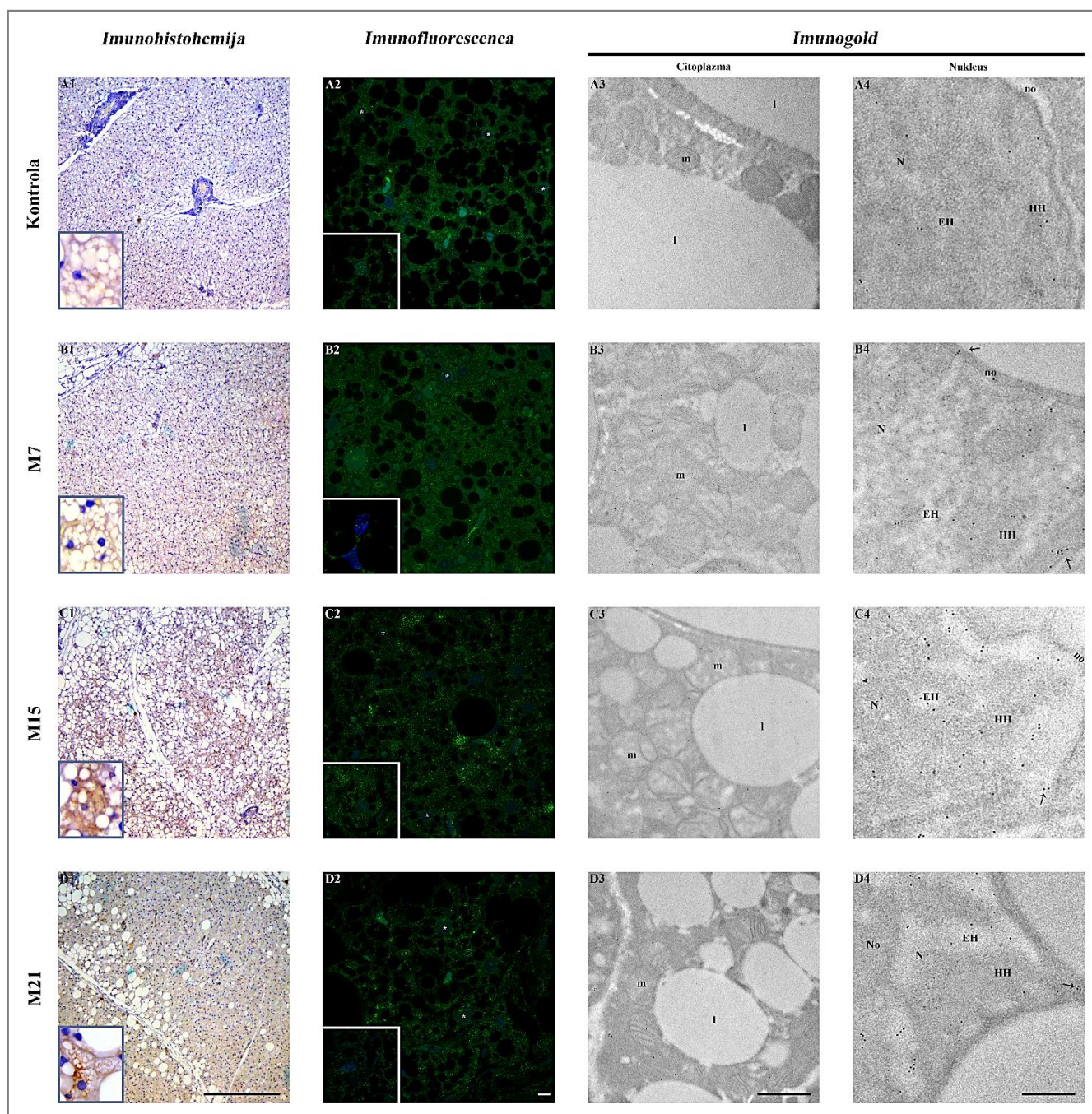
Analiza rezultata imunohistohemijskog obeležavanja Nrf2 pokazuje da je u kontroli intenzitet imunopozitivnosti slab (Slika 27, A1) i da je relativno mali broj ćelija imunopozitivan na Nrf2. Takođe se uočavaju i mrki adipociti koji nisu Nrf2 imunopozitivni. Imunopozitivna reakcija se uočava u citoplazmi i u mitohondrijama, dok u nukleusima odsustvuje (Slika 27, A1 – insert). U grupi M7 (Slika 27, B1) intenzitet imunopozitivnosti je jači nego u kontroli i broj imunopozitivnih ćelija je veći. Imunopozitivna reakcija se uočava u citoplazmi i u mitohondrijama, kao i u pojedinim nukleusima (Slika 27, B1 – insert). U grupi M15 (Slika 27, C1) intenzitet imunopozitivnosti je izuzetno jak. Skoro svi mrki adipociti na preseku su imunopozitivni na Nrf2. Jaka imunopozitivna reakcija u vidu smeđih granula je primećena u mitohondrijama, citoplazmi i većem broju nukleusa (Slika 27, C1 – insert). U grupi M21 (Slika 27, D1) intenzitet imunopozitivnosti je nešto slabiji u poređenju sa grupom M15, ali su i u ovoj grupi svi mrki adipociti na preseku imunopozitivni na Nrf2. Imunopozitivna reakcija se uočava u citoplazmi, mitohondrijama i ponekom nukleusu (Slika 27, D1 – insert).

Analiza rezultata imunofluorescentnog obeležavanja Nrf2 pokazuje da je intenzitet imunofluorescence u kontroli veoma slab. Step en imunopozitivnosti je nizak a veoma slaba imunopozitivna reakcija javlja se u citoplazmi i sporadično u ponekom nukleusu (Slika 27, A2).

Međutim, kod malog broja nukleusa zapažena je izrazita perinukleusna lokalizacija Nrf2 (Slika 27, A2 – zvezdice). U grupi M7 intenzitet imunofluorescence je slab i stepen imunopozitivnosti je nizak kao u kontrolnoj grupi (Slika 27, B2). Primećen je veći broj imunopozitivnih ćelija u poređenju sa kontrolnom grupom. Imunopozitivna reakcija uočena je u citoplazmi i pojedinim nukleusima, ali i u perinukleusnom regionu. Intenzitet imunofluorescence u grupi M15 blago raste u poređenju sa kontrolom i sa grupom M7 ali je i dalje slab (Slika 27, C2). Stepen imunopozitivnosti je nizak iako broj imunopozitivnih ćelija raste. Imunopozitivna reakcija uočena je u citoplazmi, oko lipidnih tela i u ponekom nukleusu. U grupi M21 intenzitet imunofluorescence blago raste u poređenju sa kontrolom, ali blago opada u poređenju sa grupom M15 (Slika 27, D2). Stepen imunopozitivnosti je nizak dok je broj ćelija imunopozitivnih na Nrf2 u ovoj grupi najveći. Imunopozitivna reakcija uočena je u citoplazmi, oko lipidnih tela i u većem broju nukleusa.

Obeležavanje Nrf2 imunogoldom omogućilo nam je da na nivou ultrastrukture utvrdimo tačnu lokalizaciju ovog transkripcionog faktora. Naši rezultati pokazali su da je intenzitet imunopozitivnosti u kontrolnoj grupi veoma slab (Slika 27, A3 i 4). Imunopozitivna reakcija uočena je u nukleusima (Slika 27, A4) kako u domenu euhromatina, tako i u domenu heterohromatina, kao i na kristama pojedinih mitohondrija (Slika 27, A3). U grupi M7 intenzitet imunopozitivnosti je jači u odnosu na kontrolu (Slika 27, B3 i 4). Imunopozitivna reakcija uočena je u nukleusima (Slika 27, B4), pretežno u domenu heterohromatina ali i u oblasti kompleksa nukleusne pore (Slika 27, B4 – strelice) i regionu nukleusnog ovoja. Pored toga, imunopozitivna reakcija zapažena je u mitohondrijama (na spoljašnjoj membrani i na kristama), i to u većem broju mitohondrija nego što je u kontroli (Slika 27, B3). U grupi M15 intenzitet imunopozitivnosti je jači i u odnosu na kontrolu, ali i u odnosu na grupu M7 (Slika 27, C3 i 4). Imunopozitivna reakcija uočena je prevashodno u nukleusima (Slika 27, C4) gde je dominantna u domenu heterohromatina, a zapaža se i u oblasti kompleksa nukleusne pore (Slika 27, C4 – strelica). Takođe, imunopozitivna reakcija zapažena je u pojedinim mitohondrijama (Slika 27, C3). U grupi M21 intenzitet imunopozitivnosti raste i u odnosu na kontrolu ali je malo slabiji u odnosu na grupu M15 (Slika 27, D3 i 4). Jaka imunopozitivna reakcija uočena je u nukleusima mrkih adipocita (Slika 27, D4) gde je, kao i u ostalim hipotiroidnim grupama dominantna u domenu heterohromatina. I u ovoj grupi, imunopozitivna reakcija je uočena u oblasti kompleksa nukleusne pore (Slika 27, D4 – strelica) i u pojedinim mitohondrijama (Slika 27, D3).

Intenzitet imunopozitivnosti na Nrf2 poredeći tri metoda obeležavanja najjači je u grupi M15. Na nivou tkiva broj imunopozitivnih ćelija raste sa dužinom tretmana. Na nivou ćelija dominantne su citoplazmatska i mitohondrijska lokalizacija Nrf2, a na ultrastrukturnom nivou dominira nukleusna lokalizacija ovog transkripcionog faktora.



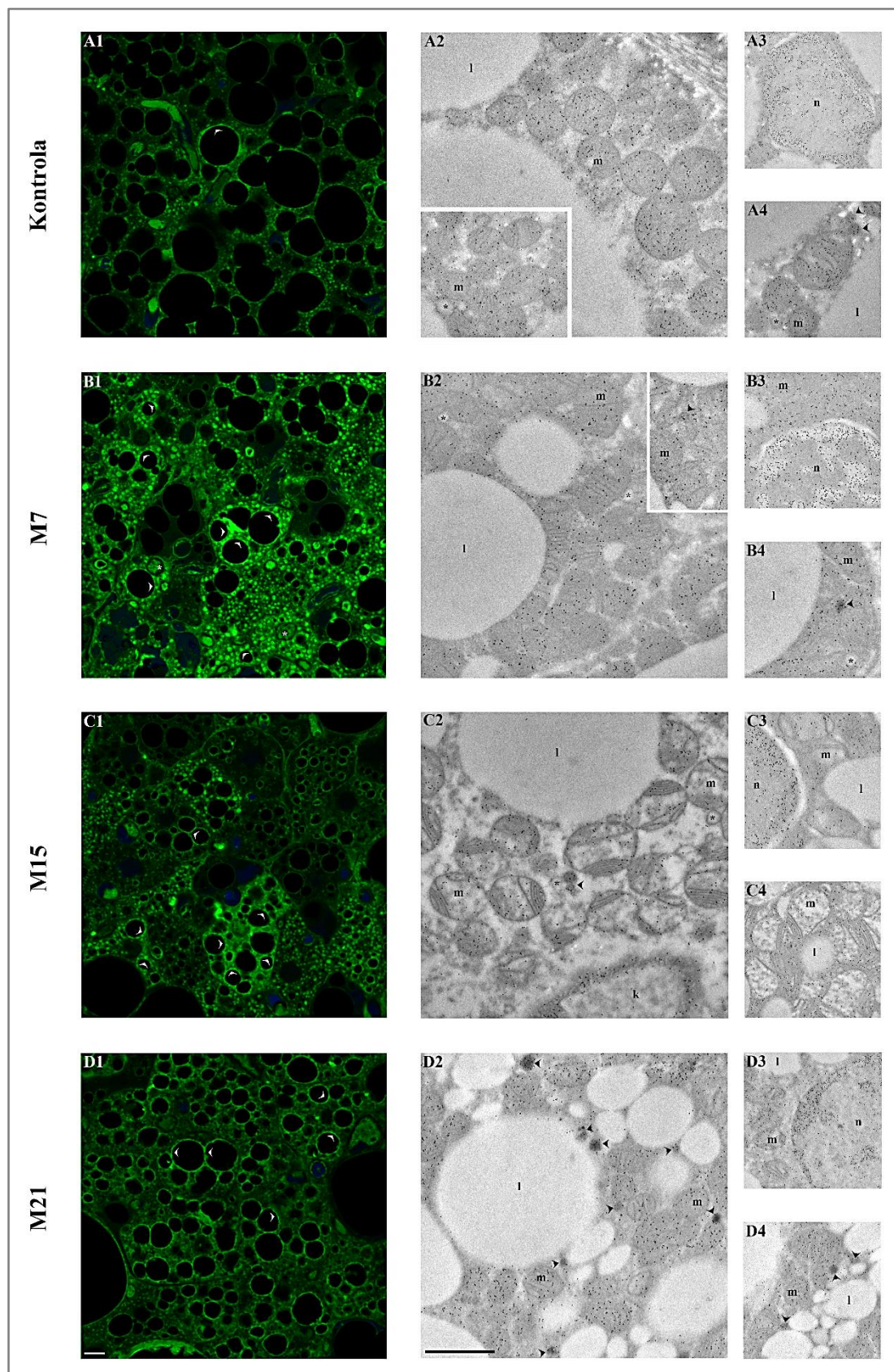
Slika 27. Imunohistohemijsko (A1-D1), imunofluorescentno (A2-D2) i imunogold (A3-D3, A4-D4) obeležavanje Nrf2 na presecima mrkog masnog tkiva. Kontrola (A1-4), grupa M7 (B1-4), grupa M15 (C1-4), grupa M21 (D1-4). l, lipidna tela; m, mitohondrije; N, nukleus; No, nukleolus; EH, euhromatin; HH, heterohromatin; bela zvezdica, imunopozitivni nukleusi (konfokalna mikroskopija); strelice, kompleks nukleusne pore (TEM). Imunohistohemija: bar 200 μm . Konfokalna mikroskopija: lokalizacija Nrf2 – zeleno, kontrastno bojenje nukleusa Sytox orange – plavo; bar 5 μm . Transmisiona elektronska mikroskopija: veličina partikula zlata 10 nm; bar 1 μm .

4.18.2 Imunofluorescentna i imunogold lokalizacija 4-HNE

Analiza rezultata imunofluorescentnog obeležavanja 4-HNE modifikovanih proteina pokazuje da je intenzitet imunofluorescence u kontroli veoma slab (Slika 28, A1). Uočava se jako mali broj ćelija sa srednjim stepenom imunopozitivnosti. Imunopozitivna reakcija javlja se u citoplazmi, u mitohondrijama, oko lipidnih tela (glava strelice), u pojedinim nukleusima (zvezdice) ili perinukleusno. U grupi M7 intenzitet imunopozitivnosti je izuzetno jak (Slika 28, B1). Uočava se veliki broj ćelija koje odlikuje visok stepen imunopozitivnosti. Imunopozitivna reakcija javlja se u citoplazmi, mitohondrijama, u mnogobrojnim nukleusima i oko lipidnih tela. U grupi M15 intenzitet imunopozitivnosti je slabiji u odnosu na grupu M7, ali jači u poređenju sa kontrolnom grupom (Slika 28, C1). Ukupan broj imunopozitivnih ćelija na preseku tkiva je manji a samo mali broj ćelija odlikuje visok stepen imunopozitivnosti. Imunopozitivna reakcija javlja se u citoplazmi, mitohondrijama, nukleusima i oko lipidnih tela. U grupi M21 intenzitet imunopozitivnosti je veoma slab, sličan kao u kontrolnoj grupi (Slika 28, D1). Uočava se mali broj ćelija sa srednjim stepenom imunopozitivnosti. Imunopozitivna reakcija javlja se u citoplazmi, oko lipidnih tela, u pojedinim nukleusima ili perinukleusno.

Metodom imunogold obeležavanja 4-HNE želeli smo da preciznije istražimo njegovu lokalizaciju na ultrastrukturnom nivou. Naši rezultati pokazali su da je intenzitet imunopozitivnosti u kontroli visok (Slika 28, A2-4). Imunopozitivna reakcija javlja se prevashodno u mitohondrijama (na kristama), u pojedinim peroksizomima (na membrani) (Slika 28, A4), ponegde u citoplazmi i u nukleusima, pretežno u regionu euhromatina (Slika 28, A3). Euhromatin je u nukleusima mrkih adipocita u kontrolnoj grupi pozicioniran periferno dok heterohromatin zauzima centralno mesto. U grupi M7 intenzitet imunopozitivnosti je takođe visok (Slika 28, B2-4). Imunopozitivna reakcija javlja se u mitohondrijama (na kristama), u peroksizomima (pretežno u matriksu) (Slika 28, B4), ponegde u citoplazmi, i u nukleusima, kako u regionu euhromatina, tako i u regionu heterohromatina (Slika 28, B3). Takođe, imunopozitivna reakcija se uočava u nukleusima i u citoplazmi endotelskih ćelija, kao i u eritrocitima. U ovoj grupi, u pojedinim ćelijama, mitohondrije su jako gusto pakovane tako da izgleda kao da je intenzitet reakcije jači nego u kontroli. U grupi M15 intenzitet imunopozitivnosti je takođe visok kao u kontrolnoj i grupi M7 (Slika 28, C2-4). Imunopozitivna reakcija javlja se u mitohondrijama sa vrlo specifičnim i pravilnim rasporedom partikula zlata na kristama. U ovoj grupi je uočena i veoma jaka reakcija na spoljašnjoj membrani mitohondrija (Slika 28, C2 i 4). Imunopozitivna reakcija se još javlja i u peroksizomima (pretežno u matriksu) (Slika 28, C2), oko pojedinih lipidnih tela, ponegde u citoplazmi i u nukleusima (kako u regionu euhromatina, tako i u regionu heterohromatina) (Slika 28, C3). U grupi M21 intenzitet imunopozitivnosti je visok kao u kontroli i u ostalim hipotiroidnim grupama (Slika 28, D2-4). Imunopozitivna reakcija javlja se u mitohondrijama, na kristama i na spoljašnjoj membrani (Slika 28, D2 i 4). Veoma jaka reakcija je uočena u matriksu peroksizoma, koji su u ovoj grupi izuzetno brojni (Slika 28, D2 i 4). Imunopozitivna reakcija se javlja ponegde u citoplazmi i u nukleusima (uglavnom u regionu heterohromatina koji je u ovoj grupi periferno pozicioniran) (Slika 28, D3).

Intenzitet imunopozitivnosti na 4-HNE se ne menja u hipotiroidnim grupama u poređenju sa kontrolom, ali je izuzetno visok u svim grupama. U kontroli imunopozitivna reakcija se lokalizuje na kristama mitohondrija, na membrani peroksizoma kao i u periferno pozicioniranom euhromatinu nukleusa. Takav obrazac ekspresije uočava se i sedmog dana sa razlikom u peroksizomalnoj lokalizaciji – matriks je pozitivniji od membrane. Od petnaestog dana do kraja tretmana, veoma jaka reakcija uočava se i na spoljašnjoj membrani mitohondrija, kao i u heterohromatinu koji je sada dominantno na periferiji nukleusa mrkih adipocita.



Slika 28. Imunofluorescentno (A1-D1) i imunogold (A2-D2, A4-D4) obeležavanje 4-HNE na presecima mrkog masnog tkiva. Kontrola (A1-4), grupa M7 (B1-4), grupa M15 (C1-4), grupa M21 (D1-4). l, lipidna tela; m, mitohondrije; n, nukleusi; crna glava strelice, peroksizomi; crna zvezdica, cisterne gIER; bela glava strelice, perilipidna lokalizacija imunopozitivne reakcije; bela zvezdica, imunopozitivni nukleusi. Konfokalna mikroskopija: lokalizacija 4-HNE modifikovanih proteina – zeleno, kontrastno bojenje nukleusa Sytox orange – plavo; bar 5 μ m. Transmisiona elektronska mikroskopija: veličina partikula zlata 10 nm, bar 1 μ m.

5. DISKUSIJA

5.1 Hipotiroidizmom indukovane promene na nivou organizma

Tiroidni hormoni imaju veoma važnu ulogu u svim glavnim aspektima funkcije BAT uključujući regulaciju genske ekspresije, dostupnost nutrijenata, lipogenezu, lipolizu, termogenezu, biogenezu mitohondrija i peroksizoma, kao i antioksidativnu odbranu (Mory i sar., 1981; Rubio i sar., 1995; Silva 1995; Bianco i McAninch 2013). Zato je analiza nivoa tiroidnih hormona u uslovima hipotiroidizma od izuzetnog značaja za dalje istraživanje promena u BAT. Naši rezultati potvrđuju da metimazol, u dozi od 0,04%, indukuje hipotiroidizam kod pacova u periodu od dvadeset jednog dana. Zapravo, promene nivoa tiroidnih hormona i TSH javljaju se već nakon sedam dana, što znači da se blokiranje biosinteze tiroidnih hormona (jodiranje tiroglobulina) metimazolom dešava ubrzo nakon početka tretmana. Nivoi T3 i T4 u plazmi zadržani su na niskom nivou do kraja tretmana. To sistemsko sniženje koncentracije tiroidnih hormona se najverovatnije ne odražava na BAT obzirom na nepromenjenu ekspresiju lokalne dejodinaze DIO2 koja tkivu obezbeđuje minimalan nivo T3 kao biološki aktivne forme hormona. Izuzetno je važna činjenica da je nivo TSH u izrazitom porastu sa dužinom tretmana, što nam pokazuje da je funkcija štitaste žlezde zaista suprimirana tretmanom a da hipofiza pokušava da stimuliše njen rad i na taj način kompenzuje smanjenu koncentraciju tiroidnih hormona.

Kod ljudi, hipotiroidizam se vezuje za usporavanje stope metabolizma, povećano deponovanje energije unete hranom, povećan indeks telesne mase i razvoj gojaznosti (Wagh i sar., 2020). Međutim, pokazano je da hipotiroidizam ostvaruje suprotne efekte po telesnu masu kod ljudi i eksperimentalnih životinja, pa čak i između različitih modela u zavisnosti od pola, načina indukcije hipotiroidizma, doze i dužine tretmana. Kod ljudi hipotiroidizam uglavnom dovodi do porasta telesne mase i gojaznosti (Mullur i sar., 2014; Aiceles i Da Fonte Ramos, 2016) dok kod pacova, kako je ponazano u nekim studijama, nema uticaja ili čak dovodi do pada telesne mase (Abelenda i Puerta 1990; Curcio i sar., 1999; Čakić-Milošević i sar., 2004). Pretpostavlja se da je razlog pada telesne mase kod hipotiroidnih pacova termogena aktivacija mrkog masnog tkiva usled koje dolazi do povećane potrošnje energije uskladištene u obliku lipida i njenog oslobađanja u vidu toplote. Naši rezultati govore u prilog ovoj pretpostavci, pokazujući pad relativnog prinosa telesne mase kod hipotiroidnih životinja sa dužinom tretmana. Na osnovu toga možemo da zaključimo da hipotiroidizam deluje stimulatивно na porast termogene aktivnosti BAT kod pacova.

Poznato je da tiroidni hormoni regulišu procese esencijalne za normalan rast i razvoj (Mullur i sar., 2014), ali takođe učestvuju u regulaciji metabolizma lipida, ugljenih hidrata, proteina, elektrolita i minerala (Yao i sar., 2014). S tim u vezi, njihov nedostatak ili snižena koncentracija dovode do poremećaja homeostaze i promena, pre svega, u metabolizmu lipida, i to najčešće na nivou jetre kao centralnog mesta njihove sinteze i razgradnje. Naši rezultati analize biohemijskih parametara pokazuju da hipotiroidizam dovodi do promene u metabolizmu lipida, ugljenih hidrata, proteina i minerala u plazmi pacova. Nivoi ukupnog i LDL holesterola u plazmi pacova rastu u hipotiroidizmu uz nepromenjeni nivo HDL holesterola, dok nivo triglicerida opada u M15 i M21 grupi. Literaturno je pokazano da su nivoi ukupnog i LDL holesterola i apolipoproteina B viši u serumu pacijenata sa hipotiroidizmom, kao i u plazmi hipotiroidnih pacova (Müller i Seitz 1984; Scarabottolo i sar., 1986; Pearce 2012). Takođe je pokazano i da je ekspresija receptora za LDL na membrani hepatocita snižena kod hipotiroidnih pacova (Scarabottolo i sar., 1986) što za rezultat ima pad stope katabolizma LDL i porast ukupnog i LDL holesterola u cirkulaciji (Duntas, 2002). Hiperlipidemija, u prvom redu

hiperholesterolemija pokazana je u hipotiroidizmu pre više od devedeset godina (Mason i sar., 1930) i od tada je veza između tiroidne disfunkcije i poremećaja lipidnog statusa dobro utvrđena, čemu doprinose daju i naši rezultati. Pad nivoa triglicerida u serumu može biti i rezultat njegovog povećanog usvajanja iz cirkulacije. Nešto slično pokazano je na skeletnim mišićima hipotiroidnih pacova kod kojih je zapažena povećana aktivnost lipoprotein lipaze, a samim tim i lipoliza, kao i povećano usvajanje triglicerida (Kaciuba-Uscilko i sar., 1980).

Kada je u pitanju metabolizam ugljenih hidrata, pokazano je da hipotiroidizam najveće promene takođe ispoljava u jetri, uzrokujući smanjenje stope glukoneogeneze, deponovanja/oslobađanja glukoze što dovodi do hipoglikemije, ali i povećane sinteze glikogena u različitim animalnim modelima (Yao i sar., 2014; Martinez i Ortiz 2017). Dodatno je pokazano da su kod hipotiroidnih pacova smanjeni ukupan promet glukoze i stopa iskorišćavanja glukoze u skeletnim mišićima i masnom tkivu (Cettour-Rose i sar., 2005). Naši rezultati pokazuju pad nivoa glukoze u plazmi pacova u grupi M15 i M21, što ukazuje na povećano usvajanje i deponovanje glukoze u hipotiroidizmu.

Naši rezultati takođe pokazuju da hipotiroidizam ne utiče na nivo laktata i kreatinina u plazmi pacova, ali dovodi do povišenja nivoa uree u plazmi u M15 i M21 hipotiroidnoj grupi. Time su naši rezultati u saglasnosti sa literaturnim podacima koji pokazuju da hipotiroidizam dovodi do povećanja nivoa uree u serumu pacova, ali i u serumu pacijenata sa hipotiroidizmom (Marti i sar., 1988; Sidhu i sar., 2016). To ukazuje na povećan katabolizam proteina i izmenjen matabolizam azota uzrokovan sniženom koncentracijom tiroidinih hormona. Pored toga, naši rezultati pokazuju da hipotiroidizam dovodi do smanjenja nivoa kalcijuma u plazmi pacova u M15 i M21 hipotiroidnoj grupi, što je takođe u saglasnosti sa literaturnim podacima dobijenim u različitim humanim i animalnim studijama da je hipokalcemija verni pratilac hipotiroidizma (Baltaci i sar., 2013; Sridevi i sar., 2016). Razlog tome je što u fiziološkim uslovima tiroidni hormoni, pre svega T4, regulišu ekspresiju gena koji kodiraju Ca^{2+} ATPazu i Na^{+}/Ca^{2+} izmenjivače sarkoplazminog retikuluma (Hudecova i sar., 2004), čime indirektno regulišu i oslobađanje kalcijuma iz ćelija u cirkulaciju (Murgod i Soans, 2012; Sridevi i sar., 2016). Stoga je sasvim razumljivo da snižena koncentracija T4 u serumu rezultira padom nivoa kalcijuma. Ne treba zaboraviti ni međuodnos štitaste i paraštitaste žlezde u održavanju koncentracije jona kalcijuma u krvi koji takođe može da doprinosi opisanim promenama u hipotiroidizmu.

5.2 Promene na nivou tkiva, ćelija i organela indukovane hipotiroidizmom

Naši rezultati su pokazali da hipotiroidizam, iako dovodi do smanjenja relativnog prinosa telesne mase, ne utiče na promenu relativne mase mrkog masnog tkiva pacova. Literaturni podaci pokazuju da hipotiroidizam, indukovan na različite načine, ostvaruje različite efekte po masu mrkog masnog tkiva u različitim eksperimentalnim modelima (Mory i sar., 1981; Čakić-Milošević i sar., 2004; Weiner i sar., 2016). Međutim, Abelenda i Puerta (1990) su pokazali da hipotiroidizam indukovan metimazolom u dozi od 0,04% nema efekat na masu mrkog masnog tkiva pacova, što govore i naši rezultati.

Analiza mrkog masnog tkiva na nivou ultrastrukture pokazuje da se na presecima tkiva mogu razlikovati tri tipa mrkih adipocita klasifikovanih prema vrsti, broju, veličini i organizaciji organela u citoplazmi. Ta heterogenost mrkih adipocita raste sa dužinom tretmana što može ukazati na izrazitu metaboličku heterogenost ćelija u okviru mrkog masnog tkiva. Zatim, na elektron mikrofografijama, jasno se uočava i smanjenje veličine mrkih adipocita sa dužinom tretmana što je potvrđeno rezultatima morfometrijske analize koji pokazuju pad površine mrkih adipocita. Pad veličine ćelija verovatno je kompenzovan porastom njihovog broja po jedinici površine tkiva, što se takođe vidi na elektron mikrofografijama (Slika 1), a koji je dodatno podržan odsustvom promena u relativnoj masi mrkog masnog tkiva u hipotiroidizmu.

Smanjenje površine mrkih adipocita odvija se na račun smanjenja srednjeg dijametra i volumenske gustine lipidnih tela a povećanja njihovog relativnog broja i posledičnog povećanja volumenske gustine citoplazme sa dužinom tretmana. Ovakvo usitnjavanje lipidnih tela, kao organela koje zauzimaju najveći volumen u ćelijama, ukazuje na intenzivnu lipolizu indukovanu hipotiroidizmom. Intenzivnom lipolizom obezbeđuju se masne kiseline kao glavni supstrat oksidativnih procesa sadržanih u osnovi produkcije toplote, a u odgovoru mrkog masnog tkiva na izlaganje hladnoći ili povećan unos hrane (Souza i sar., 2007).

Intenzivna lipoliza je, pored smanjenog prinosa telesne mase, još jedan pokazatelj termogene aktivacije mrkog masnog tkiva hipotiroidizmom. U prilog ovome idu i rezultati morfometrijske i stereološke analize mitohondrija koji pokazuju porast i broja i volumenske gustine mitohondrija u hipotiroidizmu što posledično dovodi do pada vrednosti srednjeg dijametra mitohondrija nakon sedmog dana tretmana. Broj mitohondrija nastavlja da raste do kraja tretmana. Takođe, relativna površina mitohondrija se menja u skladu sa srednjim vrednostima dijametra mitohondrija. Porast broja, uz pad vrednosti srednjeg dijametra mitohondrija, ukazuje na biogenezu mitohondrija koja prati program termogene aktivacije mrkog masnog tkiva i povećanje β -oksidacije masnih kiselina nastalih intenzivnom lipolizom. Naši rezultati su u skladu sa literaturnim podacima koji pokazuju da je dinamika mitohondrija posebno važna u mrkom masnom tkivu gde produkcija toplote kao esencijalna fiziološka funkcija koja održava telesnu temperaturu i rasipanje viška energije kao kontrola gojaznosti, zavisi od mitohondrijske aktivnosti (Cannon i Nedergaard 2004). Pored toga, Wikstrom i sar. (2014) su pokazali da mitohondrije mrkog masnog tkiva od izduženih i tubularnih, kakve su kod miševa gajenih u termoneutralnim uslovima, nakon samo 4 sata izlaganja hladnoći postaju okrugle i krupne, što je u skladu sa njihovom deobom i prosvetljivanjem. Međutim, literaturni podaci vezani za broj mitohondrija i termogenu aktivaciju mrkog masnog tkiva u uslovima hipotiroidizma su u suprotnosti sa rezultatima koje smo mi dobili. Naime, Lombardi i sar. (2015) su pokazali da su u mrkom masnom tkivu hipotiroidnih pacova maksimalni oksidativni kapacitet i stopa mitohondrijske termogeneze redukovani usled pada broja mitohondrija i stope respiracije izražene kroz redukovani proteinski sadržaj mitohondrija, aktivnost citrat sintaze, sadržaj VDAC1, imunohistohemijske detekcije COX IV, imunopozitivnosti i proteinskog sadržaja UCP1 (Lombardi i sar., 2015). Razlog za ostvarivanje ovako kontradiktornih rezultata može biti odabir načina indukcije hipotiroidizma, jer su Lombardi i sar. (2015) imali agresivniji pristup u tretmanu indukujući i sistemski i lokalni hipotiroidizam, dok smo mi primenili manje invazivan metod za indukciju sistemskog hipotiroidizma.

Porast broja mitohondrija je praćen porastom broja lizozoma, koji su najbrojniji petnaestog dana tretmana. S obzirom na to da je jedna od uloga lizozoma uklanjanje ostarelih i oštećenih organela i njihovo recikliranje (Ballabio, 2016; Killackey i sar., 2020), naši rezultati ukazuju na učešće lizozoma u selektivnom uklanjanju oštećenih mitohondrija primećenih u ćelijama sedmog i petnaestog dana tretmana. Porast broja mitohondrija je verovatno spregnut sa njihovom degradacijom u ćeliji u cilju održanja ravnoteže između mitohondriogeneze i mitofagije, čime se obezbeđuje konstantnost mitohondrijske mase u ćelijama (Carelli i sar., 2015). Konstantnost mitohondrijske mase u mrkim adipocitima je od izuzetnog značaja jer su mitohondrije nosioci procesa termogeneze, a samim tim je i održanje stalne telesne temperature kod malih endotermnih organizama njihova glavna uloga. Pored toga, lokalizacija lizozoma uz mitohondrije takođe može ukazati na metabolički *crosstalk* između ove dve organele, što se pre svega odnosi na razmenu metabolita poput aminokiselina, lipida i jona kalcijuma (Todkar i sar., 2017). Takođe je pokazano da se vezikulama koje nastaju od mitohondrija (MDV) mogu transportovati stari i oštećeni mitohondrijski proteini do endolizozomskog sistema, gde bivaju razgrađeni ili sekretovani van ćelije u vidu egzozoma (Soto-Herederó i sar., 2017). Na taj način, vezikularni transport između mitohondrija i lizozoma

preko MDV predstavlja mehanizam kontrole kvaliteta mitohondrija u ćelijama sisara (Soubannier i sar., 2012; McLelland i sar., 2014; Sugiura i sar., 2014).

5.3 Hipotiroidizam indukuje proliferaciju peroksizoma u mrkim adipocitima

Iako su peroksizomi prepoznati kao važni partneri mitohondrija u procesu oksidacije masnih kiselina u mrkim adipocitima, još uvek nema podataka o njihovom nastanku i putevima biogeneze u ovim ćelijama. Naši rezultati su pokazali da, uz biogenezu mitohondrija, a kao podršku intenzivnoj β -oksidaciji masnih kiselina, hipotiroidizam u mrkim adipocitima indukuje i biogenezu peroksizoma. Porast relativnog broja peroksizoma, koji se ogleda i u porastu njihove volumenske gustine već od sedmog dana tretmana do njegovog kraja, nesumnjivo ukazuju na indukovanu proliferaciju ovih organela. Peroksizomi su najbrojniji uz lipidna tela, a zatim uz mitohondrije što ukazuje na njihovu blisku saradnju u cilju povećanja termogenog kapaciteta mrkog masnog tkiva kao odgovora na sniženu koncentraciju tiroidnih hormona.

Peroksizomi su organele karakteristične po svojoj visokoj plastičnosti koja se reflektuje sposobnošću da brzo prilagode svoj broj, oblik, veličinu i enzimski sastav metaboličkim zahtevima ćelije. Do danas, u mrkim adipocitima peroksizomi su istraživani na ultrastrukturnom nivou u samo dve studije (Ahlabo i Barnard, 1971; Pavelka i sar., 1976), i njihov nastanak i dalje nepoznanica. Naši rezultati su pokazali da hipotiroidizam indukuje proliferaciju peroksizoma stimulišći njihovu biogenezu kanonskim, ali i *de novo* putem. Ova detaljna ultrastrukturna studija otkriva po prvi put različite puteve biogeneze peroksizoma u mrkim adipocitima: 1) biogeneza od postojećih organela, rastom i deobom, 2) biogeneza od glER, pupljenjem, 3) biogeneza od glER i mitohondrija – hibridna priroda novonastalih peroksizoma, 4) biogeneza od mitohondrija, pupljenjem sa spoljašnje mitohondrijske membrane. Svaki put postoji i funkcioniše u eutiroidnoj kontroli i tokom hipotiroidizma (ali na vremenski zavisani način), odlikuje se specifičnim profilima organela i setom peroksina – proteina esencijalnih za biogenezu i funkciju peroksizoma.

5.3.1 Biogeneza peroksizoma kanonskim putem

Biogeneza peroksizoma od postojećih organela po modelu rasta i deobe je dobro istražena i prihvaćena (Lazarow i Fujiki, 1985). Naši rezultati pokazuju prisustvo ovog puta biogeneze peroksizoma u mrkim adipocitima eutiroidne kontrole koji sa dužinom tretmana postaje glavni put biogeneze sedmog, a u manjoj meri i petnaestog dana. Kanonski put biogeneze je postepen proces koji zahteva učešće specifičnih peroksizomalnih membranskih proteina. Peroksin 11 familija (Pex11) sadrži nekoliko membranskih proteina konzerviranih kod gljiva, biljaka i sisara koji kontrolišu peroksizomalnu proliferaciju i regulišu peroksizomalnu morfologiju, veličinu i broj (Li i Gould, 2002; 2003; Koch i sar., 2005; Thoms i Erdmann, 2005; Delille i sar., 2010; Koch i sar., 2010). U okviru njih Pex11 β , konsitutivno eksprimirana izoforma Pex11 je uključen u proliferaciju peroksizoma u ćelijama sisara. Pex11 β promoviše izduživanje, sužavanje i deobu, što ga čini glavnim i peroksinom posebno odgovornim za ovaj put biogeneze peroksizoma (Schrader i sar., 1998). Mi smo pokazali da je Pex11 β vodeći molekularni igrač u biogenezi peroksizoma, što se ogleda u njegovoj povišenoj proteinskoj ekspresiji već od sedmog dana tretmana. Istovremeno, sve zapažene strukture karakteristične za kanonski put biogeneze peroksizoma (peroksizomalni nosioci, strukture u obliku mašni i strukture u vidu niske bisera) su bile najbrojnije i preovlađujuće pre-peroksizomalne strukture sedmog dana tretmana, u poređenju sa petnaestim i dvadeset prvim danom. Međutim, visoka ekspresija Pex11 β do kraja tretmana ukazuje na njegovu ulogu i u nekim drugim procesima, poput peroksizomalnog sazrevanja, kako su postulirali Delille i sar. (2011).

Kako bismo potvrdili navedeno, analizirali smo još jednog važnog igrača koji je uključen u procese deobe peroksizoma – Drp1. Naime, pokazano je da je Drp1 protein neophodan za finalnu podjelu membrane peroksizoma, ali ne i za korake izduživanja i sužavanja koji joj prethode (Koch, 2004). Naši rezultati su pokazali da je proteinski nivo, ali i lokalizacija Drp1 na peroksizomima najviša sedmog dana u poređenju sa eutiroidnom kontrolom čime se deoba peroksizoma validira kao prvi korak u proliferaciji peroksizoma. Pad proteinske ekspresije Drp1 i vraćanje na kontrolni nivo je u saglasnosti sa smanjenom stopom deobe peroksizoma petnaestog, a posebno dvadeset prvog dana. Ovo dalje podržava pretpostavljenu ulogu Pex11 β u sazrevanju peroksizoma. Druge potencijalne uloge Pex11 β ne mogu biti isključene i svakako zaslužuju dalja istraživanja.

Nadalje, detaljnom analizom zapazili smo da je deoba peroksizoma asimetričan proces u kome neki proksizomi sadrže stare proteine i lipide, dok drugi sadrže nosintetisane membranske i matriksne proteine i lipide, kako su pokazali (Schrader i sar., 2016). U prilog ovom zapažanju stoji izuzetna heterogenost peroksizoma u pogledu stepena DAB obojenosti, CAT imunopozitivnosti i veličine peroksizoma u ukviru niske bisera. Naši rezultati jasno potvrđuju da je kanonski put biogeneze rani/prvi korak u proliferaciji peroksizoma u hipotiroidizmu. To se moglo i očekivati jer su u ranim fazama hipotiroidizma mrki adipociti primorani da proizvedu veliki broj novih peroksizoma u kratkom vremenskom periodu, a deoba postojećih organela je najbrži i energetski najmanje zahtevan put biogeneze.

5.3.2 *De novo* biogeneza peroksizoma

Za razliku od biogeneze peroksizoma kanonskim putem, *de novo* biogeneza je otvoreno pitanje već duže vreme, posebno u pogledu nastanka peroksizoma od ER. Naša studija je pokazala veoma česte strukturne asocijacije peroksizoma sa tubulama glER i u eutiroidnoj kontroli i u hipotiroidnim grupama, s tim da je njihov broj najveći dvadeset prvog dana tretmana. Prisustvo membranskih mostića između peroksizomalne membrane i membrane glER ukazuje na hipotiroidizmom indukovano *de novo* biogenezu peroksizoma od glER. Ranije objavljeni podaci ukazuju na moguće poreklo peroksizoma sisara od ER, pokazujući klastere peroksizoma okružene glER, koji su mestimično međusobno povezani u morfološki definisan peroksizomalni retikulum (Novikoff i Novikoff 1972). Kasnije studije su potom pokazale postojanje pre-peroksizomalnih ER domena od kojih se formiraju pre-peroksizomalne vezikule čijom fuzijom nastaju peroksizomi kompetentni za unos enzima matriksa (Titorenko i Rachubinski, 2000; Lam i sar., 2010; Agrawal i sar., 2011; Van Der Zand i sar., 2012).

Geuze i sar. (2003) su pokazali prisustvo Pex13 i PMP70 u peroksizomalnom retikulumu koji je povezan sa glER, potvrđujući time njegovu aktivnu ulogu u proliferaciji peroksizoma. Dalje studije genetike i proteomike kod kvasaca omogućile su identifikaciju više od 32 peroksina koji su uključeni u biogenezu peroksizoma (Kim i sar., 2006), od kojih je samo 17 nađeno i kod sisara. Dok su neki od ovih peroksina u ćelijama sisara uključeni u unos proteina peroksizomalne membrane (Kim i sar., 2006) i *de novo* biogenezu peroksizoma (Pex16 i Pex19), drugi su uključeni u strukturno/funkcijsko sazrevanje peroksizoma (Pex16, Pex19, PMP70, Pex5, Pex13, Pex26, Pex6). Odsustvo ili mutacija bilo kog od ovih peroksina dovodi do poremećaja biogeneze peroksizoma i njihovog nestanka.

Proces strukturno/funkcijskog sazrevanja peroksizoma uključuje usmeravanje i inseriranje nosintetisanih proteina peroksizomalne membrane i unos matriksnih proteina. Literaturni podaci pokazuju postojanje različitih molekulskih osnova unosa PMP i solubilnih enzima peroksizomalnog matriksa (Fujiki i Lazarow, 1985; Gould i Valle, 2000). Pex19 je predominantno citoplazmatski solubilni šaperon i receptor za proteine matriksa, ali je u manjoj meri lokalizovan i na membrani peroksizoma (Sacksteder i sar., 2000; Jones i sar., 2004). To je multifunkcijski protein koji prepoznaje peroksizomalne membranske lokalizujuće sekvence

PMP; sprečava pogrešno savijanje, agregaciju i destrukciju PMP u citoplazmi; usmerava novosintetisane PMP ka membrani peroksizoma i stoga igra suštinsku ulogu u unosu PMP (Jones i sar., 2004). Naši rezultati pokazuju da hipotiroidizam indukuje povišenje proteinske ekspresije Pex19 od petnaestog dana do kraja tretmana, čime se ističe značaj ovog peroksina u biogenezi peroksizoma mrkih adipocita. To nam dodatno govori da ekspresija Pex19 prati sintezu novih PMP i ukazuje na povećanu potrebu za njihovom stabilizacijom i inseriranjem u novoformirane pre-peroksizome.

Peroksizomalni membranski protein koji tesno saraduje sa Pex19 i omogućava inseriranje novosintetisanih PMP u membranu peroksizoma je Pex16. Kao integralni protein membrana ER i peroksizoma, Pex16 se smatra master regulatorom *de novo* biogeneze peroksizoma od glER (Kim i sar., 2006; Sugiura i sar., 2017). Na naše iznenađenje, hipotiroidizam snižava proteinsku ekspresiju Pex16 sedmog dana tretmana za više od 50% u odnosu na kontrolu i zadržava je na tako niskom nivou do kraja tretmana. Jedno od mogućih objašnjenja je da *de novo* biogenezu u mrkim adipocitima prati veoma brzo sazrevanje peroksizoma koje se odvija paralelno sa njihovim formiranjem, tako da novonastali peroksizomi postaju odmah potpuno funkcioni. S obzirom na to da iscrpljivanje endogenog nivoa samog Pex16 povećava direktnu ugradnju PMP (Agrawal i Subramani, 2016) naši rezultati ukazuju na to da hipotiroidizam verovatno favorizuje direktnu ugradnju PMP u membranu peroksizoma, preko Pex19, ometajući tako ekspresiju Pex16. Ovo je dodatno podržano činjenicom da hipotiroidizam indukuje povišenu proteinsku ekspresiju PMP70 paralelno sa Pex19 od petnaestog dana do kraja tretmana. PMP70 (ABCD3) je peroksizomalni membranski protein čija je uloga transport masnih kiselina za oksidaciju iz citoplazme u matriks peroksizoma (Van Roermund i sar., 2014). Tako povišena ekspresija PMP70 implicira postojanje velikog broja funkcijski zrelih peroksizoma u mrkim adipocitima.

Peroksizomalni matriksni proteini se upućuju u peroksizome preko jednog od dva peroksizomalna lokalizujuća signala (PTS1 i PTS2) (Fujiki i sar., 2008). Kod sisara i biljaka, PTS1 i PTS2 proteini su vezani za ciklične citosolne receptore Pex5 i Pex7 (Pieuchot i Jedd, 2012). Pex5 je solubilni receptor koji prepoznaje proteine u citoplazmi, vezuje ih, stabilizuje i transportuje do dokirajućeg/translocirajućeg kompleksa u membrani peroksizoma, promovišući njihovu translokaciju kroz membranu (Freitas i sar., 2011). Ovaj peroksin egzistira u dve dominantne izoforme nastale kao rezultat alternativnog splajsovanja: duga forma – Pex5(L) i kratka forma – Pex5(S). Duga forma Pex5 sadrži Pex7 vezujući epitop (Dodt i sar., 2001) i zbog toga ima ulogu koreceptora Pex7 za PTS2 proteine. Na taj način kod sisara, dva puta unosa peroksizomalnih matriksnih proteina konvergiraju ka Pex5(L). Naši rezultati pokazuju redukciju proteinske ekspresije Pex5(L) za više od 50% sedmog dana, a potom vraćanje na kontrolni nivo petnaestog dana tretmana. Nasuprot tome, proteinska ekspresija Pex5(S) je bila stabilna sedmog dana tretmana, a zatim je povišena petnaestog dana i zadržala se na visokom nivou do kraja tretmana. Na osnovu toga možemo zaključiti da rani hipotiroidizam favorizuje unos PTS1 proteina, ali s obzirom na to da su oni mnogo brojniji od PTS2 proteina ovaj trend se nastavlja do kraja tretmana preko aktivnosti PEX5(S).

Translokacija novosintetisanih peroksizomalnih proteina u matriks organele je omogućena postojanjem dokirajuće/translocirajuće mašinerije (DTM) u membrani peroksizoma koju čine Pex13 i Pex14 (Fujiki i sar., 2008). Naši rezultati pokazuju da se proteinska ekspresija Pex13 ne menja uprkos povećanju broja peroksizoma i proteinske ekspresije drugih peroksina. S obzirom na to da je prethodna studija pokazala da je Pex14 stehiometrijski mnogo brojnija od drugih subedinca DTM (Galiani i sar., 2016; Dias i sar., 2017), moguće je da u mrkim adipocitima hipotiroidizam za translocirajući kompleks favorizuje pre Pex14 nego Pex13.

Pri ulasku u peroksizome PTS sekvence matriksnih proteina se isecaju nakon čega oni postaju aktivni enzimi, a solubilni PTS receptori se eksportuju iz organele. Međutim, pokazano je da Pex5 ipak ostaje usidren u translocirajućem kompleksu (Carvalho i sar., 2007) a njegova ekstrakcija iz membrane je omogućena aktivnošću Pex1/Pex6 kompleksa koji je takođe usidren u membranu peroksizoma direktnim vezivanjem Pex6 za Pex26 (Matsumoto i sar., 2003; Tamura i sar., 2006; Fujiki i sar., 2012). Weller i sar. (2005) su pokazali da nedostatak Pex26 dovodi do smanjenog unosa PTS1 i PTS2 proteina u peroksizome ćelijske linije fibroblasta kože. Zanimljivo je i da unos Pex26 zavisi od Pex19 (Halbach, 2006), kao i da Pex26 prati direktan put unosa proteina matriksa vođen peroksinima Pex19 i Pex13 (Yagita i sar., 2013). Mi smo pokazali da proteinska ekspresija Pex26 počinje da raste od petnaestog dana i dostiže veoma visok nivo dvadeset prvog dana hipotiroidizma u poređenju sa eutiroidnom kontrolom. Ovakav obrazac ekspresije Pex26 je veoma sličan obrascu primećenom za Pex19. Suprotno tome, hipotiroidizam indukuje snažan pad proteinske ekspresije Pex6 koji ne afektuje unos CAT, što je pokazano obeležavanjem CAT imunogoldom. To ukazuje na neometan unos matriksnih proteina u peroksizome u hipotiroidizmu, bez obzira na pad proteinske ekspresije Pex6.

Nastanak peroksizoma od ER i kanonskim putem u istoj ćeliji unutar fizioloških uslova, je već duže vreme predmet rasprave. Dve nedavne studije su došle do kontradiktornih zaključaka iako su obe pratile rast kvasaca gajenih u sličnim uslovima. Zaključak jedne studije je da peroksizomi mogu nastati samo *de novo*, a druge da mogu nastati isključivo od već postojećih organela u ćelijama kvasaca (Motley i Hettema, 2007; van der Zand i sar., 2012). Slične kontradiktornosi se javljaju i kada je u pitanju biogeneza peroksizoma kod sisara, kod kojih je pokazano da peroksizomi mogu nastati *de novo* u ćelijama u kojima ove organele već postoje (Smith i Aitchison, 2013). Kim i sar. (2006) su pokazali da peroksizomi mogu nastati od ER u ćelijama sisara i da je ovo dominantan put njihove biogeneze i u normalnim i u mutiranim ćelijama kojima nedostaju peroksizomi. Naši rezultati su u korelaciji sa rezultatima koje su dobili Kim i sar. (2006), jer smo pokazali da se biogeneza peroksizoma od glER odvija i u eutiroidnoj kontroli. Na osnovu toga smo zaključili da ER igra ključnu ulogu u *de novo* biogenezi peroksizoma, ali i u održavanju peroksizomalnog pula u ćelijama unutar fizioloških uslova. Dodatno, u hipotiroidnom stanju nastanak peroksizoma *de novo* je dominantan put njihove biogeneze dvadeset prvog dana tretmana. U skladu sa tim, možemo da zaključimo da hipotiroidizam indukuje dvostepeno povećanje broja peroksizoma. U prvom koraku, sedmog dana, Pex11β i Drp1 stimulišu brzu proliferaciju peroksizoma rastom i deobom, koja se nastavlja ali i postepeno smanjuje do petnaestog dana tretmana. Time se u drugom koraku, dvadeset prvog dana tretmana, intenzivira *de novo* biogeneza peroksizoma.

Nedavno je pokazano da postoji još jedan intrigantan put nastanka peroksizoma. Naime, sve je veći broj studija koje pokazuju da su mitohondrije takođe uključene u njihovu biogenezu. U skladu sa tim, mi smo primetili da su brojni peroksizomi često u kontaktu sa membranama mitohondrija i glER u formi trijade organela. Broj trijada raste sa dužinom trajanja hipotiroidizma i najbrojnije su dvadeset prvog dana. Zbog jasnog prisustva membranskih mostića između peroksizoma i mitohondrija sa jedne i ER sa druge strane, naši rezultati pružaju dokaze o hibridnoj prirodi novonastalih peroksizoma – od mitohondrija i glER. Pre više od četrdeset godina, Goldfisher i sar. (1973) su otkrili postojanje veze između odsustva peroksizoma i izmenjene morfologije mitohondrija kod obolelih od cerebro-hepato-renalnog sindroma. Mnogo godina kasnije, Neuspieli sar. (2008) su prvi put pokazali postojanje vezikularnog transporta i komunikacije između mitohondrija i peroksizoma preko vezikula poreklom od mitohondrija (MDV). Na osnovu ovih, ali i drugih dokaza, Mohanty i McBride (2013) su pretpostavili da i ER i vezikule poreklom od mitohondrija mogu doprineti nastanku peroksizoma. Konačno, Sugiura i sar. (2017) su pružili dokaze o postojanju hibridne prirode novonastalih peroksizoma u okviru ćelijske linije humanih fibroblasta, izolovanih iz pacijenata sa Zellweger sindromom, a kojima nedostaju peroksizomi. Ova hibridna priroda biogeneze

peroksizoma uključuje formiranje pre-peroksizomalnih vezikula sa mitohondrijske spoljašnje membrane koje nose Pex13 i Pex14 i čije sazrevanje zahteva fuziju sa vezikulama nastalim od ER koje nose Pex16, kako bi se formirali pre-peroksizomi potpuno kompetentni za unos matriksnih proteina. Mi nismo primetili postojanje vezikula između mitohondrija i glER, ali jesmo otkrili zrele peroksizome pozitivne na CAT povezane membranskim mostićima sa spoljašnjom membranom mitohondrija i membranom glER. Pretpostavljamo da ovi peroksizomi nastaju fuzijom pre-peroksizomalnih vezikula poreklom od spoljašnje mitohondrijske membrane i vezikula poreklom od glER, ali da ovakvi peroksizomi ostaju u kontaktu sa roditeljskim organelama tokom procesa sazrevanja. Takođe, mi pretpostavljamo da ova subpopulacija peroksizoma u mrkim adipocitima ostaje u morfološko/funkcijskoj vezi sa organelama od kojih je nastala zbog lakše metaboličke komunikacije u okviru trijada, kao i kontrole lipidnog metabolizma u hipotiroidizmu.

Nadalje, otkrili smo peroksizome kao vezikule poreklom od mitohondrija čija je membrana u kontinuitetu sa spoljašnjom membranom mitohondrija. Ove vezikule su primećene i u eutiroidnoj kontroli i u hipotiroidnim grupama, mada se ne pojavljuju često. Uspostavljene su jednom membranom, liče na zrele peroksizome, pozitivne su na CAT i, po prvi put, ukazuju na pojavu peroksizoma nastalih samo od mitohondrija. Dakle, ovaj fenomen ukazuje da i u eutiroidnim i u hipotiroidnim uslovima peroksizomi mogu nastati pupljenjem sa spoljašnje membrane mitohondrija. Još jedan dokaz, koji podržava ovaj put biogeneze je prisustvo VDAC1 na membrani peroksizoma mrkih adipocita. Do danas, VDAC1 je identifikovan u peroksizomima kvasaca i u glioksizomima semena koja skladište lipide (Messina i sar., 2012) ali ne i na peroksizomima ćelija sisara (Antonenkov i Hiltunen, 2006). Naši rezultati po prvi put pokazuju peroksizomalnu lokalizaciju VDAC1. Stoga, zajednička ekspresija VDAC1 za mitohondrije i peroksizome pruža dodatni dokaz da neki peroksizomi nastaju od mitohondrija. Pored toga, prisustvo VDAC1 na mestu kontakta između mitohondrija i peroksizoma ukazuje na još jedan način međuorganelarne komunikacije i možda transport metabolita. Dodatni dokaz o nastanku peroksizoma od mitohondrija pruža i imunogold obeležavanje peroksina Pex16 i PMP70, koje je pokazalo da ovi peroksini lokalizuju i u mitohondrijama, kao i na mestu kontakta između ove dve organele. Na osnovu prethodno rečenog, mi pretpostavljamo da u mrkim adipocitima postoji više populacija peroksizoma koje se razlikuju po načinu nastanka i po funkciji koju obavljaju. Ovo nije iznenađujuće, jer je prisustvo heterogene populacije peroksizoma u ćelijama jetre pacova već pokazano (Yamamoto i Fahimi, 1987). Ta heterogenost se ogleda u zauzimanju različitih lokacija u citoplazmi i kompoziciji koju peroksizomi ostvaruju sa drugim organelama, u različitom enzimskom sastavu i samim tim u različitoj funkciji koju obavljaju (Luers i sar., 1993; Wilcke i sar., 1995).

Hipotiroidizam jasno intenzivira sve puteve biogeneze peroksizoma (u okviru kanonskog i *de novo* puta) u mrkim adipocitima, ali nastanak peroksizoma od postojećih organela rastom i deobom, i pupljenjem sa glER preovlađuju. Međutim, nisu svi pomenuti putevi biogeneze peroksizoma operativni istovremeno u jednoj ćeliji. Trijade organela, peroksizomi-glER-mitohondrije su prisutne u svim eksperimentalnim grupama, ali su najbrojnije dvadeset prvog dana hipotiroidizma. Po prvi put opisan nastanak peroksizoma pupljenjem sa spoljašnje mitohondrijske membrane, kao MDV, u eutiroidnoj i svim hipotiroidnim grupama ukazuje da mitohondrije igraju veoma važnu ulogu u *de novo* biogenezi i održavanju peroksizomalne populacije, posebno u mrkim adipocitima. To takođe ističe značaj peroksizoma u mrkim adipocitima i njihovog učešća u hipotiroidizmu kao potencijalno ravnopravan partner mitohondrijama. Specifična komunikacija na liniji peroksizomi-mitohondrije može se postići direktno preko fizičkih kontaktnih mesta ili indirektno preko vezikularnog transporta ili signalnih molekula poput lipida, metabolita i reaktivnih vrsta kiseonika (Schrader i sar., 2015; Aleksic i sar., 2021). Naši rezultati su pokazali da MDV u mrkim

adipocitima igraju ulogu samo u biogenezi peroksizoma iako vezikularni transport ne može biti isključen.

5.4 Stepen zrelosti peroksizoma mrkih adipocita

Formiranje peroksizoma prati njihovo sazrevanje selektivnim i postepenim unosom peroksizomalnih membranskih proteina i lipida, kao i proteina matriksa (Delille i sar., 2009). Stepen zrelosti peroksizoma direktno je proporcionalan stepenu njihove funkcije i CAT se smatra glavnim markerom zrelosti peroksizoma. Koristeći imunogold obeležavanje CAT mi smo potvrdili da se peroksizomi koji nastaju različitim putevima biogeneze odlikuju različitim stepenom zrelosti. Naime, pokazali smo da su peroksizomi sa nosićima pozitivni na CAT samo u njihovom glavnom, globularnom delu. Dodatno, brojne tubularne strukture koje se javljaju petnaestog dana tretmana su CAT pozitivne samo u svom početnom, širem delu. Potom, peroksizomi čija je membrana u kontinuitetu sa membranom gLER pokazuju homogenu imunopozitivnost na CAT u svom matriksu. Peroksizomi u okviru trijada su pozitivni na CAT samo u svom globularnom delu, kao i peroksizomi koji nastaju pupljenjem spoljašnje mitohondrijske membrane. Odsustvo imunopozitivnosti na CAT u peroksizomalnim nosićima, finalnom užem delu tubularnih struktura, u oblasti mostića koji povezuju peroksizome sa ER, mitohondrijama ili sa obe organele u okviru trijada, potvrđuje hipotezu da CAT može biti uneta samo u potpuno strukturno zrele peroksizome (Sugiura i sar., 2017). Interesantno je da su peroksizomi sa CAT negativnim repovima prvo bili opisani kao gastruloidne cisterne ili kao CAT negativne membranske petlje (Baumgart i sar., 1989; Roels i Cornelis, 1989). Takođe, pad aktivnosti CAT povezivan je sa redukcijom elektronske gustine peroksizomalnog matriksa na elektron mikrofografijama (povremeno primećenom kod hepatitisa), kao i sa heterogenom distribucijom proizvoda katalazne reakcije CAT, koja je dovela do pojave malih transparentnih zona u matriksu peroksizoma (de Craemer i sar., 1991). Nasuprot tome, CAT pozitivni peroksizomi čija je membrana u kontinuitetu sa spoljašnjom membranom mitohondrija, membranom gLER ili sa obe istovremeno u okviru trijada obezbeđuju čvrste dokaze o *de novo* biogenezi peroksizoma u mrkim adipocitima.

Stepen imunopozitivnosti peroksizoma na CAT (obeleženu imunogoldom) raste sa dužinom tretmana i u velikoj meri zavisi od puta njihovog nastanka. U skladu sa tim, prepoznali smo tri populacije peroksizoma u mrkim adipocitima: 1) jako CAT pozitivne, zrele peroksizome (pojedinačni, globularni), 2) slabo CAT pozitivne, nezrele peroksizome (niske bisera) i 3) retke, CAT negativne peroksizomalne profile (grupa M15). Na osnovu toga možemo da zaključimo da je obilje peroksizoma u mrkim adipocitima u hipotiroidizmu heterogeno u pogledu stepena zrelosti. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima prethodnih studija u pogledu vremena i načina sazrevanja peroksizoma (Delille i sar., 2011) ali nismo pronašli razlike između nezrelih populacija peroksizoma. Naime, kod kvasca *Yarrowia lipolytica* identifikovano je čak pet različitih populacija nezrelih peroksizoma koji sazrevaju na tačno utvrđen način (Titorenko i sar., 2000; Veenhuis i sar., 2000), dok za ćelije sisara još uvek ne postoje podaci o tome.

Brojni literaturni podaci otkrivaju da se mnogo više govori i zna o strukturnoj nego o funkcijskoj zrelosti peroksizoma. Neki autori smatraju da su peroksizomi potpuno zreli tek kada unesu sve neophodne matriksne enzime (Mohanty i McBride, 2013). Drugi pak smatraju da su peroksizomi potpuno funkcijski zreli kada pored CAT u svom matriksu sadrže bar jednu oksidazu (De Duve i Baudhuin, 1966; Pascual-Ahuir i sar., 2017). Mi smo pored CAT analizirali imunopozitivnost peroksizoma mrkih adipocita na dve izoforme acil-CoA oksidaze, ACOX1 i ACOX3, kao dodatnu potvrdu njihove funkcijske zrelosti. Naši rezultati su pokazali da imunopozitivnost peroksizoma na obe izoforme raste sa dužinom tretmana, kao i stepen njihove kolokalizacije u okviru iste organele iako je ekspresija ACOX1 izoforme dominantna u

eutiroidnoj i svim hipotiroidnim grupama. Ovim potvrđujemo postojanje potpuno funkcijski zrelih peroksizoma u mrkim adipocitima, kao i rast njihovog broja sa dužinom tretmana. Zanimljivo je i da se lokalizacija peroksizoma imunopozitivnih na obe izoforme oksidaze menja sa dužinom tretmana. Naši rezultati takođe pokazuju da je u nekim peroksizomima prisutna samo ACOX1, a u nekim samo ACOX3 izoforma ovog enzima, što dodatno ukazuje na značajnu funkcijsku heterogenost peroksizoma u samim mrkim adipocitima. Uzevši u obzir ranije pomenutu intenzivnu lipolizu, povišena imunoekspresija peroksizomalnih β -oksidativnih enzima jasno ukazuje na hipotiroidizmom indukovanu povećanu stopu β -oksidacije masnih kiselina u peroksizomima i ističe važnu ulogu peroksizoma u povećanju termogenog kapaciteta BAT. Naši rezultati su u skladu sa literaturnim podacima koji su pokazali da hipotiroidizam indukuje porast aktivnosti CAT i ukupne aktivnosti ACOX enzima u BAT kod pacova (Giacobino i sar., 1989). Pored toga, povišena aktivnost, genska i imuno ekspresija ACOX1 enzima u BAT je pokazana i prilikom aklimacije na hladnoću (Nedergaard i sar., 1980; Guardiola-Diaz i sar., 1999).

Konačno, naši rezultati su pokazali da sposobnost deobe imaju samo potpuno zreli peroksizomi, kako u eutiroidnoj, tako i u hipotiroidnim grupama. Međutim, u literaturi ne postoji konsenzus oko deobe zrelih i nezrelih peroksizoma ni kada su u pitanju ćelije kvasaca ni sisara. Kod vrsta *Yarrowia lipolytica* i *Hansenula polymorpha*, peroksizomalne vezikule se dele tek nakon sticanja potpune zrelosti, dok su kod vrste *Candida boidinii* nezreli peroksizomi sa delimično unetim matriksnim proteinima skloni deobi (Veenhuis i sar., 2000). Slično tome, kod humanih ćelija i zreli i nezreli peroksizomi mogu da se dele (Gould i Valle, 2000).

5.5 Transkripciona regulacija biogeneze peroksizoma

PPAR α je prvi transkripcioni faktor koji je povezan sa proliferacijom peroksizoma i njegova aktivacija povećava ne samo ekspresiju gena za oksidaciju masnih kiselina već i za povećan broj peroksizoma u jetri (Schrader i sar., 2012). Međutim, pokazano je da fibrati, visoko efektivni u indukciji peroksizomalnih gena preko aktivacije PPAR α u jetri (Weng i sar., 2015), ne utiču na regulaciju peroksizomalnih gena u BAT (Bagattin i sar., 2010). Takođe, postoje dokazi da proliferacija peroksizoma u BAT korelira sa ekspresijom oba receptora – PPAR α i PPAR γ (Guardiola-Diaz i sar., 1999). Dodatno, skorija istraživanja su pokazala da su zajednički ciljni geni PPAR α/γ odgovorni za regulaciju termogene funkcije mrkih adipocita (Shen i sar., 2020). Na osnovu ovakvih literaturnih podataka, naši rezultati ukazuju na to da je regulacija biogeneze peroksizoma u mrkim adipocitima u hipotiroidizmu mogući rezultat zajedničke aktivnosti PPAR α i PPAR γ . Ekspresija PPAR γ kao master regulatora strukture i funkcije mrkih adipocita nije afektovana, dok je ekspresija Pex16, peroksina čija je ekspresija pod direktnom PPAR γ transkripcionom kontrolom (Hofer i sar., 2017) snažno afektovana hipotiroidizmom. Pad ekspresije PPAR α petnaestog i dvadeset prvog dana, zajedno sa snažnom negativnom regulacijom Pex16 mogao bi imati za cilj inhibiciju prekomerne produkcije peroksizoma.

Paralelno sa biogeneze peroksizoma hipotiroidizam indukuje i biogenezu mitohondrija koja je najintenzivnija petnaestog dana tretmana. Ključni regulator biogeneze mitohondrija i ko-aktivator PPAR γ u BAT je PGC-1 α (Ventura-Clapier i sar., 2008). Međutim, pored toga što reguliše biogenezu mitohondrija, kao i gena uključenih u oksidativnu fosforilaciju i mitohondrijsku β -oksidaciju, pokazano je da PGC-1 α reguliše i biogenezu peroksizoma u mrkim adipocitima nezavisno od PPAR α (Bagattin i sar., 2010). Naši rezultati su pokazali da hipotiroidizam ne afektuje ekspresiju PGC-1 α u BAT. Iz svega navedenog možemo zaključiti da orkestrirana, zajednička aktivnost PPAR α i PPAR γ uz PGC-1 α , verovatno nije jedini/neophodni

mehanizam modulacije ekspresije glavnih molekulskih igrača koji leže u osnovi biogeneze peroksizoma.

5.6 Hipotiroidizam, tiroidni receptori, RXR i DIO2

Tiroidni hormoni igraju višestruku ulogu u BAT koju ostvaruju preko svojih receptora. Tiroidni receptori (TR) su transkripcioni faktori koji pripadaju grupi nukleusnih receptora, a modulaciju ekspresije ciljnih gena vrše vezivanjem za TRE u njihovom promotorskom regionu (Goglia i sar., 1999). U većini slučajeva tiroidni receptori formiraju heterodimere sa receptorima retinoične kiseline (RXR) (Villarroya i sar., 1999) i na taj način aktiviraju transkripciju gena zavisnih od tiroidnih hormona. Aktivnost BAT zavisi od lokalne koncentracije T3 koju obezbeđuje dejodinaza 2 (DIO2), enzim koji konvertuje T4 u biološki aktivan T3 i koji je u BAT visoko ekspimiran (Carvalho i sar., 1991; Bianco i Larsen, 2005). Naši rezultati su pokazali da se ekspresija TR α 2 i TR β 1 u hipotiroidizmu ne menja, dok je ekspresija TR α 1 povišena tek dvadeset prvog dana tretmana, što je praćeno nepromenjenom ekspresijom RXR α u BAT. Stoga možemo reći da hipotiroidizam favorizuje TR α 1 izofornu tiroidnih receptora u BAT, što nije iznenađujuće jer je već pokazano da je ovo dominantna izoforma tiroidnih receptora u BAT miševa (Wikström i sar., 1998). Naši rezultati takođe idu u prilog već pomenutoj činjenici da hipotiroidizam pokreće termogenu aktivaciju BAT, što pokazuju i rezultati studija koje ističu TR α kao regulatora termogene funkcije BAT (Wikström i sar., 1998; Marrif i sar., 2005), a TR β kao ključnog regulatora metabolizma holesterola (Gullberg i sar., 2002). Nadalje, naši rezultati su pokazali da hipotiroidizam ne afektuje ekspresiju DIO2, što znači da je lokalna produkcija T3 u BAT stabilna u hipotiroidizmu i nivou kao kao u eutiroidizmu. Našim rezultatima idu u prilog i literaturni podaci koji pokazuju da se u uslovima hipotiroidizma period poluživota DIO2 produžava na pet sati, što je takođe razlog njegove stabilne ekspresije (Bianco i Larsen, 2005). Pored toga, ranija studija je pokazala da je unutarćelijska koncentracija T3 u BAT, zahvaljujući upravo postojanju i aktivnosti DIO2, relativno nezavisna od nivoa cirkulišućih tiroidnih hormona (Silva i Larsen, 1983). Dodatno, studije na tiroidektomisanim i hipotiroidnim pacovima su demonstrirale značaj BAT specifične DIO2 u lokalnoj produkciji T3 usled izlaganja hladnoći čime je tada po prvi put, istaknut značaj T3 u pojačanju termogenog odgovora na intenziviranu simpatičku stimulaciju (Silva i Larsen, 1983; 1985).

Potom, naši rezultati imunofluorescentnog obeležavanja tiroidnih receptora pokazuju da je najviši stepen imunoekspresije TR α 1 i TR α 2 zapažen petnaestog dana tretmana. Takođe, pokazuju da je unutarćelijska lokalizacija obe izoforme pretežno citoplazmatska, dok je nukleusna lokalizacija veoma slaba i pokazana samo za TR α 1 izofornu. U okviru citoplazmatske lokalizacije tiroidnih receptora dominira njihovo prisustvo u mitohondrijama, što je potvrdila i kolokalizacija sa COX IV. Tiroidni hormoni učestvuju u proliferaciji, diferencijaciji i maturaciji mitohondrija, što ih ubraja u glavne regulatore njihove biogeneze (Almeida i sar., 1995). Usled već pokazane akumulacije tiroidnih hormona u mitohondrijama jetre (Morel i sar., 1996), prisustvo tiroidnih receptora u ovom ćelijskom kompartmentu nije iznenađujuće, pogotovu kada se radi o mitohondrijama mrkih adipocita. Izolovanjem skraćenih formi TR α 1 iz matriksa (p43) i unutrašnje membrane mitohondrija (p28) (Wrutniak i sar., 1995) koje imaju sposobnost da vezuju T3 sličnim afinitetom kao i TR α 1, pokazano je direktno učešće tiroidnih hormona u transkripciji genoma mitohondrija na različitim eksperimentalnim modelima (Casas i sar., 1999; Enríquez i sar., 1999; Casas i sar., 2009; Carazo i sar., 2012; Pessemesse i sar., 2014). Sobzirom na to da TR α 1 ima sposobnost vezivanja tiroidnih hormona i da je dominantna izoforma receptora u BAT, a da TR α 2 nema sposobnost vezivanja tiroidnih hormona što ga čini supresorom, paralelni porast imunoekspresije obe izoforme TR α do petnaestog dana tretmana, kao i pojačavanje Harlekin efekta sa dužinom tretmana ukazuju na

visoko regulisanu aktivnost tiroidnih hormona u mrkom masnom tkivu u uslovima hipotiroidizma. Pored toga, naši rezultati po prvi put pokazuju lokalizaciju obe izoforme tiroidnih receptora u mitohondrijama mrkih adipocita.

5.7 Hipotiroidizam indukuje promene u sistemu antioksidativne odbrane u BAT

Efekte hipotiroidizma, kao jednog od čestih oboljenja širom sveta koje povećava faktor rizika za razvoj mnogih drugih metaboličkih poremećaja na redoks i metaboličku homeostazu u BAT su veoma malo izučavani. Brojne ranije studije sistema antioksidativne odbrane u različitim tkivima i na različitim modelima hipotiroidizma dale su kontradiktorne rezultate. Mnoga istraživanja su pokazala opšti trend regulacije antioksidativne odbrane koji se ogleda u porastu aktivnosti enzima antioksidativne odbrane u BAT (Petrović i sar., 2001), mozgu (Mano i sar., 1995) i eritrocitima hipotiroidnih pacova (Yilmaz i sar., 2003). U serumu i eritrocitima pacijenata sa hipotiroidizmom pojedini autori su pokazali porast aktivnosti enzima antioksidativne odbrane (Santi i sar., 2010, 2012; Reddy i sar., 2013), a drugi da nema promene (Baskol i sar., 2007; Dave i Paradkar 2009; Santi i sar., 2012). Takođe je pokazan čak pad aktivnosti enzima antioksidativne odbrane u izolovanim makrofagima (Pereira i sar., 1995), limfoidnim organima i mišićima (Pereira i sar., 1994), jetri (Cano-Europa i sar., 2010) i u serumu hipotiroidnih pacova (de Souza Cardoso i sar., 2021).

Pored toga, neke prethodne studije su pokazale da hipotiroidizam može aktivirati funkciju BAT (Mory i sar., 1981; Dicker i sar., 1992) slično kao i hladnoća (Nedergaard i sar., 1980; Barja de Quiroga i sar., 1991; Laurberg i sar., 2005; Petrović i sar., 2006). Takođe je pokazano da termogena aktivacija BAT indukovana hladnoćom korelira sa pozitivnom regulacijom antioksidativne odbrane u ovom tkivu (Petrović i sar., 2010). Naši rezultati pokazuju da hipotiroidizam na sličan način kao i hladnoća dovodi do širokih promena na nivou antioksidativne odbrane u BAT. Naime, pokazali smo da hipotiroidizam povećava proteinsku ekspresiju komponenti antioksidativne odbrane (CuZnSOD, MnSOD, CAT, GCL, Trx i ukupan sadržaj GSH), kao i aktivnost TR i CAT u BAT. Izrazit porast proteinske ekspresije i aktivnosti CAT može reflektovati aktivaciju mitohondrijskog i peroksizomalnog oksidativnog metabolizma karakterističnog za termogenu aktivaciju BAT. Ovo je takođe podržano istovremenim porastom sadržaja GSH i proteinske ekspresije GCL, glavnog i limitirajućeg enzima u sintezi GSH. Sa druge strane, proteinska ekspresija i aktivnost GSH-Px, kao i aktivnost GR koji se ne menjaju u hipotiroidizmu, pokazuju da nisu svi enzimi antioksidativne odbrane afektovani tretmanom ili bar nisu svi afektovani u isto vreme. Ovo naročito koreliše sa vremenski zavisni obrascem biogeneze peroksizoma i mitohondrija u kojima se najviše produkuje ROS i RNS. Takođe, nismo zapazili ni promene u aktivnosti CuZnSOD i MnSOD, bez obzira na porast njihove proteinske ekspresije u M15 i M21, što može biti rezultat različitih posttranslacionih modifikacija koje uključuju alosteričnu regulaciju i reverzibilne kovalentne modifikacije poput oksidacije, fosforilacije, acetilacije, metilacije i drugih. Na osnovu svega navedenog možemo zaključiti da, kao i prilikom adaptacije na hladnoću (Laurberg i sar., 2005) peroksidativni i GSH zavisni delovi antioksidativne odbrane mogu biti pokazatelji termogene aktivacije BAT u hipotiroidizmu.

5.7.1 Kreiranje specifičnih strukturnih jedinica u mrkim adipocitima

Poznato je da su velike promene u redoks-metaboličkoj homeostazi često praćene funkcijskom reorganizacijom različitih ćelijskih kompartmenata koja uključuje njihovo strukturno remodeliranje u odgovoru na izmenjene zahteve tkiva. U ovom kontekstu, strukturno remodeliranje implicira kreiranje bliskih strukturnih asocijacija ćelijskih organela čija je primarna uloga pružanje podrške specifičnim funkcijskim adaptacijama. Naši rezultati su

pokazali da hipotiroidizam indukuje stvaranje bliske strukturne asocijacije mitohondrija, peroksizoma i lipidnih tela – MPLB jedinice u mrkim adipocitima. Najupečatljiviji primer kozavisne, međuorganelarne komunikacije u literaturi je opisan kroz funkcijsku interakciju između peroksizoma i mitohondrija u procesima β -oksidacije masnih kiselina i uklanjanja ROS (Fransen i sar., 2012; Wanders, 2014; Lismont i sar., 2015). Takođe je pokazano da lipidi sintetisani od strane peroksizoma učestvuju u regulaciji termogeneze tako što posreduju u deobi mitohondrija indukovanom hladnoćom (Park i sar., 2018). Mi smo pokazali da su peroksizomi najbrojniji oko lipidnih tela, što predstavlja morfološku indikaciju za njihovu važnu ulogu u lipidnom metabolizmu. U prilog tome idu i rezultati prethodnih studija koji su takođe pokazali peroksizome asociране sa lipidnim telima u 3T3-L1 adipocitima i epididimalnom depou belog masnog tkiva miševa (Schrader, 2001), kod kvasaca (Binns i sar., 2006) i kod biljnih semena bogatih lipidima (Kunze i sar., 2006). Dodatno, skorije studije su pokazale da transport lipida između peroksizoma i lipidnih tela nije jednosmeran već dvosmeran. Taj dvosmerni transport lipida između peroksizoma i lipidnih tela kontroliše metabolički fluks lipida i balans između produkcije energije i njenog iskorišćavanja u zavisnosti od metaboličkog konteksta (Bartz i sar., 2007), dok bliska strukturna asocijacija između ove dve organele ukazuje na koordinisanu regulaciju metabolizma i transporta lipida kroz njihove membrane (Lodhi i Semenkovich, 2014). Međutim, unutarćelijska regulacija lipidnog transporta, pored peroksizoma i lipidnih tela, uključuje i mitohondrije. Pokazano je da u različitim tipovima ćelija i unutar različitih metaboličkih uslova kontakt između lipidnih tela i mitohondrija može služiti kao mesto odvijanja i lipogeneze i lipolize (Olzmann i Carvalho, 2019). Naši rezultati su u saglasnosti sa prethodnom studijom koja je pokazala da mitohondrije asociране sa lipidnim telima predstavljaju posebnu populaciju mitohondrija (Benador i sar., 2018) koje zajedno sa peroksizomima formiraju MPLB – strukturno/funkcijske jedinice mrkih adipocita. Pretpostavljamo da ove novouspostavljene strukturne jedinice glavnih funkcijskih aktera, praćene specifičnim obrascima lokalizacije enzima antioksidativne odbrane ukazuju na jedinstven funkcijski sincicijum koji podržava redoks zavisne promene indukovane hipotiroidizmom. Dakle, hipotiroidizam indukuje strukturno remodeliranje BAT istovremeno sa promenama redoks homeostaze. Otuda možemo zaključiti da naši rezultati ukazuju na strogu i visoko regulisanu kooperaciju između različitih ćelijskih kompartmenata tokom adaptivnog odgovora tkiva na novo homeostatsko stanje uspostavljeno petnaestog i dvadeset prvog dana hipotiroidizma.

5.7.2 Uspostavljanje nove lokalizacije enzima antioksidativne odbrane

Uzimajući u obzir gore pomenute promene proteinske ekspresije enzima antioksidativne odbrane, mi smo dalje analizirali obrasce njihove distribucije kako bismo otkrili moguće promene indukovane hipotiroidizmom. Imunofluorescentnim obeležavanjem pokazali smo Harlekin efekat na nivou BAT za svaki od ispitivanih enzima, a upotrebom imunogold obeležavanja enzima antioksidativne odbrane pronašli smo njihovo prisustvo u već pokazanim, ali i na potpuno novim lokacijama na subćelijskom nivou. Jedna od novih lokacija jesu nukleusi mrkih adipocita, sa izraženom povećanom akumulacijom analiziranih enzima antioksidativne odbrane u ovom kompartmentu sa dužinom tretmana. Međutim, pitanje njihove funkcije u ovom kompartmentu za sada ostaje bez odgovora. Da li i u nukleusu enzimi antioksidativne odbrane obavljaju istu funkciju kao i na već ranije pokazanim lokacijama (antioksidativnu i zaštitnu ulogu), ili vrše neku drugu funkciju, kao *moonlighting* proteini (regulatorna uloga) ostaje tema nekih budućih istraživanja. Uočene razlike u lokalizaciji antioksidativnih enzima u ćelijskim subkompartimentima, vremenu pojavljivanja i korelacija sa njihovom proteinskom ekspresijom i aktivnošću favorizuju dodatne antioksidativne, zaštitne uloge ispitivanih enzima. Poznato je i široko prihvaćeno stanovište po kome je mesto lokalizacije nekog proteina blisko povezano sa funkcijom koju obavlja u datom kompartmentu

u ćeliji. Tako otkrivanje njegove nove pozicije sugerira povećanu potrebu za aktivnošću tog proteina u specifičnom ćelijskom kompartmentu. U našoj studiji, lokalizacija enzima antioksidativne odbrane u peroksizomima, posebno MnSOD i kontinuiran porast proteinske ekspresije CAT sa dužinom tretmana, mogu ukazivati na sinergizam redoks remodeliranja i remodeliranja oksidativnih procesa kao odgovor na hipotiroidizam. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima studije [Giacobina i sar. \(1989\)](#), koji su pokazali porast aktivnosti CAT u BAT u uslovima metimazolom indukovano hipotiroidizma. Sinergizam redoks remodeliranja i remodeliranja oksidativnih procesa u mrkim adipocitima može biti glavni razlog strukturne asocijacije mitohondrija, peroksizoma i lipidnih tela (MPLB) i njihovog organizovanja u funkcijske jedinice. Pored navedenog, pokazali smo i specifične obrasce redistribucije enzima antioksidativne odbrane, CuZnSOD na kristama mitohondrija i membrani peroksizoma; MnSOD u matriksu peroksizoma; CAT u mitohondrijama i GSH-Px na lipidnim telima i oko njih (na njihovoj polumembrani). Ovakva redistribucija enzima ukazuje na njihovu subkompartmentalizaciju nastalu kao rezultat finog podešavanja antioksidativne odbrane u mrkim adipocitima tokom hipotiroidizma.

5.7.3 Transkripciona kontrola redoks remodeliranja mrkog masnog tkiva

Transkripcioni faktor Nrf2 je master regulator redoks homeostaze koji reguliše ekspresiju gena uključenih u fazu II detoksifikacije i antioksidativne odbrane. Među ovim genima jesu i geni koji kodiraju komponente AD, uključujući CuZnSOD, MnSOD, CAT, GSH-Px, GCL i Trx ([Girnun i sar., 2002](#); [Milani i sar., 2011](#); [Rani i sar., 2016](#); [Kim i sar., 2017](#); [Tonelli, Chio i Tuveson 2018](#)). Pored toga, Nrf2 integriše redoks i metaboličku homeostazu tako što reguliše ekspresiju velikog broja gena uključenih u intermedijerni metabolizam, proces transkripcije, mitohondrijsku funkciju, imunski odgovor, ćelijsku proliferaciju, signalizaciju, preživljavanje i ćelijski ciklus ([Lee i sar., 2003](#); [Suh i sar., 2004](#); [Ryoo i Kwak, 2018](#); [Schmidlin i sar., 2019](#)). Naši rezultati pokazuju da hipotiroidizam indukuje proteinsku ekspresiju i nukleusnu translokaciju Nrf2 u BAT. Posledično, Nrf2 u BAT verovatno pokreće signalnu kaskadu koja pozitivno reguliše ekspresiju gena za komponente AD, što se ogleda u porastu proteinske ekspresije CuZnSOD, MnSOD, CAT, GCL i Trx.

Što se tiče subćelijske lokalizacije Nrf2, prisustvo ovog transkripcionog faktora u nukleusima mrkih adipocita u eutiroidnoj kontroli ukazuje na njegovu regulatornu ulogu i u fiziološkim uslovima. Međutim, porast imunolokalizacije Nrf2 u nukleusima mrkih adipocita tokom hipotiroidizma, posebno petnaestog dana, ukazuje na to da Nrf2 modulira redoks homeostazu u BAT. Pored toga, aktivacija Nrf2 puta u BAT obezbeđuje molekulska osnovu ne samo za opsežne promene u antioksidativnoj odbrani tkiva već i za promene na nivou ultrastrukture. Nedavne studije su pokazale da je Nrf2 direktno uključen u regulaciju funkcije i dinamike mitohondrija ([Piantadosi i sar., 2008](#); [W. Shen i sar., 2008](#); [Holmström i sar., 2013](#); [Ichimura i sar., 2013](#); [Kovac i sar., 2014](#); [Ludtmann i sar., 2014](#); [Holmström i sar., 2016](#)). Prva fizička asocijacija Nrf2 i spoljašnje membrane mitohondrija opisana je 2008. godine ([Lo i Hannink, 2008](#)), a kasnije je pretpostavljeno da direktna interakcija Nrf2 sa mitohondrijama ima za svrhu očuvanje integriteta i funkcije mitohondrija ([Strom i sar., 2016](#); [Tsushima i sar., 2019](#)). Mi smo pokazali prisustvo Nrf2 i na spoljašnjoj i na unutrašnjoj membrani mitohondrija. Da li lokalizacija Nrf2 na unutrašnjoj membrani mitohondrija ukazuje na neku drugu, novu ulogu ovog transkripcionog faktora ostaje da se istraži.

5.7.4 Mehanizam redoks-strukturnog remodeliranja mrkog masnog tkiva

Naši rezultati pokazuju povećanu proteinsku ekspresiju Nrf2, već nakon sedmog dana hipotiroidizma, praćenu povišenjem proteinske ekspresije enzima antioksidativne odbrane sedmog, petnaestog i dvadeset prvog dana hipotiroidizma. Zanimljivo je da je najjača

imunolokalizacija 4-HNE takođe zapažena sedmog dana hipotiroidizma. 4-HNE kao krajnji produkt lipidne peroksidacije reguliše i ćelijsko preživljavanje i ćelijsku smrt, u zavisnosti od njegove koncentracije, tipa ćelije i metaboličkog statusa ćelije (Ayala i sar., 2014). Novije *in vitro* i *in vivo* studije su pokazale da 4-HNE indukuje translokaciju Nrf2 u nukleus, delujući kao sekundarni glasnik u redoks zavisnim signalnim putevima u ćeliji (Zhang i sar., 2010; Huang i sar., 2012; Chapple i sar., 2013; López-Bernardo i sar., 2015). Dalje je pokazano da 4-HNE lako prolazi kroz membrane, pa se tako proteinski adukti 4-HNE mogu lokalizovati u svim kompartmentima ćelije (Castro i sar., 2017). U skladu sa tim, povišena imunopozitivnost na 4-HNE i njegova specifična lokalizacija u nukleusima, mitohondrijama, peroksizomima, citoplazmi i posebno oko lipidnih tela, ukazuju na višestruke uloge 4-HNE, uključujući i aktivaciju Nrf2 u BAT tokom hipotiroidizma. Privremen porast imunopozitivnosti na 4-HNE na početku tretmana ukazuje na njegovu potencijalnu ulogu sekundarnog glasnika u u redoks zavisnim signalnim putevima u ćeliji. Porast 4-HNE ukazuje na promene u redoks homeostazi uzrokovane porastom prooksidativnog pritiska, što posledično dovodi do pokretanja antioksidativnog odgovora koji se reflektuje porastom proteinske ekspresije Nrf2 i enzima antioksidativne odbrane. Ova antioksidativna kaskada dovodi do uspostavljanja novog homeostatskog stanja u BAT, što je praćeno vraćanjem 4-HNE na kontrolni nivo.

6. ZAKLJUČCI

Ova doktorska disertacije je pokazala da hipotiroidizam indukuje proliferaciju peroksizoma u mrkim adipocitima intenzivirajući različite puteve njihove biogeneze na vremenski zavisani način. Pokazano je da peroksizomi nastaju od postojećih organela po modelu rasta i deobe, pupljenjem od glER, od glER i mitohondrija istovremeno – hibridna priroda biogeneze peroksizoma, i po prvi put pokazano, pupljenjem sa spoljašnje membrane mitohondrija. Svaki od opisanih puteva biogeneze peroksizoma je prisutan u eutiroidnoj kontroli i tokom hipotiroidizma i karakteriše se specifičnim profilima organela i setom peroksina. Prisustvo peroksizoma, njihova distribucija, stepen zrelosti, ali i funkcija koju obavljaju su izuzetno heterogeni u mrkim adipocitima. Ta heterogenost, harlekinizam, je zapravo refleksija razlika u njihovom nastanku.

U kontekstu regulacije biogeneze peroksizoma pokazano je da orkestrirana i zajednička aktivnost PPAR α i PPAR γ , uz učešće PGC-1 α verovatno nije jedini/neophodni mehanizam modulacije ekspresije glavnih molekulskih igrača koji leže u osnovi biogeneze peroksizoma. Pokazan je paralelni porast imunoekspresije obe izoforme tiroidnog receptora TR α do petnaestog dana tretmana, kao i pojačavanje Harlekin efekta sa dužinom tretmana što ukazuje na visoko regulisanu aktivnost tiroidnih hormona u mrkom masnom tkivu u uslovima hipotiroidizma. U prilog ovoj tvrdnji ide i stabilna ekspresija DIO2 u hipotiroidizmu. Pored toga, po prvi put je pokazana lokalizacija obe izoforme tiroidnih receptora u mitohondrijama mrkih adipocita, čime se ističe direktan uticaj tiroidnih hormona na proliferaciju, diferencijaciju, maturaciju i funkciju mitohondrija. Dakle, proliferacija peroksizoma i mitohondrija kao i intenzivna lipoliza u mrkim adipocitima ukazuju na termogenu aktivaciju mrkog masnog tkiva indukovanu hipotiroidizmom.

S obzirom da su peroksizomi uz mitohondrije mesta najveće produkcije ROS i RNS, pokazano je da hipotiroidizam indukuje obimno redoks i strukturno remodeliranje mrkog masnog tkiva. Indukcija antioksidativne odbrane praćena subćelijskom relokalizacijom enzima antioksidativne odbrane usko je vezana za strukturnu reorganizaciju i remodeliranje organela. To remodeliranje podrazumeva uspostavljanje bliske strukturne asocijacije mitohondrija, peroksizoma i lipidnih tela – MPLB jedinice i reflektuje potrebu za funkcijskom međuorganelarnom kooperacijom i održanjem redoks homeostaze u mrkim adipocitima. Dodatno je pokazano da hipotiroidizam indukuje porast proteinske ekspresije i aktivnosti Nrf2, što ukazuje na njegovu potencijalnu ulogu redoks-senzitivnog transkripcionog faktora u redoks-strukturnom remodeliranju mrkog masnog tkiva, što verovatno uključuje i sekundarne glasnike redoks zavisnog signalnog puta, poput 4-HNE.

LITERATURA

- Abelenda, M.; Puerta, M.L. Cold-induced thermogenesis in hypothyroid rats. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **1990**, *416*, 663–666, doi:10.1007/BF00370612.
- Agrawal, G.; Joshi, S.; Subramani, S. Cell-free sorting of peroxisomal membrane proteins from the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 9113–9118, doi:10.1073/pnas.1018749108.
- Agrawal, G.; Subramani, S. De novo peroxisome biogenesis: Evolving concepts and conundrums. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.* **2016**, *1863*, 892–901, doi:10.1016/j.bbamcr.2015.09.014.
- Ahlabo, I.; Barnard, T. Observations on peroxisomes in brown adipose tissue of the rat. *J. Histochem. Cytochem.* **1971**, *19*, 670–675, doi:10.1177/19.11.670.
- Aiceles, V.; Da Fonte Ramos, C. A link between hypothyroidism, obesity and male reproduction. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **2016**, *25*, 5–13, doi:10.1515/hmbci-2015-0054.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell, 6th Edition*; **2008**, Vol. 40; ISBN 9780815344322.
- Aleksic, M.; Kalezic, A.; Saso, L.; Jankovic, A.; Korac, B.; Korac, A. The unity of redox and structural remodeling of brown adipose tissue in hypothyroidism. *Antioxidants MDPI* **2021**, *10*, 1–16, doi:10.3390/antiox10040591.
- Almeida, A.; Orfao, A.; López-Mediavilla, C.; Medina, J.M. Hypothyroidism prevents postnatal changes in rat liver mitochondrial populations defined by rhodamine-123 staining. *Endocrinology* **1995**, *136*, 4448–4453, doi:10.1210/endo.136.10.7545104.
- Andrade-Navarro, M.A.; Sanchez-Pulido, L.; McBride, H.M. Mitochondrial vesicles: an ancient process providing new links to peroxisomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, *21*, 560–567, doi:10.1016/j.ceb.2009.04.005.
- Andringa, K.K.; Udoh, U.S.; Landar, A.; Bailey, S.M. Proteomic analysis of 4-hydroxynonenal (4-HNE) modified proteins in liver mitochondria from chronic ethanol-fed rats. *Redox Biol.* **2014**, *2*, 1038–1047, doi:10.1016/j.redox.2014.09.006.
- Andrusic, L.; Dudzik, D.; Barbas, C.; Milkovic, L.; Grune, T.; Zarkovic, N. Short overview on metabolomics approach to study pathophysiology of oxidative stress in cancer. *Redox Biol.* **2018**, *14*, 47–58, doi:10.1016/j.redox.2017.08.009.
- Angermüller, S.; Bruder, G.; Völkl, A.; Wesch, H.; Fahimi, H.D. Localization of xanthine oxidase in crystalline cores of peroxisomes. A cytochemical and biochemical study. *Eur. J. Cell Biol.* **1987**, *45*, 137–144.
- Antonenkov, V.D.; Hiltunen, J.K. Peroxisomal membrane permeability and solute transfer. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.* **2006**, *1763*, 1697–1706.
- Antonenkov, V.D.; Grunau, S.; Ohlmeier, S.; Hiltunen, J.K. Peroxisomes are oxidative organelles. *Antioxid. Redox Signal.* **2010**, *13*, 525–537, doi:10.1089/ars.2009.2996.
- Antonenkov, V.D.; Hiltunen, J.K. Transfer of metabolites across the peroxisomal membrane. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis Dis.* **2012**, *1822*, 1374–1386, doi:10.1016/j.bbadis.2011.12.011.

- Arrojo E Drigo, R.; Bianco, A.C. Type 2 deiodinase at the crossroads of thyroid hormone action. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2011**, *43*, 1432–1441, doi:10.1016/j.biocel.2011.05.016.
- Auten, R.L.; Davis, J.M. Oxygen toxicity and reactive oxygen species: The devil is in the details. *Pediatr. Res.* **2009**, *66*, 121–127, doi:10.1203/PDR.0b013e3181a9eafb.
- Ayala, A.; Muñoz, M.F.; Argüelles, S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, 1–31, doi:10.1155/2014/360438.
- Bagattin, A.; Hugendubler, L.; Mueller, E. Transcriptional coactivator PGC-1 promotes peroxisomal remodeling and biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 20376–20381, doi:10.1073/pnas.1009176107.
- Ballabio, A. The awesome lysosome. *EMBO Mol. Med.* **2016**, *8*, 73–76, doi:10.15252/emmm.201505966.
- Baltaci, A.K.; Mogulkoc, R.; Belviranlı, M. Serum levels of calcium, selenium, magnesium, phosphorus, chromium, copper and iron - their relation to zinc in rats with induced hypothyroidism. *Acta Clin. Croat.* **2013**, *52*, 151–156.
- Barja de Quiroga, G.; Lopez-Torres, M.; Perez-Campo, R.; Abelenda, M.; Paz Nava, M.; Puerta, M.L. Effect of cold acclimation on GSH, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in brown adipose tissue. *Biochem. J.* **1991**, *277*, 289–292, doi:10.1042/bj2770289.
- Barth, T.; Bruges, G.; Meiwes, A.; Mogk, S.; Mudogo, C.N.; Duszenko, M. Staurosporine-induced cell death in *Trypanosoma brucei* and the role of endonuclease G during apoptosis. *Open J. Apoptosis* **2014**, *3*, 16–31, doi:10.4236/ojapo.2014.32003.
- Bartz, R.; Li, W.; Venables, B.; Zehmer, J.K.; Roth, M.R.; Welti, R.; Anderson, R.G.W.; Liu, P.; Chapman, K.D. Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J. lipid Res.* **2007**, *48*, 837–847, doi:10.1194/jlr.M600413-JLR200.
- Baskol, G.; Atmaca, H.; Tanriverdi, F.; Baskol, M.; Kocer, D.; Bayram, F. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with hypothyroidism before and after treatment. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **2007**, *115*, 522–526, doi:10.1055/s-2007-981457.
- Baudhuin, P.; Henri B.; de Duve, C. Combined biochemical and morphological study of particulate fractions from rat liver. *J. Cell Biol.* **1965**, *26*, 219–243. <https://doi.org/10.1083/jcb.26.1.219>.
- Baumgart, E.; Volkl, A.; Hashimoto, T.; Fahimi, H.D. Biogenesis of peroxisomes: Immunocytochemical investigation of peroxisomal membrane proteins in proliferating rat liver peroxisomes and in catalase-negative membrane loops. *J. Cell Biol.* **1989**, *108*, 2221–2231, doi: 10.1083/jcb.108.6.2221.
- Benador, I.Y.; Veliova, M.; Mahdavian, K.; Petcherski, A.; Wikstrom, J.D.; Assali, E.A.; Acín-Pérez, R.; Shum, M.; Oliveira, M.F.; Cinti, S.; et al. Mitochondria bound to lipid droplets have unique bioenergetics, composition, and dynamics that support lipid droplet expansion. *Cell Metab.* **2018**, *27*, 869–885.e6, doi:10.1016/j.cmet.2018.03.003.
- Berger, J.; Moller, D.E. The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* **2002**, *53*, 409–435, doi:10.1146/annurev.med.53.082901.104018.

- Bhaumik, P.; Koski, M.K.; Glumoff, T.; Hiltunen, J.K.; Wierenga, R.K. Structural biology of the thioester-dependent degradation and synthesis of fatty acids. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 621–628, doi:10.1016/j.sbi.2005.10.010.
- Bianco, A.C.; Silva, J.E. Nuclear 3,5,5-triiodothyronine (T3) in brown adipose tissue: Receptor occupancy and sources of T3 as determined by in vivo techniques. *Endocrinology*, **1987**, *120*, 55–62, doi:10.1210/endo-120-1-55.
- Bianco, A.C.; Sheng, X.; Silva, J.E. Triiodothyronine amplifies norepinephrine stimulation of uncoupling protein gene transcription by a mechanism not requiring protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 18168–18175, doi:10.1016/s0021-9258(19)81340-6.
- Bianco, A.C.; Larsen, P.R. Cellular and structural biology of the deiodinases. *Thyroid* **2005**, *15*, 777–786, doi:10.1089/thy.2005.15.777.
- Bianco, A.C.; McAninch, E.A. The role of thyroid hormone and brown adipose tissue in energy homeostasis. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2013**, *1*, 250–258, doi:10.1016/S2213-8587(13)70069-X.
- Bieber, L.L.; Krahling, J.B.; Clarke, P.R.H.; Valkner, K.J.; Tolbert, N.E. Carnitine acyltransferases in rat liver peroxisomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **1981**, *211*, 599–604, doi:10.1016/0003-9861(81)90494-X.
- Binns, D.; Januszewski, T.; Chen, Y.; Hill, J.; Markin, V.S.; Zhao, Y.; Gilpin, C.; Chapman, K.D.; Anderson, R.G.W.; Goodman, J.M. An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies. *J. Cell Biol.* **2006**, *173*, 719–731, doi:10.1083/jcb.200511125.
- Bonekamp, N.A.; Völkl, A.; Fahimi, H.D.; Schrader, M. Reactive oxygen species and peroxisomes: Struggling for balance. *BioFactors*, **2009**, *35*, 346–355, doi:10.1002/biof.48.
- Brent, G.A. The molecular basis of thyroid hormone action. *N. Engl. J. Med.* **1994**, *331*, 847–853, doi:10.1056/NEJM199409293311306.
- Brenta, G. Why can insulin resistance be a natural consequence of thyroid dysfunction? *J. Thyroid Res.* **2011**, 1–9, doi:10.4061/2011/152850.
- Cancio, I.; Cajaraville, M.P. Cell biology of peroxisomes and their characteristics in aquatic organisms. *Int. Rev. Cytol.* **2000**, *199*, 201–293, doi:10.1016/s0074-7696(00)99005-3.
- Cannon, B.; Alexson, S.; Nedergaard, J. Peroxisomal beta-oxidation in brown fat. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1982**, *386*, 40–58.
- Cannon, B.; Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* **2004**, *84*, 277–359.
- Cano-Europa, E.; Blas-Valdivia, V.; Lopez-Galindo, G.E.; Franco-Colin, M.; Pineda-Reynoso, M.; Hernandez-Garcia, A.; Ortiz-Butron, R. Methimazole-induced hypothyroidism causes alteration of the redox environment, oxidative stress, and hepatic damage; events not caused by hypothyroidism itself. *Ann. Hepatol.* **2010**, *9*, 80–88, doi:10.1016/s1665-2681(19)31684-9.
- Carazo, A.; Levin, J.; Casas, F.; Seyer, P.; Grandemange, S.; Busson, M.; Pessemesse, L.; Wrutniak-Cabello, C.; Cabello, G. Protein sequences involved in the mitochondrial import of the 3,5,3'-L-triiodothyronine receptor p43. *J. Cell. Physiol.* **2012**, *227*, 3768–3777, doi:10.1002/jcp.24085.

- Carelli, V.; Maresca, A.; Caporali, L.; Trifunov, S.; Zanna, C.; Rugolo, M. Mitochondria: Biogenesis and mitophagy balance in segregation and clonal expansion of mitochondrial DNA mutations. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2015**, *63*, 21–24, doi:10.1016/j.biocel.2015.01.023.
- Carey, A.L.; Kingwell, B.A. Brown adipose tissue in humans: Therapeutic potential to combat obesity. *Pharmacol. Ther.* **2013**, *140*, 26–33, doi:10.1016/j.pharmthera.2013.05.009.
- Carvalho, S.D.; Kimura, E.T.; Bianco, A.C.; Silva, J.E. Central role of brown adipose tissue thyroxine 5'-deiodinase on thyroid hormone-dependent thermogenic response to cold. *Endocrinology* **1991**, *128*, 2149–2159, doi:10.1210/endo-128-4-2149.
- Carvalho, A.F.; Pinto, M.P.; Grou, C.P.; Alencastre, I.S.; Franssen, M.; Sá-Miranda, C.; Azevedo, J.E. Ubiquitination of mammalian Pex5p, the peroxisomal import receptor. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 31267–31272, doi:10.1074/jbc.M706325200.
- Casas, F.; Rochard, P.; Rodier, A.; Cassar-Malek, I.; Marchal-Victorion, S.; Wiesner, R.J.; Cabello, G.; Wrutniak, C. A Variant form of the nuclear triiodothyronine receptor c-ErbA α 1 plays a direct role in regulation of mitochondrial RNA synthesis. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 7913–7924, doi:10.1128/mcb.19.12.7913.
- Casas, F.; Pessemeesse, L.; Grandemange, S.; Seyer, P.; Baris, O.; Gueguen, N.; Ramonatxo, C.; Perrin, F.; Fouret, G.; Lepourry, L.; et al. Overexpression of the mitochondrial T3 receptor induces skeletal muscle atrophy during aging. *PLoS One* **2009**, *4*, 1–14, doi:10.1371/journal.pone.0005631.
- Castro, J.P.; Jung, T.; Grune, T.; Siems, W. 4-Hydroxynonenal (HNE) modified proteins in metabolic diseases. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *111*, 309–315, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.497.
- Cettour-Rose, P.; Theander-Carrillo, C.; Asensio, C.; Klein, M.; Visser, T.J.; Burger, A.G.; Meier, C.A.; Rohner-Jeanrenaud, F. Hypothyroidism in rats decreases peripheral glucose utilisation, a defect partially corrected by central leptin infusion. *Diabetologia* **2005**, *48*, 624–633, doi:10.1007/s00125-005-1696-4.
- Changle, M.; Suresh, S. Peroxisome matrix and membrane protein biogenesis change. *IUBMB Life* **2009**, *61*, 713–722, doi:10.1002/iub.196.
- Chapple, S.J.; Cheng, X.; Mann, G.E. Effects of 4-hydroxynonenal on vascular endothelial and smooth muscle cell redox signaling and function in health and disease. *Redox Biol.* **2013**, *1*, 319–331, doi:10.1016/j.redox.2013.04.001.
- Cheng, S.Y.; Gong, Q.H.; Parkison, C.; Robinson, E.A.; Appella, E.; Merlino, G.T.; Pastan, I. The nucleotide sequence of a human cellular thyroid hormone binding protein present in endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 11221–11227, doi:10.1016/s0021-9258(18)60947-0.
- Chitolina Schetinger, M.R.; Morsch, V.M.; Farias Martins Filho, A.O.; Duarte Junior, H.R.; Ribeiro Coriolano, F.H.; et al. Neuroprotection elicited by resveratrol in a rat model of hypothyroidism: Possible involvement of cholinergic signaling and redox status. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2021**, *524*, 1–8, doi:10.1016/j.mce.2021.111157.
- Christie K.N. and Stoward J.P. Catalase in skeletal muscle fibers. *J. Histochem. Cytochem.* **1979**, *27*, 814–819, doi:10.1177/27.4.376691.
- Christoffolete, M.A.; Linardi, C.C.G.; De Jesus, L.; Ebina, K.N.; Carvalho, S.D.; Ribeiro, M.O.; Rabelo, R.; Curcio, C.; Martins, L.; Kimura, E.T.; et al. Mice with targeted disruption of

- the *dio2* gene have cold-induced overexpression of the uncoupling protein 1 gene but fail to increase brown adipose tissue lipogenesis and adaptive thermogenesis. *Diabetes* **2004**, *53*, 577–584, doi:10.2337/diabetes.53.3.577.
- Chung, G.E.; Kim, D.; Kim, W.; Yim, J.Y.; Park, M.J.; Kim, Y.J.; Yoon, J.H.; Lee, H.S. Non-alcoholic fatty liver disease across the spectrum of hypothyroidism. *J. Hepatol.* **2012**, *57*, 150–156, doi:10.1016/j.jhep.2012.02.027.
- Costa-Rodrigues, J.; Carvalho, A.F.; Fransen, M.; Hambruch, E.; Schliebs, W.; Sá-Miranda, C.; Azevedo, J.E. Pex5p, the peroxisomal cycling receptor, is a monomeric non-globular protein. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 24404–24411, doi:10.1074/jbc.M501985200.
- Curcio, C.; Lopes, A.M.; Ribeiro, M.O.; Francoso, O.A.; Carvalho, S.D.; Lima, F.B.; Bicudo, J.E.; Bianco, A.C. Development of compensatory thermogenesis in response to overfeeding in hypothyroid rats. *Endocrinology* **1999**, *140*, 3438–3443, doi:10.1210/endo.140.8.6906.
- Cvoro, A.; Bajic, A.; Zhang, A.; Simon, M.; Golic, I.; Sieglaff, D.H.; Maletic-Savatic, M.; Korac, A.; Webb, P. Ligand independent and subtype-selective actions of thyroid hormone receptors in human adipose derived stem cells. *PLoS One* **2016**, *11*, 1–27, doi:10.1371/journal.pone.0164407.
- Čakić-Milošević, M.; Korać, A.; Davidović, V. Methimazole-induced hypothyroidism in rats: Effects on body weight and histological characteristics of thyroid gland. *Jugosl. Med. Biohemija* **2004**, *23*, 143–147, doi:10.2298/JMH0402143C.
- Dave, B.N.; Paradkar, N.M. Total superoxide dismutase, Cu/Zn superoxide dismutase and glutathione peroxidase in untreated hyperthyroidism and hypothyroidism. *JK Sci.* **2009**, *11*, 6–10.
- David, J.; Enrique, J.; Hospital, B.I. Adenosine 3',5'-monophosphate and thyroid hormone control of uncoupling protein messenger ribonucleic acid in freshly dispersed brown adipocytes. *Endocrinology* **1992**, *130*, doi: 10.1210/endo.130.5.1374009.
- Davis, J.; Davis, F.B. Nongenomic actions of thyroid hormone. *Thyroid* **1996**, *6*, 497–504, doi: 10.1089/thy.1996.6.497.
- de Craemer, D.; Kerckaert, I.; Roels, F. Hepatocellular peroxisomes in human alcoholic and drug-induced hepatitis: A quantitative study. *Hepatology* **1991**, *14*, 811–817, doi:10.1002/hep.1840140512.
- De Duve, C.; Baudhuin, P. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev.* **1966**, *46*, 323–357, doi:10.1152/physrev.1966.46.2.323.
- De Jesus, L.A.; Carvalho, S.D.; Ribeiro, M.O.; Schneider, M.; Kim, S.W.; Harney, J.W.; Larsen, P.R.; Bianco, A.C. The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **2001**, *108*, 1379–1385, doi:10.1172/JCI200113803.
- Dean, M.; Rzhetsky, A.; Allikmets, R. The human ATP-Binding Cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* **2001**, *11*, 1156–1166, doi:10.1101/gr.184901.
- Del Río, L.A.; Palma, J.M.; Sandalio, L.M.; Corpas, F.J.; Pastori, G.M.; Bueno, P.; López-Huertas, E. Peroxisomes as a source of superoxide and hydrogen peroxide in stressed plants. *Biochem. Soc. Trans.* **1996**, *24*, 434–438, doi:10.1042/bst0240434.

- Del Río, L.A.; Corpas, F.J.; Sandalio, L.M.; Palma, J.M.; Gómez, M.; Barroso, J.B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J. Exp. Bot.* **2002**, *53*, 1255–1272, doi:10.1093/jxb/53.372.1255.
- Del Río, L.A.; López-Huertas, E. ROS generation in peroxisomes and its role in cell signaling. *Plant Cell Physiol.* **2016**, *57*, 1364–1376, doi:10.1093/pcp/pcw076.
- Delille, H.K.; Alves, R.; Schrader, M. Biogenesis of peroxisomes and mitochondria: linked by division. *Histochem. Cell Biol.* **2009**, *131*, 441–446, doi:10.1007/s00418-009-0561-9.
- Delille, H.K.; Agricola, B.; Guimaraes, S.C.; Borta, H.; Lüers, G.H.; Fransen, M.; Schrader, M. Pex11p β -mediated growth and division of mammalian peroxisomes follows a maturation pathway. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 2750–2762, doi:10.1242/jcs.062109.
- Delille, H.K.; Dodt, G.; Schrader, M. Pex11p β -mediated maturation of peroxisomes. *Commun. Integr. Biol.* **2011**, *4*, 51–54, doi:10.4161/cib.4.1.13647.
- Dias, A.F.; Rodrigues, T.A.; Pedrosa, A.G.; Barros-Barbosa, A.; Francisco, T.; Azevedo, J.E. The peroxisomal matrix protein translocon is a large cavity-forming protein assembly into which PEX5 protein enters to release its cargo. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 15287–15300, doi:10.1074/jbc.M117.805044.
- Dicker, A.; Raasmaja, A.; Cannon, B.; Nedergaard, J. Increased α 1-adrenoceptor density in brown adipose tissue indicates recruitment drive in hypothyroid rats. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **1992**, *263*, E654–662, doi:10.1152/ajpendo.1992.263.4.e654.
- Distel, B.; Erdmann, R.; Gould, S.J.; Blobel, G.; Crane, D.I.; Cregg, J.M.; Dodt, G.; Fujiki, Y.; Goodman, J.M.; Just, W.W.; et al. A unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors. *J. Cell Biol.* **1996**, *135*, 1–3, doi:10.1083/jcb.135.1.1.
- Dodt, G.; Warren, D.; Becker, E.; Rehling, P.; Gould, S.J. Domain mapping of human PEX5 reveals functional and structural similarities to *Saccharomyces cerevisiae* pex18p and pex21p. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 41769–41781, doi:10.1074/jbc.M106932200.
- Duntas, L.H. Thyroid disease and lipids. *Thyroid* **2002**, *12*, 287–293, doi:10.5005/jp/books/10928_36.
- Enríquez, J.A.; Fernández-Silva, P.; Garrido-Pérez, N.; López-Pérez, M.J.; Pérez-Martos, A.; Montoya, J. Direct regulation of mitochondrial RNA synthesis by thyroid hormone. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 657–670, doi:10.1128/mcb.19.1.657.
- Erdmann, R.; Schliebs, W. Peroxisomal matrix protein import: the transient pore model. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 738–742, doi: 10.1038/nrm1710.
- Erdmann, R. Assembly, maintenance and dynamics of peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2016**, *1863*, 787–789, doi:10.1016/j.bbamcr.2016.01.020.
- Ezaki, J.; Kominami, E.; Ueno, T. Peroxisome degradation in mammals. *IUBMB Life* **2011**, *63*, 1001–1008, doi:10.1002/iub.537.
- Fahimi, H.D.; Baumgart, E. Current cytochemical techniques for the investigation of peroxisomes: A review. *J. Histochem. Cytochem.* **1999**, *47*, 1219–1232, doi: 10.1177/002215549904701001.
- Fang, Y.; Morrell, J.C.; Jones, J.M.; Gould, S.J. PEX3 functions as a PEX19 docking factor in the import of class I peroxisomal membrane proteins. *J. Cell Biol.* **2004**, *164*, 863–875, doi:10.1083/jcb.200311131.

- Farré, J.; Mahalingam, S.S.; Proietto, M.; Subramani, S. Peroxisome biogenesis, membrane contact sites, and quality control. *EMBO Rep.* **2018**, *20*, e46864, doi:10.15252/embr.201846864.
- Farwell, A. P., Braverman, L.E. Thyroid and antithyroid drugs. *Goodman Gilman's Pharmacol. Basis Ther.* **1996**, 1383–1409.
- Fedorenko, A.; Lishko, P. V.; Kirichok, Y. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell* **2012**, *151*, 400–413, doi:10.1016/j.cell.2012.09.010.
- Francisco, T.; Rodrigues, T.A.; Freitas, M.O.; Grou, C.P.; Carvalho, A.F.; Sá-Miranda, C.; Pinto, M.P.; Azevedo, J.E. A cargo-centered perspective on the PEX5 receptor-mediated peroxisomal protein import pathway. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 29151–29159, doi:10.1074/jbc.M113.487140.
- Fransen, M.; Nordgren, M.; Wang, B.; Apanasets, O. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis Dis.* **2012**, *1822*, 1363–1373, doi:10.1016/j.bbadis.2011.12.001.
- Fransen, M.; Lismont, C. Redox signaling from and to peroxisomes: Progress, challenges, and prospects. *Antioxid. Redox Signal.* **2019**, *30*, 95–112, doi:10.1089/ars.2018.7515.
- Freitas, M.O.; Francisco, T.; Rodrigues, T.A.; Alencastre, I.S.; Pinto, M.P.; Grou, C.P.; Carvalho, A.F.; Fransen, M.; Sá-Miranda, C.; Azevedo, J.E. PEX5 protein binds monomeric catalase blocking its tetramerization and releases it upon binding the N-terminal domain of PEX14. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 40509–40519, doi:10.1074/jbc.M111.287201.
- Friesema, E.C.H.; Visser, W.E.; Visser, T.J. Genetics and phenomics of thyroid hormone transport by MCT8. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2010**, *322*, 107–113, doi:10.1016/j.mce.2010.01.016.
- Fujiki, Y.; Lazarow, P.B. Post-translational import of fatty acyl-CoA oxidase and catalase into peroxisomes of rat liver in vitro. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 5603–5609.
- Fujiki, Y.; Miyata, N.; Matsumoto, N.; Tamura, S. Dynamic and functional assembly of the AAA peroxins, Pex1p and Pex6p, and their membrane receptor Pex26p involved in shuttling of the PTS1 receptor Pex5p in peroxisome biogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* **2008**, *36*, 109–113, doi:10.1042/bst0360109.
- Fujiki, Y.; Nashiro, C.; Miyata, N.; Tamura, S.; Okumoto, K. New insights into dynamic and functional assembly of the AAA peroxins, Pex1p and Pex6p, and their membrane receptor Pex26p in shuttling of PTS1-receptor Pex5p during peroxisome biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.* **2012**, *1823*, 145–149, doi:10.1016/j.bbamcr.2011.10.012.
- Fujiki, Y.; Okumoto, K.; Mukai, S.; Honsho, M.; Tamura, S. Peroxisome biogenesis in mammalian cells. *Front. Physiol.* **2014**, *307*, 1–8, doi:10.3389/fphys.2014.00307.
- Fujiki, Y.; Abe, Y.; Imoto, Y.; Tanaka, A.J.; Okumoto, K.; Honsho, M.; Tamura, S.; Miyata, N.; Yamashita, T.; Chung, W.K.; et al. Recent insights into peroxisome biogenesis and associated diseases. *J. Cell Sci.* **2020**, *133*, 1–9, doi:10.1242/jcs.236943.
- Fukai, T.; Ushio-Fukai, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *15*, 1583–1606, doi:10.1089/ars.2011.3999.

- Galiani, S.; Waithe, D.; Reglinski, K.; Cruz-Zaragoza, L.D.; Garcia, E.; Clausen, M.P.; Schliebs, W.; Erdmann, R.; Eggeling, C. Super-resolution microscopy reveals compartmentalization of peroxisomal membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 16948–16962, doi:10.1074/jbc.M116.734038.
- Gardner, B.M.; Castanzo, D.T.; Chowdhury, S.; Stjepanovic, G.; Stefely, M.S.; Hurley, J.H.; Lander, G.C.; Martin, A. The peroxisomal AAA-ATPase Pex1/Pex6 unfolds substrates by processive threading. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–15, doi:10.1038/s41467-017-02474-4.
- Gebicka, L.; Krych-Madej, J. The role of catalases in the prevention/promotion of oxidative stress. *J. Inorg. Biochem.* **2019**, *197*, 110699, doi:10.1016/j.jinorgbio.2019.110699.
- Geuze, H.J.; Murk, J.L.; Stroobants, A.K.; Griffith, J.M.; Kleijmeer, M.J.; Koster, A.J.; Verkleij, A.J.; Distel, B.; Tabak, H.F. Involvement of the endoplasmic reticulum in peroxisome formation. *Mol. Biol. Cell* **2003**, *14*, 2900–2907, doi:10.1091/mbc.E02.
- Ghorbani, M.; Himms-Hagen, J. Appearance of brown adipocytes in white adipose tissue during CL 316,243-induced reversal of obesity and diabetes in Zucker fa/fa rats. *Int. J. Obes.* **1997**, *21*, 465–475, doi:10.1038/sj.ijo.0800432.
- Giacobino, J.P.; Moinat, M.; Muzzin, P.; Siegrist-Kaiser, C.A.; Seydoux, J.; Girardier, L. Peroxisomal oxidative capacity of brown adipose tissue depends on the thyroid status. *Mol. Cell. Endocrinol.* **1989**, *61*, 217–225, doi:10.1016/0303-7207(89)90133-0.
- Girnun, G.D.; Domann, F.E.; Moore, S.A.; Robbins, M.E.C. Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor response element in the rat catalase promoter. *Mol. Endocrinol.* **2002**, *16*, 2793–2801, doi:10.1210/me.2002-0020.
- Glatzle, D.; Vuilleumier, J.P.; Weber, F.; Decker, K. Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia* **1974**, *30*, 665–667, doi:10.1007/BF01921531.
- Glorieux, C.; Calderon, P.B. Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol. Chem.* **2017**, *398*, 1095–1108, doi:10.1515/hsz-2017-0131.
- Goglia, F.; Moreno, M.; Lanni, A. Action of thyroid hormones at the cellular level: The mitochondrial target. *FEBS Lett.* **1999**, *452*, 115–120, doi:10.1016/S0014-5793(99)00642-0.
- Goldfisher, S.; Moore, C.L.; Johnson, A.B.; Spiro, A.J.; Valsamis, M.P.; Wisniewski, H.K.; Ritch, R.H.; Norton, W.T.; Rapin, I.; Gartner, L.M. Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebro-hepato-renal syndrome. *Science* **1973**, *182*, 62–64, doi:10.1126/science.182.4107.62.
- Gould, S.J.; Valle, D. Peroxisome biogenesis disorders: Genetics and cell biology. *Trends Genet.* **2000**, *16*, 340–345, doi:10.1016/S0168-9525(00)02056-4.
- Griffith, O.W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* **1980**, *106*, 207–212, doi:10.1248/bpb.33.556.
- Grou, C.P.; Francisco, T.; Rodrigues, T.A.; Freitas, M.O.; Pinto, M.P.; Carvalho, A.F.; Domingues, P.; Wood, S.A.; Rodríguez-Borges, J.E.; Sá-Miranda, C.; et al. Identification of ubiquitin-specific protease 9X (USP9X) as a deubiquitinase acting on ubiquitin-peroxin 5 (PEX5) thioester conjugate. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 12815–12827, doi:10.1074/jbc.M112.340158.

- Guardiola-Diaz, H.M.; Rehnmark, S.; Usuda, N.; Albrektsen, T.; Feltkamp, D.; Gustafsson, J.Å.; Alexson, S.E.H. Rat peroxisome proliferator-activated receptors and brown adipose tissue function during cold acclimatization. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 23368–23377, doi:10.1074/jbc.274.33.23368.
- Guimarães, C.P.; Domingues, P.; Aubourg, P.; Fouquet, F.; Pujol, A.; Jimenez-Sanchez, G.; Sá-Miranda, C.; Azevedo, J.E. Mouse liver PMP70 and ALDP: Homomeric interactions prevail in vivo. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **2004**, *1689*, 235–243, doi:10.1016/j.bbadis.2004.04.001.
- Gullberg, H.; Rudling, M.; Saltó, C.; Forrest, D.; Angelin, B.; Vennström, B. Requirement for thyroid hormone receptor β in T3 regulation of cholesterol metabolism in mice. *Mol. Endocrinol.* **2002**, *16*, 1767–1777, doi:10.1210/me.2002-0009.
- Halbach, A. Targeting of the tail-anchored peroxisomal membrane proteins PEX26 and PEX15 occurs through C-terminal PEX19-binding sites. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 2508–2517, doi:10.1242/jcs.02979.
- Hall, J.A.; Ribich, S.; Christoffolete, M.A.; Simovic, G.; Correa-Medina, M.; Patti, M.E.; Bianco, A.C. Absence of thyroid hormone activation during development underlies a permanent defect in adaptive thermogenesis. *Endocrinology* **2010**, *151*, 4573–4582, doi:10.1210/en.2010-0511.
- Hallengren, B. Hypothyroidism – clinical features, diagnosis and therapy; thyroid tests should be performed on broad indications. *Lakartidningen* **1998**, *95*, 4091–4096.
- Hanson, P.I.; Whiteheart, S.W. AAA+ proteins: Have engine, will work. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 519–529, doi: 10.1038/nrm1684.
- Hernández, A.; Obregón, M.J. Triiodothyronine amplifies the adrenergic stimulation of uncoupling protein expression in rat brown adipocytes. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **2000**, *278*, 769–777, doi:10.1152/ajpendo.2000.278.5.e769.
- Hofer, D.C.; Pessentheiner, A.R.; Pelzmann, H.J.; Schlager, S.; Madreiter-Sokolowski, C.T.; Kolb, D.; Eichmann, T.O.; Rechberger, G.; Bilban, M.; Graier, W.F.; et al. Critical role of the peroxisomal protein PEX16 in white adipocyte development and lipid homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **2017**, *1862*, 358–368, doi:10.1016/j.bbalip.2016.12.009.
- Holmgren, A.; Sengupta, R. The use of thiols by ribonucleotide reductase. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49*, 1617–1628, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.005.
- Holmström, K.M.; Baird, L.; Zhang, Y.; Hargreaves, I.; Chalasani, A.; Land, J.M.; Stanyer, L.; Yamamoto, M.; Dinkova-Kostova, A.T.; Abramov, A.Y. Nrf2 impacts cellular bioenergetics by controlling substrate availability for mitochondrial respiration. *Biol. Open* **2013**, *2*, 761–770, doi:10.1242/bio.20134853.
- Holmström, K.M.; Kostov, R. V.; Dinkova-Kostova, A.T. The multifaceted role of Nrf2 in mitochondrial function. *Curr. Opin. Toxicol.* **2016**, *2*, 80–91, doi:10.1016/j.cotox.2016.10.002.
- Horner, S.M.; Briley, J.; Liu, H.M.; Park, H.S.; Gale, M. Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 14590–14595, doi:10.1073/pnas.1110133108.

- Hsieh, A.C.L.; Carlson, L.D. Role of the thyroid in metabolic low temperature. *Am. J. Physiol.* **1956**, 40-44.
- Hua, R.; Kim, P.K. Multiple paths to peroxisomes: Mechanism of peroxisome maintenance in mammals. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.* **2016**, 1863, 881–891, doi:10.1016/j.bbamcr.2015.09.026.
- Huang, Y.; Li, W.; Kong, A.N.T. Anti-oxidative stress regulator NF-E2-related factor 2 mediates the adaptive induction of antioxidant and detoxifying enzymes by lipid peroxidation metabolite 4-hydroxynonenal. *Cell Biosci.* **2012**, 2, 1–7, doi:10.1186/2045-3701-2-40.
- Hudecova, S.; Vadaszova, A.; Soukup, T.; Krizanova, O. Effect of thyroid hormones on the gene expression of calcium transport systems in rat muscles. *Life Sci.* **2004**, 75, 923–931, doi:10.1016/j.lfs.2004.01.026.
- Ichimura, Y.; Waguri, S.; Sou, Y. shin; Kageyama, S.; Hasegawa, J.; Ishimura, R.; Saito, T.; Yang, Y.; Kouno, T.; Fukutomi, T.; et al. Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Mol. Cell* **2013**, 51, 618–631, doi:10.1016/j.molcel.2013.08.003.
- Imanaka, T.; Aihara, K.; Suzuki, Y.; Yokota, S.; Osumi, T. The 70-kDa Peroxisomal Membrane Protein (PMP70), an ATP-Binding Cassette Transporter. *Cell Biochem. Biophys.* **2000**, 32, 131–138, doi:10.1385/CBB:32:1-3:131.
- Imanaka, T. Biogenesis, the function of peroxisomes, and their role in genetic disease: With a focus on the ABC transporter. *Yakugaku Zasshi* **2018**, 138, 1067–1083, doi:10.1248/yakushi.18-00023.
- Islinger, M.; Voelkl, A.; Fahimi, H.D.; Schrader, M. The peroxisome: an update on mysteries 2.0. *Histochem. Cell Biol.* **2018**, 150, 443–471, doi:10.1007/s00418-018-1722-5.
- Jansen, R.L.M.; van der Klei, I.J. The peroxisome biogenesis factors Pex3 and Pex19: multitasking proteins with disputed functions. *FEBS Lett.* **2019**, 593, 457–474, doi:10.1002/1873-3468.13340.
- Jansen, R.L.M.; Santana-Molina, C.; van den Noort, M.; Devos, D.P.; van der Klei, I.J. Comparative genomics of peroxisome biogenesis proteins: making sense of the PEX proteins. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, 9, 1–22, doi:10.3389/fcell.2021.654163.
- Jones, J.M.; Morrell, J.C.; Gould, S.J. PEX19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class 1 peroxisomal membrane proteins. *J. Cell Biol.* **2004**, 164, 57–67, doi:10.1083/jcb.200304111.
- Joshi, S.; Agrawal, G.; Subramani, S. Phosphorylation-dependent Pex11p and Fis1p interaction regulates peroxisome division. *Mol. Biol. Cell* **2012**, 23, 1307–1315, doi:10.1091/mbc.e11-09-0782.
- Kaciuba-Uscilko, H.; Dudley, G.A.; Terjung, R.L. Influence of thyroid status on skeletal muscle LPL activity and TG uptake. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **1980**, 238, E518-523, doi:10.1152/ajpendo.1980.238.6.e518.
- Killackey, S.A.; Philpott, D.J.; Girardin, S.E. Mitophagy pathways in health and disease. *J. Cell Biol.* **2020**, 219, 1–15, doi:10.1083/jcb.202004029.
- Kim, P.K.; Mullen, R.T.; Schumann, U.; Lippincott-Schwartz, J. The origin and maintenance of mammalian peroxisomes involves a de novo PEX16-dependent pathway from the ER. *J. Cell Biol.* **2006**, 173, 521–532, doi:10.1083/jcb.200601036.

- Kim, Y.S.; Vallur, P.G.; Phaëton, R.; Mythreye, K.; Hempel, N. Insights into the dichotomous regulation of SOD2 in cancer. *Antioxidants* **2017**, *6*, 1–25, doi:10.3390/antiox6040086.
- Kobayashi, S.; Tanaka, A.; Fujiki, Y. Fis1, DLP1, and Pex11p coordinately regulate peroxisome morphogenesis. *Exp. Cell Res.* **2007**, *313*, 1675–1686, doi:10.1016/j.yexcr.2007.02.028.
- Koch, A. Peroxisome elongation and constriction but not fission can occur independently of dynamin-like protein 1. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 3995–4006, doi:10.1242/jcs.01268.
- Koch, A.; Yoon, Y.; Bonekamp, N.A.; McNiven, M.A.; Michael, S. A Role for Fis1 in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 5077–5086, doi:10.1091/mbc.E05.
- Koch, J.; Pranjic, K.; Huber, A.; Ellinger, A.; Hartig, A.; Kragler, F.; Brocard, C. PEX11 family members are membrane elongation factors that coordinate peroxisome proliferation and maintenance. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 3389–3400, doi:10.1242/jcs.064907.
- Korac, A.; Buzadzic, B.; Petrovic, V.; Vasilijevic, A.; Jankovic, A.; Micunovic, K.; Korac, B. The role of nitric oxide in remodeling of capillary network in rat interscapular brown adipose tissue after long-term cold acclimation. *Histol. Histopathol.* **2008**, *23*, 441–450, doi:10.14670/HH-23.441.
- Kovac, S.; Angelova, P.R.; Holmström, K.M.; Zhang, Y.; Dinkova-Kostova, A.T.; Abramov, A.Y. Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2014**, *1850*, 794–801, doi:10.1016/j.bbagen.2014.11.021.
- Krisans, S.K. The role of peroxisomes in cholesterol metabolism. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1992**, *7*, 358–364, doi:10.1165/ajrcmb/7.4.358.
- Kunze, M.; Pracharoenwattana, I.; Smith, S.M.; Hartig, A. A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2006**, *1763*, 1441–1452, doi:10.1016/j.bbamcr.2006.09.009.
- Lageweg, W.; Tager, J.M.; Wanders, R.J.A. Topography of very-long-chain-fatty-acid-activating activity in peroxisomes from rat liver. *Biochem. J.* **1991**, *276*, 53–56, doi:10.1042/bj2760053.
- Lam, S.K.; Yoda, N.; Schekman, R. A vesicle carrier that mediates peroxisome protein traffic from the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *108*, E51–E52, doi:10.1073/pnas.1103526108.
- Lapa, C.; Maya, Y.; Wagner, M.; Arias-Loza, P.; Werner, R.A.; Herrmann, K.; Higuchi, T. Activation of brown adipose tissue in hypothyroidism. *Ann. Med.* **2015**, *47*, 538–545, doi:10.3109/07853890.2015.1085126.
- Laurberg, P.; Andersen, S.; Karmisholt, J. Cold adaptation and thyroid hormone metabolism. *Horm. Metab. Res.* **2005**, *37*, 545–549, doi:10.1055/s.
- Lazar, M.A. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr. Rev.* **1993**, *14*, 184–193, doi:10.1210/er.14.2.184.
- Lazarow, P.B.; De Duve, C. A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1976**, *73*: 2043–2046, <https://doi.org/10.1073/pnas.73.6.2043>.
- Lazarow, P.B.; Fujiki, Y. Biogenesis of peroxisomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1985**, *1*, 489–530, doi:10.1146/annurev.cb.01.110185.002421.

- Lazarow, P.B. The role of peroxisomes in mammalian cellular metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* **1987**, *10*, 11–22, doi:10.1007/BF01812843.
- Lee, J.M.; Calkins, M.J.; Chan, K.; Kan, Y.W.; Johnson, J.A. Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 12029–12038, doi:10.1074/jbc.M211558200.
- LeHir, M.; Herzog, V.; Fahimi, H.D. Cytochemical detection of catalase with 3,3'-diaminobenzidine. *Histochemistry* **1979**, *66*, 51–66, doi: 10.1007/BF00493354.
- Lettieri-Barbato, D. Redox control of non-shivering thermogenesis. *Mol. Metab.* **2019**, *25*, 11–19, doi:10.1016/j.molmet.2019.04.002.
- Li, X.; Baumgart, E.; Dong, G.-X.; Morrell, C.J.; Jimenez-Sanchez, G.; Valle, D.; Smith, D.K.; Gould, J.S. PEX11 is required for peroxisome proliferation in response to 4-phenylbutyrate but is dispensable for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha-mediated peroxisome proliferation. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 8226–8240, doi:10.1128/mcb.22.23.8226-8240.2002.
- Li, X.; Gould, S.J. PEX11 promotes peroxisome division independently of peroxisome metabolism. *J. Cell Biol.* **2002**, *156*, 643–651, doi:10.1083/jcb.200112028.
- Li, X.; Gould, S.J. Membrane transport structure function and biogenesis: The Dynamin-like GTPase DLP1 is essential for peroxisome division and is recruited to peroxisomes in part by PEX11. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 17012–17020, doi:10.1074/jbc.M212031200.
- Lismont, C.; Nordgren, M.; Van Veldhoven, P.P.; Fransen, M. Redox interplay between mitochondria and peroxisomes. *Front. Cell Dev. Biol.* **2015**, *3*, 1-19, doi:10.3389/fcell.2015.00035.
- Lismont, C.; Revenco, I.; Fransen, M. Peroxisomal hydrogen peroxide metabolism and signaling in health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1–21, doi:10.3390/ijms20153673.
- Liu, J.; Lu, W.; Shi, B.; Klein, S.; Su, X. Peroxisomal regulation of redox homeostasis and adipocyte metabolism. *Redox Biol.* **2019**, *24*, 1-8, doi:10.1016/j.redox.2019.101167.
- Lo, S.C.; Hannink, M. PGAM5 tethers a ternary complex containing Keap1 and Nrf2 to mitochondria. *Exp. Cell Res.* **2008**, *314*, 1789–1803, doi:10.1016/j.yexcr.2008.02.014.
- Lodhi, I.J.; Semenkovich, C.F. Peroxisomes: A nexus for lipid metabolism and cellular signaling. *Cell Metab.* **2014**, *19*, 380–392, doi:10.1016/j.cmet.2014.01.002.
- Lombardi, A.; Senese, R.; De Matteis, R.; Busiello, R.A.; Cioffi, F.; Goglia, F.; Lanni, A. 3,5-diiodo-L-thyronine activates brown adipose tissue thermogenesis in hypothyroid rats. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–22, doi:10.1371/journal.pone.0116498.
- López-Bernardo, E.; Anedda, A.; Sánchez-Pérez, P.; Acosta-Iborra, B.; Cadenas, S. 4-Hydroxynonenal induces Nrf2-mediated UCP3 upregulation in mouse cardiomyocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, *88*, 427–438, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.032.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Anal. Biochem.* **1951**, *193*, 265–275, doi:10.1016/0304-3894(92)87011-4.
- Lu, S.C. Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1830*, 3143–3153, doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.008.

- Łuczaj, W.; Gęgotek, A.; Skrzydlewska, E. Antioxidants and HNE in redox homeostasis. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *111*, 87–101, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.033.
- Ludtmann, M.H.R.; Angelova, P.R.; Zhang, Y.; Abramov, A.Y.; Dinkova-Kostova, A.T. Nrf2 affects the efficiency of mitochondrial fatty acid oxidation. *Biochem. J.* **2014**, *457*, 415–424, doi:10.1042/BJ20130863.
- Luers, G.; Hashimoto, T.; Fahimi, H.D.; Volkl, A. Biogenesis of peroxisomes: Isolation and characterization of two distinct peroxisomal populations from normal and regenerating rat liver. *J. Cell Biol.* **1993**, *121*, 1271–1280, doi:10.1083/jcb.121.6.1271.
- Luthman, M.; Holmgren, A. Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization. *Biochemistry* **1982**, *21*, 6628–6633, doi:10.1021/bi00269a003.
- Mannaerts, G.P.; Van Veldhoven, P.P.; Casteels, M. Peroxisomal lipid degradation via β - and α -oxidation in mammals. *Cell Biochem. Biophys.* **2000**, *32*, 73–87, doi:10.1385/CBB:32:1-3:73.
- Mano, T.; Sinohara, R.; Sawai, Y.; Oda, N.; Nishida, Y.; Mokuno, T.; Asano, K.; Ito, Y.; Kotake, M.; Hamada, M.; et al. Changes in lipid peroxidation and free radical scavengers in the brain of hyper- and hypothyroid aged rats. *J. Endocrinol.* **1995**, *147*, 361–365, doi:10.1677/joe.0.1470361.
- Marrif, H.; Schifman, A.; Stepanyan, Z.; Gillis, M.A.; Calderone, A.; Weiss, R.E.; Samarut, J.; Silva, J.E. Temperature homeostasis in transgenic mice lacking thyroid hormone receptor- α gene products. *Endocrinology* **2005**, *146*, 2872–2884, doi:10.1210/en.2004-1544.
- Marshall, P.A.; Dyer, J.M.; Quick, M.E.; Goodman, J.M. Redox-sensitive homodimerization of Pex11p: a proposed mechanism to regulate peroxisomal division. *J. Cell Biol.* **1996**, *135*, 123–137, doi:10.1083/jcb.135.1.123.
- Marti, J.; Portoles, M.; Jimenez-Nacher, I.; Cabo, J.; Jordá, A. Effect of thyroid hormones on urea biosynthesis and related processes in rat liver. *Endocrinology* **1988**, *123*, 2167–2174, doi:10.1210/endo-123-5-2167.
- Martinez, B.; Ortiz, R.M. Thyroid hormone regulation and insulin resistance: Insights from animals naturally adapted to fasting. *Physiology* **2017**, *32*, 141–151, doi:10.1152/physiol.00018.2016.
- Mason, R.L.; Hunt, H.M.; Hurxthal, L. Blood cholesterol values in hyperthyroidism and hypothyroidism — their significance. *N. Engl. J. Med.* **1930**, *203*, 1273–1278, doi:10.1056/nejm193012252032601.
- Matsumoto, N.; Tamura, S.; Furuki, S.; Miyata, N.; Moser, A.; Shimozawa, N.; Moser, H.W.; Suzuki, Y.; Kondo, N.; Fujiki, Y. Mutations in novel peroxin gene PEX26 That Cause Peroxisome-Biogenesis Disorders of Complementation Group 8 Provide a Genotype-Phenotype Correlation. *Am. J. Hum. Genet.* **2003**, *73*, 233–246, doi:10.1086/377004.
- Mattiazzi Ušaj, M.; Brložnik, M.; Kaferle, P.; Žitnik, M.; Wolinski, H.; Leitner, F.; Kohlwein, S.D.; Zupan, B.; Petrovič, U. Genome-wide localization study of yeast Pex11 identifies peroxisome–mitochondria interactions through the ERMES complex. *J. Mol. Biol.* **2015**, *427*, 2072–2087, doi:10.1016/j.jmb.2015.03.004.
- Maxfield, F.R.; Willingham, M.C.; Pastan, I.; Dragsten, P.; Cheng, S.Y. Binding and mobility of the cell surface receptors for 3,3',5- triiodo-L-thyronine. *Science*, **1981**, *211*, 63–65, doi:10.1126/science.6255563.

- McGuinness, M.C.; Lu, J.-F.; Zhang, H.-P.; Dong, G.-X.; Heinzer, A.K.; Watkins, P.A.; Powers, J.; Smith, K.D. Role of ALDP (ABCD1) and mitochondria in X-linked adrenoleukodystrophy. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 744–753, doi:10.1128/mcb.23.2.744-753.2003.
- McLelland, G.L.; Soubannier, V.; Chen, C.X.; McBride, H.M.; Fon, E.A. Parkin and PINK1 function in a vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control. *EMBO J.* **2014**, *33*, 282–295, doi:10.1002/emj.201385902.
- McNew, J.A.; Goodman, J.M. The targeting and assembly of peroxisomal proteins: Some old rules do not apply. *Trends Biochem. Sci.* **1996**, *21*, 54–58.
- Mendoza, A.; Hollenberg, A.N. Pharmacology & therapeutics new insights into thyroid hormone action. *Pharmacol. Ther.* **2017**, *173*, 135–145, doi:10.1016/j.pharmthera.2017.02.012.
- Messina, A.; Reina, S.; Guarino, F.; Pinto, De V. VDAC isoforms in mammals. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* **2012**, *1818*, 1466–1476, doi:10.1016/j.bbmem.2011.10.005.
- Milani, P.; Gagliardi, S.; Cova, E.; Cereda, C. SOD1 transcriptional and posttranscriptional regulation and its potential implications in ALS. *Neurol. Res. Int.* **2011**, *2011*, 1–9, doi:10.1155/2011/458427.
- Misra, H.P.; Fridovich, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 3170–3175.
- Miura, Y. The biological significance of ω -oxidation of fatty acids. *Proc. Japan Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **2013**, *89*, 370–382, doi:10.2183/pjab.89.370.
- Mohanty, A.; McBride, H.M. Emerging roles of mitochondria in the evolution, biogenesis, and function of peroxisomes. *Front. Physiol.* **2013**, *4*, 1–12, doi:10.3389/fphys.2013.00268.
- Morel, G.; Ricard-Blum, S.; Ardail, D. Kinetics of internalization and subcellular binding sites for T3 in mouse liver. *Biol. Cell* **1996**, *86*, 167–174, doi:10.1016/0248-4900(96)84781-2.
- Mory, G.; Ricquier, D.; Pesquies, P.; Hemon, P. Effects of hypothyroidism on the brown adipose tissue of adult rats: comparison with the effects of adaptation to cold. *J. Endocrinol.* **1981**, *91*, 515–524, doi: 10.1677/joe.0.0910515.
- Motley, A.M.; Hetteema, E.H. Yeast peroxisomes multiply by growth and division. *J. Cell Biol.* **2007**, *178*, 399–410, doi:10.1083/jcb.200702167.
- Motley, A.M.; Galvin, P.C.; Ekal, L.; Nuttall, J.M.; Hetteema, E.H. Reevaluation of the role of Pex1 and dynamin-related proteins in peroxisome membrane biogenesis. *J. Cell Biol.* **2015**, *211*, 1041–1056, doi:10.1083/jcb.201412066.
- Müller, M.J.; Seitz, H.J. Thyroid hormone action on intermediary metabolism. *Klin. Wochenschr.* **1984**, *62*, 49–55, doi:10.1007/bf01769663.
- Mullur, R.; Liu, Y.Y.; Brent, G.A. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* **2014**, *94*, 355–382, doi:10.1152/physrev.00030.2013.
- Murgod, R.; Soans, G. Changes in electrolyte and lipid profile in hypothyroidism. *Int. J. Life Sci. Pharma Res.* **2012**, *2*, 185–194.

- Nair, D.M.; Purdue, P.E.; Lazarow, P.B. Pex7p translocates in and out of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **2004**, *167*, 599–604, doi:10.1083/jcb.200407119.
- Nayer, P. De Thyroid hormone action at the cellular level. *Horm. Res.* **1987**, *26*, 48–57, doi:10.1159/000180685.
- Nedergaard, J.; Alexson, S.; Cannon, B. Cold adaptation in the rat: Increased brown fat peroxisomal β -oxidation relative to maximal mitochondrial oxidative capacity. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **1980**, *8*, C208-C216, doi:10.1152/ajpcell.1980.239.5.c208.
- Nedergaard, J.; Bengtsson, T.; Cannon, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol. Metab.* **2007**, *293*, E444–E452, doi:10.1152/ajpendo.00691.2006.
- Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Lehninger, Principles of Biochemistry*; Fifth editi.; W. H. Freeman and company, New York: New York, **2008**; ISBN 0716743396.
- Neuspiel, M.; Schauss, A.C.; Braschi, E.; Zunino, R.; Rippstein, P.; Rachubinski, R.A.; Andrade-Navarro, M.A.; McBride, H.M. Cargo-selected transport from the mitochondria to peroxisomes is mediated by vesicular carriers. *Curr. Biol.* **2008**, *18*, 102–108, doi:10.1016/j.cub.2007.12.038.
- Nordberg, J.; Arnér, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *31*, 1287–1312, doi:10.1016/S0891-5849(01)00724-9.
- Nordgren, M.; Wang, B.; Apanasets, O.; Fransen, M. Peroxisome degradation in mammals: Mechanisms of action, recent advances, and perspectives. *Front. Physiol.* **2013**, *4*, 1–12, doi:10.3389/fphys.2013.00145.
- Novikoff, A. B.; Beaufay, H.; De Duve, C. Electron microscopy of lysosome-rich fractions from rat liver. *J. Biophys. Biochem Cytol* **1956**, *2*, 179–184. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13357540>.
- Novikoff, P.M.; Novikoff, A.B. Peroxisomes in absorptive cells of mammalian small intestine. *J. Cell Biol.* **1972**, *53*, 532–560, doi:10.1083/jcb.53.2.532.
- O'Shea, P.J.; Williams, G.R. Insight into the physiological actions of thyroid hormone receptors from genetically modified mice. *J. Endocrinol.* **2002**, *175*, 553–570, doi:10.1677/joe.0.1750553.
- Obregon, M.-J. Thyroid hormone and adipocyte differentiation. *Thyroid*, **2008**, *18*, 185–195, doi:10.1089/thy.2007.0254.
- Obregon, M.-J. Adipose tissues and thyroid hormones. *Front. Physiol.* **2014**, *5*, 479, doi:10.3389/fphys.2014.00479.
- Okumoto, K.; Noda, H.; Fujiki, Y. Distinct modes of ubiquitination of peroxisome-targeting signal type 1 (PTS1) receptor Pex5p regulate PTS1 protein import. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 14089–14108, doi:10.1074/jbc.M113.527937.
- Oliveira, M.E.; Gouveia, A.M.; Pinto, R.A.; Sá-Miranda, C.; Azevedo, J.E. The energetics of Pex5p-mediated peroxisomal protein import. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 39483–39488, doi:10.1074/jbc.M305089200.
- Olzmann, J.A.; Carvalho, P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 137–155, doi:10.1038/s41580-018-0085-z.

- Ortiga-Carvalho, T.M.; Sidhaye, A.R.; Wondisford, F.E. Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2014**, *10*, 582–591, doi:10.1038/nrendo.2014.143.
- Osumi, T.; Hashimoto, T.; Ui, N. Purification and properties of acyl-CoA oxidase from rat liver. *J. Biochem.* **1980**, *87*, 1735–1746, doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a132918.
- Paglia, D.E.; Valentine, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* **1967**, *70*, 158–169, doi:10.5555/uri:pii:0022214367900765.
- Park, H.; He, A.; Min, T.; Johnson, M.J.; Dean, M.J.; Pietka, T.A.; Chen, Y.; Zhang, X.; Hsu, F.-F.; Razani, B.; et al. Peroxisome-derived lipids regulate adipose thermogenesis by mediating cold-induced mitochondrial fission. *J. Clin. Invest.* **2018**, *129*, 694–711, doi:10.1172/jci120606.
- Pascual-Ahuir, A.; Manzanares-Estreder, S.; Proft, M. Pro- and antioxidant functions of the peroxisome-mitochondria connection and its impact on aging and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 1–17, doi:10.1155/2017/9860841.
- Pavelka, M.; Goldenberg, H.; Htittinger, M.; Kramar, R. Enzymic and morphological studies on catalase positive particles from brown fat of cold adapted rats. *Histochemistry* **1976**, *50*, 47–55, doi: 10.1007/BF00492785.
- Pearce, E.N. Update in lipid alterations in subclinical hypothyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *97*, 326–333, doi:10.1210/jc.2011-2532.
- Pedrosa, A.G.; Francisco, T.; Bicho, D.; Dias, A.F.; Barros-Barbosa, A.; Hagmann, V.; Dodt, G.; Rodrigues, T.A.; Azevedo, J.E. Peroxisomal monoubiquitinated PEX5 interacts with the AAA ATPases PEX1 and PEX6 and is unfolded during its dislocation into the cytosol. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 11553–11563, doi:10.1074/jbc.RA118.003669.
- Pereira, B.; Rosa, L.F.; Safi, D.A.; Bechara, E.J.H.; Curi, R. Control of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in rat lymphoid organs by thyroid hormones. *J. Endocrinol.* **1994**, *140*, 73–77, doi: 10.1677/joe.0.1400073.
- Pereira, B.; Rosa, L.F.; Safi, D.A.; Bechara, E.J.H.; Curi, R. Hormonal regulation of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in rat macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *50*, 2093–2098, doi:10.1016/0006-2952(95)02116-7.
- Pessemesse, L.; Lepourry, L.; Bouton, K.; Levin, J.; Cabello, G.; Wrutniak-Cabello, C.; Casas, F. P28, a truncated form of TR α 1 regulates mitochondrial physiology. *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 4037–4043, doi:10.1016/j.febslet.2014.09.026.
- Petrović, N.; Cvijić, G.; Davidović, V. The activity of antioxidant enzymes and the content of uncoupling protein-1 in the brown adipose tissue of hypothyroid rats: Comparison with effects of iopanoic acid. *Physiol. Res.* **2001**, *50*, 289–297.
- Petrović, V.; Korać, A.; Buzadžić, B.; Korać, B. The effects of L-arginine and L-NAME supplementation on redox-regulation and thermogenesis in interscapular brown adipose tissue. *J. Exp. Biol.* **2005**, *208*, 4263–4271, doi:10.1242/jeb.01895.
- Petrović, V.; Buzadžić, B.; Korać, A.; Vasilijević, A.; Janković, A.; Korać, B. Free radical equilibrium in interscapular brown adipose tissue: Relationship between metabolic profile and antioxidative defense. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* **2006**, *142*, 60–65, doi:10.1016/j.cbpc.2005.10.004.

- Petrović, V.; Korać, A.; Buzadžić, B.; Vasiljević, A.; Janković, A.; Mićunović, K.; Korać, B. Nitric oxide regulates mitochondrial re-modelling in interscapular brown adipose tissue: Ultrastructural and morphometric-stereologic studies. *J. Microsc.* **2008**, *232*, 542–548, doi:10.1111/j.1365-2818.2008.02132.x.
- Petrović, V.; Buzadžić, B.; Korać, A.; Korać, B. Antioxidative defense and mitochondrial thermogenic response in brown adipose tissue. *Genes Nutr.* **2010**, *5*, 225–235, doi:10.1007/s12263-009-0162-1.
- Petrović, V.; Buzadžić, B.; Korać, A.; Vasiljević, A.; Janković, A.; Korać, B. NO modulates the molecular basis of rat interscapular brown adipose tissue thermogenesis. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* **2010**, *152*, 147–159, doi:10.1016/j.cbpc.2010.03.008.
- Piantadosi, C.A.; Carraway, M.S.; Babiker, A.; Suliman, H.B. Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1. *Circ. Res.* **2008**, *103*, 1232–1240, doi:10.1161/01.RES.0000338597.71702.ad.
- Pieuchot, L.; Jedd, G. Peroxisome assembly and functional diversity in eukaryotic microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* **2012**, *66*, 237–263, doi:10.1146/annurev-micro-092611-150126.
- Platta, H.W.; El Magraoui, F.; Schlee, D.; Grunau, S.; Girzalsky, W.; Erdmann, R. Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p is required for its recycling. *J. Cell Biol.* **2007**, *177*, 197–204, doi:10.1083/jcb.200611012.
- Poirier, Y.; Antonenkov, V.D.; Glumoff, T.; Hiltunen, J.K. Peroxisomal β -oxidation-A metabolic pathway with multiple functions. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.* **2006**, *1763*, 1413–1426, doi:10.1016/j.bbamcr.2006.08.034.
- Poulos, A.; van Crugten, C.; Sharp, P.; Carey, W.F.; Robertson, E.; Becroft, D.M.O.; Saudubray, J.M.; Poll-The, B.T.; Christensen, E.; Brandt, N. Prenatal diagnosis of Zellweger syndrome and related disorders: Impaired degradation of phytanic acid. *Eur. J. Pediatr.* **1986**, *145*, 507–510, doi:10.1007/BF02429053.
- Purdue, E.P.; Lazarow, P.B. Targeting of human catalase to peroxisomes is dependent upon a novel COOH-terminal peroxisomal targeting sequence. *J. Cell Biol.* **1996**, *134*, 849–862, doi:10.1083/jcb.134.4.849.
- Raas-Rothschild, A.; Wanders, R.J.A.; Mooijer, P.A.W.; Gootjes, J.; Waterham, H.R.; Gutman, A.; Suzuki, Y.; Shimozawa, N.; Kondo, N.; Eshel, G.; et al. A PEX6-defective peroxisomal biogenesis disorder with severe phenotype in an infant, versus mild phenotype resembling Usher syndrome in the affected parents. *Am. J. Hum. Genet.* **2002**, *70*, 1062–1068, doi:10.1086/339766.
- Rabelo, R. Delineation of thyroid hormone-responsive sequences within a critical enhancer in the rat uncoupling protein gene. *Endocrinology* **1995**, *136*, 1003–1013, doi:10.1210/en.136.3.1003.
- Radi, R.; Turrens, J.F.; Chang, L.Y.; Bush, K.M.; Crapo, J.D.; Freeman, B.A. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 22028–22034, doi:10.2165/00000001-000000000-00000.
- Raivio, K.; Crapo, J.D.; Chang, L.Y.; Pietarinen, P.; Devlin, R.B.; Kinnula, V.L. Catalase and glutathione reductase protection of human alveolar macrophages during oxidant

- exposure in vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2013**, *13*, 434–441, doi:10.1165/ajrcmb.13.4.7546773.
- Rani, V.; Deep, G.; Singh, R.K.; Palle, K.; Yadav, U.C.S. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci.* **2016**, *148*, 183–193, doi:10.1016/j.lfs.2016.02.002.
- Reddy, J.K.; Krishnakantha, T.P. Hepatic peroxisome proliferation: Induction by two novel compounds structurally unrelated to clofibrate. *Science*, **1975**, *190*, 787–789, doi:10.1126/science.1198095.
- Reddy, J.K.; Hashimoto, T. Peroxisomal β -oxidation and peroxisome proliferator - Activated receptor α : An adaptive metabolic system. *Annu. Rev. Nutr.* **2001**, *21*, 193–230, doi:10.1146/annurev.nutr.21.1.193.
- Reddy, V.S.; Gouroju, S.; Suchitra, M.M.; Suresh, V.; Sachan, A.; Srinivasa Rao, P.V.L.N.; Bitla, A.R. Antioxidant defense in overt and subclinical hypothyroidism. *Horm. Metab. Res.* **2013**, *45*, 754–758, doi:10.1055/s-0033-1348262.
- Rhodin, J. Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney: an electron microscopic study, Including an Experimental Analysis of the Conditions for Fixation of the Ren. *Thesis. Karolinska Institutet, Stock. Ab. Godvil* **1954**, *1*, 187–206.
- Ribeiro, M.O.; Bianco, A.C.; Brent, G.A.; Ribeiro, M.O.; Carvalho, S.D.; Schultz, J.J.; Chiellini, G.; Scanlan, T.S.; Bianco, A.C.; Brent, G.A. Thyroid hormone – sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform – specific. *J. Clin. Investig.* **2001**, *108*, 97–105, doi:10.1172/JCI200112584.
- Ribeiro, M.O.; Bianco, S.D.C.; Kaneshige, M.; Schultz, J.J.; Cheng, S.Y.; Bianco, A.C.; Brent, G.A. Expression of uncoupling protein 1 in mouse brown adipose tissue is thyroid hormone receptor- β isoform specific and required for adaptive thermogenesis. *Endocrinology* **2010**, *151*, 432–440, doi:10.1210/en.2009-0667.
- Ricquier, D.; Bouillaud, F.; Toumelin, P.; Mory, G.; Bazin, R.; Arch, J.; Pénicaud, L. Expression of uncoupling protein mRNA in thermogenic or weakly thermogenic brown adipose tissue. Evidence for a rapid β -adrenoreceptor-mediated and transcriptionally regulated step during activation of thermogenesis. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 13905–13910, doi:10.1016/s0021-9258(18)66957-1.
- Roels, F.; Cornelis, A. Heterogeneity of catalase staining in human hepatocellular peroxisomes. *J. Histochem. Cytochem.* **1989**, *37*, 331–337, doi:10.1177/37.3.2918222.
- Rothwell, N.J.; Stock, M.J. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Obes. Res.* **1997**, *5*, 650–656, doi:10.1002/j.1550-8528.1997.tb00591.x.
- Rouiller, C.; W. Bernhard. ‘Microbodies’ and the problem of mitochondrial regeneration in liver cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1956**, *2*, 355–360. <https://doi.org/10.1083/jcb.2.4.355>.
- Rubio, A.; Raasmaja, A.; Silva, J.E. Thyroid hormone and norepinephrine signaling in brown adipose tissue. II: Differential effects of thyroid hormone on β 3-adrenergic receptors in brown and white adipose tissue. *Endocrinology*, **1995**, *136*, 3277–3284. doi: 10.1210/endo.136.8.7628361.

- Ryoo, I.; Kwak, M.K. Regulatory crosstalk between the oxidative stress-related transcription factor Nfe2l2/Nrf2 and mitochondria. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2018**, *359*, 24–33, doi:10.1016/j.taap.2018.09.014.
- Sacksteder, K.A.; Jones, J.M.; South, S.T.; Li, X.; Liu, Y.; Gould, S.J. PEX19 binds multiple peroxisomal membrane proteins, is predominantly cytoplasmic, and is required for peroxisome membrane synthesis. *J. Cell Biol.* **2000**, *148*, 931–944, doi:10.1083/jcb.148.5.931.
- Saito, M. Human brown adipose tissue: Regulation and anti-obesity potential. *Endocr. J.* **2014**, *61*, 409–416, doi:10.1507/endocrj.EJ13-0527.
- Santi, A.; Duarte, M.M.M.F.; Moresco, R.N.; Menezes, C.; Bagatini, M.D.; Schetinger, M.R.C.; Loro, V.L. Association between thyroid hormones, lipids and oxidative stress biomarkers in overt hypothyroidism. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2010**, *48*, 1635–1639, doi:10.1515/CCLM.2010.309.
- Santi, A.; Duarte, M.M.M.F.; De Menezes, C.C.; Loro, V.L. Association of lipids with oxidative stress biomarkers in subclinical hypothyroidism. *Int. J. Endocrinol.* **2012**, *2012*, 1-7, doi:10.1155/2012/856359.
- Santini, F.; Marzullo, P.; Rotondi, M.; Ceccarini, G.; Pagano, L.; Ippolito, S.; Chiovato, L.; Biondi, B. The crosstalk between thyroid gland and adipose tissue: signal integration in health and disease. *Eur. J. Endocrinol.* **2014**, *171*, R137–R152, doi:10.1530/EJE-14-0067.
- Scarabottolo, L.; Trezzi, E.; Roma, P.; Catapano, A.L. Experimental hypothyroidism modulates the expression of the low density lipoprotein receptor by the liver. *Atherosclerosis* **1986**, *59*, 329–333, doi:10.1016/0021-9150(86)90129-2.
- Schmidlin, C.J.; Dodson, M.B.; Madhavan, L.; Zhang, D.D. Redox regulation by NRF2 in aging and disease. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *134*, 702–707, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.016.
- Schmidt, F.; Dietrich, D.; Eylenestein, R.; Groemping, Y.; Stehle, T.; Dodt, G. The role of conserved PEX3 regions in PEX19-binding and peroxisome biogenesis. *Traffic* **2012**, *13*, 1244–1260, doi:10.1111/j.1600-0854.2012.01380.x.
- Schrader, M.; Reuber, B.E.; Morrell, J.C.; Jimenez-Sanchez, G.; Obie, C.; Stroh, T.A.; Valle, D.; Schroer, T.A.; Gould, S.J. Expression of PEX11 β mediates peroxisome proliferation in the absence of extracellular stimuli. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 29607–29614, doi:10.1074/jbc.273.45.29607.
- Schrader, M. Tubulo-reticular clusters of peroxisomes in living COS-7 cells. *J. Histochem. Cytochem.* **2001**, *49*, 1421–1429, doi:10.1177/002215540104901110.
- Schrader, M.; Fahimi, H.D. Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem. Cell Biol.* **2004**, *122*, 383–393, doi:10.1007/s00418-004-0673-1.
- Schrader, M.; Fahimi, H.D. Growth and division of peroxisomes. *Int. Rev. Cytol.* **2006**, 237–290, doi: 10.1016/S0074-7696(06)55005-3.
- Schrader, M.; Fahimi, H.D. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2006**, *1763*, 1755–1766, doi:10.1016/j.bbamcr.2006.09.006.
- Schrader, M.; Yoon, Y. Mitochondria and peroxisomes: Are the ‘Big Brother’ and the ‘Little Sister’ closer than assumed? *BioEssays* **2007**, *29*, 1105–1114, doi:10.1002/bies.20659.

- Schrader, M.; Bonekamp, N.A.; Islinger, M. Fission and proliferation of peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **2012**, *1822*, 1343–1357, doi:10.1016/j.bbadis.2011.12.014.
- Schrader, M.; Costello, J.; Godinho, L.F.; Islinger, M. Peroxisome-mitochondria interplay and disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2015**, *38*, 681–702, doi:10.1007/s10545-015-9819-7.
- Schrader, M.; Costello, J.L.; Godinho, L.F.; Azadi, A.S.; Islinger, M. Proliferation and fission of peroxisomes - An update. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2016**, *1863*, 971–983, doi:10.1016/j.bbamcr.2015.09.024.
- Schrader, M.; Pellegrini, L. The making of a mammalian peroxisome, version 2.0: mitochondria get into the mix. *Cell Death Differ.* **2017**, *44*, 1–5, doi:10.1038/cdd.2017.23.
- Shen, W.; Liu, K.; Tian, C.; Yang, L.; Li, X.; Ren, J.; Packer, L.; Cotman, C.W.; Liu, J. R- α -Lipoic acid and acetyl-L-carnitine complementarily promote mitochondrial biogenesis in murine 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia* **2008**, *51*, 165–174, doi:10.1007/s00125-007-0852-4.
- Shen, Y.; Su, Y.; Silva, F.J.; Weller, A.H.; Sostre-Colón, J.; Titchenell, P.M.; Steger, D.J.; Seale, P.; Soccio, R.E. Shared PPAR α / γ target genes regulate brown adipocyte thermogenic function. *Cell Rep.* **2020**, *30*, 3079-3091.e5, doi:10.1016/j.celrep.2020.02.032.
- Shio, H.; Lazarow, P.B. Relationship between peroxisomes and endoplasmic reticulum investigated by combined catalase and glucose-6-phosphatase cytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* **1981**, *29*, 1263–1272, doi:10.1177/29.11.6274950.
- Sidhu, G.K.; Malek, R.R.; Khubchandani, A.; Mansuri, S.H.; Patel, M.S.; Oza, R.H. Creatinine and uric acid levels in hypothyroid patients a study of serum urea, creatinine and uric acid levels in hypothyroid patients. *Int. J. Res Med.* **2016**, *5*, 115–118.
- Sies, H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *27*, 916–921, doi:10.1016/S0891-5849(99)00177-X.
- Sies, H. Role of metabolic H₂O₂ generation: Redox signaling and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 8735–8741, doi:10.1074/jbc.R113.544635.
- Sies, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* **2017**, *11*, 613–619, doi:10.1016/j.redox.2016.12.035.
- Silva, J.E.; Larsen, P.R. Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature* **1983**, *305*, 712–713, doi: 10.1038/305712a0.
- Silva, J.E.; Larsen, P.R. Potential of brown adipose tissue type II thyroxine 5'-deiodinase as a local and systemic source of triiodothyronine in rats. *J. Clin. Invest.* **1985**, *76*, 2296–2305, doi:10.1172/JCI112239.
- Silva, J.E. Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. *Thyroid* **1995**, *5*, 481–492, doi:10.1089/thy.1995.5.481.
- Silva, J.E.; Rabelo, R. Regulation of the uncoupling protein gene expression. *Eur. J. Endocrinol.* **1997**, *136*, 251–264, doi:10.1530/eje.0.1360251.
- Sinha, R.A.; Singh, B.K.; Yen, P.M. Thyroid hormone regulation of hepatic lipid and carbohydrate metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* **2014**, *25*, 538–545, doi:10.1016/j.tem.2014.07.001.

- Smith, J.J.; Aitchison, J.D. Peroxisomes take shape. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2013**, *14*, 803–817, doi:10.1038/nrm3700.
- Soto-Heredero, G.; Baixauli, F.; Mittelbrunn, M. Interorganellar communication between mitochondria and the endolysosomal system. *Front. Cell Dev. Biol.* **2017**, *5*, 1–8, doi:10.3389/fcell.2017.00095.
- Soubannier, V.; Rippstein, P.; Kaufman, B.A.; Shoubridge, E.A.; McBride, H.M. Reconstitution of mitochondria derived vesicle formation demonstrates selective enrichment of oxidized cargo. *PLoS One* **2012**, *7*, 1–9, doi:10.1371/journal.pone.0052830.
- Souza, S.C.; Christoffolete, M.A.; Ribeiro, M.O.; Miyoshi, H.; Strissel, K.J.; Stancheva, Z.S.; Rogers, N.H.; D'Eon, T.M.; Perfield, J.W.; Imachi, H.; et al. Perilipin regulates the thermogenic actions of norepinephrine in brown adipose tissue. *J. Lipid Res.* **2007**, *48*, 1273–1279, doi:10.1194/jlr.M700047-JLR200.
- Sridevi, D.; Dambal, A.A.; Sidrah; Challa, A.S.; Padaki, S.K. A Study of serum magnesium, calcium and phosphorus in hypothyroidism. *Int. J. Clin. Biochem. Res.* **2016**, *3*, 236, doi:10.5958/2394-6377.2016.00045.9.
- Stradomska, T.J.; Syczewska, M.; Jamroz, E.; Pleskaczyńska, A.; Kruczek, P.; Ciara, E.; Tyłki-Szymanska, A. Serum very long-chain fatty acids (VLCFA) levels as predictive biomarkers of diseases severity and probability of survival in peroxisomal disorders. *PLoS One* **2020**, *15*, 1–11, doi:10.1371/journal.pone.0238796.
- Strom, J.; Xu, B.; Tian, X.; Chen, Q.M. Nrf2 protects mitochondrial decay by oxidative stress. *FASEB J.* **2016**, *30*, 66–80, doi:10.1096/fj.14-268904.
- Subramani, S. Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation, turnover, and movement. *Physiol. Rev.* **1998**, *78*, 171–188, doi:10.1016/s0092-8674(00)80185-3.
- Subramani, S. Hitchhiking fads en route to peroxisomes. *J. Cell Biol.* **2002**, *156*, 415–417, doi:10.1083/jcb.200112122.
- Sugiura, A.; McLelland, G.-L.; Fon, E. a; McBride, H.M. A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *EMBO J.* **2014**, *33*, 1–15, doi:10.15252/embj.201488104.
- Sugiura, A.; Mattie, S.; Prudent, J.; McBride, H.M. Newly born peroxisomes are a hybrid of mitochondrial and ER-derived pre-peroxisomes. *Nature*, **2017**, *542*, 251–254, doi:10.1038/nature21375.
- Suh, J.H.; Shenvi, S. V.; Dixon, B.M.; Liu, H.; Jaiswal, A.K.; Liu, R.M.; Hagen, T.M. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 3381–3386, doi:10.1073/pnas.0400282101.
- Suter, E.R. The fine structure of brown adipose tissue. I. Cold-induced changes in the rat. *J. Ultrastructure Res.* **1969a**, *26*, 216–241, doi:10.1016/S0022-5320(69)80003-1.
- Suter, E.R. The fine structure of brown adipose tissue. II. Perinatal development in the rat. *J. Ultrastruct. Res.* **1969b**, *26*, 246–258, doi:10.1016/s0022-5320(69)80003-1.
- Tamura, S.; Yasutake, S.; Matsumoto, N.; Fujiki, Y. Dynamic and functional assembly of the AAA peroxins, Pex1p and Pex6p, and their membrane receptor Pex26p. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 27693–27704, doi:10.1074/jbc.M605159200.

- Terlecky, S.R.; Walton, P. A. *The Biogenesis of Cellular Organelles*. The biogenesis and cell biology of peroxisomes in human health and disease. *Biol. Cell. Organelles* **2005**, 164–175, 978-0-387-26867-5, https://doi.org/10.1007/0-387-26867-7_9.
- Terlecky, S.R. Peroxisomes, oxidative stress, and inflammation. *World J. Biol. Chem.* **2012**, *3*, 93–97, doi:10.4331/wjbc.v3.i5.93.
- Theodoulou, F.L.; Bernhardt, K.; Linka, N.; Baker, A. Peroxisome membrane proteins: multiple trafficking routes and multiple functions? *Biochem. J.* **2013**, *451*, 345–352, doi:10.1042/BJ20130078.
- Thoms, S.; Erdmann, R. Dynamin-related proteins and Pex11 proteins in peroxisome division and proliferation. *FEBS J.* **2005**, *272*, 5169–5181, doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04939.x.
- Till, A.; Lakhani, R.; Burnett, S.F.; Subramani, S. Pexophagy: The selective degradation of peroxisomes. *Int. J. Cell Biol.* **2012**, *2012*, 1–18, doi:10.1155/2012/512721.
- Titorenko, V.I.; Rachubinski, R.A. Peroxisomal membrane fusion requires two AAA family ATPases, Pex1p and Pex6p. *J. Cell Biol.* **2000**, *150*, 881–886, doi:10.1083/jcb.150.4.881.
- Titorenko, V.I.; Smith, J.J.; Szilard, R.K.; Rachubinski, R.A. Peroxisome Biogenesis in the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Cell Biochem. Biophys.* **2000**, *32*, 21–26, doi:10.1385/CBB:32:1-3:21.
- Todkar, K.; Ilamathi, H.S.; Germain, M. Mitochondria and lysosomes: Discovering bonds. *Front. Cell Dev. Biol.* **2017**, *5*, 1–7, doi: 10.3389/fcell.2017.00106.
- Tonelli, C.; Chio, I.I.C.; Tuveson, D.A. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid. Redox Signal.* **2018**, *29*, 1727–1745, doi:10.1089/ars.2017.7342.
- Trbojević, B.; Đorđe, M.; Mirjana, S.; Slavica, S. Dijagnoza hipotiroidizma. *Med. Glas. Spec. Boln. za Boles. štitaste žlezde i Boles. Metab.* **2008**, *13*, 29–60.
- Tsushima, M.; Liu, J.; Hirao, W.; Yamazaki, H.; Tomita, H.; Itoh, K. Emerging evidence for crosstalk between Nrf2 and mitochondria in physiological homeostasis and in heart disease. *Arch. Pharm. Res.* **2019**, *43*, 286–296, doi:10.1007/s12272-019-01188-z.
- Vaitkus, J.A.; Farrar, J.S.; Celi, F.S. Thyroid hormone mediated modulation of energy expenditure. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 16158–16175, doi:10.3390/ijms160716158.
- Vamecq, J.; Cherkaoui-Malki, M.; Andreoletti, P.; Latruffe, N. The human peroxisome in health and disease: The story of an oddity becoming a vital organelle. *Biochimie* **2014**, *98*, 4–15, doi:10.1016/j.biochi.2013.09.019.
- van der Klei, I.J.; Veenhuis, M. PTS1-independent sorting of peroxisomal matrix proteins by Pex5p. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.* **2006**, *1763*, 1794–1800, doi:10.1016/j.bbamcr.2006.08.013.
- van der Klei, I.J.; Yurimoto, H.; Sakai, Y.; Veenhuis, M. The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.* **2006**, *1763*, 1453–1462, doi:10.1016/j.bbamcr.2006.07.016.
- van der Zand, A.; Gent, J.; Braakman, I.; Tabak, H.F. Biochemically distinct vesicles from the endoplasmic reticulum fuse to form peroxisomes. *Cell* **2012**, *149*, 397–409, doi:10.1016/j.cell.2012.01.054.

- Van Roermund, C.W.T.; Ijlst, L.; Wagemans, T.; Wanders, R.J.A.; Waterham, H.R. A role for the human peroxisomal half-transporter ABCD3 in the oxidation of dicarboxylic acids. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **2014**, *1841*, 563–568, doi:10.1016/j.bbalip.2013.12.001.
- Van Veldhoven, P.P.; Van Rompuy, P.; Vanhooren, C.T.; Mannaerts, G.P. Purification and further characterization of peroxisomal trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase from rat liver. *Biochem. J.* **1994**, *304*, 195–200, doi:10.1042/bj3040195.
- Van Veldhoven, P.P.; Mannaerts, G.P. Role and organization of peroxisomal β -oxidation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1999**, *466*, 261–272, doi:10.1007/0-306-46818-2_31.
- Veenhuis, M.; Salomons, F.A.; Van Der Klei, I.J. Peroxisome biogenesis and degradation in yeast: A structure/function analysis. *Microsc. Res. Tech.* **2000**, *51*, 584–600, doi:10.1002/1097-0029(20001215)51:6<584::AID-JEMT8>3.0.CO;2-W.
- Vella, K.R.; Hollenberg, A.N. The actions of thyroid hormone signaling in the nucleus. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2017**, *1–9*, doi:10.1016/j.mce.2017.03.001.
- Ventura-Clapier, R.; Garnier, A.; Veksler, V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: The central role of PGC-1 α . *Cardiovasc. Res.* **2008**, *79*, 208–217, doi:10.1093/cvr/cvn098.
- Vetrano, A.M.; Heck, D.E.; Mariano, T.M.; Mishin, V.; Laskin, D.L.; Laskin, J.D. Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 35372–35381, doi:10.1074/jbc.M503991200.
- Villarroya, F.; Giralt, M.; Iglesias, R. Retinoids and adipose tissues: Metabolism, cell differentiation and gene expression. *Int. J. Obes.* **1999**, *23*, 1–6, doi:10.1038/sj.ijo.0800799.
- Volkl, A.; Baumgart, E.; Fahimi, H.D. Localization of urate oxidase in the crystalline cores of rat liver peroxisomes by immunocytochemistry and immunoblotting. *J. Histochem. Cytochem.* **1988**, *36*, 329–336, doi:10.1177/36.4.3346536.
- Wagh, S.P.; Bhagat, S.P.; Bankar, N.; Jain, K. Relationship between hypothyroidism and body mass index in women: A cross-sectional study. *Int. J. Curr. Res. Rev.* **2020**, *12*, 48–51, doi:10.31782/IJCRR.2020.12129.
- Walker, C.L.; Pomatto, L.C.D.; Tripathi, D.N.; Davies, K.J.A. Redox regulation of homeostasis and proteostasis in peroxisomes. *Physiol. Rev.* **2018**, *98*, 89–115, doi:10.1152/physrev.00033.2016.
- Walton, P.A.; Hill, P.E.; Subramani, S. Import of stably folded proteins into peroxisomes. *Mol. Biol. Cell* **1995**, *6*, 675–683, doi:10.1091/mbc.6.6.675.
- Walton, P.A.; Brees, C.; Lismont, C.; Apanasets, O.; Fransen, M. The peroxisomal import receptor PEX5 functions as a stress sensor, retaining catalase in the cytosol in times of oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2017**, *1864*, 1833–1843, doi:10.1016/j.bbamcr.2017.07.013.
- Wanders, R.J.A.; Waterham, H.R. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 295–332, doi:10.1146/annurev.biochem.74.082803.133329.
- Wanders, R.J.A. Metabolic functions of peroxisomes in health and disease. *Biochimie* **2014**, *98*, 36–44, doi:10.1016/j.biochi.2013.08.022.

- Watkins, P.A.; Howard, A.E.; Gould, S.J.; Avigan, J.; Mihalik, S.J. Phytanic acid activation in rat liver peroxisomes is catalyzed by long-chain acyl-CoA synthetase. *J. Lipid Res.* **1996**, *37*, 2288–2295, doi:10.1016/s0022-2275(20)37477-0.
- Watkins, P.A. Fatty acid activation. *Prog. Lipid Res.* **1997**, *36*, 55–83, doi:10.1016/S0163-7827(97)00004-0.
- Weibel, E.R.; Stäubli, W.; Gnägi, H.R.; Hess, F.A. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. *J. Cell Biol.* **1969**, *42*, 92–112, doi:10.1083/jcb.42.1.92.
- Weiner, J.; Kranz, M.; Klötting, N.; Kunath, A.; Steinhoff, K.; Rijntjes, E.; Köhrle, J.; Zeisig, V.; Hankir, M.; Gebhardt, C.; et al. Thyroid hormone status defines brown adipose tissue activity and browning of white adipose tissues in mice. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1-10, doi:10.1038/srep38124.
- Weng, H.; Endo, K.; Li, J.; Kito, N.; Iwai, N. Induction of peroxisomes by butyrate-producing probiotics. *PLoS One* **2015**, *10*, 1-11, doi:10.1371/journal.pone.0117851.
- Wikström, L.; Johansson, C.; Saltó, C.; Barlow, C.; Barros, A.C.; Baas, F.; Forrest, D.; Thorén, P.; Vennström, B. Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor $\alpha 1$. *EMBO J.* **1998**, *17*, 455–461, doi:10.1093/emboj/17.2.455.
- Wilcke, M.; Hultenby, K.; Alexson, S.E.H. Novel peroxisomal populations in subcellular fractions from rat liver. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 6949–6958, doi:10.1074/jbc.270.12.6949.
- Williams, C.P.; Stanley, W.A. Peroxin 5: A cycling receptor for protein translocation into peroxisomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2010**, *42*, 1771–1774, doi:10.1016/j.biocel.2010.07.004.
- Williams, G.R.; Bassett, J.H.D. Local control of thyroid hormone action: Role of type 2 deiodinase. *J. Endocrinol.* **2011**, *209*, 261–272, doi:10.1530/JOE-10-0448.
- Wrutniak, C.; Cassar-Malek, I.; Marchal, S.; Rascle, A.; Heusser, S.; Keller, J.M.; Flechon, J.; Dauca, M.; Samarut, J.; Ghysdael, J.; et al. A 43-kDa protein related to c-Erb A $\alpha 1$ is located in the mitochondrial matrix of rat liver. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 16347–16354, doi:10.1074/jbc.270.27.16347.
- Yagita, Y.; Hiromasa, T.; Fujiki, Y. Tail-anchored PEX26 targets peroxisomes via a PEX19-dependent and TRC40-independent class I pathway. *J. Cell Biol.* **2013**, *200*, 651–666, doi:10.1083/jcb.201211077.
- Yamamoto, K.; Fahimi, H.D. Three-dimensional reconstruction of a peroxisomal reticulum in regenerating rat liver: Evidence of interconnections between heterogeneous segments. *J. Cell Biol.* **1987**, *105*, 713–722, doi:10.1083/jcb.105.2.713.
- Yamashita, S. ichi; Abe, K.; Tatemichi, Y.; Fujiki, Y. The membrane peroxin PEX3 induces peroxisome-ubiquitination-linked pexophagy. *Autophagy* **2014**, *10*, 1549–1564, doi:10.4161/auto.29329.
- Yao, X.; Hou, S.; Zhang, D.; Xia, H.; Wang, Y.C.; Jiang, J.; Yin, H.; Ying, H. Regulation of fatty acid composition and lipid storage by thyroid hormone in mouse liver. *Cell Biosci.* **2014**, *4*, 1–10, doi:10.1186/2045-3701-4-38.
- Yau, W.W.; Singh, B.K.; Lesmana, R.; Zhou, J.; Sinha, R.A.; Wong, K.A.; Wu, Y.; Bay, B.H.; Sugii, S.; Sun, L.; et al. Thyroid hormone (T3) stimulates brown adipose tissue activation via

- mitochondrial biogenesis and MTOR-mediated mitophagy. *Autophagy* **2019**, *15*, 131–150, doi:10.1080/15548627.2018.1511263.
- Yen, P.M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 1097–1142, doi:10.1152/physrev.2001.81.3.1097.
- Yilmaz, S.; Ozan, S.; Benzer, F.; Canatan, H. Oxidative damage and antioxidant enzyme activities in experimental hypothyroidism. *Cell Biochem. Funct.* **2003**, *21*, 325–330, doi:10.1002/cbf.1031.
- Zaninovich, A.A.; Raíces, M.; Rebagliati, I.; Ricci, C.; Hagmüller, K. Brown fat thermogenesis in cold-acclimated rats is not abolished by the suppression of thyroid function. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **2002**, *283*, 496–502, doi:10.1152/ajpendo.00540.2001.
- Zhang, X.; Hoffmann, B.; Tran, P.B.; Graupner, G.; Pfahl, M. Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Nature* **1992**, *355*, 441–446, doi:10.1038/355441a0.
- Zhang, Y.; Sano, M.; Shinmura, K.; Tamaki, K.; Katsumata, Y.; Matsushashi, T.; Morizane, S.; Ito, H.; Hishiki, T.; Endo, J.; et al. 4-Hydroxy-2-nonenal protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via the Nrf2-dependent pathway. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2010**, *49*, 576–586, doi:10.1016/j.yjmcc.2010.05.011.
- Zhang, H.; Forman, H.J. 4-Hydroxynonenal activates Src through a non-canonical pathway that involves EGFR/PTP1B. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, *89*, 701–707, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.025.
- Zhang, X.; Li, K.; Jones, R.A.; Bruner, S.D.; Butcher, R.A. Structural characterization of acyl-CoA oxidases reveals a direct link between pheromone biosynthesis and metabolic state in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113*, 10055–10060, doi:10.1073/pnas.1608262113.
- Zhou, Z.; Kang, Y.J. Cellular and subcellular localization of catalase in the heart of transgenic mice. *J. Histochem. Cytochem.* **2000**, *48*, 585–594, doi:10.1177/002215540004800502.

BIOGRAFIJA AUTORA

Marija Aleksić je rođena 24.11.1990. godine u Novom Pazaru. Srednju školu je završila u Raški, a osnovne studije je upisala 2009. godine na Državnom univerzitetu u Novom Pazaru, Departman za biomedicinske nauke, studijski program Biologija, koje je završila 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,91. Master studije je upisala 2013. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija i fiziologija, modul Biologija ćelija i tkiva, koje je završila 2014. godine sa prosečnom ocenom 10,00. Iste godine upisuje doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biologija, modul Biologija ćelija i tkiva.

Od 2015. godine zaposlena je na Katedri za biologiju ćelija i tkiva, prvo kao istraživač pripravnik na projektu 173055 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, a potom, od 2018. godine, kao istraživač saradnik na istom projektu. Na kursu Viši kurs biologije ćelija i tkiva, angažovana je za izvođenje laboratorijskih i praktičnih vežbi. Takođe, član je i aktivni učesnik u radu Centra za elektronsku mikroskopiju, pri Katedri za biologiju ćelija i tkiva.

Član je Srpskog društva za mikroskopiju, Evropskog društva za mikroskopiju, Srpskog društva za mitohondrijsku i slobodno-radikalnu fiziologiju, Evropskog društva za istraživanje slobodnih radikala, Srpskog biohemijskog društva, Federacije evropskih biohemijskih društava. Učesnik je brojnih radionica i kurseva u zemlji i inostranstvu. Samostalno ili kao koautor objavila je osam radova u istaknutim međunarodnim časopisima (M21), časopisima od međunarodnog značaja (M22) i međunarodnim časopisima (M23), kao i dvadeset saopštenja sa međunarodnih skupova.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Марија Алексић _____

број индекса _____ Б3004/2014 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Биогенеза пероксизома мрког масног ткива пацова у хипотироидизму

индукованом метимазолом

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 30.08.2011. године

Марија Алексић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Марија Алексић _____

Број индекса _____ Б3004/2014 _____

Студијски програм _____ Биологија, модул Биологија ћелија и ткива _____

Наслов рада _____ Биогенеза пероксизома мрког масног ткива пацова у хипотироидизму идукованом метимазолом _____

Ментори Др Александра Кораћ, редовни професор _____

_____ Универзитет у Београду–Биолошки факултет _____

_____ Др Александра Јанковић, научни саветник _____

_____ Универзитет у Београду–Институт за Биолошка истраживања
„Синиша Станковић”–Институт од националног значаја за Републику Србију _____

Потписани/а _____ Марија Н. Алексић _____

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 30.08.2011. године _____

_____ Марија Алексић _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Биогенеза пероксизома мрког масног ткива пацова у хипотироидизму

ИНДУКОВАНОМ МЕТИМАЗОЛОМ

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 30.08.2020. године

Марија Алексић

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

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

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

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

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

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