

Univerzitet u Beogradu

Medicinski fakultet

Kasja V. Pavlović

Uticaj metformina na energetski status i  
mitohondrijalnu funkciju mišićnih ćelija *in vitro*

doktorska disertacija

Beograd, 2024.

University of Belgrade

Faculty of Medicine

Kasja V. Pavlović

Effects of metformin on energy status and  
mitochondrial function of muscle cells *in vitro*

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024.

**Mentori:**

dr Nebojša M. Lalić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

dr Ivanka Marković, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

**Članovi komisije:**

dr Aleksandra Jotić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

dr Anđelka Isaković, docent  
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

dr Aleksandar Đukić, redovni profesor  
Univerzitet u Kragujevcu, Fakultet medicinskih nauka

Datum odbrane:

Zahvaljujem se koautorima rada, koji je proizašao iz ove doktorske disertacije:

1. doc. dr Anđelki Isaković, naučnom saradniku Nini Krako Jakovljević i prof. dr Ivanki Marković na osmišljavanju koncepta rada, kao i na pomoći pri osmišljavanju prikazivanja rezultata i pomoći pri pisanju teksta rada,
2. doc. dr Anđelki Isaković na pomoći u sprovođenju analiza protočnom citofluorimetrijom,
3. istraživaču pripravniku Tijani Ivanović na pomoći pri izvođenju eksperimenata,
4. prof. dr Nebojši M. Laliću, prof. dr Ivanki Marković, doc. dr Anđelki Isaković i naučnom saradniku Nini Krako Jakovljević na pregledanju i korigovanju rukopisa,
5. prof. dr Nebojši M. Laliću i prof. dr Ivanki Marković na superviziji i mentorstvu.

Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je u Laboratoriji za ćelijsku dijagnostiku i terapiju u dijabetesu, Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Univerzitetskog kliničkog centra Srbije, kao i na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Ova doktorska disertacija je urađena uz finansijsku podršku Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, u okviru plana i programa i ugovora o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada Medicinskog fakulteta (br. 451-03-68/2022-14/200110).

Zahvaljujem se:

svojim mentorima, profesoru Nebojši Laliću i profesorki Ivanki Marković, na ukazanom poverenju i pomoći u svim koracima izrade ove doktorske disertacije;

članovima komisije, profesorki Aleksandri Jotić, docentkinji Anđelki Isaković i profesoru Aleksandru Đukiću, koji su u završnim koracima izrade svojim sugestijama doprineli kvalitetu ove doktorske disertacije;

kolegama sa Instituta za histologiju i embriologiju, profesorki Tamari Kravić, docentu Darku Ćiriću i docentkinji Tamari Martinović, za pomoć pri izvođenju eksperimenata koji su uključivali metodu konfokalne mikroskopije;

naučnom savetniku Neveni Zogović sa Instituta za biološka istraživanja Siniša Stanković, za pomoć pri izvođenju eksperimenata koji su uključivali metodu luminometrije;

svim kolegama sa Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju, Klinike za endokrinologiju i Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, na pomoći, podršci i lepoj atmosferi na poslu tokom ovih godina zajedničkog rada;

tehničarima Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju, na prvom mestu Nadi Božović i Sanji Čabarkapi, bez čije pomoći, znanja i iskustva bi bilo daleko teže raditi;

mojim kolegicama iz laboratorije i asistentske sobe: Nini Krako Jakovljević, Tijani Ivanović, Anđelki Isaković, Mariji Jeremić, Maji Jovanović i Sanji Blagojević, za saradnju i veliku pomoć u laboratorijskom i naučnom radu, kao i za sve lepe trenutke na poslu, podršku i prijateljstvo;

porodici i prijateljima, na strpljenju, podršci i ljubavi.

## UTICAJ METFORMINA NA ENERGETSKI STATUS I MITOHONDRIJALNU FUNKCIJU MIŠIĆNIH ĆELIJA *IN VITRO*

Metformin je oralni antidiijabetik i lek prvog izbora u terapiji dijabetesa tipa 2. Iako se koristi duže od 60 godina, molekularni mehanizmi dejstva metformina nisu u potpunosti razjašnjeni. Istraživanja pokazuju da metformin dovodi do inhibicije kompleksa I respiratornog lanca i aktivacije AMP-om aktivirane protein kinaze (AMPK), međutim koncentracije metformina korišćene u ovim studijama su sporne, baš kao i njihova farmakološka relevantnost. Cilj ove studije bio je da ispita efekte različitih koncentracija metformina na energetske metabolizam i aktivnost najznačajnijih signalnih puteva, u mišićnim ćelijama *in vitro*.

Svi eksperimenti rađeni su na ćelijskoj liniji C2C12, a izvođeni su u uslovima visoke i niske koncentracije glukoze. Ćelije su tretirane metforminom terapijske (50  $\mu\text{M}$ ) ili suprafarmakološke (5 mM) koncentracije. Mitohondrijska funkcija merena je respirometrijom visoke rezolucije, a produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta i mitohondrijski membranski potencijal protočnom citofluorimetrijom. Aktivnost signalnih puteva AMPK i PI3K/Akt merena je kvantifikacijom fosforilisanih formi ispitivanih proteina imunoblotom.

Metformin suprafarmakološke koncentracije inhibirao je mitohondrijsku funkciju intaktnih i permeabilizovanih ćelija, delovanjem na kompleks I respiratornog lanca, dok terapijska koncentracija metformina nije uticala na respiraciju. Ni jedna od ispitivanih koncentracija metformina nije dovela do promene energetskog i redoks statusa ćelija. Suprafarmakološka, ali ne i terapijska koncentracija metformina, dovela je do depolarizacije unutrašnje membrane mitohondrija, povećanja produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta i aktivacije signalnih puteva AMPK i PI3K/Akt. Zaključujemo da terapijska koncentracija metformina u mišićnim ćelijama ne dovodi do efekata na energetske metabolizam koji su pokazani korišćenjem suprafarmakoloških koncentracija.

**Ključne reči:** metformin, mitohondrije, respiratorni lanac, AMPK, PI3K/Akt, glukoza

**Naučna oblast:** medicina

**Uža naučna oblast:** molekularna medicina

**UDK broj:**

## **EFFECTS OF METFORMIN ON ENERGY STATUS AND MITOCHONDRIAL FUNCTION OF MUSCLE CELLS *IN VITRO***

Metformin is an oral antidiabetic agent and first-line drug in type 2 diabetes treatment. Even though it has been used for over 60 years, the molecular mechanisms of metformin action are not completely understood. Metformin-induced inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I and activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) have been confirmed by studies, but metformin concentrations used in these studies and their pharmacological relevance are a common point of debate. The aim of this study was to explore the effects of different metformin concentrations on energy metabolism and activity of relevant signaling pathways in C2C12 muscle cells *in vitro*.

All experiments were performed on C2C12 cell line, and conducted in conditions of high and low glucose concentration. Cells were treated with therapeutic (50  $\mu$ M) or suprapharmacological (5 mM) metformin concentrations. Mitochondrial function was measured by high-resolution respirometry, ROS production and mitochondrial membrane potential by flow cytometry. AMPK and PI3K/Akt signalling pathway activity was studied by quantification of phosphorylated forms of proteins of interest.

Suprapharmacological metformin concentration caused an inhibition of mitochondrial function of intact and permeabilised cells by affecting complex I, while therapeutic metformin concentration had no such effect. None of the studied treatment concentrations affected energy or redox status of the cells. Suprapharmacological, but not therapeutic metformin concentration, lead to mitochondrial inner membrane depolarisation, increased ROS production and AMPK and PI3K/Akt signalling pathway activation. In conclusion, therapeutic metformin treatment does not affect energy metabolism in muscle cells in the manner which was shown using suprapharmacological metformin concentrations.

**Key words:** metformin, mitochondria, respiratory chain, AMPK, PI3K/Akt, glucose

**Scientific field:** medicine

**Scientific subfield:** molecular medicine

**UDC number:**

## Sadržaj:

1. UVOD .....	1
1.1. Dijabetes tip 2.....	2
1.1.1. Istorijat dijabetesa.....	2
1.1.2. Patofiziologija dijabetesa tipa 2.....	3
1.1.3. Promene u metabolizmu skeletnog mišića u tipu 2 dijabetesa .....	4
1.1.4. Farmakološka terapija u dijabetesu .....	7
1.2. Metabolizam glukoze u skeletnom mišiću .....	8
1.2.1. Oksidativna fosforilacija .....	10
1.3. Signalni putevi za regulaciju energetskeg metabolizma u skeletnom mišiću.....	14
1.3.1. Insulinski signalni put.....	14
1.3.2. Adenozin monofosfatom aktivirana protein kinaza - AMPK .....	16
1.4. Metformin .....	19
1.4.1. Istorijat upotrebe metformina .....	19
1.4.2. Antidijabetičko dejstvo metformina.....	20
1.4.3. Molekularni mehanizmi dejstva metformina .....	21
1.4.4. Izazovi u dizajnu studija koje ispituju molekularne mehanizme dejstva metformina.....	23
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	24
3. MATERIJAL I METODE.....	26
3.1. Čelijska linija.....	27
3.1.1. Gajenje čelijske kulture .....	27
3.1.2. Presejavanje, brojanje i postavljanje ćelija za eksperimente.....	27
3.1.3. Tretmani .....	28
3.2. Čelijski vijabilitet i proliferacija.....	29
3.2.1. Kristal violet esej.....	29
3.2.2. Test aktivnosti kisele fosfataze .....	29
3.2.3. MTT test.....	30
3.2.4. Test aktivnosti laktat dehidrogenaze.....	30
3.2.5. Određivanje indeksa proliferacije .....	30
3.3. Ispitivanje unosa glukoze u ćelije .....	31
3.4. Mitohondrijska respiracija .....	32
3.4.1. Optimizacija broja ćelija i koncentracije digitonina .....	32
3.4.2. Uticaj metformina na mitohondrijsku respiraciju permeabilizovanih ćelija.....	34
3.4.3. Uticaj dugotrajnog tretmana metforminom (5 dana) na mitohondrijsku respiraciju permeabilizovanih ćelija .....	34
3.4.4. Uticaj metformina na mitohondrijsku respiraciju intaktnih ćelija.....	35
3.4.5. Normalizacija respiracije na količinu mitohondrija .....	35



3.5.	Određivanje energetskeg statusa ćelija .....	36
3.6.	Određivanje redoks statusa ćelija.....	37
3.7.	Ispitivanje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta, mitohondrijskog membranskog potencijala i sadržaja mitohondrija protočnom citofluorimetrijom.....	38
3.8.	Ispitivanje morfologije i sadržaja mitohondrija konfokalnom mikroskopijom ....	38
3.9.	Ispitivanje aktivnost signalnih puteva.....	39
3.9.1.	Priprema uzoraka za imunoblot.....	39
3.9.2.	Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu i transfer proteina sa gela na membranu .....	40
3.9.3.	Vizualizacija proteina.....	41
3.10.	Statistička analiza podataka .....	41
4.	<b>REZULTATI</b> .....	42
4.1.	Visoke koncentracije metformina dovode do smanjenja ćelijskog vijabiliteta.....	43
4.2.	Suprafarmakološka koncentracija metformina dovodi do smanjene proliferacije ćelija .....	44
4.3.	Suprafarmakološka, ali ne i terapijska, koncentracija metformina dovodi do povećanog unosa glukoze u ćelije.....	45
4.4.	Uticaj metformina na respiratornu funkciju mitohondrija .....	46
4.4.1.	Suprafarmakološka, ali ne i terapijska, koncentracija metformina dovodi do inhibicije mitohondrijske respiracije permeabilizovanih ćelija.....	46
4.4.2.	Suprafarmakološka koncentracija metformina trenutno dovodi do inhibicije respiratorne funkcije kompleksa I.....	49
4.4.3.	Petodnevni tretman terapijskom koncentracijom metformina ne utiče na mitohondrijsku respiraciju ćelija.....	51
4.4.4.	Suprafarmakološka, ali ne i terapijska, koncentracija metformina dovodi do inhibicije mitohondrijske respiracije intaktnih ćelija.....	52
4.4.5.	Istovremeni tretman insulinom ne menja efekat metformina na respiratornu funkciju mitohondrija.....	53
4.5.	Metformin ne dovodi do promene energetskeg i redoks statusa ćelija.....	55
4.6.	Uticaj metformina na oksidativni stres i mitohondrijski membranski potencijal.....	56
4.6.1.	Suprafarmakološka koncentracija metformina i medijum sa visokom koncentracijom glukoze dovode do povećane produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta.....	56
4.6.2.	Suprafarmakološka, ali ne i terapijska, koncentracija metformina dovodi do povećane produkcije superoksidnog anjon radikala .....	57
4.6.3.	Suprafarmakološka, ali ne i terapijska, koncentracija metformina dovodi do depolarizacije unutrašnje membrane mitohondrija .....	59
4.6.4.	Istovremeni tretman insulinom ne menja efekte metformina na oksidativni stres i mitohondrijski membranski potencijal.....	60
4.7.	Uticaj metformina na mitohondrijski sadržaj i morfologiju.....	63

4.7.1.	Metformin ne utiče na sadržaj mitohondrija meren protočnom citofluorimetrijom .....	63
4.7.2.	Suprafarmakološka koncentracija metformina dovodi do smanjenja broja i povećanja površine mitohondrija, kod ćelija gajenih u medijum sa niskom koncentracijom glukoze .....	64
4.8.	Uticaj metformina na aktivnost signalnih puteva AMPK i PI3K/Akt .....	67
4.8.1.	Signalni putevi AMPK i PI3K/Akt aktivirani su suprafarmakološkom, ali ne i terapijskom koncentracijom metformina.....	67
4.8.2.	Istovremeni tretman insulinom menja efekte metformina na signalne puteve AMPK i PI3K/Akt.....	68
4.9.	Farmakološka inhibicija signalnih puteva PI3K/Akt i AMPK.....	71
5.	<b>DISKUSIJA</b> .....	73
5.1.	Uticaj visokih koncentracija metformina na ćelijski vijabilitet.....	74
5.2.	Mehanizmi antidijabetičkog delovanja metformina u mišićnim ćelijama .....	74
5.2.1.	Unos glukoze u ćelije .....	74
5.2.2.	Uticaj metformina na respiratornu funkciju mitohondrija.....	75
5.2.3.	Energetski i redoks status ćelija.....	77
5.2.4.	Uticaj primene metformina na produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta i mitohondrijski membranski potencijal .....	79
5.2.5.	Uticaj primene metformina na količinu mitohondrija u ćeliji .....	80
5.2.6.	Aktivnost signalnih puteva AMPK i PI3K/Akt.....	81
5.3.	Efekat dostupnosti glukoze na terapijske efekte metformina .....	82
5.4.	Interakcija signalnih puteva AMPK i PI3K/Akt i efekti metformina .....	83
5.4.1.	Efekti tretmana insulinom na dejstvo metformina.....	83
5.4.2.	Farmakološka inhibicija signalnih puteva .....	84
5.5.	Ograničenja studije .....	85
5.6.	Značaj i budući pravci istraživanja.....	85
6.	<b>ZAKLJUČCI</b> .....	87
7.	<b>LITERATURA</b> .....	89

# **1. UVOD**

## 1.1. Dijabetes tip 2

Dijabetes je jedna od hroničnih bolesti današnjice sa najvećom prevalencijom - 537 miliona odraslih na svetu pati od ove bolesti, od kojih je oko 90% pogođeno tipom 2 dijabetesa [1]. Incidencija dijabetesa tipa 2 je u stalnom porastu, što se pripisuje povećanoj učestalosti gojaznosti, sedentarnom načinu života i starenju populacija [2]. Osnovna odlika patologije dijabetesa je hiperglikemija - povišena koncentracija glukoze u krvi, koja se javlja kao posledica poremećaja u sekreciji i/ili delovanju insulina. Insulin je jedan od hormona koji regulišu homeostazu glukoze – u stanju obilja hranljivih materija nakon obroka, kada je koncentracija glukoze u krvi povišena, insulin stimuliše preuzimanje glukoze u tkiva, katabolizam glukoze i skladištenje energetskih rezervi, što vodi snižavanju glikemije. Metaboličke promene uzrokovane nedostatkom insulina i njegovim smanjenim delovanjem na nivou tkiva podrazumevaju smanjeno preuzimanje glukoze u periferna tkiva kao i povećano oslobađanje glukoze iz jetre, što vodi hiperglikemiji. Pored hiperglikemije i glukozurije (pojave glukoze u urinu), najupečatljiviji simptomi dijabetesa su polidipsija, polifagija, poliurija i gubitak telesne mase. Kriterijum za postavljanje dijagnoze dijabetesa je glikemija našte  $\geq 7$  mmol/L (126 mg/dL) ili glikemija u 120. minutu testa opterećenja glukozom (eng. *oral glucose tolerance test* - OGTT)  $\geq 11,1$  mmol/L (200 mg/dL) [3]. Prema preporukama Američke asocijacije za dijabetes (eng. *American Diabetes Association* - ADA) kao pouzdan kriterijum za dijagnozu uključen je i HbA1c  $\geq 6,5\%$  [4].

Terminom *diabetes mellitus* ili šećerna bolest označava se čitav skup bolesti različite etiologije, koje za posledicu imaju povišenu glikemiju. Prema etiološkoj klasifikaciji, dijabetes se deli na tip 1, tip 2, gestacijski dijabetes i druge specifične oblike dijabetesa [4]. Tip 1 dijabetesa je autoimunska oboljenja u kome dolazi do destrukcije  $\beta$ -ćelija endokrinog pankreasa u kojima se sintetiše insulin. Obično se javlja u dečjoj dobi i leči se insulinom, tako da se naziva i insulin-zavisni dijabetes. Dijabetes tip 2 obično se javlja u odraslom dobu, a u osnovi etiopatogeneze je insulinska rezistencija, uz naknadni gubitak funkcije  $\beta$ -ćelija. Dijabetes tip 2 često se javlja uporedo sa gojaznošću, poremećajem metabolizma masti (koji za posledicu ima hiperlipidemiju i masnu jetru) i hipertenzijom, te se ovaj skup patologija u stručnoj literaturi prepoznaje kao celina i označava kao metabolički sindrom (sindrom X, sindrom insulinske rezistencije) [5]. Gestacijski dijabetes se definiše kao stanje povišene glikemije koje se prvi put registruje u trudnoći. U druge specifične oblike dijabetesa svrstavaju se mnogobrojna, retka oboljenja sa genetičkom osnovom, dijabetes indukovani drugim oboljenjima ili lekovima itd [6].

### 1.1.1. Istorijat dijabetesa

Simptomi dijabetesa bili su prepoznati još u antičko doba, od strane lekara u Egiptu, Indiji i Grčkoj, koji opisuju stanje koje karakterišu polidipsija, poliurija i polifagija, kao i gubitak telesne mase i sladak ukus urina [7]. Naziv dijabetes potiče od Areteusa, koji je na osnovu najupečatljivijih simptoma, polidipsije i poliurije, bolest imenovao po grčkoj reči koja znači proticati (slikovit opis stanja u kome voda „protiče” kroz pacijenta). Nekoliko engleskih lekara u 17. i 18. veku fokusiralo se na ispitivanje slatkog ukusa urina, te su potvrdili prisustvo glukoze u urinu i krvi obolelih, i u naziv bolesti dodali reč *mellitus* (što na latinskom znači slatko) [8]. U 19. veku, Klod Bernar je otkrio prisustvo glikogena u jetri i rasvetlio ulogu ovog organa u regulaciji glikemije [8]. Minkovski i Mering 1889. godine dolaze do prvih otkrića o fiziološkoj ulozi endokrinog pankreasa, te zaključuju da odstranjivanje pankreasa kod pasa dovodi do hiperglikemije, prekomernog mokrenja, žeđi i gubitka telesne mase. Nakon ovoga,

Benting i Best pokazali su da primena vodenog ekstrakta pankreasa dovodi do nestanka simptoma kod pasa sa odstranjenim pankreasom [9], a zaslužni su i za izolaciju insulina, za šta je dodeljena Nobelova nagrada 1923. godine [10]. Ubrzo nakon toga insulin je počeo da se koristi u terapiji dijabetesa, što je dovelo do zapažanja da neki pacijenti na njega ne reaguju na očekivani način. U kombinaciji sa prethodno uočenim razlikama u fenotipu (podela pacijenata na mlade i vitke, kod kojih se javlja ketoacidoza, i starije i gojazne), ovo je dovelo do klasifikacije dijabetesa na tip 1 ili insulin-zavisni i tip 2 ili insulin-nezavisni *diabetes mellitus*.

### 1.1.2. Patofiziologija dijabetesa tipa 2

Kliničku sliku dijabetesa tipa 2 čine kombinacija insulinske rezistencije i narušene funkcije  $\beta$ -ćelija. Insulinska rezistencija se definiše kao smanjena osetljivost tkiva na dejstvo insulina [11]. Tkiva pogođena insulinskom rezistencijom su jetra, skeletni mišić i adipozno tkivo. Kao posledica insulinske rezistencije, kod obolelih od dijabetesa uočava se povećana bazalna proizvodnja glukoze u jetri (koja je rezultat intenziviranja glikogenolize i glukoneogeneze), kao i smanjeno preuzimanje glukoze u periferna tkiva, na prvom mestu skeletni mišić. Zlatni standard za utvrđivanje insulinske rezistencije *in vivo* je hiperinsulinemijski euglikemijski klamp [12], ali se u rutinskoj kliničkoj praksi koriste i druge metode koje su manje vremenski i tehnički zahtevne [13–15]. Praćenjem ispitanika sa intolerancijom na glukozu (eng. *impaired glucose tolerance* - IGT), pokazano je da se insulinska rezistencija javlja i do nekoliko decenija pre uspostavljanja potpune kliničke slike dijabetesa [16–18]. U prvim stadijumima patogeneze dijabetesa, usled insulinske rezistencije dolazi do kompenzatorne prekomerne sekrecije insulina, čime se omogućava održavanje normoglikemije. Postepeni gubitak funkcije  $\beta$ -ćelija dovodi do intolerancije na glukozu, koja se registruje putem povišene postprandijalne glikemije. Kasnije tokom progresije bolesti, smanjena sekrecija insulina zajedno sa povećanjem proizvodnje i oslobađanja glukoze iz jetre, dovode do potpune manifestacije dijabetesa sa povišenim glikemijama našte. U dijabetesu se uočava i povišena sekrecija glukagona, što dodatno stimuliše prekomernu proizvodnju glukoze u jetri [6].

Na ćelijskom nivou, insulinska rezistencija se registruje kao poremećaj aktivacije insulinskog signalnog puta. Neki od molekularnih mehanizama za koje je pokazano da dovode do smanjene aktivacije insulinskog signalnog puta su: pojačana internalizacija i razgradnja insulinskog receptora, pojačana razgradnja supstrata insulinskog receptora (eng. *insulin receptor substrate* - IRS) [19], defosforilacija tirozinskih ostataka insulinskog receptora i IRS [20], kao i inhibitorna fosforilacija serinskih i treoninskih ostataka insulinskog receptora i IRS [21]. Osetljivost na insulin regulisana je različitim faktorima prisutnim u cirkulaciji, kao što su hormoni, masne kiseline i adipokini. Hiperinsulinemija, koja je posledica insulinske rezistencije, dodatno inhibira signalni odgovor ćelija na insulin [22–27], negativnom regulacijom broja insulinskih receptora [28], kao i delovanjem na nishodne komponente insulinskog signalnog puta [29]. Povišeni nivoi lipida u krvi koji se zapažaju kod pacijenata sa dijabetesom, gojaznošću i metaboličkim sindromom takođe doprinose insulinskoj rezistenciji. Poremećena ravnoteža između dostupnosti i upotrebljivosti lipida dovodi do ektopičnog nagomilavanja masti (u vidu masne jetre i intramiocelularnih lipida), što korelira sa sniženom insulinskom senzitivnošću [30].

Dijabetes, posebno ukoliko nije adekvatno lečen, dovodi do pojave hroničnih komplikacija, koje su najznačajniji uzrok mortaliteta obolelih od dijabetesa. Komplikacije dijabetesa klasifikuju se u dve velike grupe: nevasikularne i vaskularne, koje se dalje dele na mikrovaskularne i makrovaskularne. Mikrovaskularne komplikacije, kao što su dijabetesna retinopatija, nefropatija i neuropatija, karakteristične su za dijabetes, dok za makrovaskularne

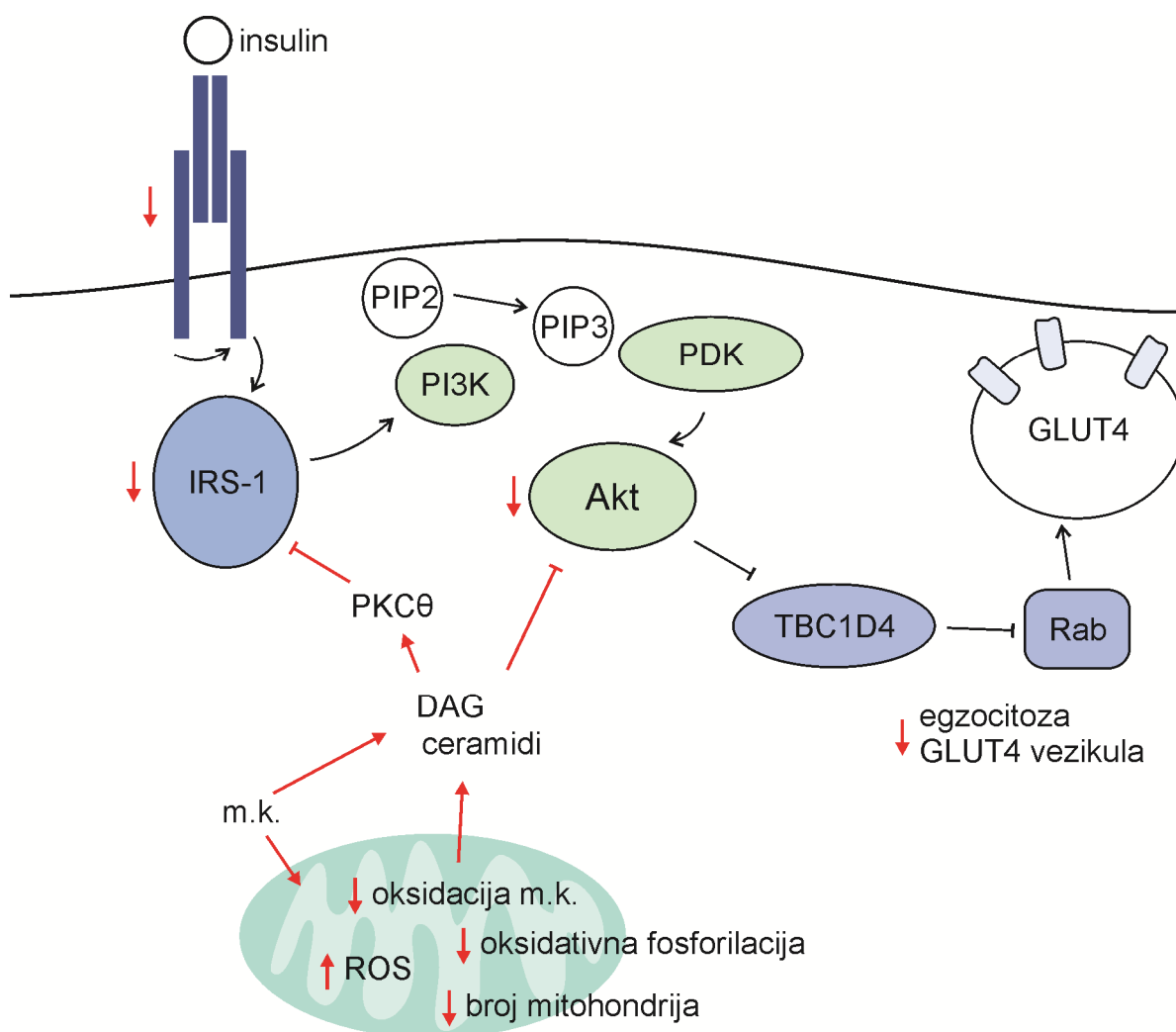
komplikacije dijabetes predstavlja faktor rizika, zajedno sa hiperlipidemijom, gojaznošću i drugim faktorima koji se često javljaju udruženo [6]. Cilj farmakološke terapije dijabetesa je, osim regulacije glikemije, i smanjenje rizika od komplikacija dijabetesa. Krajem 20. veka u Ujedinjenom Kraljevstvu je sprovedena do tog trenutka najveća prospektivna klinička studija (eng. *The United Kingdom Prospective Diabetes Study - UKPDS*), koja je trajala 20 godina (1977-1997. godine). Rezultati ove studije pokazali su da najveći značaj u prevenciji i usporavanju progresije mikrovaskularnih komplikacija kod obolelih od dijabetesa ima precizna regulacija glikemije, bez značajne razlike između primenjenih terapijskih pristupa (sulfonilureja, metformin, insulin) [31,32].

### 1.1.3. Promene u metabolizmu skeletnog mišića u tipu 2 dijabetesa

Skeletni mišići imaju ključnu ulogu u regulaciji glikemije na nivou organizma, zahvaljujući svojoj visokoj metaboličkoj aktivnosti i udelu u telesnoj masi. Skeletni mišići su odgovorni za oko 80% postprandijalnog preuzimanja glukoze, što ih čini glavnim tkivom odgovornim za hipoglikemijski efekat insulina [33]. Zajedno sa adipoznim tkivom, skeletni mišići spadaju u insulin-zavisna tkiva, što znači da je unos glukoze u ćelije regulisan insulinom. U prisustvu visoke koncentracije glukoze u krvi, a pod uticajem insulina, stimulisan je unos glukoze u mišićne ćelije, njeno iskorišćavanje za dobijanje energije kao i deponovanje u vidu glikogena. Kolorimetrijskim merenjem metabolizma glukoze *in vivo* utvrđeno je da se postprandijalno 75% glukoze u mišiću metaboliše neoksidativno, na prvom mestu sintezom glikogena, te da je inhibicija ovog procesa jedan od prvih poremećaja koji se javljaju u dijabetesu [34,35]. Insulin reguliše i metabolizam proteina u mišiću, stimulišući sintezu i inhibirajući razgradnju proteina, i na ovaj način deluje stimulatивно na očuvanje mišićne mase [36]. Za mišićno tkivo je karakteristično da fizička aktivnost ispoljava efekte slične insulinu - stimuliše ugrađivanje transportera za glukozu 4 (eng. *glucose transporter 4 - GLUT4*) u membranu i katabolizam glukoze. Fizička aktivnost takođe povećava senzitivnost tkiva na insulin, i preporučuje se osobama koje boluju od dijabetesa, kao važan segment terapijskog režima [37]. Dodatno, fizička aktivnost uzrokuje porast koncentracije AMP-a u mišićima, koji pak aktivira AMP-om aktiviranu kinazu (AMPK), a ona zatim kovalentno modifikuje enzime koji regulišu ulazak aktiviranih masnih kiselina u mitohondrije mišićnih ćelija i njihovo iskorišćavanje za dobijanje energije.

Smatra se da je insulinska rezistencija skeletnog mišića primarni poremećaj, koji i do više decenija prethodi pojavi hiperglikemije i dijagnozi dijabetesa tipa 2. Naime, prisustvo mišićne insulinske rezistencije je pokazano kod ispitanika sa visokim rizikom od oboljevanja od dijabetesa tipa 2, kao što su deca roditelja obolelih od dijabetesa, kod kojih nisu prisutni drugi faktori rizika koji bi mogli biti uzrok insulinske rezistencije (gojaznost, hiperlipidemija) [18,38]. U skeletnom mišiću pacijenata obolelih od dijabetesa uočene su brojne promene na ćelijskom nivou (shema 1), kao što su smanjena aktivnost insulinskog signalnog puta, poremećaj funkcije mitohondrija, nakupljanje intramiocelularnih lipidnih kapi i povećana produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta [39]. U skeletnom mišiću pogođenom insulinskom rezistencijom zapaža se smanjen kapacitet za oksidaciju masnih kiselina [40,41], kao i smanjena metabolička fleksibilnost - sposobnost mišićnog tkiva da, u uslovima nakon obroka, pređe sa oksidacije masnih kiselina, kao glavnog energetskeg supstrata u stanju gladovanja, na oksidaciju glukoze, usled aktivacije insulinskog signalnog puta [42-44]. Poremećaj regulacije metabolizma lipida u mitohondrijama dovodi do unutarćelijskog nakupljanja proizvoda katabolizma lipida, kao što su diacilglicerol (DAG) i ceramidi, što dovodi do inhibicije insulinskog signalnog puta aktivacijom klase nekanonskih protein kinaza C (kao što je PKC $\theta$ ) [45-47].

Merenjem aktivnosti oksidativnih i glikolitičkih enzima u skeletnom mišiću obolelih od dijabetesa, pokazano je da povećana dostupnost supstrata dovodi do toga da brzina glikolize prevazilazi kapacitet oksidativne fosforilacije za reoksidaciju redukovanih koenzima [48,49]. U kasnijim studijama je direktnim merenjem mitohondrijske funkcije, *in vivo* [50–55] ili *ex vivo* [56–58], uočena snižena mitohondrijska respiracija kod obolelih od dijabetesa. Postoji mogućnost da je ovo posledica smanjenja količine (broja), a ne funkcije mitohondrija, na šta ukazuje činjenica da, kada se mitohondrijska respiracija normalizuje u odnosu na pokazatelje količine mitohondrija (aktivnost citrat sintaze ili broj kopija mtDNK), razlika između grupa pacijenata i zdravih kontrola se gubi [59,60]. U skladu sa ovim, u dijabetesu je pokazana snižena ekspresija regulatornog proteina transkripcije PGC-1 $\alpha$  (koaktivator 1 $\alpha$  receptora  $\gamma$  aktiviranog peroksizomalnim proliferatorom, eng. *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1- $\alpha$* ), centralnog regulatora procesa fisije i fuzije mitohondrija [61,62].



### Shema 1. Promene u molekularnim događajima u mišićnim ćelijama obolelih od dijabetesa tipa 2.

U skeletnom mišiću pacijenata obolelih od dijabetesa uočene su brojne promene u ćelijskom metabolizmu. Smanjena aktivnost insulinskog signalnog puta dovodi do smanjenog ulaska glukoze u mišćne ćelije kao i njenog iskorišćavanja. Smanjen broj i oksidativni kapacitet mitohondrija dovode do povećane produkcije ROS kao i nakupljanja masnih kiselina i proizvoda katabolizma lipida, što dodatno inhibira signalnu kaskadu stimulisanu insulinom. IRS-1 – supstrat insulinskog receptora 1, PI3K - kinaza fosfatidilinozitola 3, PIP<sub>2</sub> - fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat, PIP<sub>3</sub> - fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat, PDK - kinaza zavisna od 3-fosfoinozitida, m.k. – masne kiseline, ROS – reaktivne kiseonične vrste, DAG – diacilglicerol, PKC – protein kinaza C, TBC1D4 - supstrat kinaze Akt molekulske mase 160 kDa, GLUT4 - transporter za glukožu 4.



#### 1.1.4. Farmakološka terapija u dijabetesu

Prvi lek koji je korišćen u terapiji dijabetesa je insulin - iste godine kada je prvi put izolovan (1923.) insulin postaje komercijalno dostupan i počinje da se upotrebljava za lečenje dijabetesa tipa 1 [63]. Ubrzo zatim, ispitivanjem derivata gvanidina, a malo kasnije i sulfonamida, ustanovljeno je da ove supstance izazivaju hipoglikemijski efekat, te se javlja interesovanje za ispitivanje njihove potencijalne primene u lečenju dijabetesa. Hemijskim modifikacijama ovih jedinjenja dobijaju se prvi oralni antidijabetici - 1928. na evropskom tržištu se pojavljuje dekametil-digvanid, pod komercijalnim nazivom Sintalin [64]. Kao i mnogi kasnije otkriveni oralni antidijabetici, ovaj lek ubrzo je povučen iz prodaje zbog neželjenih efekata.

Sredinom 50-tih godina 20. veka prvi antidijabetici iz grupe sulfonilureja, karbutamid i tolbutamid, počinju da se prodaju u SAD [8]. Mehanizam delovanja ovih antidijabetika je stimulacija egzocitoze insulinskih granula iz  $\beta$ -ćelija, nezavisno od glukoze [65]. Derivati sulfonilureje efikasno snižavaju glikemiju, ali neželjeni efekti, kao što su povećanje telesne mase i hipoglikemija, doveli su do smanjenja upotrebe ovih lekova nakon uvođenja drugih klasa antidijabetika. Još jedan nedostatak lekova iz ove grupe je pojava tahifilaksije, slabljenja terapijskih efekata pri dugotrajnoj primeni, za šta je potencijalno odgovoran postepeni gubitak funkcije  $\beta$ -ćelija [66]. Feniletibigvanid ili fenformin uveden je kao lek za dijabetes u Americi 1959. godine, ali je povučen iz upotrebe nakon samo nekoliko godina zbog visoke incidencije laktičke acidoze. Sledeći terapeutik iz grupe bigvanida, metformin, u Evropi počinje da se koristi 1960. godine, a u SAD tek 1994 [67]. Metformin je zbog svoje efikasnosti, malog broja neželjenih efekata kao i pristupačne cene i dalje najčešće korišćeni antidijabetik u celom svetu. O osobinama i mehanizmu dejstva metformina biće reči u narednim poglavljima.

Sledeća grupa antidijabetika koja se na tržištu pojavila sredinom devedesetih godina 20. veka su tiazolidindionski derivati ili glitazoni (troglitazon, rosiglitazon, pioglitazon). Ova klasa lekova deluje na receptor  $\gamma$  aktiviran peroksizomalnim proliferatorom (eng. *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$*  - PPAR- $\gamma$ ) [68], koji putem regulacije transkripcije utiče na metabolizam lipida i ugljenih hidrata i posredno povećava senzitivnost tkiva na insulin [69]. Sledi otkriće lekova koji deluju na inkretinski sistem - agonisti receptora za glukogonu sličan peptid 1 (eng. *glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists*), kao što je egzenatid, i inhibitori enzima koji razgrađuje GLP-1, dipeptidil peptidaze 4 (DPP-4), koji deluju povećavajući glukozom indukovanu sekreciju insulina i suprimirajući sintezu glukagona [70]. GLP-1 agonisti se u savremenim vodičima za lečenje preporučuju zbog svog efekta na smanjenje telesne mase i kardioprotektivnog dejstva [71]. Inhibitori natrijum-glukoznog kotransportera 2 (eng. *sodium-glucose cotransporter 2* - SGLT-2) ili gliflozini su oralni antidijabetici koji ulaze u upotrebu 2010. godine, a koji inhibicijom funkcije transportera za glukozu u bubrežnim tubulama povećavaju bubrežnu ekskreciju glukoze, što dovodi do snižavanja glikemije [8].

Savremeni standardi nege predviđaju individualni pristup lečenju dijabetesa tipa 2, što podrazumeva uzimanje u obzir različitih faktora pri određivanju terapije, kao što su komorbiditeti, neželjeni efekti, rizik od hipoglikemije, uticaj na telesnu masu, finansijska situacija i uticaj na kvalitet života pojedinačnih pacijenata [71]. Za većinu pacijenata, ipak, inicijalna terapija podrazumeva korišćenje metformina kao leka prvog izbora, u kombinaciji sa promenom životnog stila. Terapiju treba započeti neposredno po postavljanju dijagnoze. Kod većine pacijenata, usled progresivne prirode bolesti, nije moguće održati zadovoljavajuću regulaciju glikemije korišćenjem monoterapije metforminom duže od nekoliko godina, nakon čega se uvode i drugi lekovi. U slučaju pacijenata kod kojih je uočen povišen rizik ili već postojeće kardiovaskularne i bubrežne komplikacije, preporučena je terapija SGLT-2

inhibitorima i/ili agonistima GLP-1 receptora, za koje je potvrđeno da imaju povoljan uticaj na kardiovaskularni sistem. Kod pacijenata bez ovih komplikacija, ne postoje jasni dokazi o prednosti određene grupe antidijabetika pri uvođenju kombinovane terapije, te se doktoru prepušta da, u skladu sa ciljevima i preferencijama određenog pacijenta, donese izbor. U jednom trenutku, kod većine pacijenata obolelih od dijabetesa tipa 2 neophodno je uvođenje insulinske terapije, samostalno ili u kombinaciji sa drugim agensima, radi postizanja terapijskih ciljeva [71].

## 1.2. Metabolizam glukoze u skeletnom mišiću

Pojam metabolizam obuhvata sve hemijske reakcije u živom sistemu katalizovane enzimima, koje dovode do transformacije strukture ili energetske sadržaja molekula [72]. Heterotrofni organizmi dolaze do energije oksidacijom nutrijenata, a energija ovih egzergonih reakcija pretvara se u hemijsku energiju visokoenergetskih veza. Među ovim jedinjenjima, najveći značaj u biološkim i biohemijskim procesima ima adenzin trifosfat (ATP), koji se smatra za univerzalnu energetske valutu ćelije. Hidroliza fosfatne veze ATP-a (čime se dobijaju ADP i neorganski fosfat) obezbeđuje energiju za odvijanje endergonih reakcija, polimerizaciju gradivnih jedinica u biomakromolekule, transport molekula kroz biološke membrane itd. Koncentracije adeninskih nukleotida u ćeliji od velikog su značaja za odvijanje reakcija fosforilacije u kojima ovi molekuli učestvuju. Žive ćelije održavaju ukupnu koncentraciju adeninskih nukleotida konstantnom, tako da se promena energetske statusa uočava kao promena međusobnih odnosa koncentracija ovih nukleotida [72].

Glukoza je univerzalni izvor energije i atoma ugljenika za sve ćelije višecelijskih organizama. Homeostaza glukoze na nivou organizma ključna je za njegovo optimalno funkcionisanje, te se koncentracija glukoze u krvi održava u uskom opsegu (3,9-5,6 mmol/L kod čoveka) dejstvom hormona metaboličke homeostaze, insulina i glukagona, ali i drugih hormona koji mogu uticati na glikemiju (npr. kortizol, adrenalin i dr.) [73]. Unos glukoze u ćelije skeletnog mišića vrši se preko transportera GLUT4, čiji je broj na ćelijskoj membrani regulisan insulinom. Aktivacija insulinskog signalnog puta indukuje eksternalizaciju preformiranih vezikula sa GLUT4 iz unutarćelijskih vezikularnih odeljaka i njihovo ugrađivanje u ćelijsku membranu, čime je omogućen povećan unos glukoze u ćelije nakon obroka. Nakon unosa u ćeliju, glukoza se dejstvom heksokinaze fosforiliše do glukozo-6-fosfata. Fosforilacija sprečava izlazak glukoze iz ćelije i takođe smanjuje koncentraciju slobodne glukoze, što omogućava dalji ulazak glukoze u ćeliju. Glukozo-6-fosfat se dalje, u zavisnosti od energetske statusa i potreba ćelije, usmerava u jedan od 3 puta - glikolizu, put pentozofosfata ili sintezu glikogena. Insulin i adenzin monofosfatom aktivirana protein kinaza (eng. *adenosine monophosphate activated protein kinase* - AMPK) pozitivno regulišu transkripciju mišićne izoforme heksokinaze [74,75].

Energetski metabolizam mišića tokom kontrakcije zasniva se na korišćenju rezervi kreatin fosfata i glikogena za sintezu ATP-a. Nakon što se ove rezerve istroše, prelazi se na upotrebu supstrata iz cirkulacije, kao što su glukoza, masne kiseline i aminokiseline. Kreatin fosfat je visokoenergetski fosfat specifičan za skeletne mišiće, srčani mišić i mozak. Fosforilacija kreatina uz utrošak ATP-a katalizovana je kreatin fosfokinazom, a zahvaljujući reverzibilnoj prirodi ove reakcije, pri snižavanju nivoa ATP-a on se može regenerisati od ADP-a prebacivanjem fosfatne grupe sa kreatin fosfata. Drugi izvor energije za mišićnu kontrakciju je glikogen, rezervni polisaharid životinja koji se nalazi u svim ćelijama, ali u najvećoj količini u mišićima i jetri. Sinteza glikogena započinje prevođenjem glukozo-6-fosfata u glukozo-1-fosfat dejstvom fosfoglukomutaze, nakon čega se uz utrošak UTP-a (uridin trifosfata) generiše aktivirani oblik glukoze - UDP-glukoza. Dodavanje glukoznog ostatka na glikogenski lanac,

formiranjem  $\alpha$ -1,4 glikozidnih veza, katalizuje glikogen sintaza, a formiranje grana ( $\alpha$ -1,6 veza) enzim grananja. Glikogen fosforilaza katalizuje raskidanje  $\alpha$ -1,4 glikozidne veze, pri čemu se oslobađa glukozo-1-fosfat, koji se izomerizuje u glukozo-6-fosfat. Mišići, za razliku od jetre, ne eksprimiraju glukozo-6-fosfatazu, te se glukozo-6-fosfat nastao glikogenolizom ne može defosforilisati, preći u cirkulaciju i učestvovati u regulaciji glikemije, već se koristi kao energetski supstrat pri mišićnom radu (kontrakciji). Glikogen sintaza i glikogen fosforilaza su ključni enzimi za regulaciju procesa sinteze i razgradnje glikogena. Alosterni regulatori ovih enzima su glukozoza, glukozo-6-fosfat i AMP, koji ukazuju na energetski status i dostupnost supstrata. Pored ovoga, značajna je i regulacija ovih enzima kovalentnom modifikacijom, što je posredovano kinazama i fosfatazama uključenim u signalne puteve insulina i AMPK [72,76].

Katabolizam glukoze započinje procesom glikolize, koji čini niz reakcija kojima se glukozoza razgrađuje do piruvata, uz dobijanje 2 molekula ATP-a i 2 molekula NADH. U pripremnoj fazi glikolize, glukozoza se konvertuje do gliceraldehid-3-fosfata, pri čemu se troši ATP. U narednoj fazi, gliceraldehid-3-fosfat se oksiduje do piruvata, pri čemu se procesom fosforilacije na nivou supstrata dobija ATP, a koenzim NAD (nikotinamid adenin dinukleotid) se redukuje. Regulacija glikolize odvija se preko enzima heksokinaze, fosfofruktokinaze 1 i piruvat kinaze. Ključnu ulogu u regulaciji glikolize kod sisara ima fosfofruktokinaza 1, koja je alosterno regulisana nivoima adeninskih nukleotida (ATP je inhibira, a AMP aktivira), što ukazuje na važnost energetskog statusa ćelije za odvijanje glikolize. Fosfofruktokinaza 1 je alosterno aktivirana i fruktozo-2,6-bisfosfatom, koji nastaje dejstvom fosfofruktokinaze 2. Ovaj enzim je negativno regulisan glukagonom (fosforilacija protein kinazom A), te tako glukagon u uslovima hipoglikemije dovodi do smanjenja intenziteta glikolize u jetri, ali ne i u mišiću, uzimajući u obzir odsustvo receptora za glukagon na mišićnim ćelijama. Citrat je još jedan inhibitor fosfofruktokinaze 1. U uslovima „energetske sitosti“ kada su količine NADH u mitohondrijama velike, blokiraju se ključne dehidrogenazne reakcije Krebsovog ciklusa, citrat koji nastaje u početnoj reakciji ovog ciklusa napušta mitohondrije i u citosolu alosterno inhibira fosfofruktokinazu 1. Za regulaciju piruvat kinaze karakteristično je postojanje tkivno specifičnih izoenzima - M tip piruvat kinaze koji je eksprimiran u mišićima ne podleže inhibiciji fosforilacijom (za razliku od L tipa u jetri), zbog važnosti glukoze kao izvora energije za mišićnu kontrakciju. Insulin aktivira ekspresiju enzima glikolize, čime pozitivno reguliše odvijanje ovog kataboličkog procesa [72,76].

Ukoliko se aerobni metabolizam ne može odvijati optimalno (u uslovima hipoksije, prisustva inhibitora oksidativne fosforilacije itd.), a potrebe za ATP-om su velike, piruvat se procesom homolaktične (mlečnokiselinske) fermentacije redukuje do laktata. Ova reakcija katalizovana je enzimom laktat dehidrogenazom, a značajna je zato što reoksidacijom NADH omogućava odvijanje glikolize. Merenjem koncentracije laktata ili pH može se meriti brzina anaerobne glikolize. Skeletni mišić u kontrakciji, u trenucima nedovoljno efikasnog dopremanja krvi može doći u stanje hipoksije, te dolazi do povećane sinteze laktata. Laktat iz mišića se krvotokom doprema do jetre gde služi kao prekursor za sintezu glukoze - glukoneogenezu. U uslovima aerobnog metabolizma, piruvat se dalje transportuje u matriks mitohondrija gde se odvija proces oksidativne dekarboksilacije piruvata. Dejstvom piruvat dehidrogenaznog kompleksa, piruvat se oksiduje do acetil-CoA i CO<sub>2</sub>, pri čemu se dobija jedan NADH [72,76].

Potpuna oksidacija glukoze dovršava se u Krebsovom ciklusu (ciklusu trikarboksilnih kiselina ili ciklusu limunske kiseline), gde se acetil-CoA u nizu reakcija oksiduje do CO<sub>2</sub>. Acetil-CoA osim od glukoze može nastati i oksidacijom masnih kiselina, ketonskih tela i nekih aminokiselina. Prva reakcija ciklusa je kondenzacija acetil-CoA sa oksaloacetatom, u kojoj se dobija citrat (dejstvom enzima citrat sintaze). Ciklus čini osam reakcija, od kojih se u 3 odvija redukcija NAD, a u jednoj redukcija FAD (flavin adenin dinukleotid). Reakcija u kojoj dolazi do redukcije FAD katalizovana je sukcinat dehidrogenazom, koja je ujedno i kompleks II

respiratornog lanca i jedini membranski enzim Krebsovog ciklusa. U ovom ciklusu dolazi do oslobađanja 2 molekula CO<sub>2</sub> i koenzima A, a fosforilacijom na nivou supstrata sintetise se molekul GTP-a. Regulacija ciklusa odvija se regulacijom enzima koji katalizuju nepovratne reakcije: citrat sintaze, izocitrat dehidrogenaze i α-ketoglutarat dehidrogenaze, koji su regulisani NAD/NADH odnosom. Krebsov ciklus omogućava oksidaciju acetilne jedinice i predstavlja izvor prekursora za mnoge biosintetske reakcije [72,76].

### 1.2.1. Oksidativna fosforilacija

Glukoza se u živim sistemima kompletno oksiduje do ugljen dioksida u procesima glikolize, oksidativne dekarboksilacije piruvata i Krebsovom ciklusu. Povezivanje ovih egzergonih procesa sa sintezom ATP-a odigrava se na respiratornom lancu mitohondrija, što je prvi predstavio Piter Mičel 1961. godine u vidu hemiosmotske teorije. U oksido-redukcionim reakcijama kataboličkih puteva dolazi do prikupljanja redukcionih ekvivalenata (elektrona, atoma vodonika ili hidridnih jona) od strane koenzima angažovanih dehidrogenaza - nikotinamid adenin dinukleotida (NAD) i flavin adenin dinukleotida (FAD). Redukovane forme ovih koenzima (NADH i FADH<sub>2</sub>) predaju redukzione ekvivalente na elektron-transportni lanac, i na taj nači se reoksiduju, što je neophodno za nastavak oksidacionih reakcija. Elektron-transportni lanac vrši prenos redukcionih ekvivalenata u većem broju koraka od početnog donora do krajnjeg akceptora (O<sub>2</sub>), čime se obezbeđuje postepeno oslobađanje energije koja se konvertuje u elektrohemijski gradijent pumpanjem protona preko unutrašnje mitohondrijske membrane, nasuprot gradijentu koncentracije, u međumembranski prostor. Protoni iz međumembranskog prostora mogu se vratiti u matriks prolaskom kroz proteinski kanal ATP sintaze (kompleks V respiratornog lanca), koja energiju ovog gradijenta koristi za sintezu molekula ATP-a, od ADP-a i neorganskog fosfata [72].

Mitohondrije su ćelijske organele sa centralnom ulogom u energetsom metabolizmu. Ograničene su dvema membranama, između kojih se nalazi međumembranski prostor, a unutrašnja sredina mitohondrija naziva se mitohondrijski matriks. Spoljašnja mitohondrijska membrana permeabilna je za jone i male molekule, zahvaljujući mnogim porinskim kanalima, dok je unutrašnja mitohondrijska membrana nepermeabilna, bogata proteinima i formira invaginacije koje se nazivaju kriste. Mitohondrije su mesto odvijanja mnogih kataboličkih reakcija - Krebsov ciklus, β-oksidacija masnih kiselina, oksidacija ketonskih tela kao i mnogih aminokiselina odvijaju se u matriksu mitohondrija, dok se oksidativna fosforilacija odvija na proteinima unutrašnje membrane mitohondrija.

S obzirom na to da je unutrašnja mitohondrijska membrana nepermeabilna za hidrofilne supstance, redukциони ekvivalenti (NADH) nastali u metaboličkim procesima u citosolu (glikolizi) moraju se transportovati u mitohondrijski matriks putem sistema povratnog transporta (eng. *shuttle*). Sistemi povratnog transporta obezbeđuju da se citosolni NADH oksiduje, pri čemu se redukuje supstrat za koga postoji transporter na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani. Kada redukovani supstrat dospe u matriks mitohondrija dešava se druga oksido-redukcija tj. supstrat se reoksiduje, a redukциони ekvivalenti se prebacuju na NAD ili FAD. Glicerofosfatni sistem povratnog transporta sačinjen je od dva enzima koji katalizuju istu reakciju, citosolne i mitohondrijske forme glicerol-3-fosfat dehidrogenaze (3-fosfoglicerol dehidrogenaze). Citosolna forma ovog enzima vrši reoksidaciju NADH. Mitohondrijska forma glicerol-3-fosfat dehidrogenaze kao koenzim ima FAD. FADH<sub>2</sub> se reoksiduje i elektrone predaje elektron-transportnom lancu (koenzimu Q), što daje 1,5 molekula ATP-a (nasuprot reoksidaciji NADH koja daje 2,5 ATP-a). Kod sisara je zastupljeniji malat-aspartatni sistem povratnog transporta, koji se sastoji iz citosolne i mitohondrijske forme enzima malat dehidrogenaze. Obe izoforme enzima imaju NAD kao koenzim, što ovaj

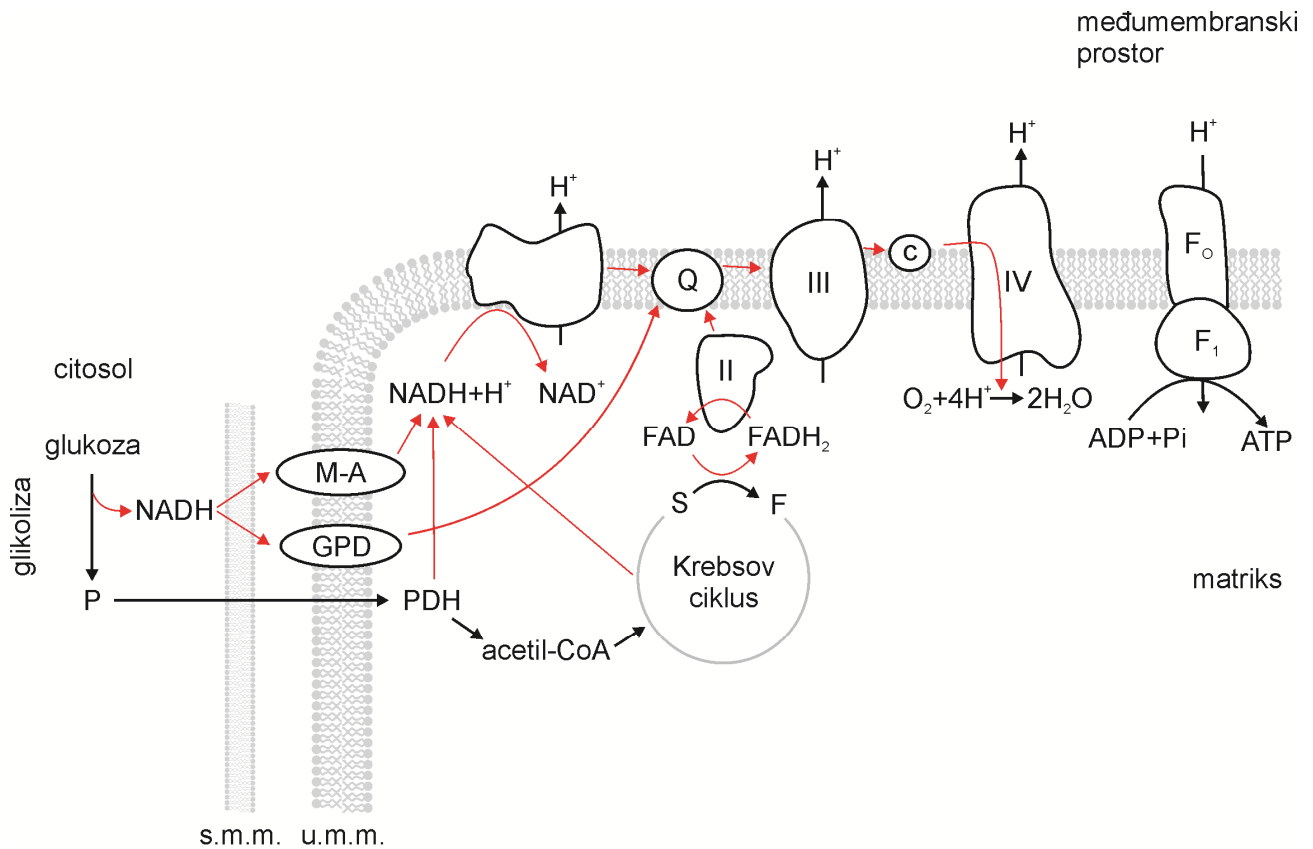
transportni sistem čini energetski efikasnijim. Transport reakcionih intermedijera omogućen je postojanjem dva antiport sistema: malat -  $\alpha$ -ketoglutarat i glutamat - aspartat. Ostali katabolički putevi (Krebsov ciklus, oksidativna dekarboksilacija piruvata,  $\beta$ -oksidacija masnih kiselina, oksidacija ketonskih tela) odvijaju se u matriksu mitohondrija, te se redukcionim ekvivalenti nastali u ovim reakcijama slobodno reoksiduju na respiratornom lancu [72].

Kompleks I respiratornog lanca, NADH dehidrogenaza ili NADH-CoQ-reduktaza, je veliki proteinski kompleks sastavljen iz 42 subjedinice, od kojih su neke kodirane u mitohondrijskom, a neke u jedarnom genomu. Zahvaljujući koenzimima - flavinmononukleotidu (FMN) i gvožđe-sumpornim proteinima, kompleks I preuzima elektrone od NADH i prenosi ih do koenzima Q, čime generiše energiju za prenos protona preko unutrašnje mitohondrijske membrane. Kompleks II ili sukcinat-CoQ-reduktaza, enzim je Krebsovog ciklusa (sukcinat dehidrogenaza), koji elektrone prenosi sa sukcinata na koenzim Q. Za razliku od drugih kompleksa respiratornog lanca, kompleks II nije transmembranski protein, već je slabo vezan za matriksnu stranu unutrašnje mitohondrijske membrane, tako da prenos elektrona preko kompleksa II ne dovodi do pumpanja protona kroz unutrašnju mitohondrijsku membranu. Kao koenzime sadrži FAD, 3 gvožđe-sumporna proteina i citohrom b<sub>560</sub>. Koenzim Q ili ubihinon je liposolubilna komponenta unutrašnje mitohondrijske membrane koji služi kao prenosilac elektrona sa kompleksa I i II, kao i sa drugih donora (preuzima elektrone sa svih dehidrogenaza koje sadrže FAD), do kompleksa III. Zahvaljujući svojoj liposolublnosti, lateralno je mobilan u lipidnom dvosloju membrane, što mu omogućava da funkcioniše kao prenosilac elektrona. Kompleks III ili citohrom c reduktaza (CoQ-cyt c-reduktaza) prenosi elektrone sa koenzima Q na citohrom c, pri čemu dolazi do transporta protona iz matriksa u međumembranski prostor. Sadrži dva različita citohroma b (562 i 566), citohrom c<sub>1</sub> i jedan gvožđe-sumporni protein. Citohrom c je periferni, slabo vezani membranski protein, koji se prolazno vezuje za komplekse III i IV i vrši prenos elektrona između njih. Kao redoks centar citohroma c funkcioniše hem - atom gvožđa u porfirinskom prstenu, koji može prenositi samo 1 e<sup>-</sup>. Kompleks IV ili citohrom c oksidaza, vrši prenos elektrona sa citohroma c na molekul kiseonika, redukujući ga do vode. Kao koenzime sadrži citohrome a i a<sub>3</sub>, kao i jone bakra. Potrebno je da se sa citohroma c prenesu 4 elektrona, jedan po jedan, da bi se jedan molekul kiseonika redukovao do dva molekula vode, pri čemu dolazi do pumpanja protona u međumembranski prostor. Tom prilikom vezuju se i 4 H<sup>+</sup> iz matriksa, čime kompleks IV dodatno doprinosi elektrohemijском gradijentu protona. Zahvaljujući visokom afinitetu za elektrone, kiseonik vrši funkciju krajnjeg akceptora elektrona u respiratornom lancu. Nepotpuna redukcija kiseonika dovodi do formiranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (superoksid anjon radikal, vodonik peroksid), koji zbog svoje visoke reaktivnosti dovode do oštećenja ćelijskih struktura [72]. Tok elektrona i pumpanje protona od strane pojedinih kompleksa respiratornog lanca u toku potpunog katabolizma ugljeničnog skeleta glukoze kroz glikolizu, oksidativnu dekarboksilaciju piruvata i Krebsov ciklus prikazani su na shemi 2.

Uspostavljanje elektrohemijškog gradijenta protona dešava se tako što pri prolasku elektrona, kompleksi I, III i IV elektron-transportnog lanca oslobođenu energiju koriste za prenos protona iz matriksa u međumembranski prostor. Pored gradijenta koncentracije, uspostavljaju se i pH i električni gradijent preko unutrašnje membrane mitohondrija. Kretanje protona niz gradijent koncentracije, kroz ATP sintazu, egzergoni je proces pri kome se oslobađa energija koja se koristi za sintezu ATP-a. Protoni se niz gradijent koncentracije mogu kretati i kroz druge prenosiocе, kao što je termogenin (eng. *uncoupling protein 1* - UCP1), pri čemu se generiše toplotna energija. Ovaj protein je kod sisara eksprimiran u mrkom masnom tkivu. Određene supstance, dekuplujući agensi, vrše razdvajanje procesa transporta elektrona i sinteze ATP-a. Ove supstance su obično lipofilne slabe kiseline koje prelaze membranu u protonizovanom, neutralnom stanju (te se nazivaju i protonofore), i na ovaj način prenose

protone preko membrane, niz gradijent koncentracije, time dovodeći do rasipanja elektrohemijuskog gradijenta protona [72].

ATP sintaza (kompleks V ili  $F_0F_1$  ATPaza) je veliki transmembranski proteinski kompleks, koji koristi elektrohemijuski gradijent protona za sintezu visokoenergetske fosfatne veze ATP-a. Sastoji se iz dve funkcionalne jedinice -  $F_0$  (nazvana tako zbog osetljivosti na inhibitor oligomicin) gradi transmembranski kanal za protone, a  $F_1$  se nalazi sa matriksne strane membrane i vrši funkciju ATP sintaze. Za sintezu jednog molekula ATP-a iz ADP-a i neorganskog fosfata potrebno je da kroz  $F_0$  komponentu prođe 4 protona, što izaziva njenu rotaciju i prenos energije na  $F_1$  komponentu usled čega dolazi do konformacione promene.  $F_1$  komponenta je izgrađena od većeg broja različitih subjedinica ( $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ ), a katalitički centar čine tri  $\beta$  subjedinice koje mogu biti u konformacionim stanjima L (*loose* - opušteno), O (*open* - otvoreno) i T (*tight* - stegnuto). Supstrati - ADP i  $P_i$ , vezuju se za subjedinicu u L stanju, a njenom promenom u T stanje dolazi do povećanja katalitičke aktivnosti i sinteze ATP-a. Energija rotacije koristi se za promenu konformacije iz T u O stanje, što omogućava otpuštanje novosintetisanog molekula ATP-a. Transport novosintetisanog ATP-a u citosol, kao i ADP-a koji je supstrat za ATP sintazu u matriks vrši se preko translokaze adeninskog nukleotida. Ovaj transporter koji funkcioniše po principu antiporta veoma je važan za odvijanje oksidativne fosforilacije, zato što u slučaju smanjene koncentracije ADP-a dolazi do zaustavljanja čitavog procesa. Drugi transporter, translokaza fosfata, unosi neorganski fosfat u matriks mitohondrija, po principu simporta uz proton ( $H^+$ ) [72].



**Shema 2. Put elektrona dobijenih potpunom oksidacijom glukoze.** Glukoza se potpuno oksiduje u procesima glikolize, oksidativne dekarboksilacije piruvata i Krebsovog ciklusa. Redukcioni ekvivalenti (crvene strelice) nastali u ovim procesima prenose se na elektron-transportni lanac. Energija nastala transportom elektrona na respiratornom lancu koristi se za generisanje elektrohemijjskog gradijenta protona, što omogućava sintezu ATP-a. M-A – malat-aspartatni transporter, GPD – glicerofosfatni transporter (glicerol-3-fosfat dehidrogenaza), PDH – piruvat dehidrogenazni kompleks, P – piruvat, S – sukcinat, F – fumarat, Q – koenzim Q (ubihinon), c – citohrom c, s.m.m. – spoljašnja mitohondrijska membrana, u.m.m. – unutrašnja mitohondrijska membrana.

### 1.3. Signalni putevi za regulaciju energetskeg metabolizma u skeletnom mišiću

U živim organizmima, metabolički procesi su regulisani tako da budu usklađeni sa količinom dostupnih hranljivih materija. Tokom evolucije višćelijskih eukariota, razvili su se sistemi koji detektuju nivo raspoloživih nutrijenata i energetske status ćelija i na osnovu toga pokreću kaskadu događaja koja funkcionisanje ćelije usklađuje sa uslovima sredine. Ovi sistemi baziraju se na aktivnosti hormona i unutarćelijskih signalnih puteva, te se metabolizam reguliše kako na nivou celog organizma tako i na nivou svake pojedinačne ćelije.

#### 1.3.1. Insulinski signalni put

Insulin je polipeptidni hormon endokrinog pankreasa sa ključnom ulogom u regulaciji energetskeg metabolizma - prvenstveno deluje kao regulator metabolizma ugljenih hidrata, masti i proteina, ali učestvuje i u regulaciji ćelijskog rasta i proliferacije. Insulin je jedini hormon koji ima hipoglikemijski efekat, a u ciljnim tkivima insulin ima anabolički efekat. Dva glavna signalna puta koja pokreće insulin su PI3K/Akt put, odgovoran za metaboličke efekte insulina, i MAP kinazni put, koji reguliše proliferaciju, diferencijaciju i rast ćelija.

Insulinski signalni put započinje vezivanjem insulina za receptor tirozin-kinaznog tipa na ćelijskoj membrani. Insulinski receptor je preformirani heterotetramer sastavljen od dve  $\alpha$  i dve  $\beta$  subjedinice - vanćelijske  $\alpha$  subjedinice grade ligand-vezujući centar, dok su  $\beta$  subjedinice transmembranski proteini, sa C-terminalnim segmentom koji u citosolu gradi tirozin-kinazni aktivni centar [77]. Vezivanje insulina dovodi do unakrsne autofosforilacije tirozinskih ostataka  $\beta$  subjedinica receptora, čime se aktivira tirozin-kinazna aktivnost i omogućava fosforilacija supstrata. Receptor za insulin nema direktnu interakciju sa nishodnim efektorima, već na njih deluje posredno, preko skeletnih i adapterskih proteina. Najznačajniji od njih su proteini koji se nazivaju supstratima receptora za insulin (eng. *insulin receptor substrate* - IRS). Do sada je otkriven veći broj proteina iz familije IRS (IRS 1-6), a IRS-1 i IRS-2 imaju najznačajniju ulogu u glavnim ciljnim tkivima insulina - jetri, mišićima i adipoznom tkivu [21]. Kaskada fosforilacija započinje fosforilacijom IRS-a, što omogućava vezivanje proteina sa SH2 (eng. *Src homology 2*) domenima, koji se vezuju za fosforilisane tirozinske ostatke.

PI3K/Akt put započinje vezivanjem regulatorne subjedinice kinaze fosfatidilinozitola 3 (eng. *phosphatidylinositol 3-kinase* - PI3K) za fosfotirozinske ostatke IRS, posredstvom SH2 domena. Ovo dovodi do kolokalizacije PI3K uz ćelijsku membranu i aktivacije njene katalitičke subjedinice [78]. PI3K katalizuje fosforilaciju membranskog lipida fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfata (eng. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate* - PIP<sub>2</sub>) do fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfata (eng. *phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate* - PIP<sub>3</sub>). PIP<sub>3</sub> ima ulogu sekundarnog glasnika i regrutuje na ćelijsku membranu proteine sa PH domenima (eng. *pleckstrin homology domain*), u ovom slučaju protein kinazu B (PKB ili Akt) i kinazu zavisnu od 3-fosfoinozitida (eng. *3-phosphoinositide-dependent kinase-1* - PDK-1) [79]. PIP<sub>3</sub> omogućava da PDK-1 fosforiliše Akt time što dovodi do njihove kolokalizacije, ali i time što vezivanjem za Akt dovodi do konformacione promene koja omogućava da PDK-1 fosforiliše treonin na poziciji 308 [78,79]. Za potpunu aktivaciju Akt potrebna je još jedna fosforilacija, koju na serinu 473 vrši kompleks mTOR/Rictor (kompleks ciljnog proteina rapamicina kod sisara, eng. *mammalian target of rapamycin complex 2* - mTORC2) [80,81].



Serin/treonin kinaza Akt je glavni protein čijim posredstvom insulin vrši svoje efekte na energetske metabolizam, kao što su unos glukoze u ćelije, regulacija sinteze glikogena i proteina. Jedan od direktnih supstrata Akt kinaze je AS160 (eng. *Akt substrate 160 kDa* ili TBC1D4), protein koji stimulira GTPaznu aktivnost (eng. *GTPase-activating protein* - GAP) [82]. Dejstvo AS160 održava Rab, člana porodice malih G-proteina koji učestvuju u reorganizaciji citoskeleta [83], u neaktivnom, GDP vezanom stanju. Aktivacijom signalnog puta insulina, aktivirana Akt kinaza fosforira AS160, što inhibira GAP (eng. *GTPase-activating protein*) aktivnost ovog proteina i tako povećava egzocitozu GLUT4 vezikula. Regulacija sinteze glikogena vrši se preko kinaze glikogen sintaze (eng. *glycogen synthase kinase 3* - GSK-3) koju Akt fosforira i inaktivira, te na taj način omogućava aktivnost glikogen sintaze (GSK-3 u aktivnom obliku vrši inhibitornu fosforilaciju glikogen sintaze) [84,85]. Regulacija metabolizma glikogena od strane insulina obavlja se još i posredstvom protein fosfataze 1 (eng. *protein phosphatase 1* - PP1) koja dovodi do defosforilacije kojom aktivira glikogen sintazu [86], a inhibira glikogen fosforilazu [87]. mTORC1 je proteinski kompleks koji vrši funkciju glavnog regulatora sinteze proteina i ćelijskog rasta, koji u odgovoru na signale koji ukazuju na obilje nutrijenata i povoljan energetske status ćelije (insulin, aminokiseline, faktori rasta) aktivira translaciju. Insulinski signalni put pozitivno regulira aktivnost mTORC1 posredstvom proteina TSC2 (protein tuberozne skleroze, eng. *tuberous sclerosis protein 2*), koji je inhibitor mTOR kompleksa 1. Fosforilacija od strane Akt-a dovodi do njegove disocijacije od mTORC1 i posledične aktivacije kompleksa [88]. Osim takozvanih brzih efekata, koje insulin indukuje putem kovalentne regulacije aktivnosti proteina, značajni su i efekti na regulaciju ekspresije gena. FOXO1 (eng. *forkhead box protein O1*) je regulatorni protein transkripcije koji regulira ekspresiju mnogih gena čiji proteinski proizvodi učestvuju u metaboličkim procesima, kao što su lipoliza i glukoneogeneza. Fosforilacija od strane Akt-a dovodi do njegovog izlaska iz jedra i prekida aktivacije transkripcije ciljnih gena [89].

Poznato je da insulin stimulira oksidaciju glukoze, ali mehanizam koji do ovog efekta dovodi nije u potpunosti razjašnjen, a podaci o direktnom dejstvu insulina na oksidativnu fosforilaciju su malobrojni. Kratkotrajni tretman insulinom povećava efikasnost respiracije (iskorišćavanje energije dobijene prenosom elektrona za sintezu ATP-a) [90], aktivira ekspresiju proteina respiratornog lanca, povećava aktivnosti citrat sintaze i citohrom c oksidaze [91]. Preko mTORC1 i FOXO1 insulin utiče na ekspresiju i aktivnost transkripcionog regulatora PGC-1 $\alpha$ , koji je poznat kao centralni regulator biogeneze mitohondrija, a inhibicija GSK3 $\beta$  (fosforilacijom od strane Akt-a) povećava ekspresiju PGC-1 $\alpha$  [92]. Važnost insulinske signalizacije za funkciju mitohondrija ogleda se i u mnogo puta potvrđenoj činjenici da se u insulinskoj rezistenciji i dijabetesu kao jedan od centralnih poremećaja javlja narušena funkcija mitohondrija, uz poremećaj mitohondrijske dinamike, pokazan i kroz smanjenu ekspresiju PGC-1 $\alpha$ , kao i gena čiju ekspresiju PGC-1 $\alpha$  regulira [61,62].

Pored regulacije energetske metabolizma, insulin takođe aktivira signalne puteve koji reguliraju proliferaciju i rast ćelije, pre svega MAP kinazni put (protein kinaza aktivirana mitogenom, eng. *mitogen-activated protein kinase*) [93]. Aktivacija ovog signalnog puta posredstvom insulinskog receptora može se odvijati na dva načina – insulinski receptor fosforira Shc protein (eng. *SH2 containing protein*), koji dalje aktivira Grb2 (adapterski protein koji se vezuje za receptore faktora rasta, eng. *growth factor receptor-bound protein 2*), ili direktnom aktivacijom Grb2, koji se svojim SH2 domenom vezuje za fosfotirozinski ostatak IRS1. Protein Grb2 svojim protein-vezujućim SH3 domenom ostvaruje kontakt sa domenom bogatim prolinom proteina Sos. Ovaj protein vrši funkciju faktora koji stimulira razmenu guaninskih nukleotida (eng. *guanine nucleotide-exchange factor* - GEF), te aktivira GTP-aznu aktivnost proteina Ras. Ras svojom GTPazom aktivnošću dalje aktivira Raf-1 kinazu, što započinje kinaznu kaskadu aktivacije - Raf-1 fosforira i aktivira MEK, koja dalje fosforira i aktivira kinazu regulisanu vanćelijskim signalima - ERK (eng. *extracellular signal-regulated*

kinases) [94,95]. ERK je u ovom signalnom putu efektorska kinaza, koja može da ulazi u nukleus i fosforiliše i time reguliše aktivnost proteina regulatora transkripcije kao što je Elk1, koji reguliše ekspresiju velikog broja insulinom regulisanih gena. Serin/treonin kinaza ERK 1/2 ima više od 50 poznatih supstrata, koji uglavnom imaju funkciju transkripcionih regulatora [93]. Putevi MAPK i PI3K/Akt su horizontalno povezani – Ras može direktno aktivirati PI3K [96].

### 1.3.2. Adenozin monofosfatom aktivirana protein kinaza - AMPK

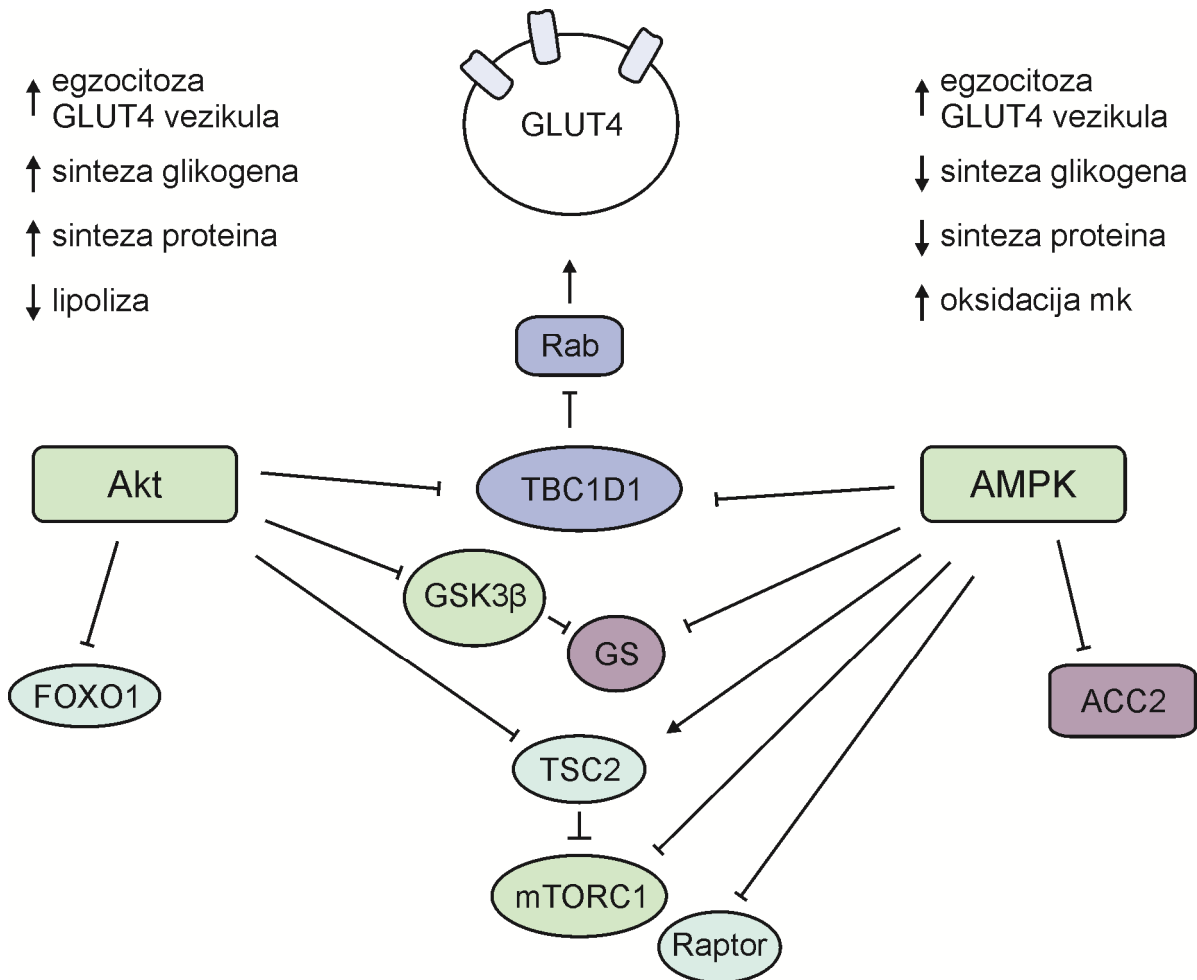
Adenozin monofosfatom aktivirana protein kinaza (eng. *adenosine monophosphate activated protein kinase* - AMPK) jedan je od centralnih energetske senzora u ćeliji. AMPK vrši funkciju svojevrsnog energetske prekidača, koji dovodi do inhibicije anaboličkih i aktivacije kataboličkih puteva u ćeliji. Ova serin/treonin kinaza je ključni efektor kao i regulatorna tačka sistema koji odgovara na energetske stres na ćelijskom nivou. Izvori energetske stresa mogu biti poremećaj u sintezi ATP-a usled nedostatka hranljivih materija ili kiseonika, prisustva toksina i inhibitora metaboličkih procesa, ili povećane potrošnje ATP-a, kao u slučaju mišićne kontrakcije. Nezavisno od uzroka, ovaj signal uvek se registruje kao promena odnosa AMP/ATP, te je aktivnost AMPK regulisana nivoima adeninskih nukleotida u ćeliji - povećanje koncentracije AMP-a i ADP-a i smanjenje koncentracije ATP-a dovode do aktivacije AMPK. Preko velikog broja nishodnih supstrata, AMPK reguliše procese ključne za rast i funkcionisanje ćelije - metabolizam ugljenih hidrata i masti, autofagiju, sintezu proteina itd. Regulacijom enzima i ključnih čvorišta u signalnim putevima, AMPK koordiniše sveobuhvatan odgovor ćelije na snižen energetske status. Ovaj sistem je visoko konzerviran, a geni homologni onima koji kodiraju za subjedinice AMPK prisutni su u gotovo svim ispitivanim eukariotskim genomima. Kod jednoćelijskih eukariota kao što je kvasac (*Saccharomyces cerevisiae*) ovaj sistem reguliše metabolički odgovor u slučaju odsustva glukoze u okolini.

AMPK je heterotrimerni kompleks, sačinjen od po jedne  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  subjedinice. Katalitička  $\alpha$  subjedinica sadrži protein-kinazni aktivni centar i regulatorni domen, dok regulatorne subjedinice  $\beta$  i  $\gamma$  sadrže domene koji vezuju glikogen (eng. *carbohydrate binding module* - CBM) [97], odnosno adeninske nukleotide (eng. *cystathionine- $\beta$ -synthase domain* - CBS). Aktivnost AMPK je kovalentno regulisana fosforilacijom na treoninu 172 (T172)  $\alpha$  subjedinice [98], a ovu fosforilaciju kod sisara vrše LKB1 (kinaza jetre B1, eng. *liver kinase B1*) i u nekim tipovima ćelija kinaza kalcijum-kalmodulin zavisne protein kinaze 2 (eng. *calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2* - CAMKK) [99–101]. Uloga CAMKK ispitivana je u aktivaciji AMPK indukovanoj mišićnom kontrakcijom, kao potencijalni mehanizam AMP-nezavisne,  $Ca^{2+}$ -zavisne aktivacije, usled povećanja koncentracije jona kalcijuma tokom kontrakcije [100,101]. Aktivnost AMPK je alosterno regulisana adeninskim nukleotidima na više načina - vezivanje AMP-a za  $\gamma$  subjedinicu povećava aktivnost kinaze [102], a prisustvo AMP-a ili ADP-a inhibira defosforilaciju i takođe pozitivno reguliše fosforilaciju na T172. Alosterne regulacije AMP-om zavisna je i od količine prisutnog ATP-a, te se na ovaj način povećava senzitivnost na promene energetske statusa ćelije. Na karakteristike alosterne regulacije aktivnosti AMPK utiče sastav heterotrimer - različite izoforme subjedinica koje grade kompleks međusobno se razlikuju u afinitetu za vezivanje nukleotida, a njihova ekspresija je tkivno specifična.

AMPK reguliše veliki broj ćelijskih procesa fosforilacijom svojih nishodnih supstrata. Glavni efekat AMPK u skeletnom mišiću je povećanje unosa glukoze u ćelije usled porasta egzocitoze GLUT4 vezikula [103]. Ovaj proces pokreće mišićna kontrakcija, koja dovodi do povećanog nivoa AMP-a i posredne aktivacije AMPK. Za razliku od procesa insulinom posredovane egzocitoze GLUT4 vezikula u mišiću u stanju mirovanja, na koji utiče insulinska

rezistencija, unos glukoze uzrokovan aktivacijom AMPK nesmetano se odvija i u stanju insulinske rezistencije, čime se objašnjava deo pozitivnih efekata fizičke aktivnosti kod osoba obolelih od dijabetesa [104]. Supstrati AMPK uključeni u ovaj proces su TBC1D1 i TBC1D4, a uloga pojedinačnih izoformi nije u potpunosti razjašnjena, i verovatno zavisi od tipa mišićnog vlakna [105,106]. Tokom fizičke aktivnosti, AMPK igra važnu ulogu u prelasku sa neoksidativnog na oksidativni metabolizam, do čega dolazi nakon što se potroše rezerve kreatin-fosfata. Tokom kraćeg perioda mišićne kontrakcije, fosforilacija ADP u ATP se odvija zahvaljujući visokoenergetskim vezama kreatin-fosfata, što ne dovodi do porasta nivoa AMP-a, te odgovor AMPK izostaje. Tokom dužeg perioda mišićnog rada, rezerve kreatin-fosfata i glikogena bivaju potrošene, te dolazi do prelaska na oksidaciju nutrijenata iz krvotoka radi sinteze ATP-a, u čemu AMPK igra važnu ulogu [107]. AMPK u mišiću negativno reguliše sintezu glikogena putem inhibitorne fosforilacije glikogen sintaze [108]. Posredstvom inhibitorne fosforilacije acetil koenzim A karboksilaze - ACC1 (eng. *acetyl-CoA carboxylase* - ACC) i HMG-CoA reduktaze (eng. *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase* - HMGCR), ključnih enzima u sintezi masnih kiselina, odnosno holesterola, AMPK u uslovima manjka hranljivih materija i ATP-a zaustavlja sintezu lipida u jetri [109]. U skeletnom mišiću je eksprimiran izoenzim ACC2, koji sintezom malonil-CoA dovodi do inhibicije karnitin-palmitoil transferaze 1, enzima koji omogućava ulazak masnih kiselina u mitohondrijski matriks, radi odvijanje  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina. Inhibicijom ACC2, AMPK u mišiću stimuliše oksidaciju masnih kiselina. AMPK u mišiću fosforiliše i na ovaj način aktivira i malonil-CoA dekarboksilazu, enzim koji razgrađuje malonil-CoA, i tako dodatno aktivira oksidaciju masnih kiselina [110].

AMPK inhibira sintezu proteina kroz regulaciju mTORC1, koju vrši na više načina: aktivirajućom fosforilacijom TSC2, inhibitora mTOR-a [111], inhibitornom fosforilacijom Raptor-a, jedne od proteinskih komponenti mTORC1 [112], ili direktnom fosforilacijom mTOR-a, što sprečava kinazu Akt da fosforiliše i time aktivira ovaj protein [113,114]. Kroz inhibiciju mTORC1, čime sprečava inhibitornu fosforilaciju proteina ULK1, ali i direktnom fosforilacijom ove kinaze [115,116], AMPK aktivira proces autofagije, koji u ćelijama u stanju manjka nutrijenata lizozomalnom razgradnjom ćelijskih komponenti obezbeđuje energetske supstrate i prekursore za biosintetske procese. U slučaju dužeg trajanja signala, tj. prolongiranog stanja energetskeg stresa, AMPK reguliše metaboličke puteve delujući na transkripciju i ekspresiju gena. Fosforilacijom centralnog regulatora mitohondrijske biogeneze, PGC-1 $\alpha$ , AMPK povećava ekspresiju mitohondrijskih gena i GLUT4 [117] i stimuliše biogenezu mitohondrija [118–120], čime se objašnjava i dugo poznat fenomen uticaja fizičke aktivnosti na povećani oksidativni kapacitet mišića. Pokazano je da je AMPK ključna za pokretanje mitohondrijske fisije u odgovoru na energetske stres [121]. Mitohondrijska fisija je proces deobe mitohondrija, i ključan je za kontrolu kvaliteta i uklanjanje oštećenih mitohondrija procesom mitofagije [122], a pokazano je i da je mitohondrijska fisija povezana sa poboljšanjem mitohondrijske respiracije [123,124]. Sumarni konvergirajući efekti signalnih puteva AMPK i PI3K/Akt prikazani su na shemi 3.



**Shema 3. Konvergirajući efekti signalnih puteva PI3K/Akt i AMPK.** Signalni putevi PI3K/Akt i AMPK dele veliki broj nishodnih supstrata. Oba puta pozitivno regulišu unos glukoze u mišićne ćelije, ali njihovi efekti na metabolizam glikogena, proteina i masti su suprotni. GLUT4 – transporter za glukozu 4, Akt – protein kinaza B, FOXO1 - *forkhead box protein 01*, GSK3β – kinaza glikogen sintaze 3β, GS – glikogen sintaza, mTORC1 – kompleks I ciljnog proteina rapamicina kod sisara, AMPK - adenzin monofosfatom aktivirana protein kinaza, ACC2 - acetil koenzim A karboksilaza 2.

## 1.4. Metformin

Metformin (1,1-dimetilbigvanid) je oralni antihyperglikemijski lek iz grupe bigvanida. Po preporukama relevantnih organizacija, metformin je lek prvog izbora u lečenju dijabetesa tipa 2 [125–127]. Zahvaljujući svojoj efikasnosti u snižavanju glikemije, retkim neželjenim efektima i pristupačnoj ceni, trenutno je najčešće upotrebljavani antidijabetik na svetu [128], koji svakodnevno koristi preko 200 miliona ljudi obolelih od dijabetesa tipa 2, u vidu monoterapije ili u kombinaciji sa drugim antidijabeticima [129]. Pored efikasnog snižavanja glikemije, insulinemije i poboljšanja lipidnog profila, metformin promovise smanjenje telesne mase, a prema nekim studijama dovodi i do smanjenog kardiovaskularnog rizika. Pored lečenja dijabetesa tipa 2, indikacije metformina vremenom su proširene, te se ovaj lek koristi i u prevenciji dijabetesa (kod pacijenata sa predijabetesom) [130] i lečenju sindroma policističnih jajnika [131].

### 1.4.1. Istorijat upotrebe metformina

Koreni upotrebe metformina u lečenju dijabetesa mogu se naći u srednjevekovnoj narodnoj medicini Evrope i upotrebi biljke *Gallega officinallis* (narodni naziv ždraljevina, ždraljika) za ublažavanje simptoma koji se danas pripisuju dijabetesu [132]. Početkom 20. veka izolovana je aktivna supstanca odgovorna za antihyperglikemijsko dejstvo ove biljke - gvanidin [133]. Hemijskom modifikacijom molekula gvanidina sintetisani su galegin (monogvanidin) i sintalin (digvanidin), čija je upotreba u lečenju dijabetesa ubrzo obustavljena usled toksičnosti i sve veće dostupnosti insulina. Metformin je sintetisan 1922. godine [134], ali njegovo antihyperglikemijsko dejstvo pokazano je tek 1929. [135]. Dimetil gvanidini ili bigvanidi manje su toksični od prethodno ispitivanih gvanidinskih derivata, a metformin se pokazao kao najmanje toksičan član ove grupe, ali ujedno i najmanje potentan u snižavanju glikemije. Zbog velike doze potrebne za postizanje efekta, kao i nedovoljno značajnog (po mišljenju tadašnjih stručnjaka) sniženja glikemije kod zdravih životinja, istraživanje metformina je privremeno zapostavljeno. Francuski lekar Žan Stern se sredinom 50. godina 20. veka zainteresovao za bigvanide, te je nakon početnih ispitivanja na životinjama sproveo i kliničku studiju upotrebe metformina za lečenje dijabetesa. Pokazano je da metformin može smanjiti potrebnu dozu insulina kod pacijenata sa tipom 2 dijabetesa, dok kod nekih pacijenata može u potpunosti zameniti insulin [136]. Prvi lekovi iz grupe bigvanida, metformin i buformin, pojavljuju se na tržištu u Evropi 50. i 60. godina 20. veka. Fenformin je zbog svoje potentnosti stekao veliku popularnost, posebno u Sjedinjenim Američkim državama. Međutim, podaci dobijeni u jednoj kliničkoj studiji (eng. *University Group Diabetes Program* - UGDP) govore o učestalom javljanju laktičke acidoze, te je 1978. fenformin povučen sa tržišta u SAD, kao i u većini evropskih država. Metformin je u SAD uveden u upotrebu za terapiju dijabetesa tipa 2 tek 1994. godine [67]. Rezultati UKPDS publikovani 1998. godine pokazali su da metformin, pored dobre regulacije glikemije, kod pacijenata obolelih od dijabetesa tipa 2 smanjuje kardiovaskularni rizik i povećava preživljavanje [32]. Ova i druge studije u kojima je pokazana efikasnost i bezbednost upotrebe metformina [128] doprinele su tome da on postane lek prvog izbora u terapiji dijabetesa tipa 2.

## 1.4.2. Antidijabetičko dejstvo metformina

Metformin snižava koncentraciju glukoze u krvi delujući na nivou jetre, inhibicijom endogene proizvodnje glukoze, kao i na nivou perifernih tkiva, pre svega skeletnog mišića, gde dovodi do povećanog unosa glukoze. Debata o značaju i udelu ovih mehanizama vodi se od ranih istraživanja efekata metformina. Uvođenje metode euglikemijskog hiperinsulinemijskog klampa, kojom se meri senzitivnost perifernih tkiva na insulin, kao i tehnika za *in vivo* merenje metabolizma glukoze (indirektna kolorimetrija, NMR spektroskopija), dovelo je do produkcije velikog broja podataka o efektima metformina u različitim tkivima.

Kod ispitanika na terapiji metforminom registrovano je sniženje glikemije našte, smanjeno oslobađanje glukoze iz jetre i inhibicija glukoneogeneze [69,137–139]. Na osnovu ovih rezultata, pretpostavlja se da metformin deluje putem inhibicije proizvodnje glukoze u jetri i na taj način snižava glikemiju našte. Ne postoji saglasnost da li do ovoga dolazi zbog inhibicije glukoneogeneze [139] ili glikogenolize [140]. Dejstvo metformina na inhibiciju glukoneogeneze u jetri pokazano je i u životinjskim i ćelijskim modelima [141–143].

Kao metabolički veoma aktivno tkivo sa velikim udelom u telesnoj masi, skeletni mišić igra važnu ulogu u regulaciji glikemije. Uloga skeletnog mišića u antidijabetičkom dejstvu metformina dovodi se u pitanje zbog nekonzistentnosti i povremene oprečnosti rezultata različitih studija koje su se bavile efektima metformina na mišić. Kod pacijenata na terapiji metforminom, pored sniženja glikemije našte uočava se i sniženje postprandijalne glikemije, što ukazuje na povećan unos glukoze u periferna tkiva [69]. U mnogim studijama je, na osnovu euglikemijskog hiperinsulinemijskog klampa ili OGT testa, pokazano da metformin dovodi do povećanja insulinske senzitivnosti i povećanog unosa glukoze u mišić [69,137,138,144–146]. Sa druge strane, mnoge studije opovrgavaju ulogu skeletnog mišića u dejstvu metformina, pokazujući da tretman metforminom ne dovodi do povećanog unosa glukoze u periferna tkiva [139,140,147]. Nekonzistentnost u rezultatima ovih studija može se pripisati razlikama u dizajnu (definisanje studijskih grupa, obustavljanje druge terapije pre započinjanja studije, doziranje metformina) kao i metodološkom pristupu [148].

Kada govorimo o dejstvu metformina na insulinsku rezistenciju, nameće se i pitanje kauzalnosti - da li metformin primarno deluje na povećanje insulinske senzitivnosti, što posledično dovodi do snižavanja glikemije, ili regulacija glikemije povoljno utiče na senzitivnost na insulin [149,150]. Hipoteza da do povećanja senzitivnosti na insulin dolazi isključivo usled regulacije glikemije potkrepljena je zapažanjem da je povećanje unosa glukoze u periferna tkiva izazvano metforminom uporedivo sa onim izazvanim derivatima sulfonilureje, za koje se zna da deluju povećavajući sekreciju insulina, i nemaju uticaj na insulinsku senzitivnost [69]. Studije na životinjama i ćelijskim kulturama koje omogućavaju definisanje uslova eksperimenta, kao i razvoj metoda kojima se mogu ispitivati molekularni mehanizmi dejstva metformina, predstavljaju način da se ove nedoumice razjasne. Literaturni podaci o efektima metformina na insulinsku signalizaciju nisu konzistentni [151,152]. Metformin u životinjskim modelima dijabetesa povećava insulinsku senzitivnost skeletnog mišića, vraćajući na kontrolni nivo unos glukoze u tkivo, sintezu glikogena i aktivnost insulinskog signalnog puta [150,151,153]. U *in vitro* studijama na kulturi mišićnih ćelija, metformin dovodi do egzocitoze vezikula sa GLUT4 transporterom [154] i anulira efekte insulinske rezistencije izazvane insulinom na aktivnost insulinskog signalnog puta i unos glukoze [155]. Pokazano je da metformin delujući na metabolizam lipida potire efekte lipotoksičnosti i na taj način povećava senzitivnost na insulin [156,157].

### 1.4.3. Molekularni mehanizmi dejstva metformina

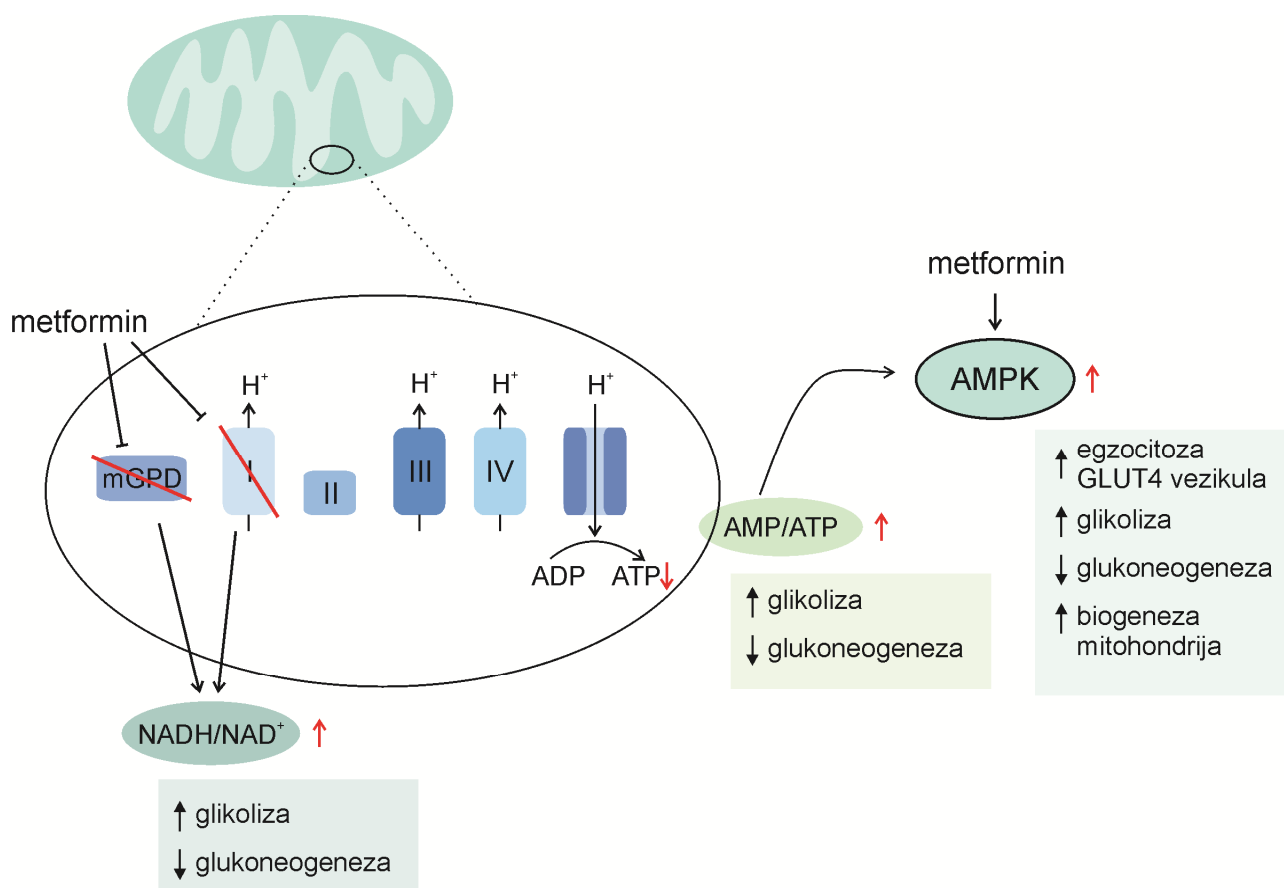
Iako se metformin u kliničkoj praksi koristi već preko 60 godina, molekularni mehanizmi njegovog dejstva nisu u potpunosti razjašnjeni. Osnovni mehanizmi koji se navode u literaturi su inhibicija kompleksa I respiratornog lanca mitohondrija [143,158] i aktivacija AMP-om aktivirane protein kinaze [159,160]. Hipoteza o inhibiciji kompleksa I kao osnovnom mehanizmu antidijabetičkog dejstva metformina predlaže da metformin, inhibiranjem respiratorne funkcije mitohondrija, dovodi do promene energetske i redoks statusa ćelije i posledične promene aktivnosti enzima metaboličkih puteva [161], kao i aktivacije AMPK [162]. Sve ovo pospešuje povećan unos i katabolizam glukoze u perifernim tkivima, uz smanjenu sintezu glukoze u jetri, što vodi snižavanju glikemije.

Inhibitorni efekat derivata gvanidina na mitohondrijsku respiraciju uočen je na samom početku istraživanja ovih supstanci [163]. Dva rada iz 2000. godine [143,158] neosporno su dokazala da metformin specifično inhibira kompleks I respiratornog lanca mitohondrija i predložila da ovaj mehanizam leži u osnovi antidijabetičkog dejstva metformina. Ova pretpostavka potkrepljena je činjenicom da drugi inhibitori respiratornog lanca postižu antidijabetičke efekte uporedive sa efektima metformina [164,165]. Drugi autori pak tvrde da visoke koncentracije metformina koje su potrebne da dovedu do inhibicije kompleksa I ukazuju na to da je ovaj mehanizam odgovoran isključivo za laktičku acidozu, koja je neželjeni efekat terapije metforminom [166]. Veća lipofilnost fenformina i niže koncentracije potrebne za inhibiciju kompleksa I [167] u odnosu na metformin, objašnjavaju veliku učestalost laktičke acidoze pri primeni fenformina. Takođe je pokazano da fenformin, za razliku od metformina, osim kompleksa I inhibira i funkciju kompleksa II i IV [168]. Inhibicija respiratorne funkcije kompleksa I visokom koncentracijom metformina pokazana je na različitim uzorcima tkiva jetre: intaktnim i permeabilizovanim primarnim hepatocitima, izolovanim mitohondrijama i submitohondrijskim česticama [143,158], tkivnom homogenatu [169], imunoprecipitiranom kompleksu I [166], a zatim i u drugim tkivima i tipovima ćelija (skeletni mišić [170], srce [171,172], ćelije krvi [173], tumorske ćelije [174]). Inhibicija respiratorne funkcije pokazana je *in vivo* i *ex vivo* na eksperimentalnim životinjama tretiranim metforminom [175].

Drugi široko prihvaćeni molekularni mehanizam dejstva metformina je aktivacija adenozin monofosfatom aktivirane protein kinaze - AMPK. Znajući da AMPK deluje na ćelijski metabolizam usmeravajući ga u pravcu katabolizma, a inhibirajući anaboličke procese, jasno je da aktivacija AMPK metforminom ima pozitivne efekte na regulaciju energetske homeostaze u dijabetesu, putem povećanja unosa i oksidacije glukoze u mišićnim ćelijama, smanjene proizvodnje glukoze u jetri, povećane oksidacije masnih kiselina itd. Aktivacija AMPK metforminom je pokazana u *in vitro* i životinjskim studijama, u jetri i mišiću [159,176,177]. Rezultati studija ne slažu se u odgovoru na pitanje da li do aktivacije AMPK dolazi posredno, kao posledica povećanja koncentracije AMP-a do koje dolazi usled inhibicije oksidativne fosforilacije [162], ili nezavisno od inhibicije mitohondrijske respiracije i promene energetske statusa ćelije [178,179]. Pokazano je i da metformin direktno inhibira AMP deaminazu, enzim katabolizma adeninskih nukleotida, i tako dovodi do povećanja koncentracije AMP-a i aktivacije AMPK [180].

Postoje dokazi o dejstvu metformina na regulaciju glikemije mehanizmima nezavisnim od inhibicije kompleksa I i AMPK, kao što su regulacija aktivnosti glukozo-6 fosfataze [181,182], glukokinaze [183] i mTORC1 [184]. Inhibicija glicerol-3-fosfat dehidrogenaze je još jedan pokazani mehanizam dejstva metformina na mitohondrije, nezavisan od inhibicije kompleksa I - inhibicijom transporta citosolnog NADH u mitohondrije, metformin deluje na promenu redoks statusa ćelije, što za posledicu ima inhibiciju glukoneogeneze u ćelijama jetre [185]. Mehanizam inhibicije glicerol-3-fosfat dehidrogenaze pokazan je *in vitro* na hepatocitima kao i

kod eksperimentalnih životinja [185,186]. Mehanizmi u osnovi molekularnog delovanja metformina sumirani su na shemi 4.



**Shema 4. Molekularni mehanizmi dejstva metformina.** Potencijalni molekularni mehanizmi dejstva metformina na nivou mitohondrija su inhibicija kompleksa I respiratornog lanca i mitohondrijske forme glicerol-3-fosfat dehidrogenaze. Na ovaj način, metformin posredno dovodi do promene u energetsom i redoks statusu ćelija, kao i posledične aktivacije AMPK. AMPK - adenzin monofosfatom aktivirana protein kinaza, NAD - nikotinamid adenin dinukleotid, ATP - adenzin trifosfat, ADP - adenzin difosfat.



#### 1.4.4. Izazovi u dizajnu studija koje ispituju molekularne mehanizme dejstva metformina

Iz prethodno navedenog možemo zaključiti da je velikim brojem *in vitro* studija pokazano da metformin dovodi do inhibicije kompleksa I respiratornog lanca mitohondrija i aktivacije AMPK. Međutim, *in vivo* studije koje su ispitivale molekularne mehanizme delovanja metformina kod ljudi su malobrojne, a njihovi rezultati nekonzistentni. Pojedine studije pokazuju da metformin dovodi do aktivacije AMPK u mišićnom [160] i adipoznom tkivu [187] pacijenata, dok druge pokazuju suprotno [188]. Kod pacijenata obolelih od dijabetesa tipa 2 koji su na terapiji metforminom pokazana je neizmenjena mitohondrijska respiratorna funkcija u skeletnom mišiću [189], kao i neizmenjen energetska status [188], a isto je pokazano i u skeletnom mišiću eksperimentalnih životinja [190]. Nekoliko skorašnjih studija je ispitivanjem efekata terapijskih doza metformina došlo do interesantnih rezultata - niske koncentracije metformina dovode do povećane funkcije mitohondrija, delujući preko AMPK na mitohondrijsku dinamiku [172,191], u hepatocitima i kardiomiocitima, kao i kod eksperimentalnih životinja *in vivo*.

Velika varijabilnost rezultata publikovanih studija otežava donošenje jasnih zaključaka o preciznim mehanizmima, ciljnim tkivima i farmakološkoj relevantnosti molekularnih efekata metformina. Deo ove varijabilnosti može se objasniti razlikama u izabranim eksperimentalnim modelima, korišćenim metodama i dizajnu studija. Primetne su i značajne razlike u korišćenim koncentracijama i trajanjima tretmana koji su u ovim studijama dovodili do zapaženog efekta. Koncentracije metformina korišćene u studijama su česta meta kritika [192,193], s obzirom na to da su u većini *in vitro* studija za tretmane korišćene suprafarmakološke koncentracije, u milimolarnom opsegu, koje su značajno više od koncentracije metformina u plazmi pacijenata na oralnoj terapiji [194], ili eksperimentalnih životinja [195].

Metformin se u krvotok unosi iz gastrointestinalnog trakta, a iz organizma izlučuje preko bubrega u neizmenjenom stanju. Kod pacijenata na terapiji uspostavlja se stabilna koncentracija u plazmi od oko 4–15  $\mu\text{M}$  ( $\sim 0,5\text{--}2,0 \mu\text{g/ml}$ ) [196]. Zbog hidrofobnosti molekula metformina, koji se u fiziološkim uslovima nalazi u katjonskoj protonizovanoj formi, ulazak u ćelije posredovan je transporterima za organske katjone (eng. *organic cation transporter* - OCT) [196]. Diskrepanca u koncentracijama metformina *in vivo* i *in vitro* objašnjava se akumulacijom metformina u ciljnim tkivima kao i potencijalnom akumulacijom pozitivno naelektrisanog metformina u matriksu mitohondrija, usled mitohondrijskog membranskog potencijala. Imajući u vidu farmakodinamiku metformina kao i činjenicu da do danas nije otkriven transporter na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani koji bi omogućio ulazak ovog hidrofilnog molekula u matriks, ova hipoteza čini se malo verovatnom [197]. Takođe, merenjem distribucije radioaktivno obeleženog metformina u različitim ćelijskim frakcijama [191,198] nije izmerena značajna akumulacija metformina u mitohondrijama.

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Imajući u vidu prethodno pomenute nedostatke postojećih *in vitro* studija koje su ispitivale molekularne mehanizme dejstva metformina na mišićnim ćelijama, kao i neslaganje autora oko dizajna studija, korišćenih koncentracija metformina i metoda za ispitivanje energetskeg metabolizma, svrha ovog istraživanja bila je da se na ćelijskoj liniji skeletnog mišića miša C2C12 ispita efekat metformina, u uslovima niske i visoke koncentracije glukoze u medijumu, na energetski metabolizam i signalne puteve važne za njegovu regulaciju.

Polazeći od hipoteze da metformin u terapijskoj koncentraciji menja respiratornu funkciju mitohondrija, energetski i redoks status ćelije i utiče na aktivnost signalnih puteva koji regulišu metabolizam u ćelijama skeletnog mišića, postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

1. Ispitati uticaj metformina na mitohondrijalnu respiraciju, energetski (AMP/ATP) i redoks (NADH/NAD) status, kod mišićnih ćelija miša C2C12 u uslovima niske ili visoke koncentracije glukoze u medijumu, kao i u tretmanu insulinom.
2. Ispitati uticaj metformina na potencijal unutrašnje membrane mitohondrija, produkciju slobodnih kiseoničnih radikala i morfologiju i sadržaj mitohondrija u ćeliji, kod mišićnih ćelija miša C2C12 u uslovima niske ili visoke koncentracije glukoze u medijumu, kao i u tretmanu insulinom.
3. Ispitati uticaj metformina na aktivnost i međusobne interakcije signalnih puteva AMPK i PI3K/Akt, kao i uticaj farmakološke inhibicije komponenti ovih signalnih puteva na mitohondrijalne parametre opisane u ciljevima 1 i 2, kod mišićnih ćelija miša C2C12 u uslovima niske ili visoke koncentracije glukoze u medijumu, kao i u tretmanu insulinom.

# **3. MATERIJAL I METODE**

### 3.1. Čelijska linija

U eksperimentima je korišćena čelijska linija mioblasta miša C2C12, nabavljena od Evropske kolekcije čelijskih kultura (eng. *European Collection of Animal Cell Cultures*, Ujedinjeno Kraljevstvo). C2C12 čelijska linija nastala je selekcijom jednog od klonova C2 čelijske linije, dobijene iz tkiva skeletnog mišića noge zdravog odraslog C3H miša [199]. C2C12 ćelije se gaje kao proliferišući mioblasti, a mogu se diferencirati u kontraktilne miotube koje eksprimiraju karakteristične mišićne proteine.

#### 3.1.1. Gajenje čelijske kulture

Rad sa čelijskom kulturom obavljan je u biološki sigurnom kabinetu sa laminarnim protokom vazduha (engl. *laminar flow cabinet*), uz poštovanje pravila za sterilan rad. Čelije su zamrzavane u medijumu za krioprezervaciju (fetalni goveđi serum (FBS), 10% dimetilsulfoksid (DMSO)), a zamrznute ćelije čuvane su u buretu sa tečnim azotom. Nakon odmrzavanja standardnom procedurom, ćelije su gajene u kulturi bar 7 dana pre postavljanja eksperimenata, da bi se izbegli efekti oštećenja izazvanog zamrzavanjem i odmrzavanjem ćelija. Čelije su gajene na temperaturi od 37 °C, u vlažnoj atmosferi koja sadrži 5% CO<sub>2</sub>. Za gajenje ćelija korišćena su dva čelijska medijuma: Dulbekov modifikovani "Eagle" medijum - DMEM (eng. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) sa visokom koncentracijom glukoze (4,5 g/L; 25 mM) sa stabilnom formom glutamina (4 mM L-alanil-L-glutamin) i natrijum piruvatom (1 mM) i DMEM sa niskom koncentracijom glukoze (1 g/L; 5,5 mM), sa stabilnom formom glutamina i natrijum piruvatom. U oba medijuma dodavano je 10% fetalnog goveđeg seruma (eng. *fetal bovine serum* - FBS) i 1% antibiotik/antimikotik rastvora (penicilin, streptomycin, amfotericin B). Pri gajenju čelijske kulture medijum je menjan svaki drugi dan, a radi održavanja proliferativnog kapaciteta mioblasta nije dozvoljeno da ćelije dostignu više od 70% konfluentnosti. Osnovna kultura gajena je u medijumu sa visokom koncentracijom glukoze (u skladu sa preporukama proizvođača), a kada je eksperimentalni dizajn zahtevao korišćenje medijuma sa niskom koncentracijom glukoze ćelije su gajene u ovom medijumu bar 7 dana pre postavljanja eksperimenta. Čelije su korišćene za eksperimente do 20. pasaže. Morfologija ćelija tokom gajenja i eksperimenata analizirana je na invertnom mikroskopu sa faznim kontrastom, na uveličanju od 100 ×.

#### 3.1.2. Presejavanje, brojanje i postavljanje ćelija za eksperimente

Pri presejavanju i postavljanju ćelija za eksperimente, korišćena je standardna procedura za presejavanje adherentnih ćelija: nakon uklanjanja medijuma i ispiranja ćelija fiziološkim rastvorom puferovanim fosfatom (eng. *phosphate buffered saline* - PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> i 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4), preko ćelija je sipan rastvor proteolitičkog enzima tripsina, sa dodatkom helatora jona kalcijuma, etilendiamin tetrasirćetne kiseline (eng. *ethylenediaminetetraacetic acid* - EDTA) (0,05% tripsin, 0,65 mM EDTA), što dovodi do odvajanja ćelija sa površine suda. Efekat tripsina blokira se potpunim medijumom, a čelijska suspenzija se prebaci u epruvetu i centrifugira na 500 *g*, 5 min, na sobnoj temperaturi. Čelijski talog se resuspenduje u 1 mL medijuma, od čega se 20 µL izdvaja za brojanje - čelijska suspenzija meša se sa tripan plavom (0,04% u PBS-u) u odnosu 1:9, i ćelije se broje u komori po Neubauer-u, posmatranjem na svetlosnom mikroskopu. Nakon brojanja, zapremina

ćelijske suspenzije sa željenim brojem ćelija sipa se u sud za gajenje ćelija u koji je prethodno sipan medijum (tabela 1).

U eksperimentima gde je tako navedeno, ćelije su diferencirane u miotube. Diferencijacija ćelija vršena je gajenjem ćelija do potpune konfluentnosti, kada se vrši zamena standardnog medijuma za gajenje (DMEM, 10% FBS, 1% antibiotik/antimikotik) sa medijumom za diferencijaciju (DMEM sa dodatkom 2% konjskog seruma i 0,5% antibiotik/antimikotik rastvora). Ćelije su u medijumu za diferencijaciju gajene još 5 dana, uz redovnu zamenu medijuma svakog drugog dana. Ova procedura dovodi do prestanka proliferacije i fuzionisanja mioblasta u polijedarne miotube, što je posledica kontaktne inhibicije kao i smanjene koncentracije faktora rasta u konjskom serumu u odnosu na fetalni goveđi serum.

**Tabela 1. Postavljanje C2C12 ćelija za eksperimente: broj ćelija i zapremina medijuma u zavisnosti od suda za gajenje**

sud	broj ćelija	V	metoda
petri šolja 100 mm	400.000	10 mL	WB, TEM
petri šolja 60 mm	200.000	5 mL	WB, O2k, NADH/NAD esej
ploča sa 6 bunara	80.000	2 mL	unos glukoze u ćelije
ploča sa 12 bunara	40.000	1,5 mL	protočna citofluorimetrija
ploča sa 24 bunara	15.000	750 µL	konfokalna mikroskopija
ploča sa 96 bunara	3.000	200 µL	testovi vijabiliteta, ADP/ATP

WB - western blot; TEM - transmisiona elektronska mikroskopija; O2k - respirometrija visoke rezolucije.

### 3.1.3. Tretmani

Ćelije su 24 h nakon zasejavanja u sudove za gajenje ćelija tretirane dodavanjem manje zapremine (10% od ukupne zapremine medijuma u sudu) rastvora željene supstance u ćelijskom medijumu.

Metformin-hidrohlorid rastvaran je u sterilnoj destilovanoj vodi u koncentraciji od 100 mM, čime je dobijen radni štok koji je dalje razblaživan u ćelijskom medijumu do željene koncentracije. Ćelije su metforminom tretirane u trajanju od 24 h ili 5 dana, a koncentracije tretmana bile su u opsegu između 50 µM i 5 mM. Najniža koncentracija metformina, 50 µM, predstavlja koncentraciju ekvivalentnu terapijskoj, dok najviša, 5 mM, predstavlja suprafarmakološku koncentraciju. Za tretmane u trajanju od 5 dana, svež tretman je dodavan svaki drugi dan, pri zameni medijuma.

Za tretmane insulinom korišćen je Novorapid, brzodelujući insulinski analog insulin aspart, koji se koristi u tretmanu dijabetesa. Ćelije su insulinom koncentracije 60 nM (10 U/L) tretirane u trajanju od 24 h, a radi testiranja aktivacije insulinskog signalnog puta korišćen je kratkotrajni (15 min) insulinski tretman, koncentracije 120 nM (20 U/L).

## 3.2. Čelijski vijabilitet i proliferacija

Potencijalni citotoksični efekat metformina na C2C12 ćelije ispitan je testovima vijabiliteta: kristal violet (eng. *crystal violet* - CV), testom aktivnosti kisele fosfataze (eng. *acid phosphatase assay*- AcP) i MTT testom. Efekat metformina na integritet ćelijske membrane (kao pokazatelj oštećenja ćelija koje vodi u ćelijsku smrt) određivan je testom aktivnosti laktat dehidrogenaze (eng. *lactate dehydrogenase* - LDH). Efekat metformina na proliferaciju ćelija meren je brojanjem ćelija u toku 5 dana i izračunavanjem indeksa proliferacije. Čelije su za testove vijabiliteta gajene u pločama sa 96 bunara (3.000 ćelija po bunaru) i tretirane rastućim koncentracijama metformina u trajanju od 24 sata. Svi uzorci rađeni su u 6 tehničkih replikata i za izračunavanje procenta vijabiliteta korišćene su srednje vrednosti. Apsorbancija je merena pomoću spektrofotometrijskog čitača za ploče sa 96 bunara. Procenat vijabiliteta računat je u odnosu na negativnu kontrolu (netretirane ćelije), za koje se uzima da je vijabilitet 100%, a od svih vrednosti oduzimana je vrednost apsorbancije slepe probe.

### 3.2.1. Kristal violet esej

Kristal violet je test vijabiliteta koji se koristi za adherentne ćelijske kulture, a zasniva se na neselektivnom bojenju proteina i DNK fiksiranih ćelija bojom kristal violet. Čelijska smrt dovodi do odvajanja adherentnih ćelija od podloge, tako da se mrtve ćelije lako ispiraju iz kulture, a žive ćelije koje su ostale na podlozi se fiksiraju i boje, tako da je intenzitet boje direktno proporcionalan broju živih ćelija.

Nakon isteka tretmana, ćelijski medijum se prosipa iz ploče, i bunari se ispiraju PBS-om (200  $\mu$ L po bunaru), da bi se eliminisale mrtve, odlepljene ćelije. Zatim se ćelije fiksiraju metanolom (50  $\mu$ L po bunaru), 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon odlivanja metanola, bunari se ponovo ispiraju sa 200  $\mu$ L PBS-a, a zatim se sipa rastvor kristal violet boje i ploča se inkubira na sobnoj temperaturi 10-15 minuta. Nakon inkubacije, boja se prosipa i bunari ispiraju potapanjem ploče u posudu sa česmenskom vodom. Ploče se dobro osuše na vazduhu i boja se rastvori dodavanjem 33% sirćetne kiseline (50  $\mu$ L po bunaru) i apsorbancija se meri na 570 nm.

### 3.2.2. Test aktivnosti kisele fosfataze

Test aktivnosti kisele fosfataze je test vijabiliteta koji radi po principu indirektno procene broja živih ćelija na osnovu aktivnosti unutarćelijskih enzima. Hidrolizom supstrata, p-nitrofenil fosfata (PNPP) dejstvom kiselih fosfataza, dobija se obojeni proizvod p-nitrofenol, čija je apsorbancija direktno proporcionalna broju živih ćelija [200,201].

Nakon isteka tretmana, iz bunara se ukloni medijum i dodaje se 100  $\mu$ L supstrata (10 mM PNPP, 0,1% Triton X-100 u 0,1 M natrijum-acetatatu pH 5,5) po bunaru. Ploča se inkubira 90 minuta na 37 °C, a zatim se reakcija blokira dodavanjem 50  $\mu$ L natrijum hidroksida (1 M NaOH), i meri se apsorbancija na 405 nm.

### 3.2.3. MTT test

Kao i test aktivnosti kisele fosfataze, MTT test bazira se na merenju aktivnosti unutarćelijskih enzima. MTT test meri količinu kristala formazana nastalih hidrolizom 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolijum bromida (eng. *methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide* - MTT) koju katalizuju mitohondrijske dehidrogenaze.

Po isteku tretmana, iz bunara se ukloni medijum, i u svaki bunar se sipa po 50 µL rastvora MTT u ćelijskom medijumu (0,5 mg/mL). Nakon inkubacije (3 h, 37 °C), a kada se golim okom vidi razvijanje ljubičaste boje i na svetlostnom mikroskopu se mogu uočiti formirani kristali formazana, supstrat se uklanja iz bunara, a kristali se rastvaraju dodavanjem 100 µL dimetilsulfoksida (DMSO) po bunaru. Apsorbancija se meri na 570 nm, uz prethodno mešanje.

### 3.2.4. Test aktivnosti laktat dehidrogenaze

Test aktivnosti LDH se zasniva na činjenici da, u okolnostima narušavanja integriteta ćelijske membrane, solubilni citosolni enzim laktat dehidrogenaza (LDH) prelazi u ćelijski medijum. Laktat dehidrogenaza je eksprimirana u gotovo svim tipovima ćelija i stabilna je u ćelijskom medijumu, što omogućava merenje aktivnosti ovog enzima. Laktat dehidrogenaza katalizuje oksidaciju laktata do piruvata, pri čemu se NAD<sup>+</sup> redukuje do NADH+H<sup>+</sup>. U sledećoj reakciji, NADH uz pomoć prenosioca elektrona fenazin metosulfata, redukuje p-jodo-nitrotetrazolijum hlorid (INT) do obojenog formazana, čija se apsorbancija meri [202].

Nakon isteka tretmana, u 6 bunara sa netretiranim ćelijama dodaje se Triton X-100 (3% od ukupne zapremine) i inkubira se 5 minuta na sobnoj temperaturi, dok ne dođe do lize ćelija. Po 100 µL supernatanta ćelijske kulture (ćelijskog medijuma) iz svakog bunara prebacuje se u novu ploču sa 96 bunara, a zatim se dodaje po 100 µL supstrata (54 mM L-laktat, 0,28 mM fenazin metosulfat, 0,66 mM p-jodo-nitrotetrazolijum hlorid i 1,3 mM nikotinamid adenin dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) u 0,2 M Tris pH 8,2). Nakon 10 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, meri se apsorbancija na talasnoj dužini od 530 nm sa referentnom talasnom dužinom od 650 nm. Merenje se ponavlja u razmaku od 5 minuta, sve dok se ne utvrdi da nema porasta apsorbancije između merenja. Rezultat testa se izražava kao procenat citotoksičnosti u odnosu na ćelije lizirane pomoću deterdženta Triton X-100 (pozitivna kontrola, 100% mrtve). Procenat citotoksičnosti se izračunava po formuli:

$$\%C = \frac{T - NK}{PK - NK} \cdot 100$$

C - citotoksičnost (broj ćelija sa narušenim integritetom ćelijske membrane)

T - apsorbancija tretiranih ćelija

NK - negativna kontrola, apsorbancija netretiranih ćelija

PK - pozitivna kontrola, apsorbancija mrtvih ćelija liziranih pomoću Triton X-100

### 3.2.5. Određivanje indeksa proliferacije

Za određivanje indeksa proliferacije ćelije su postavljene u 5 ploča sa 6 bunara, u gustini od 10.000 ćelija po bunaru. Nakon 24 h, ćelije su tripsinizacijom podignute iz jedne od ploča, obojene tripan plavim i prebrojane u hemocitometru po Neubauer-u, i ovaj broj je uzet kao



početni broj ćelija. Ostale ploče su tretirane 24 h nakon postavljanja. Svakog od narednih dana, ćelije iz jedne od ploča su prebrojavane, a medijum i tretman su menjani svakog drugog dana. Indeks proliferacije računat je po formuli [203]:

$$IP = \left( \log_2 \frac{N3}{N0} \right) / 3$$

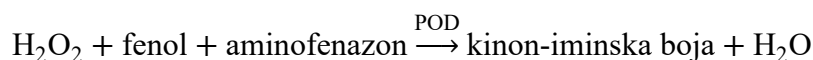
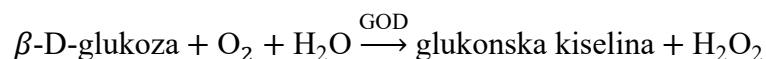
IP - indeks proliferacije - broj dupliranja ukupnog broja ćelija po danu

N3 - broj ćelija 3. dana

N0 - broj ćelija nultog dana

### 3.3. Ispitivanje unosa glukoze u ćelije

Koncentracija glukoze u ćelijskom medijumu merena je kao indirektni indikator unosa glukoze u ćelije. Koncentracija glukoze merena je spektrofotometrijski, korišćenjem eseja Glucose-TR. Dodavanje reagensa dovodi do oksidacije glukoze od strane glukozo oksidaze, pri čemu nastaje vodonik peroksid. Vodonik peroksid u prisustvu peroksidaze reaguje sa hromogenim akceptorom kiseonika, fenol aminofenazonom, što dovodi do razvijanja boje, a merena apsorbancija je proporcionalna koncentraciji glukoze u uzorku.



Ovaj enzimski esej predviđen je za merenje koncentracije glukoze u serumu ili plazmi. Da bismo potvrdili da je moguće koristiti ga za merenje glukoze u ćelijskom medijumu, izmerene su koncentracije glukoze u svežem medijumu, koji nije prethodno bio u ćelijskoj kulturi. Izmerene vrednosti poklapale su se sa onima koje navodi proizvođač. Radi optimizacije, upoređeni su rezultati merenja na spektrofotometru sa kivetom i na automatskom čitaču za ploče. Kako nije bilo većih odstupanja u vrednostima opredelili smo se za merenje u ploči sa 96 bunara.

Ćelije su postavljene u ploče sa 6 bunara, a svaki uzorak je postavljen u duplikatu. Radni reagens dobija se rekonstituisanjem mešavine enzima i hromogenog agensa (15.000 U/L glukozo oksidaza, 1000 U/L peroksidaza, 2,6 mM 4-aminofenazon) u puferu (0,3 mM fenol u 92 mM Tris puferu pH 7,4). U obeleženu ploču sa 96 bunara sipano je 200  $\mu\text{L}$  radnog reagensa po bunaru, a zatim je dodato po 2  $\mu\text{L}$  ćelijskog medijuma iz bunara sa prethodno tretiranim ćelijama. Kao standard je korišćen rastvor glukoze poznate koncentracije (100 mg/dL glukoza u  $\text{H}_2\text{O}$ ). Nakon mešanja, ploča je inkubirana 10 minuta na 37 °C, a apsorbancija je merena na talasnoj dužini od 492 nm korišćenjem spektrofotometrijskog čitača za ploče sa 96 bunara. Sva merenja obavljena su u tehničkom duplikatu, a za dalju analizu su korišćene srednje vrednosti. Koncentracija glukoze u uzorcima izračunata je po formuli:

$$C_G \left[ \frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right] = \frac{A_U - A_B}{A_S - A_B} \cdot C_S$$

C<sub>G</sub> - koncentracija glukoze  
C<sub>S</sub> - koncentracija standarda (100 mg/mL)  
A<sub>U</sub> - apsorbancija uzorka  
A<sub>B</sub> - apsorbancija slepe probe  
A<sub>S</sub> - apsorbancija standarda

Molarna koncentracija glukoze dobija se množenjem koncentracije faktorom konverzije:

$$C[\text{mg/dL}] \cdot 0,055 = C[\text{mmol/L}]$$

### 3.4. Mitohondrijska respiracija

Mitohondrijska respiratorna funkcija je merena respirometrijom visoke rezolucije. Merenjem koncentracije kiseonika u zatvorenoj komori kiseoničnom elektrodom Klarkovog tipa i izračunavanjem promene koncentracije u jedinici vremena kvantifikuje se potrošnja kiseonika od strane biološkog uzorka tj. stopa respiracije. Stopa respiracije izražava se kao fluks kiseonika po jedinici zapremine (eng. *O<sub>2</sub> flux per volume*) [pmol/s·mL], a unošenjem broja ćelija po komori aparata u softver, respiracija se može normalizovati u odnosu na broj ćelija, te se izražava kao protok kiseonika po pojedinačnoj ćeliji (eng. *O<sub>2</sub> flow per cell*) [amol/s·cell]. Mitohondrijska respiracija analizirana je primenom nekoliko različitih protokola titracija (eng. *substrate-uncoupler-inhibitor titration - SUIT protocol*) u zavisnosti od eksperimentalnog pitanja.

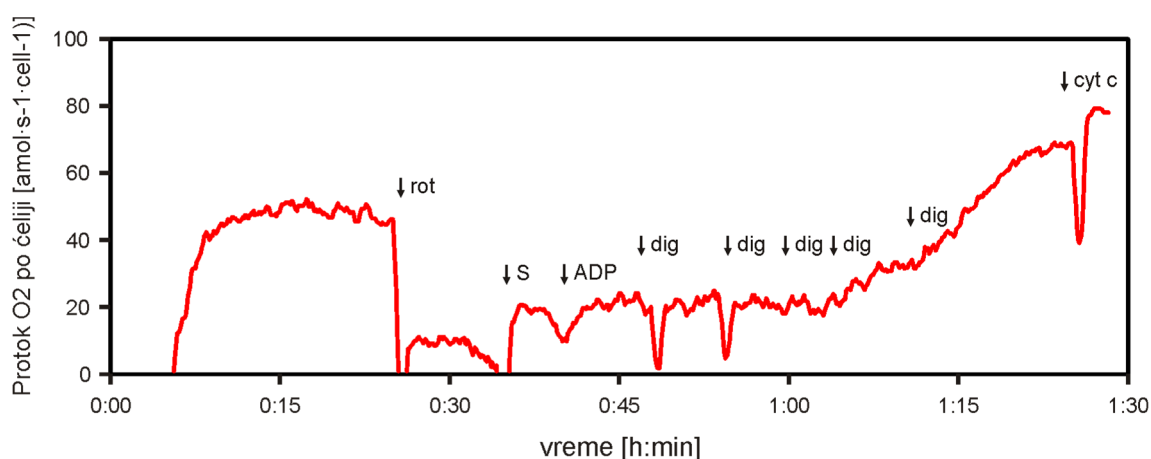
Nakon isteka tretmana, ćelije su tripsinizovane i resuspendovane u mitohondrijskom respiratornom medijumu - MiR05 (0,5 mM EGTA (etilen glikol-bis (2-aminoetiletar)-N,N,N',N'- tetrasirćetna kiselina), 3 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 60 mM laktobionska kiselina, 20 mM taurin, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM HEPES, 110 mM D-saharoza, 1 g/l BSA (albumin seruma govečeta), pH 7,1), i merenje je izvođeno u istom medijumu. Temperatura unutar komore je u svim merenjima bila 37 °C, a brzina magnetnih mešalica u komorama 750 rpm. Koncentracija kiseonika unutar komora održavana je u opsegu 50-200 μM, uz reoksigenaciju otvaranjem poklopca komore ukoliko je koncentracija O<sub>2</sub> bila blizu donje granice U toku svakog eksperimenta dodavanjem citohroma c (10 μM) proveravan je integritet mitohondrijskih membrana. Ukoliko je spoljašnja mitohondrijska membrana intaktna, citohrom c ne ulazi u mitohondrije i respiracija ostaje nepromenjena. Ukoliko je povećanje respiracije nakon dodavanja citohroma c bilo veće od 20% eksperimenti su isključeni iz finalne analize. Merenje i analiza sirovih podataka rađeni su u softveru DatLab (verzije 6 i 7). Po preporukama proizvođača, kalibracija instrumenta je rađena svakog dana pre eksperimenta, a jednom u 3 meseca rađena je kalibracija pozadinskog šuma (eng. *background calibration*), uz zamenu zaštitnih membrana i čišćenje senzora svakih 6 meseci.

#### 3.4.1. Optimizacija broja ćelija i koncentracije digitonina

Optimalan broj ćelija po komori instrumenta zavisi od tipa ćelija, i utvrđuje se pre započinjanja eksperimenata, merenjem respiracije za različite koncentracije ćelija. Optimalna ROUTINE respiracija treba da bude viša od 20 pmol/s·mL, a maksimalna merena respiracija

do 300 pmol/s·mL [204]. Utvrđen je optimalan broj od 500.000 ćelija po komori za C2C12 ćelijsku liniju, i ovaj broj ćelija korišćen je u svim eksperimentima.

Digitonin je blagi deterdžent koji selektivno deluje na holesterol, te je pogodan za permeabilizaciju ćelijske membrane, usled visokog udela holesterola u njenom sastavu, dok mitohondrijske membrane, koje sadrže manji udeo holesterola, pri istoj koncentraciji digitonina ostaju intaktne [205]. Permeabilizacija ćelijske membrane dovodi do oslobađanja citosolnog sadržaja u okolni rastvor, što dovodi do razblaživanja unutarćelijskih energetskih supstrata do zanemarljivo male koncentracije. Na ovaj način egzogeno dodati supstrati, čiji ulazak u permeabilizovane ćelije nije ograničen transportom preko ćelijske membrane, već je omogućena njihova slobodna difuzija do mitohondrija, predstavljaju jedini izvor energetskih supstrata, a njihova koncentracija kao i trenutak dodavanja određeni su protokolom za respirometriju. Optimalna koncentracija digitonina za određenu vrstu ćelijskog uzorka određuje se pomoću respirometrijskog protokola (SUIT-010 O2 ce-pce D008, Oroboros) [206] pre započinjanja eksperimenata. Nakon dodavanja ćelija u komoru, registruje se respiracija bazirana na endogenim supstratima (ROUTINE). Dodavanjem rotenona, specifičnog inhibitora kompleksa I, respiracija se smanjuje, nakon čega se dodaju sukcinat (supstrat kompleksa II) i ADP (supstrat ATP sintaze, čije dodavanje omogućava odigravanje oksidativne fosforilacije). Ćelijska membrana je potpuno nepermeabilna za sukcinat, tako da ova titracija neće dovesti do povećanja respiracije ukoliko su ćelijske membrane intaktne. Zatim se digitonin titrira u koracima od po 1 µg, i prati se povećanje respiracije do dostizanja platoa, što ukazuje na potpunu permeabilizaciju. U ovom trenutku, intaktnost mitohondrijskih membrana proverava se dodavanjem citohroma c, što će dovesti do povećanja respiracije ukoliko su mitohondrijske membrane permeabilizovane prevelikom koncentracijom digitonina. Za C2C12 ćelijsku liniju utvrđena je optimalna koncentracija digitonina od 10 µg/milion ćelija, i ova koncentracija korišćena je u svim eksperimentima na permeabilizovanim ćelijama.



**Shema 5. Prikaz protokola za optimizaciju koncentracije digitonina.** Rot-rotenon, S- sukcinat, dig - digitonin, cyt c - citohrom c.

### 3.4.2. Uticaj metformina na mitohondrijsku respiraciju permeabilizovanih ćelija

Ćelije su metforminom tretirane u kulturi u trajanju od 24 h, a korišćene su koncentracije 50  $\mu$ M, 250  $\mu$ M, 1 mM, 5 mM. Takođe, merena je mitohondrijska respiracija ćelija tretiranih kratkotrajno - dodavanjem metformina direktno u komoru oksigrafa. Metformin je u ovom slučaju dodavan nakon dodavanja ćelija u komoru i uspostavljanja stabilne ROUTINE respiracije, a finalne koncentracije u komori bile su 50  $\mu$ M i 5 mM.

Mitohondrijska respiracija analizirana je SUIIT protokolom za permeabilizovane ćelije: digitonin (10  $\mu$ g/milion ćelija), piruvat (5 mM), malat (2 mM), glutamat (10 mM), ADP (2,5 mM) + MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), rotenon (0,5  $\mu$ M), sukcinat (10 mM), antimicin a (2,5  $\mu$ M). ROUTINE respiracija intaktnih ćelija, koja se zasniva na oksidaciji endogenih supstrata, registruje se pre dodavanja digitonina. Nakon permeabilizacije digitoninom, dodavanjem supstrata za kompleks I (NADH-vezanih supstrata) piruvata, malata i glutamata, postiže se LEAK respiracija, koja predstavlja aktivnost respiratornog lanca koja nadomešćuje za „curenje” protona niz gradijent koncentracije, mimo ATP sintaze (u odsustvu ADP-a). Kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za kompleks I (OXPHOS CI) meri se nakon dodavanja ADP-a (supstrat ATP sintaze), u prisustvu jona magnezijuma koji omogućava optimalno funkcionisanje ATP sintaze. Dodavanjem specifičnog inhibitora kompleksa I - rotenona, i supstrata za kompleks II - sukcinata, može se izmeriti kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za kompleks II (OXPHOS CII), a dodavanjem inhibitora kompleksa III (antimicin A) dobija se ROX - rezidualna potrošnja kiseonika, u stanju kada je respiratorni lanac neaktivan. Finalni rezultati dobijeni su oduzimanjem vrednosti ROX od vrednosti respiracije u svim ostalim respiratornim stanjima.

### 3.4.3. Uticaj dugotrajnog tretmana metforminom (5 dana) na mitohondrijsku respiraciju permeabilizovanih ćelija

Radi utvrđivanja efekata dugotrajnijeg tretmana terapijskom koncentracijom metformina, diferencirane i nediferencirane ćelije tretirane su metforminom koncentracije 50  $\mu$ M u trajanju od 5 dana. Za diferencirane ćelije, tretman je počinjao nultog dana diferencijacije, tj. dodavan je zajedno sa prvom zamenom medijuma u medijum za diferencijaciju, a zatim su medijum i tretman menjani svakog drugog dana (D0, D2, D4). Za eksperimente na nediferenciranim ćelijama, ćelije su presejavane svakog drugog dana, da bi se sprečilo dostizanje konfluentnosti i održao proliferativni kapacitet ćelija. Pri presejavanju je dodavan i svež tretman.

Mitohondrijska respiracija analizirana je SUIIT protokolom za permeabilizovane ćelije (SUIIT-003 O2 ce-pce D020, Oroboros) [207]: digitonin (10  $\mu$ g/milion ćelija), piruvat (5 mM), malat (2 mM), glutamat (10 mM), ADP (2,5 mM) + MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), sukcinat (10 mM), rotenon (0,5  $\mu$ M), antimicin a (2,5  $\mu$ M), askorbat (0,5 mM) i TMPD (2 mM), azid (100 mM). Ovo je omogućilo kvantifikovanje respiratornih stanja ROUTINE - respiracije intaktnih ćelija, LEAK respiracije, kapaciteta oksidativne fosforilacije vezanog za kompleks I (OXPHOS CI) (nakon dodavanja ADP-a), kapaciteta oksidativne fosforilacije konvergirajućih puteva kompleksa I i II (OXPHOS CI+II) (nakon dodavanja supstrata kompleksa II - sukcinata), i kapaciteta oksidativne fosforilacije vezanog za kompleks II (OXPHOS CII) (nakon inhibicije kompleksa I rotenonom). Nakon toga, dodavanjem inhibitora kompleksa III meri se ROX, čija se vrednost oduzima od drugih respiratornih stanja. Aktivnost kompleksa IV (CIV) meri se dodavanjem sintetičkog supstrata citohrom c oksidaze, TMPD (N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamin dihidrohlorid). Zbog visoke stope autooksidacije TMPD, uz njega se dodaje i antioksidativni agens askorbat,

koji smanjuje autooksidaciju, te omogućava prenos elektrona sa TMPD na kompleks IV. Nakon dodavanja specifičnog inhibitora kompleksa IV - Na-azida, stopa respiracije ostaje relativno visoka, usled autooksidacije supstrata, što se naziva hemijskim pozadinskim šumom, te se finalna vrednost aktivnosti CIV dobija oduzimanjem vrednosti respiracije nakon dodavanja Na-azida.

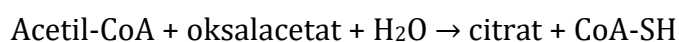
#### 3.4.4. Uticaj metformina na mitohondrijsku respiraciju intaktnih ćelija

Ćelije su u kulturi tretirane metforminom koncentracije 50  $\mu$ M i 5 mM u trajanju od 24 h. Mitohondrijska respiracija analizirana je SUIIT protokolom za intaktne ćelije (SUIIT-003 O2 ce-pce D020, Oroboros) [207]: piruvat (5 mM), glukoza (25 mM), oligomicin (2,5  $\mu$ M), CCCP (titracija po 1  $\mu$ L do uspostavljanja platoa, oko 2  $\mu$ M), rotenon (0,5  $\mu$ M), sukcinat (10 mM), digitonin (10  $\mu$ g/milijon ćelija), antimicin a (2,5  $\mu$ M), askorbat (0,5 mM) i TMPD (2 mM), azid (100 mM). Respiratorna stanja merena i prezentovana za eksperimente na intaktnim ćelijama su ROUTINE - respiracija intaktnih ćelija, LEAK - respiracija u prisustvu inhibitora ATP sintaze oligomicina, ET - kapacitet za transport elektrona (eng. *electron transfer capacity*) koji predstavlja respiraciju u prisustvu dekuplujućeg agensa, na primer karbonil cijanid m-hlorofenil hidrazona (eng. *carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone* - CCCP), ROX - rezidualna potrošnja kiseonika (nakon inhibicije respiratornog lanca antimicinom A), kao i aktivnost kompleksa IV (CIV), koja se dobija dodavanjem TMPD i askorbata. Finalni rezultati dobijeni su oduzimanjem vrednosti ROX od svih vrednosti, osim aktivnosti kompleksa IV koja se izračunava oduzimanjem vrednosti posle dodavanja Na-azida od vrednosti respiracije posle dodavanja TMPD-a. Takođe su računati indeksi 1-L/E, 1-R/E, (R-L)/E (L - LEAK, E - ET, R - ROUTINE), koji predstavljaju nivo spregnutosti sistema za fosforilaciju i sistema za transport elektrona, tj. ilustruju u kojoj je meri energija dobijena transportom elektrona efikasno iskorišćen za sintezu ATP-a [204].

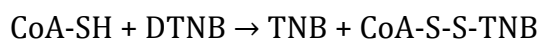
#### 3.4.5. Normalizacija respiracije na količinu mitohondrija

Za normalizaciju respiracije, pored broja ćelija, može se koristiti i aktivnost citrat sintaze. Citrat sintaza je enzim mitohondrijskog matriksa, čija ekspresija i aktivnost su konstantne za određeni tip tkiva ili ćelija, te se koristi kao marker enzim za kvantifikaciju mitohondrijskog sadržaja. Aktivnost citrat sintaze merena je spektrofotometrijski, prema protokolu [208], modifikovanom za ploču sa 96 bunara.

Merenje aktivnosti citrat sintaze zasniva se na dve reakcije - prva je reakcija koju katalizuje citrat sintaza, u kojoj acetil-CoA i oksalacetat reaguju i daju citrat (inicijalna reakcija Krebsovog ciklusa):



Tiolna grupa dobijenog CoA-SH reaguje sa DTNB (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoična kiselina)) i nastaje TNB:



Proizvod reakcije TNB (tionitrobenzoična kiselina) je obojena supstanca sa pikom apsorpcije na 412 nm. Apsorbancija se linearno povećava u toku vremena, dostižući 0,6 - 0,8 jedinica u toku 200 sekundi merenja.

Pri pripremanju uzorka za respiometriju, mala zapremina ćelijske suspenzije odvajana je za analizu aktivnosti citrat sintaze. Uzorci (200  $\mu\text{L}$  ćelijske suspenzije gustine  $1-2 \times 10^6$  ćelija/mL) su zamrzavani potapanjem u tečni azot, i nakon toga čuvani na  $-80^\circ\text{C}$  do upotrebe. U bunare mikrotitarske ploče sipa se prethodno pripremljena reakciona smeša (0,1 mM DTNB, 0,3 mM acetyl-CoA, 0,25% Triton X-100 u  $\text{H}_2\text{O}$ ) u koju se dodaju uzorci (20  $\mu\text{L}$  u ukupnu zapreminu u bunaru od 200  $\mu\text{L}$ ) u duplikatu. Pri svakom merenju korišćen je standard citrat sintaze, radi provere reagenasa i uslova reakcije. Standard je pripriman svež, razblaživanjem enzima citrat sintaze u 0,1 M Tris-HCl, pH 7,0, do finalne koncentracije od 0,01 i 0,03 U/mL. Merenje kinetike reakcije obavlja se merenjem promene apsorbcije na 412 nm, u trajanju od 120 s, sa trajanjem intervala između merenja od 10 s. Prvo merenje vrši se bez supstrata (oksalacetat) i služi za određivanje početnog nivoa enzimske aktivnosti (ova vrednost oduzima se od vrednosti drugog merenja da bi se dobila vrednost  $dA/dt$ ), a zatim se u bunare dodaje oksalacetat (0,5 mM) nakon čega se ponavlja merenje. Specifična aktivnost enzima citrat sintaze ( $v$ ) izražena po milionu ćelija [ $\text{IU}/10^6$  ćelija] izračunava se po formuli:

$$v = \frac{dA/dt}{l\epsilon_B} \times \frac{V_1}{V_2\rho}$$

$dA/dt$  - promena apsorbcije u jedinici vremena [ $\text{min}^{-1}$ ]

$l$  - dužina optičkog puta (= 0,552 cm)

$\epsilon_B$  - ekstinkcioni koeficijent TNB za datu talasnu dužinu i pH (=  $13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

$V_1$  - ukupna zapremina rastvora u bunaru (= 0,2 mL)

$V_2$  - zapremina uzorka (= 0,02 mL)

$\rho$  - gustina ćelija [ $10^6 \text{ cm}^{-3}$ ]

### 3.5. Određivanje energetskog statusa ćelija

Odnos ADP/ATP određivan je iz uzoraka ćelija upotrebom komercijalno dostupnog kita, po uputstvima proizvođača. Merenje koncentracije ATP-a vršeno je luminometrijom - merenjem svetlosti oslobođene pri reakciji ATP-a sa D-luciferinom, koji u prisustvu enzima luciferaze prelazi u oksiluciferin, uz oslobađanje fotona svetlosti.



Ćelije su postavljene u bele neprovidne ploče sa 96 bunara (3.000 ćelija po bunaru) i 24 h kasnije tretirane. Ćelije koje su tretirane metforminom u trajanju od 5 dana gajene su prethodno u petri šoljama sa dodatkom metformina (svež tretman i medijum dodavani su svaki drugi dan), a postavljene su zajedno sa ostalim ćelijama u ploču sa 96 bunara trećeg dana tretmana. Nakon isteka tretmana, ćelijski medijum je prosut iz bunara, i dodato je 90  $\mu\text{L}$  prethodno pripremljenog ATP reagensa u svaki bunar. Deterdžent iz reakcionog pufera dovodi do lize ćelija i prelaska molekula ATP i ADP iz citosola u rastvor. U prisustvu luciferaze, ATP reaguje sa luciferinom i dolazi do otpuštanja svetlosti. Nakon inkubacije u trajanju od 1 min na sobnoj temperaturi, meri se intenzitet svetlosti, i dobijena vrednost označava se kao  $\text{RLU}_A$  (relativne jedinice svetlosti; eng. *relative light units* - RLU). Intenzitet svetlosti izmeren

luminometrijom predstavlja direktnu meru koncentracije unutarćelijskog ATP-a. Nakon inkubacije od 10 minuta na sobnoj temperaturi, merenje se ponavlja, i dobija se vrednost  $RLU_B$  koja predstavlja rezidualni ATP signal. Zatim se u bunare dodaje po 5  $\mu$ L prethodno pripremljenog ADP reagensa, što dovodi do enzimske konverzije ADP-a u ATP, nakon čega se merenjem intenziteta svetlosti dobija ukupna koncentracija ATP-a i ADP-a u uzorku -  $RLU_C$ . Merenje luminescencije rađeno je na aparatu BioTek Synergy H1. Odnos ADP/ATP izračunat je na osnovu formule:

$$ADP/ATP = RLU_C - \frac{RLU_B}{RLU_A}$$

### 3.6. Određivanje redoks statusa ćelija

Odnos NAD/NADH u uzorcima ćelija određen je upotrebom komercijalno dostupnog kolorimetrijskog kita, po uputstvima proizvođača. Po isteku tretmana, ćelije su podignute tripsinom i prebrojane. Izračunata je zapremina ćelijske suspenzije koja sadrži 500.000 ćelija i ova zapremina je prebačena u nove epruvete koje su zatim centrifugirane (500 g, 5 min, 22 °C). Supernatant je odliven, a preko ćelijskog taloga sipano je po 400  $\mu$ L pufera za ekstrakciju i dobro promešano vorteksovanjem. Ćelijski sadržaj je ekstrahovan putem 2 ciklusa zamrzavanja (20 min na -80 °C) i topljenja (10 min na sobnoj temperaturi), uz povremeno mešanje na vorteksu. Nakon ovoga uzorci su centrifugirani (13.000 g, 10 min, 22 °C), čime se nerastvorne komponente izdvajaju u talog, a supernatanti su prebačeni u nove epruvete. Uzorci su zatim deproteinizovani centrifugiranjem kroz filtere na 14.000 g, 20 min na 4 °C. Polovina od ukupne zapremine prebačena je u nove epruvete koje su inkubirane 30 min na 60 °C u vodenom kupatilu, radi degradacije NAD-a.

U ploču sa 96 bunara sipano je 50  $\mu$ L uzorka po bunaru, u duplikatu, a zatim po 100  $\mu$ L reakcionog reagensa. Sadržaj ploča je promešan i inkubiran 5 minuta na sobnoj temperaturi, što dovodi do konverzije NAD u NADH. U bunare je sipano po 10  $\mu$ L rastvora za razvijanje boje i uzorci su inkubirani 90 min na sobnoj temperaturi. Nakon isteka inkubacije, u bunare je dodato po 10  $\mu$ L rastvora za zaustavljanje reakcije i apsorbancija na 450 nm izmerena na čitaču za ploče sa 96 bunara. Apsorbancija standarda (rastvor NADH poznatih koncentracija: 0, 20, 40, 60, 80, 100 pM) merena je na isti način, i ovo je korišćeno za konstruisanje standardne krive, na osnovu koje se izračunavaju koncentracije NADH u uzorcima. Pod uticajem enzima iz reagensa NAD iz uzorka pretvara se u NADH, čija se apsorbancija meri, te se iz uzoraka koji nisu zagrevani dobija koncentracija ukupnog NAD-a (NAD+NADH - NAD total). U polovini uzoraka NAD je razgrađen visokom temperaturom, te se u njima dobija koncentracija NADH. Odnos NAD/NADH dobija se računanjem po formuli:

$$NAD/NADH = \frac{NAD_{total} - NADH}{NADH}$$

### **3.7. Ispitivanje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta, mitohondrijskog membranskog potencijala i sadržaja mitohondrija protočnom citofluorimetrijom**

Za merenje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *reactive oxygen species* – ROS) korišćene su neselektivna redoks-senzitivna boja dihidrorodamin (DHR) i boja specifična za produkciju superoksid anjon radikala dihidroetidijum (DHE). Fluorescencija ovih boja registruje se kao zelena (FL1) za DHR i crvena (FL2) za DHE, a povećanje intenziteta fluorescencije označava povećanje produkcije slobodnih kiseoničnih radikala. Za merenje depolarizacije mitohondrija korišćena je lipofilna katjonska boja JC-1. Ova boja u obliku monomera emituje zelenu fluorescenciju (FL1), a u slučaju normalnog mitohondrijskog membranskog potencijala dolazi do nakupljanja boje u negativno naelektrisanom matriksu i do formiranja agregata koji emituju crvenu fluorescenciju (FL2). Promena mitohondrijskog membranskog potencijala prati se kao promenu odnosa FL1/FL2, a porast ovog odnosa ukazuje na depolarizaciju. Za kvantifikaciju mitohondrija u ćelijama korišćena je boja *MitoTracker Red CMXRos*, koja ulazi u polarizovane mitohondrije, vezuje se za njih i fluorescira u crvenom delu spektra, što se detektuje na kanalu FL2. Povećanje intenziteta fluorescencije ukazuje na povećan sadržaj (broj i zapreminu) aktivnih mitohondrija (eng. *mitochondrial content*).

Ćelije su nakon isteka tretmana podignute tripsinom, a nakon blokiranja ćelijskim medijumom, suspenzije su prebačene u obeležene epruvete za citometriju. Ćelije su centrifugirane (500 g, 5 min, 22 °C), supernatant odliven i ćelijski talog resuspendovan u rastvoru boja u ćelijskom medijumu (1 μM DHR, 10 μM DHE, 100 nM *MitoTracker Red*) ili adekvatnom puferu (2 μM JC-1 rastvoren u reakcionom puferu). Nakon inkubacije (30 min, 37 °C), ćelije su 2 puta oprane (resuspendovane u 1 mL PBS-a vorteksovanjem i centrifugirane na 500 g, 5 min, 22 °C) i nakon poslednje centrifuge resuspendovane u 300 μL PBS-a. Intenzitet fluorescencije meren je protočnom citofluorimetrijom. Praćena je veličina i morfologija ćelija putem *front scatter* i *side scatter* merenja, a na *dot-plot* grafiku se izdvaja uniformna populacija živih ćelija koja se obeležava, te su analizirane samo ćelije unutar te populacije. Za detekciju i obradu rezultata korišćen je kompjuterski program *CellQuest Pro Software*. Svi uzorci su rađeni u tehničkom duplikatu, a za svaki uzorak je detektovano 10.000 događaja (ćelija). Kao mera intenziteta fluorescencije korišćena je vrednost geometrijske sredine svih detektovanih događaja, a u finalnoj obradi rezultata predstavljena je relativna promena intenziteta fluorescencije uzoraka u odnosu na negativnu kontrolu (netretirane ćelije), čija je vrednost arbitrarno postavljena na jediničnu.

### **3.8. Ispitivanje morfologije i sadržaja mitohondrija konfokalnom mikroskopijom**

Za ispitivanje morfologije i sadržaja mitohondrija u ćelijama C2C12 tretiranim metforminom, korišćena je konfokalna mikroskopija. Za pripremu uzoraka za konfokalnu mikroskopiju, ćelije su postavljene u ploče sa 24 bunara (15.000 ćelija po bunaru), u koje su prethodno postavljena pokrovnostakla za gajenje adherentnih ćelija. Nakon isteka tretmana, iz bunara je uklonjen ćelijski medijum i sipano po 300 μL rastvora fluorescentne boje *MitoTracker Red CMXRos* (100 nM u ćelijskom medijumu). Ploče su inkubirane 15 minuta na 37 °C, nakon čega se bunari ispiraju - prvi put medijumom za gajenje ćelija, i još 2 puta PBS-om. U bunare je zatim sipano po 300 μL 4% paraformaldehida, i ćelije su fiksirane 30 minuta



na sobnoj temperaturi. Bunari su 3 puta ispirani PBS-om, a pokrovna stakla sa fiksiranim ćelijama su izvađena iz bunara i fiksirana na predmetna stakla pomoću medijuma za pokrivanje pločica. Mikrografije za morfometrijsku analizu napravljene su korišćenjem konfokalnog mikroskopa, uz korišćenje laserske linije talasne dužine 543 nm (TRITC predpodešavanje lasera i detektora). Korišćen je  $\times 63$  objektiv, uz upotrebu  $\times 4$  digitalnog uveličanja (ukupno uveličanje  $\times 252$ ) na 10 vidnih polja (10 ćelija) po uzorku. Analiza je rađena u softveru *Fiji*, korišćenjem dodatka *Mitochondrial Analyzer* [209]. Na svakoj mikrografiji softverski je utvrđen broj mitohondrija kao i njihova ukupna površina po ćeliji, kao i srednja vrednost površine mitohondrije po ćeliji.

### 3.9. Ispitivanje aktivnost signalnih puteva

Aktivnost unutarćelijskih signalnih puteva PI3K/Akt i AMPK merena je metodom imunoblota, određivanjem količine proteina od interesa u ćelijskim lizatima. Imunoblot je semikvantitativna metoda, što znači da se količina proteina ne izražava apsolutnim jedinicama, već relativno, u odnosu na negativnu kontrolu - netretirane ćelije. Količina fosforilisane forme normalizovana je na ukupnu količinu istog proteina, da bi se isključio efekat tretmana na sintezu datog proteina i pratio samo uticaj na aktivaciju/inhibiciju putem kovalentne modifikacije. Takođe, svi proteini normalizovani su na količinu  $\beta$ -aktina u datom uzorku, što predstavlja internu kontrolu, zahvaljujući konstitutivnoj ekspresiji  $\beta$ -aktina na koju većina tretmana nema uticaj. Imunoblot podrazumeva nekoliko ključnih koraka, a to su: elektroforetsko razdvajanje proteina na gelu, transfer proteina sa gela na membranu, inkubacija membrane u primarnom i sekundarnom antitelu i vizualizacija proteina pomoću obeleženih antitela.

#### 3.9.1. Priprema uzoraka za imunoblot

Izolovanje ćelijskog sadržaja vrši se liziranjem ćelija. Nakon isteka tretmana, posude za gajenje ćelija stavljaju se na led, ćelijski medijum se uklanja aspiriranjem, a zatim se ćelije ispiraju 2 puta hladnim PBS-om. Nakon potpunog uklanjanja PBS-a, na ćelije se sipa pufer za liziranje (15 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA) sa dodatkom inhibitora proteaza i fosfataza (1% PMSF - fenilmetilsulfonilfluorid, 5% NaF, 1%  $\text{Na}_2\text{VO}_3$ , 2% PIC - koktel inhibitora proteaza i fosfataza, eng. *protease/phosphatase inhibitor cocktail*). Deterdžent NP-40 permeabilizuje ćelijske membrane i dovodi do oslobađanja ćelijskog sadržaja, a inhibitori proteaza i fosfataza omogućavaju prezervaciju strukture proteina kao i statusa fosforilacije zatečenog u trenutku liziranja. Ćelije se zatim mehanički skidaju sa površine suda grebalicom (eng. *scraper*), a pufer za liziranje sa ćelijskim sadržajem sakuplja se pipetom u mikrotube. Uzorci se inkubiraju na ledu 30 minuta, a zatim centrifugiraju na 14.000 *g*, 15 min, na 4 °C, i supernatanti se prebace u nove tube.

Ukupna koncentracija proteina u uzorku merena je metodom po Bradfordu [210]. Ova metoda bazira se na reakciji proteina iz uzorka sa bojom *Coomassie brilliant blue G-250*, koja se neselektivno vezuje za proteine, te menja boju iz crvene u plavu. Intenzitet boje meri se spektrofotometrijski i direktno je proporcionalan koncentraciji proteina u uzorku, a koncentracija proteina u svakom uzorku izračunava se na osnovu standardne krive.

Po 2 mL Bradfordovog reagensa (0,1 mg/mL *Coomassie Brilliant Blue G-250*, 5% etanol, 10%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  u vodi) sipa se u epruvete, a zatim se dodaje po 2  $\mu\text{L}$  uzorka (lizata ćelija). Uzorci za standardnu krivu dobijaju se korišćenjem albumina seruma govečeta (eng. *bovine serum*

*albumin* - BSA) poznate koncentracije (1 mg/mL), a razblaživanjem u reagensu dobijaju se koncentracije od 0 (slepa proba), 1, 2, 4, 6, 8, i 10 µg/mL. Uzorci se dobro promešaju vorteksovanjem, pre nalivanja u ploču sa 96 bunara (100 µL po bunaru u triplikatu) i apsorbancija se meri na 570 nm. Vrednosti apsorbancije za uzorke BSA poznate koncentracije koriste se za konstruisanje standardne krive na osnovu koje se računa koncentracija proteina u lizatima.

Finalna priprema uzoraka podrazumeva razblaživanje svih uzoraka do jednake koncentracije ukupnih proteina kao i denaturaciju proteina. Uzorci se razblažuju dodavanjem vode, kao i jednake zapremine redukujućeg pufera za pripremu uzoraka za elektroforezu (eng. *loading buffer*: 10% SDS, 50% glicerol, 10 mM 2-merkaptetanol, 0,01% bromfenol plavo, 312,5 mM Tris-HCl, pH 6,8). Glicerol u puferu povlači uzorak na dno bunara pri nalivanju na gel i sprečava difuziju uzorka van bunara, a bromfenol plava boja obeležava uzorak tako da je vidljiv golim okom i može se pratiti njegovo napredovanje kroz gel. Do denaturacije proteina dovodi anjonski deterdžent natrijum dodecil sulfat (eng. *sodium dodecil sulphate* - SDS). Polipeptidni lanac vezuje negativno naelektrisane molekule SDS-a proporcionalno svojoj relativnoj molekulskoj masi (1 molekul SDS-a vezuje se na svake 2 aminokiseline), tako da proteini zadobijaju uniformno negativno naelektrisanje, dok sopstveno naelektrisanje proteina biva maskirano. Zbog odbijanja negativnih naelektrisanja SDS-a proteini zadobijaju konformaciju štapa. Za potpunu denaturaciju proteina pored SDS-a, potreban je i β-merkaptetanol (redukujući agens koji raskida disulfidne veze u proteinima), kao i zagrevanje - uzorci se zagrevaju na 100 °C u vodenom kupatilu 5 minuta, nakon čega se mogu čuvati na -20 °C do upotrebe.

### **3.9.2. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu i transfer proteina sa gela na membranu**

Proteini su razdvajani elektroforezom na poliakrilamidnom gelu (eng. *polyacrylamide gel electrophoresis* - SDS-PAGE). SDS-PAGE omogućava razdvajanje proteina u električnom polju na osnovu veličine, budući da pri pripremi uzoraka proteini bivaju denaturisani (gube tercijernu i sekundarnu strukturu), a odnos masa/naelektrisanje svih proteina postaje isti zbog uniformnog negativnog naelektrisanja koje im daje vezani SDS. U zavisnosti od molekulske mase ispitivanih proteina, korišćeni su gelovi od 8 ili 10% akrilamida, a veličine pora gela proporcionalne su udelu poliakrilamida.

U smešu za gel za razdvajanje (10% akrilamid/0,34% bisakrilamid, 0,1% SDS, 375 mM Tris-HCl, pH 8,8) dodaju se 0,05 % amonijum persulfat (APS) i 0,03 % tetrametil etilendiamin (TEMED) koji katalizuju reakciju polimerizacije, te se ova smeša sipa u aparaturu i ostavi oko 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon što polimerizuje, preko gela za razdvajanje sipa se smeša gela za koncentrovanje (4% akrilamid/0,14% bisakrilamid, 0,1% SDS, 125 mM Tris-HCl, pH 6,8 sa dodatkom 0,05% APS i 0,033% TEMED) i odmah po sipanju u rastvor se uranja češalj za bunare. Kada gel polimerizuje, češalj se vadi, a gelovi se postavljaju u aparaturu za vertikalnu elektroforezu. Pufer za elektroforezu (192 mM glicin, 0,1% SDS, 25 mM Tris-HCl, pH 8,3) sipa se u anodne i katodne rezervoare. Uzorci se sipaju u bunare gela, tako da se u svakom bunaru nalazi ista količina ukupnih proteina (10-20 µg proteina/bunaru). U jedan od bunara se sipa marker, koji sadrži obojene proteine poznatih molekulskih masa, čije kretanje može da se prati i na osnovu kojih se lociraju ispitivani proteini poznate molekulske mase. Aparatura za vertikalnu elektroforezu stavlja se na 4°C i povezuje sa strujnim izvorom, koji se podešava na konstantni napon (100 V do ulaska uzoraka u gel za razdvajanje, kada se pojačava na 150 V).

Proteini su sa gela preneti na nitrocelulozne membrane procesom polusuvog elektrotransfera. Filter papiri i membrana natapaju se puferom za transfer (192 mM glicin, 20% metanol, 25 mM Tris-HCl, pH 8,3), a zatim se slaže sendvič za transfer, tako da se membrana nalazi bliže anodi, da bi negativno naelektrisani proteini, krećući se ka anodi, prešli iz gela na membranu. Strujni izvor podešava se na konstantnu jačinu struje (0,83 mA/cm<sup>2</sup> membrane). Nakon 90 minuta transfera, membrana se boji sa *Ponceau S*, kiselim bojom koja neselektivno boji proteine, da bi se proverila efikasnost transfera. Nakon bojenja membrane se ispiraju u PBS-u.

### 3.9.3. Vizualizacija proteina

Pre inkubacije sa antitelima, membrane su 30 minuta inkubirane u 10% rastvoru odmašćenog mleka u prahu u fiziološkom rastvoru puferovanom *Tris*-om, sa dodatkom *Tween*-a (eng. *Tris-buffered saline*, 0,05% *Tween* - TBS-T), da bi se izbeglo nespecifično vezivanje antitela za membranu. Membrane su inkubirane sa zečjim primarnim antitelima za proteine od interesa, rastvorenim u 5% rastvoru mleka u TBS-T preko noći, na 4 °C na mešalici. Korišćena su zečja primarna antitela: pAMPK Thr172, AMPK, pAkt Ser473, pAkt Thr308, Akt, pGSK3 $\beta$  Ser9, GSK3 $\beta$ , pACC Ser79, ACC i  $\beta$ -actin. Nakon ispiranja (3  $\times$  5 min u TBS-T), membrane su inkubirane 90 minuta na sobnoj temperaturi sa sekundarnim antitelom, koje je anti-zečje IgG, konjugovano sa peroksidazom rena. Sva antitela bila su razblažena u rastvoru odmašćenog mleka u prahu (5% u TBS-T), u odnosu koji preporučuje proizvođač. Hemiluminescentna vizualizacija je vršena korišćenjem rastvora luminola i kumarične kiseline (1,5 mM luminol, 0,2 mM kumarična kiselina, 100 mM Tris-HCl, pH 8,5) uz dodavanje vodonik peroksida (0,009%), na aparatu *ChemiDoc*. Intenzitet traka kvantifikovan je denzitometrijski, korišćenjem softvera *Image Lab*. Proteini od interesa normalizovani su na nivo  $\beta$ -aktina, a fosforilisane forme su dodatno normalizovane na ukupni nivo istog proteina. Rezultati su prikazani kao relativna promena u odnosu na negativnu kontrolu.

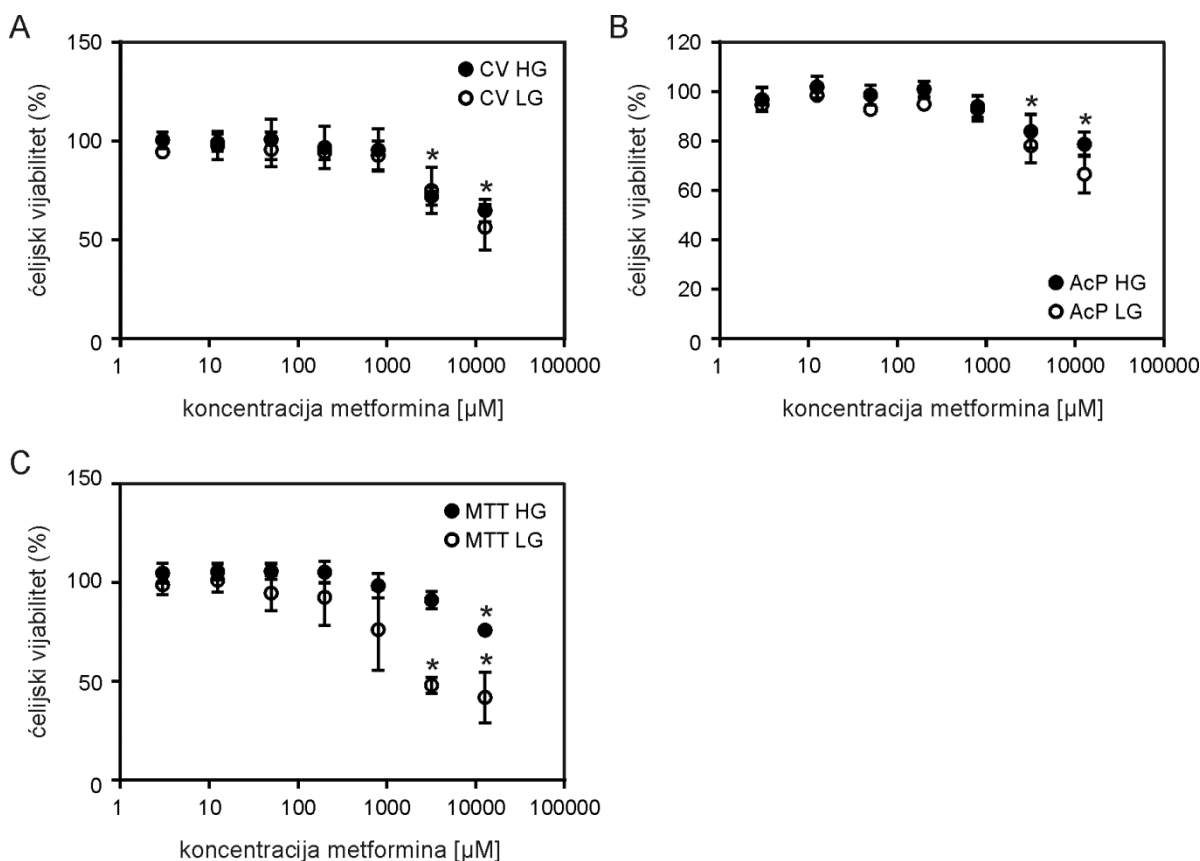
### 3.10. Statistička analiza podataka

Za jednofaktorsko poređenje dve grupe korišćen je studentov t-test, a za poređenje tri ili više grupa korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (*one way ANOVA*) ili dvofaktorska analiza varijanse (*two way ANOVA*). Nakon analize ANOVA rađen je post hoc test po Danetu (*Dunnett*) ili Bonferoniju (*Bonferroni*). p vrednost  $\leq 0.05$  uzimana je za statistički značajnu. Statistički testovi rađeni su u softveru *GraphPad Prism*, verzija 5.

# **4. REZULTATI**

## 4.1. Visoke koncentracije metformina dovode do smanjenja ćelijskog vijabiliteta

U cilju ispitivanja potencijalnog citotoksičnog efekta visokih koncentracija metformina na mišićne ćelije C2C12, ispitan je vijabilitet ćelija gajenih u medijumu sa visokom (eng. *high glucose* – HG) i niskom (eng. *low glucose* – LG) koncentracijom glukoze, nakon 24 h tretmana širokim opsegom koncentracija metformina (3; 12,5; 50; 200; 800; 3.200; 12.800  $\mu\text{M}$ ) upotrebom testova vijabiliteta kristal violet, test aktivnosti kisele fosfataze i MTT. Tretman koncentracijama metformina višim od 3 mM (3,2 i 12,8 mM) izazvao je smanjenje vijabiliteta ćelija gajenih u oba medijuma, što je mereno kristal violet testom kao i testom aktivnosti kisele fosfataze (slika 1A i 1B). Pri merenju MTT testom, samo najviša koncentracija metformina (12,8 mM) uzrokovala je smanjenje vijabiliteta ćelija gajenih u HG medijumu, za razliku od ćelija gajenih u LG medijumu, čiji je vijabilitet bio značajno smanjen pri tretmanima od 3,2 i 12,8 mM (slika 1C).

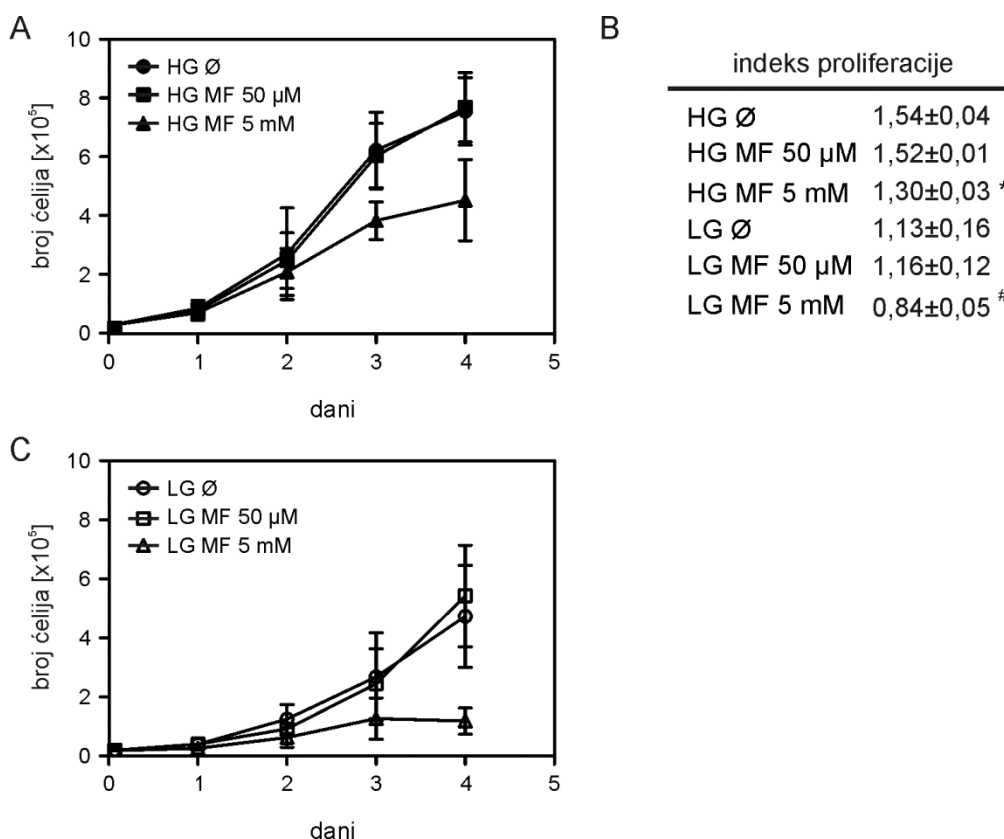


**Slika 1. Primena milimolarnih koncentracija metformina dovodi do smanjenja vijabiliteta C2C12 ćelija.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom (25 mM) i niskom (5,5 mM) koncentracijom glukoze, tretirane su širokim opsegom koncentracija metformina (3; 12,5; 50; 200; 800; 3.200; 12.800  $\mu\text{M}$ ) u trajanju od 24 h. Ćelijski vijabilitet je meren testovima kristal violet (A), testom aktivnosti kisele fosfataze (B) i MTT (C). Rezultati 3 nezavisna eksperimenta predstavljeni su kao srednja vrednost  $\pm$  SD, \* -  $p < 0,05$  u odnosu na odgovarajuću kontrolu (netretirane ćelije). Ćelijski vijabilitet izražen je u procentima, u odnosu na vijabilitet netretiranih ćelija (negativne kontrole) koji je izražen kao 100%. Koncentracije metformina su grafički izražene na logaritamskoj skali (x-osa,  $\log_{10}$ ). CV - kristal violet (eng. *crystal violet*), AcP - test aktivnosti kisele fosfataze (eng. *acid phosphatase assay*), HG - medijum sa visokom koncentracijom glukoze (eng. *high glucose*), LG - medijum sa niskom koncentracijom glukoze (eng. *low glucose*).

Integritet ćelijske membrane pri tretmanu istim koncentracijama metformina u trajanju od 24 h ispitan je testom aktivnosti laktat dehidrogenaze, čime je pokazano da ni jedna od ispitanih koncentracija metformina ne dovodi do narušavanja integriteta ćelijske membrane, što bi ukazivalo na ćelijsku smrt po tipu nekroze (rezultati nisu prikazani).

## 4.2. Suprafarmakološka koncentracija metformina dovodi do smanjene proliferacije ćelija

Odabrane koncentracije metformina, 50  $\mu$ M koja predstavlja koncentraciju ekvivalentnu terapijskoj i 5 mM koja predstavlja suprafarmakološku koncentraciju, dalje su ispitane u cilju utvrđivanja potencijalnog efekta na proliferaciju ćelija. Tretman metforminom terapijske koncentracije (50  $\mu$ M) nije doveo do promene indeksa proliferacije u odnosu na netretirane ćelije. Tretman suprafarmakološkom koncentracijom metformina (5 mM) doveo je do značajnog smanjenja indeksa proliferacije u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije), u ćelijama gajenim u oba ispitivana medijuma (sa niskom i visokom koncentracijom glukoze). Indeks proliferacije ćelija gajenih u LG medijumu bio je niži u odnosu na ćelije gajene u HG medijumu, nezavisno od tretmana (slika 2).

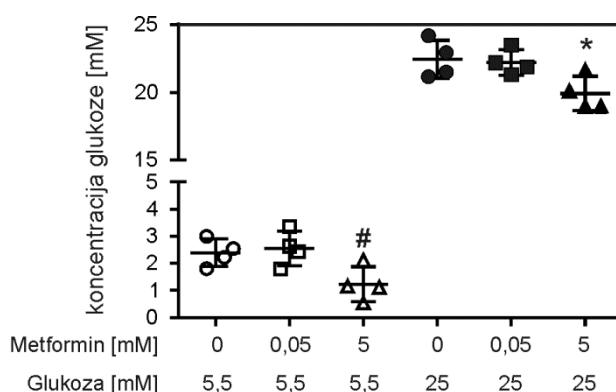


**Slika 2. Primena milimolarne koncentracije metformina dovodi do smanjenja indeksa proliferacije C2C12 ćelija.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom (25 mM) i niskom (5,5 mM) koncentracijom glukoze, tretirane su metforminom koncentracije 50  $\mu$ M ili 5 mM, u trajanju od 4 dana, a broj ćelija određivan je svakog dana te je konstruisana kriva rasta (A, B) i određeni su indeksi proliferacije (C) za svaki od ispitivanih tretmana. Rezultati 3 nezavisna eksperimenta predstavljeni su kao srednja vrednost  $\pm$  SD (A, B), \* -  $p < 0,05$  u odnosu na netretirane ćelije gajene u HG medijumu (25 mM), # -  $p < 0,05$  u odnosu na netretirane ćelije gajene u LG medijumu (5,5 mM). HG - medijum sa

visokom koncentracijom glukoze (eng. *high glucose*), LG - medijum sa niskom koncentracijom glukoze (eng. *low glucose*), MF - metformin.

### 4.3. Suprafarmakološka, ali ne i terapijska, koncentracija metformina dovodi do povećanog unosa glukoze u ćelije

Radi ispitivanja uticaja metformina na unos glukoze u ćelije merena je koncentracija glukoze u ćelijskom medijumu nakon tretmana metforminom (50  $\mu$ M, odnosno 5 mM) u trajanju od 24 h. Tretman suprafarmakološkom koncentracijom metformina (5 mM) doveo je do smanjenja koncentracije glukoze u medijumu, što ukazuje na povećan unos glukoze u ćelije. Isti efekat je uočen bilo da su ćelije gajene u medijumu sa visokom (HG) ili niskom koncentracijom glukoze (LG). Terapijska koncentracija metformina (50  $\mu$ M) nije izazvala promenu koncentracije glukoze u medijumu, u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije) (slika 3).



**Slika 3. Primena milimolarne koncentracije metformina dovodi do povećanog unosa glukoze u ćelije.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom (25 mM) i niskom (5,5 mM) koncentracijom glukoze, tretirane su metforminom u koncentraciji od 50  $\mu$ M ili 5 mM, u trajanju od 24 h. Koncentracija glukoze u ćelijskom medijumu merena je pomoću Glucose-TR eseja. Prikazani su rezultati 4 nezavisna eksperimenta, sa srednjom vrednošću  $\pm$  SD. \* -  $p < 0,05$  u odnosu na netretirane ćelije gajene u HG medijumu (25 mM), # -  $p < 0,05$  u odnosu na netretirane ćelije gajene u LG medijumu (5,5 mM).

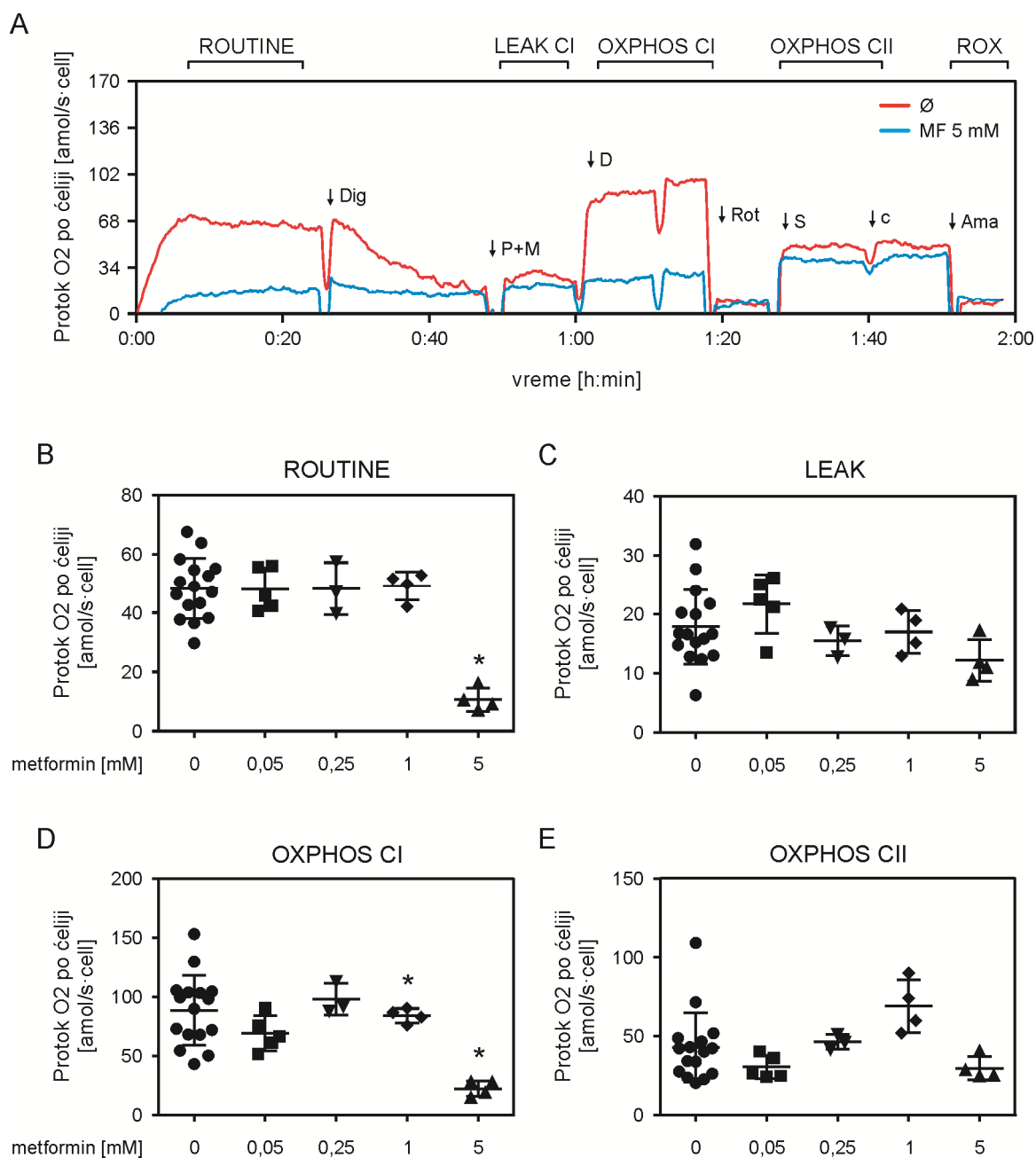
## **4.4. Uticaj metformina na respiratornu funkciju mitohondrija**

Jedan od ključnih pretpostavljenih molekularnih mehanizama dejstva metformina je inhibicija mitohondrijske respiracije, tj. funkcije kompleksa I respiratornog lanca. U cilju ispitivanja uticaja metformina na respiratornu funkciju mitohondrija, korišćena je respirometrija visoke rezolucije, kojom se meri respiracija živih ćelija. Korišćene su različite koncentracije i različita vremena trajanja tretmana metforminom, kao i različiti protokoli za respirometriju, da bi se preciznije odredili mehanizmi i karakteristike efekata koje metformin potencijalno ima na mitohondrijsku respiratornu funkciju.

### **4.4.1. Suprafarmakološka, ali ne i terapijska, koncentracija metformina dovodi do inhibicije mitohondrijske respiracije permeabilizovanih ćelija**

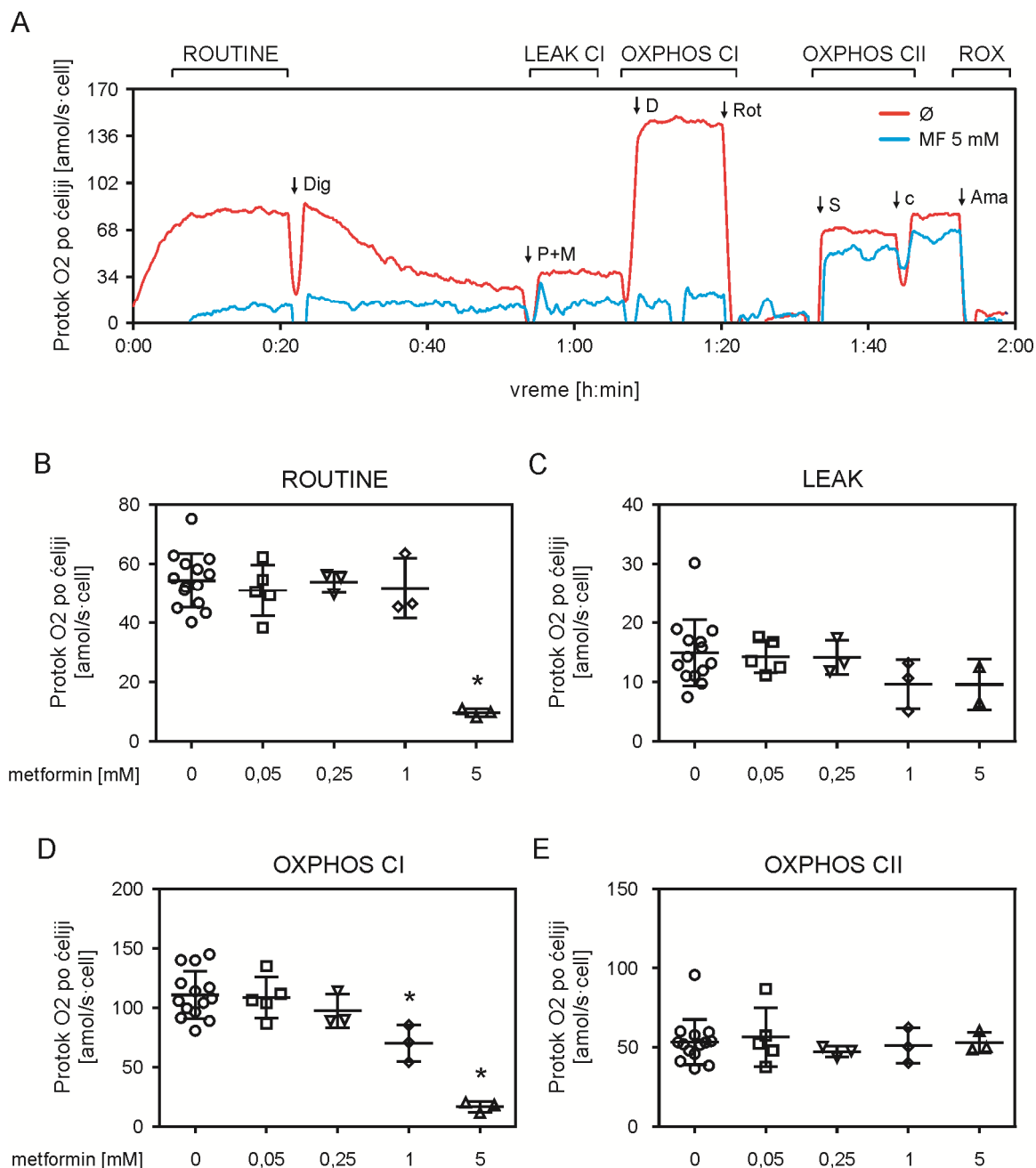
Ćelije gajene u oba medijuma (sa visokom i niskom koncentracijom glukoze) tretirane su rastućim koncentracijama metformina (50; 250; 1000; 5000  $\mu\text{M}$ ) u trajanju od 24 h. Mitohondrijska respiratorna funkcija merena je respirometrijom visoke rezolucije, korišćenjem protokola na permeabilizovanim ćelijama. Sniženje ROUTINE respiracije (respiracija intaktnih ćelija koja se bazira na korišćenju endogenih supstrata) uočeno je samo pri tretmanu najvišom ispitivanom koncentracijom metformina (5 mM), u ćelijama gajenim u oba ispitivana medijuma (slike 4B i 5B). Nasuprot ovome, kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za kompleks I (OXPHOS CI) ćelija gajenih u oba ispitivana medijuma bio je snižen nakon tretmana metforminom koncentracije 1 i 5 mM (slike 4D i 5D). Tretman metforminom nije izazvao promene u LEAK respiraciji (slike 4C i 5C) ili kapacitetu oksidativne fosforilacije vezanom za kompleks II (OXPHOS CII) (slike 4E i 5E).





**Slika 4. Primena milimolarne koncentracije metformina dovodi do smanjenja ROUTINE i OXPBOS CI respiracije kod ćelija gajenih u medijumu sa visokom koncentracijom glukoze.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom koncentracijom glukoze (25 mM), tretirane su metforminom (50 - 5000  $\mu$ M) u trajanju od 24 h. Mitohondrijska respiracija permeabilizovanih ćelija merena je respirometrijom visoke rezolucije. Prikazan je reprezentivni zapis respirometrije netretiranih i ćelija tretiranih 5 mM metforminom (A), kao i vrednosti respiracije u ROUTINE (B), LEAK (C), OXPBOS CI (D) i OXPBOS CII (E) respiratornim stanjima. Prikazani su rezultati 3-5 nezavisnih eksperimenata, sa srednjim vrednostima  $\pm$  SD, a vrednosti su korigovane oduzimanjem ROX. \* -  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije). Dig - digitonin, P - piruvat, M - malat, D - ADP, Rot - rotenon, S - sukcinat, cyt c - citohrom c, Ama - antimicin A, MF - metformin,  $\emptyset$  - kontrola (netretirane ćelije), OXPBOS - oksidativna fosforilacija (eng. *oxidative phosphorylation*), ROX - rezidualna potrošnja kiseonika (eng. *residual oxygen consumption*).

Ćelije gajene u medijumu sa niskom koncentracijom glukoze bile su osetljivije na efekte tretmana metforminom - uočeno je veće smanjenje u kapacitetu oksidativne fosforilacije vezane za kompleks I pri tretmanu 5 mM metforminom (68% smanjenja kod ćelija gajenih u HG medijumu i 85% smanjenja kod ćelija gajenih u LG medijumu). Respiracija u OXPHOS stanju bila je viša kod netretiranih ćelija gajenih u LG medijumu u odnosu na netretirane ćelije gajene u HG medijumu.

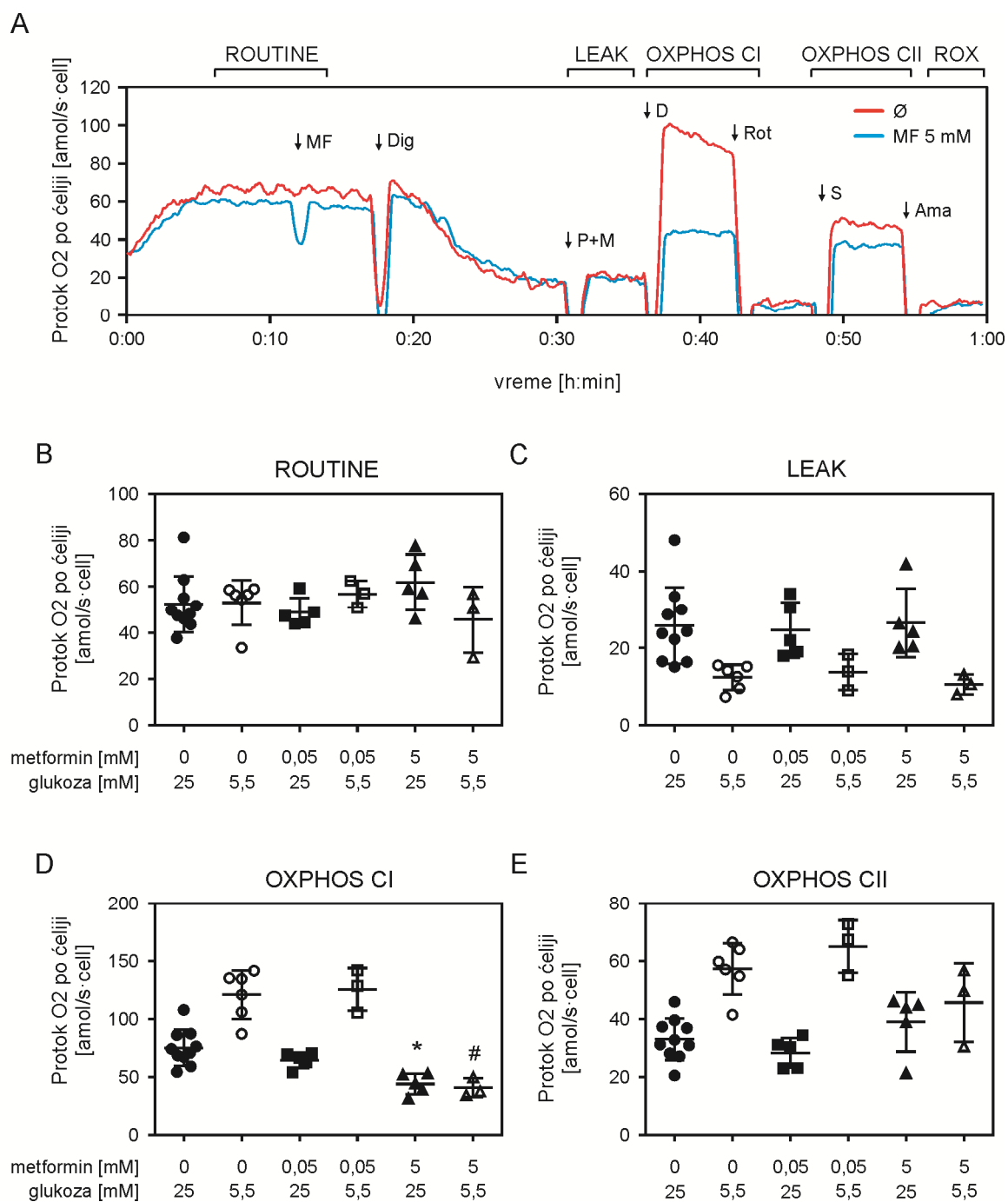


**Slika 5. Primena milimolarne koncentracije metformina dovodi do smanjenja ROUTINE i OXPHOS CI respiracije kod ćelija gajenih u medijumu sa niskom koncentracijom glukoze.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa niskom koncentracijom glukoze (5,5 mM), tretirane su metforminom (50 - 5000  $\mu$ M) u trajanju od 24 h. Mitohondrijska respiracija permeabilizovanih ćelija merena je respirometrijom visoke rezolucije. Prikazan je reprezentativni zapis respirometrije netretiranih i ćelija tretiranih 5 mM metforminom (A), kao i vrednosti respiracije u ROUTINE (B), LEAK (C), OXPHOS CI (D) i OXPHOS CII (E) respiratornim stanjima. Prikazani su rezultati 3-5 nezavisnih eksperimenata, sa

srednjim vrednostima  $\pm$  SD, a vrednosti su korigovane oduzimanjem ROX. \* -  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije). Dig - digitonin, P - piruvat, M - malat, D - ADP, Rot - rotenon, S - sukcinat, cyt c - citohrom c, Ama - antimicin A, MF - metformin,  $\emptyset$  - kontrola (netretirane ćelije), OXPHOS - oksidativna fosforilacija (eng. *oxidative phosphorylation*), ROX - rezidualna potrošnja kiseonika (eng. *residual oxygen consumption*).

#### **4.4.2. Suprafarmakološka koncentracija metformina trenutno dovodi do inhibicije respiratorne funkcije kompleksa I**

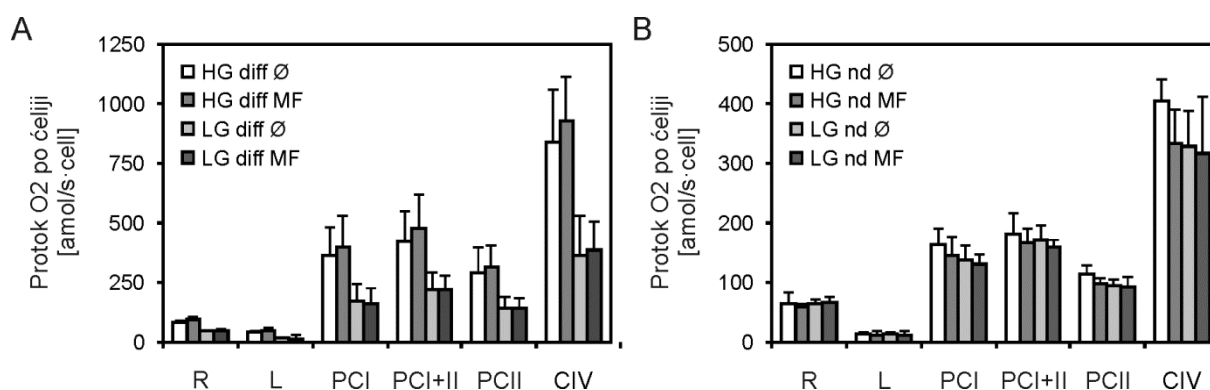
Radi utvrđivanja vremenske dinamike procesa inhibicije respiratorne funkcije mitohondrija, dalje su ispitani tretmani različitih trajanja. Odabrane koncentracije metformina (50  $\mu$ M i 5 mM) dodavane su direktno u komoru, neposredno nakon dodavanja ćelija. Mitohondrijska respiratorna funkcija je ispitivana protokolom za respiometriju na permeabilizovanim ćelijama. Kod ćelija izloženih kratkom tretmanu metforminom suprafarmakološke koncentracije (5 mM) uočeno je sniženje kapaciteta oksidativne fosforilacije vezane za kompleks I (slika 6D), uporedivo sa onim registrovanim pri 24 h tretmanu istom koncentracijom metformina. Za razliku od 24 h tretmana, sniženje respiracije nije uočeno u ROUTINE respiraciji (slika 6B), što se može objasniti nedovoljnim trajanjem tretmana (titracija metformina obavlja se tokom registrovanja ROUTINE respiracije). Terapijska koncentracija metformina (50  $\mu$ M) nije dovela do promena ni u jednom od ispitanih respiratornih stanja (slika 6). Opisani efekti metformina bili su isti kod ćelija gajenih u HG i LG medijumu.



**Slika 6. Kratkotrajni tretman metforminom milimolarne koncentracije dovodi do smanjenja OXPHOS CI respiracije.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom (25 mM) i niskom (5,5 mM) koncentracijom glukoze, tretirane su metforminom (50  $\mu$ M ili 5 mM), dodavanjem tretmana direktno u komoru mernog aparata i mitohondrijska funkcija permeabilizovanih ćelija je merena respirometrijom visoke rezolucije. Prikazan je reprezentativni zapis respirometrije netretiranih i ćelija tretiranih 5 mM metforminom (A), kao i vrednosti respiracije u ROUTINE (B), LEAK (C), OXPHOS CI (D) i OXPHOS CII (E) respiratornim stanjima. Prikazani su rezultati 3-6 nezavisnih eksperimenata, sa srednjim vrednostima  $\pm$  SD, a vrednosti su korigovane oduzimanjem ROX. \* -  $p < 0,05$  u odnosu na netretirane ćelije gajene u HG medijumu (25 mM), # -  $p < 0,05$  u odnosu na netretirane ćelije gajene u LG medijumu (5,5 mM). Dig - digitonin, P - piruvat, M - malat, D - ADP, Rot - rotenon, S - sukcinat, cyt c - citohrom c, Ama - antimicin A, MF - metformin,  $\emptyset$  - kontrola (netretirane ćelije), OXPHOS - oksidativna fosforilacija (eng. *oxidative phosphorylation*), ROX - rezidualna potrošnja kiseonika (eng. *residual oxygen consumption*).

#### 4.4.3. Petodnevi tretman terapijskom koncentracijom metformina ne utiče na mitohondrijsku respiraciju ćelija

Pošto je pokazano da tretman terapijskom koncentracijom metformina (kratkotrajni kao i 24 h) ne utiče na mitohondrijsku respiraciju, ćelije su tretirane metforminom koncentracije 50  $\mu\text{M}$  u trajanju od 5 dana, u pokušaju da se simulira hronična izloženost metforminu, nalik onoj u organizmu pacijenata. Petodnevi tretman ispitivan je na nediferenciranim i diferenciranim C2C12 ćelijama. Ni u jednom od ispitivanih respiratornih stanja nisu uočene promene pri tretmanu metforminom terapijske koncentracije u trajanju od 5 dana, ni kod diferenciranih (slika 7A) ni kod nediferenciranih ćelija (slika 7B), za oba (HG i LG) medijuma u kojima su ćelije gajene.



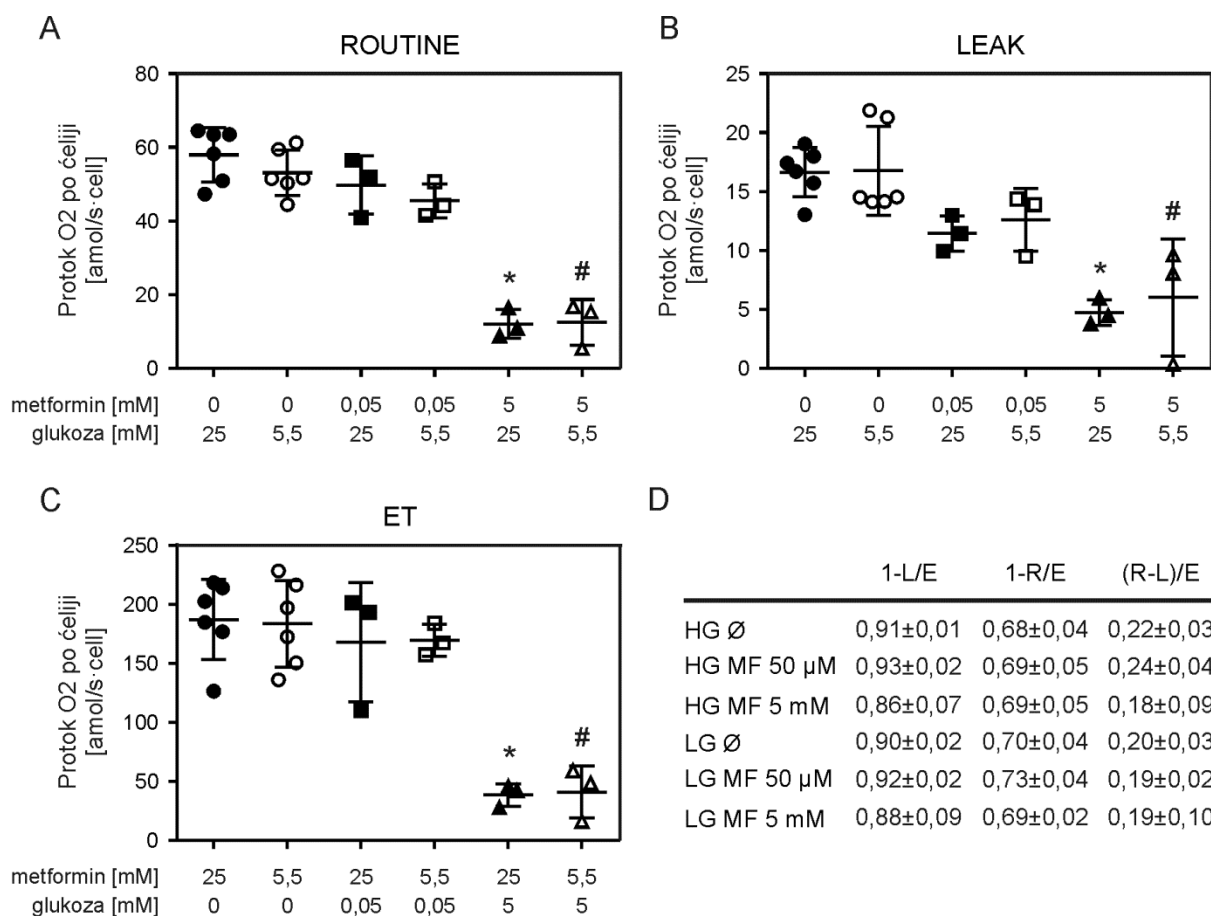
**Slika 7. Primena metformina terapijske koncentracije (50  $\mu\text{M}$ ) u trajanju od 5 dana ne dovodi do promene respiracije ni u jednom od merenih respiratornih stanja.** Diferencirane (A) i nediferencirane (B) C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom (25 mM) i niskom (5,5 mM) koncentracijom glukoze, tretirane su metforminom koncentracije 50  $\mu\text{M}$  u trajanju od 5 dana. Respiracija permeabilizovanih ćelija merena je respirometrijom visoke rezolucije. Rezultati 3 nezavisna eksperimenta predstavljeni su kao srednja vrednost  $\pm$  SD, a vrednosti su korigovane oduzimanjem ROX. HG - medijum sa visokom koncentracijom glukoze (eng. *high glucose*), LG - medijum sa niskom koncentracijom glukoze (eng. *low glucose*), MF - metformin, Ø - kontrola (netretirane ćelije), diff - diferencirane ćelije, nd - nediferencirane ćelije. R - ROUTINE, L - LEAK, PCI - OXPHOS CI, PCI+II - OXPHOS CI + CII, PCII - OXPHOS CII, CIV - kompleks IV (eng. *complex IV*), OXPHOS - oksidativna fosforilacija (eng. *oxidative phosphorylation*), ROX - rezidualna potrošnja kiseonika (eng. *residual oxygen consumption*).

Tretman metforminom u trajanju od 5 dana (50  $\mu\text{M}$ ) nije uticao na aktivnost citrat sintaze (HG: Ø=0,033 $\pm$ 0,026; MF=0,035 $\pm$ 0,029; LG: Ø=0,05 $\pm$ 0,01; MF=0,053 $\pm$ 0,013 [IU/10<sup>6</sup> ćelija]). Ovi rezultati ukazuju na to da petodnevi tretman terapijskom koncentracijom metformina ne utiče na količinu mitohondrija u ćelijama. U skladu sa ovim, i rezultati respirometrije normalizovani na aktivnost citrat sintaze bili su nepromenjeni - nije bilo razlike među grupama.

#### 4.4.4. Suprafarmakološka, ali ne i terapijska, koncentracija metformina dovodi do inhibicije mitohondrijske respiracije intaktnih ćelija

Radi daljeg ispitivanja efekata metformina na mitohondrijsku respiraciju, korišćen je respirometrijski protokol na intaktnim ćelijama, koji omogućava registrovanje respiracije u uslovima bližim fiziološkim – ćelijska membrana ostaje intaktna, a mitohondrijska respiracija bazirana je na korišćenju endogenih supstrata ćelije (a ne egzogeno dodatih supstrata u saturišućoj koncentraciji). Ovo omogućava opažanje suptilnijih promena u respiraciji, koje ne potiču od promena u maksimalnom intrinzičnom kapacitetu pojedinih komponenti respiratornog lanca, već od promena u korišćenju pojedinih supstrata.

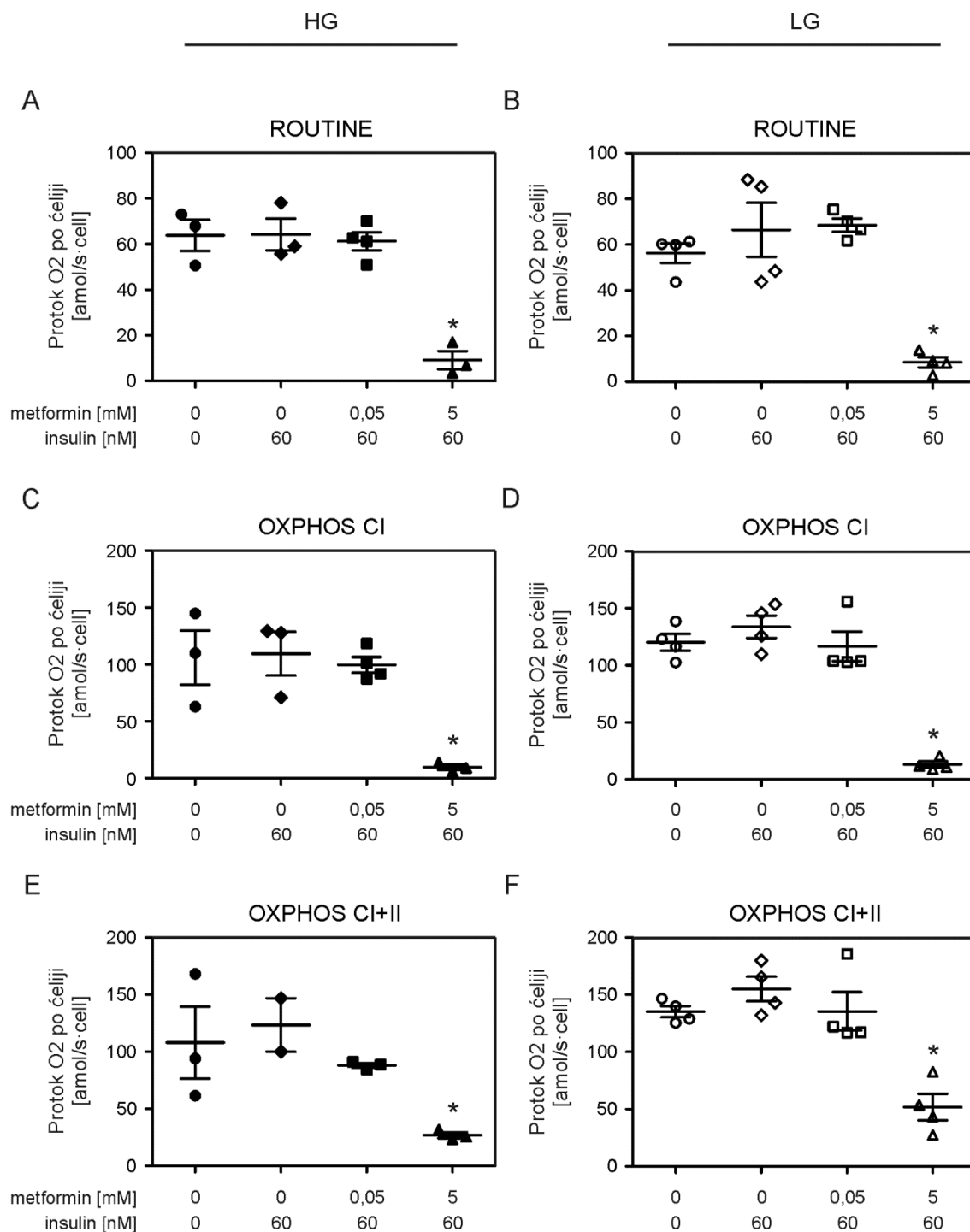
Merenjem respiracije intaktnih ćelija gajenih u medijumu sa visokom i niskom koncentracijom glukoze, pri tretmanu metforminom suprafarmakološke koncentracije, uočeno je smanjenje u sva tri merena respiratorna stanja: ROUTINE – respiracija intaktnih ćelija (slika 8A), LEAK – respiracija pri inhibiciji ATP sintaze (slika 8B) i ET - maksimalni respiratorni kapacitet elektron-transportnog lanca (u prisustvu dekuplujućeg agensa) (slika 8C). Pri tretmanu metforminom koncentracije 50  $\mu\text{M}$  nije bilo promena ni u jednom od ispitanih respiratornih stanja. Tretman metforminom terapijske (50  $\mu\text{M}$ ) kao ni suprafarmakološke (5 mM) koncentracije nije doveo do promena u respiratornim indeksima: 1-L/E, 1-R/E i (R-L)/E. Ovo ukazuje na to da i pored smanjenja respiracije izazvanog metforminom suprafarmakološke koncentracije, nije došlo do promena u parametrima spregnutosti sistema za fosforilaciju i sistema za transport elektrona (slika 8D).



**Slika 8. Primena milimolarne koncentracije metformina dovodi do smanjenja ROUTINE, LEAK i ET respiracije intaktnih ćelija.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom (25 mM) i niskom (5,5 mM) koncentracijom glukoze, tretirane su metforminom koncentracije 50  $\mu$ M ili 5 mM u trajanju od 24 h. Respiracija intaktnih ćelija merena je respirometrijom visoke rezolucije. Kvantifikovana je respiracija ROUTINE (A), LEAK (B) i ET (C) respiratornih stanja, iz kojih su izračunati i indeksi 1-L/E, 1-R/E i (R-L)/E (D). Prikazani su rezultati 3 nezavisna eksperimenta, sa srednjim vrednostima  $\pm$  SD, a vrednosti su korigovane oduzimanjem ROX. \* -  $p < 0,05$  u odnosu na netretirane ćelije gajene u HG medijumu (25 mM), # -  $p < 0,05$  u odnosu na netretirane ćelije gajene u LG medijumu (5,5 mM). ET - kapacitet za transport elektrona (eng. *electron transfer capacity*), HG - medijum sa visokom koncentracijom glukoze (eng. *high glucose*), LG - medijum sa niskom koncentracijom glukoze (eng. *low glucose*),  $\emptyset$  - kontrola (netretirane ćelije), MF - metformin, L - LEAK, E - ET, R - ROUTINE, , ROX - rezidualna potrošnja kiseonika (eng. *residual oxygen consumption*).

#### **4.4.5. Istovremeni tretman insulinom ne menja efekat metformina na respiratornu funkciju mitohondrija**

Radi ispitivanja potencijalnog uticaja izlaganja povišenim koncentracijama insulina na efekte metformina, ćelije su tretirane metforminom odabranih koncentracija (50  $\mu$ M i 5 mM) pri istovremenom tretmanu insulinom (60 nM), u trajanju od 24 h. Mitohondrijska respiratorna funkcija analizirana je respirometrijskim protokolom na permeabilizovanim ćelijama. Uočeno je smanjenje ROUTINE (slika 9A i 9B), OXPHOS CI (slika 9C i 9D) i OXPHOS CI+II (slika 9E i 9F) respiracije kod ćelija tretiranih kombinacijom metformina suprafarmakološke koncentracije (5 mM) i insulina. Efekat istovremenog tretmana uporediv je sa promenama izazvanim samostalnim tretmanom metforminom suprafarmakološke koncentracije. Kombinacija terapijske koncentracije metformina (50  $\mu$ M) i insulina nije dovela do promena u respiraciji u odnosu na kontrolu (slika 9). Trend je bio isti za ćelije gajene u medijumu sa visokom i niskom koncentracijom glukoze. Ovi rezultati ukazuju na to da insulin ne menja efekat na mitohondrijsku respiraciju izazvan metforminom.



**Slika 9. Primena milimolarne koncentracije metformina u kombinaciji sa insulinom dovodi do smanjenja ROUTINE, OXPPOS CI i OXPPOS CI+II respiracije.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom (25 mM) i niskom (5,5 mM) koncentracijom glukoze, istovremeno su tretirane metforminom koncentracija 50  $\mu$ M ili 5 mM i insulinom koncentracije 60 nM, u trajanju od 24 h. Mitohondrijska respiracija permeabilizovanih ćelija merena je respirometrijom visoke rezolucije. Prikazana je respiracija ROUTINE (A,B), OXPPOS CI (C, D) i OXPPOS CI+II (E, F) respiratornih stanja za ćelije gajene u medijumu sa visokom i niskom koncentracijom glukoze. Prikazani su rezultati 3-4 nezavisna eksperimenta, sa srednjim vrednostima  $\pm$  SD, a vrednosti su korigovane oduzimanjem ROX. \* -  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije). HG - medijum sa visokom koncentracijom glukoze (eng. *high glucose*), LG - medijum sa niskom koncentracijom glukoze (eng. *low glucose*), OXPPOS - oksidativna fosforilacija (eng. *oxidative phosphorylation*), ROX - rezidualna potrošnja kiseonika (eng. *residual oxygen consumption*).



#### 4.5. Metformin ne dovodi do promene energetskeg i redoks statusa ćelija

Očekivana posledica inhibicije kompleksa I je poremećaj energetskeg i redoks statusa ćelije, koji se procenjuju odnosima ADP/ATP i NAD/NADH. U našim eksperimentima, metformin terapijske kao ni suprafarmakološke koncentracije nije uticao na energetske status ćelija (odnos ADP/ATP) (tabela 2). Ni jedna od ispitivanih koncentracija metformina nije uticala ni na redoks status ćelija (NAD/NADH odnos) (tabela 2). Dodatno, istovremeni tretman metforminom i insulinom kao i tretman terapijskom koncentracijom metformina u trajanju od 5 dana nisu uticali na energetske i redoks status ćelija (tabela 2).

**Tabela 2. Metformin ne dovodi do promena ADP/ATP i NAD/NADH odnosa.**

Medijum	Tretman	ADP/ATP	NAD/NADH
HG	∅	0,075±0,02	17,06±3,18
HG	MF 50 µM	0,075±0,03	22,77±6,85
HG	MF 5 mM	0,11±0,03	22,57±10,23
HG	INS	0,09±0,04	20,18±9,32
HG	INS+MF 50 µM	0,07±0,00	20,83±4,10
HG	INS+MF 5 mM	0,05±0,08	22,66±0,44
HG	MF 50 µM 5 dana	0,04±0,00	19,19±0,21
LG	∅	0,13±0,01	16,59±1,51
LG	MF 50 µM	0,06±0,03	16,57±0,68
LG	MF 5 mM	0,06±0,00	16,59±1,68
LG	INS	0,07±0,05	16,71±2,42
LG	INS+MF 50 µM	0,07±0,03	17,31±2,44
LG	INS+MF 5 mM	0,04±0,01	17,19±2,25
LG	MF 50 µM 5 dana	0,05±0,00	14,05±0,97

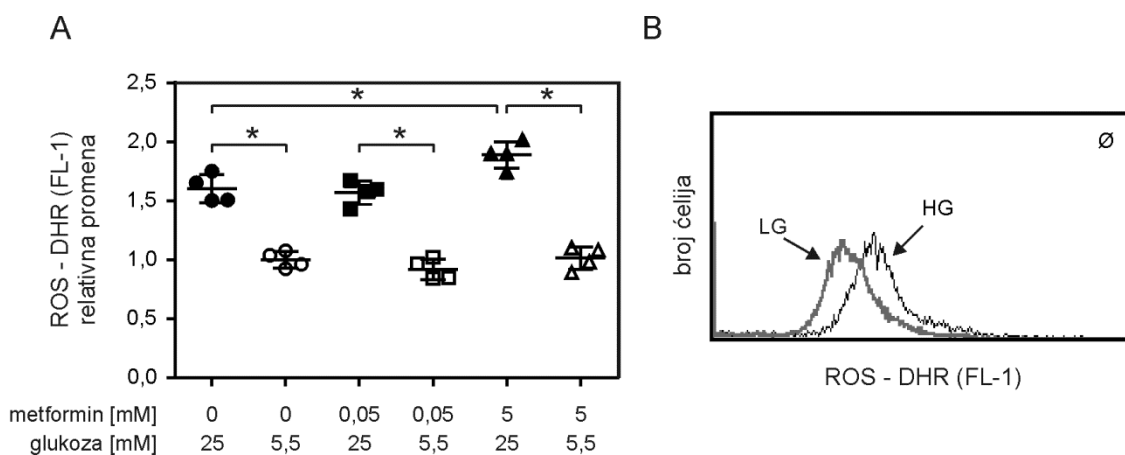
C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom (25 mM) i niskom (5,5 mM) koncentracijom glukoze, tretirane su metforminom koncentracija 50 µM ili 5 mM u trajanju od 24 h, istovremenim tretmanom metforminom (50 µM ili 5 mM) i insulinom (60 nM) u trajanju od 24 h, kao i metforminom koncentracije 50 µM u trajanju od 5 dana. Koncentracije ATP, ADP, NADH i NAD određene su komercijalnim kitovima, i na osnovu njih izračunati su količnici ADP/ATP i NAD/NADH. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD dva nezavisna eksperimenta. HG - medijum sa visokom koncentracijom glukoze (eng. *high glucose*), LG - medijum sa niskom koncentracijom glukoze (eng. *low glucose*), ∅ - kontrola (netretirane ćelije), MF - metformin, INS - insulin, ADP - adenzin difosfat, ATP - adenzin trifosfat, NAD - nikotinamid adenin dinukleotid.

## 4.6. Uticaj metformina na oksidativni stres i mitohondrijski membranski potencijal

Nakon pokazanih efekata suprafarmakoloških koncentracija metformina na mitohondrijsku respiraciju, dalje smo ispitivali efekte metformina na produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta i mitohondrijski membranski potencijal, kao posredne parametre mitohondrijske funkcije. Produkcija superoksidnog anjon radikala, ukupnih reaktivnih kiseoničnih vrsta kao i mitohondrijski membranski potencijal mereni su korišćenjem odgovarajućih fluorofora, metodom protočne citofluorimetrije.

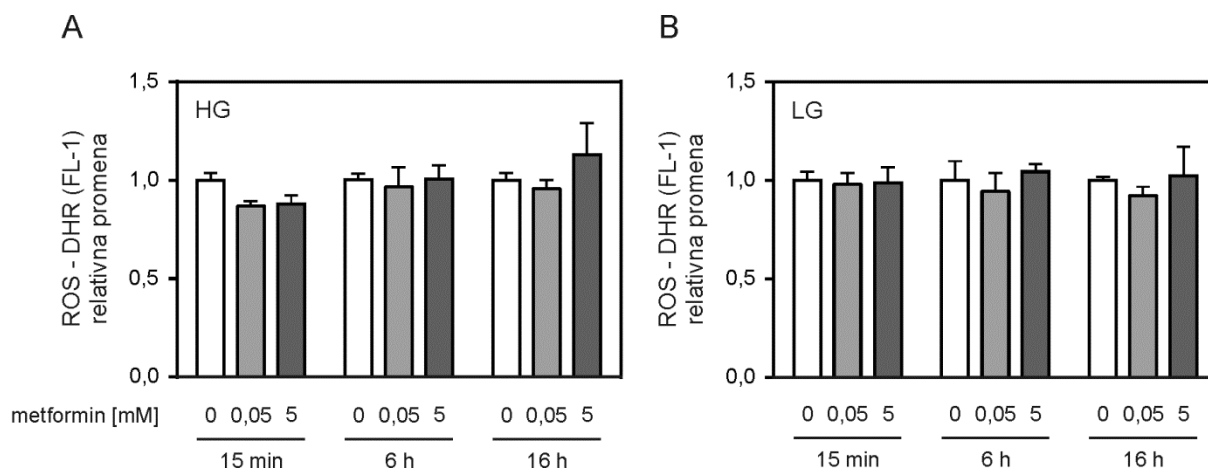
### 4.6.1. Suprafarmakološka koncentracija metformina i medijum sa visokom koncentracijom glukoze dovode do povećane produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta

Ćelije su tretirane odabranim koncentracijama metformina (50  $\mu$ M i 5 mM) u trajanju od 24 h. Tretman metforminom suprafarmakološke koncentracije (5 mM) izazvao je povećanu proizvodnju svih reaktivnih kiseoničnih vrsta u medijumu sa visokom koncentracijom glukoze (HG), što se zapaža kao povećanje intenziteta fluorescencije fluorofore DHR (slika 10A). U ćelijama gajenim u HG medijumu, proizvodnja reaktivnih kiseoničnih vrsta bila je povišena u odnosu na ćelije gajene u LG medijumu, nezavisno od tretmana metforminom (slika 10 A i 10B).



**Slika 10. Primena milimolarne koncentracije metformina dovodi do povećane produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta kod ćelija gajenih u medijumu sa visokom koncentracijom glukoze.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom (25 mM) i niskom (5,5 mM) koncentracijom glukoze, tretirane su metforminom koncentracija 50  $\mu$ M i 5 mM u trajanju od 24 h. Produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta merena je protočnom citofluorimetrijom, korišćenjem fluorohroma DHR, specifičnim za ukupne ROS. Prikazana je relativna promena intenziteta fluorescencije uzoraka u odnosu na negativnu kontrolu (netretirane ćelije), čija je vrednost postavljena na 1. Prikazani su svi rezultati dva nezavisna eksperimenta rađena u tehničkom duplikatu, sa srednjom vrednošću  $\pm$  SD (A) i reprezentativni histogram (B). \* -  $p < 0,05$ . HG - medijum sa visokom koncentracijom glukoze (eng. *high glucose*), LG - medijum sa niskom koncentracijom glukoze (eng. *low glucose*), Ø - kontrola (netretirane ćelije), DHR - dihidrorodamin, ROS - reaktivne kiseonične vrste (eng. *reactive oxygen species*).

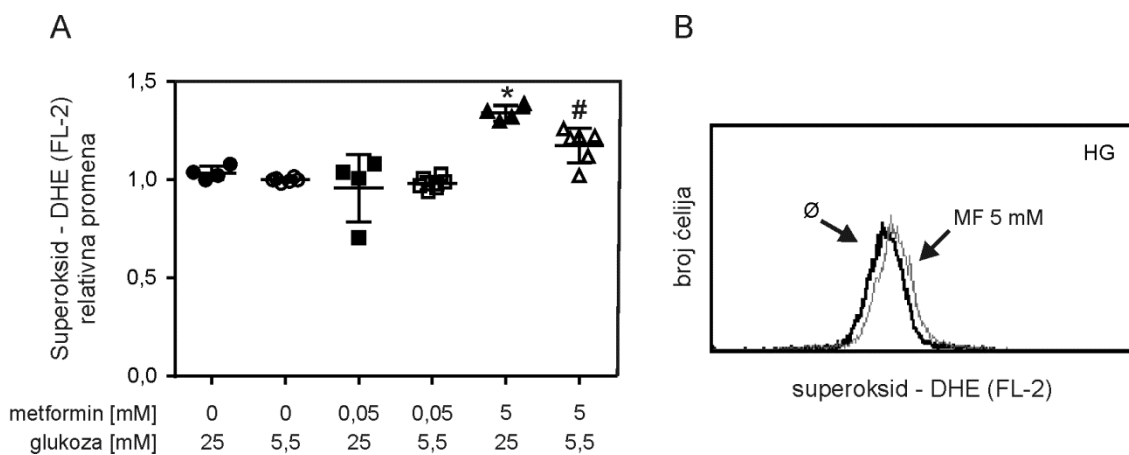
Zbog tranzijentne prirode reaktivnih kiseoničnih vrsta, kao i toga što je prethodno potvrđeno da milimolarna koncentracija metformina gotovo trenutno deluje na respiratornu funkciju, želeli smo da ispitamo vremensku dinamiku ovih promena usled tretmana metforminom. Tretiranjem ćelija metforminom u trajanju od 15 min, 6 h i 16 h, pokazano je da tretmani kraći od 24 h ne dovode do promene u produkciji ukupnih ROS, kako u ćelijama gajenim u HG medijumu (slika 11A) tako ni u ćelijama gajenim u LG medijumu (slika 11B).



**Slika 11. Tretman metforminom kraći od 24 h ne dovodi do povećane produkcije ROS.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom (25 mM) i niskom (5,5 mM) koncentracijom glukoze, tretirane su metforminom koncentracija 50  $\mu$ M i 5 mM u trajanju od 15 min, 6 h i 16 h. Produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta merena je protočnom citofluorimetrijom, korišćenjem fluorohroma DHR, specifičnim za ukupne ROS. Prikazana je relativna promena intenziteta fluorescencije uzoraka u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije), čija je vrednost postavljena na 1. Rezultati 2 nezavisna eksperimenta predstavljeni su kao srednja vrednost  $\pm$  SD. DHR – dihidrorodamin, HG - medijum sa visokom koncentracijom glukoze (eng. *high glucose*), LG - medijum sa niskom koncentracijom glukoze (eng. *low glucose*), ROS – reaktivne kiseonične vrste (eng. *reactive oxygen species*).

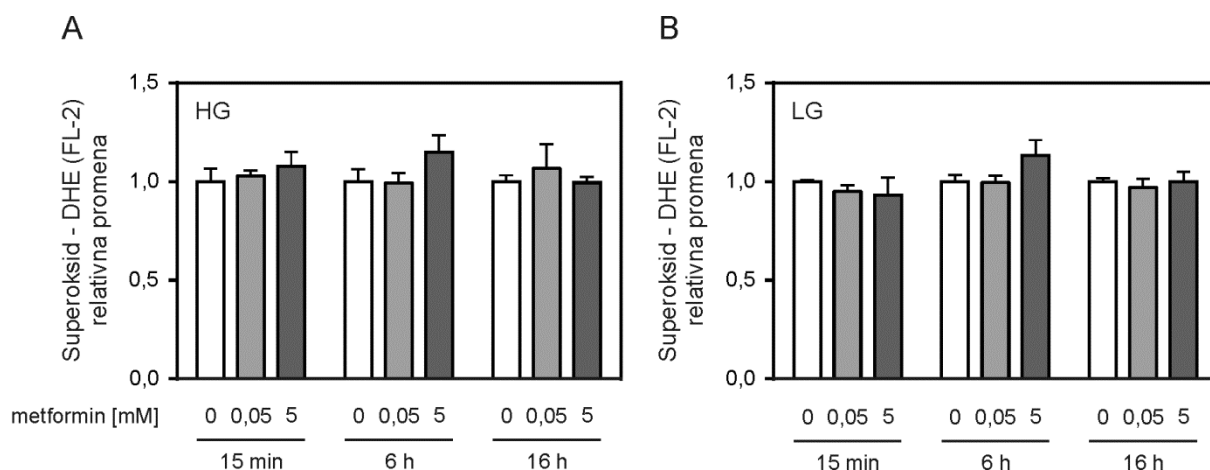
#### 4.6.2. Suprafarmakološka, ali ne i terapijska, koncentracija metformina dovodi do povećane produkcije superoksidnog anjon radikala

Suprafarmakološka koncentracija metformina (5 mM) izazvala je povećanu proizvodnju superoksidnog anjon radikala, što se zapaža kao povećanje intenziteta fluorescencije fluorofore DHE (slika 12A i 12B). Ovaj rezultat zapažen je kod ćelija gajenih u oba medijuma, ali je efekat bio izraženiji kod onih gajenih u HG medijumu (povećanje od 34% u odnosu na kontrolne - netretirane ćelije), nego kod ćelija gajenih u LG medijumu (18% povećanja). Terapijska koncentracija metformina (50  $\mu$ M) nije dovela do ovakve promene (slika 12A).



**Slika 12. Primena milimolarne koncentracije metformina dovodi do povećane produkcije superoksidnog anjon radikala.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom (25 mM) i niskom (5,5 mM) koncentracijom glukoze, tretirane su metforminom koncentracija 50  $\mu$ M i 5 mM u trajanju od 24 h. Produkcija superoksidnog anjon radikala merena je protočnom citofluorimetrijom, korišćenjem fluorohroma DHE, specifičnim za superoksid anjon radikal. Prikazana je relativna promena intenziteta fluorescencije uzoraka u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije), čija je vrednost postavljena na 1. Prikazani su svi rezultati dva nezavisna eksperimenta rađena u tehničkom duplikatu, sa srednjom vrednošću  $\pm$  SD (A) i reprezentativni histogram (B). \* -  $p < 0,05$  u odnosu na netretirane ćelije gajene u HG medijumu (25 mM), # -  $p < 0,05$  u odnosu na netretirane ćelije gajene u LG medijumu (5,5 mM). HG - medijum sa visokom koncentracijom glukoze (eng. *high glucose*), Ø - kontrola (netretirane ćelije), MF - metformin, DHE - dihidroetidijum.

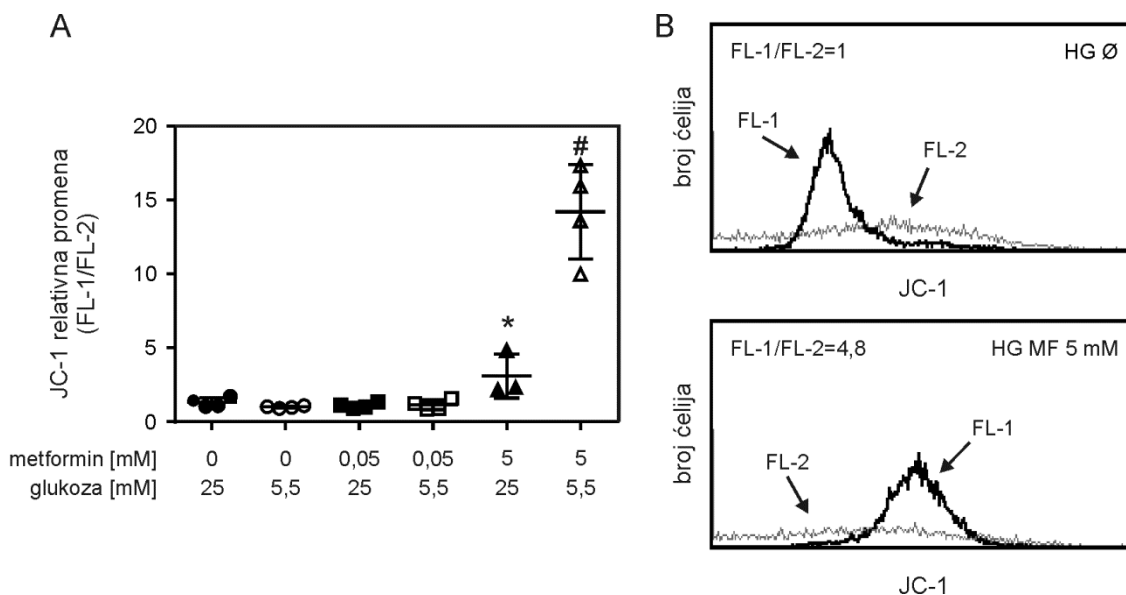
Tretiranjem ćelija, gajenih u medijumu sa visokom i niskom koncentracijom glukoze, metforminom (50  $\mu$ M i 5 mM) u trajanju od 15 min, 6 h i 16 h, pokazano je da tretmani kraći od 24 h ne dovode do promene u produkciji superoksidnog anjon radikala (slika 13).



**Slika 13. Tretman metforminom kraći od 24 h ne dovodi do povećane produkcije superoksidnog anjon radikala.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom (25 mM) i niskom (5,5 mM) koncentracijom glukoze, tretirane su metforminom koncentracija 50  $\mu$ M i 5 mM u trajanju od 15 min, 6 h i 16 h. Produkcija superoksidnog anjon radikala merena je protočnom citofluorimetrijom, korišćenjem fluorohroma DHE, specifičnim za superoksid anjon radikal. Prikazana je relativna promena intenziteta fluorescencije uzoraka u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije), čija je vrednost postavljena na 1. Rezultati 2 nezavisna eksperimenta predstavljeni su kao srednja vrednost  $\pm$  SD. DHE - dihidroetidijum, HG - medijum sa visokom koncentracijom glukoze (eng. *high glucose*), LG - medijum sa niskom koncentracijom glukoze (eng. *low glucose*).

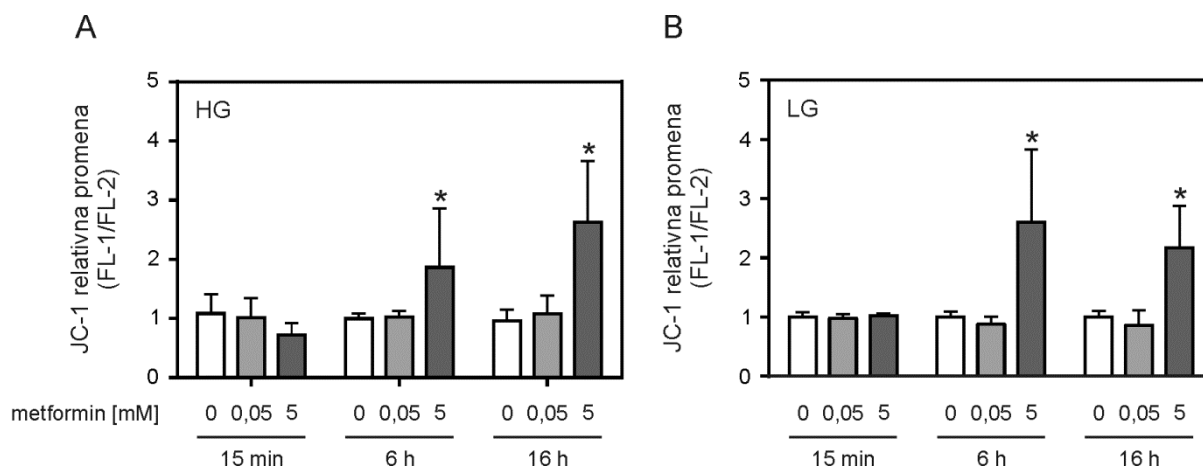
#### 4.6.3. Suprafarmakološka, ali ne i terapijska, koncentracija metformina dovodi do depolarizacije unutrašnje membrane mitohondrija

Procena mitohondrijskog membranskog potencijala vršena je merenjem fluorescencije JC-1 boje. Tretman metforminom terapijske koncentracije (50  $\mu$ M) nije uticao na mitohondrijski membranski potencijal, dok je tretman metforminom suprafarmakološke koncentracije (5 mM) izazvao depolarizaciju unutrašnje membrane mitohondrija ćelija gajenih u oba medijuma. Efekat je bio izraženiji kod ćelija gajenih u medijumu sa niskom koncentracijom glukoze (srednje vrednosti FL1/FL2: HG=4,4 $\pm$ 2,9; LG=14,2 $\pm$ 3,2) (slika 14).



**Slika 14. Primena milimolarne koncentracije metformina dovodi do depolarizacije unutrašnje membrane mitohondrija.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom (25 mM) i niskom (5,5 mM) koncentracijom glukoze, tretirane su metforminom koncentracija 50  $\mu$ M i 5 mM u trajanju od 24 h. Mitohondrijski membranski potencijal meren je protočnom citofluorimetrijom, korišćenjem fluorohroma JC-1. Promena mitohondrijskog membranskog potencijala prati se kao promenu odnosa FL1/FL2. Prikazana je relativna promena intenziteta fluorescencije uzoraka u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije), čija je vrednost postavljena na 1. Prikazani su svi rezultati dva nezavisna eksperimenta rađena u tehničkom duplikatu, sa srednjom vrednošću  $\pm$  SD (A) i reprezentativni histogrami (B). \* -  $p < 0,05$  u odnosu na netretirane ćelije gajene u HG medijumu (25 mM), # -  $p < 0,05$  u odnosu na netretirane ćelije gajene u LG medijumu (5,5 mM). LG - medijum sa niskom koncentracijom glukoze (eng. *low glucose*),  $\emptyset$  - kontrola (netretirane ćelije), MF - metformin.

Za razliku od produkcije ROS, depolarizacija mitohondrija uočena je u C2C12 ćelijama gajenim u oba medijuma i pri ispitivanju kraćih tretmana metforminom koncentracije 5 mM, počevši od 6 sati (slika 15).

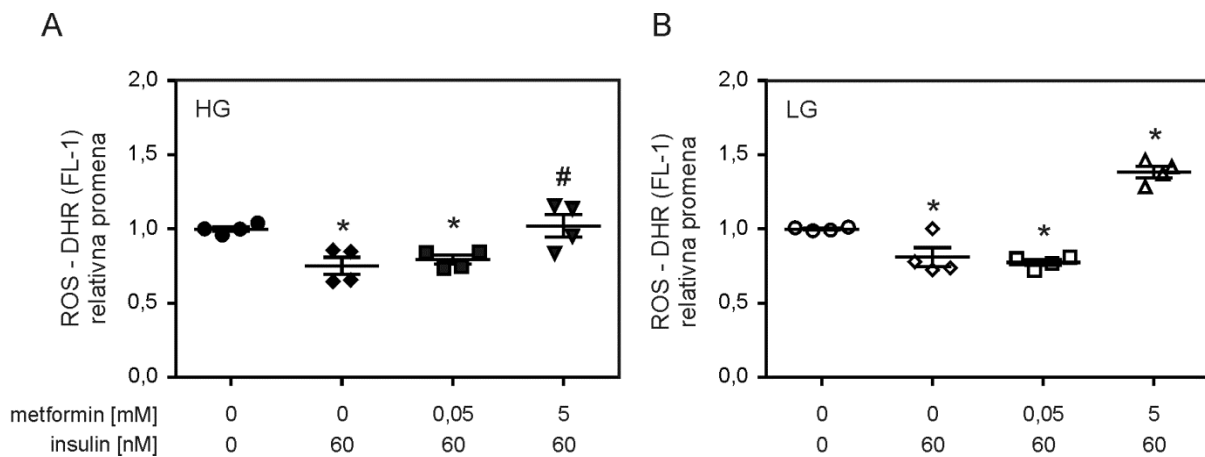


**Slika 15. Tretmani milimolarnom koncentracijom metformina u trajanju od 6 i 16 h dovode do depolarizacije unutrašnje membrane mitohondrija.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom (25 mM) i niskom (5,5 mM) koncentracijom glukoze, tretirane su metforminom koncentracija 50  $\mu$ M i 5 mM u trajanju od 15 min, 6 h i 16 h. Mitohondrijski membranski potencijal meren je protočnom citofluorimetrijom, korišćenjem fluorohroma JC-1. Promena mitohondrijskog membranskog potencijala prati se kao promenu odnosa FL1/FL2. Prikazana je relativna promena intenziteta fluorescencije uzoraka u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije), čija je vrednost postavljena na 1. Rezultati 2 nezavisna eksperimenta predstavljani su kao srednja vrednost  $\pm$  SD. \* -  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije). HG - medijum sa visokom koncentracijom glukoze (eng. *high glucose*), LG - medijum sa niskom koncentracijom glukoze (eng. *low glucose*).

#### 4.6.4. Istovremeni tretman insulinom ne menja efekte metformina na oksidativni stres i mitohondrijski membranski potencijal

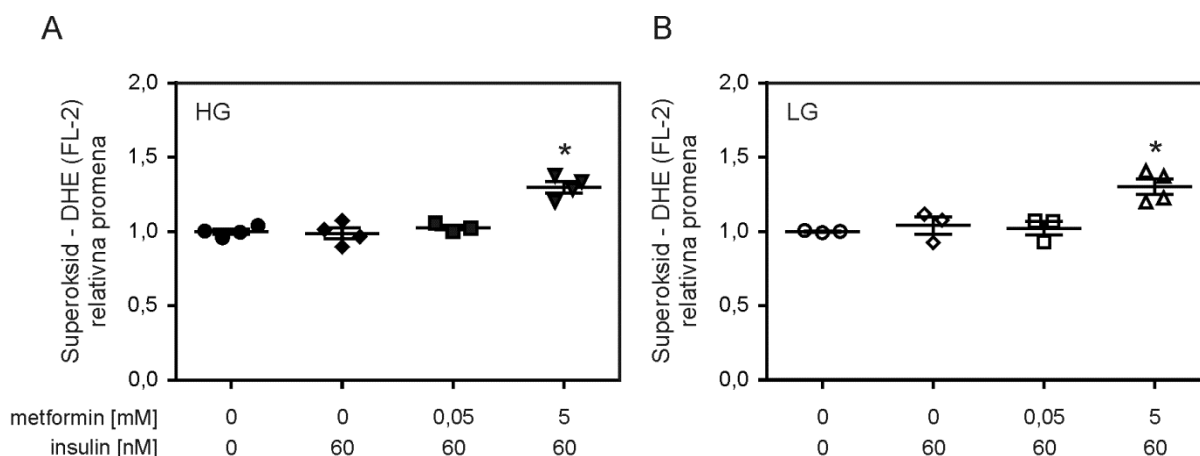
Da bi se ispitalo da li izlaganje povišenim koncentracijama insulina menja efekte koje metformin vrši na produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta i mitohondrijski membranski potencijal, ćelije su istovremeno tretirane metforminom odabranih koncentracija (50  $\mu$ M i 5 mM) i insulinom (60 nM), u trajanju od 24 h.

Tretman insulinom je, nezavisno od tretmana metforminom, doveo do smanjene produkcije ukupnih ROS u odnosu na netretirane, kontrolne ćelije. Istovremeni tretman insulinom i metforminom suprafarmakološke koncentracije (5 mM) ipak je doveo do povećane produkcije ROS, u odnosu na ćelije tretirane samo insulinom (slika 16). Za razliku od ćelija tretiranih samo metforminom, u slučaju istovremenog tretmana sa insulinom, efekat suprafarmakološke koncentracije metformina bio je izraženiji kod ćelija gajenih u LG medijumu.



**Slika 16. Istovremeni tretman metforminom milimolarne koncentracije i insulinom dovodi do povećanja produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom (25 mM) i niskom (5,5 mM) koncentracijom glukoze, istovremeno su tretirane metforminom koncentracija 50  $\mu$ M i 5 mM i insulinom koncentracije 60 nM, u trajanju od 24 h. Produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta merena je protočnom citofluorimetrijom, korišćenjem fluorohroma DHR, specifičnim za ukupne ROS. Prikazana je relativna promena intenziteta fluorescencije uzoraka u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije), čija je vrednost postavljena na 1. Prikazani su svi rezultati dva nezavisna eksperimenta rađena u tehničkom duplikatu, sa srednjom vrednošću  $\pm$  SD. \* -  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije), # -  $p < 0,05$  u odnosu na ćelije tretirane insulinom. HG - medijum sa visokom koncentracijom glukoze (eng. *high glucose*), LG - medijum sa niskom koncentracijom glukoze (eng. *low glucose*), DHR – dihidrorodamin.

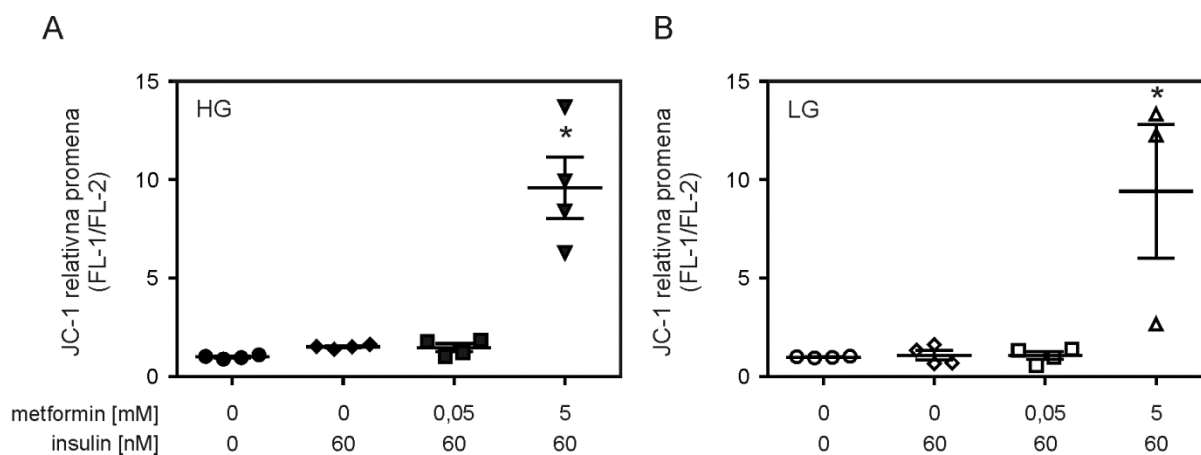
Merenjem produkcije superoksidnog anjon radikala protočnom citofluorimetrijom uz pomoć fluorofore DHE, ustanovili smo da istovremeni tretman insulinom ne menja odgovor na metformin – u kombinaciji sa insulinom, metformin suprafarmakološke koncentracije (5 mM) izazivao je povećanje produkcije superoksida, dok metformin terapijske koncentracije (50  $\mu$ M) nije imao efekta (slika 17). Sam insulin nije doveo do promene fluorescencije DHE u odnosu na kontrolu.



**Slika 17. Istovremeni tretman metforminom milimolarne koncentracije i insulinom dovodi do povećane produkcije superoksidnog anjon radikala.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom (25 mM) i niskom (5,5 mM) koncentracijom glukoze, istovremeno su tretirane metforminom koncentracija 50  $\mu$ M i 5 mM i insulinom koncentracije 60 nM, u trajanju od 24 h. Produkcija superoksidnog anjon radikala merena je protočnom citofluorimetrijom, korišćenjem fluorohroma DHE, specifičnim za superoksid anjon radikal. Prikazana je relativna promena intenziteta

fluorescencije uzoraka u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije), čija je vrednost postavljena na 1. Prikazani su svi rezultati dva nezavisna eksperimenta rađena u tehničkom duplikatu, sa srednjom vrednošću  $\pm$  SD. \* -  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije). HG - medijum sa visokom koncentracijom glukoze (eng. *high glucose*), LG - medijum sa niskom koncentracijom glukoze (eng. *low glucose*),  $\emptyset$  - kontrola - netretirane ćelije, DHE - dihidroetidijum.

Istovremeni tretman insulinom nije uticao ni na sposobnost suprafarmakološke koncentracije metformina da izazove depolarizaciju unutrašnje membrane mitohondrija - zapaženi efekat bio je uporediv sa onim postignutim pri tretmanu metforminom bez prisustva insulina. Efekat je bio isti u ćelijama gajenim u oba ispitivana medijuma. Terapijska koncentracija metformina pri istovremenom tretmanu sa insulinom nije dovela do promena u mitohondrijskom membranskom potencijalu (slika 18).



**Slika 18. Istovremeni tretman metforminom milimolarne koncentracije i insulinom dovodi do depolarizacije unutrašnje membrane mitohondrija.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom (25 mM) i niskom (5,5 mM) koncentracijom glukoze, istovremeno su tretirane metforminom koncentracija 50  $\mu$ M i 5 mM i insulinom koncentracije 60 nM, u trajanju od 24 h. Mitohondrijski membranski potencijal meren je protočnom citofluorimetrijom, korišćenjem fluorohroma JC-1. Promena mitohondrijskog membranskog potencijala prati se kao promenu odnosa FL1/FL2. Prikazana je relativna promena intenziteta fluorescencije uzoraka u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije), čija je vrednost postavljena na 1. Prikazani su svi rezultati dva nezavisna eksperimenta rađena u tehničkom duplikatu. \* -  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije). HG - medijum sa visokom koncentracijom glukoze (eng. *high glucose*), LG - medijum sa niskom koncentracijom glukoze (eng. *low glucose*).

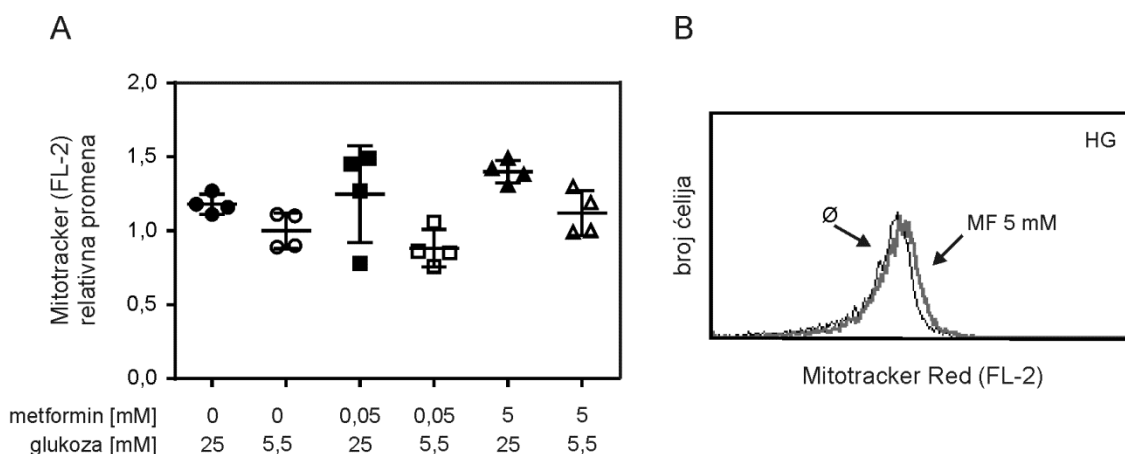


## 4.7. Uticaj metformina na mitohondrijski sadržaj i morfologiju

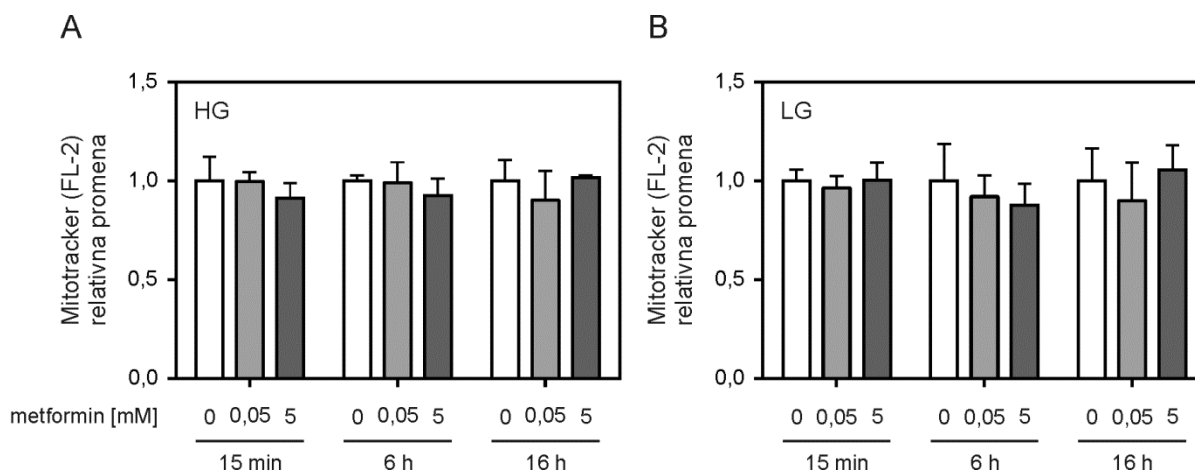
Sadržaj mitohondrija meren je protočnom citofluorimetrijom kao i konfokalnom mikroskopijom, korišćenjem u oba slučaja boje specifične za mitohondrije MitoTracker Red. Konfokalnom mikroskopijom analizirana je i morfologija i veličina mitohondrija.

### 4.7.1. Metformin ne utiče na sadržaj mitohondrija meren protočnom citofluorimetrijom

Ćelije su tretirane odabranim koncentracijama metformina (50  $\mu$ M i 5 mM) u trajanju od 24 h. Sadržaj mitohondrija meren je na osnovu intenziteta fluorescencije fluorofore *MitoTracker Red* metodom protočne citofluorimetrije. Tretman ni jednom od ispitivanih koncentracija metformina nije uticao na ukupnu količinu mitohondrija (slika 19). Ispitivanjem kraćih trajanja tretmana potvrđeno je da do promene u količini mitohondrija ne dolazi ni pri tretmanu metforminom od 15 min, 6 h ili 16 h (slika 20).



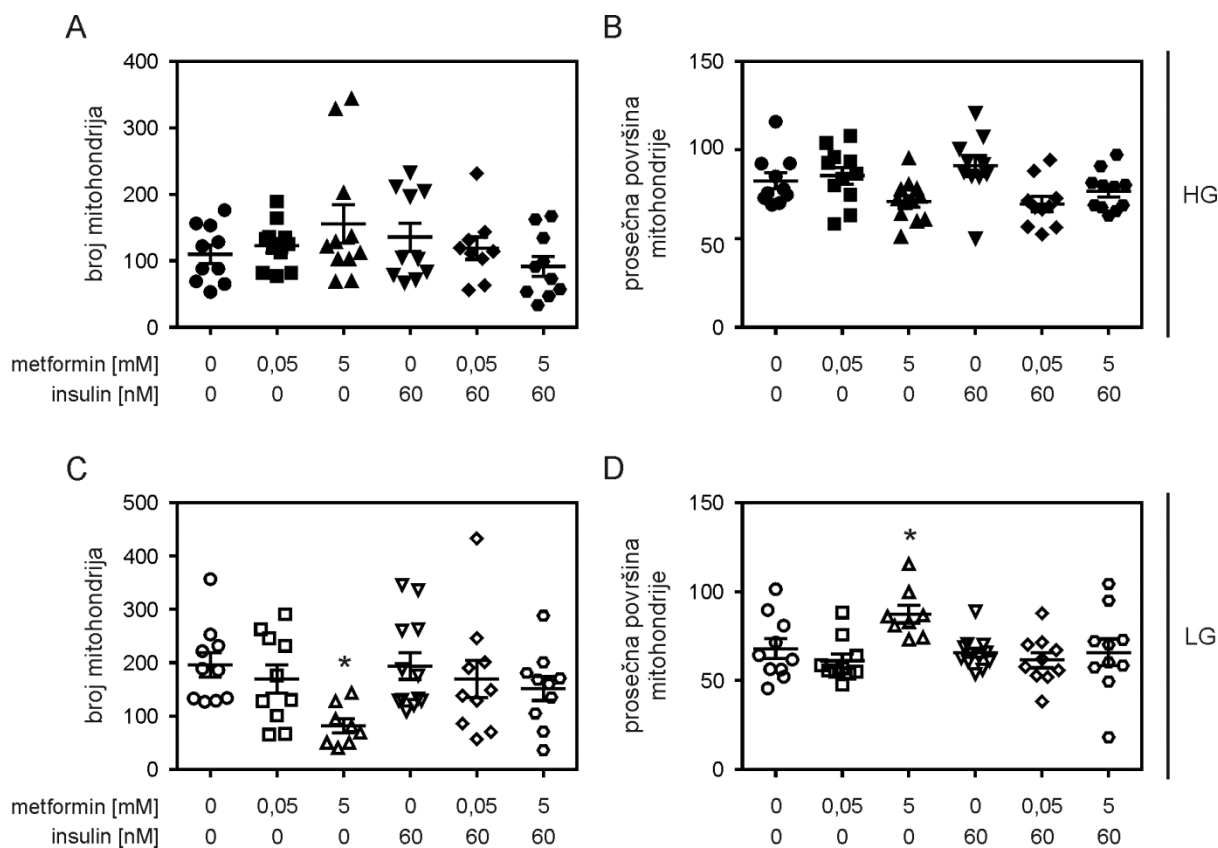
**Slika 19. Primena metformina ne dovodi do promene sadržaja mitohondrija, merenog protočnom citofluorimetrijom.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom (25 mM) i niskom (5,5 mM) koncentracijom glukoze, tretirane su metforminom koncentracija 50  $\mu$ M i 5 mM u trajanju od 24 h. Intenzitet fluorescencije boje specifične za mitohondrije *MitoTracker Red* meren je protočnom citofluorimetrijom. Prikazana je relativna promena intenziteta fluorescencije uzoraka u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije), čija je vrednost postavljena na 1. Prikazani su svi rezultati dva nezavisna eksperimenta rađena u tehničkom duplikatu, sa srednjom vrednošću  $\pm$  SD (A) i reprezentativni histogram (B). HG - medijum sa visokom koncentracijom glukoze (eng. *high glucose*), Ø - kontrola (netretirane ćelije), MF - metformin.



**Slika 20. Tretman metforminom kraći od 24 h ne dovodi do promene sadržaja mitohondrija, merenog protočnom citofluorimetrijom.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom (25 mM) i niskom (5,5 mM) koncentracijom glukoze, tretirane su metforminom koncentracija 50  $\mu$ M i 5 mM u trajanju od 15 min, 6 h i 16 h. Intenzitet fluorescencije boje specifične za mitohondrije *MitoTracker Red* meren je protočnom citofluorimetrijom. Prikazana je relativna promena intenziteta fluorescencije uzoraka u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije), čija je vrednost postavljena na 1. Rezultati 2 nezavisna eksperimenta predstavljeni su kao srednja vrednost  $\pm$  SD. HG - medijum sa visokom koncentracijom glukoze (eng. *high glucose*), LG - medijum sa niskom koncentracijom glukoze (eng. *low glucose*).

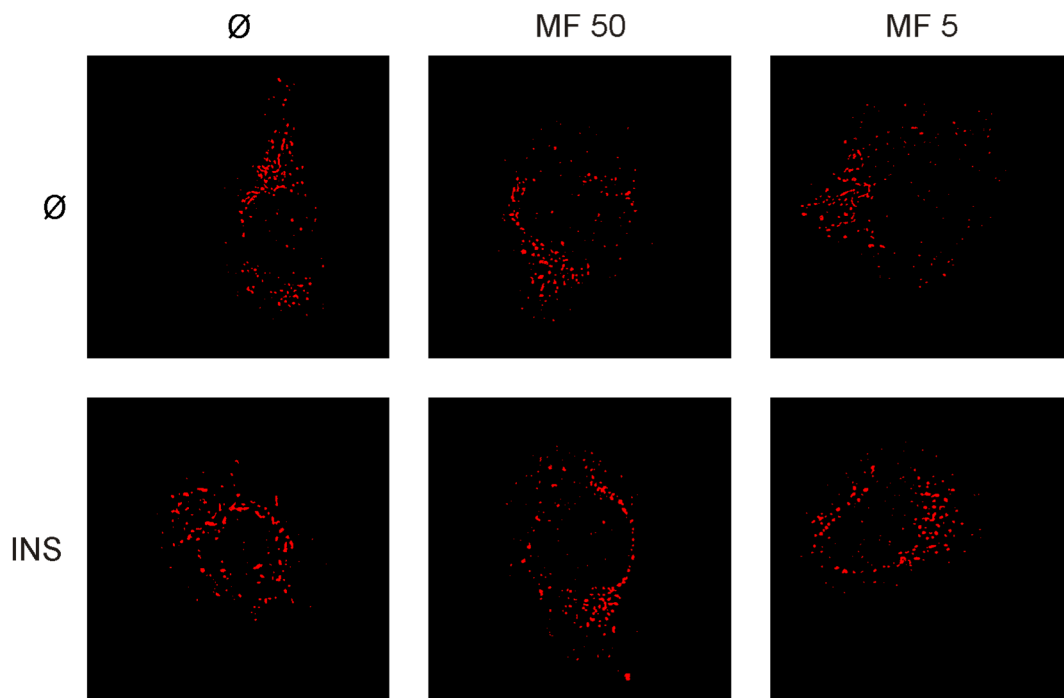
#### 4.7.2. Suprafarmakološka koncentracija metformina dovodi do smanjenja broja i povećanja površine mitohondrija, kod ćelija gajenih u medijum sa niskom koncentracijom glukoze

Analizom mikrografija napravljenih konfokalnom mikroskopijom, nakon bojenja ćelija bojom *MitoTracker Red* i fiksiranja, određen je ukupan broj mitohondrija po ćeliji kao i srednje vrednosti površine mitohondrija. Kod ćelija gajenih u medijumu sa niskom koncentracijom glukoze uočeno je da suprafarmakološka koncentracija metformina (5 mM) dovodi do smanjenja broja i povećanja površine mitohondrija, u odnosu na odgovarajuće kontrolne (netretirane) ćelije (slika 21 C i D). Ovakva promena nije uočena kod ćelija gajenih u HG medijumu (slika 21 A i B), kao ni pri istovremenom tretmanu insulinom i metforminom suprafarmakološke koncentracije.

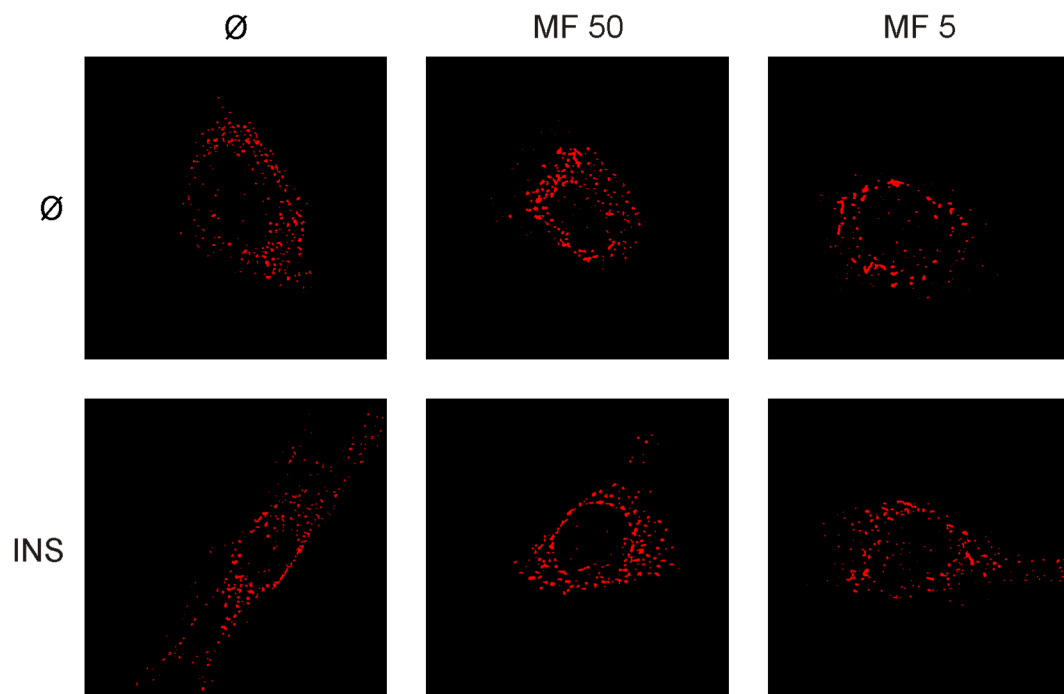


**Slika 21. Primena milimolarne koncentracije metformina izaziva smanjenje broja i povećanje površine mitohondrija, kod ćelija gajenih u medijumu sa niskom koncentracijom glukoze.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom (25 mM) i niskom (5,5 mM) koncentracijom glukoze, tretirane su metforminom koncentracija 50  $\mu$ M i 5 mM, kao i istovremenim tretmanom metforminom (50  $\mu$ M i 5 mM) i insulinom (60 nM), u trajanju od 24 h. Ćelije su obojene bojom specifičnom za mitohondrije, *MitoTracker Red*, a broj i površina mitohondrija kvantifikovani su sa mikrografija. Prikazani su rezultati kvantifikacije 10 mikrografija (ćelija), sa srednjim vrednostima  $\pm$  SD. \* -  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije). HG - medijum sa visokom koncentracijom glukoze (eng. *high glucose*), LG - medijum sa niskom koncentracijom glukoze (eng. *low glucose*).

Promena u brojnosti i površini mitohondrija uočava se na mikrografijama - mitohondrije ćelija tretiranih metforminom suprafarmakološke koncentracije, gajenih u LG medijumu, su veće i izduženije, ali primetno malobrojnije u odnosu na netretirane ćelije (slika 23). Terapijska koncentracija metformina (50  $\mu$ M) nije dovela do ovakvih promena (slike 22 i 23).



**Slika 22. Primena metformina i insulina ne dovodi do promene broja i morfologije mitohondrija, kod ćelija gajenih u medijumu sa visokom koncentracijom glukoze.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom koncentracijom glukoze (25 mM), tretirane su metforminom koncentracija 50  $\mu$ M i 5 mM, kao i istovremenim tretmanom metforminom (50  $\mu$ M i 5 mM) i insulinom (60 nM), u trajanju od 24 h. Ćelije su obojene bojom specifičnom za mitohondrije, *MitoTracker Red*. Prikazane su reprezentativne mikrofografije, jedne od 10 ćelija slikanih po uzorku. Ø – kontrola (netretirane ćelije), MF – metformin, INS – insulin.



**Slika 23. Primena milimolare koncentracije metformina dovodi do promene broja i morfologije mitohondrija, kod ćelija gajenih u medijumu sa niskom koncentracijom glukoze.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa niskom koncentracijom glukoze (5,5 mM), tretirane su metforminom koncentracija 50  $\mu$ M i 5 mM, kao i istovremenim tretmanom metforminom (50  $\mu$ M i 5 mM) i insulinom (60 nM), u trajanju od 24 h. Ćelije su obojene bojom specifičnom za mitohondrije, *MitoTracker Red*.

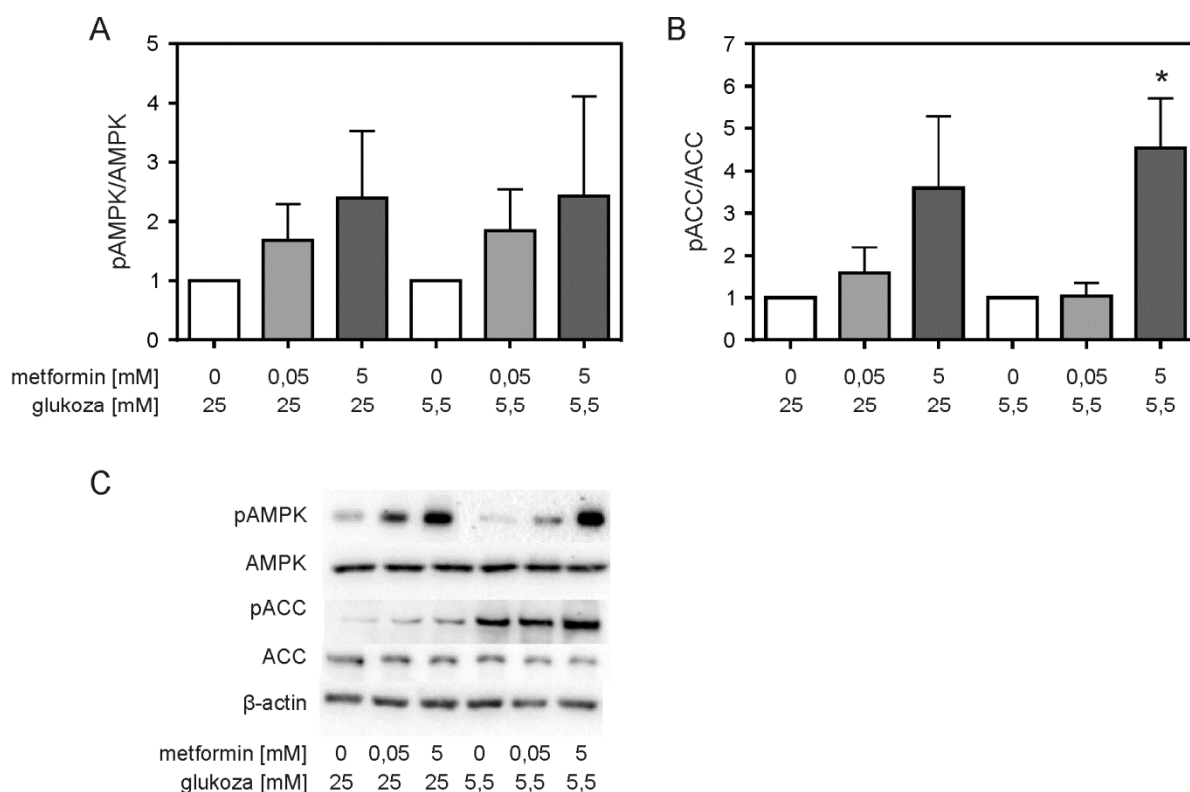
Prikazane su reprezentativne mikrografije, jedne od 10 ćelija slikanih po uzorku. Ø – kontrola (netretirane ćelije), MF – metformin, INS – insulin.

#### 4.8. Uticaj metformina na aktivnost signalnih puteva AMPK i PI3K/Akt

Aktivnost signalnih puteva AMPK i PI3K/Akt ispitivana je metodom imunoblot, merenjem nivoa fosforilanih formi proteina AMPK, ACC, Akt i GSK3 $\beta$  u ćelijama, nakon 24 h tretmana metforminom koncentracije 50  $\mu$ M ili 5 mM.

##### 4.8.1. Signalni putevi AMPK i PI3K/Akt aktivirani su suprafarmakološkom, ali ne i terapijskom koncentracijom metformina

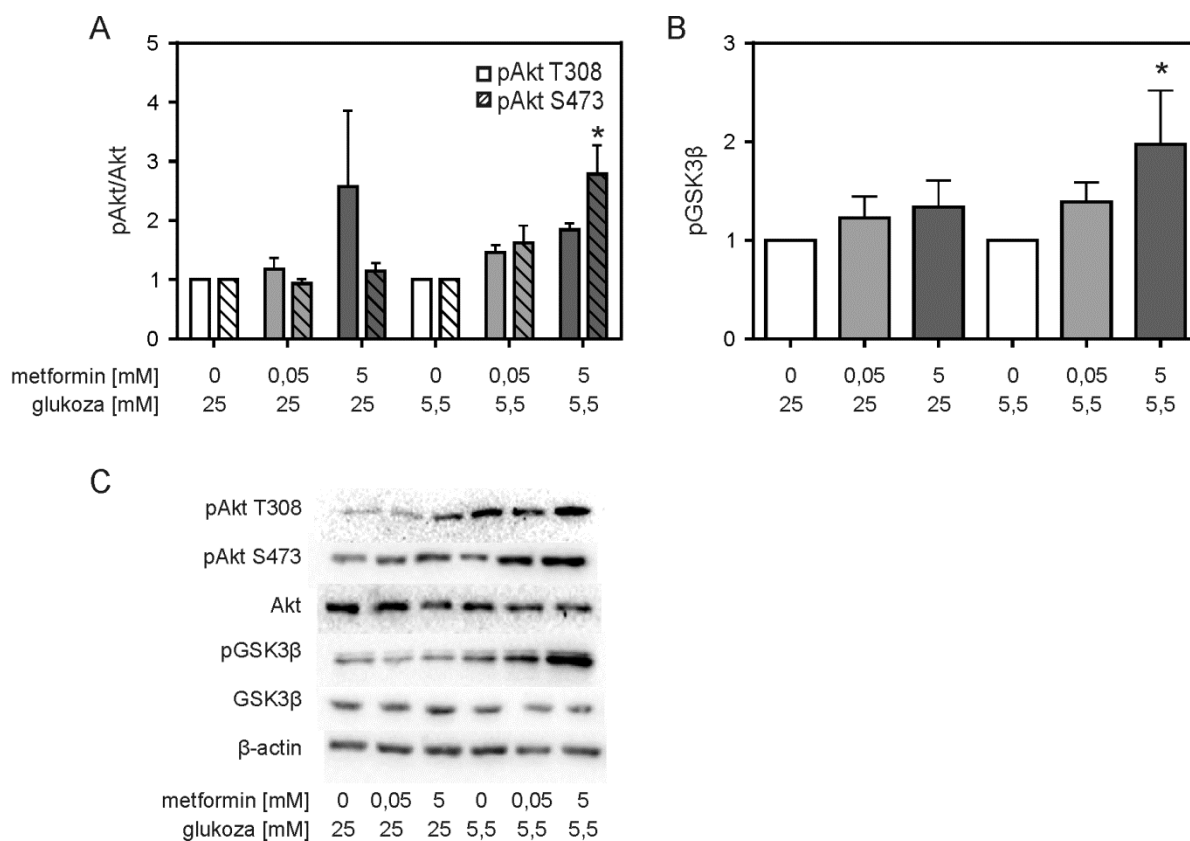
Trend ka povećanju nivoa fosforilane forme AMPK (Thr172) i njenog nishodnog supstrata ACC, uočen je pri tretmanu metforminom koncentracije 5 mM, ali ne i 50  $\mu$ M (slika 24). Ovo je uočeno u ćelijama gajenim u oba medijuma, a efekat je bio izraženiji u medijumu sa niskom koncentracijom glukoze (povećanje od 2-5 puta u HG i 2-7 puta u LG). Ovo ukazuje na aktivaciju signalnog puta AMPK suprafarmakološkom koncentracijom metformina.



**Slika 24. Primena milimolarne koncentracije metformina dovodi do povećanja fosforilacije proteina AMPK signalnog puta.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom (25 mM) i niskom (5,5 mM) koncentracijom glukoze, tretirane su metforminom koncentracija 50  $\mu$ M i 5 mM u trajanju od 24 h. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi proteina od interesa – fosforilanih formi i ukupnih proteina (pAMPK Thr172, AMPK, pACC Ser79, ACC,  $\beta$ -aktin) jednog od 3 nezavisna eksperimenta sa sličnim rezultatima (C). Denzitometrijska analiza (A i B) predstavljena je kao relativna promena u odnosu na netretirane ćelije, čija je vrednost postavljena na 1, a prikazana je srednja vrednost  $\pm$ SD. Nivoi svih proteina normalizovani su na nivo  $\beta$ -aktina, a fosforilane forme proteina izražene su

relativno na ukupni nivo istog proteina. \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije), broj nezavisnih eksperimenata  $n \geq 3$ .

Pri tretmanu metforminom suprafarmakološke koncentracije uočen je trend ka povećanju nivoa fosforilisane forme kinaze Akt, za oba mesta fosforilacije (1,5-5 puta za Thr308 i 1,5-3,5 puta za Ser473), kao i za nivo fosforilisane forme GSK3 $\beta$ , koja je nishodni supstrat Akt kinaze (1,3-3,5 puta povećanja) (slika 25). Statističku značajnost razlike dostigle su promene u nivou pAkt S473 i GSK3 $\beta$ , u ćelijama gajenim u LG medijumu.

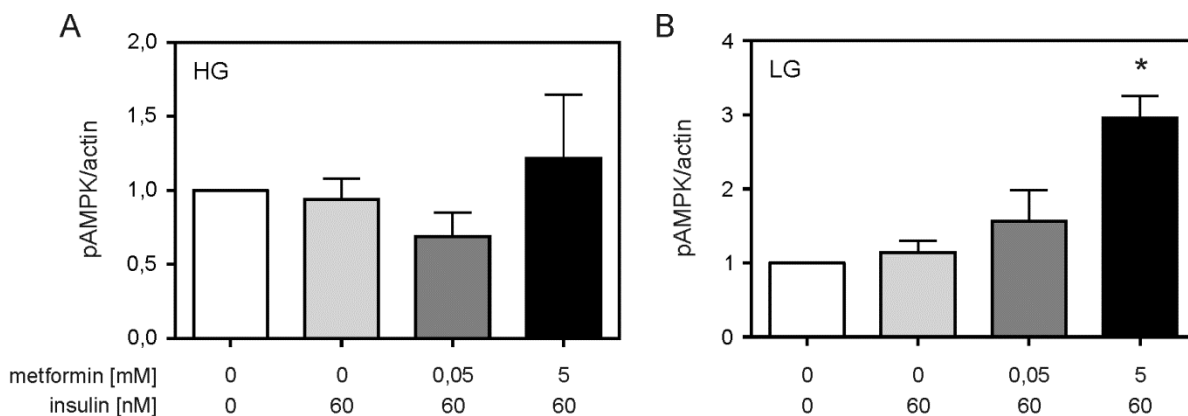


**Slika 25. Primena milimolarne koncentracije metformina dovodi do povećanja fosforilacije proteina PI3K/Akt signalnog puta.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom (25 mM) i niskom (5,5 mM) koncentracijom glukoze, tretirane su metforminom koncentracija 50  $\mu$ M i 5 mM u trajanju od 24 h. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi proteina od interesa – fosforilisanih formi i ukupnih proteina (pAkt Ser473, pAkt Thr308, Akt, pGSK3 $\beta$  Ser9, GSK3 $\beta$ ,  $\beta$ -aktin) jednog od 3 nezavisna eksperimenata sa sličnim rezultatima (C). Denzitometrijska analiza (A i B) predstavljena je kao relativna promena u odnosu na netretirane ćelije, čija je vrednost postavljena na 1, a prikazana je srednja vrednost  $\pm$ SD. Nivoi svih proteina normalizovani su na nivo  $\beta$ -aktina, a fosforilisane forme proteina izražene su relativno na ukupni nivo istog proteina. \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije), broj nezavisnih eksperimenata  $n \geq 3$ .

#### 4.8.2. Istovremeni tretman insulinom menja efekte metformina na signalne puteve AMPK i PI3K/Akt

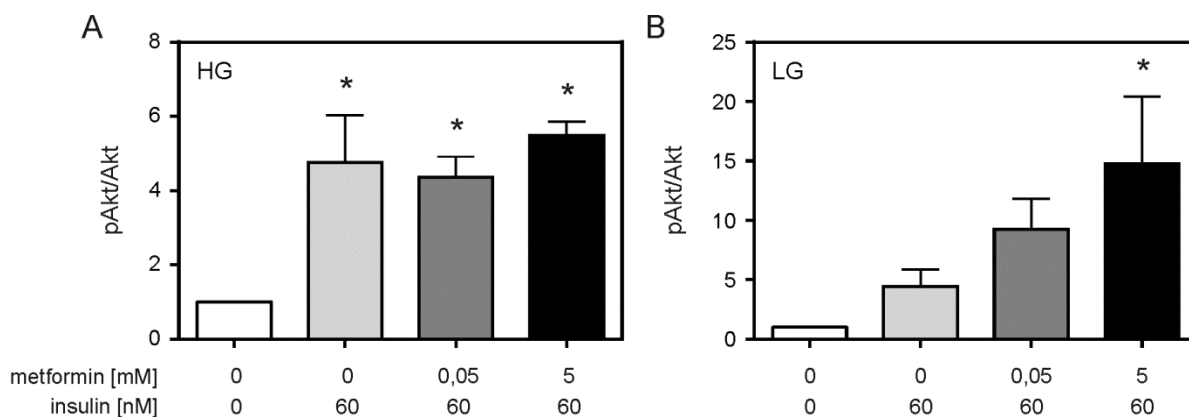
Poznato je da signalni putevi AMPK i PI3K/Akt međusobno interaguju, kao i da na oba signalna puta utiče dostupnost energetskih supstrata. Nakon što je utvrđeno kako različite

koncentracije metformina deluju na signalne puteve AMPK i PI3K/Akt, radi ispitivanja interakcije ovih signalnih puteva ćelije su izložene istovremenom tretmanu metforminom i insulinom, u trajanju od 24 h. Kod ćelija gajenih u HG medijumu, istovremeni tretman metforminom (5 mM) i insulinom nije doveo do povećanja fosforilacije AMPK (slika 26A). Za razliku od ovoga, u ćelijama gajenim u LG medijumu, istovremeni tretman metforminom (5 mM) i insulinom doveo je do povećanja fosforilacije AMPK, u odnosu na kontrolne, netretirane ćelije (slika 26B).



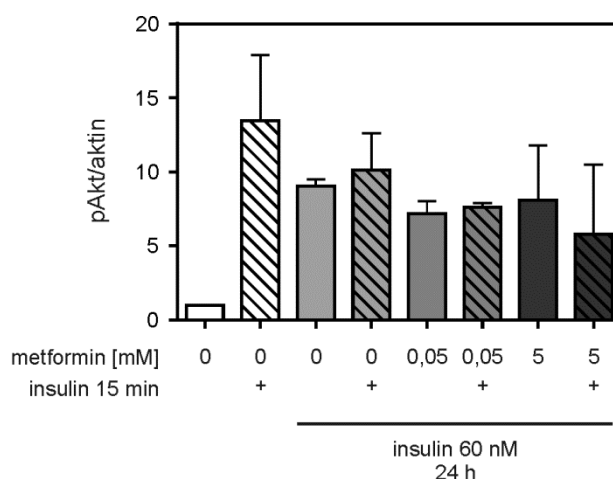
**Slika 26. Istovremeni tretman insulinom dovodi do gubitka efekta metformina na AMPK put u ćelijama gajenim u medijumu sa visokom koncentracijom glukoze.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom (25 mM) i niskom (5,5 mM) koncentracijom glukoze, istovremeno su tretirane metforminom (50  $\mu$ M i 5 mM) i insulinom (60 nM), u trajanju od 24 h. Denzitometrijska analiza predstavljena je kao relativna promena u odnosu na netretirane ćelije, čija je vrednost postavljena na 1, a prikazana je srednja vrednost  $\pm$ SD. Nivo fosforilisane forme proteina AMPK (pAMPK Thr172) normalizovan je na nivo  $\beta$ -aktina. \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije), broj nezavisnih eksperimenata  $n \geq 3$ . HG - medijum sa visokom koncentracijom glukoze (eng. *high glucose*), LG - medijum sa niskom koncentracijom glukoze (eng. *low glucose*).

Tretman insulinom dovodi do hronične aktivacije signalnog puta PI3K/Akt, što se ogleda u povećanom nivou fosforilisane forme Akt kinaze. U slučaju istovremenog tretmana sa metforminom, ovo je dovelo do toga da metformin nije izazvao dodatno povećanje fosforilacije, što je zapaženo u ćelijama gajenim u HG medijumu (slika 27A). Sa druge strane, ćelije gajene u LG medijumu odgovorile su na istovremeni tretman insulinom i metforminom koncentracije 5 mM isto kao i u slučaju samostalnog tretmana metforminom, tj. metformin suprafarmakološke koncentracije u kombinaciji sa insulinom doveo je do značajnog povećanja nivoa fosforilisane forme Akt kinaze u odnosu na netretirane ćelije (slika 27B).



**Slika 27. Istovremeni tretman insulinom dovodi do gubitka efekta metformina na PI3K/Akt put u ćelijama gajenim u medijumu sa visokom koncentracijom glukoze.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom (25 mM) i niskom (5,5 mM) koncentracijom glukoze, istovremeno su tretirane metforminom (50  $\mu$ M i 5 mM) i insulinom (60 nM), u trajanju od 24 h. Denzitometrijska analiza predstavljena je kao relativna promena u odnosu na netretirane ćelije, čija je vrednost postavljena na 1, a prikazana je srednja vrednost  $\pm$ SEM. Nivo fosforilisane forme kinaze Akt (pAkt Ser473) izražen je relativno na ukupni nivo istog proteina. \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije), broj nezavisnih eksperimenata  $n = 3$ . HG - medijum sa visokom koncentracijom glukoze (eng. *high glucose*), LG - medijum sa niskom koncentracijom glukoze (eng. *low glucose*).

Da bi se ispitalo da li metformin povećava senzitivnost insulinskog signalnog puta u mišićnim ćelijama, ćelije gajene u medijumu sa visokom koncentracijom glukoze tretirane su insulinom (60 nM) u trajanju od 24 h, što dovodi do smanjene senzitivnosti na insulin. Ove ćelije izložene su istovremenom tretmanu metforminom koncentracije 50  $\mu$ M ili 5 mM. Senzitivnost na insulin ispitana je merenjem porasta nivoa fosforilisane forme Akt-a nakon kratkotrajnog tretmana insulinom (120 nM, 15 min). Tretman metforminom nije doveo do povećane senzitivnosti ćelija tretiranih insulinom, gajenih u HG medijumu – insulinski stimulus nije doveo do značajnog povećanja nivoa pAkt u ovim ćelijama (slika 28).

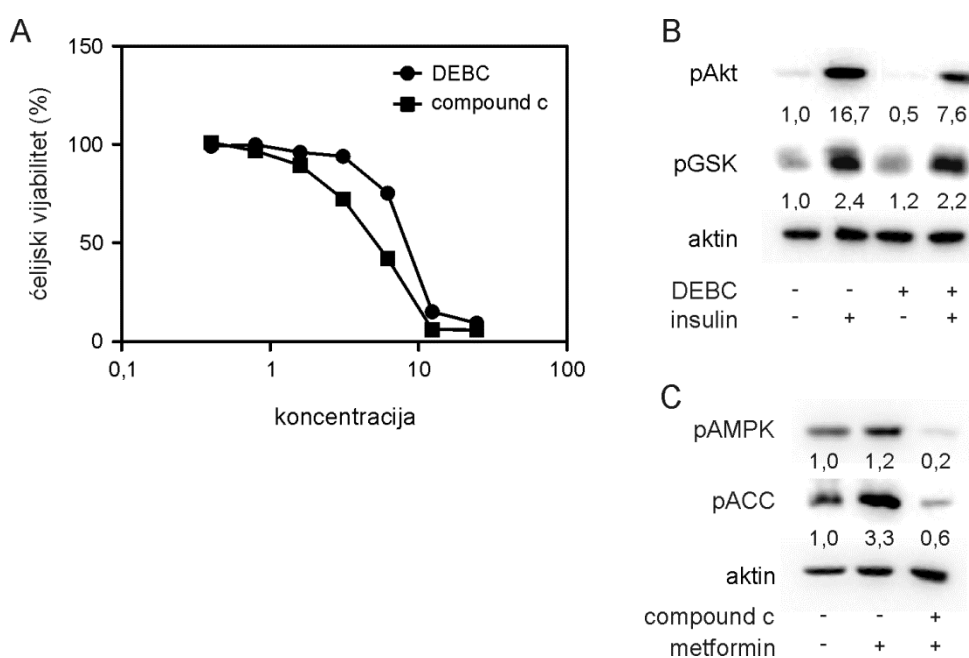


**Slika 28. Istovremeni tretman metforminom ne dovodi do povećanja senzitivnosti na insulin kod ćelija tretiranih insulinom.** C2C12 ćelije gajene u medijumu sa visokom koncentracijom glukoze (25 mM) tretirane su metforminom koncentracija 50  $\mu$ M i 5 mM u kombinaciji sa insulinom koncentracije 60 nM, u trajanju od 24 h, sa ili bez stimulacije insulinom (120 nM, 15 min). Denzitometrijska analiza predstavljena je kao relativna promena u odnosu na netretirane ćelije, čija je vrednost postavljena na 1, a prikazana je srednja vrednost  $\pm$ SEM, broj nezavisnih eksperimenata  $n = 2$ . Nivo fosforilisane forme proteina Akt (pAkt Ser473) normalizovan je na nivo  $\beta$ -aktina.



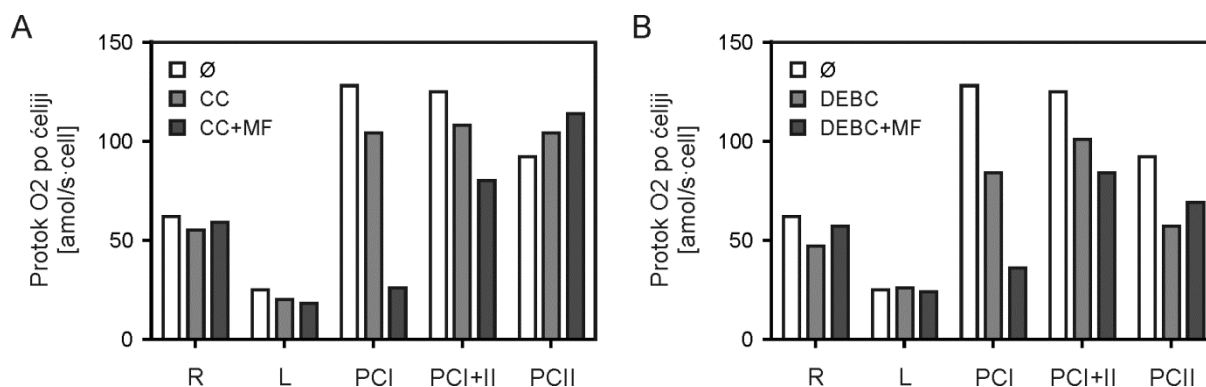
## 4.9. Farmakološka inhibicija signalnih puteva PI3K/Akt i AMPK

Uticaj farmakološke inhibicije komponenti signalnih puteva PI3K/Akt i AMPK na efekte metformina ispitan je korišćenjem inhibitora Akt kinaze - DEBC i inhibitora AMPK - dorzomorfin (*compound c*). U cilju optimizacije koncentracija ovih supstanci za upotrebu na ćelijskoj liniji C2C12, ispitan je uticaj inhibitora na vijabilitet ćelija, pri tretmanu od 24 h. DEBC je doveo do drastičnog smanjenja vijabiliteta u koncentracijama preko 6  $\mu\text{M}$ , a dorzomorfin je pokazao veću toksičnost, dovodeći do smanjenja vijabiliteta u koncentracijama preko 3  $\mu\text{M}$  (slika 29A). Da bismo potvrdili inhibiciju signalnih puteva PI3K/Akt odnosno AMPK, pri korišćenju odabranih koncentracija i trajanja tretmana, korišćena je metoda imunoblota. Količina fosforilisane forme Akt kinaze merena je pri tretmanu DEBC-om, sa i bez insulinke stimulacije (tretman insulinom koncentracije 120 nM u trajanju od 15 minuta), koja dovodi do aktivacije signalnog puta insulina. Količina fosforilisane forme AMPK merena je pri tretmanu dorzomorfinom, sa i bez tretmana metforminom kao aktivatorom AMPK. Sa oba inhibitora pokazano je da tretman u trajanju od 90 minuta inhibira fosforilaciju ciljnih kinaza (slika 29 B i C). Tretman istim koncentracijama u trajanju od 24 h doveo je do ćelijske smrti, dok niže koncentracije nisu bile efikasne u inhibiciji fosforilacije AMPK i Akt (rezultati nisu prikazani).



**Slika 29. Optimizacija koncentracije farmakoloških inhibitora signalnih puteva.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom koncentracijom glukoze (25 mM), tretirane su širokim opsegom koncentracija inhibitora 10-DEBC hidrohlorida i *compound c* (0,4-25  $\mu\text{M}$ ), u trajanju od 24 h, a ćelijski vijabilitet je meren testom aktivnosti kisele fosfataze. Prikazani su rezultati po jednog reprezentativnog eksperimenta (sa 6 tehničkih replikata). Ćelijski vijabilitet izražen je u procentima, u odnosu na vijabilitet netretiranih ćelija (negativne kontrole) koji je izražen kao 100%, a koncentracije inhibitora su grafički izražene na logaritamskoj skali (x-osa,  $\log_{10}$ ) (A). C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom koncentracijom glukoze (25 mM), tretirane su inhibitorima: 10-DEBC hidrohlorid (10  $\mu\text{M}$ , 90 min) i *compound c* (5  $\mu\text{M}$ , 90 min). Kao aktivatori signalnih puteva PI3K/Akt i AMPK, korišćeni su insulin (120 nM, 15 min), odnosno metformin (5 mM, 1 h). Prikazani su reprezentativni imunoblotovi proteina od interesa: pAkt Ser473, pGSK3 $\beta$ ,  $\beta$ -aktin (B) i pAMPK Thr172, pACC Ser79,  $\beta$ -aktin (C), a ispod traka izraženi su rezultati denzitometrijske analize nivoa proteina, kao relativna promena u odnosu na netretirane ćelije.

Zbog toga što pri tretmanu u trajanju od 24 h nije bilo moguće izazvati inhibiciju ciljnih kinaza farmakološkim inhibitorima bez izazivanja ćelijske smrti, nije bilo moguće koristiti inhibitore u eksperimentima gde su efekti uočeni pri ovom trajanju tretmana metforminom. Pošto je prethodno pokazano da metformin koncentracije 5 mM gotovo trenutno dovodi do inhibicije mitohondrijske respiracije, ovaj model iskorišćen je za esperiment sa inhibitorima. C2C12 ćelije tretirane su inhibitorima DEBC (10  $\mu$ M) i *compound c* (5  $\mu$ M) u trajanju od 90 minuta. Mitohondrijska respiracija merena je respirometrijom visoke rezolucije, uz dodavanje metformina (5 mM) direktno u komoru aparata. Sam tretman inhibitorima doveo je do blagog sniženja mitohondrijske respiracije u svim respiratornim stanjima, u odnosu na netretirane, kontrolne ćelije. Međutim, nakon dodavanja metformina, efekat na smanjenje mitohondrijske respiracije bio je isti kao i kod ćelija koje prethodno nisu tretirane inhibitorima (slika 30). Ovo ukazuje na nezavisnost procesa inhibicije mitohondrijske respiracije od signalnih puteva PI3K/Akt i AMPK.



**Slika 30. Farmakološka inhibicija aktivnosti proteina Akt i AMPK ne utiče na inhibiciju mitohondrijske respiracije od strane metformina.** C2C12 ćelije, gajene u medijumu sa visokom koncentracijom glukoze (25 mM), tretirane su inhibitorima *compound c* (5  $\mu$ M) (A) i 10-DEBC hidrohlorid (10  $\mu$ M) (B) u trajanju od 90 min. Metformin (5 mM) je dodavan direktno u komoru mernog aparata. Mitohondrijska funkcija permeabilizovanih ćelija je merena respirometrijom visoke rezolucije. Prikazani su rezultati po jednog reprezentativnog eksperimenta. ∅ – kontrola – netretirane ćelije, CC - *compound c*, MF – metformin, R – ROUTINE, L – LEAK, PCI – OXPHOS CI, PCI+II – OXPHOS CI + CII, PCII – OXPHOS CII, CIV - kompleks IV (eng. *complex IV*).

# **5. DISKUSIJA**

Naši rezultati ukazuju na to da koncentracije metformina, koje su uporedive sa koncentracijama izmerenim u plazmi pacijenata na terapiji metforminom (u mikromolarnom opsegu), imaju drugačiji efekat u mišićnim ćelijama u odnosu na suprafarmakološke (milimolarne) koncentracije koje se uobičajeno primenjuju u ispitivanjima *in vitro*. Pri primeni metformina mikromolarne koncentracije *in vitro*, u našim eksperimentima nije došlo do inhibicije kompleksa I, niti do aktivacije AMPK, u mišićnim ćelijama C2C12. Takođe, dostupnost glukoze u ćelijskom medijumu suptilno je uticala na odgovor ćelija na tretman višim koncentracijama metformina - efekat na inhibiciju kompleksa I, depolarizaciju mitohondrijske membrane i aktivaciju AMPK bio je izraženiji u ćelijama gajenim u medijumu sa niskom koncentracijom glukoze. Nasuprot ovome, kod ćelija gajenih u medijumu sa visokom koncentracijom glukoze, primena metformina milimolarne koncentracije je izazvala izraženije povećanje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta u odnosu na ćelije gajene u medijumu sa niskom koncentracijom glukoze.

## **5.1. Uticaj visokih koncentracija metformina na ćelijski vijabilitet**

U većini studija koje su se bavile ispitivanjem mehanizama dejstva metformina na ćelijskim linijama nije prikazano da li korišćeni tretman utiče na vijabilitet ćelija. Iako je u mnogim radovima pokazano da metformin izaziva smrt tumorskih ćelija [211–213], podaci o efektima metformina na vijabilitet netumorskih ćelija su oskudni i nekonzistentni (neka istraživanja pokazuju citotoksične efekte visokih koncentracija metformina na netumorsku ćelijsku liniju keratinocita [214,215]). Sa druge strane, nije uočeno smanjenje vijabiliteta mišićnih ćelija usled tretmana milimolarnom koncentracijom metformina [216], što se može objasniti i kratkim trajanjem tretmana (1 h). Takođe, pokazano je da metformin može da potire negativne efekte koji se uočavaju prilikom primene drugih supstanci, kao što su visoke koncentracije lipida i glukoze, te dovodi do boljeg preživljavanja ćelija izloženih ovim tretmanima [217–220]. U našem istraživanju, tretman milimolarnim koncentracijama metformina u trajanju od 24 h doveo je do smanjenja vijabiliteta C2C12 ćelija. Ovo dovodi u pitanje relevantnost mehanizama pokazanih korišćenjem visokih koncentracija metformina *in vitro*, tj. njihovo ekstrapoliranje na kontekst terapijskih efekata u organizmu.

## **5.2. Mehanizmi antidijabetičkog delovanja metformina u mišićnim ćelijama**

### **5.2.1. Unos glukoze u ćelije**

Unos glukoze u ćelije skeletnog mišića zavisao je od dejstva insulina i posledične egzocitoze vezikula koje sadrže GLUT4 transportere [82]. Isti mehanizam pokreće i aktivacija AMPK [75]. Kako je u tipu 2 dijabetesa smanjen unos glukoze u mišićne ćelije, jedan od pretpostavljenih mehanizama terapijskog dejstva metformina u mišiću je i reverzija ovog efekta. Pokazano je da metformin povećava unos glukoze u skeletne mišiće ljudi i eksperimentalnih životinja [221], kao i miotube u kulturi [176,222–224], uključujući i C2C12 ćelije [155]. Istraživanja su pokazala da metformin dovodi do povećanog unosa glukoze u mišićne ćelije mehanizmima inhibicije endocitoze GLUT4 transportera [223], aktivacije AS160 i Rab GAP i povećanja ekspresije Rab4 [225]. Nasuprot ovome, postoje studije koje pokazuju da metformin ne dovodi do povećanog unosa glukoze u mišićne ćelije [226,227], što se može

objasniti razlikama u dizajnu (ove studije izvođene su *in vivo* ili *ex vivo* na mišiću ljudi). Prema našim rezultatima, primena metformina u milimolarnoj koncentraciji dovela je do povećanog unosa glukoze u ćelije, dok je kod primene terapijske koncentracije metformina (50  $\mu\text{M}$ ) taj efekat izostao. Nasuprot ovome, u studiji u kojoj je pokazano da metformin povećava unos glukoze u primarne miotube čoveka, najjači efekat registrovan je pri korišćenju 50  $\mu\text{M}$  metformina [222]. Uzrok izostanka efekta pri korišćenju terapijske koncentracije u našem slučaju mogao bi se pripisati metodološkim ograničenjima - unos glukoze u ćelije kvantifikovan je indirektno, merenjem koncentracije glukoze u ćelijskom medijumu. U našem istraživanju nije uočena razlika u efektima metformina između ćelija gajenih u medijumima sa različitim početnom koncentracijom glukoze, iako je u jednom prethodno publikovanom istraživanju pokazano da povećanje koncentracije glukoze u medijumu povećava unos 2-deoksiglukoze u mišićne ćelije [222]. U našem istraživanju meren je unos glukoze nezavisan od insulina, tako da ovaj rezultat ne daje informaciju o uticaju metformina na insulinu senzitivnost mišićnih ćelija, već na efekte nezavisne od insulina. Ovakav dizajn je u skladu sa podacima iz literature - prethodno je pokazano da metformin povećava insulin-nezavisan, ali ne i insulin-zavisan unos glukoze u mišićne ćelije [155,222,223].

### 5.2.2. Uticaj metformina na respiratornu funkciju mitohondrija

Među predlaganim mehanizama dejstva metformina, centralno mesto zauzima inhibicija respiratorne funkcije mitohondrija [193]. U većini istraživanja u kojima je ispitivan efekat metformina u uslovima *in vitro*, a u kojima je pokazano da metformin inhibira kompleks I respiratornog lanca mitohondrija (korišćenjem respirometrije ili spektrofotometrijskog merenja aktivnosti izolovanog kompleksa I), korišćene su suprafarmakološke, milimolarne koncentracije metformina [143,158,167,228,229]. Takođe, u istraživanjima na eksperimentalnim životinjama, inhibicija respiracije u mišiću postignuta je korišćenjem visokih doza metformina (100 i 300 mg/kg/dan) [175]. Podaci o efektima metformina na mitohondrijsku funkciju u skeletnom mišiću ljudi vrlo su oskudni, ali u jednom istraživanju pokazano je da je respiracija izmerena u mišićnim biopsijama pacijenata na terapiji metforminom jednaka onoj kod zdravih kontrola [189]. Visoke koncentracije metformina koje su potrebne da izazovu inhibiciju kompleksa I respiratornog lanca dovode u pitanje značaj ovog mehanizma u terapijskom delovanju metformina [192].

Kao razlog za primenu visokih koncentracija metformina u istraživanjima *in vitro* najčešće je navođena pretpostavka da u uslovima *in vivo*, usled mitohondrijskog membranskog potencijala dolazi do akumulacije pozitivno naelektrisanih molekula metformina u matriksu mitohondrija [143,167]. Fiziološka razlika potencijala ( $\Delta\Psi$ ) na unutrašnjoj membrani mitohondrija od 120-150 mV mogla bi da dovede do koncentrovanja metformina u matriksu mitohondrija 100-300 puta u odnosu na koncentraciju u okolnom rastvoru [167]. Imajući to u vidu, ukoliko se u eksperimentima koriste intaktne ćelije, pretpostavka je da će doći do akumulacije metformina unutar mitohondrija, te je za inhibiciju funkcije kompleksa I potrebna manja koncentracija u odnosu na koncentraciju metformina koja je potrebna da dovede do inhibicije izolovanog kompleksa I. Ova pretpostavka eksperimentalno je podržana razlikama u izmerenim koncentracijama potrebnim za inhibiciju aktivnosti kompleksa I za 50% ( $\text{IC}_{50}$  vrednostima) kod različitih vrsta uzoraka: za izolovani kompleks I ili submitohondrijske čestice, izmerene su vrednosti u opsegu od 19 do 80 mM [143,166,167], za izolovane mitohondrije 2-15 mM [143,230], dok su vrednosti koje se navode za intaktne ćelije u mikromolarnom opsegu (330  $\mu\text{M}$  za HepG2 [167]). U skladu sa ovim je i to da su  $\text{IC}_{50}$  vrednosti za izolovani kompleks I i mitohondrije mrkog masnog tkiva iste, s obzirom na smanjen mitohondrijski membranski potencijal usled prisustva UCP1 [229].

U jednom od ranih, uticajnih radova na ovu temu [158], navodi se da metformin (u milimolarnoj koncentraciji) izaziva inhibiciju respiratorne aktivnosti kompleksa I u intaktnim ćelijama jetre, ali ne i u izolovanim mitohondrijama ili permeabilizovanim ćelijama. Ova razlika se objašnjava aktivacijom još uvek neotkrivenog signalnog puta koji dovodi do inhibicije kompleksa I, te je ova hipoteza prihvaćena kao objašnjenje za nekonzistentnost efekta između različitih vrsta uzoraka i u drugim radovima [198]. Nasuprot tome, u drugom radu objavljenom iste godine [143] pokazano je da kratkotrajni tretman metforminom (0-6 h) milimolarne koncentracije inhibira respiraciju izolovanih mitohondrija i submitohondrijskih čestica (eksperimentalno dobijenih vezikula nastalih od unutrašnje mitohondrijske membrane, koje sadrže komplekse respiratornog lanca). Submitohondrijske čestice zahtevale su mnogo više koncentracije da bi došlo do inhibicije, usled toga što u njima ne dolazi do akumulacije metformina. Isti rad pokazuje da čak i tretman mikromolarnim koncentracijama metformina (u trajanju od 24 i 60 h) hepatocita u kulturi izaziva smanjenje respiracije u prisustvu supstrata kompleksa I. Uzimajući u obzir ove podatke, naš eksperimentalni dizajn trebalo bi da omogući akumulaciju metformina i dostizanje koncentracija koje su dovoljno visoke da dovedu do inhibicije kompleksa I. Međutim, ovo nije uočeno - mitohondrijska respiracija bila je neizmenjena nakon 24 h i čak 5 dana tretmana metforminom koncentracije 50  $\mu$ M.

Različita interpretacija sličnih rezultata u pomenutim radovima može se objasniti i merenjem različitih respiratornih stanja [231] - smanjenje respiracije u svim ispitivanim uzorcima pokazano je merenjem u OXPHOS stanju (stanje 3) [143], dok je u eksperimentima u kojima nije uočena inhibicija respiracije merenje vršeno u LEAK stanju (stanje 4) [158]. Merenjem respiracije u oba respiratorna stanja, pokazano je da metformin dovodi do inhibicije respiracije u OXPHOS, ali ne i u LEAK stanju [228,230], što je slučaj i u našim rezultatima na permeabilizovanim ćelijama. Ovo se može objasniti razlikama u ovim respiratornim stanjima - OXPHOS predstavlja respiraciju koja je spregnuta sa sintezom ATP-a, dok LEAK respiracija predstavlja aktivnost respiratornog lanca koja kompenzuje za curenje protona preko unutrašnje mitohondrijske membrane, te služi samo za održavanje mitohondrijskog membranskog potencijala. Takođe, metformin koncentracije 5 mM je u našim eksperimentima na intaktnim ćelijama izazvao smanjenje respiracije u sva tri merena respiratorna stanja (ROUTINE, LEAK i ET). Važno je istaći da ova dva merena LEAK stanja nisu identična, te se ne mogu direktno porediti - u permeabilizovanim ćelijama LEAK stanje mereno je u odsustvu ADP-a (kao i u pomenutom radu [158]), a u intaktnim ćelijama LEAK stanje postiže se dodavanjem inhibitora ATP sintaze, oligomicina. ET je respiratorno stanje u kome je, usled dejstva dekuplujućeg agensa, transport elektrona razdvojen od sinteze ATP-a, a mitohondrijski membranski potencijal se gubi. Inhibicija respiracije u ovom stanju protivna je hipotezi (zastupljenoj u nekim starijim radovima) da rasipanje membranskog potencijala pod dejstvom dekuplujućeg agensa sprečava akumulaciju metformina i posledičnu inhibiciju kompleksa I [163]. Međutim, naši rezultati kao i prethodno publikovani radovi u kojima je pokazana inhibicija respiracije u ET stanju [158,172,191] pokazuju da je inhibicija respiracije metforminom moguća nezavisno od mitohondrijskog membranskog potencijala.

Većina autora je saglasna da metformin specifično inhibira kompleks I [143,158,172,230]. Postoje dokazi koji ukazuju na mogućnost da metformin može da inhibira i kompleks II i mitohondrijsku formu glicerol-3-fosfat dehidrogenaze (eng. *mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase* - mGPD) [185,229], ali u izuzetno visokom koncentracijama (IC<sub>50</sub> vrednosti navedene za CII i mGPD u jednom od radova su 80-180 mM) [229]. Prema našim rezultatima, u ćelijama C2C12, milimolarna koncentracija metformina inhibira kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za kompleks I, dok je kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za kompleks II nepromenjen, a funkcija mGPD nije ispitana.

U malom broju istraživanja ispitivani su efekti primene relativno nižih koncentracija metformina (u mikromolarnom opsegu), ali bez konzistentnih rezultata. U jednom od istraživanja pokazano je da tretman metforminom koncentracije 50  $\mu\text{M}$  dovodi do inhibicije respiracije [143], dok je u drugom tretman metforminom koncentracije 75  $\mu\text{M}$  doveo do povećanja stope respiracije [191] (pri čemu su obe studije koristile ćelijske kulture hepatocita i trajanje tretmana je iznosilo 24 - 48 h). Prema našim rezultatima, najniža ispitana koncentracija koja je dovela do inhibicije mitohondrijske respiracije na permeabilizovanim ćelijama je 1 mM, s tim da je ova koncentracija dovela do inhibicije respiracije samo u OXPHOS CI respiratornom stanju, dok je za inhibiciju ROUTINE respiracije bila potrebna koncentracija od 5 mM. Ovo je u skladu sa drugim publikovanim studijama na mišićnim ćelijama, gde je na primarnoj kulturi miofibrila čoveka pokazan isti trend veće senzitivnosti OXPHOS respiracije na inhibiciju metforminom, iako su koncentracije potrebne za inhibiciju bile nešto niže nego u našem istraživanju (338  $\mu\text{M}$  za OXPHOS i 776  $\mu\text{M}$  za ROUTINE) [224]. Na ćelijskoj liniji C2C12 pokazano je da primena metformina u koncentraciji od 1 mM tokom 48 h dovodi do smanjenja respiracije u svim merenim respiratornim stanjima (uključujući ROUTINE i OXPHOS) [232].

U suprotnosti sa hipotezom da metformin inhibira mitohondrijsku funkciju su nedavno objavljeni radovi koji pokazuju da niske koncentracije metformina dovode do povećanja mitohondrijske respiracije. Pokazano je da primena metformina koncentracije 75  $\mu\text{M}$  dovodi do povećanja mitohondrijske respiracije u primarnim hepatocitima, što je potvrđeno i u animalnom modelu, u jetri miševa tretiranih niskom dozom metformina (50 mg/kg/dan u toku 2 nedelje) [191]. Ovakav efekat na mitohondrijsku funkciju objašnjava se aktivacijom procesa biogeneze mitohondrija, posredstvom aktivacija AMPK [191]. Sa druge strane, u istom istraživanju pokazano je da visoka koncentracija metformina (1 mM) dovodi do inhibicije mitohondrijske respiracije primarnih hepatocita, što ukazuje na potencijalni bifazni efekat metformina na mitohondrijsku respiraciju [191]. Veoma slični efekti uočeni su i na kardiomiocitima, te su ispitivane koncentracije metformina manje od 2,5 mM (1;0,5;0,1 mM) dovele do povećanja respiracije, dok je metformin u koncentracijama preko 5 mM doveo do inhibicije respiracije [172]. Povoljan efekat nižih koncentracija metformina objašnjen je takođe aktivacijom AMPK i stimulacijom biogeneze mitohondrija, što je pokazano gubljenjem ovog efekta usled farmakološke inhibicije aktivnosti AMPK. Prema našim rezultatima, terapijska koncentracija metformina (50  $\mu\text{M}$ ) nije dovela do promene u respiraciji C2C12 miocita, kao ni do povećanja količine mitohondrija niti aktivacije AMPK (o čemu će biti više reči kasnije).

### 5.2.3. Energetski i redoks status ćelija

Ukoliko se prihvati hipoteza da je osnovni mehanizam dejstva metformina inhibicija kompleksa I respiratornog lanca mitohondrija, iz ovoga sledi da dolazi do smanjene sinteze ATP-a, samim tim do pada u energetskom statusu ćelije koji se ogleda u odnosu adeninskih nukleotida (povećanje ADP/ATP i AMP/ATP odnosa). Druga direktna posledica inhibicije kompleksa I je nakupljanje NADH, zbog nemogućnosti njegove reoksidacije na elektron-transportnom lancu, koje se može pratiti kao povećanje odnosa NADH/NAD (redoks statusa). Promene energetskog i redoks statusa mogu uzrokovati promene aktivnosti enzima metaboličkih puteva, koji su regulisani adeninskim nukleotidima, kao i oksidovanom ili redukovanom formom NAD-a [233,234]. Takođe, odnos koncentracija adeninskih nukleotida reguliše aktivnost AMPK, jednog od pretpostavljenih ciljnih molekula metformina [159,235]. Neka istraživanja objašnjavaju dejstvo metformina na aktivaciju AMPK upravo povećanjem koncentracije AMP-a do koje dolazi usled inhibicije mitohondrijske respiracije [162]. Imajući

sve ovo u vidu, promene energetskeg i redoks statusa mogu imati važnu ulogu u mehanizmima dejstva metformina.

U mnogim istraživanjima je pokazano da metformin, pored toga što dovodi do inhibicije mitohondrijske funkcije, dovodi i do promene energetskeg statusa (merenog u ovim radovima kao odnos ATP/ADP, ATP/AMP ili koncentracija ATP-a) u kulturi hepatocita [158,233]. Slični rezultati dobijeni su i na animalnim modelima, merenjem koncentracija adeninskih nukleotida u jetri eksperimentalnih životinja [143,233]. Sa druge strane, u istraživanju u kome je pokazano da mikromolarna (terapijska) koncentracija metformina dovodi do povećanja respiratorne funkcije mitohondrija, u skladu sa tim pokazano je i poboljšanje energetskeg statusa (povećanje koncentracije ATP-a) u primarnim hepatocitima, nakon tretmana terapijskom koncentracijom metformina [191]. Naši rezultati pokazuju da metformin nije uticao na energetske status (ADP/ATP odnos) ćelija C2C12, te čak ni primena metformina u milimolarnoj koncentraciji (5 mM), koja u našim eksperimentima dovodi do inhibicije respiratorne funkcije, nije dovela do promene odnosa ADP/ATP. Slično je pokazano u nizu istraživanja drugih istraživačkih grupa, u kojima primena metformina nije dovela do promene energetskeg statusa ćelija [161,178,185]. Ovo se može objasniti kompenzatornim mehanizmima ćelija - treba imati na umu da je deo ćelija gajen u medijumu sa visokom koncentracijom glukoze (o uticaju dostupnosti glukoze na osetljivost ćelija biće više reči kasnije), kao i da mišićne ćelije sadrže rezerve glikogena, koje im potencijalno omogućavaju kompenzaciju u stanju energetskeg stresa kao što je inhibicija oksidativne fosforilacije, te nadoknađivanje ATP-a putem glikolize, kao i nedostatkom metoda (nedovoljna senzitivnost).

Istraživanja pokazuju da tretman metforminom dovodi do inhibicije kompleksa I, što je praćeno promenom redoks statusa ka redukovanim stanju i u citosolu i u mitohondrijama hepatocita [143,158,236]. Redoks status ovih ćelijskih odeljaka meren je preko odnosa laktat/piruvat (koji odražava redoks status citosola) i 3-hidroksibutirat/acetoacetat (koji odražava redoks status mitohondrija). Međutim, u nekoliko istraživanja je pokazano da mikromolarne koncentracije metformina dovode do redukovanijeg stanja u citosolu (povećanje odnosa laktat/piruvat u odnosu na kontrolne - netretirane ćelije), ali oksidovanijeg u mitohondrijama (smanjenje odnosa 3-hidroksibutirat/acetoacetat) [161,185]. Postoji više mehanizama koji bi mogli objasniti ovaj efekat - jedno od istraživanja predlaže hipotezu da metformin dovodi do direktne inhibicije glicerofosfatnog transportnog sistema, što dalje, usled nemogućnosti prenosa redukcionih ekvivalenata iz citosola u mitohondrije, dovodi do redukovanijeg stanja u citosolu, a oksidovanijeg u mitohondrijama [185]. Nasuprot tome, u drugom istraživanju pokazano je da metformin ne menja aktivnost glicerol-3-fosfat dehidrogenaze, a kao objašnjenje za promene u redoks statusu autori predlažu da akumulacija naelektrisanog molekula metformina u matriksu mitohondrija dovodi do depolarizacije mitohondrija, što ima za posledicu inhibiciju malat-aspartatnog transportnog sistema, čija funkcija je zavisna od elektrohemijskog gradijenta [161]. U našim rezultatima, metformin nije doveo do promene odnosa NAD/NADH na nivou celih ćelija, čak ni pri tretmanu milimolarnom koncentracijom, za koju je potvrđeno da deluje inhibitorno na respiratornu funkciju mitohondrija. Postoje istraživanja u kojima je metformin u mišićnim ćelijama doveo do povećanja odnosa NADH/NAD na nivou čitavih ćelija [224]. Sa druge strane, promena NADH/NAD odnosa (redoks statusa na nivou čitavih ćelija) u nekim istraživanjima izostaje, iako je uočena promena odnosa laktat/piruvat i 3-hidroksibutirat/acetoacetat tj. surogat markera redoks statusa u citosolu i mitohondrijama [185]. Lokalne promene redoks statusa u pojedinim ćelijskim odeljcima (mitohondrijama i citosolu) mogu sprečiti uočavanje promene redoks statusa na nivou cele ćelije, posebno ako se zbog svog suprotnog smera potiru. Takođe, NAD se u citosolu može regenerisati redukcijom piruvata u laktat, u slučaju inhibicije oksidativne fosforilacije i nemogućnosti reoksidacije



NADH na kompleksu I. Stoga je merenje odnosa laktat/piruvat merodavnije od merenja NADH/NAD odnosa.

#### **5.2.4. Uticaj primene metformina na produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta i mitohondrijski membranski potencijal**

Mnogobrojne studije ispitivale su uticaj metformina na produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta, ali rezultati ovih istraživanja su varijabilni i ne ukazuju na jasan zaključak. Pokazano je da ekstremno visoke koncentracije metformina indukuju povećanu produkciju ROS u izolovanim mitohondrijama (>25 mM) [167,229]. Niže koncentracije (1 mM) potrebne su da dovedu do istog efekta kod intaktnih ćelija [166], što je u skladu sa koncentracijama potrebnim za inhibiciju kompleksa I. Sa druge strane, neke studije pokazuju da metformin ne menja produkciju ROS [228], ili čak smanjuje produkciju ROS [172]. Pokazano je i da metformin smanjuje oskidativni stres u životinjskim i ćelijskim modelima dijabetesa i ishemijske, vraćajući produkciju ROS na nivo registrovan u kontroli [171,237,238]. Slično ovome, merenjem produkcije ROS u mononuklearnim ćelijama periferne krvi ispitanika obolelih od dijabetesa, zapažena je niža produkcija ROS u ćelijama pacijenata koji su na terapiji metforminom, u odnosu na grupu koja nije bila na terapiji [239].

Veza između inhibicije kompleksa I i produkcije ROS nije jednostavna, tj. inhibicija kompleksa I može uzrokovati kako povećanje tako i smanjenje produkcije ROS, u zavisnosti od karakteristika inhibitora kao i uslova sredine [240]. Postoje istraživanja u kojima je pokazano da metformin izaziva inhibiciju respiratorne funkcije koja je praćena povećanjem produkcije ROS [167,229]. Ovo je slučaj i u našim eksperimentima - metformin koncentracije 5 mM, koji dovodi do inhibicije mitohondrijske respiracije, istovremeno dovodi i do povećane produkcije ROS, dok pri tretmanu terapijskom koncentracijom (50  $\mu$ M) nije uočena promena mitohondrijske respiracije, niti promena u nivou ROS. Sa druge strane, u istraživanju na kardiomiocitima je pokazano da visoke koncentracije metformina, koje inhibiraju funkciju kompleksa I, takođe dovode do smanjenja produkcije ROS, te je predloženo da je smanjena produkcija ROS odgovorna za kardioprotektivne efekte metformina [172]. Ipak, produkcija ROS u ovom istraživanju merena je pri kratkom tretmanu metforminom, dok su za respirometriju korišćeni tretmani u trajanju od 24 h. Istraživanja rađena na izolovanim mitohondrijama jetre i mozga pokazala su da tretman metforminom dovodi do povećane produkcije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pri merenju u prisustvu supstrata kompleksa I. Sa druge strane, produkcija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bila je smanjena pri merenju u prisustvu sukcinata i 3-fosfoglicerola (supstrata kompleksa II i mGPD), što ukazuje na inhibiciju produkcije ROS pri reverznom transferu elektrona (transportu elektrona sa redukovanog koenzima Q na kompleks I) [230,241].

Depolarizacija mitohondrijske membrane može da bude posledica inhibicije kompleksa I, kao što je prethodno pokazano sa milimolarnim koncentracijama metformina, koje dovode do inhibicije kompleksa I [158,166,228], kao i rotenonom, klasičnim inhibitorom kompleksa I [242–244]. Sa druge strane, u nekim studijama pokazano je da uprkos tome što dovodi do inhibicije respiratorne funkcije, metformin u visokim koncentracijama ne menja mitohondrijski membranski potencijal [174,191]. Rezultati našeg istraživanja pokazali su da metformin u milimolarnoj koncentraciji dovodi do depolarizacije mitohondrijske membrane. Zajedno sa sniženom respiracijom u dekuplovanom ET stanju, ovaj rezultat kontradiktoran je tvrdnji da je inhibicija kompleksa I od strane metformina specifična za polarizovane mitohondrije.

### 5.2.5. Uticaj primene metformina na količinu mitohondrija u ćeliji

Povećanje respiracije koje je pokazano u nekim studijama pri korišćenju terapijskih koncentracija metformina objašnjava se povećanjem broja mitohondrija i aktivacijom mehanizama kontrole kvaliteta mitohondrija. Tako je pokazano da tretman metforminom dovodi do povećanja količine mitohondrija u primarnim hepatocitima tretiranim terapijskim koncentracijama metformina *in vitro*, kao i u jetri eksperimentalnih životinja [191]. Predloženo je da do povećanja količine mitohondrija dolazi tako što metformin aktivira AMPK i MFF (faktor mitohondrijske fisije, eng. *mitochondrial fission factor*), što dovodi do povećane stope mitofisije [121,191]. Povećanje količine mitohondrija u kardiomiocitima registrovano je pri tretmanu terapijskim (mikromolarnim) koncentracijama metformina, dok suprafarmakološke (milimolarne) koncentracije metformina nisu uticale na količinu mitohondrija [172]. Pokazano je da je kod pacijenata obolelih od dijabetesa tipa 2 na terapiji metforminom smanjena akumulacija oštećenih mitohondrija u mononuklearnim ćelijama periferne krvi, usled povećane stope mitofagije [239,245].

Terapija metforminom nije uticala na količinu mitohondrija u skeletnom mišiću pacijenata obolelih od dijabetesa tipa 2 (merenu elektronskom mikroskopijom) [144], kao ni zdravih ispitanika akutno tretiranih metforminom u trajanju od 2 nedelje (merenu preko aktivnosti citrat sintaze) [246]. Tretman metforminom nije promenio količinu mitohondrija ni u skeletnom mišiću pacova (broj kopija mtDNK) [175]. Nasuprot ovome, upotreba metformina dovela je do povećanja u sadržaju proteina PGC-1 $\alpha$  (centralnog regulatora biogeneze mitohondrija) i citohroma c, što je registrovano imunoblotom, kao i aktivnosti citrat sintaze, što ukazuje na povećanu biogenezu mitohondrija [247]. Primena metformina na primarnoj kulturi mišićnih ćelija nije dovela do promene u nivou proteina citrat sintaze, kao pokazatelja količine mitohondrija [224]. Slični rezultati dobijeni su na ćelijskoj liniji C2C12, kvantifikacijom mitohondrija transmisionom elektronskom mikroskopijom [232]. Može se zaključiti da rezultati na skeletnom mišiću većinski ukazuju na izostanak promene u količini mitohondrija pod uticajem metformina, nezavisno od metode korišćene za ovu kvantifikaciju. Razlike u ovim i prethodno opisanim rezultatima na drugim vrstama tkiva i ćelija zato se mogu pripisati tkivnoj specifičnosti.

Količina mitohondrija u našim eksperimentima merena je na više načina - metodama protočne citofluorimetrije i konfokalne mikroskopije, korišćenjem fluorescentne boje specifične za mitohondrije (MitoTracker Red), kao i merenjem aktivnosti mitohondrijskog marker enzima - citrat sintaze. Rezultati dobijeni različitim metodama ne slažu se u potpunosti - merenjem fluorescencije MitoTracker Red boje protočnom citofluorimetrijom nije uočena promena u količini mitohondrija, dok je konfokalnom mikroskopijom uočeno da ćelije gajene u medijumu sa niskom koncentracijom glukoze, a tretirane suprafarmakološkom koncentracijom metformina, sadrže manji broj mitohondrija. Morfološka analiza je pokazala da su mitohondrije u ovim ćelijama veće po površini i izduženije od mitohondrija netretiranih, kontrolnih ćelija. Razlika u količini mitohondrija uočenih konfokalnom mikroskopijom može biti posledica depolarizacije mitohondrija. Naime, u prethodnim eksperimentima, merenjem fluorescencije boje JC-1 pokazano je da tretman metforminom milimolarne koncentracije dovodi do depolarizacije mitohondrija, koja je bila izraženija u ćelijama gajenim u LG medijumu. S obzirom na to da mitohondrijski membranski potencijal utiče na intenzitet fluorescencije boje MitoTracker Red, rezultati dobijeni merenjem fluorescencije ove boje ne mogu se tumačiti isključivo u smislu količine mitohondrija u ćeliji [248]. Razlike u rezultatima protočne citofluorimetrije i mikroskopije mogu se pripisati razlikama u metodologiji, te potencijalno ograničenje u tumačenju rezultata predstavlja činjenica da je mikroskopijom kvantifikovan broj mitohondrija u slučajnom uzorku od 10 ćelija, dok se protočnom citofluorimetrijom kvantifikuje fluorescencija 10.000 ćelija po uzorku. Aktivnost citrat sintaze

smatra se zlatnim standardom za kvantifikaciju sadržaja mitohondrija u ćelijama i tkivima, a trajanje tretmana od 5 dana trebalo bi da omogući dovoljno vremena za ispoljavanje promene u broju mitohondrija. Ipak, nakon 5 dana tretmana terapijskom koncentracijom metformina nije uočena promena u aktivnosti citrat sintaze, kao pokazatelja količine mitohondrija.

### 5.2.6. Aktivnost signalnih puteva AMPK i PI3K/Akt

Aktivacija adenozin monofosfatom aktivirane protein kinaze - AMPK je jedan od široko prihvaćenih i često izučavanih molekularnih mehanizama dejstva metformina. Aktivacija AMPK pokazana je u skeletnom mišiću u mnogim *in vivo* [160,176], kao i *in vitro* studijama [176,180,184,249]. Ipak, u *in vitro* istraživanjima korišćene su milimolarne koncentracije metformina, a samo mali broj studija na hepatocitima pokazao je da terapijske koncentracije metformina dovode do aktivacije AMPK [159,191]. Metformin u mikromolarnim koncentracijama nije izazvao aktivaciju AMPK u C2C12 ćelijama (čak ni pri trajanju tretmana od 3 dana) [250,251], ali je tretman metforminom koncentracije 1 mM u trajanju od 48 h doveo do povećane količine fosforilisanе forme AMPK u istoj ćelijskoj liniji [252]. Ovo je u skladu sa našim rezultatima, koji su pokazali da primena metformina suprafarmakološke, milimolarne koncentracije (5 mM) dovodi do povećane fosforilacije AMPK, što se ne uočava pri primeni terapijske koncentracije metformina (50  $\mu$ M). Prema nekim autorima, inhibicija respiracije od strane metformina izaziva smanjenu produkciju ATP-a i posledičnu promenu energetskeg statusa, što dovodi do aktivacije AMPK [162], dok drugi tvrde da do aktivacije AMPK od strane metformina dolazi mehanizmima nezavisnim od inhibicije kompleksa I [180]. Naši rezultati pokazuju da je milimolarna koncentracija metformina dovela do inhibicije kompleksa I kao i aktivacije AMPK, dok terapijska koncentracija nije izazvala ni jedan od ovih efekata. Dalje ispitivanje zavisnosti ovih mehanizama prokomentarisano je u narednim odeljcima.

Istraživanja o uticaju metformina na aktivnost insulinskog signalnog puta su malobrojna i ne daju konzistentne rezultate. Na ćelijskoj liniji C2C12 pokazano je da metformin dovodi do pojačanog odgovora na insulinski stimulus, u smislu fosforilacije insulinskog receptora i IRS [155], a u ćelijskoj liniji hepatocita Huh7 metformin je doveo do povećane bazalne fosforilacije insulinskog receptora [253]. Sa druge strane, u mišićnim biopsijama pacijenata obolelih od dijabetesa, terapija metforminom nije dovela do povećanja aktivnosti PI3K kao ni Akt kinaze [152]. Naši rezultati pokazali su da metformin suprafarmakološke koncentracije dovodi do povećane fosforilacije Akt kinaze, na oba mesta fosforilacije, i povećane fosforilacije GSK3 $\beta$ , nishodnog supstrakta Akt kinaze, što ukazuje na aktivaciju insulinskog signalnog puta. Sa druge strane, metformin terapijske koncentracije nije doveo do promene u nivou fosforilacije komponenti insulinskog signalnog puta. Dejstvo metformina na insulinski signalni put je u prethodnim istraživanjima uglavnom ispitivano u kontekstu reverzije efekata insulinske rezistencije, tj. povećanja insulinske senzitivnosti [149–151,254]. U našim eksperimentima metformin nije doveo do povećanja senzitivnosti na insulin. Naime, tretman insulinom u trajanju od 24 h dovodi do smanjene fosforilacije Akt u odgovoru na insulinski stimulus (tretman insulinom koncentracije 120 nM u trajanju od 15 minuta). Istovremena primena metformina i insulina u trajanju od 24 h nije dovela do reverzije efekata insulina na smanjenje insulinske senzitivnosti.

### 5.3. Efekat dostupnosti glukoze na terapijske efekte metformina

Ćelijske linije, koje se koriste u istraživanju, kultivišu se korišćenjem standardnog protokola, koji podrazumeva korišćenje odgovarajućeg medijuma. Kada je u pitanju ćelijska linija C2C12, protokol podrazumeva korišćenje medijuma (DMEM), sa visokom koncentracijom glukoze [255]. Koncentracija glukoze u ovom medijumu je 25 mmol/L, što je u odnosu na fiziološke uslove veoma visoko, imajući u vidu da je referentni opseg glikemije našte 4,1-5,6 mmol/L [4,73]. Uzimajući u obzir da metformin svoje terapijsko dejstvo vrši u uslovima hiperglikemije, kao i da mehanizmi dejstva koji su ispitivani u ovoj studiji uključuju regulaciju energetskeg metabolizma i aktivnost relevantnih signalnih puteva, smatrali smo da je važno razmotriti dostupnost energetskih supstrata, te su ovi mehanizmi ispitani u uslovima različite koncentracije glukoze - u DMEM medijumu sa niskom (5,5 mM - LG) i visokom (25 mM - HG) koncentracijom glukoze.

Na osnovu literaturnih podataka, pretpostavlja se da niska koncentracija glukoze u ćelijskom medijumu čini ćelije manje sposobnima da se izbore sa inhibicijom oksidativne fosforilacije, i na taj način ih čini osetljivijima na ćelijsku smrt. Inhibicija kompleksa I respiratornog lanca i posledično smanjenje koncentracije ATP-a jedan je od mehanizama predloženih za objašnjenje citotoksičnog dejstva metformina u tumorskim ćelijama [256,257]. Stoga ne čudi da su tumorske ćelije osetljivije na citotoksično dejstvo metformina u odsustvu glukoze [174,258]. U slučaju HepG2 hepatocita, metformin dovodi do smanjene produkcije ATP-a, ali samo u odsustvu glukoze u ćelijskom medijumu [166]. Ipak, u našim eksperimentima, samo kada je vijabilitet meren MTT testom je kod ćelija gajenih u LG medijumu registrovano veće smanjenje vijabiliteta u odnosu na ćelije gajene u HG medijumu. Ovo se može objasniti principom metode - MTT test se zasniva na aktivnosti mitohondrijskih dehidrogenaza [259], a milimolarne koncentracije metformina osim smanjenja ćelijskog vijabiliteta dovode i do inhibicije mitohondrijske respiratorne aktivnosti.

Ćelije gajene u medijumu sa niskom koncentracijom glukoze bile su osetljivije na efekte metformina na mitohondrijsku respiraciju - kod ovih ćelija primećeno je veće smanjenje respiracije, iako je minimalna koncentracija potrebna da dovede do inhibicije respiracije bila ista kod ćelija gajenih u oba medijuma. Kapacitet oksidativne fosforilacije netretiranih ćelija gajenih u LG medijumu bio je viši u odnosu na ćelije gajene u HG medijumu, što se može objasniti Varburg-Krebtri efektom [260,261], a prethodno je već pokazano u ćelijskoj liniji C2C12 [262]. Ovo ipak ne objašnjava procentualno veće smanjenje respiracije kod ćelija gajenih u LG medijumu tretiranih visokom koncentracijom metformina, u odnosu na odgovarajuće netretirane ćelije (gajene u istom medijumu). U skladu sa ovim, kod ćelija gajenih u LG medijumu registrovana je i veća promena mitohondrijskog membranskog potencijala (depolarizacija) u odnosu na ćelije gajene u HG medijumu. Aktivacija signalnih puteva AMPK i PI3K/Akt pod uticajem milimolarne koncentracije metformina takođe je bila izraženija u ćelijama gajenim u medijumu sa niskom koncentracijom glukoze. Veći efekat metformina na aktivaciju AMPK u LG medijumu može se objasniti time što niska koncentracija glukoze može aktivirati AMPK nezavisno od metformina [263], što bi pojačalo uočeni efekat metformina. Sa druge strane, u slučaju fosforilacije Akt kinaze, visoka koncentracija glukoze (koja doprinosi nastanku insulinske rezistencije) inhibira aktivnost insulinskog signalnog puta [264,265], te je moguće pretpostaviti da ćelije gajene u medijumu sa niskom koncentracijom glukoze jače odgovaraju na tretman metforminom, povećanjem fosforilacije Akt kinaze.

Naši rezultati pokazuju da tretman metforminom suprafarmakološke koncentracije dovodi do povećane produkcije ukupnih ROS kao i superoksid anjon radikala. Ovaj efekat prisutan je samo u ćelijama gajenim u medijumu sa visokom koncentracijom glukoze kada se

radi o ukupnim ROS, dok je povećanje superoksida prisutno u oba medijuma, ali izraženije u ćelijama gajenim u HG medijumu. Takođe, ukupna produkcija ROS bila je viša u ćelijama gajenim u HG medijumu u odnosu na LG, nezavisno od tretmana metforminom (registruje se i u netretiranim ćelijama). Poznato je da hiperglikemija izaziva oksidativni stres u mnogim tkivima [266,267], a posledice ovoga vidimo u komplikacijama dijabetesa, ali ova pojava, poznata kao glukotoksičnost, nije podrobno izučavana u ćelijama skeletnog mišića.

#### **5.4. Interakcija signalnih puteva AMPK i PI3K/Akt i efekti metformina**

Poznato je da metformin svoje terapijsko dejstvo *in vivo* može obavljati u stanju hiperinsulinemije, koja je prisutna u početnim stadijumima patogeneze dijabetesa tipa 2, kao i da je jedan od potencijalnih terapijskih efekata metformina senzitivizacija tkiva na insulin. Literaturni podaci o efektima metformina na insulinski signalni put nisu konzistentni [268,269], ali pretpostavlja se da za potencijalno dejstvo metformina na povećanje insulinske senzitivnosti od značaja može biti interakcija insulinskog signalnog puta (posredstvom PI3K/Akt) i signalnog puta odgovornog za očuvanje unutarćelijskog energetskeg balansa (posredstvom AMPK), zato što je poznato da između ovih signalnih puteva postoje mehanizmi međusobne regulacije, i to na više nivoa. Ova dva signalna puta odgovaraju na suprotne signale – AMPK se aktivira u stanju pada energetskeg naboja ćelije, a PI3K/Akt u stanju sitosti i obilja nutrijenata. Sa druge strane, aktivacija ovih signalnih puteva može dovesti i do nekih konvergirajućih efekata, posebno u skeletnom mišiću, gde oba puta pospešuju egzocitozu vezikula sa GLUT4 transporterima i unos glukoze u ćeliju [270]. Brojna istraživanja ukazuju da je regulacija ova dva puta recipročna, i podrazumeva međusobnu inhibiciju [270–272], ali sve je više istraživanja koja ukazuju na kompleksniju interakciju od prethodno pretpostavljene, uključujući i primere da AMPK može da aktivira insulinski signalni put [273–275]. Uloga metformina u ovoj interakciji za sada nije temeljno izučena. Pokazano je da u kardiomiocitima Akt inhibira fosforilaciju AMPK, ali da tretman metforminom u ovim uslovima nadjačava inhibitorno dejstvo Akt i dovodi do aktivacije AMPK [276]. Značaj interakcije ovih signalnih puteva u dejstvu metformina na ćelijskom nivou ispitan je istovremenim tretiranjem ćelija metforminom i insulinom, kao i farmakološkom inhibicijom signalnih puteva AMPK i PI3K/Akt, što je diskutovano u daljem tekstu.

##### **5.4.1. Efekti tretmana insulinom na dejstvo metformina**

U nizu istraživanja je pokazano da insulin u skeletnom mišiću stimuliše mitohondrijsku funkciju [90,91] i sintezu ATP-a [91] i reguliše mitohondrijsku dinamiku [92]. Naša grupa prethodno je pokazala da tretman insulinom u trajanju od 24 h kod C2C12 ćelija dovodi do smanjenog odgovora insulinskog signalnog puta, ali ne i do promena u mitohondrijskoj respiraciji, produkciji ROS ili morfologiji mitohondrija [277]. Efekat istovremene primene metformina i insulina na mitohondrijsku respiraciju, produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta, mitohondrijski membranski potencijal i količinu i morfologiju mitohondrija, nepromenjen je u odnosu na efekte samostalnog tretmana metforminom. Ovi rezultati su u skladu sa pretpostavkom da metformin deluje na mitohondrijsku funkciju i prateće parametre direktno i nezavisno od aktivnosti signalnog puta PI3K/Akt [143,166,167,230].

Signalni putevi PI3K/Akt i AMPK pri istovremenom tretmanu insulinom i metforminom pokazivali su različite obrasce aktivacije u zavisnosti od korišćenog medijuma za gajenje ćelija. Tretman insulinom u trajanju od 24 h u ćelijama gajenim u HG medijumu doveo je do

aktivacije signalnog put PI3K/Akt, čiju aktivnost odražava nivo fosforilisane forme Akt kinaze (pAkt). Istovremeni tretman insulinom i metforminom nije doveo do dodatnog povećanja nivoa pAkt, tj. nivo fosforilisane forme Akt kinaze bio je nepromenjen u odnosu na ćelije tretirane samo insulinom. Nasuprot tome, u ćelijama gajenim u LG medijumu sam insulin nije uticao na nivo pAkt, ali je istovremeni tretman insulinom i metforminom (5 mM) izazvao povećanje nivoa fosforilacije ove kinaze. Tretman insulinom u kombinaciji sa visokom koncentracijom glukoze koristi se pri uspostavljanju ćelijskih modela insulinske rezistencije, što dovodi do inhibicije odgovora PI3K/Akt puta na stimulaciju (15 min tretman visokom koncentracijom insulina) [277,278]. Može se pretpostaviti da povišena bazalna aktivacija PI3K/Akt signalnog puta izazvana tretmanom insulinom u trajanju od 24 sata takođe onemogućava odgovor ovog signalnog puta na metformin. Istovremeni tretman metforminom (5 mM) i insulinom doveo je do povećanja fosforilacije AMPK kod ćelija gajenih u LG medijumu, dok je kod ćelija gajenih u HG medijumu ovaj odgovor je bio inhibiran. Ovo nije primećeno pri samostalnom tretmanu metforminom suprafarmakološke koncentracije, koji je doveo do povećanja fosforilacije AMPK kod ćelija gajenih u oba medijuma. I pored inhibicije uobičajenog odgovora oba signalna puta na metformin, pri istovremenom tretmanu insulinom kod ćelija gajenih u HG medijumu, efekat metformina na respiraciju u ovim uslovima bio je nepromenjen (respiracija je inhibirana u istoj meri kao i pri samostalnom tretmanu metforminom). Stoga se može pretpostaviti da, u našem modelu, inhibicija mitohondrijske respiracije ne zavisi od aktivnosti signalnih puteva AMPK i PI3K/Akt.

#### 5.4.2. Farmakološka inhibicija signalnih puteva

Pitanje uloge AMPK u terapijskim efektima metformina jedno je od centralnih u ovoj oblasti istraživanja. U pokušaju da se na njega odgovori, efekti metformina se mogu pratiti u modelima gde je aktivnost AMPK inhibirana farmakološkim inhibitorima ili genetičkom modifikacijom. U jetri genetički modifikovanih miševa, i u odsustvu ekspresije AMPK metformin je doveo do inhibicije glukoneogeneze i snižavanja glikemije [233]. Sa druge strane, odsustvo AMPK u jetri genetički modifikovanih miševa sprečilo je dejstvo metformina na smanjenje glikemije, inhibiciju glukoneogeneze kao i poboljšanje respiratorne funkcije i povećanje broja mitohondrija [191]. Pokazano je čak i da metformin dovodi do poboljšanja respiracije kod miševa sa genetički inhibiranom aktivnošću AMPK u skeletnom mišiću, ali ne i kod *wild type* miševa [177]. Neki od efekata metformina, kao što su inhibicija sinteze glukoze [159] i povećanje količine mitohondrija i stope respiracije [172], mogu izostati u slučaju farmakološke inhibicije AMPK.

U cilju ispitivanja uloge signalnih puteva AMPK i PI3K/Akt u mehanizmima dejstva metformina, u ovom istraživanju korišćeni su farmakološki inhibitori ispitivanih signalnih puteva. 10-DEBC hidrohlorid (10-[4'-(N,N-Dietilamino) butil]-2-hlorofenoksazin hidrohlorid) je selektivni inhibitor kinaze Akt, koji sprečava njenu fosforilaciju i aktivaciju. Na tumorskim ćelijama pokazano je da DEBC postiže potpunu inhibiciju fosforilacije Akt (S473) pri koncentraciji od 2,5  $\mu$ M (trajanje tretmana 1 h), ali pri dužem tretmanu ista koncentracija DEBC inhibira rast ćelija i indukuje apoptozu [279]. Dorzomorfin (*compound c*, 6-[4-(2-piperidin-1-il-etoksi) fenil]-3-piridin-4-il-pirazolo [1, 5-a] pirimidin) je reverzibilni kompetitivni inhibitor AMPK [159]. Inhibitorski efekat dorzomorfina nije u potpunosti selektivan za AMPK - u koncentracijama potrebnim za inhibiciju AMPK (ili nižim) dovodi do inhibicije mnogih drugih kinaza [280,281], kao i do inhibicije Akt kinaze nezavisne od AMPK [282]. Koncentracije dorzomorfina za koje je pokazano da inhibiraju fosforilaciju AMPK u ćelijskoj kulturi su u opsegu 2,5-40  $\mu$ M, pri trajanju tretmana od 3-5 h [159,172].

Optimizacijom koncentracije i trajanja tretmana potrebnih za inhibiranje signalnih puteva, pokazali smo da, u našem eksperimentalnom modelu, oba inhibitora efikasno inhibiraju ciljne signalne puteve pri kratkotrajnom tretmanu (90 min). Pri dužem trajanju tretmana (24 h), primena koncentracija koje su dovodile do inhibicije ciljanih kinaza u C2C12 ćelijama imala je za posledicu značajno smanjenje preživljavanja ćelija. Jedini efekat koji je uočen pri kratkom tretmanu metforminom je inhibicija mitohondrijske funkcije, te je u tom slučaju bilo moguće primeniti prethodni tretman inhibitorima. Ovim eksperimentom pokazano je da inhibicija signalnih puteva AMPK ili PI3K/Akt nije uticala na inhibitorski efekat metformina na mitohondrijsku respiraciju, što navodi na zaključak da je uticaj metformina na mitohondrijsku respiraciju nezavisan od aktivnosti signalnih puteva AMPK i PI3K/Akt. Ovo je u skladu sa prethodno publikovanim podacima, da inhibitori PI3K/Akt puta ne utiču na inhibiciju respiracije od strane metformina u hepatocitima [158].

## 5.5. Ograničenja studije

Ćelijska linija korišćena u ovoj studiji, C2C12, potiče od mišićnog tkiva miša, te se može dovesti u pitanje adekvatnost ovog modela za razumevanje delovanja metformina kod ljudi. Ipak, ova ćelijska linija donosi određene prednosti u odnosu na ćelijske linije mišića čoveka, u vidu lakoće manipulacije, dobrog odgovora signalnih puteva i pogodnosti za istraživanja energetskog metabolizma. Poznato je da doziranje lekova kod glodara može biti različito u odnosu na ljude, što se odnosi i na metformin. Međutim, izmerene koncentracije metformina u plazmi ljudi i eksperimentalnih životinja nakon oralne administracije su uporedive [283]. Dodatno ograničenje je činjenica da je diferencijacija mišićnih ćelija važan parametar koji utiče na njihovu fiziologiju. Diferencirane miotube uključene su u istraživanje da bi se ispitale potencijalne razlike u odgovoru na tretman metforminom, s obzirom na to da je pokazano da diferencijacija utiče na energetski metabolizam C2C12 ćelija [284]. Kako su rezultati eksperimenata urađenih i na diferenciranim i na nediferenciranim C2C12 ćelijama bili uporedivi u pogledu efekta metformina na respiratornu funkciju, zbog tehničkih poteškoća sa manipulacijom ostali eksperimenti nisu ponavljani na diferenciranim ćelijama.

U *in vitro* studijama, koncentracije tretmana često se biraju tako da izazovu željeni efekat u kratkom vremenskom roku, bez uzimanja u obzir koncentracija koje su prisutne *in vivo*, a samim tim dolazi do izazova u ekstrapolaciji ovako dobijenih rezultata. Moguće je da, s obzirom na duže vreme izloženosti supstanci *in vivo*, nije moguće postići iste efekte u toku nekoliko dana *in vitro*, te da ove studije nisu direktno uporedive. U našim eksperimentima, efekti terapijske koncentracije metformina ispitani su pri trajanju tretmana od 24 h i 5 dana, sa ciljem da se što bolje simulira hronična izloženost tretmanu. Prilikom poređenja koncentracija supstanci u *in vivo* i *in vitro* eksperimentima, uzeta su u obzir farmakokinetička svojstva supstance, tj. kako se supstanca apsorbuje u organizam, kako se metabolizuje i kako se izlučuje iz tela. S obzirom na to da se metformin i glukoza u krvotoku prisutni u neizmenjenom obliku, kao i u ćelijskom medijumu tokom *in vitro* tretmana, koncentracije u medijumu za gajenje ćelija izabrane su tako da što bliže odražavaju koncentracije u krvi.

## 5.6. Značaj i budući pravci istraživanja

Inhibicija kompleksa I respiratornog lanca i aktivacija AMPK već decenijama se navode kao glavni molekularni mehanizmi dejstva metformina. Međutim, tek poslednjih nekoliko godina postavlja se pitanje o adekvatnosti eksperimentalnog dizajna studija iz kojih su

proizašli ovi podaci, te se fokus pomera ka istraživanju efekata terapijskih koncentracija metformina. Ova, novija istraživanja, dala su predlog alternativnih mehanizama kojima metformin deluje u ćelijama, kao što su promene u energetskom i redoks statusu ćelija, alosterna regulacija aktivnosti enzima metaboličkih puteva [161,203,285] i inhibicija glicerol-3-fosfat dehidrogenaze [185,186,286]. Kako je najveći broj ovih istraživanja rađen na ćelijama jetre, uloga navedenih mehanizama u skeletnom mišiću gotovo je neispitana. Ova studija doprinosi ispitivanju molekularnih mehanizama delovanja farmakološki relevantnih koncentracija metformina na mišićne ćelije, a korišćenje ćelijske linije kao modela omogućilo je detaljniju karakterizaciju signalnih puteva i mehanizama delovanja metformina na energetski status ćelije i funkciju mitohondrija.

Dalji koraci u ispitivanju molekularnih mehanizama dejstva metformina bili bi potvrđivanje mehanizama, otkrivenih pri istraživanju terapijskih koncentracija, u *in vivo* sistemima, pre svega kod pacijenata obolelih od dijabetesa tipa 2 koji su na terapiji metforminom, kao i u različitim ciljnim tkivima. Korak ka ovome su neke od skorašnjih studija, u kojima je ispitivan efekat metformina na neke od mitohondrijskih parametara u ćelijama krvi pacijenata obolelih od dijabetesa [239] i sindroma policističnih jajnika [287], te je pokazan povoljan efekat metformina: smanjena produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta, povećana ekspresija proteina kompleksa respiratornog lanca kao i povećana respiracija. Merenjem respiratorne funkcije skeletnog mišića pokazano je da dve nedelje terapije metforminom ne utiče na respiraciju kod zdravih ispitanika [246], što je u skladu sa našim rezultatima.

Osim za lečenje dijabetesa tipa 2, metformin se koristi i u terapiji drugih stanja u kojima je prisutna insulinska rezistencija, kao što su sindrom policističnih jajnika i gestacijski dijabetes. Ispitivanje uticaja metformina na energetski metabolizam placente i potencijalni efekti metformina na plod fokus su velikog broja studija poslednjih godina. U ovim studijama, posebna pažnja je posvećena odabiru korišćenih koncentracija metformina, usklađujući ih sa koncentracijom metformina u plazmi majke i fetusa kao i u tkivu placente [288]. Podaci o respiraciji trofoblasta nisu u potpunosti jednoznačni, te neke od studija pokazuju da niske koncentracije metformina ne utiču na respiraciju trofoblasta, a visoke koncentracije inhibiraju respiraciju [289,290], dok je u drugima pokazana inhibicija respiracije čak i sa terapijskim koncentracijama metformina (10 i 100  $\mu\text{M}$ ) [288,291]. Još jedna oblast u kojoj metformin izaziva sve veće interesovanje je terapija malignih oboljenja. Epidemiološke studije pokazale su bolju prognozu malignih bolesti kod pacijenata koji koriste metformin, što je pokrenulo interesovanje za ispitivanje metformina kao adjuvantne terapije uz klasične hemioterapeutike. Razmatranje mogućih novih primena i proširenja indikacija za upotrebu metformina daje još veći značaj bazičnim istraživanjima molekularnih mehanizama njegovog dejstva, zato što njihovo poznavanje omogućava bolje predviđanje povoljnih efekata leka na novu patologiju, potencijalnih neželjenih efekata kao i interakcije s drugim lekovima.



# **6. ZAKLJUČCI**

Analizom dobijenih rezultata istraživanja, a u skladu sa postavljenim ciljevima, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Milimolarna, suprafarmakološka, koncentracija metformina inhibira mitohondrijsku respiraciju, ali ne dovodi do promene energetske (ADP/ATP) i redoks (NAD/NADH) statusa mišićnih ćelija.

Delujući na funkciju kompleksa I respiratornog lanca mitohondrija, metformin inhibira mitohondrijsku funkciju intaktnih i permeabilizovanih ćelija. Minimalna koncentracija koja pri tretmanu od 24 h dovodi do inhibicije respiracije je 1 mM. Terapijska koncentracija metformina (50  $\mu$ M) ne utiče na respiraciju ni pri trajanju tretmana od 5 dana, dok 5 mM metformin trenutno dovodi do inhibicije kompleksa I respiratornog lanca. Ni jedna od ispitivanih koncentracija metformina nije dovela do promene energetske i redoks statusa C2C12 ćelija.

2. Milimolarna, suprafarmakološka, koncentracija metformina dovodi do depolarizacije unutrašnje mitohondrijske membrane i povećane produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta.

Suprafarmakološka, ali ne i terapijska koncentracija metformina, dovodi do promene mitohondrijskog membranskog potencijala i produkcije ROS, kao i do smanjene količine mitohondrija merene konfokalnom mikroskopijom.

3. Milimolarna, suprafarmakološka, koncentracija metformina aktivira i AMPK i PI3K/Akt signalni put, a efekti metformina na mitohondrije nezavisni su od aktivnosti ovih signalnih puteva.

Suprafarmakološka, ali ne i terapijska koncentracija metformina, dovodi do aktivacije signalnih puteva AMPK i PI3K/Akt. Inhibicija ovih signalnih puteva, kao i istovremeni tretman insulinom, ne menjaju efekte metformina na merene mitohondrijske parametre, što ukazuje na to da su efekti metformina na mitohondrije nezavisni od efekta na ove signalne puteve.

# **7. LITERATURA**

1. Magliano DJ, Boyko EJ; IDF Diabetes Atlas 10th edition scientific committee. IDF DIABETES ATLAS [Internet]. 10th ed. Brussels: International Diabetes Federation; 2021.
2. Tinajero MG, Malik VS. An Update on the Epidemiology of Type 2 Diabetes: A Global Perspective. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2021;50(3):337–55.
3. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse: Diabetes mellitus. Beograd; 2013.
4. American Diabetes Association Professional Practice Committee. 2. Diagnosis and Classification of Diabetes: Standards of Care in Diabetes—2024. *Diabetes Care.* 2024;47(January):S20–42.
5. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet.* 2005;366(9501):1415–28.
6. Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J. Harrison's principles of internal medicine. 19th ed. New York, NY, USA: McGraw-hill; 2015.
7. Karamanou M, Protogerou A, Tsoucalas G, Androutsos G, Poulakou-rebelakou E. Milestones in the history of diabetes mellitus: The main contributors. *World J Diabetes.* 2016;7(1):1–7.
8. Tattersall RB. The history of diabetes mellitus. In: Holt R, Cockram C, Flyvbjerg A, Goldstein B, editors. *Textbook of diabetes.* 5th ed. John Wiley and Sons, Ltd; 2017. p. 1–22.
9. Boron WF, Boulpaep EL. *Medical physiology: a cellular and molecular approach.* Potentials. 2009. 1337 p.
10. Rydén L, Lindsten J. The history of the Nobel prize for the discovery of insulin. *Diabetes Res Clin Pract.* 2021;175:108819.
11. DeFronzo RA, Tripathy D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2009;32 Suppl 2.
12. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Glucose clamp technique: a method insulin secretion and resistance for quantifying.* *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1979;6:E-214-223.
13. Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, et al. Quantitative insulin sensitivity check index: A simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(7):2402–10.
14. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28(7):412–9.
15. Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: Comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care.* 1999;22(9):1462–70.
16. Jallut D, Golay A, Munger R, Frascarolo P, Schutz Y, Jéquier E, et al. Impaired glucose tolerance and diabetes in obesity: A 6-year follow-up study of glucose metabolism. *Metabolism.* 1990;39(10):1068–75.
17. Abdul-Ghani MA, Tripathy D, DeFronzo RA. Contributions of  $\beta$ -cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Diabetes Care.* 2006;29(5):1130–9.
18. Lillioja S, Mott DM, Howard B V., Bennett PH, Yki-Jarvinen H, Freymond D, et al. Impaired glucose tolerance as a disorder of insulin action. *N Engl J Med.* 1988;318(19):1217–25.
19. Zhande R, Zhande R, Mitchell JJ, Mitchell JJ, Wu J, Wu J, et al. Molecular Mechanism of Insulin-Induced Degradation of Insulin Receptor Substrate 1. *Microbiology.* 2002;22(4):1016–26.
20. Wu X, Hardy VE, Joseph JI, Jabbour S, Mahadev K, Zhu L, et al. Protein-tyrosine phosphatase activity in human adipocytes is strongly correlated with insulin-stimulated glucose uptake and is a target of insulin-induced oxidative inhibition. *Metabolism.* 2003;52(6):705–12.
21. White MF. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*

- 2002;283(3):E413–22.
22. Shanik MH, Xu Y, Skrha J, Dankner R, Zick Y, Roth J. Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse? *Diabetes Care*. 2008;31(Supplement 2):S262-8.
  23. Furnica RM, Istasse L, Maiter D. A severe but reversible reduction in insulin sensitivity is observed in patients with insulinoma. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2018;79(1):30–6.
  24. Vuorinen-Markkola H, Koivisto VA, Yki-Jarvinen H. Mechanisms of hyperglycemia-induced insulin resistance in whole body and skeletal muscle of type I diabetic patients. *Diabetes*. 1992;41(5):571–80.
  25. Yki-Jarvinen H, Helve E, Koivisto VA. Hyperglycemia decreases glucose uptake in type I diabetes. *Diabetes*. 1987;36(8):892–6.
  26. Rossetti L, Smith D, Shulman GI, Papachristou D, DeFronzo RA. Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissues sensitivity to insulin in diabetic rats. *J Clin Invest*. 1987;79(5):1510–5.
  27. Laybutt DR, Schmitz-Peiffer C, Saha AK, Ruderman NB, Biden TJ, Kraegen EW. Muscle lipid accumulation and protein kinase C activation in the insulin-resistant chronically glucose-infused rat. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 1999;277(6):E1070–6.
  28. Gavin JR, Roth J, Neville DM, Meyts PDE, Buell DN. Insulin-Dependent Regulation of Insulin Receptor Concentrations: A Direct Demonstration in Cell Culture. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1974;71(1):84–8.
  29. Zick Y. Role of Ser/Thr kinases in the uncoupling of insulin signaling. *Int J Obes*. 2003;27:S56–60.
  30. Krssak M, Petersen KF, Dresner A, Dipietro L, Vogel SM, Rothman DL, et al. Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a <sup>1</sup>H NMR spectroscopy study. *Diabetologia*. 1999;42(1):113–6.
  31. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HAW. 10-Year Follow-up of Intensive Glucose Control in Type 2 Diabetes. Vol. 359, *New England Journal of Medicine*. 2008. p. 1577–89.
  32. King P, Peacock I, Donnelly R. The UK Prospective Diabetes Study ( UKPDS ): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes. *Br J Clin Pharmacol*. 1999;48(5):643–8.
  33. Ferrannini E, Bjorkman O, Reichard GA, Pilo A, Olsson M, Wahren J, et al. The disposal of an oral glucose load in healthy subjects. A quantitative study. *Diabetes*. 1985;34(6):580–8.
  34. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am*. 2004;88(4):787–835.
  35. Shulman GI, Rothman DL, Jue T, Stein P, DeFronzo RA, Shulman RG. Quantitation of Muscle Glycogen Synthesis in Normal Subjects and Subjects with Non-Insulin-Dependent Diabetes by <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy . Vol. 322, *New England Journal of Medicine*. 1990. p. 223–8.
  36. Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Maratou E, Raptis S. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract - ne valjaju Inf sve*. 2011;21(1):91–7.
  37. Molina P. *Endocrine Physiology*. McGraw Hill; 2010.
  38. Warram JH, Martin BC, Krolewski AS, Soeldner JS, Kahn CR. Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Ann Intern Med*. 1990;113(12):909–15.
  39. Di Meo S, Iossa S, Venditti P. Skeletal muscle insulin resistance: Role of mitochondria and other ROS sources. *J Endocrinol*. 2017 Apr 1;233(1):R15–42.
  40. Kelley DE, Simoneau JA. Impaired free fatty acid utilization by skeletal muscle in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1994;94(6):2349–56.
  41. Blaak EE, Wagenmakers AJM, Glatz JFC, Wolffenbuttel BHR, Kemerink GJ, Langenberg CJM, et al. Plasma FFA utilization and fatty acid-binding protein content are diminished in type 2 diabetic muscle. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2000;279(1 42-1):146–54.
  42. Kelley DE, Mandarino LJ. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: A

- reexamination. *Diabetes*. 2000;49(5):677–83.
43. Rahimi Y, Camporez JPG, Petersen MC, Pesta D, Perry RJ, Jurczak MJ, et al. Genetic activation of pyruvate dehydrogenase alters oxidative substrate selection to induce skeletal muscle insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(46):16508–13.
  44. Muoio DM. Metabolic inflexibility: when mitochondrial indecision leads to metabolic gridlock. *Cell*. 2014;159(6):1253–62.
  45. Martins AR, Nachbar RT, Gorjao R, Vinolo M a, Festuccia WT, Lambertucci RH, et al. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids Health Dis*. 2012;11(1):30.
  46. Szendroedi J, Yoshimura T, Phielix E, Koliaki C, Marcucci M, Zhang D, et al. Role of diacylglycerol activation of PKC $\theta$  in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(26):9597–602.
  47. Ritter O, Jelenik T, Roden M. Lipid-mediated muscle insulin resistance: different fat, different pathways? *J Mol Med*. 2015;93(8):831–43.
  48. Simoneau JA, Kelley DE. Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in NIDDM. *J Appl Physiol*. 1997;83(1):166–71.
  49. Kelley DE, He J, Menshikova E V, Ritov VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51(10):2944–50.
  50. Schrauwen-Hinderling VB, Kooi ME, Hesselink MKC, Jeneson JAL, Backes WH, Van Echteld CJA, et al. Impaired in vivo mitochondrial function but similar intramyocellular lipid content in patients with type 2 diabetes mellitus and BMI-matched control subjects. *Diabetologia*. 2007;50(1):113–20.
  51. Szendroedi J, Schmid AI, Chmelik M, Toth C, Brehm A, Krssak M, et al. Muscle mitochondrial ATP synthesis and glucose transport/phosphorylation in type 2 diabetes. *PLoS Med*. 2007;4(5):0858–67.
  52. Petersen K, Dufour S. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2004;350(7):664–71.
  53. Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, et al. Mitochondrial dysfunction in the elderly: Possible role in insulin resistance. *Science*. 2003;300(5622):1140–2.
  54. Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Shatzkes N, et al. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest*. 2005;115(12):3587–93.
  55. Regensteiner JG, Sippel J, McFarling ET, Wolfel EE, Hiatt WR. Effects of non-insulin-dependent diabetes on oxygen consumption during treadmill exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 1995;27(6):875–81.
  56. Phielix E, Schrauwen-Hinderling VB, Mensink M, Lenaers E, Meex R, Hoeks J, et al. Lower intrinsic ADP-stimulated mitochondrial respiration underlies in vivo mitochondrial dysfunction in muscle of male type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2008;57(11):2943–9.
  57. Mogensen M, Sahlin K, Fernström M, Glintborg D, Vind BF, Beck-Nielsen H, et al. Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2007 Jun;56(6):1592–9.
  58. Ritov VB, Menshikova E V., He J, Ferrell RE, Goodpaster BH, Kelley DE. Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005;54(1):8–14.
  59. Boushel R, Gnaiger E, Schjerling P, Skovbro M, Kraunsøe R, Dela F. Patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle. *Diabetologia*. 2007;50(4):790–6.
  60. Larsen S, Stride N, Hey-Mogensen M, Hansen CN, Andersen JL, Madsbad S, et al. Increased mitochondrial substrate sensitivity in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2011;54(6):1427–36.
  61. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson K, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC-1  $\alpha$  - responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in

- human diabetes. *Nat Genet.* 2003;34(3):267–73.
62. Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S, et al. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(14):8466–71.
  63. Meyts P De. Insulin and its receptor : structure , function and evolution. 2004;(7):1351–62.
  64. Zajac J, Shrestha A, Patel P, Poretsky L. The main events in the history of diabetes mellitus. In: *Principles of diabetes mellitus.* 2010. p. 3–16.
  65. Loubatières A, Mariani MM, Ribes G, de Malbosc H, Chapal J. Etude expérimentale d'un nouveau sulfamide hypoglycémiant particulièrement actif, le HB 419 ou glibenclamide. *Diabetologia.* 1969;5(1):1–10.
  66. Krentz AJ, Bailey CJ. Oral Antidiabetic Agents Current Role in Type 2 Diabetes Mellitus. 2005;65(3):385–411.
  67. Bailey CJ. Metformin: historical overview. *Diabetologia.* 2017;60:1566–76.
  68. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). *J Biol Chem.* 1995;270(22):12953–6.
  69. Inzucchi SE, Maggs DG, Spollett GR, Page SL, Rife FS, Walton V, et al. Efficacy and metabolic effects of metformin and troglitazone in type II diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1998;338(13):867–72.
  70. Nauck MA, Quast DR, Wefers J, Meier JJ. GLP-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes – state-of-the-art. *Mol Metab.* 2021;46(October 2020):101102.
  71. American Diabetes Association Professional Practice Committee. 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Care in Diabetes-2024. *Diabetes Care.* 2024 Jan 1;47(Suppl 1):S158-S178.
  72. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry.* New York, NY, USA: W.H. Freeman; 2013.
  73. Rifai N, Horvath AR, Wittwer CT E. *Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics.* 8th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2019.
  74. O'Brien RM, Granner DK. Regulation of gene expression by insulin. *Physiol Rev.* 1996;76(4):1109–61.
  75. Holmes BF, Kurth-Kraczek EJ, Winder WW. Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. *J Appl Physiol.* 1999;87(5):1990–5.
  76. Lieberman M, Peet A. *Marks' basic medical biochemistry : a clinical approach.* Vol. 5, Wolters Kluwer. 2017.
  77. Youngren JF. Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(7–8):873–91.
  78. Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K. Phosphoinositide 3-kinase : the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J.* 1998;333:471–90.
  79. Anderson KE, Coadwell J, Stephens LR, Hawkins PT. Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr Biol.* 1998;8(12):684–91.
  80. Kumar A, Harris TE, Keller SR, Choi KM, Magnuson MA, Lawrence JC. Muscle-Specific Deletion of Rictor Impairs Insulin-Stimulated Glucose Transport and Enhances Basal Glycogen Synthase Activity. *Mol Cell Biol.* 2008;28(1):61–70.
  81. Sarbassov DD. Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science (80- ).* 2005;307(5712):1098–101.
  82. Sano H, Kane S, Sano E, Miinea CP, Asara JM, Lane WS, et al. Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem.* 2003;278(17):14599–602.
  83. Sakamoto K, Holman GD. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *AJP Endocrinol Metab.* 2008;295(1):E29–37.

84. Cross D, Alessi D, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings B. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995;378(6559):785–9.
85. Sutherland C, Leighton IA, Cohen P. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  by phosphorylation: New kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem J*. 1993;296(1):15–9.
86. Newgard CB, Brady MJ, O’Doherty RM, Saltiel AR. Emerging roles of the glycogen targeting subunits of protein phosphatase-1. *Diabetes*. 2000;49:1967–77.
87. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol Rev*. 2018;98(4):2133–223.
88. Morita M, Gravel SP, Hulea L, Larsson O, Pollak M, St-Pierre J, et al. MTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity. *Cell Cycle*. 2015;14(4):473–80.
89. O-sullivan I, Zhang W, Wasserman DH, Liew CW. FOXO1 integrates direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production and glucose utilization. *Nat Commun*. 2015;6.
90. Nisr RB, Affourtit C. Insulin acutely improves mitochondrial function of rat and human skeletal muscle by increasing coupling efficiency of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2014;1837(2):270–6.
91. Stump CS, Short KR, Bigelow ML, Schimke JM, Nair KS. Effect of insulin on human skeletal muscle mitochondrial ATP production, protein synthesis, and mRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(13):7996–8001.
92. Theeuwes WF, Gosker HR, Schols AMWJ, Langen RCJ, Remels AHV. Regulation of PGC-1 $\alpha$  expression by a GSK-3 $\beta$ -TFEB signaling axis in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2020;1867(2):118610.
93. Avruch J. MAP kinase pathways: The first twenty years. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2007;1773(8):1150–60.
94. Siddle K. Signalling by insulin and IGF receptors : supporting acts and new players. *J Mol Endocrinol*. 2011;47(1):R1-10.
95. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414(6865):799–806.
96. Kodaki T, Woscholski R, Hallberg B, Rodriguez-Viciano Julian Downward P, Parker PJ. The activation of phosphatidylinositol 3-kinase by Ras. *Curr Biol*. 1994;4(9):798–806.
97. Hudson ER, Pan DA, James J, Lucocq KA, Hawley SA, Green KA, et al. A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Curr Biol*. 2003;13:861–6.
98. Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D, et al. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 1996;271(44):27879–87.
99. Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Mäkelä TP, et al. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD $\alpha/\beta$  and MO25 $\alpha/\beta$  are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol*. 2003;2(4):1–16.
100. Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, et al. Calmodulin-dependent protein kinase kinase- $\beta$  is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab*. 2005;2(1):9–19.
101. Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong SP, Momcilovic M, Johnstone SR, et al. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase- $\beta$  acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab*. 2005;2(1):21–33.
102. Cheung PCF, Salt IP, Davies SP, Hardie DG, Carling D. Characterization of AMP-activated protein kinase  $\gamma$ -subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem J*. 2000;346(3):659–69.
103. Lee-Young RS, Griffie SR, Lynes SE, Bracy DP, Ayala JE, McGuinness OP, et al. Skeletal muscle AMP-activated protein kinase is essential for the metabolic response to exercise in



- vivo. *J Biol Chem*. 2009;284(36):23925–34.
104. Musi N, Fujii N, Hirshman MF, Ekberg I, Fro S, Ljungqvist O, et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) is activated in muscle of subjects with type 2 diabetes during exercise. *Diabetes*. 2001;50(may):921–7.
  105. Kjøbsted R, Roll JLW, Jørgensen NO, Birk JB, Foretz M, Viollet B, et al. AMPK and TBC1D1 Regulate Muscle Glucose Uptake After , but Not During , Exercise and Contraction. 2019;68(July):1427–40.
  106. Wendt C De, Espelage L, Eickelschulte S, Springer C, Toska L, Scheel A, et al. Contraction-Mediated Glucose Transport in Skeletal Muscle Is Regulated by a Framework of AMPK ,. 2021;70(December):2796–809.
  107. Jørgensen SB, Richter EA, Wojtaszewski JFP. Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise. *J Physiol*. 2006;574(Pt. 1):17–31.
  108. Carling D, Grahame Hardie D. The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. *BBA - Mol Cell Res*. 1989;1012(1):81–6.
  109. Carling D, Zammit VA, Hardie DG. A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett*. 1987;223(2):217–22.
  110. Kjøbsted R, Hingst JR, Fentz J, Foretz M, Sanz M-N, Pehmoller C, et al. AMPK in skeletal muscle function and metabolism. *FASEB J*. 2018;32(4):1741–77.
  111. Inoki K, Zhu T, Guan K-L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*. 2003;115:577–90.
  112. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2008;30(2):214–26.
  113. Cheng SWY, Fryer LGD, Carling D, Shepherd PR. Thr2446 Is a Novel Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Phosphorylation Site Regulated by Nutrient Status. *J Biol Chem*. 2004;279(16):15719–22.
  114. Dreyer HC, Fujita S, Cadenas JG, Chinkes DL, Volpi E, Rasmussen BB. Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle. *J Physiol*. 2006;576(2):613–24.
  115. Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino SR, Kohnz RA, Mair W, et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science*. 2011;331(6016):456–61.
  116. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*. 2011;13(2):132–41.
  117. Jäger S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(29):12017–22.
  118. Bergeron R, Ren JM, Cadman KS, Moore IK, Perret P, Pypaert M, et al. Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2001;281:E1340–6.
  119. Garcia-Roves PM, Osler ME, Holmström MH, Zierath JR. Gain-of-function R225Q mutation in AMP-activated protein kinase  $\gamma$ 3 subunit increases mitochondrial biogenesis in glycolytic skeletal muscle. *J Biol Chem*. 2008;283(51):35724–34.
  120. Zong H, Ren JM, Young LH, Pypaert M, Mu J, Birnbaum MJ, et al. AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(25):15983–7.
  121. Toyama EQ, Herzig S, Courchet J, Lewis TLJ, Loson OC, Hellberg K, et al. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. *Science (80- )*. 2016;351(6270):275–81.
  122. Adebayo M, Singh S, Singh AP, Dasgupta S. Mitochondrial fusion and fission: The fine-tune balance for cellular homeostasis. *FASEB J*. 2021 Jun;35(6):e21620.

123. Liesa M, Shirihai OS. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab.* 2013;17(4):491–506.
124. Twig G, Elorza A, Molina AJA, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 2008;27(2):433–46.
125. Committee ADAPP. 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care.* 2022;45(Suppl. 1):S125–43.
126. International Diabetes Federation. IDF Clinical Practice Recommendations for managing Type 2 Diabetes in Primary Care. 2017; 1–43 p. Available from: [www.idf.org/managing-type2-diabetes](http://www.idf.org/managing-type2-diabetes)
127. Davies MJ, Aroda VR, Collins BS, Gabbay RA, Green J, Maruthur NM, et al. Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2022. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetologia.* 2022;65(12):1925–66.
128. Group TDDPPR. Long-term safety, tolerability, and weight loss associated with metformin in the diabetes prevention program outcomes study. *Diabetes Care.* 2012;35(4):731–7.
129. Schernthaner G, Schernthaner GH. The right place for metformin today. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020;159:107946.
130. Nacionalni registar lekova. Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije. 2022.
131. Teede HJ, Tay CT, Laven J, Dokras A, Moran LJ, Piltonen TT, et al. Recommendations from the 2023 International Evidence-based Guideline for the Assessment and Management of Polycystic Ovary Syndrome. Vol. 38, *Human Reproduction.* 2023. p. 1655–79.
132. Bailey CJ, Day C. Metformin: its botanical background. *Pract Diabetes Int.* 2004;21(3):115–7.
133. Watanabe CK. Studies in the Metabolism Changes Induced By Administration of Guanidine Bases. *J Biol Chem.* 1918;33(2):253–65.
134. Warner EA, Bell J. The preparation of methylguanidine, and of  $\beta\beta$ -dimethylguanidine by the interaction of dicyandiamide, and methylammonium and dimethylammonium chlorides respectively. *J Chem Soc Trans.* 1922;121:1790–4.
135. Hesse, E;Taubmann G. XXII. Aus dem Pharmakologisehen Institut der Universitiit Breslau. Die Wirkung des Big~anids und seiner I)erivate auf den Zuckerstoffwechsel. *Arch f Exp Pathol u Pharmakol.* 1929;290–308.
136. Sterne J. Du nouveau dans les antidiabetiques. La NN dimethylamine guanyl guanidine (N.N.D.G.). *Maroc Med.* 1957;36:1295–6.
137. Johnson AB, Webster JM, Sum C-F, Heseltine L, Argyraki M, Cooper BG, et al. The impact of metformin therapy on hepatic glucose production and skeletal muscle glycogen synthase activity in overweight type II diabetic patients. *Metabolism.* 1993;42(9):1217–22.
138. Stumvoll M, Nurjhan N, Perriello G, Dailey G, Gerich JE. Metabolic Effects of Metformin in Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *N Engl J Med.* 1995;333(9):550–4.
139. Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, et al. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2000;49(12):2063–9.
140. Cusi K, Consoli A, DeFronzo RA. Metabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(11):4059–67.
141. Takashima M, Ogawa W, Hayashi K, Inoue H, Kinoshita S, Okamoto Y, et al. Role of KLF 15 in regulation of hepatic gluconeogenesis and metformin action. *Diabetes.* 2010;59(7):1608–15.
142. Song S, Andrikopoulos S, Filippis C, Thorburn AW, Khan D, Proietto J. Mechanism of fat-induced hepatic gluconeogenesis: Effect of metformin. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2001;281(2 44-2):275–82.
143. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects

- through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J.* 2000;348(3):607–14.
144. Mathieu-Costello O, Kong A, Ciaraldi TP, Cui L, Ju Y, Chu N, et al. Regulation of skeletal muscle morphology in type 2 diabetic subjects by troglitazone and metformin: Relationship to glucose disposal. *Metabolism.* 2003;52(5):540–6.
  145. Malin SK, Gerber R, Chipkin SR, Braun B. Independent and combined effects of exercise training and metformin on insulin sensitivity in individuals with prediabetes. *Diabetes Care.* 2012;35(1):131–6.
  146. Eriksson A, Attvall S, Bonnier M, Eriksson JW, Rosander B, Karlsson FA. Short-term effects of metformin in type 2 diabetes. *Diabetes, Obes Metab.* 2007;9(4):483–9.
  147. Natali A, Baldeweg S, Toschi E, Capaldo B, Barbaro D, Gastaldelli A, et al. Vascular Effects of Improving Metabolic Control With Metformin or Rosiglitazone in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2004;27(6):1349–57.
  148. Ferrannini A, Natali E. Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes : a systematic review. *Diabetologia.* 2006;49:434–41.
  149. Zabielski P, Chacinska M, Charkiewicz K, Baranowski M, Gorski J, Blachnio-Zabielska AU. Effect of metformin on bioactive lipid metabolism in insulin-resistant muscle. *J Endocrinol.* 2017;233(3):329–40.
  150. Bradley EA, Premilovac D, Betik AC, Hu D, Attrill E, Richards SM, et al. Metformin improves vascular and metabolic insulin action in insulin-resistant muscle. *J Endocrinol.* 2019;243(2):85–96.
  151. Zhou ZY, Ren LW, Zhan P, Yang HY, Chai DD, Yu ZW. Metformin exerts glucose-lowering action in high-fat fed mice via attenuating endotoxemia and enhancing insulin signaling. *Acta Pharmacol Sin.* 2016;37(8):1063–75.
  152. Kim YB, Ciaraldi TP, Kong A, Kim D, Chu N, Mohideen P, et al. Troglitazone but not metformin restores insulin-stimulated phosphoinositide 3-kinase activity and increases p110 $\beta$  protein levels in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. *Diabetes.* 2002;51(2):443–8.
  153. Rossetti L, DeFronzo RA, Gherzi R, Stein P, Andraghetti G, Falzetti G, et al. Effect of metformin treatment on insulin action in diabetic rats: In vivo and in vitro correlations. *Metabolism.* 1990;39(4):425–35.
  154. Hundal HS. Cellular mechanism of metformin action involves glucose transporter translocation from an intracellular pool to the plasma membrane in L6 muscle cells. *Endocrinology.* 1992;131(3):1165–73.
  155. Kumar N, Dey CS. Metformin enhances insulin signalling in insulin-dependent and -independent pathways in insulin resistant muscle cells. *Br J Pharmacol.* 2002;137(3):329–36.
  156. Collier CA, Bruce CR, Smith AC, Lopaschuk G, Dyck DJ. Metformin counters the insulin-induced suppression of fatty acid oxidation and stimulation of triacylglycerol storage in rodent skeletal muscle. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2006;291(1):182–9.
  157. Fullerton MD, Galic S, Marcinko K, Sikkema S, Chen ZP, Neill HMO, et al. Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin – sensitizing effects of metformin. 2016;19(12):1649–54.
  158. El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Avéret N, Rigoulet M, Leverve X. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem.* 2000;275(1):223–8.
  159. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 2001;108(8):1167–74.
  160. Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenholm P, Rooyackers O, et al. Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002;51(July):2074–81.
  161. Alshawi A, Agius L. Low metformin causes a more oxidized mitochondrial NADH/NAD redox state in hepatocytes and inhibits gluconeogenesis by a redox-independent mechanism.

- J Biol Chem. 2019;294(8):2839–53.
162. Stephenne X, Foretz M, Taleux N, Van Der Zon GC, Sokal E, Hue L, et al. Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status. *Diabetologia*. 2011;54(12):3101–10.
  163. Schäfer G. Site-specific uncoupling and inhibition of oxidative phosphorylation by biguanides. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 1969;172(2):334–7.
  164. Owen MR, Halestrap AP. The mechanisms by which mild respiratory chain inhibitors inhibit hepatic gluconeogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1142:11–22.
  165. Hou WL, Yin J, Alimujiang M, Yu XY, Ai LG, Bao YQ, et al. Inhibition of mitochondrial complex I improves glucose metabolism independently of AMPK activation. *J Cell Mol Med*. 2018;22(2):1316–28.
  166. Dykens JA, Jamieson J, Marroquin L, Nadanaciva S, Billis PA, Will Y. Biguanide-induced mitochondrial dysfunction yields increased lactate production and cytotoxicity of aerobically-poised HepG2 cells and human hepatocytes in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;233(2):203–10.
  167. Bridges HR, Jones AJY, Pollak MN, Hirst J. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochem J*. 2014;462(3):475–87.
  168. Drahotka Z, Palenickova E, Endlicher R, Milerova M, Brejchova J, Vosahlikova M, et al. Biguanides inhibit complex I, II and IV of rat liver mitochondria and modify their functional properties. *Physiol Res*. 2014;63(1):1–11.
  169. Palenickova E, Cahova M, Drahotka Z, Kazdova L, Kalous M. Inhibitory Effect of Metformin on Oxidation of NADH-Dependent Substrates in Rat Liver Homogenate. *Physiol Res*. 2011;60:835–9.
  170. Brunmair B, Staniek K, Gras F, Scharf N, Althaym A, Clara R, et al. Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I. *Diabetes*. 2004;53(April):1052–9.
  171. Mohsin AA, Chen Q, Quan N, Rousselle T, Maceyka MW, Samidurai A, et al. Mitochondrial complex I inhibition by metformin limits reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther*. 2019;369(2):282–90.
  172. Emelyanova L, Bai X, Yan Y, Bosnjak ZJ, Kress D, Warner C, et al. Biphasic effect of metformin on human cardiac energetics. *Transl Res*. 2021;229:5–23.
  173. Piel S, Ehinger JK, Elmér E, Hansson MJ. Metformin induces lactate production in peripheral blood mononuclear cells and platelets through specific mitochondrial complex I inhibition. *Acta Physiol*. 2015;213(1):171–80.
  174. Wheaton WW, Weinberg SE, Hamanaka RB, Soberanes S, Sullivan LB, Anso E, et al. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *Elife*. 2014;2014(3):1–18.
  175. Wessels B, Ciapaite J, Van Den Broek NMA, Nicolay K, Prompers JJ. Metformin impairs mitochondrial function in skeletal muscle of both lean and diabetic rats in a Dose-dependent manner. *PLoS One*. 2014;9(6).
  176. Sajjan MP, Bandyopadhyay G, Miura A, Standaert ML, Nimal S, Longnus SL, et al. AICAR and metformin, but not exercise, increase muscle glucose transport through AMPK-, ERK-, and PDK1-dependent activation of atypical PKC. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2010;298(2):179–92.
  177. Kristensen JM, Treebak JT, Schjerling P, Goodyear L, Wojtaszewski JFP. Two weeks of metformin treatment induces AMPK-dependent enhancement of insulin-stimulated glucose uptake in mouse soleus muscle. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2014;306(10):1099–109.
  178. Hawley SA, Gadalla AE, Olsen GS, Hardie DG. The Antidiabetic Drug Metformin Activates the AMP-Activated Protein Kinase Cascade via an Adenine Nucleotide-Independent Mechanism. *Diabetes*. 2002;51(August):2420–5.
  179. Fryer LGD, Parbu-Patel A, Carling D. The anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J Biol Chem*. 2002;277(28):25226–32.

180. Ouyang J, Parakhia RA, Ochs RS. Metformin activates AMP kinase through inhibition of AMP deaminase. *J Biol Chem*. 2011;286(1):1–11.
181. Ota S, Horigome K, Ishii T, Nakai M, Hayashi K, Kawamura T, et al. Metformin suppresses glucose-6-phosphatase expression by a complex I inhibition and AMPK activation-independent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;388(2):311–6.
182. Heishi M, Ichihara J, Teramoto R, Itakura Y, Hayashi K, Ishikawa H, et al. Global gene expression analysis in liver of obese diabetic db/db mice treated with metformin. *Diabetologia*. 2006;49:1647–55.
183. Guigas B, Bertrand L, Taleux N, Foretz M, Wiernsperger N, Vertommen D, et al. 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide-1- $\beta$ -D-Ribofuranoside and metformin inhibit hepatic glucose phosphorylation by an AMP-activated protein kinase-independent effect on glucokinase translocation. *Diabetes*. 2006;55:865–74.
184. Kalender A, Selvaraj A, Kim SY, Gulati P, Brûlé S, Viollet B, et al. Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab*. 2010;11(5):390–401.
185. Madiraju AK, Erion DM, Rahimi Y, Zhang X, Braddock D, Albright RA, et al. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature*. 2014;510(7506):542–6.
186. Madiraju AK, Qiu Y, Perry RJ, Rahimi Y, Zhang XM, Zhang D, et al. Metformin inhibits gluconeogenesis via a redox-dependent mechanism in vivo. *Nat Med*. 2018;24(9):1384–94.
187. Boyle JG, Logan PJ, Jones GC, Small M, Sattar N, Connell JMC, et al. AMP-activated protein kinase is activated in adipose tissue of individuals with type 2 diabetes treated with metformin: A randomised glycaemia-controlled crossover study. *Diabetologia*. 2011;54(7):1799–809.
188. Kristensen JM, Lill Lund C, Kjøbsted R, Birk JB, Andersen NR, Nybo L, et al. Metformin does not compromise energy status in human skeletal muscle at rest or during acute exercise: A randomised, crossover trial. *Physiol Rep*. 2019;7(23):1–17.
189. Larsen S, Rabøl R, Hansen CN, Madsbad S, Helge JW, Dela F. Metformin-treated patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial complex I respiration. *Diabetologia*. 2012;55(2):443–9.
190. Kane DA, Anderson EJ, Price JW, Woodlief TL, Lin C Te, Bikman BT, et al. Metformin selectively attenuates mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission without affecting respiratory capacity in skeletal muscle of obese rats. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(6):1082–7.
191. Wang Y, An H, Liu T, Qin C, Sesaki H, Guo S, et al. Metformin Improves Mitochondrial Respiratory Activity through Activation of AMPK. *Cell Rep*. 2019;29(6):1511-1523.e5.
192. Fontaine E. Metformin-induced mitochondrial complex I inhibition: facts, uncertainties, and consequences. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9(December 17):753.
193. Vial G, Demaille D, Guigas B. Role of mitochondria in the mechanism(s) of action of metformin. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10(May 7):294.
194. Christensen MMH, Brasch-Andersen C, Green H, Nielsen F, Damkier P, Beck-Nielsen H, et al. The pharmacogenetics of metformin and its impact on plasma metformin steady-state levels and glycosylated hemoglobin A1c. *Pharmacogenet Genomics*. 2011;21(12):837–50.
195. Wilcock C, Wyre ND, Bailey CJ. Subcellular distribution of metformin in rat liver. *J Pharm Pharmacol*. 1991;43(6):442–4.
196. Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, et al. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet*. 2011;50(2):81–98.
197. Glossmann HH, Lutz OMD. Pharmacology of metformin – An update. *Eur J Pharmacol*. 2019;865(August):172782.
198. Demaille D, Guigas B, Leverve X, Wiernsperger N, Devos P. Obligatory role of membrane events in the regulatory effect of metformin on the respiratory chain function. *Biochem Pharmacol*. 2002;63(7):1259–72.
199. Neville C, Rosenthal N, McGrew M, Bogdanova N, Hauschka S. Skeletal muscle cultures.

- In: *Methods in Cell Biology*. Cambridge, MA: Academic Press Inc.; 1997. p. 85–116.
200. Yang TT, Sinai P, Kain SR. An acid phosphatase assay for quantifying the growth of adherent and nonadherent cells. *Anal Biochem*. 1996 Oct 1;241(1):103–8.
  201. Connolly DT, Knight MB, Harakas NK, Wittwer AJ, Feder J. Determination of the number of endothelial cells in culture using an acid phosphatase assay. *Anal Biochem*. 1986;152(1):136–40.
  202. Babson AL, Phillips GE. A rapid colorimetric assay for serum lactic dehydrogenase. *Clin Chim Acta*. 1965;12(2):210–5.
  203. Gui DY, Sullivan LB, Luengo A, Hosios AM, Bush LN, Gitego N, et al. Environment dictates dependence on mitochondrial complex I for NAD<sup>+</sup> and aspartate production and determines cancer cell sensitivity to metformin. *Cell Metab*. 2016;24(5):716–27.
  204. Doerrier C, Garcia-Souza LF, Krumschnabel G, Wohlfarter Y, Mészáros AT, Gnaiger E. High-resolution fluorespirometry and oxphos protocols for human cells, permeabilized fibers from small biopsies of muscle, and isolated mitochondria. *Methods Mol Biol*. 2018;1782:31–70.
  205. Gnaiger E, Kuznetsov A V, Lassnig B, Fuchs A, Renner K, Stadlmann S, et al. High-resolution respirometry – optimum permeabilization of the cell membrane by digitonin SB. *Water*. 1998;95:89–94.
  206. SUIIT-010 O<sub>2</sub> ce-pce D008 - Bioblast [Internet]. Available from: [https://wiki.oroboros.at/index.php/SUIIT-010\\_O2\\_ce-pce\\_D008](https://wiki.oroboros.at/index.php/SUIIT-010_O2_ce-pce_D008)
  207. SUIIT-003 O<sub>2</sub> ce-pce D020 - Bioblast [Internet]. Available from: [https://wiki.oroboros.at/index.php/SUIIT-003\\_O2\\_ce-pce\\_D020](https://wiki.oroboros.at/index.php/SUIIT-003_O2_ce-pce_D020)
  208. Eigentler A. Oroboros Instruments High-Resolution Respirometry Oroboros Protocols Enzymes Laboratory Protocol: Citrate synthase a mitochondrial marker enzyme. *Mitochondrial Physiol Netw* [Internet]. 2020;17(04):1–12. Available from: [http://wiki.oroboros.at/index.php/MiPNet17.04\\_CitrateSynthasewww.mitofit.org](http://wiki.oroboros.at/index.php/MiPNet17.04_CitrateSynthasewww.mitofit.org)
  209. Chaudhry A, Shi R, Luciani DS. A pipeline for multidimensional confocal analysis of mitochondrial morphology, function and dynamics in pancreatic  $\beta$ -cells. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2020;318(2):E87–101.
  210. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248–54.
  211. Wang Y, Xu W, Yan Z, Zhao W, Mi J, Li J, et al. Metformin induces autophagy and G0/G1 phase cell cycle arrest in myeloma by targeting the AMPK/mTORC1 and mTORC2 pathways. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):1–12.
  212. Zhao Y, Sun H, Feng M, Zhao J, Zhao X, Wan Q, et al. Metformin is associated with reduced cell proliferation in human endometrial cancer by inhibiting PI3K/AKT/mTOR signaling. *Gynecol Endocrinol*. 2018;34(5):428–32.
  213. Teh JT, Zhu WL, Newgard CB, Casey PJ, Wang M. Respiratory capacity and reserve predict cell sensitivity to mitochondria inhibitors: Mechanism-based markers to identify metformin-responsive cancers. *Mol Cancer Ther*. 2019;18(3):693–705.
  214. Deng Y, Ma W. Metformin inhibits HaCaT cell viability via the miR-21/PTEN/Akt signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2018;17(3):4062–6.
  215. Wang X, Li R, Zhao X, Yu X, Sun Q. Metformin Promotes HaCaT Cell Apoptosis through Generation of Reactive Oxygen Species via Raf-1-ERK1/2-Nrf2 Inactivation. *Inflammation*. 2018;41(3):948–58.
  216. Vytla VS, Ochs RS. Metformin increases mitochondrial energy formation in L6 muscle cell cultures. *J Biol Chem*. 2013;288(28):20369–77.
  217. Kim DS, Jeong SK, Kim HR, Kim DS, Chae SW, Chae HJ. Metformin regulates palmitate-induced apoptosis and ER stress response in HepG2 liver cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2010;32(2):251–7.
  218. Jadhav KS, Dungan CM, Williamson DL. Metformin limits ceramide-induced senescence in C2C12 myoblasts. *Mech Ageing Dev*. 2013;134(11–12):548–59.

219. Langer S, Kreutz R, Eisenreich A. Metformin modulates apoptosis and cell signaling of human podocytes under high glucose conditions. *J Nephrol.* 2016;29(6):765–73.
220. Geng Y, Hernández Villanueva A, Oun A, Buist-Homan M, Blokzijl H, Faber KN, et al. Protective effect of metformin against palmitate-induced hepatic cell death. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2020;1866(3):165621.
221. Kristensen JM, Larsen S, Helge JW, Dela F, Wojtaszewski JFP. Two Weeks of Metformin Treatment Enhances Mitochondrial Respiration in Skeletal Muscle of AMPK Kinase Dead but Not Wild Type Mice. *PLoS One.* 2013;8(1):1–10.
222. Sarabia V, Lam L, Burdett E, Leiter LA, Klip A. Glucose transport in human skeletal muscle cells in culture: Stimulation by insulin and metformin. *J Clin Invest.* 1992;90(4):1386–95.
223. Polianskyte-Prause Z, Tolvanen TA, Lindfors S, Dumont V, Van M, Wang H, et al. Metformin increases glucose uptake and acts renoprotectively by reducing SHIP2 activity. *FASEB J.* 2019;33(2):2858–69.
224. Maurer J, Zhao X, Irmeler M, Gudiksen A, Pilmark NS, Li Q, et al. Redox state and altered pyruvate metabolism contribute to a dose-dependent metformin-induced lactate production of human myotubes. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2023;325(4):1131–43.
225. Lee JO, Lee SK, Jung JH, Kim JH, You GY, Kim SJ, et al. Metformin induces Rab4 through AMPK and modulates GLUT4 translocation in skeletal muscle cells. *J Cell Physiol.* 2011;226(4):974–81.
226. Hällsten K, Virtanen KA, Lönnqvist F, Sipilä H, Oksanen A, Viljanen T, et al. Rosiglitazone but not metformin enhances insulin- and exercise-stimulated skeletal muscle glucose uptake in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002;51(12):3479–85.
227. Galuska D, Nolte L, Zierath J, Wallberg-Henriksson H. Effect of metformin on insulin-stimulated glucose transport in isolated skeletal muscle obtained from patients with NIDDM. *Diabetologia.* 1994;37:826–32.
228. Carvalho C, Correia S, Santos MS, Seça R, Oliveira CR, Moreira PI. Metformin promotes isolated rat liver mitochondria impairment. *Mol Cell Biochem.* 2008;308(1–2):75–83.
229. Pecinova A, Drahota Z, Kovalcikova J, Kovarova N, Pecina P, Alan L, et al. Pleiotropic Effects of Biguanides on Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017.
230. Yoval-sánchez B, Ansari F, Lange D, Galkin A. Effect of metformin on intact mitochondria from liver and brain: Concept revisited. 2022;1–21.
231. Fontaine E. Metformin and respiratory chain complex I: The last piece of the puzzle? *Biochem J.* 2014;463(3):e3–5.
232. Crocker CL, Baumgarner BL, Kinsey ST.  $\beta$ -guanidinopropionic acid and metformin differentially impact autophagy, mitochondria and cellular morphology in developing C2C12 muscle cells. *J Muscle Res Cell Motil.* 2020;41(2–3):221–37.
233. Foretz M, Hébrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G, et al. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest.* 2010;120(7):2355–69.
234. Miller RA, Chu Q, Xie J, Foretz M, Viollet B, Birnbaum MJ. Biguanides suppress hepatic glucagon signaling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature.* 2013;494(7436):256–60.
235. Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo S-H, Bardeesy N, DePinho RA, et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science.* 2005;310(5754):1642–6.
236. Gouaref I, Detaille D, Wiernsperger N, Khan NA, Leverve X, Koceir E-A. The desert gerbil *Psammomys obesus* as a model for metformin-sensitive nutritional type 2 diabetes to protect hepatocellular metabolic damage: Impact of mitochondrial redox state. *PLoS One.* 2017;12(2):e0172053.
237. Kane DA, Anderson EJ, Price JW, Woodlief TL, Lin C Te, Bikman BT, et al. Metformin selectively attenuates mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission without affecting respiratory capacity in

- skeletal muscle of obese rats. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(6):1082–7.
238. Liu XD, Li YG, Wang GY, Bi YG, Zhao Y, Yan ML, et al. Metformin protects high glucose-cultured cardiomyocytes from oxidative stress by promoting NDUFA13 expression and mitochondrial biogenesis via the AMPK signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2020;22(6):5262–70.
  239. de Marañon AM, Diaz-Pozo P, Canet F, Diaz-Morales N, Abad-Jimenez Z, Lopez-Domenech S, et al. Metformin modulates mitochondrial function and mitophagy in peripheral blood mononuclear cells from type 2 diabetic patients. *Redox Biol*. 2022;53.
  240. Scialò F, Fernández-Ayala DJ, Sanz A. Role of mitochondrial reverse electron transport in ROS signaling: Potential roles in health and disease. *Front Physiol*. 2017;8(JUN):1–7.
  241. Batandier C, Guigas B, Detaille D, El-Mir M, Fontaine E, Rigoulet M, et al. The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin. *J Bioenerg Biomembr*. 2006;38(1):33–42.
  242. Xiong Y, Qian J, Xu M, Qiu J, Xia J, Ma R, et al. Effects of low concentrations of rotenone upon mitohormesis in SH-SY5Y cells. *Dose-Response*. 2013;11(2):270–80.
  243. Hong Y, Nie H, Wu D, Wei X, Ding X, Ying W. NAD<sup>+</sup> treatment prevents rotenone-induced apoptosis and necrosis of differentiated PC12 cells. *Neurosci Lett*. 2014;560:46–50.
  244. Fortalezas S, Marques-da-Silva D, Gutierrez-Merino C. Creatine Protects Against Cytosolic Calcium Dysregulation, Mitochondrial Depolarization and Increase of Reactive Oxygen Species Production in Rotenone-Induced Cell Death of Cerebellar Granule Neurons. *Neurotox Res*. 2018;34(3):717–32.
  245. Bhansali S, Bhansali A, Dutta P, Walia R, Dhawan V. Metformin upregulates mitophagy in patients with T2DM: A randomized placebo-controlled study. *J Cell Mol Med*. 2020;24(5):2832–46.
  246. McKenzie AI, Mahmassani ZS, Petrocelli JJ, de Hart NMMP, Fix DK, Ferrara PJ, et al. Acute exposure to a clinical dose of metformin increases skeletal muscle mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission and production in healthy, older adults: A randomized controlled trial. *Exp Gerontol*. 2022;163.
  247. Suwa M, Egashira T, Nakano H, Sasaki H, Kumagai S. Metformin increases the PGC-1 $\alpha$  protein and oxidative enzyme activities possibly via AMPK phosphorylation in skeletal muscle in vivo. *J Appl Physiol*. 2006;101(6):1685–92.
  248. Xiao B, Deng X, Zhou W, Tan EK. Flow cytometry-based assessment of mitophagy using mitotracker. Vol. 10, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2016.
  249. Chen CT, Chen W, Chung HH, Cheng KC, Yeh CH, Cheng JT. Activation of imidazoline I-2B receptor by metformin to increase glucose uptake in skeletal muscle. *Horm Metab Res*. 2011;43(10):708–13.
  250. Bruckbauer A, Zemel MB. Synergistic effects of metformin, resveratrol, and hydroxymethylbutyrate on insulin sensitivity. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther*. 2013;6:93–102.
  251. Pavlidou T, Rosina M, Fuoco C, Gerini G, Gargioli C, Castagnoli L, et al. Regulation of myoblast differentiation by metabolic perturbations induced by metformin. *PLoS One*. 2017;12(8):1–19.
  252. Crocker CL, Baumgarner BL, Kinsey ST.  $\beta$ -guanidinopropionic acid and metformin differentially impact autophagy, mitochondria and cellular morphology in developing C2C12 muscle cells. *J Muscle Res Cell Motil*. 2020;41(2–3):221–37.
  253. Gunton JE, Delhanty PJD, Takahashi SI, Baxter RC. Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(3):1323–32.
  254. Wu W, Tang S, Shi J, Yin W, Cao S, Bu R, et al. Metformin attenuates palmitic acid-induced insulin resistance in L6 cells through the AMP-activated protein kinase/sterol regulatory element-binding protein-1c pathway. *Int J Mol Med*. 2015;35(6):1734–40.
  255. C2C12 ATCC ® CRL-1772<sup>TM</sup> Mus musculus muscle [Internet]. Available from:



[https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1772.aspx?geo\\_country=rs#](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1772.aspx?geo_country=rs#)

256. Lee J, Yesilkanal AE, Wynne JP, Frankenberger C, Liu J, Yan J, et al. Effective breast cancer combination therapy targeting BACH1 and mitochondrial metabolism. *Nature*. 2019;568(7751):254–8.
257. Saini N, Yang X. Metformin as an anti-cancer agent: Actions and mechanisms targeting cancer stem cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2018;50(2):133–43.
258. Samuel SM, Ghosh S, Majeed Y, Arunachalam G, Emara MM, Ding H, et al. Metformin represses glucose starvation induced autophagic response in microvascular endothelial cells and promotes cell death. *Biochem Pharmacol*. 2017;132:118–32.
259. Morgan DM. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Methods Mol Biol*. 1998;79(4):179–83.
260. Marroquin LD, Hynes J, Dykens JA, Jamieson JD, Will Y. Circumventing the crabtree effect: Replacing media glucose with galactose increases susceptibility of hepG2 cells to mitochondrial toxicants. *Toxicol Sci*. 2007 Jun;97(2):539–47.
261. de Kok MJC, Schaapherder AF, Wüst RCI, Zuiderwijk M, Bakker JA, Lindeman JHN, et al. Circumventing the Crabtree effect in cell culture: A systematic review. Vol. 59, *Mitochondrion*. Elsevier B.V.; 2021. p. 83–95.
262. Elkalaf M, Anděl M, Trnka J. Low Glucose but Not Galactose Enhances Oxidative Mitochondrial Metabolism in C2C12 Myoblasts and Myotubes. *PLoS One*. 2013 Aug 5;8(8).
263. Salt IP, Johnson G, Ashcroft SJH, Hardie DG. AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic  $\beta$  cells, and may regulate insulin release. *Biochem J*. 1998;335(3):533–9.
264. Huang C, Somwar R, Patel N, Niu W, Török D, Klip A. Sustained exposure of L6 myotubes to high glucose and insulin decreases insulin-stimulated GLUT4 translocation but upregulates GLUT4 activity. *Diabetes*. 2002;51(7):2090–8.
265. Samuel VT, Shulman GI. The pathogenesis of insulin resistance: Integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest*. 2016;126(1):12–22.
266. Fiorentino T, Prioretta A, Zuo P, Folli F. Hyperglycemia-induced Oxidative Stress and its Role in Diabetes Mellitus Related Cardiovascular Diseases. *Curr Pharm Des*. 2013;19(32):5695–703.
267. Luc K, Schramm-Luc A, Guzik TJ, Mikolajczyk TP. Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. *J Physiol Pharmacol*. 2019;70(6):809–24.
268. Salpeter SR, Buckley NS, Kahn JA, Salpeter EE. Meta-analysis: Metformin Treatment in Persons at Risk for Diabetes Mellitus. *Am J Med*. 2008;121(2).
269. Sun J, Wang Y, Zhang X, He H. The effects of metformin on insulin resistance in overweight or obese children and adolescents: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Med (United States)*. 2019;98(4).
270. Towler MC, Hardie DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res*. 2007;100(3):328–41.
271. Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen CC, Skeen JE, Sonenberg N, Hay N. Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J Biol Chem*. 2005;280(37):32081–9.
272. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Age-related changes in AMPK activation: Role for AMPK phosphatases and inhibitory phosphorylation by upstream signaling pathways. *Ageing Res Rev*. 2016;28:15–26.
273. Bertrand L, Ginion A, Beauloye C, Hebert AD, Guigas B, Hue L, et al. AMPK activation restores the stimulation of glucose uptake in an in vitro model of insulin-resistant cardiomyocytes via the activation of protein kinase B. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2006;291(1):239–50.
274. Leclerc GM, Leclerc GJ, Fu G, Barredo JC. AMPK-induced activation of Akt by AICAR is mediated by IGF-1R dependent and independent mechanisms in acute lymphoblastic leukemia. *J Mol Signal*. 2010;5:1–13.

275. Tao R, Gong J, Luo X, Zang M, Guo W, Wen R, et al. AMPK exerts dual regulatory effects on the PI3K pathway. *J Mol Signal*. 2010;5:1–9.
276. Kovacic S, Soltys CLM, Barr AJ, Shiojima I, Walsh K, Dyck JRB. Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart. *J Biol Chem*. 2003;278(41):39422–7.
277. Krako Jakovljevic N, Pavlovic K, Zujovic T, Kravic-Stevovic T, Jotic A, Markovic I, et al. In vitro models of insulin resistance: mitochondrial coupling is differently affected in liver and muscle cells. *Mitochondrion*. 2021;61(Nov):165–73.
278. Yang C, Aye CC, Li X, Diaz Ramos A, Zorzano A, Mora S. Mitochondrial dysfunction in insulin resistance: differential contributions of chronic insulin and saturated fatty acid exposure in muscle cells. *Biosci Rep*. 2012;32(5):465–78.
279. Thimmaiah KN, Easton JB, Germain GS, Morton CL, Kamath S, Buolamwini JK, et al. Identification of N10-substituted phenoxazines as potent and specific inhibitors of Akt signaling. *J Biol Chem*. 2005;280(36):31924–35.
280. Vogt J, Traynor R, Sapkota GP. The specificities of small molecule inhibitors of the TGF $\beta$  and BMP pathways. *Cell Signal*. 2011;23(11):1831–42.
281. Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, Mclauchlan H, et al. The selectivity of protein kinase inhibitors : a further update. 2007;315:297–315.
282. Vucicevic L, Misirkic M, Kristina J, Vilimanovich U, Sudar E, Isenovic E, et al. Compound C induces protective autophagy in cancer cells through AMPK inhibition-independent blockade of Akt / mTOR pathway Compound C induces protective autophagy in cancer cells through AMPK inhibition-independent blockade of Akt / mTOR pathway. *Autophagy*. 2011;7(1):40–50.
283. Chandel NS, Avizonis D, Reczek CR, Weinberg SE, Menz S, Neuhaus R, et al. Are Metformin Doses Used in Murine Cancer Models Clinically Relevant? *Cell Metab*. 2016;23(4):569–70.
284. Siengdee P, Trakooljul N, Murani E, Schwerin M, Wimmers K, Ponsuksili S. MicroRNAs regulate cellular ATP levels by targeting mitochondrial energy metabolism genes during C2C12 myoblast differentiation. *PLoS One*. 2015 May 26;10(5).
285. Cameron AR, Logie L, Patel K, Erhardt S, Bacon S, Middleton P, et al. Metformin selectively targets redox control of complex I energy transduction. *Redox Biol*. 2018;14(June 2017):187–97.
286. Thakur S, Daley B, Gaskins K, Vasko V V., Boufraquech M, Patel D, et al. Metformin targets mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase to control rate of oxidative phosphorylation and growth of thyroid cancer in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*. 2018;24(16):4030–43.
287. Victor VM, Rovira-Llopis S, Bañuls C, Diaz-Morales N, Castelló R, Falcón R, et al. Effects of metformin on mitochondrial function of leukocytes from polycystic ovary syndrome patients with insulin resistance. *Eur J Endocrinol*. 2015;173(5):683–91.
288. Tarry-Adkins JL, Robinson IG, Reynolds RM, Aye ILMH, Charnock-Jones DS, Jenkins B, et al. Impact of Metformin Treatment on Human Placental Energy Production and Oxidative Stress. *Front cell Dev Biol*. 2022;10(June):1–9.
289. Hebert JF, Myatt L. Metformin Impacts Human Syncytiotrophoblast Mitochondrial Function from Pregnancies Complicated by Obesity and Gestational Diabetes Mellitus in a Sexually Dimorphic Manner. *Antioxidants*. 2023;12(3):719.
290. Nashif SK, Mahr RM, Jena S, Jo S, Nelson AB, Sadowski D, et al. Metformin impairs trophoblast metabolism and differentiation in a dose-dependent manner. *Front cell Dev Biol*. 2023;11:1167097.
291. Tarry-Adkins JL, Robinson IG, Pantaleao LC, Armstrong JL, Thackray BD, Holzner LMW, et al. The metabolic response of human trophoblasts derived from term placentas to metformin. *Diabetologia*. 2023;66:2320–31.

# **PRILOZI**

## Prilog 1. Spisak skraćenica

<b>ACC</b>	acetil koenzim A karboksilaza, eng. <i>acetyl-CoA carboxylase</i>
<b>AcP</b>	test aktivnosti kisele fosfataze, eng. <i>acid phosphatase assay</i>
<b>ADA</b>	američka asocijacija za dijabetes, eng. <i>American Diabetes Association</i>
<b>AMPK</b>	adenozin monofosfatom aktivirana protein kinaza eng. <i>adenosine monophosphate activated protein kinase</i>
<b>AS160/ TBC1D4</b>	supstrat kinaze Akt molekulske mase 160 kDa, eng. <i>Akt substrate 160 kDa</i>
<b>BSA</b>	albumin seruma govečeta, eng. <i>bovine serum albumin</i>
<b>CAMKK</b>	kinaza kalcijum-kalmodulin zavisne kinaze, eng. <i>calcium/calmodulin-</i>
<b>CCCP</b>	karbonil cijanid m-hlorofenil hidrazon, eng. <i>carbonyl cyanide m-</i>
<b>CV</b>	kristal violet, eng. <i>crystal violet</i>
<b>DAG</b>	diacilglicerol
<b>DHE</b>	dihidroetidijum
<b>DHR</b>	dihidrorodamin
<b>DMEM</b>	Dulbekov modifikovani "Eagle" medijum, eng. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO</b>	dimetilsulfoksid
<b>DPP-4</b>	dipeptidil peptidaza 4
<b>DTNB</b>	5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoična kiselina)
<b>EDTA</b>	etilendiamin tetrasirćetna kiselina, eng. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
<b>EGTA</b>	etilen glikol-bis (2-aminoetiletar)- N,N,N',N'- tetrasirćetna kiselina, eng. <i>ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
<b>ERK</b>	kinaza regulisana vanćelijskim signalima, eng. <i>extracellular signal-regulated kinases</i>
<b>FAD</b>	flavin adenin dinukleotid
<b>FBS</b>	fetalni goveđi serum, eng. <i>fetal bovine serum</i>
<b>FMN</b>	flavinmononukleotid
<b>FOXO1</b>	eng. forkhead box protein O1
<b>GAP</b>	protein koji stimuliše GTPaznu aktivnost, eng. <i>GTPase-activating protein</i>
<b>GEF</b>	faktor koji stimuliše razmenu guaninskih nukleotida, eng. <i>guanine nucleotide-exchange factor</i>

<b>GLP-1</b>	glukogonu sličan peptid 1, eng. <i>glucagon-like peptide-1</i>
<b>GLUT4</b>	transporter za glukozu 4, eng. <i>glucose transporter 4</i>
<b>Grb2</b>	adapterski protein koji se vezuje za receptore faktora rasta, eng. <i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
<b>GSK-3</b>	kinaza glikogen sintaze, eng. <i>glycogen synthase kinase 3</i>
<b>HMGCR</b>	HMG-CoA reduktaza, eng. <i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase</i>
<b>IGT</b>	intolerancija na glukozu, eng. <i>impaired glucose tolerance</i>
<b>INT</b>	p-jodo-nitrotetrazolijum hlorid
<b>IRS</b>	supstrat insulinskog receptora, eng. <i>insulin receptor substrate</i>
<b>LDH</b>	laktat dehidrogenaza
<b>LKB1</b>	kinaza jetre B1, eng. <i>liver kinase B1</i>
<b>MAPK</b>	protein kinaza aktivirana mitogenom, eng. <i>mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MFF</b>	faktor mitohondrijske fisije, eng. <i>mitochondrial fission factor</i>
<b>mGPD</b>	mitohondrijska forma glicerol-3-fosfat dehidrogenaze (3-fosfoglicerol dehidrogenaze), eng. <i>mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase</i>
<b>mTOR</b>	ciljni protein rapamicina kod sisara, eng. <i>mammalian target of rapamycin</i>
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolijum bromid, eng. <i>methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide</i>
<b>NAD</b>	nikotinamid adenin dinukleotid
<b>OCT</b>	transporter za organske katjone, eng. <i>organic cation transporter</i>
<b>OGTT</b>	test opterećenja glukozom, eng. <i>oral glucose tolerance test</i>
<b>PAGE</b>	elektroforeza na poliakrilamidnom gelu, eng. <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<b>PBS</b>	fiziološki rastvor puferovan fosfatom, eng. <i>phosphate buffered saline</i>
<b>PDK</b>	kinaza zavisna od 3-fosfoinozitida, eng. <i>3-phosphoinositide-dependent</i>
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	koaktivator 1 $\alpha$ receptora $\gamma$ aktiviranog peroksizomalnim proliferatorom eng. <i>peroxisome proliferator-activated receptor <math>\gamma</math> coactivator 1<math>\alpha</math></i>
<b>PI3K</b>	kinaza fosfatidilinozitola 3, eng. <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
<b>PIC</b>	koktel inhibitora proteaza i fosfataza, eng. <i>protease/ phosphatase inhibitor</i>
<b>PIP<sub>2</sub></b>	fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat, eng. <i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
<b>PIP<sub>3</sub></b>	fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat, eng. <i>phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate</i>
<b>PKB/Ak</b>	protein kinaza B
<b>PKC</b>	protein kinaza C

<b>PMSF</b>	fenilmetilsulfonilfluorid
<b>PNPP</b>	p-nitrofenil fosfat
<b>PP1</b>	protein fosfataza 1, eng. <i>protein phosphatase 1</i>
<b>PPAR-<math>\gamma</math></b>	receptor $\gamma$ aktiviran peroksizomalnim proliferatorom, eng. <i>peroxisome proliferator-activated receptor <math>\gamma</math></i>
<b>RLU</b>	relativne jedinice svetlosti; eng. <i>relative light units</i>
<b>ROS</b>	reaktivne kiseonične vrste, eng. <i>reactive oxygen species</i>
<b>SDS</b>	natrijum dodecil sulfat, eng. <i>sodium dodecyl sulphate</i>
<b>SGLT-2</b>	natrijum-glukozni kotransporter 2, eng. <i>sodium-glucose cotransporter 2</i>
<b>TBS-T</b>	fiziološki rastvor puferovan Tris-om, sa dodatkom Tween-a, eng. <i>Tris-buffered saline with Tween</i>
<b>TMPD</b>	N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenediamin dihidrohlorid
<b>TNB</b>	tionitrobenzoična kiselina
<b>TSC</b>	protein tuberozne skleroze, eng. <i>tuberous sclerosis protein</i>
<b>UCP1</b>	termogenin, eng. <i>uncoupling protein 1</i>

## Prilog 2. Spisak korišćenih hemikalija

Hemikalija/potrošni materijal	Proizvođač, zemlja porekla
(+)-natrijum L-askorbat	Sigma-Aldrich (SAD)
2-merkaptoetanol	Sigma-Aldrich (SAD)
3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid (MTT)	Sigma-Aldrich (SAD)
4-nitrofenil fosfat, natrijumova so (PNPP)	SERVA Electrophoresis GmbH (Nemačka)
5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoična kiselina (DTNB)	Sigma-Aldrich (SAD)
Acetil koenzim A	Sigma-Aldrich (SAD)
Adenozin 5'-difosfat, natrijumova so (ADP)	Sigma-Aldrich (SAD)
Akrilamid/bis rastvor, 29:1 (30% w/v)	SERVA Electrophoresis GmbH (Nemačka)
Albumin seruma govečeta (BSA), frakcija V	ICN Biomedical (USA)
Amonijum persulfat (APS)	Sigma-Aldrich (SAD)
Antibiotik/antimikotik rastvor	Capricorn Scientific (Nemačka)
Antimicin A iz <i>Streptomyces</i> sp.	Sigma-Aldrich (SAD)
Bromfenol plavo	SERVA Electrophoresis GmbH (Nemačka)
Citohrom c iz srca konja	Sigma-Aldrich (SAD)
Citrat sintaza	Sigma-Aldrich (SAD)
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma-Aldrich (SAD)
Digitonin	Sigma-Aldrich (SAD)
Dihidroetidijum (DHE)	Thermo Fisher Scientific (USA)
Dihidrorodamin (DHR)	Thermo Fisher Scientific (SAD)
Dimetilsulfoksid (DMSO)	Sigma-Aldrich (SAD)
D-saharoza	HiMedia (Indija)
Dulbekov modifikovani "Eagle" medijum, sa niskom koncentracijom glukoze (DMEM-LPSTA)	Capricorn Scientific (Nemačka)

Dulbekov modifikovani "Eagle" medijum, sa visokom koncentracijom glukoze (DMEM-HPSTA)	Capricorn Scientific (Nemačka)
Epruvete za protočnu citometriju	Falcon, Corning (SAD)
Etilen glikol-bis (2-aminoetiletar)- N,N,N',N-tetrasirćetna kiselina (EGTA)	Sigma-Aldrich (SAD)
Etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA)	Sigma-Aldrich (SAD)
Fenazin metosulfat	Sigma-Aldrich (SAD)
Fenilmetilsulfonilfluorid (PMSF)	Thermo Fisher Scientific (SAD)
Fetalni goveđi serum (FBS)	Capricorn Scientific (Nemačka)
Filter za centrifugiranje, Amicon ultra, 10 KDa cut-off	Millipore, Sigma-Aldrich (SAD)
Glicerol	Sigma-Aldrich (SAD)
Glicin	SERVA Electrophoresis GmbH (Nemačka)
Glucose-TR esej	Spinreact (Španija)
GSK3β	Cell Signaling Technology (SAD)
HEPES	Acros organics, Thermo Fisher Scientific (SAD)
JC-1	Thermo Fisher Scientific (SAD)
Kalijum dihidrogen ortofosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	HiMedia (Indija)
Kalijum hlorid (KCl)	Zorka (Srbija)
Karbonil cijanid m-hlorofenil hidrazon (CCCP)	Sigma-Aldrich (SAD)
Kit za ATP	Sigma-Aldrich (SAD)
Kit za kvantifikaciju NAD/NADH	Sigma-Aldrich (SAD)
Koktel inhibitora proteaza i fosfataza (PIC)	Sigma-Aldrich (SAD)
Konjski serum	Capricorn Scientific (Nemačka)
Kozje anti-zečje sekundarno antitelo na IgG, konjugovano sa peroksidazom rena	Jackson Immuno Research Laboratories (SAD)
Kristal violet	Mol (Srbija)
L(-)-malat	Sigma-Aldrich (SAD)



L(+)-laktat	Sigma-Aldrich (SAD)
Laktobionska kiselina	Sigma-Aldrich (SAD)
Magnezijum hlorid heksahidrat ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ )	HiMedia (Indija)
Medijum za pokrivanje pločica, Fluoromount-G	SouthernBiotech (SAD)
Metanol	Zorka (Srbija)
Metanol	Zorka (Srbija)
Metformin-hidrohlorid	Galenika (Srbija)
MitoTracker Red, CMXRos	Thermo Fisher Scientific (SAD)
N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenediamin dihidrohlorid (TMPD)	Sigma-Aldrich (SAD)
Nastavci za automatske pipete 1000/200/20 $\mu$ l	Sarstedt (Nemačka)
Natirjum hidrogen fosfat ( $Na_2HPO_4$ )	Sigma-Aldrich (SAD)
Natrijum acetat ( $CH_3COONa$ )	Lach-Ner (Češka)
Natrijum azid	Sigma-Aldrich (SAD)
Natrijum dodecil sulfat (SDS)	SERVA Electrophoresis GmbH (Nemačka)
Natrijum fluorid (NaF)	Sigma-Aldrich (SAD)
Natrijum glutamat	Sigma-Aldrich (SAD)
Natrijum hidroksid (NaOH)	Carlo Erba Reagents (Italija)
Natrijum hlorid (NaCl)	Centrohem (Srbija)
Natrijum ortovanadat ( $Na_3VO_4$ )	Sigma-Aldrich (SAD)
Natrijum piruvat	Sigma-Aldrich (SAD)
Natrijum sukcinat	Sigma-Aldrich (SAD)
Nemasno mleko u prahu	Carl Roth (Nemačka)
Neprovidne bele ploče sa 96 bunara	Nunc Cell Culture, Thermo Fisher Scientific (SAD)
Nitrocelulozna membrana za imunoblot, Amersham protran 0,45 $\mu$ M	GE Healthcare (SAD)
NovoRapid, insulin aspart	Novo Nordisk (Danska)

NP-40	Sigma-Aldrich (SAD)
Oksalacetat	Sigma-Aldrich (SAD)
Oligomicin iz <i>Streptomyces diastatochromogenes</i>	Sigma-Aldrich (SAD)
Paraformaldehid	SERVA Electrophoresis GmbH (Nemačka)
<i>p</i> -jodo-nitrotetrazolijum hlorid	Sigma-Aldrich (SAD)
Pokrovno staklo za adherentne ćelije, Ø:13 mm	Sarstedt (Nemačka)
Proteinski marker za elektroforezu - PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (SAD)
Rotenon	Santa Cruz Biotechnology (SAD)
Sirćetna kiselina	Zorka (Srbija)
Sterilne plastične epruvete, 15/50 ml	Sarstedt (Nemačka)
Sudovi za gajenje adherentnih ćelija (petri šolje Ø:100 mm, petri šolje Ø:60 mm, ploče sa 6/12/24/96 bunara)	Sarstedt (Nemačka)
TACS 10X reakcioni pufer	R & D Systems (SAD)
Taurin	Santa Cruz Biotechnology (SAD)
Tetrametil etilendiamin (TEMED)	SERVA Electrophoresis GmbH (Nemačka)
Tripan plavo	Sigma-Aldrich (SAD)
Tripsin-EDTA 0,5% u DPBS-u, 10X	Capricorn Scientific (Nemačka)
Tris baza	SERVA Electrophoresis GmbH (Nemačka)
Triton X-100	ICN Biomedical (SAD)
Tube za zamrzavanje, 2 mL	Sarstedt (Nemačka)
Tween 20	SERVA Electrophoresis GmbH (Nemačka)
Zečje primarno antitelo na ACC	Cell Signaling Technology (SAD)
Zečje primarno antitelo na Akt	Cell Signaling Technology (SAD)
Zečje primarno antitelo na AMPK	Cell Signaling Technology (SAD)
Zečje primarno antitelo na pacc Ser79	Cell Signaling Technology (SAD)
Zečje primarno antitelo na pakt Ser473	Cell Signaling Technology (SAD)
Zečje primarno antitelo na pakt Thr308	Cell Signaling Technology (SAD)

---

Zečje primarno antitelo na pampk Thr172	Cell Signaling Technology (SAD)
Zečje primarno antitelo na pgsk3 $\beta$ Ser9	Cell Signaling Technology (SAD)
Zečje primarno antitelo na $\beta$ -actin	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (SAD)
$\beta$ -nikotinamid adenin dinukleotid, natrijumova	Sigma-Aldrich (SAD)

---

### Prilog 3. Spisak laboratorijske opreme i aparata

Oprema/aparati	Model	Proizvođač, zemlja porekla
Biološki sigurni kabinet sa laminarnim protokom vazduha	Gelaire Flow Laboratories TC72	Gelaire (Australija)
CO <sub>2</sub> inkubator za gajenje ćelijske kulture	Sanyo CO <sub>2</sub> incubator MCO-17AI	Sanyo Electric Biomedical Co (Japan)
Invertni mikroskop sa faznim kontrastom	Leica DM IL	Leica Microsystems (Nemačka)
Čitač za ploče (spektrofotometrija)	Sunrise absorbance reader	Tecan (Ujedinjeno Kraljevstvo)
Oksigraf	Oroboros Oxygraph-2k	Oroboros Instruments (Austria)
Protočni citofluorimetar	FACSCalibur	BD Biosciences, Becton, Dickinson and Company (SAD)
Sistem za polu-suvi elektrotransfer	Trans blot SD Semi-dry transfer cell	Bio-Rad Laboratories Inc (SAD)
Aparat za vizuelizaciju gelova i membrana	Chemi Doc XRS+	Bio-Rad Laboratories Inc. (SAD)
Konfokalni mikroskop	Leica TCS SP2	Leica Microsystems (Nemačka)
Objektiv za konfokalni mikroskop	PL APO 63x 1.3 Glycerol HCX CS, x63	Leica Microsystems (Nemačka)
Čitač za ploče (luminometrija)	BioTek Synergy H1	Agilent Technologies Inc. (SAD)

## Prilog 4. Terminologija respirometrije

Respiratorna stanja		
R	ROUTINE	Respiracija intaktnih ćelija koja se zasniva na oksidaciji endogenih supstrata
L	LEAK	Respiracija koja predstavlja aktivnost respiratornog lanca koja nadomešćuje za „curenje” protona niz gradijent koncentracije, mimo ADP sintaze (u odsustvu ADP-a ili u prisustvu inhibitora ATP sintaze oligomicina)
P	OXPHOS	Oksidativna fosforilacija (eng. <i>oxidative phosphorylation</i> ) - respiracija u okolnostima u kojima je transport elektrona spregnut sa sintezom ATP-a
	OXPHOS CI	Kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za kompleks I
	OXPHOS CI+II	Kapacitet oksidativne fosforilacije konvergirajućih puteva kompleksa I i II
	OXPHOS CII	Kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za kompleks II
E	ET	Kapacitet za transport elektrona (eng. <i>electron transfer capacity</i> ) koji predstavlja respiraciju u prisustvu dekuplujućeg agensa (CCCP)
	CIV	Aktivnost kompleksa IV
	ROX	Rezidualna potrošnja kiseonika (eng. <i>residual oxygen consumption</i> ), u stanju kada je respiratorni lanac neaktivan
SUIT protokol		eng. <i>substrate-uncoupler-inhibitor titration protocol</i>
Dig	digitonin	deterdžent za permeabilizaciju ćelijske membrane
P	piruvat	supstrat CI
M	malat	supstrat CI
G	glutamat	supstrat CI
D	ADP+Mg <sup>2+</sup>	supstrat ATP sintaza
S	sukcinat	supstrat CII
c	citohrom c	provera integriteta mitohondrijske membrane
Rot	rotenon	inhibitor CI
Ama	antimicin A	inhibitor CIII
Tm	TMPD	supstrat CIV
As	askorbat	supstrat CIV
U	CCCP	dekuplujući agens
Omy	oligomicin	inhibitor ATP sintaze

## Biografija

Kasja (Veljko) Pavlović rođena je 28.12.1993. u Beogradu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, modul molekularna biologija, završila je 2016. godine, sa prosečnom ocenom 9,23. Master studije na Biološkom fakultetu u Beogradu, modul biofizika, završila je 2017. godine, sa prosečnom ocenom 9,67, odbranivši rad pod nazivom „Karakterizacija modela insulinske rezistencije na ćelijskoj liniji C2C12“. Doktorske studije Molekularne medicine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je 2017. godine. Specijalističke akademske studije genetike na Biološkom fakultetu upisala je 2022. godine.

Zasnovala je radni odnos 2018. godine, prvo kao saradnik na realizaciji projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja kojim rukovodi prof. dr Nebojša M. Lalić, a zatim kao zdravstveni saradnik u Laboratoriji za ćelijsku dijagnostiku i terapiju u dijabetesu Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. Odlukom Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu 2018. godine izabrana je u zvanje istraživač pripravnik, a 2021. u zvanje istraživač saradnik.

Autor je ili koautor 3 rada koji su štampani u međunarodnim časopisima koji su na JCR listi, od čega je na dva rada prvi autor. Prema Scopus-u ovi radovi su citirani 67 puta. Takođe je autor 1 rada štampanog u istaknutom nacionalnom časopisu, 17 radova koji su štampani kao izvodi sa međunarodnih skupova i 12 radova koji su štampani kao izvodi sa nacionalnih skupova. U okviru stručnog i naučnog usavršavanja pohađala je brojne radionice i škole na temu mitohondrijske fiziologije, komparativne fiziologije i biomedicine. Kao član organizacionog odbora učestvovala je u organizaciji više naučnih i stručnih skupova, i član je više nacionalnih i međunarodnih naučnih društava. Učestvovala je u međunarodnom projektu *Mitochondrial mapping: Evolution - Age - Gender - Lifestyle - Environment (MitoEAGLE)*, 2016-2020, *COST Association*. Uključena je u edukaciju mlađih kolega i studenata, te je bila neposredni supervizor laboratorijskog rada pri izradi studentskih naučno-istraživačkih i master radova. Učestvovala je u seminaru biologije Istraživačke stanice Petnica kao stručni saradnik, a bavila se i promocijom nauke kroz učešće i organizaciju manifestacija kao što su Nedelja svesti o mozgu, Festival nauke, Noć istraživača itd.

### Objavljeni radovi proizašli iz doktorke disertacije:

Kasja Pavlovic, Nina Krako Jakovljevic, Andjelka M. Isakovic, Tijana Ivanovic, Ivanka Markovic, Nebojsa M. Lalic. Therapeutic vs. Suprapharmacological Metformin Concentrations: Different Effects on Energy Metabolism and Mitochondrial Function in Skeletal Muscle Cells *in vitro*. *Front Pharmacol.* 2022;13:930308.doi: 10.3389/fphar.2022.930308. M21 IF = 5,6

Kasja Pavlović, Nebojša M. Lalić. Ćelijski modeli za proučavanje mišićne insulinske rezistencije. *Medicinski podmladak.* 2021;72(1):50-7. doi: 10.5937/mp72-31381. M23

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Касја Павловић

Број индекса 5073/2017

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај метформина на енергетски статус и митохондријалну функцију мишићних ћелија *in vitro*

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

Потпис аутора

У Београду, 11. јула 2024.



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

Име и презиме аутора Касја Павловић

Број индекса 5073/2017

Студијски програм Молекуларна медицина

Наслов рада Утицај метформина на енергетски статус и митохондријалну  
функцију мишићних ћелија *in vitro*

Ментори проф. др Небојша М. Лалић, проф. др Иванка Марковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора**

У Београду, 11. јула 2024.





## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом: Утицај метформина на енергетски статус и митохондријалну функцију мишићних ћелија *in vitro*.

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 11. јула 2024.



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 прерада.** 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 прерада.** 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.