

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Strahinja M. Đurić

**REDOKS-METABOLIČKA HOMEOSTAZA U
JETRI, MIŠIĆIMA, DEPOIMA BELOG I
MRKOM MASNOM TKIVU TOKOM
HRONOLOŠKOG STARENJA PACOVA
DUGOTRAJNO IZLAGANIH NISKOJ
TEMPERATURI**

Doktorska disertacija

Beograd, 2026.

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Strahinja M. Đurić

**REDOKS-METABOLIČKA HOMEOSTAZA U
JETRI, MIŠIĆIMA, DEPOIMA BELOG I
MRKOM MASNOM TKIVU TOKOM
HRONOLOŠKOG STARENJA PACOVA
DUGOTRAJNO IZLAGANIH NISKOJ
TEMPERATURI**

Doktorska disertacija

Beograd, 2026.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Strahinja M. Đurić

**REDOX-METABOLIC HOMEOSTASIS IN THE
LIVER, MUSCLE, WHITE ADIPOSE TISSUE
DEPOTS AND BROWN ADIPOSE TISSUE
DURING CHRONOLOGICAL AGEING OF
RATS CHRONICALLY EXPOSED TO LOW
ENVIRONMENTAL TEMPERATURE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

MENTORKE

dr Aleksandra Korać, redovna profesorka, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Aleksandra Janković, naučna savetnica, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

ČLANOVI KOMISIJE

dr Bato Korać, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Aleksandra Čvoro, naučna savetnica, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Igor Golić, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Datum odbrane: _____

ЗАХВАЛНИЦА

Ова докторска дисертација је израђена у лабораторији Одељења за физиологију Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Института од националног значаја за Републику Србију (ИБИСС) Универзитета у Београду и на Катедри за биологију ћелија и ткива Биолошког факултета Универзитета у Београду средствима Министарства науке, технолошког развоја и иновација Републике Србије (451-03-137/2025-03/200178 и 451-03-136/2025-03/200007).

Дисертацију су осмислили и водили др Александра Јанковић и др Бато Кораћ.

Хвала др Александри Јанковић и др Бати Кораћу на омогућеној прилици за теоријски и практични рад, учење и напредовање током докторских студија, а нарочито на указаној важности интегративног поимања редокс-метаболичких процеса.

Педагошки вешто бивао сам вођен од стране др Александре Кораћ, професорке чији осећај за такт, меру и вредност, заједно са способношћу да се препозна и издвоји кривна аргументација, плене међусобном усклађеношћу, посебно на незаборавним предавањима.

Посебну захвалност дугујем др Тамари Закић, Јелени Јевтић и Маји Вукобратовић услед великог ангажовања током извођења Western blot анализе.

Др Игору Голићу, др Марији Илић и Сари Стојановић захваљујем на помоћи у практичном извођењу хистолошких аспеката дисертације.

Redoks-metabolička homeostaza u jetri, mišićima, depoima belog i mrkom masnom tkivu tokom hronološkog starenja pacova dugotrajno izlaganih niskoj temperaturi

SAŽETAK

Starenje je dinamičan biološki proces karakterisan gubitkom strukturno-funkcijskog ustrojstva i adaptivne plastičnosti organizma, pri čemu redoks-metabolička regulacija predstavlja jedan od ključnih aspekata ovog procesa. Iako dugotrajna izloženost niskoj temperaturi sredine kod glodara izaziva složene termoregulacione, redoks i metaboličke odgovore, njihov značaj u kontekstu promena povezanih sa starenjem i njihova tkivno-specifična regulacija još uvek nisu dovoljno razjašnjeni. Cilj ove disertacije bio je da okarakteriše redoks-metaboličko reprogramiranje tkiva ključnih za održanje energetske homeostaze u starenju, sa posebnim fokusom na uticaj hladnoće. Morfo-funkcijski su analizirani jetra, skeletni mišić (*m. gastrocnemius*), mrko (BAT, eng. *brown adipose tissue*) i belo masno tkivo (rWAT i gWAT, eng. *white adipose tissue*) pacova uzrasta 3, 6 i 24 meseca koji su boravili na sobnoj temperaturi (22 ± 1 °C) i na hladnoći (4 ± 1 °C, od 6. do 24. meseca). Starenje na 22 °C bilo je praćeno strukturnim pojednostavljenjem BAT i jetre, smanjenjem mase mišića i jetre, hipertrofijom WAT, slabljenjem antioksidativne odbrane u rWAT i oksidativnog metabolizma u mišiću, gWAT i jetri. Dugotrajna hladnoća je očuvala strukturnu složenost BAT i jetre i povećala njihov redoks-metabolički kapacitet, posebno održavanjem nivoa enzima β -oksidacije i glukoneogeneze u jetri, uz redukciju lipidnih depoa u WAT i tkivno-specifično prilagođavanje oksidativnog metabolizma. Aktivnost i ekspresija ključnih antioksidativnih enzima u rWAT, BAT i mišiću bile su veće nego kod životinja iste starosti na 22 °C. Rezultati pokazuju tkivno-specifične redoks-metaboličke obrasce i očuvanje kapaciteta za remodeliranje u odgovoru na dugotrajnu hladnoću tokom starenja, potencijalno doprinoseći proceni biološke starosti organa.

KLJUČNE REČI: biologija starenja, aklimacija, jetra, mrko i belo masno tkivo, mišić, redoks-metabolizam, ekofiziologija

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Biologija ćelija i tkiva

Redox-metabolic homeostasis in the liver, muscle, white adipose tissue depots and brown adipose tissue during chronological ageing of rats chronically exposed to low environmental temperature

SUMMARY

Ageing is a dynamic biological process characterised by the loss of morpho-functional organisation and adaptive plasticity of the organism, with redox-metabolic regulation representing one of the key aspects of this process. Although chronic exposure to low environmental temperature in rodents induces complex thermoregulatory, redox, and metabolic responses, their significance in the context of age-related changes and their tissue-specific regulation remains understudied. The aim of this dissertation was to investigate redox-metabolic reprogramming of tissues essential for maintaining energy homeostasis during ageing, with particular emphasis on the effects of cold exposure. Morphological and functional analyses were performed on the liver, skeletal muscle (*m. gastrocnemius*), brown (BAT) and white adipose tissue (rWAT and gWAT) of rats aged 3, 6, and 24 months, housed either at room temperature (22 ± 1 °C) or at 4 ± 1 °C (from 6 to 24 months). Ageing at 22 °C was accompanied by structural simplification of BAT and liver, reduced muscle and liver mass, hypertrophy of WAT, weakened antioxidant defence in rWAT, and diminished oxidative metabolism in muscle, gWAT, and liver. Chronic cold exposure preserved the structural complexity of BAT and liver and enhanced their redox-metabolic capacity, particularly by maintaining β -oxidation and gluconeogenesis enzyme levels in the liver, while reducing lipid depots in WAT and promoting tissue-specific adjustments of oxidative metabolism. The activity and expression of key antioxidant enzymes in rWAT, BAT, and muscle were higher than in age-matched rats kept at 22 °C. These findings demonstrate tissue-specific redox-metabolic patterns and preservation of the capacity for remodelling in response to long-term cold exposure during ageing, potentially contributing to the assessment of the biological age of organs.

KEYWORDS: biology of ageing, acclimation, liver, brown and white adipose tissue, muscle, redox-metabolism, ecophysiology

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SPECIAL TOPIC: Cell and Tissue Biology

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Starenje i redoks-metabolička homeostaza	1
1.2. Tkivna specifičnost i aklimacija na hladnoću	10
1.3. Strukturna složenost i biološka senescencija	16
2. CILJEVI	17
3. MATERIJAL I METODE	18
3.1. Dizajn ogleda i uzorkovanje tkiva	18
3.2. Priprema uzoraka za analize	18
3.2.1. Priprema uzoraka za određivanje aktivnosti enzima, Western blot i biohemijske analize	18
3.2.2. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima	18
3.2.3. Priprema za svetlosnu i fluorescentnu mikroskopiju	19
3.3. Određivanje aktivnosti enzima antioksidativne odbrane i sadržaja glutaciona	19
3.3.1. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze	19
3.3.2. Određivanje aktivnosti katalaze	19
3.3.3. Određivanje aktivnosti glutacion peroksidaze	19
3.3.4. Određivanje aktivnosti glutacion reduktaze	19
3.3.5. Određivanje aktivnosti tioredoksin reduktaze	20
3.3.6. Određivanje aktivnosti glutacion S-transferaze	20
3.3.7. Određivanje ukupnog sadržaja glutaciona	20
3.4. SDS-PAGE i Western blot analiza	20
3.4.1. Elektroforeza proteina	20
3.4.2. Prenos proteina sa gela na membranu i imunodetekcija (Western blot)	21
3.4.3. Kvantifikacija rezultata Western blot analize	21
3.5. Fraktalna i morfometrijska analiza	23
3.5.1. Fraktalna i morfometrijska analiza BAT	23
3.5.2. Morfometrijska analiza rWAT i gWAT	23
3.5.3. Fraktalna i morfometrijska analiza jetre	23
3.5.4. Relativna masa tkiva	23
3.6. Određivanje koncentracije biohemijskih parametara	23
3.7. Statistička obrada rezultata	24
4. REZULTATI	25
4.1. Analiza promena telesne mase i unosa hrane tokom hronološkog starenja pacova na sobnoj temperaturi i na hladnoći	25
4.2. Analiza biohemijskih parametara u cirkulaciji tokom starenja	26

4.3. Analiza strukturnog remodeliranja i redoks-metaboličkog reprogramiranja BAT tokom hronološkog starenja pacova na sobnoj temperaturi i na hladnoći	28
4.3.1. Fraktalna i morfometrijska analiza.....	28
4.3.2. Aktivnosti enzima antioksidativne odbrane i količina glutaciona	28
4.3.3. Proteinska ekspresija komponenti antioksidativne odbrane	31
4.3.4. Nivo proteinskih adukata sa 4-HNE	33
4.3.5. Proteinska ekspresija pAMPK, PGC-1 α i Nrf2	34
4.3.6. Proteinska ekspresija kompleksa respiratornog lanca i ATP sintaze	35
4.3.7. Proteinska ekspresija UCP1	36
4.3.8. Proteinska ekspresija glikolitičkog enzima GAPDH	37
4.4. Analiza strukturnog remodeliranja i redoks-metaboličkog reprogramiranja rWAT tokom hronološkog starenja pacova na sobnoj temperaturi i na hladnoći	38
4.4.1. Morfometrijska analiza	38
4.4.2. Aktivnosti enzima antioksidativne odbrane i količina glutaciona	39
4.4.3. Proteinska ekspresija komponenti antioksidativne odbrane	39
4.4.4. Nivo proteinskih adukata sa 4-HNE	42
4.4.5. Proteinska ekspresija pAMPK, PGC-1 α i Nrf2	43
4.4.6. Proteinska ekspresija kompleksa respiratornog lanca i ATP sintaze	44
4.4.7. Proteinska ekspresija UCP1	45
4.5. Analiza strukturnog remodeliranja i redoks-metaboličkog reprogramiranja gWAT tokom hronološkog starenja pacova na sobnoj temperaturi i na hladnoći	46
4.5.1. Morfometrijska analiza	46
4.5.2. Proteinska ekspresija komponenti antioksidativne odbrane	47
4.5.3. Nivo proteinskih adukata sa 4-HNE	49
4.5.4. Proteinska ekspresija pAMPK, PGC-1 α i Nrf2	50
4.5.5. Proteinska ekspresija kompleksa respiratornog lanca i ATP sintaze	51
4.5.6. Proteinska ekspresija glikolitičkog enzima GAPDH	52
4.6. Analiza strukturnog remodeliranja i redoks-metaboličkog reprogramiranja jetre tokom hronološkog starenja pacova na sobnoj temperaturi i na hladnoći	53
4.6.1. Fraktalna i morfometrijska analiza.....	53
4.6.2. Aktivnosti enzima antioksidativne odbrane i količina glutaciona	54
4.6.3. Proteinska ekspresija komponenti antioksidativne odbrane	55
4.6.4. Nivo proteinskih adukata sa 4-HNE	55
4.6.5. Proteinska ekspresija pAMPK i PGC-1 α	58
4.6.6. Proteinska ekspresija kompleksa respiratornog lanca i ATP sintaze	59
4.6.7. Proteinska ekspresija citrat sintaze.....	60
4.6.8. Proteinska ekspresija PCK2, mitohondrijskog enzima glukoneogeneze	61

4.6.9. Ekspresija mitohondrijskih proteina uključenih u transport i β -oksidaciju masnih kiselina	62
4.7. Analiza redoks-metaboličkog reprogramiranja skeletnog mišića tokom hronološkog starenja pacova na sobnoj temperaturi i na hladnoći	63
4.7.1. Relativna masa	63
4.7.2. Aktivnosti enzima antioksidativne odbrane i količina glutaciona	64
4.7.3. Proteinska ekspresija komponenti antioksidativne odbrane	64
4.7.4. Nivo proteinskih adukata sa 4-HNE	67
4.7.5. Proteinska ekspresija PGC-1 α i Nrf2	68
4.7.6. Proteinska ekspresija kompleksa respiratornog lanca i ATP sintaze	69
4.7.7. Proteinska ekspresija glikolitičkog enzima GAPDH	70
5. DISKUSIJA	71
5.1. Od morfološkog pojednostavljenja BAT tokom starenja na sobnoj temperaturi do usložnjavanja i redoks-metaboličkog reprogramiranja na hladnoći.....	71
5.2. Redoks-metabolička mobilizacija i inverzija hipertrofičnog fenotipa depoa WAT kod starih pacova na hladnoći	75
5.3. Od redukcije mase skeletnog mišića tokom starenja na sobnoj temperaturi do redoks-metaboličke mobilizacije na hladnoći	78
5.4. Specifičan redoks-metabolički profil jetre tokom starenja u osnovi razrastanja i usložnjavanja organa na hladnoći	80
5.5. Intertkivna integracija: redoks-metaboličko reprogramiranje tokom starenja na hladnoći.....	84
6. ZAKLJUČCI	85
7. LITERATURA	87

1. UVOD

1.1. Starenje i redoks-metabolička homeostaza

Starenje je progresivno narušavanje strukturno-funkcijskog ustrojstva živog bića koje rezultuje povećanjem mortaliteta sa protokom vremena. Iako se smatra da počinje već od rođenja, starenje postaje naročito izraženo u postreproduktivnom periodu (McDonald, 2019). Glavna obeležja starenja su klasifikovana na primarna obeležja koja su uzrok oštećenja (genomska nestabilnost, skraćivanje telomera, epigenetičke promene, gubitak proteostaze i onemogućena makroautofagija), antagonistička obeležja kao odgovor na oštećenja (narušena regulacija odgovora na nutrijente, mitohondrijska disfunkcija i ćelijska senescencija) i integrativna obeležja koja su odgovorna za klinički fenotip starenja (iscrpljivanje matičnih ćelija, izmenjena međućelijska komunikacija, hronična inflamacija i disbioza) (López-Otín i sar., 2023). Iako se mikroskopske i molekulske promene obuhvaćene ovim obeležjima odražavaju na celokupan organizam, starenje nije homogen proces (Xiong i sar., 2025). Noviji konceptualni okvir razlikuje *analogno* i *digitalno* starenje (Rando i Wyss-Coray, 2021), odnosno starenje na nivou makroskopskih struktura u čijoj osnovi je ćelijska senescencija. Pored hronološkog starenja koje je određeno uzrastom jedinke, biološko starenje pruža uvid u relativnu starost koja je determinisana opštim statusom organizma, odnosno stupnjem uznapređovalosti procesa starenja. Oдавde sledi da se hronološko i biološko starenje ne moraju nužno poklapati jer jedinke istog uzrasta mogu stariti različitom brzinom (Ferrucci i sar., 2020; Rando i Wyss-Coray, 2021; Vera i sar., 2025; Xiong i sar., 2025), ali isto tako se i ćelijske populacije u okviru jednog tkiva mogu razlikovati u pogledu adaptivne vrednosti (Rando i Wyss-Coray, 2021). U procesu starenja, ove *digitalne*, molekulske maladaptacije i disregulacije, procesi poput skraćivanja telomera i nagomilavanja lipofuscina usled narušene proteostaze, postepeno se *šire* kroz ćelijske populacije, pospešujući starenje tkiva. Međutim, kako nisu svi ćelijski tipovi podložni starenju u istoj meri, smatra se da se tkiva i organi, baš kao i jedinke, međusobno razlikuju po stopi kojom stare. Činjenica da senescentna tkiva i organi imaju specifičan sekretorni fenotip, odnosno da otpuštanjem određenih molekula stvaraju svojevrsni milje koji ubrzava narušavanje strukturno-funkcijskih kapaciteta okolnih ćelija i tkiva, objašnjava prostorno-vremensku heterogenost starenja (Rando i Wyss-Coray, 2021; Wang i sar., 2024; Xiong i sar., 2025). Ovaj aspekt senescencije naglašava značaj ispitivanja ne samo sistemskih parametara tokom vremena, već i pojedinačnih organa i tkiva kako bi se produbilo razumevanje multifaktorskog procesa kakvo je starenje.

Iako je uslovljeno unutrašnjim faktorima i neminovno napreduje tokom života, starenje je dominantno modulirano spoljašnjim činiocima (Argentieri i sar., 2025; Shiels i sar., 2025) poput temperature sredine (Kalia i sar., 2022; Ni i sar., 2023; Kallio i sar., 2025). Ovaj abiotički faktor ima sistemski uticaj na metaboličku stopu koja se kod starih glodara izlaganih hladnoći intenzivira (Asaki i Iriki, 1994; Selman i sar., 2008; Vaanholt i sar., 2009), odražavajući ubrzanje energetskog metabolizma na nivou pojedinačnih organa. Metabolizam, definisan kao promet materije i energije, obuhvata sve hemijske reakcije koje se odvijaju unutar organizma, uključujući i oksido-redukcije. Harman je prvi pisao o sprezi metaboličke stope, starenja i reaktivnih molekulskih vrsta, zaključivši da se starenje i degenerativne bolesti povezane sa njim pripisuju napadima slobodnih radikala na sastavne delove ćelija i vezivno tkivo (Harman, 1956). Prema tome, ova slobodnoradikalna hipoteza povezuje nakupljanje reaktivnih molekulskih vrsta (kako kiseonika tako i azota, eng. *reactive oxygen and nitrogen species*: ROS, RNS), neizbežnih nusprodukata aerobnog metabolizma, tokom hronološkog starenja, sa povišenim nivoima oksidativnih oštećenja biomolekula (Shields i sar., 2021). Danas se zna da je redoks-metabolička regulacija ukorenjena u adaptacijama aerobnih organizama na sredinu bogatu kiseonikom (Benzie, 2000), čiji začeci sežu više od 2,4 milijarde godina u prošlost, u doba „prve redoks revolucije“ (Ostrander i sar., 2021). ROS nastaju iz višestrukih endogenih izvora, pri čemu su mitohondrijska respiracija i (peroksizomska) oksidacija masnih kiselina glavni doprinosioci (Halliwell, 2024). Usled potencijalno štetnih efekata reaktivnih

molekula, prirodna selekcija je favorizovala razvoj antioksidativne odbrane (eng. *antioxidant defence*, AD, Sl. 1 i 2). Ona obuhvata neenzimske komponente, kao što je glutathion (GSH), i niz enzima. Sinteza GSH odvija se *de novo* u citoplazmi (pretežno hepatocita) kroz dva ATP-zavisna koraka koje katalizuju γ -glutamylcistein ligaza (eng. *gamma-glutamylcysteine ligase*, γ GCL) i glutathion sintetaza (eng. *glutathione synthetase*, GS). Katabolizam GSH započinje na spoljašnjoj strani ćelijske membrane dejstvom γ -glutamyl transpeptidaze (eng. *gamma-glutamyl transpeptidase*, GGT), koja prenosi γ -glutamilnu grupu na akceptorsku aminokiselinu. Nastali cisteinilglicin se posredstvom dipeptidaza razlaže na slobodni cistein i glicin, koji ponovo ulaze u ćeliju. Unutarćelijska γ -glutamilaminokiselina podleže dejstvu γ -glutamyl ciklotransferaze, oslobađajući aminokiselinu i 5-oksoprolin. Finalno, 5-oksoprolinaza uz utrošak ATP-a prevodi 5-oksoprolin u glutaminsku kiselinu, čime se zatvara ciklus i regeneriše supstrat za novu sintezu GSH (Halliwell i Gutteridge, 2015).

U pogledu enzima AD, superoksid dismutaze (eng. *superoxide dismutase*, SOD) vrše dismutaciju superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$) do vodonik peroksida (H_2O_2), dok su enzimi za neutralizaciju peroksida, između ostalih, katalaza (eng. *catalase*, CAT) i glutathion peroksidaza (eng. *glutathione peroxidase*, GSH-Px). Dok CAT uklanja H_2O_2 , izoforma GSH-Px4 specifično uklanja lipidne hidroperoksida, a GSH-Px1 širi spektar organskih hidroperoksida, pored H_2O_2 . Osim GSH-Px, drugi enzimi glutationskog i tioredoksinskog sistema uključuju glutathion reduktazu (eng. *glutathione reductase*, GR), tioredoksin reduktazu (eng. *thioredoxin reductase*, TR) i glutathion S-transferazu (eng. *glutathione S-transferase*, GST) (Halliwell, 2024). Kolektivno, oni održavaju ćelijsku redoks ravnotežu kroz različite, međusobno povezane i vremenski sinhronizovane mehanizme, uključujući detoksifikaciju elektrofila putem izoformi GST koje mogu uklanjati i organske hidroperoksida (Perperopoulou i sar., 2016) ili 4-hidroksinonenal (eng. *4-hydroxynonenal*, 4-HNE), aldehid nastao transformacijom lipidnih hidroperoksida (Hubatsch i sar., 1998). Održavanje zaliha GSH, kao i redukciju proteinskih disulfidnih veza i deglutathionilaciju proteina, primarno katalizuju tioredoksinski i glutaredoksinski sistemi (Shields i sar., 2021; Chai i Mieyal, 2023). Postoji više izoformi enzima AD karakterističnih za određene tipove ćelija i/ili podćelijske odeljke (Sl. 2). Na primer, kod sisara, izoforma bakar-cink SOD (CuZnSOD) nalazi se dominantno u citoplazmi (SOD1), odnosno sa spoljašnje strane ćelijske membrane (SOD3), dok je mangan SOD (MnSOD/SOD2) lociran u matriksu mitohondrija. CAT je najzastupljenija u peroksizomima, dok je peroksiredoksin 3 (eng. *peroxiredoxin-3*, PRDX3) izoforma tioredoksin-zavisne peroksidaze specifične za mitohondrije (Halliwell i Gutteridge, 2015). Kompartimentalizacija drugih izoformi PRDX, kao i izoformi GSH-Px, GR, TR i GST (Shields i sar., 2021), prikazana je na Slici 2. Stoga su kako prostorna, tako i vremenska koordinacija komponenti AD važne za održavanje fizioloških koncentracija određenih reaktivnih molekulskih vrsta (Jones i Sies, 2015; Shields i sar., 2021).

Transkripcioni faktor Nrf2 (eng. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) jeste jedan od najbolje ispitanih molekula uključenih u regulaciju redoks-metaboličke homeostaze. Nrf2 ne samo da reguliše ekspresiju gena koji kodiraju određene enzime AD i proteine uključene u metabolizam GSH, već i ekspresiju gena za enzime koji učestvuju u putu pentozofosfata (eng. *pentose phosphate pathway*, PPP) koji obnavlja NADPH, kofaktor pojedinih enzima AD. Nrf2 učestvuje i u regulaciji ekspresije gena koji kodiraju enzime uključene u oksidaciju masnih kiselina, sintezu nukleotida i serina, i dr. (Lin i sar., 2016). Ovaj transkripcioni faktor je regulisan vezivanjem za Keap1 (eng. *Kelch-like ECH-associated protein 1*) koji ga usmerava na ubikvitinaciju i degradaciju u proteazomima. Prilikom povećanja nivoa ROS, dolazi do modifikacije cisteinskih ostataka na Keap1, što dovodi do oslobađanja i stabilizacije Nrf2, njegove translokacije u nukleus i vezivanja za specifične sekvence (eng. *antioxidant response element*, ARE) u promotorima ciljnih gena (Schmidlin i sar., 2019). U skladu sa potencijalnim narušavanjem AD sa starenjem, rezultati istraživanja upućuju na remećenje signalizacije posredovane Nrf2 u poznom životnom dobu (Smith i sar., 2015; Zhang i sar., 2015; Schmidlin i sar., 2019; Buttari i sar., 2025). Međutim, višedecenijska istraživanja u svetlu slobodnoradikalske hipoteze iznedrila su i oprečne nalaze. Iako su nivoi ROS i oksidativnih oštećenja često u negativnoj korelaciji sa dugovečnošću (Ku i sar., 1993; Ku i Sohal,

1993; Pamplona i sar., 1996; Pamplona i sar., 1999), podaci o vezi između dužine životnog veka i nivoa enzima AD su kontradiktorni (Sohal i sar., 1990; Lopez-Torres i sar., 1993; Pérez-Campo i sar., 1994; Page i sar., 2010), što se ogleda u studijama koje su uključivale kako prekomernu ekspresiju (Schriner i sar., 2005; Pérez i sar., 2011) tako i deleciju gena za određene enzime AD (Neumann i sar., 2003; Elchuri i sar., 2005; Ran i sar., 2007; Pérez i sar., 2008; Singh i sar., 2010; Wei i sar., 2012; Pérez-Estrada i sar., 2019). Čak i suplementacija egzogenim antioksidantima, poput vitamina C ili N-acetil cisteina, daje nekonzistentne efekte na preživljavanje (Massie i sar., 1984; Flurkey i sar., 2010; Selman i sar., 2013). Nasuprot tome, prooksidativni molekuli i stanja koja su praćena povišenim nivoima ROS mogu produžiti životni vek (Conti i sar., 2006; Ali i sar., 2010; Weimer i sar., 2014), što sugerise da je odnos između ROS, AD i starenja znatno složeniji. Štaviše, ROS nisu nužno štetni, već esencijalni signalni molekuli uključeni u posredovanje adaptivnih odgovora koji povećavaju otpornost organizma (Davies, 2016).

Pored Harmana, Piter Mičel se takođe može smatrati jednim od pionira redoks paradigme u biologiji. Njegova hemiosmotska hipoteza (Mitchell, 1961) dala je podstrek za uvid u spregnutost oksido-redukcionih reakcija sa osnovnim metaboličkim putevima, doprinoseći razumevanju redoks-metaboličke homeostaze. Na osnovu toga da li su uključeni u biosintezu ili biorazgradnju molekula, metabolički putevi i ciklusi se mogu podeliti na anaboličke i kataboličke. Kako bi obezbedile energiju, životinje vrše oksidaciju lipida, ugljenih hidrata i proteina. Metabolički putevi su kompartmentalizovani i precizno regulisani kako bi se odgovorilo na trenutne energetske zahteve organizma (Sl. 3). Centralni katabolički procesi obuhvataju β -oksidaciju masnih kiselina, glikolizu, Krebsov ciklus i oksidativnu fosforilaciju (eng. *oxidative phosphorylation*, OXPHOS), dok su glukoneogeneza, sinteza glikogena, masnih kiselina, aminokiselina, triacilglicerola (eng. *triacylglycerol*, TAG) i nukleotida neki od važnih anaboličkih procesa (Nelson i sar., 2021).

Razlaganje glukoze započinje u citoplazmi u procesu glikolize (Slike 3 i 4). Kroz seriju enzimskih reakcija, jedan molekul glukoze se konvertuje u dva molekula piruvata, uz neto prinos od dva molekula ATP (putem fosforilacije na nivou supstrata) i dva molekula redukovano nikotinamid adenin dinukleotida (eng. *nicotinamide adenine dinucleotide*, NADH). Intermedijeri glikolize istovremeno služe kao prekursori za različite biosintetske puteve. Sudbina piruvata zavisi od dostupnosti O_2 i metaboličkog profila tkiva. Kada je smanjena raspoloživost O_2 ili je mitohondrijski kapacitet ograničen, piruvat se redukuje do laktata, čime se regeneriše NAD^+ neophodan za kontinuitet glikolitičkog fluksa. Piruvat ulazi u mitohondrije gde podleže oksidativnoj dekarboksilaciji posredstvom piruvat dehidrogenaznog kompleksa (eng. *pyruvate dehydrogenase complex*, PDH), formirajući acetil-CoA. Regulacija glikolize se primarno ostvaruje na nivou tri ireverzibilne reakcije koje katalizuju heksokinaza, fosfofruktokinaza-1 (eng. *phosphofructokinase 1*, PFK-1) i piruvat kinaza. PFK-1 predstavlja ključnu regulatornu tačku; njena aktivnost je alosterično modulirana koncentracijom AMP i citrata, dok fruktozo 2,6-bisfosfat deluje kao najsnažniji aktivator, čiji nivo direktno zavisi od hormonskih signala (insulina i glukagona) (Sl. 5). PDH kompleks je dodatno regulisan kovalentnom modifikacijom – fosforilacijom putem specifičnih kinaza (eng. *pyruvate dehydrogenase kinase*, PDK) koje inhibiraju kompleks kada su nivoi NADH i acetil-CoA visoki (najčešće usled intenzivne β -oksidacije), čime se štedi glukoza i održava oslanjanje na oksidaciju masnih kiselina. Pored glikolize, deo glukoze 6-fosfata ulazi u PPP koji je ključan za redukciju $NADP^+$ do NADPH, kao i za konverziju heksoza u pentoze čiji derivati su sastavni deo adeninskih i flavinskih nukleotida. NADPH je neophodan kofaktor za održavanje redoks homeostaze, npr. kroz regeneraciju redukovano glutaciona i tioredoksina ili redukciju O_2 do $O_2^{\cdot-}$ od strane NADPH oksidaza (eng. *NADPH oxidases*, NOXs). Pored toga, NADPH se koristi i u biosintetskim reakcijama, poput sinteze masnih kiselina, holesterola i steroidnih hormona (Nelson i sar., 2021).

Sinteza glukoze *de novo*, odnosno glukoneogeneza (Sl. 5), odvija se dominantno u jetri i korteksu bubrega. Ovaj proces, lokalizovan u citoplazmi i delimično u mitohondrijama, omogućava održavanje glikemije tokom perioda gladovanja korišćenjem neugljenohidratnih prekursora kao što su laktat, glicerol i glukogene aminokiseline. Glukoneogeneza nije reverzni proces glikolize; ona

koristi specifične enzime: piruvat karboksilazu, fosfoenolpiruvat karboksikinazu (eng. *phosphoenolpyruvate carboxykinase*, PEPCK), fruktozo 1,6-bisfosfatazu i glukozo 6-fosfatazu. Piruvat karboksilaza se nalazi u mitohondrijama, dok PEPCK ima i mitohondrijsku i citoplazmatsku izoformu. Recipročna regulacija glikolize i glukoneogeneze u citoplazmi sprečava simultano odvijanje oba procesa, što se primarno ostvaruje preko alosteričnog efektor fruktozo 2,6-bisfosfata. Visoka koncentracija ovog molekula u ćeliji deluje kao snažan aktivator PFK-1 (ključnog enzima glikolize), dok istovremeno inhibira aktivnost fruktozo 1,6-bisfosfataze (ključnog enzima glukoneogeneze). Na ovaj način, kada je glikolitički put aktivan, glukoneogeneza je suprimirana. Hormonska regulacija putem insulina i glukagona modifikuje nivo fruktozo 2,6-bisfosfata, usmeravajući metabolički fluks u skladu sa potrebama organizma za glukozom (Nelson i sar., 2021).

Višak glukoze se skladišti u formi glikogena koji služi kao primarna rezerva deponovana najviše u hepatocitima i mišićima. Metabolizam glikogena omogućen je radom glikogen fosforilaze i glikogen sintaze, čije su aktivnosti recipročno regulisane kovalentnim modifikacijama pod uticajem insulina, glukagona i adrenalina. Naime, insulin stimuliše sintezu glikogena aktivacijom fosfataze (eng. *phosphoprotein phosphatase 1*, PP1) koja defosforilacijom stimuliše glikogen sintazu, a inhibira glikogen fosforilazu. Dodatno, insulin inhibira kinazu glikogen sintaze, čime se sprečava fosforilacija i deaktivacija glikogen sintaze. Sa druge strane, adrenalin i glukagon stimulišu glikogenolizu inhibicijom PP1 i stimulisanjem kinaze glikogen fosforilaze; fosforilisana glikogen fosforilaza se posledično aktivira i razlaže glikogen (Nelson i sar., 2021).

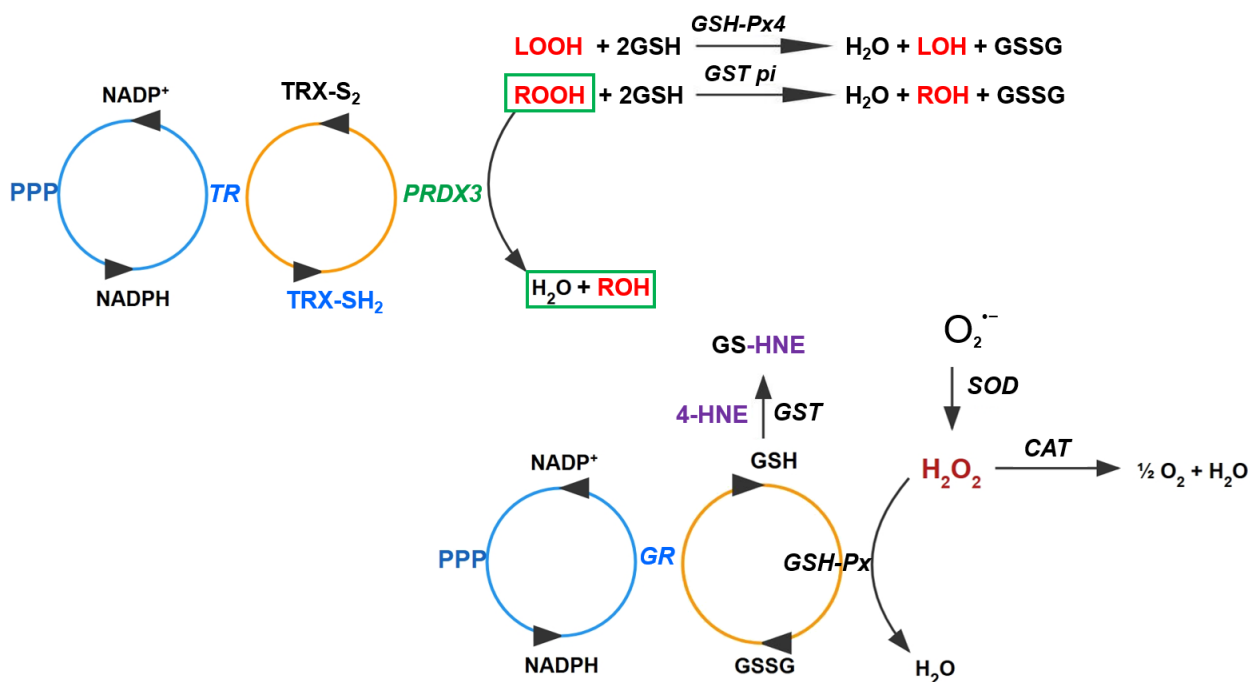
Lipidi predstavljaju najveći depo energije. Katabolizam masnih kiselina (β -oksidacija) odvija se u matriksu mitohondrija uz učešće specifičnih dehidrogenaza, poput acil-CoA dehidrogenaze srednjeg lanca (eng. *acyl-Coenzyme A dehydrogenase medium chain*, ACADM), što rezultuje proizvodnjom acetil-CoA, NADH i FADH₂. Masne kiseline se najpre aktiviraju radom acil-CoA sintetaze na citoplazmatskoj strani spoljašnje membrane mitohondrija, pri čemu se tioestarskom vezom spajaju sa koenzimom A i nastaje acil-CoA koji karnitin-aciltransferaza poput karnitin-palmitoiltransferaze 1 (eng. *carnitine palmitoyltransferase 1*, CPT-1), takođe na spoljašnjoj membrani mitohondrija, prevodi u acil-karnitin kako bi ušao u međumembranski prostor odakle kroz transporter na unutrašnjoj membrani dospeva u matriks. U matriksu se acil-karnitin prevodi u acil-CoA radom karnitin-aciltransferaze poput CPT-2 na unutrašnjoj membrani. Acil-CoA zatim može da uđe u proces β -oksidacije. Acil-CoA sintetaza i CPT-1/2 označeni su kao karnitinski nosač (eng. *carnitine shuttle*). Dok se u mitohondrijama oksiduju masne kiseline kraćeg lanca, razgradnja dugolančanih i razgranatih masnih kiselina započinje u peroksizomima (Nelson i sar., 2021) (Sl. 3).

Nasuprot oksidaciji, *de novo* sinteza masnih kiselina lokalizovana je u citoplazmi i najintenzivnije se odvija u ćelijama poput hepatocita i adipocita. Alosterična kontrola sprečava istovremeno odvijanje sinteze i razgradnje masnih kiselina. Prvi i ograničavajući korak sinteze masnih kiselina je karboksilacija acetil-CoA, koju katalizuje acetil-CoA karboksilaza (eng. *acetyl-CoA carboxylase*, ACC), pri čemu nastaje malonil-CoA. Povišena koncentracija malonil-CoA u citoplazmi deluje kao snažan alosterični inhibitor CPT-1, čime se blokira transport acil-karnitina u mitohondrije i sprečava proces β -oksidacije. Time se osigurava da se novosintetisane masne kiseline ne razgrađuju neposredno nakon nastanka, već se usmeravaju ka skladištenju u vidu TAG. Aktivnost ACC reguliše se kovalentno i alosterično: AMPK (eng. *AMP-activated protein kinase*) fosforilacijom inhibira ACC kada je koncentracija AMP visoka, dok insulin defosforilacijom aktivira ACC u stanju visoke energetske dostupnosti (niska zastupljenost AMP u ćeliji). Citrat je alosterični aktivator ACC, a palmitoil-CoA inhibitor. Ovim mehanizmima koncentracija malonil-CoA precizno odražava energetski status i usmerava ćeliju ka sintezi ili oksidaciji masnih kiselina (Nelson i sar., 2021). Pored inhibicije biosinteze masnih kiselina i drugih anaboličkih procesa u uslovima energetske deficita, fosforilisana AMPK (eng. *phosphorylated AMPK*, pAMPK) stimuliše kataboličke procese (uključujući lipolizu i glikolizu) i preuzimanje glukoze (Malik i Shaw, 2025). Na dugoročnom planu, AMPK reguliše ćelijsku plastičnost i održanje redoks-metaboličke homeostaze tako što stimuliše makroautofagiju i mitofagiju, kao i ekspresiju transkripcionih

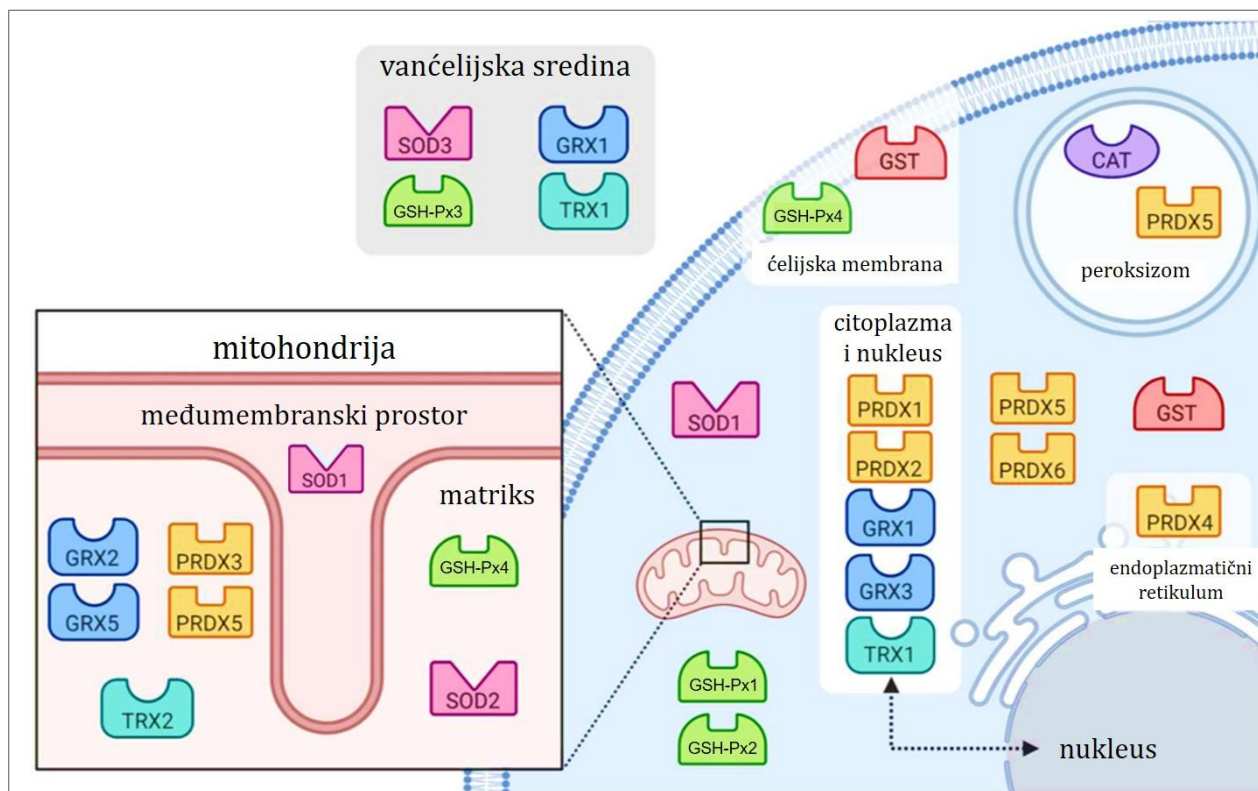
koaktivatora poput PGC-1 α (eng. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) sa kojim je uključena u aktivaciju programa biogeneze mitohondrija (Malik i Shaw, 2025).

Acetil-CoA, nastao iz različitih kataboličkih izvora, ulazi u Krebsov ciklus gde se potpuno oksiduje do CO₂. Regulacija fluksa kroz ciklus ostvaruje se na nivou tri reakcije (katalizovane citrat sintazom, izocitrat i α -ketoglutarat dehidrogenazom) koje su alosterično inhibirane visokim energetske (ATP) i redoks (NADH) potencijalom, kao i proizvodima (citrat, sukcinil-CoA), dok ADP alosterično aktivira prva dva enzima, a Ca²⁺ specifično obe dehidrogenaze. Primarni značaj ovog ciklusa (čiji intermedijeri ulaze i u biosintetske reakcije) jeste generisanje redukcionih ekvivalenata, NADH i FADH₂, koji zatim redukuju kompleks I, odnosno kompleks II (u slučaju FADH₂) respiratornog lanca unutrašnje mitohondrijske membrane. Protok elektrona kroz komplekse respiratornog lanca (I–IV) do O₂ spregnut je sa pumpanjem protona iz matriksa u međumembranski prostor. Elektroni ulaze u ovaj sistem preko kompleksa I (NADH:ubihinon oksidoreduktaze) ili kompleksa II (sukcinat dehidrogenaze). Kompleks I oksiduje NADH i prenosi elektrone na mobilni nosač ubihinon, koristeći oslobođenu energiju za pumpanje četiri protona. Kompleks II, koji predstavlja direktnu sponu sa Krebsovim ciklusom, oksiduje sukcinat do fumarata i predaje elektrone ubihinonu preko FADH₂, ali bez translokacije protona kroz membranu. Redukovani ubihinon (ubihinol) dalje transportuje elektrone do kompleksa III (ubihinon:citohrom c oksidoreduktaze), koji pumpanjem još četiri protona nastavlja generisanje gradijenta. Finalni prenos elektrona vrši se sa citohroma c na kompleks IV (citohrom c oksidazu), gde se odvija potpuna redukcija O₂ do H₂O, uz pumpanje dva protona u međumembranski prostor. Energija akumulirana u vidu proton-pokretačke sile (elektrohemijjskog potencijala) finalno se transformiše u hemijsku energiju (ATP) delovanjem ATP sintaze, čija F₀ komponenta služi kao kanal za povratak protona u matriks, dok F₁ komponenta koristi tu energiju za katalizu sinteze ATP iz ADP i neorganskog fosfata (Sl. 4). Na ovaj način spregnutost oksido-redukcionih reakcija sa proizvodnjom energije tj. susticanje redukcionog potencijala poreklom iz kataboličkih puteva na unutrašnjoj membrani mitohondrija, doprinosi oksidativnoj fosforilaciji (Nelson i sar., 2021).

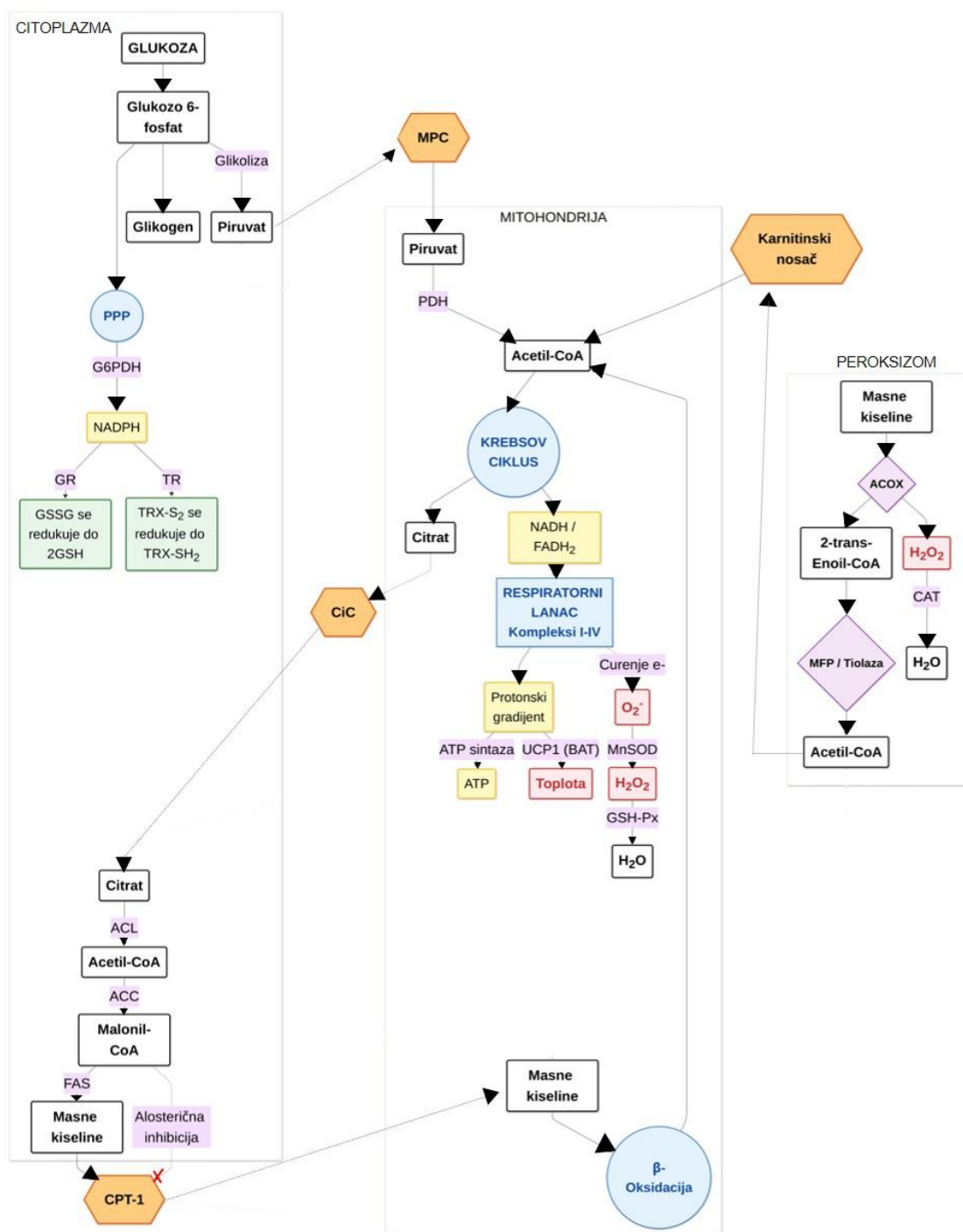
Tokom hronološkog starenja profili tkiva i organa se specifično prilagođavaju (Xiong i sar., 2025), uz očuvanje glavnih metaboličkih flukseva (Jankowski i sar., 2025). Stoga starenje treba posmatrati kao inherentni biološki proces, a ne kao patološko stanje (Libertini i sar., 2017; McDonald, 2019). Redoks-metaboličko reprogramiranje koje prati hronološko starenje nalazi se u osnovi strukturnih i funkcijskih promena specifičnih tkiva i organa. Poznata je povezanost hronološkog starenja sa većim rizikom od razvoja određenih metaboličkih poremećaja (Li i sar., 2021b), uključujući uvećanje visceralnih depoa belog masnog tkiva (eng. *white adipose tissue*, WAT) u starenju (Gonçalves i sar., 2017). Ovo zajedno sa atrofijom mišića može dovesti do sarkopenične gojaznosti (Fulle i sar., 2004). Lipidi se tokom hronološkog starenja mogu akumulirati i u jetri (Croce i sar., 2022), skeletnim mišićima (Russ i sar., 2025) i na zidovima krvnih sudova, ali i u mrkom masnom tkivu (eng. *brown adipose tissue*, BAT) koje postaje slično WAT (Zhao i sar., 2025). Budući da temperatura sredine utiče na redoks-metaboličko reprogramiranje na sistemskom nivou, a time potencijalno i na sam proces starenja, ispitivanje profila navedenih tkiva/organa kod glodara koji su dugoročno izlagani niskoj temperaturi je od izuzetnog značaja.



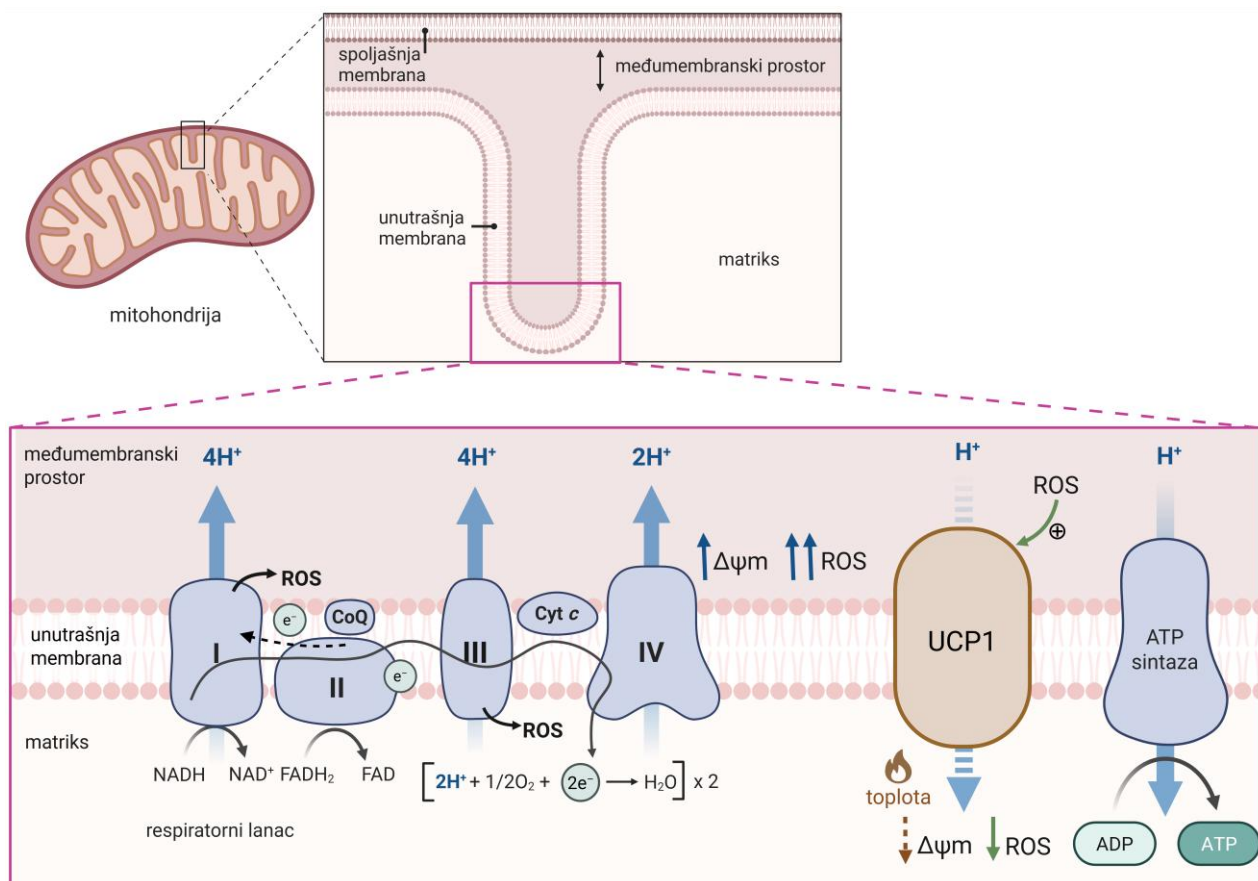
Sl. 1. Pojednostavljen prikaz komponenti antioksidativne odbrane i njihove povezanosti. O₂^{•-} – superoksid anjon radikal; SOD – superoksid-dismutaza; H₂O₂ – vodonik peroksid; CAT – katalaza; GSH – redukovani glutation; GSSG – oksidovani glutation; GSH-Px – glutation peroksidaza (uključujući izoformu GSH-Px4); GR – glutation reduktaza; TRX-SH₂ – redukovani tioredoksin; TRX-S₂ – oksidovani tioredoksin; TR – tioredoksin reduktaza; NADP⁺/NADPH – oksidovani/redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat; PPP – put pentozofosfata; ROOH/LOOH – organski/lipidni hidroperoksidi; ROH/LOH – organski/lipidni alkoholi; PRDX3 – peroksiredoksin 3; 4-HNE – 4-hidroksinonenal; GS-HNE – glutation konjugat 4-hidroksinonenala; GST(pi) – glutation S-transferaza (pi).



Sl. 2. Kompartmentalizacija komponenti antioksidativne odbrane. CAT – katalaza; GSH-Px – glutation peroksidaza; GRX – glutaredoksin; GST – glutation S-transferaza; PRDX – peroksiredoksin; SOD – superoksid dismutaza; TRX – tioredoksin. Brojevi uz skraćenice označavaju specifične izoforme navedenih enzima. Prema Shields i sar., 2021.



Sl. 3. Pojednostavljen prikaz redoks-metaboličke integrisanosti. PPP – pentozofosfatni put (eng. *pentose phosphate pathway*); GSH/GSSG – redukovani/oksidovani glutation; TRX-SH₂/TRX-S₂ – redukovani/oksidovani tioredoksin; PDH – piruvat dehidrogenaza; ACL – ATP citrat lijaza; ACC – acetil-CoA karboksilaza (eng. *acetyl-CoA carboxylase*); FAS – sintaza masnih kiselina (eng. *fatty acid synthase*); ACOX – acil-CoA oksidaza (eng. *acyl-CoA oxidase*); MFP – multifunkcijski protein; CPT-1 – karnitin palmitoiltransferaza 1 (eng. *carnitine palmitoyltransferase 1*); MPC – mitohondrijski nosač piruvata (eng. *mitochondrial pyruvate carrier*); CiC – nosač citrata (eng. *citrate carrier*); GR – glutation reduktaza; TR – tioredoksin reduktaza; GSH-Px – glutation peroksidaza; CAT – katalaza; MnSOD – mangan superoksid dismutaza; O₂⁻ – superoksid anjon radikal; H₂O₂ – vodonik peroksid; UCP1 – dekuplujuć protein 1 (eng. *uncoupling protein 1*); BAT – mrko masno tkivo (eng. *brown adipose tissue*); NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (redukovano); NADH – nikotinamid adenin dinukleotid (redukovano); FADH₂ – flavin adenin dinukleotid (redukovano); G6PDH – glukoza 6-fosfat dehidrogenaza (eng. *glucose-6-phosphate dehydrogenase*).



Sl. 4. Pojednostavljen prikaz mitohondrijske respiracije spregnute sa oksidativnom fosforilacijom. Mitohondrije mrkih adipocita imaju mogućnost alternativnog ulaska H⁺ u matriks kroz UCP1 (eng. *uncoupling protein 1*) umesto kroz ATP sintazu, pri čemu se proizvodi toplota. CoQ – koenzim Q (eng. *coenzyme Q*); Cyt c – citohrom c (eng. *cytochrome c*); e⁻ – elektron; H⁺ – proton; polja I-IV – respiratorni kompleksi (I – NADH:ubihinon oksidoreduktaza, II – suksinat dehidrogenaza, III – ubihinon:citohrom c oksidoreduktaza, IV – citohrom c oksidaza); FADH₂ (FAD) – flavin adenin dinukleotid; NADH (NAD⁺) – nikotinamid adenin dinukleotid; ROS – reaktivne vrste kiseonika (eng. *reactive oxygen species*); Δψm – membranski potencijal. Kreirano u BioRenderu.

1.2. Tkivna specifičnost i aklimacija na hladnoću

Kod endoterma, inicijalni odgovor na hladnoću oslanja se na drhteću termogenezu u skeletnim mišićima, koja je energetski zahtevna i neodrživa na duže staze. Procesom aklimacije (prilagođavanja na nisku temperaturu), primat preuzima termogeneza bez drhtanja, koja se kod pacova dominantno odvija u BAT. Aktivacija BAT posredstvom (nor)adrenalina podrazumeva snažno remodeliranje tkiva koje uključuje hipertrofiju i/ili hiperplaziju adipocita, angiogenezu i mitohondriogenezu. Angiogenom se postiže efikasnija perfuzija tkiva neophodna da podrži intenzivan oksidativni metabolizam i distribuciju toplote i energetskih supstrata, uključujući i lipide (Cannon i Nedergaard, 2004). Mitohondriogeneza, orkestrirana transkripcionim koaktivatorom PGC-1 α , praćena je uspostavljanjem većeg broja kontakata sa lipidnim telima (Yu i sar., 2015). Mitohondrije od lipidnih tela preuzimaju i oksiduju masne kiseline, što vremenom dovodi do pojave paucilokularnog izgleda adipocita (Cannon i Nedergaard, 2004; Benador i sar., 2019; Ibayashi i sar., 2024). Fisijom mitohondrija i lipidnih tela višestruko se uvećava kontaktna površina između ovih organela, a time i efikasnost lipolize, budući da je i površina kojoj mogu da pristupe lipolitički enzimi veća (Yu i sar., 2015). Ovakvo morfološko remodeliranje tkiva rezultuje pojavom termogeno aktiviranog fenotipa uslovljenog dinamičkom ravnotežom između stope lipogeneze (Song i sar., 2018) i lipolize (Mouisel i sar., 2025), proliferacije mrkih adipocita i angiogeneze. Termogeno aktivirane mitohondrije se zaokrugljuju, a kriste im se izdužuju, što povećava površinu za respiraciju i termogenezu (Cannon i Nedergaard, 2004; Bal i sar., 2017). Ključni molekulski posrednik termogeneze je dekoplujući protein 1 (eng. *uncoupling protein 1*, UCP1) koji transportuje H⁺ iz međumembranskog prostora u matriks mitohondrija odvajajući respiraciju od oksidativne fosforilacije i dovodeći do oslobađanja toplote (Sl. 4) (Bertholet i Kirichok, 2017). U ovim uslovima, BAT troši veliku količinu energije poreklom iz hrane, ali i lipidnih rezervi iz WAT, diktirajući preusmeravanje i preraspodelu resursa na sistemskom nivou (Yu i sar., 2002; Kajimura i sar., 2015; Shinde i sar., 2021; Gong i sar., 2023).

U ovom koordinisanom međuorganskom reprogramiranju, redoks-metabolički procesi u jetri aktivno doprinose održanju sistemske homeostaze (Bartelt i sar., 2011; Sepa-Kishi i sar., 2018; Su i sar., 2023), s obzirom na regulaciju glikemije, biosintezu GSH i TAG, detoksifikaciju i sintezu žučnih kiselina. Pored toga, jetra reguliše sistemsku dostupnost lipida sekrecijom lipoproteina vrlo niske gustine (eng. *very-low-density lipoprotein*, VLDL) i preuzimanjem viška holesterola putem LDL i HDL čestica (eng. *low/high-density lipoproteins*), čime se održava lipidna homeostaza koja može biti narušena tokom starenja (Sharma i Diwan, 2023) ili izmenjena usled povišenih energetskih zahteva na hladnoći (Worthmann i sar., 2017). Enzimi jetre se sintetišu i razgrađuju znatno brže u poređenju sa enzimima u drugim tkivima, poput mišićnog (Nelson i sar., 2021). Iako ekstrahepatična tkiva poseduju sposobnost metaboličkog prilagođavanja, jetra se ističe kao organ sa izuzetno visokim regenerativnim, proliferativnim i redoks-metaboličkim kapacitetom (Chance i sar., 1979; Schmucker, 1998; Hunt i sar., 2019). Naime, zahvaljujući ekspresiji heksokinaze IV (izoforme koja ne podleže alosteričnoj inhibiciji proizvodom reakcije, glukoze 6-fosfatom) i transportera glukoze visokog kapaciteta, nezavisnog od insulina (eng. *glucose transporter 2*, GLUT2), hepatociti mogu kontinuirano da preuzimaju glukozu bez obzira na trenutne unutarćelijske rezerve (Nelson i sar., 2021). Dok BAT na hladnoći pojačano troši energiju, jetra obezbeđuje neophodne supstrate putem intenzivirane glukoneogeneze i glikogenolize (Penner i Himms-Hagen, 1968; Sepa-Kishi i sar., 2018). Hladnoća pospešuje preuzimanje masnih kiselina iz cirkulacije (poreklom iz WAT) i dolazi do značajne supresije *de novo* lipogeneze u jetri (Masoro i sar., 1957; Cutler i sar., 2025). Jetra masne kiseline aktivira prevođenjem u acil-CoA koji (pored esterifikacije u TAG i pakovanja u VLDL) biva intenzivno usmeravan i na oksidaciju. U jetri se masne kiseline u procesu oksidacije skraćuju do acetil-CoA koji može ući u Krebsov ciklus. Takođe, jetra može ponovo da prevede skraćene masne kiseline u acil-karnitine srednjeg i kratkog lanca pomoću karnitin aciltransferaze i karnitin oktanoiltransferaze u matriksu mitohondrija. Na taj način nastaju acil-karnitini kratkog i srednjeg lanca koji se zatim eksportuju iz jetre u krvotok. Ovi acil-karnitini, uz glukozu, masne kiseline i razgranate aminokiseline, transportuju se putem krvi do BAT gde se oksiduju, služeći kao

gorivo za termogenezu (Simcox i sar., 2017; Gong i sar., 2023). U kapilarima perifernih tkiva, uključujući BAT, lipoproteinska lipaza hidrolizuje TAG iz VLDL, omogućavajući preuzimanje masnih kiselina. Gubitkom TAG, VLDL čestice se transformišu u LDL kojim se kolesterol transportuje do tkiva. Ovakva dinamika naglašava značaj jetre u održavanju energetskog balansa organizma u uslovima intenziviranih metaboličkih zahteva.

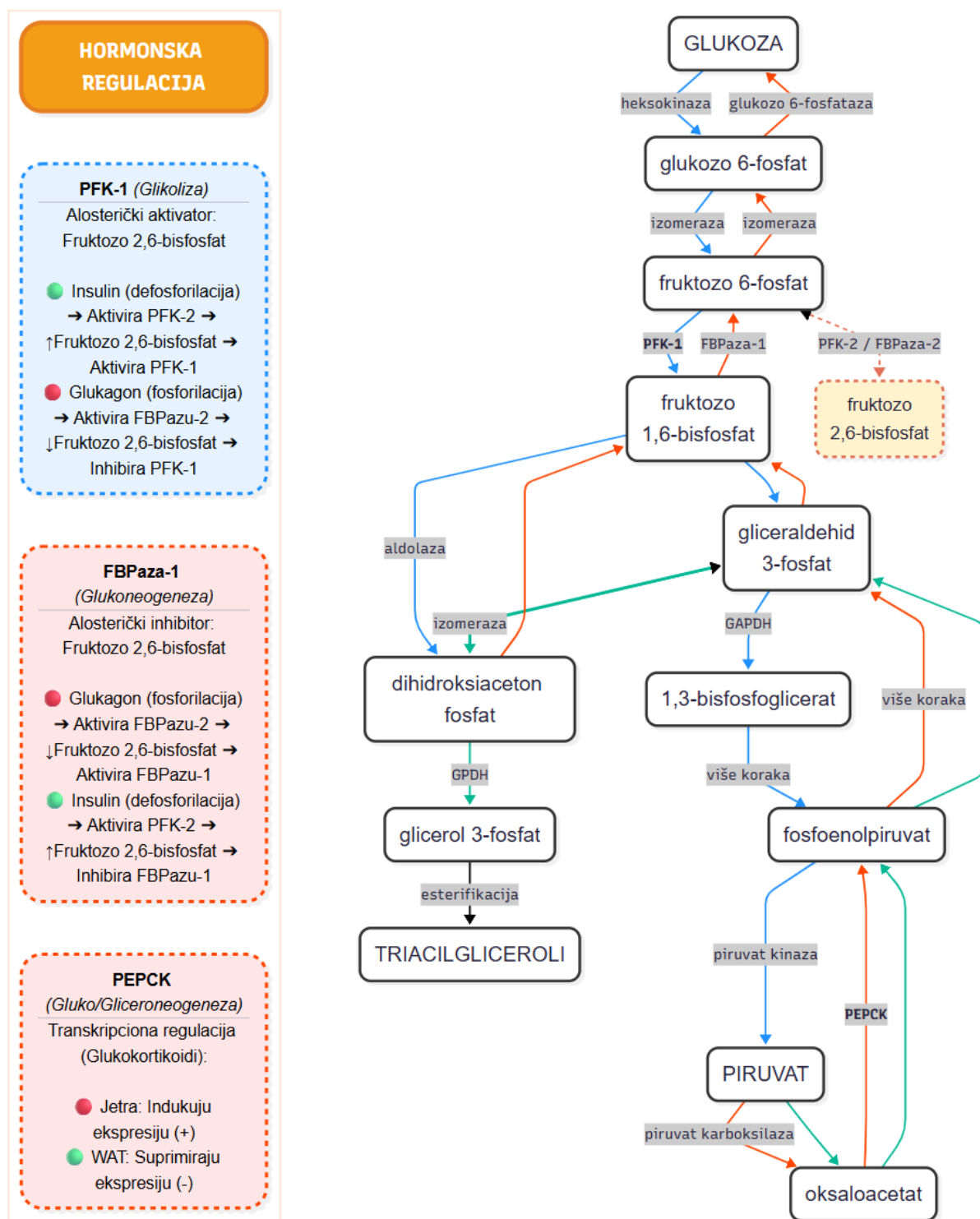
Kako adipociti WAT veoma slabo ekspimiraju glicerol kinazu, glicerol 3-fosfat neophodan za sintezu TAG nastaje u procesu gliceroneogeneze – skraćene glukoneogeneze, od piruvata do dihidroxiaceton fosfata (eng. *dihydroxyacetone phosphate*, DHAP) na koji deluje glicerol 3-fosfat dehidrogenaza (eng. *glycerol-3-phosphate dehydrogenase*, GPDH) prevodeći ga u glicerol 3-fosfat (Sl. 5). Na ovaj način, dostupnost glukoze posredno određuje stepen esterifikacije u WAT, a time i sistemsku dostupnost masnih kiselina. Naime, od glukozo 6-fosfata se u procesu glikolize dobija piruvat kojim otpočinje gliceroneogeneza. U bazalnim uslovima, ~75% masnih kiselina u WAT se reesterifikuje u TAG, a samo manji udeo masnih kiselina se oslobađa u krvotok; stoga, WAT predstavlja depo u kome se masne kiseline poreklom iz cirkulacije primarno skladište (Nelson i sar., 2021). Sa druge strane, depoi WAT reaguju na hladnoću intenzivnom lipolizom mobilisajući masne kiseline za potrebe BAT i mišića (Shinde i sar., 2021). Simpatička stimulacija rezultuje fosforilacijom perilipina, što omogućava triacilglicerol lipazi (eng. *adipose triglyceride lipase*, ATGL) i hormon-senzitivnoj lipazi (eng. *hormone-sensitive lipase*, HSL) da pristupe lipidnim telima. ATGL vrši inicijalnu hidrolizu TAG do diacilglicerola, dok HSL nastavlja proces do monoacilglicerola, oslobađajući masne kiseline i glicerol (Chouchani i Kajimura, 2019). Kod glodara ovaj proces tokom izlaganja hladnoći može biti praćen *browning* fenomenom, gde se unutar WAT pojavljuju multilokulusni bež (eng. *brite*) adipociti sa termogenim potencijalom (Janković i sar., 2015). U samom WAT, termogeneza se može ostvariti i putem tzv. beskorisnog (eng. *futile*) ciklusa hidrolize TAG praćene reesterifikacijom koji oslobađa toplotu nezavisno od UCP1 (Chouchani i Kajimura, 2019). Ovaj ciklus je regulisan glukokortikoidima koji indukuju ekspresiju PEPCK u jetri, a suprimiraju u WAT, čime se onemogućava esterifikacija masnih kiselina iz WAT, uz njihovo posledično povećanje u cirkulaciji (Sl. 5). Naime, supresija gliceroneogeneze u WAT negativnom regulacijom ekspresije PEPCK posledično smanjuje nastanak DHAP, prekursora za glicerol 3-fosfat koji sa masnim kiselinama gradi TAG; ako nema dovoljno glicerol 3-fosfata, TAG se ne sintetiše, a masne kiseline se mogu osloboditi u cirkulaciju gde se transportuju vezane za albumin (Nelson i sar., 2021). Pored neupitnog uticaja simpatičke stimulacije na lipolizu u WAT, efekat glukokortikoida prilikom izlaganja hladnoći nije toliko dobro ispitan (Bligh-Tynan i sar., 1993). Štaviše, noviji podaci sugerišu da jetra može uticati na stimulisanje lipolize u WAT tokom izlaganja niskoj temperaturi (Cutler i sar., 2025). Dakle, intenziviranje metaboličke stope na hladnoći ne samo da dovodi do hiperfagije kako bi se obezbedili energetski supstrati poput glukoze i masnih kiselina iz hrane, već dolazi i do mobilizacije lipidnih rezervi iz WAT. Jetra zatim preuzima masne kiseline iz cirkulacije, pakuje ih u VLDL i distribuira u ekstrahepatična tkiva, prvenstveno BAT. Kako VLDL sadrže i kolesterol, a radom lipoproteinske lipaze se oslobađaju masne kiseline, ove čestice prelaze u LDL čiji sadržaj je siromašniji masnim kiselinama, a bogatiji kolesterolom. Višak holesterola poreklom iz LDL u bazalnim uslovima preuzima primarno WAT, dok se na hladnoći on većim delom „reciklira“ u jetri gde se može koristiti za sintezu žučnih kiselina neophodnih za intenzivno varenje. Ove žučne kiseline mogu povratno da deluju na BAT (Worthmann i sar., 2017) pospešujući termogenezu (Bianco i sar., 1988; Volke i Krause, 2021; Worthmann i sar., 2017).

Iako skeletni mišići i u stanju mirovanja koriste lipide kao energetski supstrat, tokom dugotrajne aklimacije na hladnoću dolazi do preusmeravanja metabolizma ka dominantnoj oksidaciji masnih kiselina (Tetzlaff i sar., 2026), čime se štedi glukoza koja biva dostupnija prioritetnim organima, poput BAT, gde je neophodna za obnavljanje intermedijera Krebsovog ciklusa i održanje visokog fluksa tokom intenzivne oksidacije lipida (Wang i sar., 2020). Iako za razliku od jetre skeletni mišić ne poseduje kapacitet za glukoneogenezu, on ostaje ključna karika u Kori ciklusu, dopremajući laktat jetri za resintezu glukoze (Penner i Himms-Hagen, 1968; Periasamy

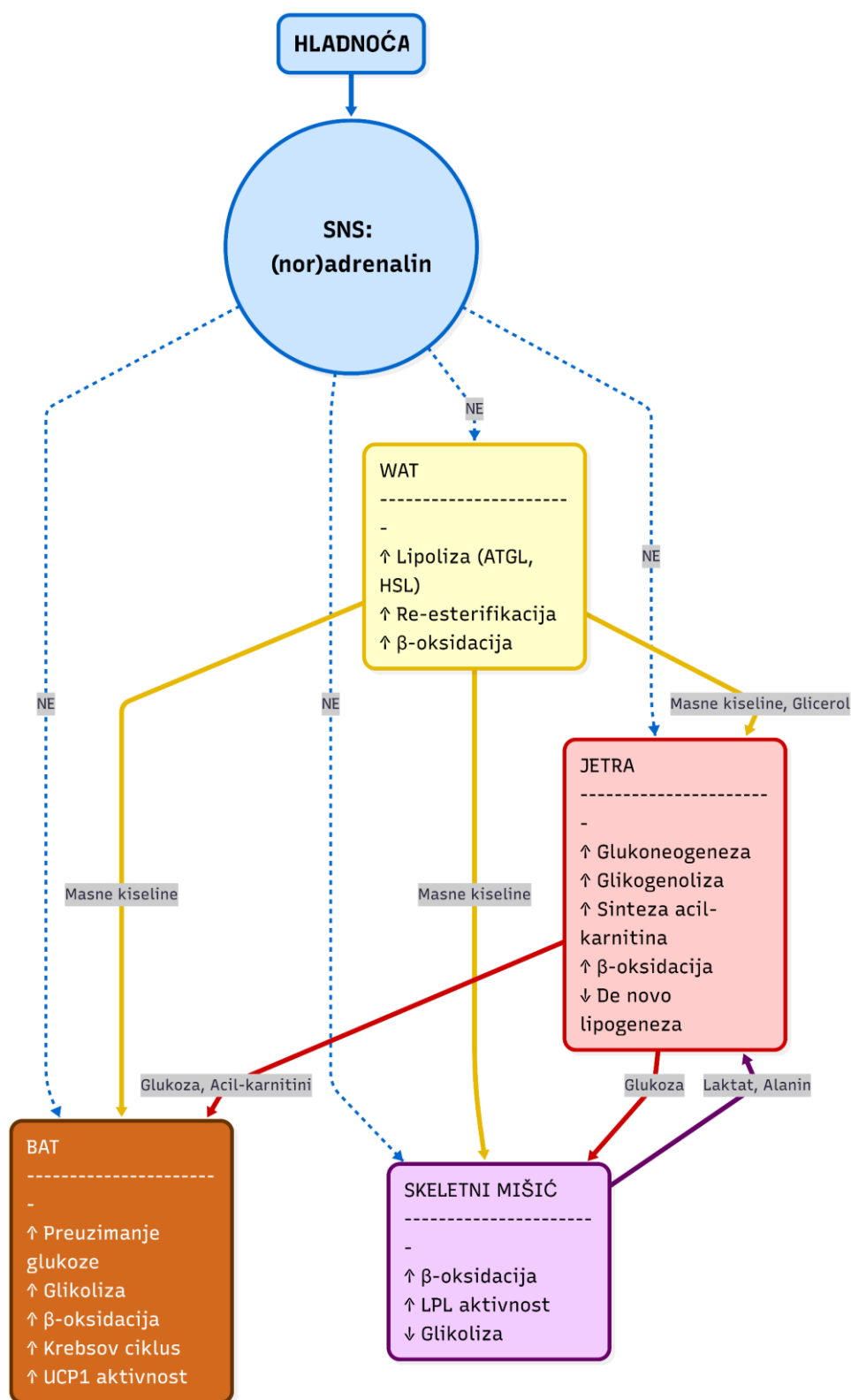
i sar., 2017). Štaviše, različiti mehanizmi termogeneze, koji nisu posredovani UCP1, pokazani su kako u poprečnoprugastim mišićnim ćelijama, tako i u bež i mrkim adipocitima (Chouchani i Kajimura, 2019; Periasamy i sar., 2017; Oeckl i sar., 2022; Janovska i sar., 2023; Bunk i sar., 2025; Liu i sar., 2025a), što dodatno usložnjava razumevanje energetskog metabolizma tokom aklimacije na hladnoću.

Dodatno, opisana sinhronizacija funkcija organa u osnovi aklimacije koordinisana je autokrino, parakrino i endokrino, npr. batokinima, adipokinima i miokinima (Villarroya i sar., 2017; Pan i Chen, 2021; Chen i sar., 2023; Ziqubu i sar., 2024; Chen i sar., 2025b; Izumi-Mishima i sar., 2025; Ozabrahamyan i sar., 2026; Tsuji i Tseng, 2026; Xue i sar., 2026). Ovi molekuli deluju na ciljna tkiva gde aktiviraju brojne ćelijske signale koji se sustiču na transkripcionim faktorima, čime se ostvaruje regulacija odgovarajućeg programa genske ekspresije. Izoforme PPAR (eng. *peroxisome proliferator-activated receptor*), na primer, često deluju u sinergiji sa koaktivatorom PGC-1 α . PPAR γ je esencijalan za adipogenezu u masnim tkivima, naročito u visceralnim depozitima gde sa PGC-1 α indukuje i termogeni program koji uključuje mitohondriogenezu i ekspresiju UCP1 (Puigserver i sar., 1998). PPAR α u BAT i jetri primarno reguliše gene uključene u oksidaciju masnih kiselina u mitohondrijama i peroksizomima, dok je u skeletnom mišiću tokom aklimacije na hladnoću sa oksidativnim programom povezan prvenstveno PPAR δ (Stančić i sar., 2013). PGC-1 α takođe pospešuje ekspresiju enzima AD: MnSOD, CAT i GSH-Px (Austin i St-Pierre, 2012), usled koaktivacije transkripcionih faktora poput FOXO3a (eng. *forkhead box O3*) ili nukleusnih respiratornih faktora 1 i 2 (eng. *nuclear respiratory factors 1 and 2*, NRF-1, NRF-2) (St-Pierre i sar., 2006; Cantó i Auwerx, 2009). Transkripciona kontrola energetskog metabolizma u jetri, BAT i skeletnim mišićima pojednostavljeno je ilustrovana na Slici 7.

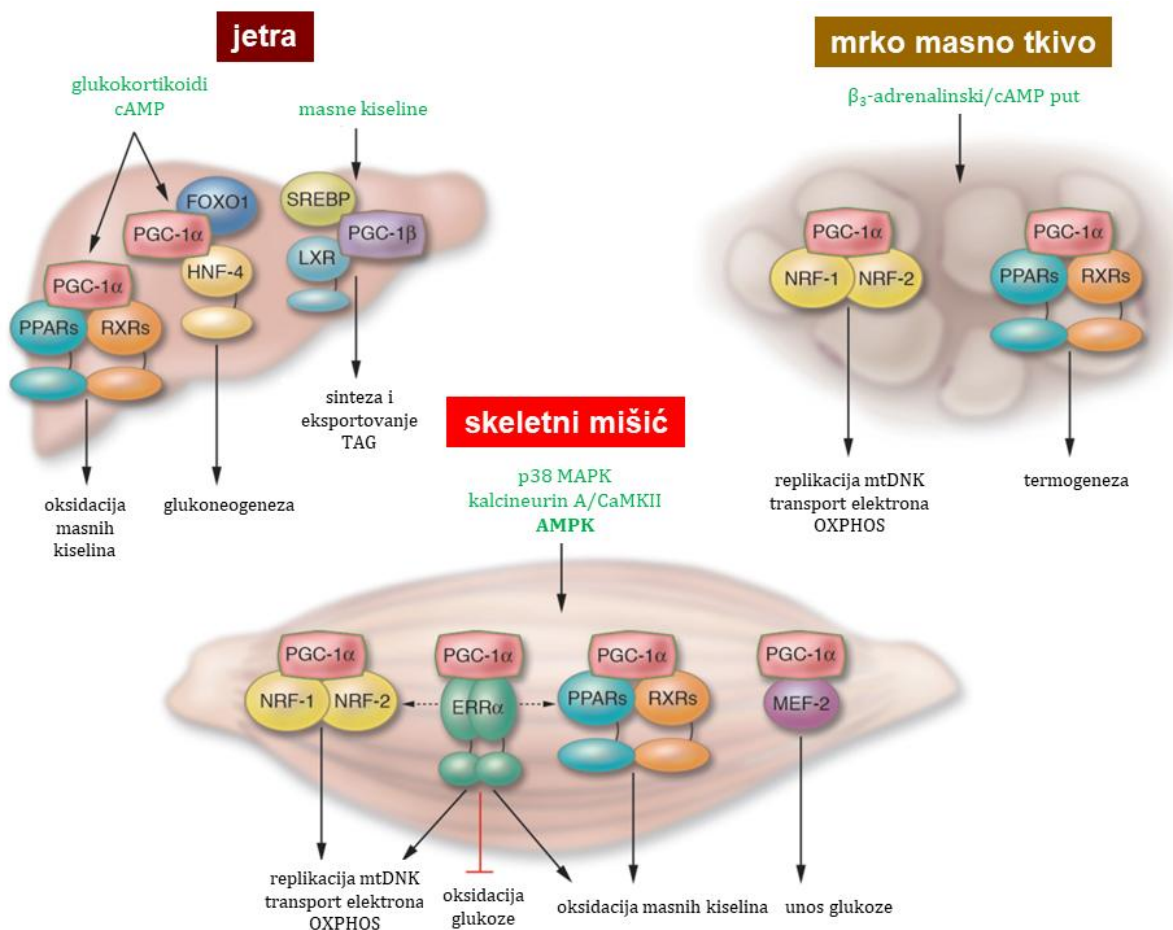
Međutim, dok su ovi mehanizmi proučeni kod mladih, polno zrelih jedinki (Sl. 6), dugotrajni uticaj hladnoće na organizme tokom hronološkog starenja ostaje nedovoljno istražen. Podaci iz literature su često oprečni (Ni i sar., 2023; Kallio i sar., 2025): dok neke studije sugerišu da stari pacovi zadržavaju sposobnost aklimacije na nisku temperaturu sredine (Asaki i Iriki, 1994), druge pokazuju da je ovaj proces praćen povišenim mortalitetom (Johnson i sar., 1963). Poznato je da starenje kod pacova smanjuje gustinu β receptora za adrenalin u BAT (Scarpace i sar., 1988) i narušava proliferativni kapacitet adipocita (Florez-Duquet i sar., 1998), što može limitirati aklimaciju. Stoga je ključno pitanje kako se proces hronološkog starenja, koji sam po sebi vodi ka strukturnom pojednostavljivanju i progresivnom „gašenju“ funkcija tkiva, prožima sa redoks-metaboličkim reprogramiranjem ili alostatskim opterećenjem koje bi mogla nametnuti dugotrajna hladnoća. Razumevanje ovog procesa u tkivima/organima esencijalnim za održanje sistemske homeostaze, kao što su jetra, skeletni mišići, BAT i WAT, jeste preduslov kako za karakterizaciju izmenjene homeostaze prilikom dugotrajnog izlaganja hladnoći, tako i za procenu biološke starosti organa.



Sl. 5. Pojednostavljen prikaz glikolize (plava strelica), glukoneogeneze (crvena strelica) i gliceroneogeneze (zelena strelica) sa ključnim tačkama hormonske regulacije. GAPDH – gliceralhid 3-fosfat dehidrogenaza (eng. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*); GPDH – glicerol 3-fosfat dehidrogenaza (eng. *glycerol-3-phosphate dehydrogenase*); PFK-1 – fosfofruktokinaza 1 (eng. *Phosphofructokinase 1*); FBPaza-1 – fruktozo 1,6-bisfosfataza 1 (eng. *fructose-1,6-bisphosphatase 1*); PEPCK – fosfoenolpiruvat karboksikinaza (eng. *phosphoenolpyruvate carboxykinase*); PFK-2/FPaza-2 – fosfofruktokinaza 2/fruktozo 2,6-bisfosfataza 2 (eng. *phosphofructokinase 2/fructose-2,6-bisphosphatase 2*). Hormonska regulacija PFK-1 i FBPaze-1 ostvaruje se kovalentnom modifikacijom (fosforilacijom/defosforilacijom) bifunkcijskog enzima PFK-2/FPaza-2, čime se menja koncentracija alosteričnog modulatora fruktozo 2,6-bisfosfata.



Sl. 6. Tkivno-specifični metabolički efekti aklimacije mladih glodara na hladnoću. SNS – simpatički nervni sistem; BAT – mrko masno tkivo (eng. *brown adipose tissue*); WAT – belo masno tkivo (eng. *white adipose tissue*); ATGL – adipozna triacilglicerol lipaza; HSL – hormon-senzitivna lipaza; LPL – lipoproteinska lipaza; UCP1 – termogenin (eng. *uncoupling protein 1*); NE – noradrenalin.



Sl. 7. Tkivno-specifična transkripciona regulacija energetskog metabolizma u jetri, mrkom masnom tkivu i skeletnim mišićima. cAMP – ciklični adenzin monofosfat; MAPK – proteinska kinaza aktivirana mitogenom (eng. *mitogen-activated protein kinase*); CaMKII – proteinska kinaza II zavisna od kalcijuma/kalmodulina (eng. *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*); AMPK – proteinska kinaza aktivirana adenzin monofosfatom; PGC-1 α /PGC-1 β – koaktivator 1 α /1 β receptora aktiviranog proliferatorom peroksizoma γ (eng. *peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α /1 β*); FOXO1 – transkripcioni faktor *forkhead box O1*; SREBP – protein koji vezuje regulatorni element sterola (eng. *sterol regulatory element-binding protein*); HNF-4 – nukleusni faktor hepatocita 4 (eng. *hepatic nuclear factor-4*); LXR – X receptor jetre (eng. *liver X receptor*); NRF-1 / NRF-2 – nukleusni respiratorni faktor 1/2 (eng. *nuclear respiratory factor-1/2*); PPAR – receptor aktiviran proliferatorom peroksizoma (eng. *peroxisome proliferator-activated receptor*); RXR – retinoidni X receptor; ERR α – receptor srodan estrogenskom receptoru α (eng. *estrogen-related receptor α*); MEF-2 – miocitni pojačivač 2 (eng. *myocyte enhancer factor-2*); TAG – triacilgliceroli; mtDNK – mitohondrijska dezoksiribonukleinska kiselina; OXPHOS – oksidativna fosforilacija (eng. *oxidative phosphorylation*). Prema Finck i Kelly, 2006.

1.3. Strukturna složenost i biološka senescencija

Povišena metabolička stopa zabeležena je ne samo kod mladih, već i kod starih glodara izlaganih niskoj temperaturi (Asaki i Iriki, 1994), kao i praćenjem ovih životinja na hladnoći tokom celog životnog veka (Selman i sar., 2008; Vaanholt i sar., 2009). Energetski skupo održanje endotermije se reflektuje na pojedinačna tkiva i organe, čije je koordinisano funkcionisanje odgovorno za održanje sistemske redoks-metaboličke homeostaze i odražava efekte hladnoće na fenotipsku plastičnost, kako na funkcijskom, tako i na strukturnom nivou. Budući da hronološko starenje vodi ka progresivnom i predvidljivom pojednostavljenju, odnosno gubitku složenosti (Lipsitz i Goldberger, 1992), precizna diskriminacija između ovog procesa inherentnog organizmu i biološkog reprogramiranja indukovano spoljašnjim činiocima, od suštinskog je značaja za prepoznavanje ranih obeležja starenja. Narušavanje homeostatskih procesa koji održavaju dinamičku ravnotežu organizma (Bernard, 1865; Cannon, 1932; Yates, 1994; Lloyd i sar., 2001) ne očitava se samo u fiziološkim procesima koji se prate pomoću elektroencefalografije i kardiografije, već i na strukturnom, mikroskopskom nivou (Lipsitz i Goldberger, 1992), čime se molekulske starenje dovodi u vezu sa *višim* fenomenima i strukturama (Goldberger i sar., 2002). Naime, kompleksnost bioloških procesa i struktura može se prepoznati fokusiranjem na pseudofraktalne obrasce koji ih karakterišu. Umesto doslovnog preslikavanja strogo matematičkih svojstava fraktala (koji ispoljava samosličnost do nivoa beskonačnosti) na biološke fenomene i forme, odlike fraktalnosti se aproksimativno procenjuju preko fraktalne dimenzije (eng. *fractal dimension*, FD) (Mandelbrot, 1983; Pantić i sar., 2022). Konkretno, moguće je izmeriti u kojoj meri biološki sistemi ispoljavaju osobine slične fraktalu, odnosno kolika je složenost tkiva, proporcionalna FD. Usled mogućnosti da iste strukture sa različitom teksturom mogu imati istu FD, kao komplementarni parametar koristi se lakunarnost (eng. *lacunarity*, Lac) – mera dubinske neravnomernosti, tačnije heterogenosti (tkivne) strukture (Smith i sar., 1996).

Sposobnost razlikovanja hronološke od biološke starosti tkiva postavlja osnovu za razumevanje tkivno-specifičnih odgovora na hladnoću koji zahtevaju rekonfiguraciju redoks-metaboličke homeostaze (Sl. 1) i u skladu je sa prepoznavanjem BAT i WAT kao ključnih endokrinih organa (Ziqubu i sar., 2024; Tsuji i Tseng, 2026) koji diktiraju stopu sistemskog starenja (Liu i sar., 2025b). S obzirom na pokazane efekte koje izlaganje niskoj temperaturi sredine kod glodara ima na reprogramiranje različitih tkiva (Sl. 6), postavlja se pitanje da li pacovi dugotrajno izlagani hladnoći zadržavaju ovaj kapacitet za aklimaciju i kako on utiče na biološko starenje. Štaviše, strukturno remodeliranje u odgovoru na temperaturne promene ogleda se u transportu nutrijenata i distribuciji toplote, koji se u biološkim sistemima odvijaju kroz kompleksne fraktalne (kapilarne) mreže čija arhitektura diktira metaboličku efikasnost tkiva (Horrell i sar., 2022; Muhammad i sar., 2025). Ovaj primer osvetljava značaj fraktalnog uvida (Kenkel i Walker, 1996; Kesić i Spasić, 2016; Pantić i sar., 2016; Brouse i sar., 2024; Jeremić i sar., 2025) za ispitivanja tkivno-specifičnih obrazaca na morfo-funkcijskoj ravni, naročito po pitanju efekata dugotrajnog izlaganja niskoj temperaturi. Na ovaj način, karakterizacija strukture postaje neodvojiva od razumevanja funkcije i predstavlja preduslov za razlikovanje senescencije uslovljene spoljašnjim činiocima od hronološkog starenja. Iako su ovi procesi u prirodi neraskidivo spregnuti, njihovo razdvajanje u kontrolisanim eksperimentalnim uslovima, poput izlaganja niskoj temperaturi, omogućava da se razume kako snažni metabolički zahtevi modifikuju biološku starost tkiva, obrnuto srazmerno stepenu strukturne složenosti.

2. CILJEVI

Redoks-metaboličko reprogramiranje predstavlja jedan od ključnih mehanizama koji povezuje i oblikuje razvoj primarnih, antagonističkih i integrativnih obeležja hronološkog starenja kroz koordinaciju redoks signalizacije, energetskog metabolizma i adaptivnih ćelijskih odgovora. Iako brojne studije ukazuju na to da je tokom starenja narušena povezanost adaptivnih redoks i metaboličkih odgovora, molekularni mehanizmi koji održavaju ili remete ovu koordinaciju još uvek nisu dovoljno razjašnjeni. Posebno nije poznato na koji način dugotrajno izlaganje niskoj temperaturi utiče na ove procese, niti da li tkiva tokom hronološkog starenja zadržavaju kapacitet za održanje redoks-metaboličke homeostaze.

Stoga je opšti cilj ove doktorske disertacije razumevanje morfo-funkcijskih promena tokom hronološkog starenja u tkivima i organima ključnim za održanje sistemske energetske homeostaze (jetri, mišićima, belom i mrkom masnom tkivu), sa posebnim akcentom na karakterizaciju promena redoks-metaboličke regulacije tokom starenja u uslovima niske temperature sredine. U skladu sa tim, specifični ciljevi ove doktorske disertacije su:

- Karakterizacija redoks-metaboličkog profila tkiva tokom hronološkog starenja i nakon dugotrajnog izlaganja niskoj temperaturi sredine ispitivanjem komponenti antioksidativne odbrane, proteina uključenih u metabolizam glukoze i lipida, kao i u mitohondrijsku respiraciju;
- Ispitivanje mehanizama redoks-metaboličkog reprogramiranja tkiva tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći karakterizacijom nivoa proteinske ekspresije ključnih regulatora energetskog metabolizma (AMPK), ekspresije antioksidativnih enzima (Nrf2) i biogeneze i funkcije mitohondrija (PGC-1 α);
- Karakterizacija sarkopeničnog fenotipa i kvantifikacija tkivno-specifičnih strukturnih promena primenom fraktalne i morfometrijske analize radi ispitivanja kapaciteta tkiva za strukturno remodeliranje u uslovima hronološkog starenja na sobnoj i niskoj temperaturi sredine;
- Ispitivanje integracije redoks-metaboličkih odgovora jetre, mišića, depoa belog i mrkog masnog tkiva objedinjavanjem redoks-metaboličkih profila tkiva sa sistemskim indikatorima metaboličke homeostaze tokom starenja na sobnoj i niskoj temperaturi sredine.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Dizajn oglada i uzorkovanje tkiva

Eksperiment je odobren na osnovu mišljenja Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu i rešenja Uprave za veterinu, Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije (br. odobrenja 01-385, 01-422, 323-07-03872/2022-05).

U studiju su uključeni mužjaci Mil Hil soja kapuljačastih hibrida (eng. *Mill Hill hybrid hooded*) pacova (*Rattus norvegicus*) starosti tri (mladi adulti, 3m), šest (zreli adulti, 6m) i dvadeset četiri meseca (stari, 24m), koji su držani na sobnoj temperaturi od 22 ± 1 °C. Pored njih, korišćena je i kohorta pacova starih 24 meseca koja je boravila u hladnoj sobi (4 ± 1 °C) u periodu od 6. do 24. meseca života (24m 4°C). Pacovi su bili podvrgnuti ciklusu svetlo/tama od 12/12 sati i imali su pristup standardnoj hrani i vodi *ad libitum*. Tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći u periodu od 6. do 24. meseca starosti praćeni su telesna masa pacova i unos hrane na mesečnom, odnosno nedeljnom nivou.

U predviđenom uzrastu, pacovi su dekapitovani, a izolovanim tkivima je izmerena apsolutna masa. Za mikroskopske analize, tkiva su uzorkovana od tri do četiri životinje po grupi. Za preostale analize korišćena su tkiva od šest do jedanaest pacova po grupi. Izolovani su: interskapularno mrko masno tkivo (BAT), gonadalno (gWAT) i retroperitonealno (rWAT) belo masno tkivo, jetra, skeletni mišić (*musculus gastrocnemius*) i krv. Pacovi kod kojih su detaljnim pregledom svih organa prilikom disekcije ustanovljene očigledne patološke promene poput tumora i apscesa, isključeni su iz analiza kako bi ogled ostao u okvirima fiziološkog starenja.

3.2. Priprema uzoraka za analize

3.2.1. Priprema uzoraka za određivanje aktivnosti enzima, Western blot i biohemijske analize

Tkiva su izolovana, isprana u fiziološkom rastvoru (jetre su prethodno perfundovane) i pohranjena na -80 °C. Homogenati tkiva pripremljeni su korišćenjem *Ultra-Turrax* homogenizatora (Janke & Kunkel IKA-Werke, Staufen, Nemačka) na $0-4$ °C u puferu (0,25 M saharoza, 0,1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4). Protokol homogenizacije je bio prilagođen tipu tkiva. Jetra i depoi WAT su homogenizovani u tri naleta od po 10 sekundi na 20500 obrtaja/min. BAT je homogenizovan u tri naleta od po 10 sekundi, a mišić u tri naleta od po 15 sekundi, na 24.000 obrtaja/min. Nakon homogenizacije, svi uzorci su sonifikovani na 40 kHz. Dobijeni homogenati su zatim podvrgnuti ultracentrifugiranju na 38.000 obrtaja/min tokom 90 minuta na 4 °C. Nakon centrifugiranja, bistra, rastvorljiva frakcija je pažljivo aspirirana kako bi se izbegla kontaminacija lipidima. Krv je nakon izolacije centrifugirana na 5.000 obrtaja/min po 10 minuta za odvajanje plazme, odnosno seruma, korišćenjem centrifuge Universal 320 R (*Hettich*, Tutlingen, Nemačka).

3.2.2. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima

Kvantifikacija ukupnih proteina u lizatima tkiva izvršena je spektrofotometrijskom metodom prema Lowry i sar. (1951). Princip ove metode zasniva se na Biuret reakciji, tokom koje u alkalnoj sredini dolazi do stvaranja kompleksa između peptidnih veza proteina i jona bakra. Nastali joni bakra zatim redukuju fosfomolibdotungstenat, koji je sastavni deo *Folin-Ciocalteu* reagensa, u heteropolimolibden plavo. Ova reakcija je omogućena oksidacijom aromatičnih aminokiselina uz katalitičko delovanje bakra. Krajnji ishod reakcije je formiranje plavo obojenog kompleksa čiji se maksimum apsorpcije očitava na talasnoj dužini od 500 nm. Intenzitet nastale boje je u direktnoj korelaciji sa koncentracijom proteina u ispitivanom uzorku. Za izračunavanje koncentracije korišćena je standardna kriva dobijena merenjem apsorbanace rastvora albumina iz goveđeg seruma

(eng. *bovine serum albumin*, BSA) poznatih koncentracija. Osetljivost primenjene metode iznosi 0,01 mg/mL, a dobijene vrednosti koncentracije proteina su izražene u mg/mL.

Sve spektrofotometrijske analize izvršene su korišćenjem UV-1800 spektrofotometra (Shimadzu Corporation, Kjoto, Japan).

3.2.3. Priprema za svetlosnu i fluorescentnu mikroskopiju

BAT, gWAT, rWAT i jetra su fiksirani u 4% paraformaldehidu tokom 24 sata. Nakon ispiranja u česmenskoj vodi preko noći, tkiva su dehidrirana serijom etanola rastućih koncentracija, prosvetljena u ksilenu i ukalupljena u parafin. Za analize su korišćeni preseći debljine ~5 µm.

3.3. Određivanje aktivnosti enzima antioksidativne odbrane i sadržaja glutaciona

3.3.1. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Ukupna specifična aktivnost SOD, kao i aktivnosti njenih izoformi CuZnSOD i MnSOD, određene su korišćenjem metode inhibicije autooksidacije epinefrina, prema modifikovanom protokolu Misra i Fridovich (1972), kako je opisano u radu Petrović i sar. (1986). Ukratko, test je izveden na 26 °C u 0,05 M natrijum-karbonatnom puferu (pH 10,2). Korišćen je svež osnovni rastvor adrenalina u 0,1 N HCl, sa konačnom koncentracijom od 0,3 mM u kivetu. Aktivnost SOD u uzorcima kvantifikovana je na osnovu njihove sposobnosti da inhibiraju brzinu autooksidacije epinefrina od 0,021–0,022 ΔA/min na 480 nm. Aktivnost MnSOD je merena nakon preinkubacije uzoraka sa jednakim zapreminama 8 mM KCN radi inhibicije CuZnSOD. Za sva merenja, zapremine uzoraka su prilagođene kako bi se osiguralo da procenat inhibicije bude u linearnom opsegu. Jedna jedinica SOD definisana je kao količina enzima potrebna za postizanje 50% inhibicije autooksidacije epinefrina pod standardnim reakcionim uslovima. Aktivnost enzima je izražena u jedinicama po mg proteina (J mg⁻¹ proteina).

3.3.2. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost CAT je izmerena prema metodi Beutlera (1975) koja prati brzinu razgradnje H₂O₂ katalazom iz uzorka. Reakcija je praćena spektrofotometrijski na 230 nm u rastvoru koji sadrži 5 mM EDTA i 1 M Tris-HCl (pH 8,0). Neenzimska razgradnja H₂O₂ bila je zanemarljiva pod mernim uslovima, što je potvrđeno u kontrolnim reakcijama bez uzorka. Aktivnost katalaze izračunata je korišćenjem molarnog ekstinkcionog koeficijenta za H₂O₂ (0,071 mM⁻¹cm⁻¹) i izražena u jedinicama po mg proteina. Jedna jedinica katalaze odgovara količini enzima potrebnoj da razloži 1 µmol H₂O₂ po minutu na 25 °C, koristeći 10 mM H₂O₂ kao supstrat.

3.3.3. Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze

Aktivnost GSH-Px je određena metodom po Paglia i Valentine (1967). Ovaj test meri potrošnju NADPH, specifično njegovu oksidaciju glutation reduktazom (GR) na 340 nm. Reakcija uključuje korišćenje t-butil hidroperoksida (3 mM) kao supstrata za GSH-Px, u 0,5 M fosfatnom puferu (pH 7,0) na 37 °C. Da bi se osigurala specifičnost merenja, u reakcionu smešu je uključen 10 mM natrijum-azid. Aktivnost enzima je izražena kao nM oksidovanog NADPH po minutu po mg proteina, izračunato korišćenjem molarnog ekstinkcionog koeficijenta od 6,22 mM⁻¹cm⁻¹ za NADPH. Neto stopa enzimske reakcije određena je nakon oduzimanja stope neenzimske oksidacije NADPH procenjene u paralelnoj slepoj probi (eng. *blank*) bez uzorka tkiva.

3.3.4. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze

Aktivnost GR je merena metodom Glatzle i sar. (1974), koja kvantifikuje redukciju oksidovanog glutaciona (GSSG) pomoću GR uz upotrebu NADPH. Oksidacija NADPH praćena je spektrofotometrijski na 340 nm u fosfatnom puferu (pH 7,4) koji sadrži 2 mM GSSG i 0,1 mM NADPH na 37 °C. Aktivnost je izražena kao nM potrošenog NADPH po minutu po mg proteina,

izračunato korišćenjem molarnog ekstinkcionog koeficijenta od $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ za NADPH. Proračun je uzeo u obzir apsorbancu kompletne reakcione smeše bez dodatog uzorka.

3.3.5. Određivanje aktivnosti tioredoksin reduktaze

Aktivnost TR je određena metodom Luthman i Holmgren (1982). Ovaj test se zasniva na tome da TR katalizuje NADPH-zavisnu redukciju disulfidne veze u 5,5'-ditio-bis-nitrobenzoevoj kiselini (DTNB), što dovodi do povećanja apsorbanije praćene na 412 nm tokom prvih dva minuta. Aktivnost enzima se kvantifikuje na osnovu količine oksidovanog NADPH po minutu, s obzirom na to da 1 mol NADPH generiše 2 mola tionitrobenzoata (TNB), koristeći molarni ekstinkcioni koeficijent od $13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ za TNB. Rezultati su izraženi kao specifična aktivnost u nM oksidovanog NADPH po minutu po mg proteina. Proračun aktivnosti je korigovan za bilo koju neenzimsku reakciju praćenjem apsorbanice reakcione smeše bez uzorka tkiva.

3.3.6. Određivanje aktivnosti glutathion S-transferaze

Aktivnost GST je izmerena metodom koju su opisali Habig i sar. (1974). GST katalizuje konjugaciju 1-hloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) sa SH grupom glutathiona. Rezultujući CDBN-glutathion kompleks apsorbuje svetlost na 340 nm, omogućavajući određivanje aktivnosti enzima merenjem promena u apsorbanici. Aktivnost GST izračunata je korišćenjem molarnog ekstinkcionog koeficijenta za CDBN ($9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), a vrednosti su izražene u nM GSH $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteina. Stopa spontane, neenzimske konjugacije CDBN sa GSH merena je u paralelnoj slepoj probi bez izvora enzima i oduzeta je od stope aktivnosti GST iz uzoraka.

3.3.7. Određivanje ukupnog sadržaja glutathiona

Za određivanje ukupnog GSH, alikvot sonikata tkiva je prvo deproteinizovan. Proteini su precipitirani 10% sulfosalicilnom kiselinom, nakon čega je usledila inkubacija na ledu 10 minuta i centrifugiranje (5000 obrtaja/min tokom 5 minuta na 4°C). Dobijeni supernatant bez proteina korišćen je za merenje. Ukupan sadržaj glutathiona (redukovanog i oksidovanog) u tkivu određen je spektrofotometrijskom metodom koju je opisao Griffith (1980). Reakcija je izvedena na 30°C u 125 mM natrijum-fosfatnom puferu (pH 7,5) koji sadrži 6,3 mM EDTA. Ova metoda se zasniva na interakciji između redukovanog glutathiona (GSH) i DTNB, što rezultira formiranjem TNB i oksidovanog glutathiona (GSSG). Brzina formiranja TNB proporcionalna je koncentraciji GSH u uzorku. Pošto je TNB žuto obojeno jedinjenje, koncentracija GSH u uzorku može se odrediti merenjem apsorbanije na 412 nm. Za sva merenja, stopa neenzimske reakcije određena je iz slepe probe koja je sadržala sve reagense osim homogenata tkiva; proračun količine GSH je korigovan oduzimanjem od ove vrednosti. Formirani GSSG se reciklira nazad u GSH putem GR, omogućavajući da GSH ponovo reaguje sa DTNB i proizvede TNB. Na ovaj način, izmeren sadržaj glutathiona u uzorku predstavlja zbir redukovanog i oksidovanog glutathiona. Količina GSH izračunata je korišćenjem standardne krive i izražena u nM GSH g^{-1} tkiva.

3.4. SDS-PAGE i Western blot analiza

3.4.1. Elektroforeza proteina

Razdvajanje proteina na osnovu njihove molekulske mase sprovedeno je metodom elektroforeze na poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijum-dodecil sulfata (SDS-PAGE) korišćenjem sistema Mini-Protean III (BioRad). Za koncentrisanje uzoraka korišćen je 5% gel (sastav: 5% akrilamid, 0,1% SDS, 0,125 M Tris, pH 6,8), dok je procenat akrilamida u gelu za razdvajanje varirao u zavisnosti od molekulske mase ciljanog proteina. Polimerizacija gelova inicirana je dodavanjem 0,05% amonijum-persulfata (APS) i 0,033% tetrametiletildiamina (TEMED). Elektroforetski pufer je sadržao 0,192 M glicin, 0,1% SDS i 0,025 M Tris (pH 8,3).

Priprema uzoraka podrazumevala je mešanje izolata proteina sa jednakom zapreminom pufera za nanošenje (sastav: 4% SDS, 20% glicerol, 10% β -merkaptetoanol, 0,025% brom-fenol plavo, 0,125 M Tris, pH 6,8). Pre nanošenja na gel (5–20 μ g proteina po uzorku), proteini su denaturisani izlaganjem temperaturi od 95 °C u trajanju od 5 minuta. Za procenu molekulskih masa korišćen je komercijalni proteinski marker (Thermo Fisher Scientific). Proces elektroforeze trajao je između 60 i 90 minuta pri konstantnoj jačini struje od 70 mA, uz primenu diskontinuiranog napona (inicijalno 100 V, a nakon ulaska proteina u razdvajajući gel napon je povećan na 120 V).

3.4.2. Prenos proteina sa gela na membranu i imunodetekcija (Western blot)

Nakon elektroforetskog razdvajanja, proteini su metodom mokrog transfera prebačeni na poliviniliden difluoridne (PVDF) membrane (Amersham Hybond P 0.45 μ m). Membrane su prethodno aktivirane potapanjem u metanol (10 sekundi) i destilovanu vodu (3 minuta). Transfer je vršen u puferu za transfer (0,192 M glicin, 20% metanol, 0,025 M Tris, pH 8,3) pri konstantnom naponu od 100 V tokom 60 minuta. Efikasnost prenosa proteina verifikovana je bojenjem membrane rastvorom Ponceau S.

Nakon uklanjanja boje ispiranjem u Tris puferu sa dodatkom Tween 20 (TBST: 20 mM Tris, 150 mM NaCl i 0,05% Tween-20, pH 7,4), nespecifična mesta vezivanja su blokirana inkubacijom membrane u 5% BSA rastvorenom u TBST puferu, tokom 60 minuta na sobnoj temperaturi. Membrane su potom inkubirane preko noći na 4 °C sa primarnim antitelima (Tabela 1) razblaženim u 5% BSA. Nakon ispiranja nevezanog primarnog antitela, usledila je inkubacija sa odgovarajućim sekundarnim antitelima (kozja anti-zečja – Abcam ili anti-mišja – Elabscience) konjugovanim sa peroksidazom, u razblaženju 1:15000 ili 1:5000 (u 5% BSA), tokom 120 minuta na sobnoj temperaturi.

Po završetku inkubacije, membrane su isprane u TBST puferu (30 minuta). Vizuelizacija proteina postignuta je reakcijom hemiluminiscencije potapanjem membrana u supstrat luminol uz dodatak H₂O₂ (3 minuta). Vizuelizacija proteinskih traka vršena je na aparatu *iBright CL 1500 Imaging System* (Thermo Fisher Scientific).

3.4.3. Kvantifikacija rezultata Western blot analize

Denzitometrijska analiza dobijenih proteinskih traka izvršena je upotrebom softverskog paketa *ImageJ* (NIH, Bethesda, MD, SAD). Rezultati su dobijeni integracijom volumena, što predstavlja sumu vrednosti piksela unutar definisane površine trake, umanjenu za vrednost pozadinskog šuma (eng. *background noise*). Dobijene vrednosti za ispitivane proteine normalizovane su u odnosu na ekspresiju β -aktina, koji je korišćen kao konstitutivna kontrola (protein kućepazitelj, eng. *housekeeping protein*). Ekspresija proteina izražena je u arbitrarnim jedinicama (A.J.).

Tabela 1. Primarna antitela korišćena za *Western blot*.

Antitelo	Proizvođač i kataloški br.	Razblaženje	Mr (kDa)
4-HNE	Abcam, ab46545	1:1000	višestruka trake
ACADM	Abcam, ab92461	1:10000	47
ATP sintaza (ATP5A)	Abcam, ab14748	1:1000	52
CAT	Abcam, ab18877	1:10000	59
CPT1A	Abcam, ab128568	1:1000	88
CS	Santa Cruz, sc390693	1:1000	52
CuZnSOD	Santa Cruz, sc101523	1:1000	23
GAPDH	Abcam, ab8245	1:1000	36
GCL	Abcam, ab17926	1:1000	73
GGT1	Abcam, ab55138	1:1000	61
GR	Santa Cruz, sc8992	1:1000	90–95
GSH-Px 1	Abcam, ab108427	1:5000	22
GSH-Px 4	Santa Cruz, sc166570	1:1000	21
GST pi	Abcam, ab138491	1:5000	23
GST mu	Abcam, ab53942	1:3000	25
Kompleks I (NDUFA9)	Abcam, ab55521	1:1000	43
Kompleks II (SDHB)	Abcam, ab110413	1:1000	30
Kompleks III (UQCRC2)	Abcam, ab110413	1:1000	48
Kompleks IV (COX IV)	Abcam, ab14744	1:1000	17
MnSOD	Abcam, ab13533	1:5000	25
Nrf2	Cell Signaling, #12721	1:1000	97-100
pAMPKα1	Abcam, ab133448	1:1000	64
PCK2	Elabscience, E-AB-15206	1:1000	71
PGC-1α	Elabscience, E-AB-65852	1:1000	110
PRDX3	Abcam, ab73349	1:1000	23-52
TRX	Abcam, ab26320	1:1000	12
TXNRD1	Abcam, ab124954	1:1000	55
UCP1	Abcam, ab10983	1:1000	32
β-aktin	Abcam, ab6276	1:5000	42

Skraćenice: 4-HNE – 4-hidroksinonenal; ACADM – acil-CoA dehidrogenaza; pAMPK α 1 – AMP-aktivirana proteinska kinaza alfa 1, fosforilisana; ATP5A – podjedinica α F1 domena ATP sintaze; CAT – katalaza; CPT1A – karnitin palmitoiltransferaza 1A; CS – citrat sintaza; CuZnSOD – bakar-cink superoksid dismutaza; COX IV – izoforma 1 podjedinice IV citohrom c oksidaze; GAPDH – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza; GGT1 – γ -glutamil transpeptidaza 1; GCL – glutamilcistein ligaza; GR – glutation reduktaza; GSH-Px 1/4 – glutation peroksidaza 1 i 4; GST pi – glutation S-transferaza pi; GST mu – glutation S-transferaza mi; MnSOD – mangan superoksid dismutaza; NDUFA9 – podjedinica 9 alfa subkompleksa NADH dehidrogenaze; Nrf2 – nukleusni faktor-eritroid faktor 2-zavisni faktor 2; PCK2 – fosfoenolpiruvat karboksikinaza 2; PRDX3 – peroksiredoksin 3; TRX – tioredoksin; TXNRD1 – tioredoksin reduktaza 1 (TR); UCP1 – dekuplujući protein 1; SDHB – gvožđe-sumpor podjedinica sukcinat dehidrogenaze; UQCRC2 – podjedinica 2 citohrom b-c1 kompleksa.

3.5. Fraktalna i morfometrijska analiza

Sve mikrografije za kvantitativnu analizu sačuvane su u formatu TIFF bez gubitaka. Za svako tkivo analizirano je najmanje 20 mikrografija po oglednoj grupi, sa približno pet do sedam slika po pacovu.

3.5.1. Fraktalna i morfometrijska analiza BAT

Fraktalna dimenzija (FD) i lakunarnost (Lac) određene su sa mikrografija obojenih hematoksilinom. Slike su snimljene korišćenjem objektiva 20x na svetlosnom mikroskopu *Leica DMRB* (Leica Microsystems, Veclar, Nemačka) pri rezoluciji od 2592x1944 piksela. Ovi parametri su kvantifikovani na binarizovanim slikama sa izvučenim konturama (eng. *outlined images*) korišćenjem metode brojanja kvadratnih polja (eng. *box-counting method*), što je dobro uspostavljen pristup za procenu složenosti i heterogenosti tkiva (Smith i sar., 1996), uz upotrebu *FracLac* dodatka (Karperien, 2013) za softver *ImageJ*. Kako bi se omogućila direktna korelacija između strukturne složenosti i celularnosti, brojanje nukleusa izvršeno je na istim mikrografijama. Broj nukleusa (BN) je izražen kao prosečan broj sa tri nasumično odabrana polja mreže dimenzija 109x109 µm po slici.

3.5.2. Morfometrijska analiza rWAT i gWAT

Prečnik adipocita kvantifikovan je na presecima rWAT i gWAT obojenim hematoksilinom. Slike su snimljene korišćenjem objektiva 10x na svetlosnom mikroskopu *Leica DMRB* (2592x1944 piksela). Analiza je izvršena korišćenjem *Adiposoft* dodatka (Galarraga i sar., 2012) za *ImageJ*, pri čemu je kvantifikacija zasnovana na minimumu od 600 adipocita po oglednoj grupi.

3.5.3. Fraktalna i morfometrijska analiza jetre

FD i Lac su procenjeni sa autofluorescentnih mikrografija snimljenih korišćenjem objektiva 20x na fluorescentnom mikroskopu *Leica DM4fluo* (1920x1440 piksela; ekscitacioni filter: 450-490 nm; dihroično ogledalo: 510) (Croce i sar., 2022). Ovaj pristup je odabran jer autofluorescenca širokog spektra (poreklom od više endogenih fluorofora) obezbeđuje obrise hepatocitnih nizova visokog kontrasta, čineći je pogodnom za robusnu strukturnu analizu. Međutim, varijabilni citoplazmatski signal na autofluorescentnim mikrografijama može zamagliti precizne obrise nukleusa. Kako bi se osigurala tačnost podataka o celularnosti, brojanje nukleusa je izvršeno na zasebnim presecima obojenim hematoksilinom, snimljenim korišćenjem objektiva 20x na svetlosnom mikroskopu *Leica DMRB* (2592x1944 piksela). Konačna vrednost je izražena kao prosečan broj sa tri nasumično odabrana polja mreže dimenzija 121,5x121,5 µm po slici.

3.5.4. Relativna masa tkiva

Relativna masa tkiva izražena je kao procenat ukupne telesne mase korišćenjem formule:

$$\text{relativna masa tkiva [\%]} = \frac{\text{masa tkiva [g]}}{\text{ukupna telesna masa [g]}} \times 100.$$

3.6. Određivanje koncentracije biohemijskih parametara

Koncentracija TAG, ukupnog holesterola, HDL (eng. *high density lipoprotein*), LDL (eng. *low density lipoprotein*), glukoze, kreatinina, laktata, mokraćne kiseline, β-hidroksibutirata, transferina i gvožđa i aktivnost lipoproteinske lipaze iz plazme pacova određena je na hemijskom analizatoru *Mindray Clinical Chemistry Analyzer BS-240* (Mindray, Šenžen, NR Kina). Koncentracija uree iz seruma određena je na aparatu *ILab 300+* (Instrumentation Laboratory, Milano, Italija). Indeks ateroskleroze (IA) izračunat je kao odnos koncentracije ukupnog holesterola i HDL holesterola (ukupni holesterol/HDL), dok je faktor rizika za kardiovaskularne bolesti (eng. *cardiovascular diseases*, CVD) izračunat kao odnos LDL i HDL (LDL/HDL).

3.7. Statistička obrada rezultata

Sve statističke analize su izvršene korišćenjem softvera *GraphPad Prism* verzija 8.4.3 (GraphPad Software, San Dijego, CA, SAD). Podaci su prvo testirani na normalnost raspodele korišćenjem *Shapiro–Wilk* testa. Za procenu razlika povezanih sa starenjem među grupama na sobnoj temperaturi (3, 6 i 24 meseca), korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (eng. *one-way ANOVA*) praćena *Tukey post hoc* testom kada su ispunjene pretpostavke normalnosti. Za podatke koji nisu zadovoljili pretpostavke normalnosti, korišćen je neparametarski *Kruskal-Wallis* test sa *Dunn post hoc* testom.

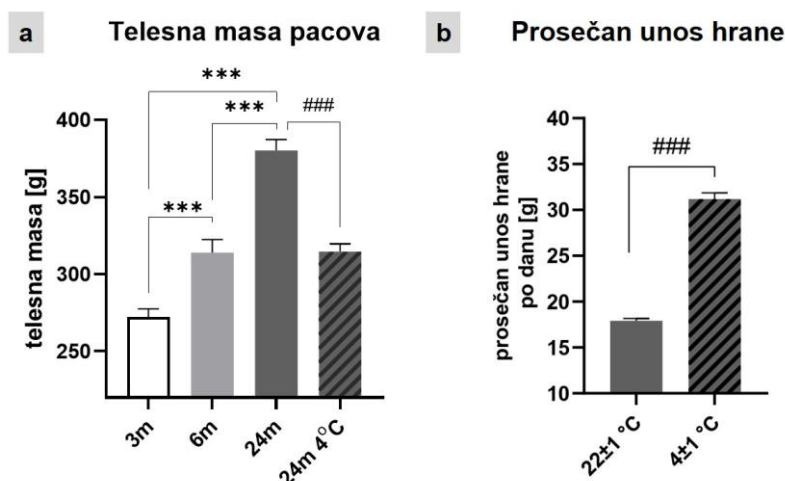
Za poređenje pacova starih 24 meseca koji su boravili na 4 °C (od 6. do 24. meseca starosti) u odnosu na grupu iste starosti na sobnoj temperaturi, korišćen je t-test za nezavisne uzorke ili, u slučajevima odsustva Gausove raspodele, *Mann-Whitney U* test. Odnos između FD i BN u BAT procenjen je korišćenjem Spirmanove korelacije i linearne regresione analize. Vrednost $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom. Podaci su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ standardna greška srednje vrednosti (SEM) ili srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija (SD).

4. REZULTATI

4.1. Analiza promena telesne mase i unosa hrane tokom hronološkog starenja pacova na sobnoj temperaturi i na hladnoći

Tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi zabeleženo je progresivno povećanje telesne mase pacova (Sl. 8a). Naime, pacovi starosti 24 meseca pokazuju višu telesnu masu kako u odnosu na pacove starosti 6 meseci ($p < 0,001$), tako i u odnosu na jedinke starosti 3 meseca ($p < 0,001$). Takođe, pacovi starosti 6 meseci imaju višu telesnu masu u poređenju sa tromesečnim životinjama ($p < 0,001$). Za razliku od promena na sobnoj temperaturi, pacovi uzrasta 24 meseca koji su bili izlagani niskoj temperaturi od 6. do 24. meseca starosti pokazuju nižu telesnu masu u odnosu na pacove iste starosti koji su boravili na sobnoj temperaturi ($p < 0,001$) (Sl. 8a).

Na Slici 8b prikazan je prosečan unos hrane po danu praćen od 6. do 24. meseca starosti pacova. Životinje uzrasta 24 meseca koje su bile izlagane niskoj temperaturi od 6. do 24. meseca starosti pokazuju kontinuiranu hiperfagiju u odnosu na pacove iste starosti koji su boravili na sobnoj temperaturi ($p < 0,001$).



Sl. 8. Promene telesne mase pacova (a) i prosečnog unosa hrane (b) tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Statistička značajnost: * Razlike između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C ($***p < 0,001$); # Razlike između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C i pacova istog uzrasta koji su boravili na 4 ± 1 °C ($###p < 0,001$). Na grafikonu za telesnu masu prikazane su srednje vrednosti $\pm$ SEM, dok su na grafikonu za prosečan unos hrane prikazane srednje vrednosti $\pm$ SD.

4.2. Analiza biokemijskih parametara u cirkulaciji tokom starenja

Analiza biokemijskih parametara u sistemske cirkulaciji (Tabela 2) otkriva specifične obrasce promena tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi (kod pacova uzrasta 3, 6 i 24 meseca) i nakon dugotrajnog izlaganja pacova niskoj temperaturi (od 6. do 24. meseca starosti – grupa 24m 4 °C u Tabeli 2).

Kada je u pitanju lipidni profil, koncentracije TAG i HDL ostaju nepromenjene tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi. Sa druge strane, ukupni holesterol je povišen kod pacova starosti 6 i 24 meseca ($p < 0,05$) u poređenju sa tromesečnim životinjama. Koncentracija LDL je viša u grupi od 24 meseca u odnosu na pacove stare 3 ($p < 0,01$) i 6 meseci ($p < 0,05$). Aktivnost lipoproteinske lipaze je snižena kod šestomesečnih pacova u odnosu na mlade ($p < 0,05$). Ovakve promene u lipidnom statusu praćene su porastom indeksa rizika; IA je povišen kod najstarije grupe na sobnoj temperaturi u poređenju sa tromesečnim pacovima ($p < 0,05$). Faktor rizika za CVD je viši kod pacova starosti 24 meseca u odnosu na grupe od 3 ($p < 0,001$) i 6 meseci ($p < 0,01$). Dugotrajno izlaganje niskoj temperaturi kod starih pacova (24 meseca) povezano je sa daljim porastom koncentracije ukupnog holesterola ($p < 0,01$) u poređenju sa pacovima iste starosti koji su boravili na sobnoj temperaturi. Ovaj porast je praćen izrazito povišenom koncentracijom HDL ($p < 0,001$) i višom aktivnošću lipoproteinske lipaze ($p < 0,05$) u grupi izlaganoj hladnoći, dok LDL ostaje na nivou sličnom onom u grupi starih pacova na sobnoj temperaturi. Ove razlike se reflektuju na pad faktora rizika za CVD ($p < 0,001$) uz primetan opadajući trend za IA kod dvogodišnjih pacova dugotrajno izlaganih niskoj temperaturi u odnosu na vršnjačku grupu na sobnoj temperaturi.

Koncentracije glukoze, laktata, β -hidroksibutirata i kreatinina se ne menjaju značajno ni tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi ni nakon dugotrajnog izlaganja starih pacova niskoj temperaturi.

Tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, koncentracija mokraćne kiseline je povišena kod dvogodišnjih pacova u odnosu na tromesečne ($p < 0,05$), dok urea ostaje nepromenjena. Nasuprot tome, kod starih pacova izlaganih niskoj temperaturi, koncentracija uree je povišena ($p < 0,05$) u odnosu na pacove iste starosti na sobnoj temperaturi. Istovremeno, iako koncentracije mokraćne kiseline i kreatinina ne pokazuju značajne razlike, primetan je opadajući trend na hladnoći u poređenju sa grupom starih pacova na sobnoj temperaturi.

Konačno, koncentracije transferina i gvožđa se ne menjaju značajno tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi. Dugotrajno izlaganje starih pacova niskoj temperaturi povezano je sa porastom koncentracije gvožđa ($p < 0,05$) u poređenju sa grupom starih jedinki na sobnoj temperaturi, dok koncentracija transferina ostaje nepromenjena pod uticajem hladnoće.

Tabela 2. Rezultati analize biohemijskih parametara u cirkulaciji pacova

Parametar	3m	6m	24m	24m 4°C
TAG [mmol/L]	1,1±0,30	1,2±0,35	1,2±0,28	1,2±0,26
Ukupni kolesterol [mmol/L]	1,4±0,11	1,5±0,09*	1,9±0,08*	2,7±0,10 ^{##}
HDL [mmol/L]	0,36±0,04	0,35±0,03	0,39±0,05	0,66±0,12 ^{###}
LDL [mmol/L]	0,15±0,06	0,17±0,05	0,32±0,04 ^{***,■}	0,30±0,06
Lipoproteinska lipaza [J/L]	13,3±2,0	7,0±1,7*	11,3±1,5	23,6±5,4 [#]
IA (ukupan kolesterol/HDL)	3,9±0,5	4,1±0,3	5,1±1,0*	4,3±0,5
Faktor rizika za CVD (LDL/HDL)	0,43±0,17	0,47±0,12	0,82±0,15 ^{***,■}	0,45±0,05 ^{###}
Glukoza [mmol/L]	6,9±0,6	7,2±0,8	7,5±0,9	7,6±0,9
Kreatinin [μmol/L]	59,3±7,3	67,8±9,6	67,7±9,4	57,6±11
Laktat [mmol/L]	4,3±0,8	4,0±1,1	3,4±0,4	3,2±0,6
Urea [mmol/L]	6,4±0,3	6,6±0,09	6,2±0,1	8,9±0,5 [#]
Mokraćna kiselina [μmol/L]	79±28	153±95	342±161*	170±61
β-hidroksibutirat [mmol/L]	0,33±0,06	0,23±0,02	0,23±0,04	0,23±0,02
Transferin [μmol/L]	13,9±1,4	14±1,0	14,1±0,8	15±1,2
Gvožđe [μmol/L]	78,3±14,9	78,5±15,8	62,2±16,2	86,7±11,4 [#]

Skraćenice: TAG – triacilgliceroli; HDL – lipoprotein visoke gustine; LDL – lipoprotein niske gustine; IA – indeks ateroskleroze; CVD – kardiovaskularne bolesti (eng. *cardiovascular diseases*).

Statistička značajnost: * Razlike u odnosu na pacove starosti 3 meseca (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$); ■ Razlike u odnosu na pacove starosti 6 meseci (■ $p < 0,05$; ■■ $p < 0,01$); # Razlike između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C i pacova istog uzrasta koji su boravili na 4 ± 1 °C (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$). U tabeli su prikazane srednje vrednosti $\pm$ SD.

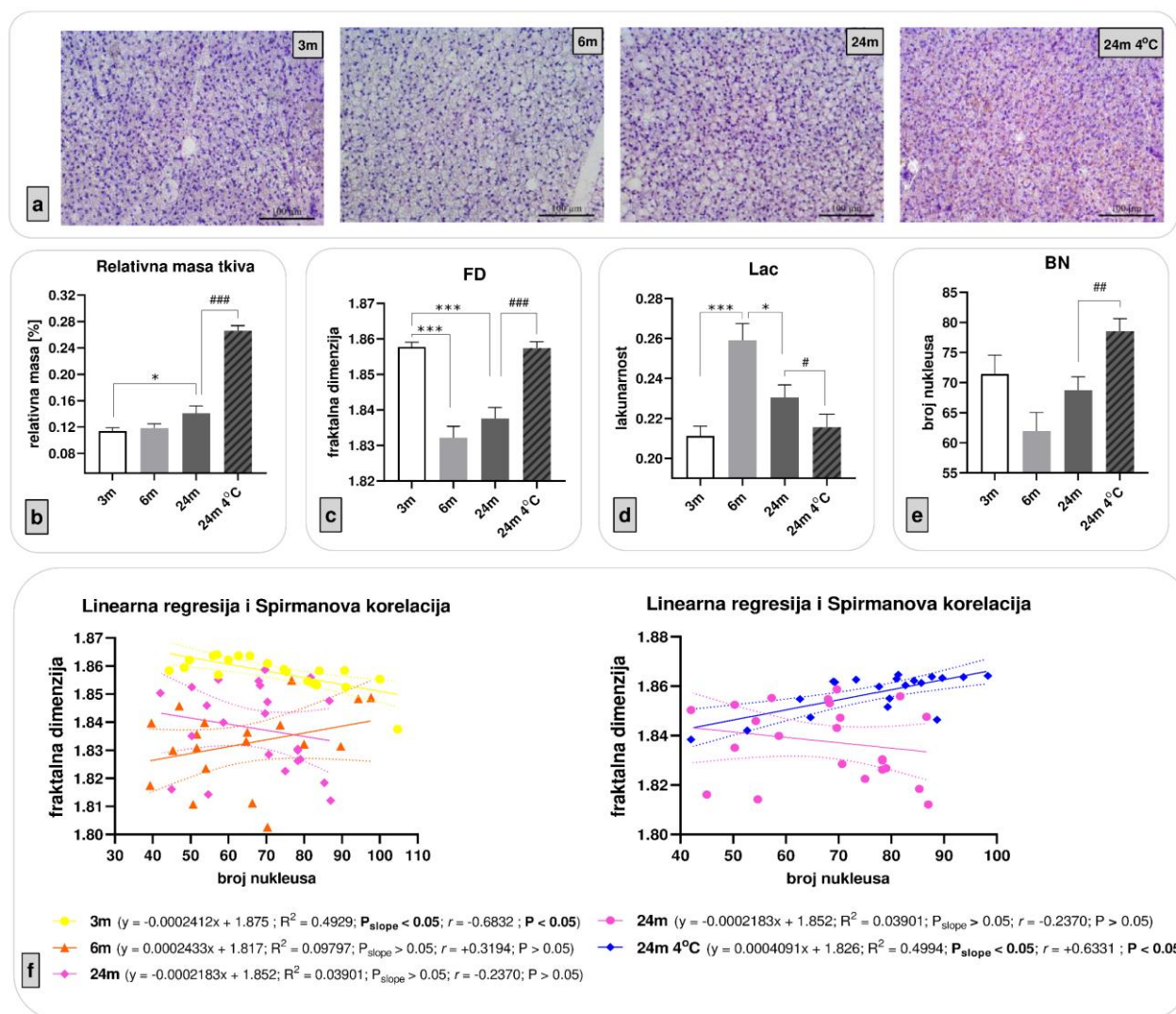
4.3. Analiza strukturnog remodeliranja i redoks-metaboličkog reprogramiranja BAT tokom hronološkog starenja pacova na sobnoj temperaturi i na hladnoći

4.3.1. Fraktalna i morfometrijska analiza

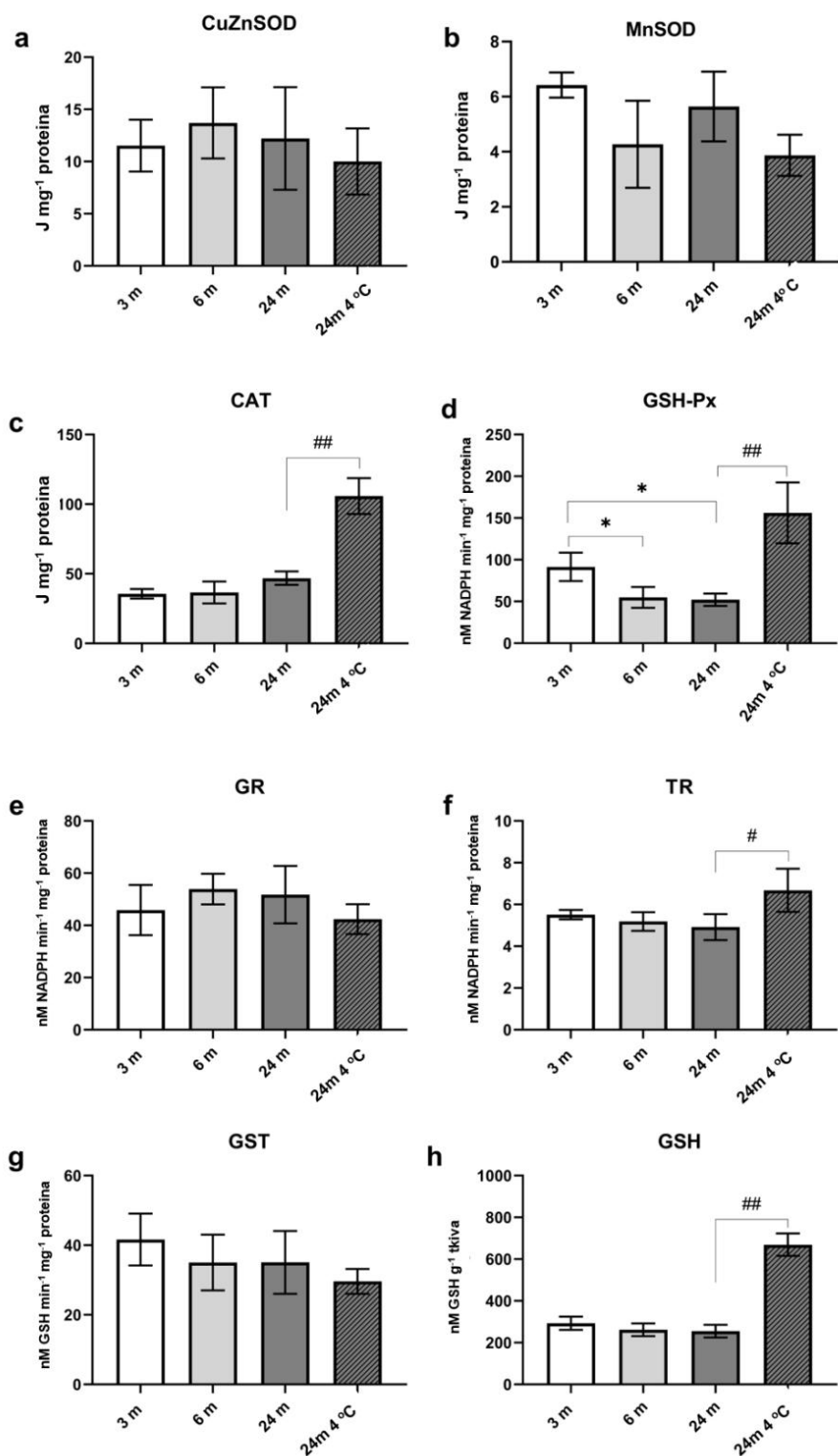
Kvalitativna procena mikrofotografija tkivnih preseka obojenih hematoksilinom pokazala je povećanje veličine lipidnih tela tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, dok je dugotrajno izlaganje hladnoći bilo povezano sa paucilokularnim izgledom (većim brojem manjih lipidnih tela). Kvantifikacija strukturne složenosti putem FD pokazuje da je starenje povezano sa opadanjem FD ($p < 0,001$). Sa druge strane, dugotrajno izlaganje hladnoći kod starih pacova povezano je sa povećanjem relativne mase BAT ($p < 0,001$) i porastom FD ($p < 0,001$) i BN ($p < 0,01$), uz istovremeno smanjenje Lac ($p < 0,05$). Analiza korelacije i regresije između FD i BN pokazuje da se negativna korelacija uočena kod pacova starosti 3 meseca ($r = -0,6832$, $p < 0,05$) gubi sa starenjem, a da se odsečki kriva regresije (eng. *regression intercepts*) razlikuju između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca koji su boravili na sobnoj temperaturi ($p < 0,05$), što implicira da razlike u FD ne zavise od BN. Međutim, dugotrajno izlaganje pacova niskoj temperaturi značajno menja ovaj odnos, pri čemu se kod jedinki izlaganih hladnoći od 6. do 24. meseca starosti uočava pozitivna korelacija između FD i BN ($r = +0,6331$, $p < 0,05$), dok je kod pacova starosti 24 meseca koji su boravili na sobnoj temperaturi zadržan blagi negativni trend. Štaviše, nagibi kriva regresije se značajno razlikuju između dvogodišnjih pacova dugotrajno izlaganih hladnoći i pacova iste starosti koji su boravili na sobnoj temperaturi (Sl. 9).

4.3.2. Aktivnosti enzima antioksidativne odbrane i količina glutaciona

U BAT, hronološko starenje na sobnoj temperaturi povezano je sa smanjenjem aktivnosti GSH-Px, što je uočeno i kod pacova starih 6 meseci i kod pacova starih 24 meseca u odnosu na grupu mladih ($p < 0,05$). Nasuprot tome, dugotrajno izlaganje hladnoći kod pacova starosti 24 meseca bilo je povezano sa povećanjem aktivnosti CAT, GSH-Px ($p < 0,01$) i TR ($p < 0,05$), kao i ukupnog sadržaja GSH ($p < 0,01$), u poređenju sa grupom pacova istog uzrasta koja je boravila na sobnoj temperaturi. Prosečna aktivnost CAT i količina GSH su se udvostručili, dok se aktivnost GSH-Px utrostručila kod pacova izlaganih hladnoći u poređenju sa grupom iste starosti na sobnoj temperaturi. Aktivnosti izoformi SOD, kao ni GR i GST se nisu značajno menjale između grupa (Sl. 10).



Sl. 9. Fraktalna i morfometrijska analiza **BAT** tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. (a) Reprezentativne mikrografije preseka obojenih hematoksilinom. Bar: 100 μ m. (b) Relativna masa tkiva. (c) Fraktalna dimenzija (FD). (d) Lakunarnost (Lac). (e) Broj nukleusa (BN). (f) Linearna regresija i Spirmanova korelaciona analiza ranga između FD i BN. R^2 : koeficijent determinacije za linearnu regresiju; r : koeficijent korelacije. * Razlike između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca koji su boravili na $22 \pm 1^\circ\text{C}$ (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$); # Razlike između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na $4 \pm 1^\circ\text{C}$ i pacova istog uzrasta koji su boravili na $22 \pm 1^\circ\text{C}$ (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$). Prikazane su srednje vrednosti $\pm$ SEM.



Sl. 10. Aktivnosti enzima AD i ukupan GSH u **BAT** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. (a) CuZnSOD; (b) MnSOD; (c) CAT; (d) GSH-Px; (e) GR; (f) TR; (g) GST; (h) ukupan GSH. * Razlike između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C (* $p < 0,05$). # Razlike između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C i pacova istog uzrasta koji su boravili na 4 ± 1 °C (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$). Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ SD.

4.3.3. Proteinska ekspresija komponenti antioksidativne odbrane

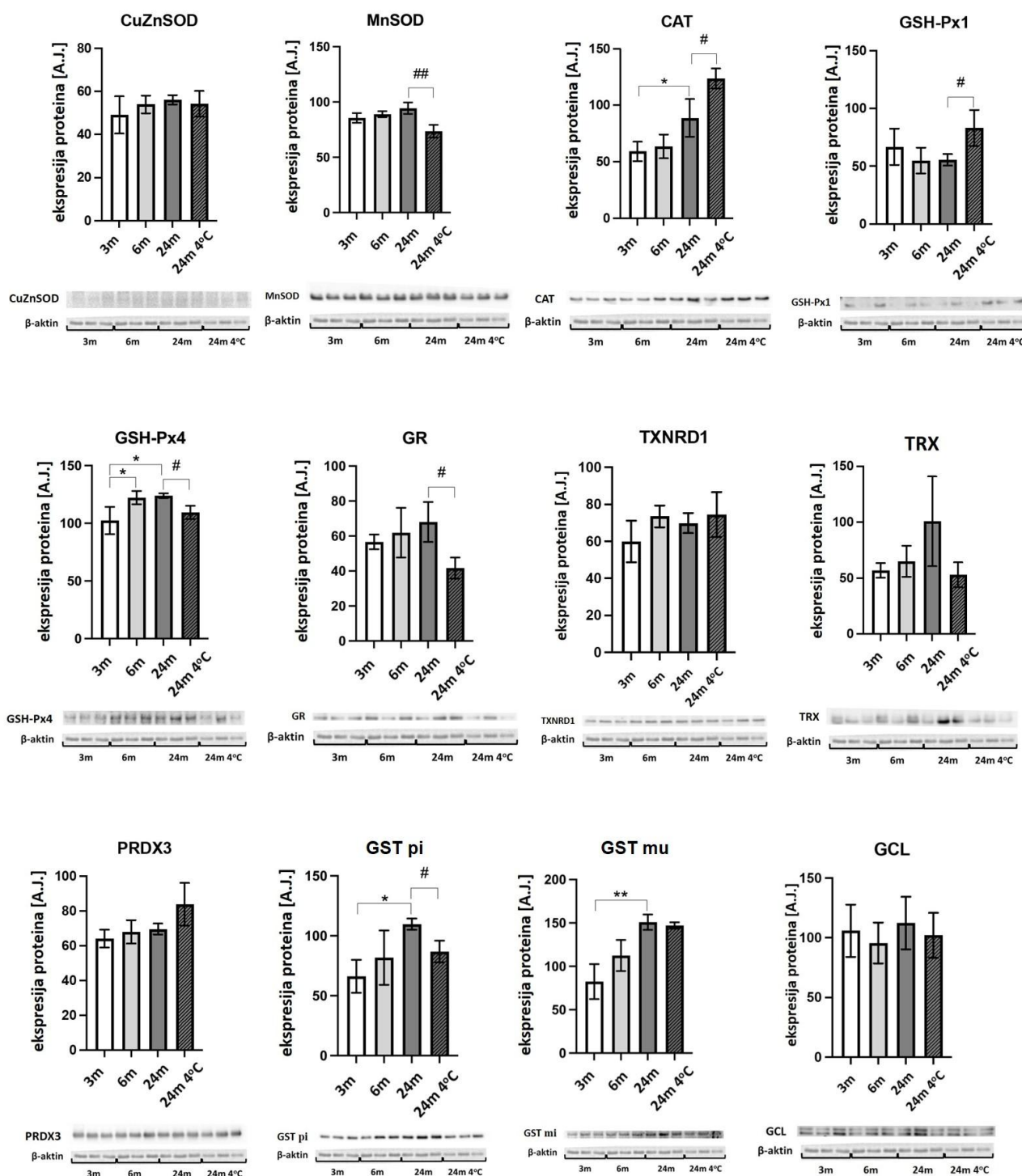
Analiza proteinske ekspresije komponenti AD u BAT (prikazana na Sl. 11) obuhvatila je enzime koji vrše dismutaciju $O_2^{\bullet-}$, enzime uključene u uklanjanje peroksida, kao i ostale komponente glutationskog i tioredoksinskog ogranka AD.

Tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, proteinska ekspresija CuZnSOD i MnSOD nije se značajno menjala između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca. Međutim, za razliku od proteinske ekspresije CuZnSOD koja se ne menja značajno ni pod uticajem hladnoće, proteinska ekspresija MnSOD je snižena ($p < 0,01$) kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi.

U kontekstu enzima uključenih u uklanjanje peroksida, proteinska ekspresija GSH-Px1 i PRDX3 nije se značajno menjala između grupa pacova starosti 3, 6 i 24 meseca koji su boravili na sobnoj temperaturi. Sa druge strane, proteinska ekspresija CAT i GSH-Px4 je viša kod pacova starosti 24 meseca u poređenju sa pacovima starosti 3 meseca koji su boravili na sobnoj temperaturi ($p < 0,05$). Dugotrajno izlaganje niskoj temperaturi sredine bilo je povezano sa višom proteinskom ekspresijom CAT i GSH-Px1 ($p < 0,05$) i rastućim trendom ekspresije PRDX3, ali i sa nižom proteinskom ekspresijom GSH-Px4 ($p < 0,05$) uočenom kod pacova starosti 24 meseca dugotrajno izlaganih niskoj temperaturi u poređenju sa životinjama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi.

Kada je reč o ostalim komponentama glutationskog i tioredoksinskog sistema, proteinska ekspresija GR, TR, TRX i GCL nije se značajno menjala između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca koji su boravili na sobnoj temperaturi. Takođe, ni dugotrajno izlaganje hladnoći nije bilo povezano sa značajnim promenama u proteinskoj ekspresiji GR, TR, TRX i GCL. Međutim, kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani hladnoći proteinska ekspresija GR je snižena u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi ($p < 0,05$).

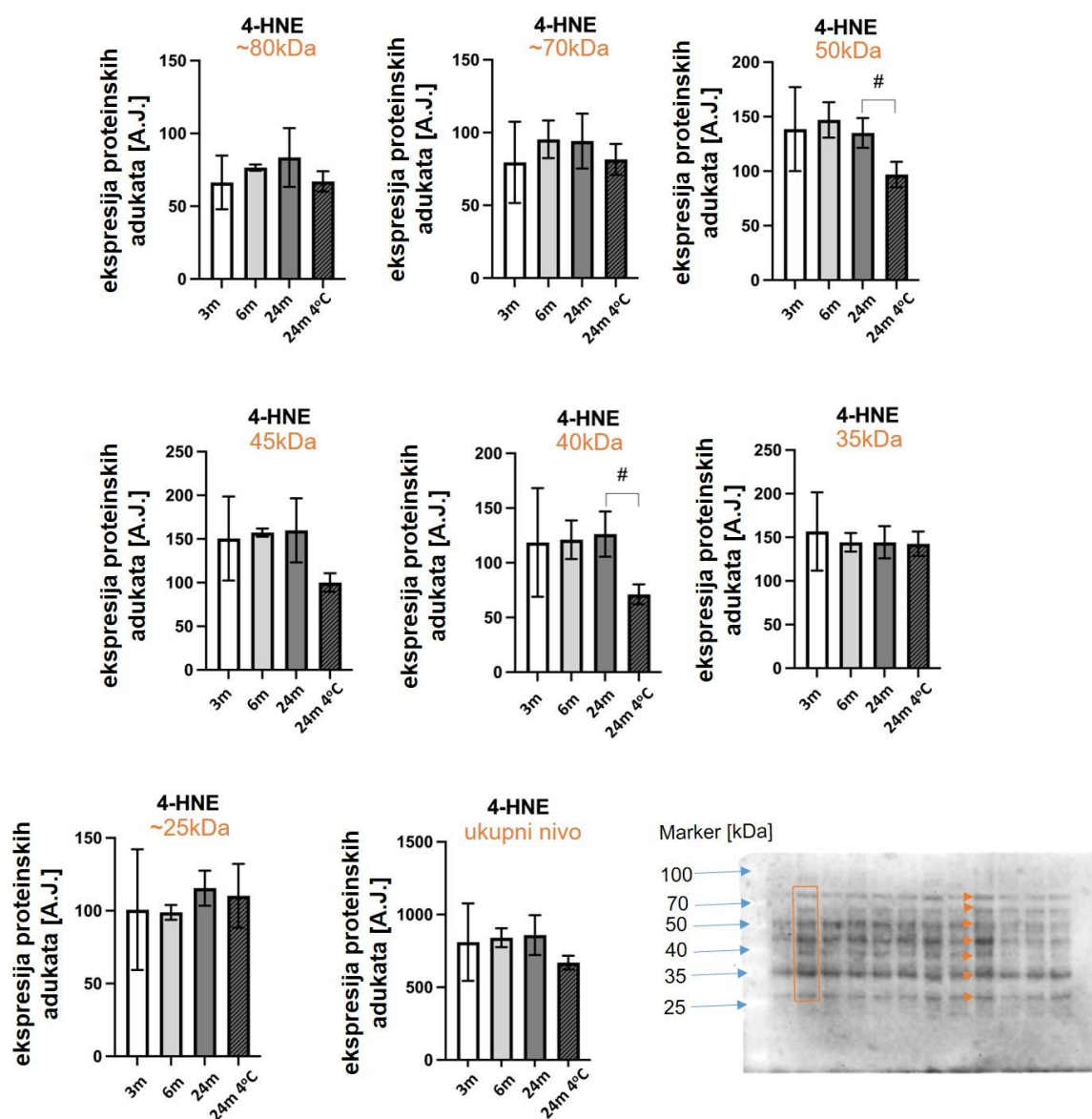
Analiza izoformi GST pokazuje da je proteinska ekspresija GST pi ($p < 0,05$) i GST mu ($p < 0,01$) povišena kod pacova starosti 24 meseca u poređenju sa tromesečnim životinjama. Za razliku od GST mu, dugotrajno izlaganje hladnoći bilo je povezano sa nižom proteinskom ekspresijom GST pi ($p < 0,05$) zabeleženom kod pacova starosti 24 meseca koji su bili izlagani niskoj temperaturi od 6. do 24. meseca u poređenju sa životinjama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi.



Sl. 11. Proteinska ekspresija komponenti AD u **BAT** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -aktin kao konstitutivno ekspimirani protein. Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D. * Razlike između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). # Razlike između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C i pacova istog uzrasta koji su boravili na 4 ± 1 °C (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$).

4.3.4. Nivo proteinskih adukata sa 4-HNE

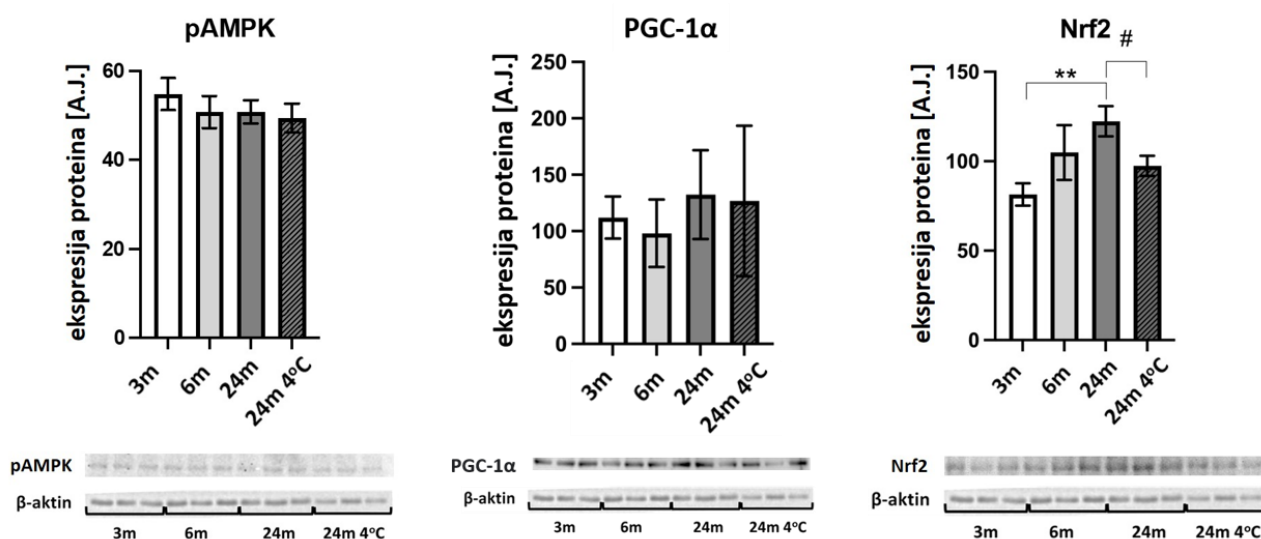
Tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, nivo proteinskih adukata sa 4-HNE molekulskih masa od 65 do 70 kDa nije se značajno menjao. Nivo adukata molekulske mase 35 kDa je povišen kod pacova starosti 6 meseci i 24 meseca ($p < 0,05$) u poređenju sa tromesečnim jedinkama koje su boravile na sobnoj temperaturi, dok je nivo adukata molekulske mase oko 70-75 kDa, kao i ukupan nivo adukata (svih kvantifikovanih traka), viši kod šestomesečnih pacova u odnosu na mlade ($p < 0,05$). Nasuprot tome, ukupni nivo proteinskih adukata sa 4-HNE nije se značajno menjao kod starih pacova dugotrajno izlaganih hladnoći u odnosu na životinje iste starosti (24 meseca) koje su boravile na sobnoj temperaturi (Sl. 12).



Sl. 12. Ekspresija adukata proteina sa 4-HNE u **BAT** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -actin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D. # Razlike između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C i pacova istog uzrasta koji su boravili na 4 ± 1 °C ($^{\#}p < 0,05$).

4.3.5. Proteinska ekspresija pAMPK, PGC-1 α i Nrf2

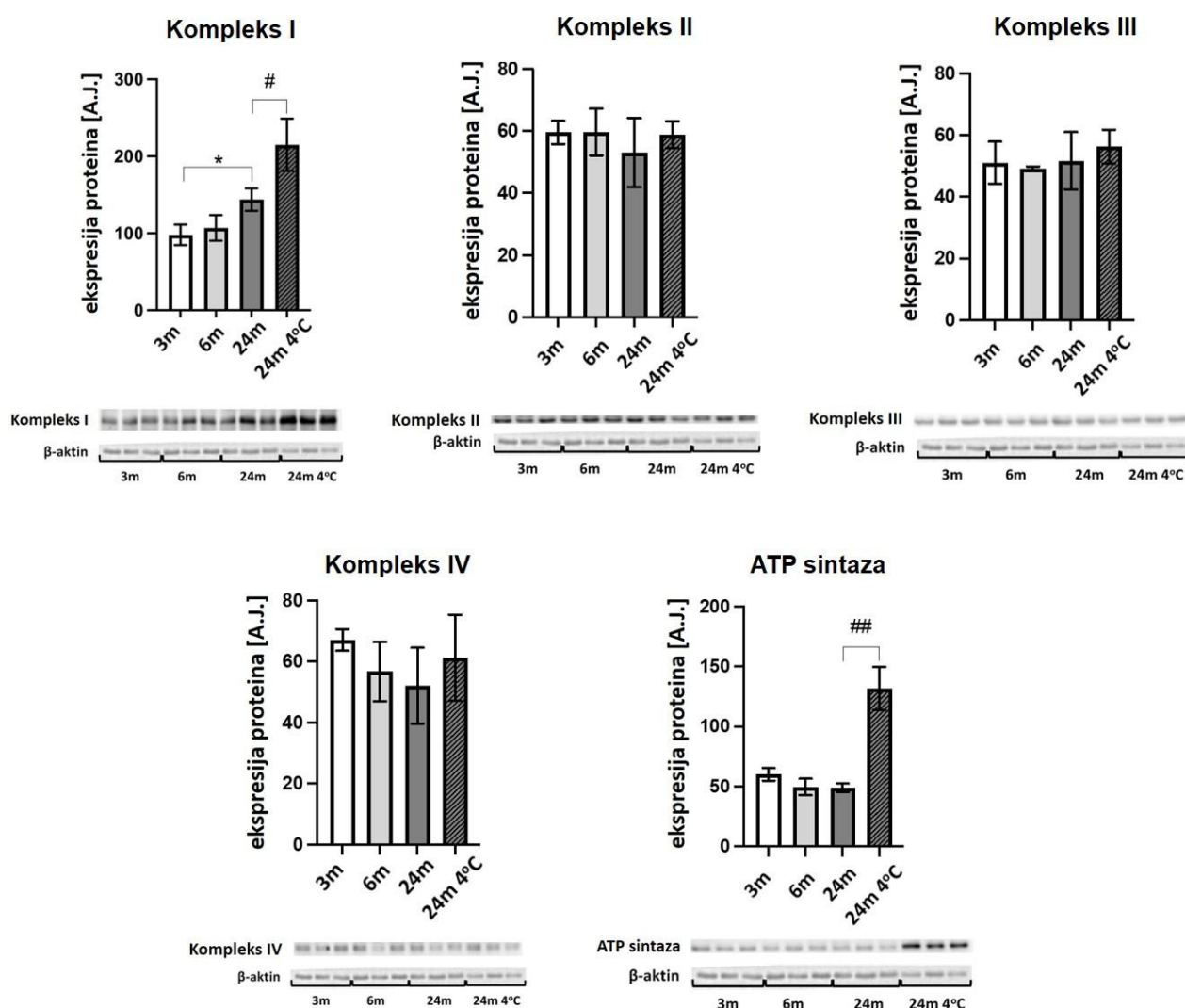
Tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, kao i nakon dugotrajnog izlaganja starih pacova niskoj temperaturi, nisu zabeležene značajne promene u proteinskoj ekspresiji pAMPK i PGC-1 α u BAT. Sa druge strane, zabeležena je povišena proteinska ekspresija Nrf2 kod pacova starosti 24 meseca u poređenju sa tromesečnim pacovima koji su boravili na sobnoj temperaturi ($p < 0,01$). Kod pacova starosti 24 meseca koji su bili izlagani niskoj temperaturi od 6. do 24. meseca u poređenju sa životinjama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi, došlo je do smanjenja proteinske ekspresije Nrf2 ($p < 0,05$), ali ne ispod nivoa koji odlikuje tromesečnu grupu pacova (Sl. 13).



Sl. 13. Proteinska ekspresija pAMPK, PGC-1 α i Nrf2 u **BAT** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -aktin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D. * Razlika između pacova starosti 3 i 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C (** $p < 0,01$). # Razlika između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C i pacova istog uzrasta koji su boravili na 4 ± 1 °C ($p < 0,05$).

4.3.6. Proteinska ekspresija kompleksa respiratornog lanca i ATP sintaze

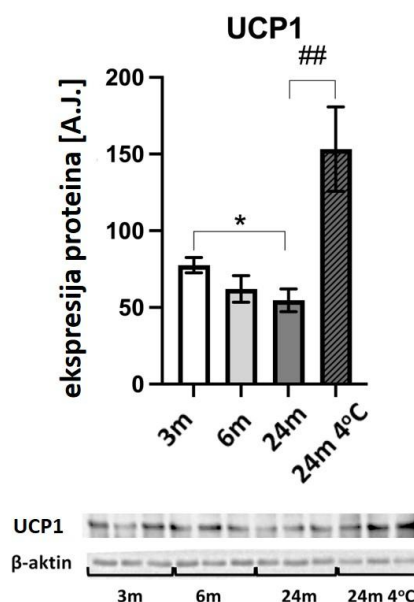
Proteinska ekspresija kompleksa II, III i IV, kao i ekspresija ATP sintaze, nisu se značajno menjale tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi u BAT. Beleži se samo povišena proteinska ekspresija kompleksa I kod starih pacova u poređenju sa tromesečnim jedinkama koje su boravile na sobnoj temperaturi ($p < 0,05$). Za razliku od kompleksa II, III i IV čija ekspresija se nije menjala ni pod uticajem hladnoće, proteinske ekspresije kompleksa I ($p < 0,05$) i ATP sintaze ($p < 0,01$) su bile izrazito povišene u grupi starih pacova dugotrajno izlaganih niskoj temperaturi u poređenju sa pacovima iste starosti (24 meseca) koji su boravili na sobnoj temperaturi, vidno nadilazeći nivoe ekspresije zabeležene i u ostalim grupama na sobnoj temperaturi (Sl. 14).



Sl. 14. Proteinska ekspresija kompleksa respiratornog lanca (I-IV) i ATP sintaze u **BAT** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -aktin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D. * Razlika između pacova starosti 3 i 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C (* $p < 0,05$). # Razlike između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C i pacova istog uzrasta koji su boravili na 4 ± 1 °C (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$).

4.3.7. Proteinska ekspresija UCP1

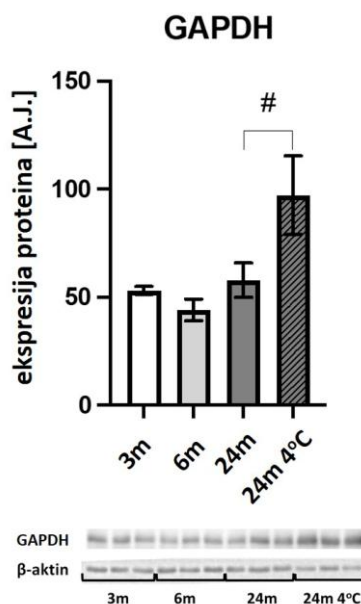
Proteinska ekspresija UCP1 u BAT je snižena kod starih pacova (24 meseca) u odnosu na mlade, tromesečne životinje ($p < 0,05$). Nasuprot tome, kod starih pacova dugotrajno izlaganih niskoj temperaturi proteinska ekspresija UCP1 je povišena u odnosu na grupu pacova iste starosti koja je boravila na sobnoj temperaturi ($p < 0,01$), vidno nadilazeći nivoe ekspresije zabeležene i u ostalim grupama na sobnoj temperaturi za oko 50% (Sl. 15).



Sl. 15. Proteinska ekspresija dekaplirajućeg proteina 1 (UCP1) u **BAT** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -aktin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na grafikonu su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D. * Razlika između pacova starosti 3 i 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C (* $p < 0,05$). # Razlike između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C i pacova istog uzrasta koji su boravili na 4 ± 1 °C ($^{##}p < 0,01$).

4.3.8. Proteinska ekspresija glikolitičkog enzima GAPDH

Proteinska ekspresija glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH) u BAT se ne menja značajno tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi. Sa druge strane, kod starih pacova dugotrajno izlaganih niskoj temperaturi proteinska ekspresija GAPDH je povišena u odnosu na grupu pacova iste starosti koja je boravila na sobnoj temperaturi ($p < 0,05$), vidno nadilazeći nivoe ekspresije zabeležene i u ostalim grupama na sobnoj temperaturi za oko 50% (Sl. 16).

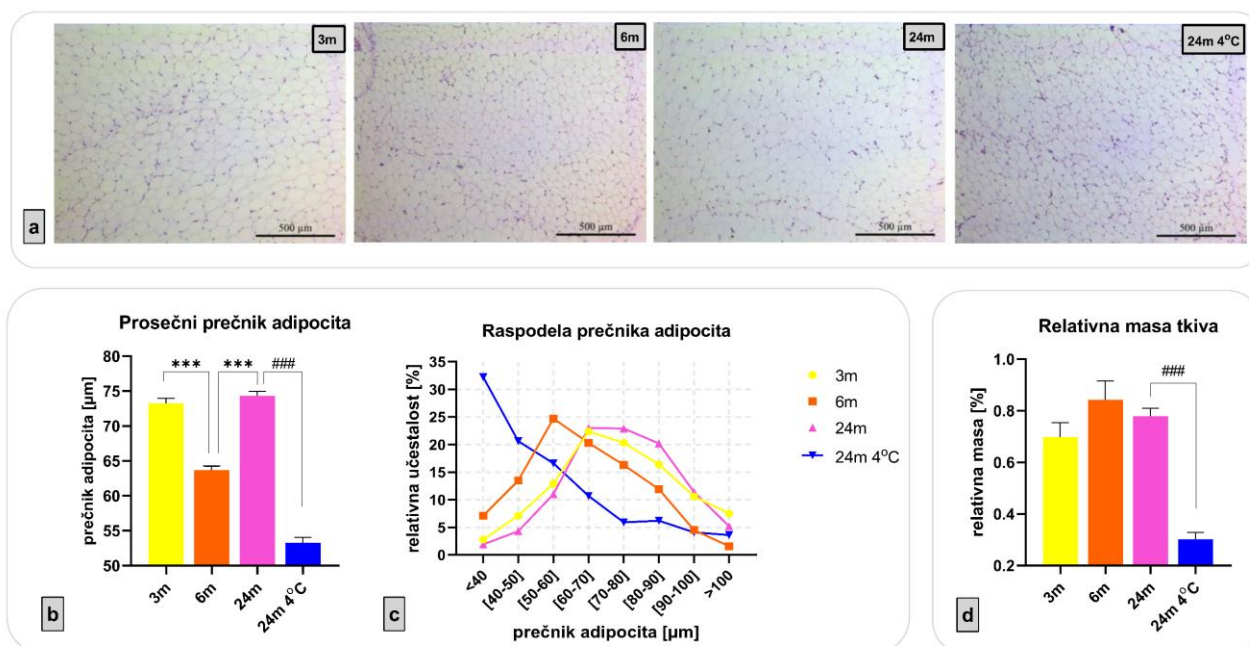


Sl. 16. Proteinska ekspresija glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH) u **BAT** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -aktin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D. [#] Razlika između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C i pacova istog uzrasta koji su boravili na 4 ± 1 °C ([#] $p < 0,05$).

4.4. Analiza strukturnog remodeliranja i redoks-metaboličkog reprogramiranja rWAT tokom hronološkog starenja pacova na sobnoj temperaturi i na hladnoći

4.4.1. Morfometrijska analiza

Histološkom analizom tkiva uočeni su tipični unilokulusni adipociti u rWAT (Sl. 17a). Analiza raspodele prečnika adipocita kod pacova koji su boravili na sobnoj temperaturi pokazuje da stari pacovi imaju veći udeo veoma velikih adipocita (Sl. 17c), što je u skladu sa trendom povećanja prosečnog dijametra adipocita (Sl. 17b) i relativne mase tkiva (Sl. 17d), kod pacova starih 24 meseca u odnosu na tromesečne pacove. Nasuprot tome, dugotrajno izlaganje hladnoći bilo je povezano sa smanjenjem prečnika adipocita ($p < 0,001$; Sl. 17b) i relativne mase depoa ($p < 0,001$; Sl. 17d), pomerajući raspodelu dijametra ka manjim adipocitima (Sl. 17c), kod dvogodišnjih pacova u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi.



Sl. 17. Morfometrijska analiza rWAT tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. (a) Reprezentativne mikrografije preseka rWAT obojenih hematoksilinom. Bar: 500 µm. (b) Prosečan prečnik adipocita. (c) Raspodela prečnika adipocita po klasama veličine. (d) Relativna masa rWAT. * Razlike između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C ($***p < 0,001$); # Razlike između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C i pacova istog uzrasta koji su boravili na 4 ± 1 °C ($###p < 0,001$). Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ SEM.

4.4.2. Aktivnosti enzima antioksidativne odbrane i količina glutaciona

U rWAT, hronološko starenje bilo je povezano sa smanjenjem aktivnosti CAT ($p < 0,05$), GSH-Px, GR ($p < 0,01$), GST i TR ($p < 0,05$) kod pacova starih 6 i 24 meseca u poređenju sa grupom starom 3 meseca. Ukupan sadržaj GSH bio je smanjen kod pacova starih 6 meseci u odnosu na tromesečnu grupu ($p < 0,01$). Hronični efekat hladnoće na rWAT kod starih pacova pokazao je suprotan profil: u poređenju sa grupom iste starosti na sobnoj temperaturi, zabeležene su povišene aktivnosti CAT, GSH-Px, GST ($p < 0,001$), GR i TR, kao i povišen ukupan sadržaj GSH ($p < 0,01$). Aktivnosti izoformi SOD nisu se značajno menjale (Sl. 18).

4.4.3. Proteinska ekspresija komponenti antioksidativne odbrane

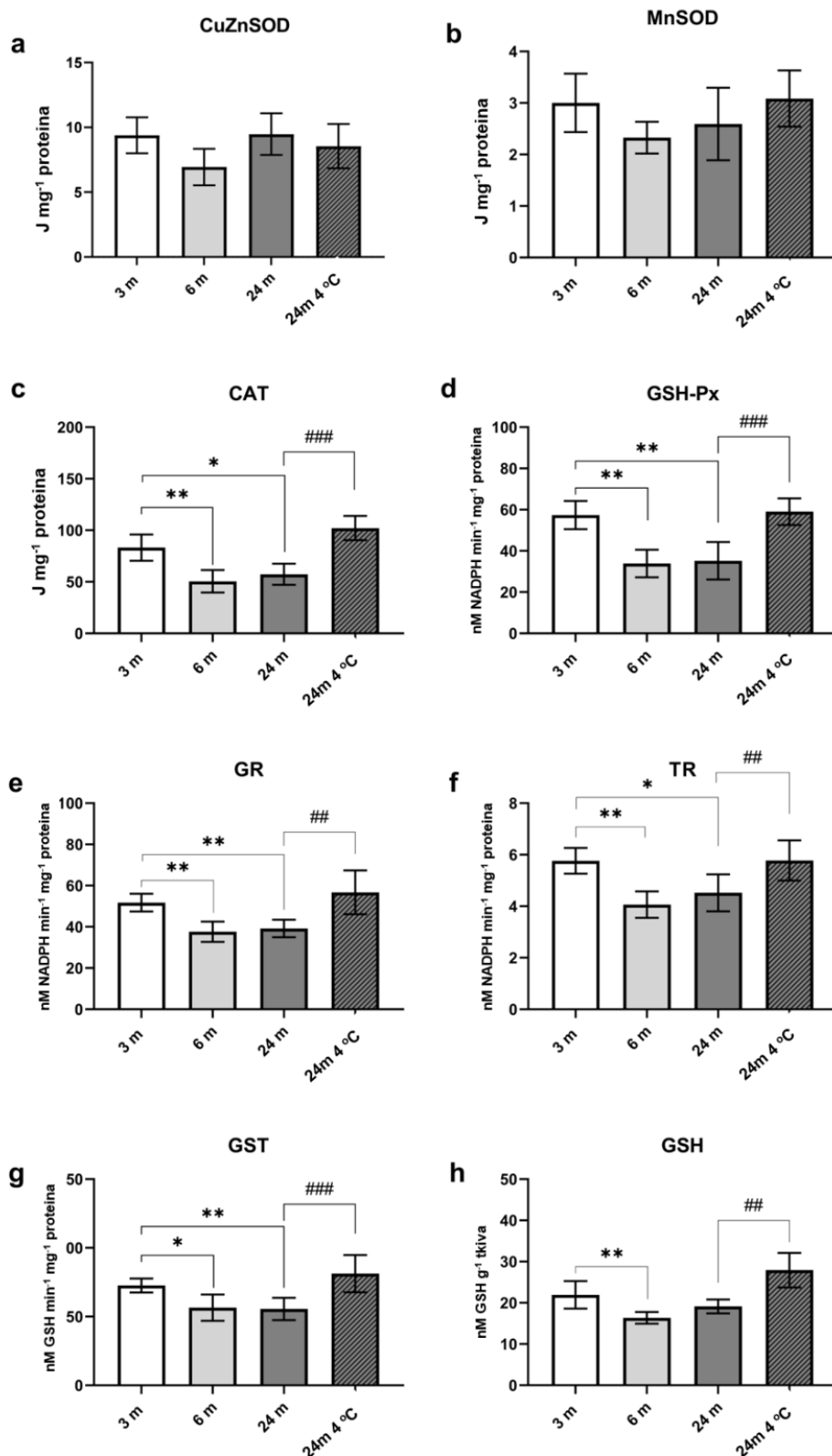
Analiza proteinske ekspresije komponenti AD u rWAT (prikazana na Sl. 19) obuhvatila je enzime koji vrše dismutaciju $O_2^{\cdot-}$, enzime uključene u uklanjanje peroksida, kao i ostale komponente glutationskog i tioredoksinskog ogranka AD.

Tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, proteinska ekspresija CuZnSOD i MnSOD nije se značajno menjala između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca. Međutim, proteinska ekspresija CuZnSOD ($p < 0,01$) i MnSOD ($p < 0,05$) je snižena kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi.

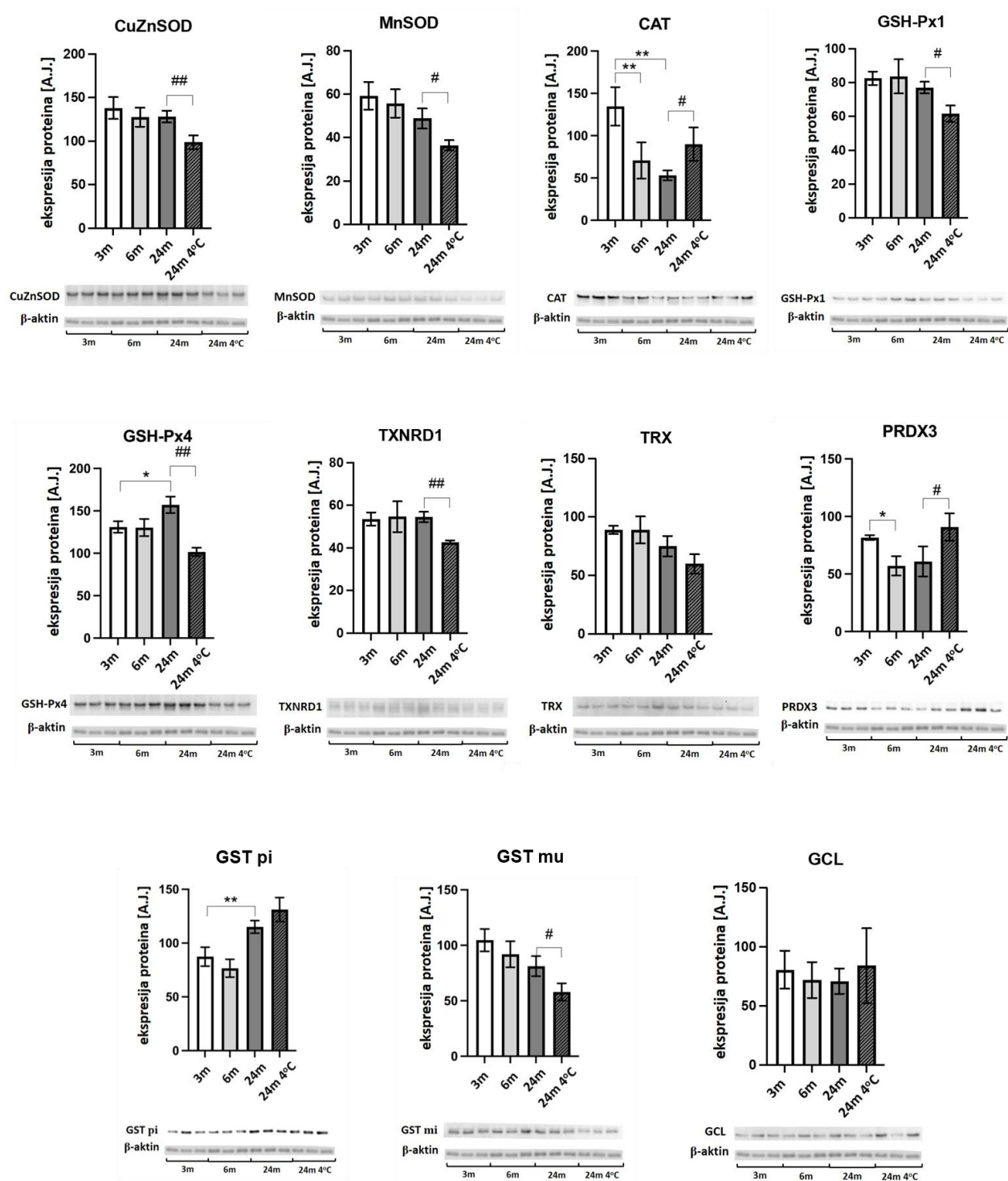
Kada su u pitanju enzimi uključeni u uklanjanje peroksida, proteinska ekspresija GSH-Px1 se nije značajno menjala tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi. Proteinska ekspresija CAT je snižena kod pacova starosti 6 i 24 meseca ($p < 0,01$) u poređenju sa tromesečnim pacovima koji su boravili na sobnoj temperaturi. Slično tome, proteinska ekspresija PRDX3 je snižena kod šestomesečnih pacova u odnosu na mlade ($p < 0,05$). Sa druge strane, proteinska ekspresija GSH-Px4 je viša kod pacova starosti 24 meseca u poređenju sa pacovima starosti 3 meseca koji su boravili na sobnoj temperaturi ($p < 0,05$). Proteinska ekspresija CAT i PRDX3 je povišena ($p < 0,05$), dok je proteinska ekspresija GSH-Px1 ($p < 0,05$) i GSH-Px4 ($p < 0,01$) snižena kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa životinjama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi.

Kada je reč o ostalim komponentama glutationskog i tioredoksinskog sistema, proteinska ekspresija TR, TRX i GCL nije se značajno menjala tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi. Proteinska ekspresija TR ($p < 0,01$) je snižena kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi, dok se proteinske ekspresije TRX i GCL nisu značajno menjale pod uticajem hladnoće.

Analiza izoformi GST pokazuje da je proteinska ekspresija GST pi povišena kod pacova starosti 24 meseca u poređenju sa tromesečnim životinjama na sobnoj temperaturi ($p < 0,01$), dok se ekspresija GST mu nije značajno menjala tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi. Za razliku od GST pi čija se ekspresija nije menjala pod uticajem hladnoće, proteinska ekspresija GST mu je snižena ($p < 0,05$) kod pacova starosti 24 meseca koji su bili izlagani niskoj temperaturi od 6. do 24. meseca u poređenju sa životinjama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi.



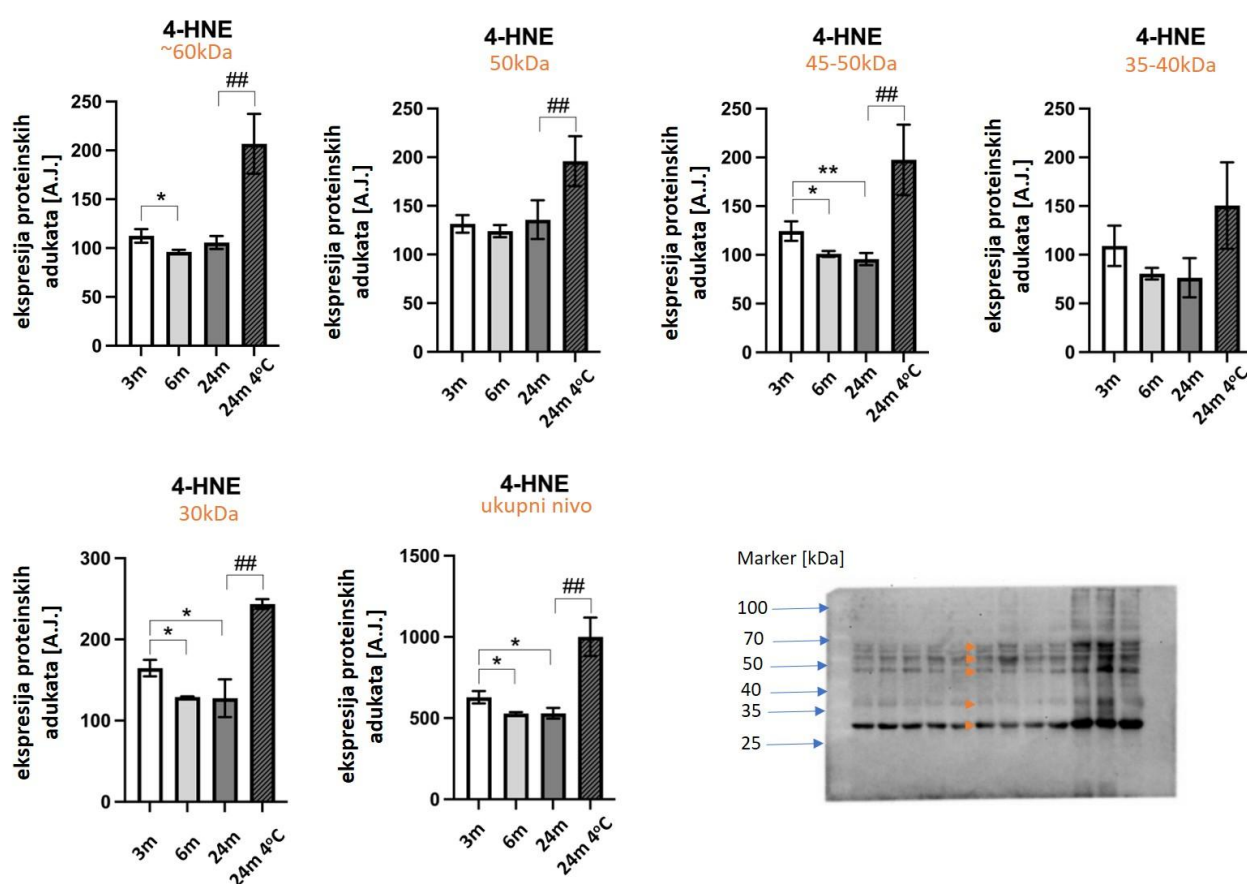
Sl. 18. Aktivnosti enzima AD i ukupan GSH u **rWAT** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. (a) CuZnSOD; (b) MnSOD; (c) CAT; (d) GSH-Px; (e) GR; (f) TR; (g) GST; (h) ukupan GSH. * Razlike između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). # Razlike između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C i pacova istog uzrasta koji su boravili na 4 ± 1 °C (## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$). Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ SD.



Sl. 19. Proteinska ekspresija komponenti AD u **rWAT** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -aktin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D. * Razlike između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca koji su boravili na $22 \pm 1^\circ\text{C}$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). # Razlike između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na $22 \pm 1^\circ\text{C}$ i pacova istog uzrasta koji su boravili na $4 \pm 1^\circ\text{C}$ (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$).

4.4.4. Nivo proteinskih adukata sa 4-HNE

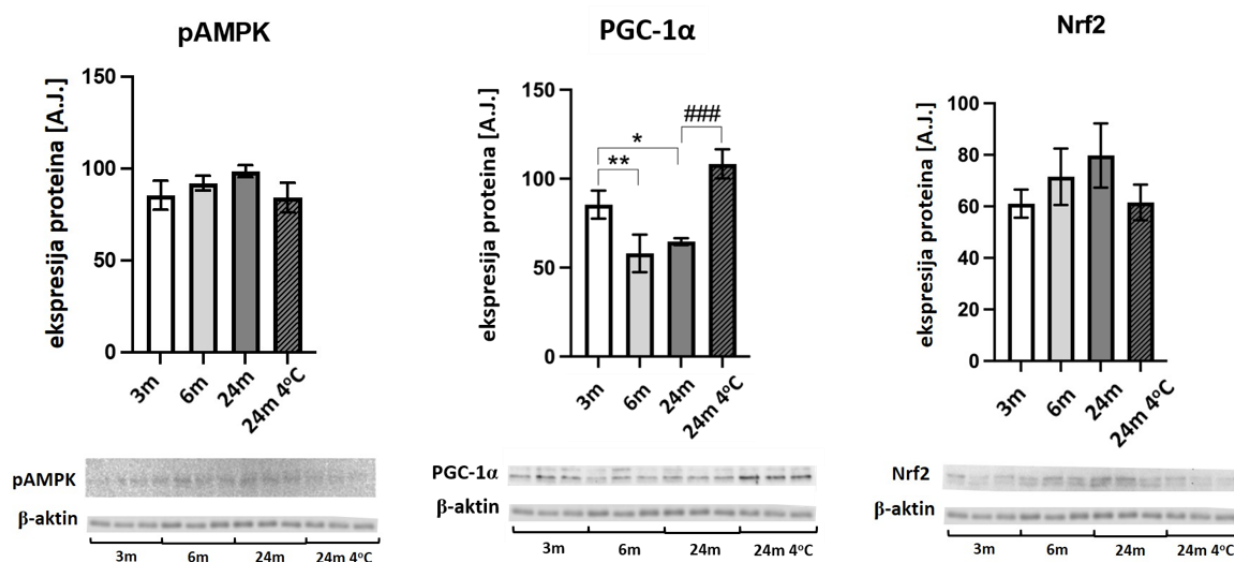
Analiza nivoa proteina koji su modifikovani posredstvom 4-HNE obuhvatila je detekciju i kvantifikaciju adukata različitih molekulskih masa u rWAT. Ekspresija adukata molekulskih masa 50 kDa i 35-40 kDa nije se značajno menjala tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi. Međutim, zbirna analiza nivoa ekspresije ovih proteinskih adukata (u svim kvantifikovanim trakama) pokazala je nižu ekspresiju kod pacova starosti 6 i 24 meseca u odnosu na tromesečne jedinke ($p < 0,05$). Ovaj obrazac je evidentan u nivou proteinske ekspresije adukata molekulskih masa 45-50 kDa i 30 kDa koja je snižena kod pacova starosti 24 meseca u odnosu na tromesečnu grupu ($p < 0,01$ i $p < 0,05$, respektivno), pri čemu su adukti oko 60 kDa, 45-50 kDa i 30 kDa sniženi kod šestomesečnih pacova u odnosu na tromesečne ($p < 0,05$). Nasuprot tome, nivo 4-HNE modifikovanih proteina molekulskih masa oko 60 kDa, 50 kDa, 45-50 kDa i 30 kDa, kao i ukupnih adukata (sve trake), povišen je kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa životinjama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi ($p < 0,01$), uz rastući trend nivoa adukata molekulske mase 35-40 kDa (Sl. 20).



Sl. 20. Ekspresija adukata proteina sa 4-HNE u rWAT pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -actin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D. * Razlike između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). # Razlike između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C i pacova istog uzrasta koji su boravili na 4 ± 1 °C (** $p < 0,01$).

4.4.5. Proteinska ekspresija pAMPK, PGC-1 α i Nrf2

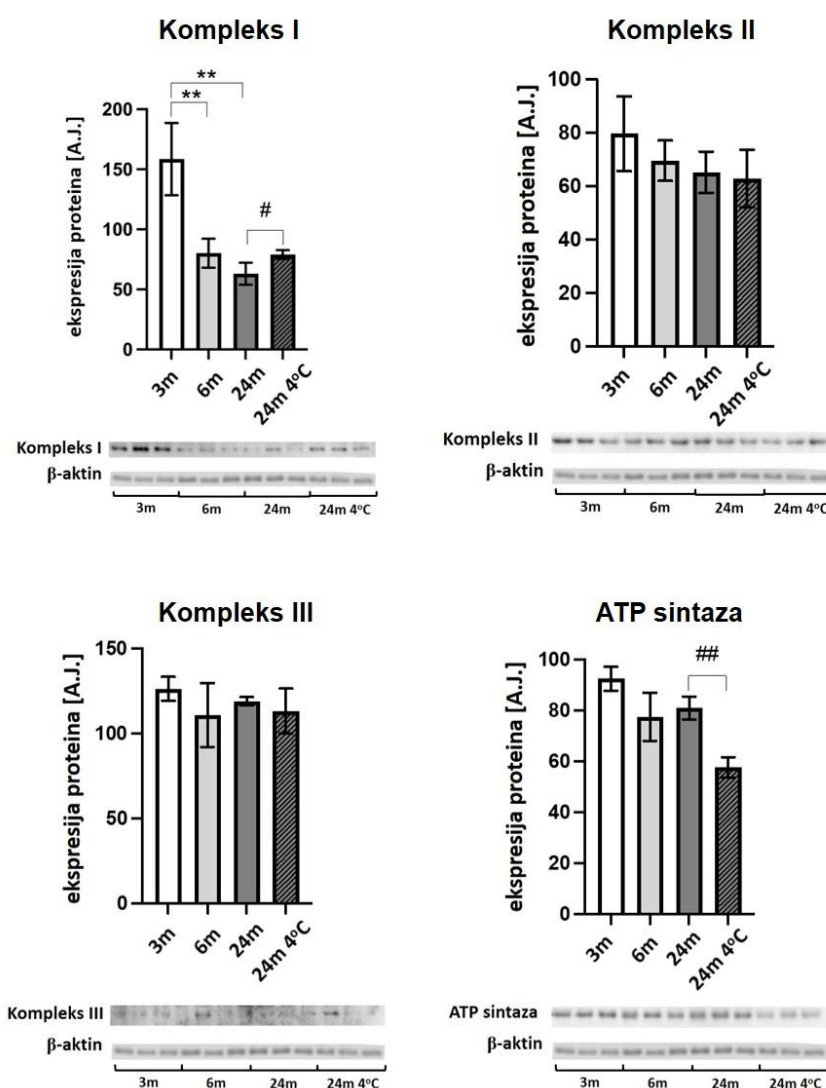
Tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, nije zabeležena značajna promena u proteinskoj ekspresiji pAMPK i Nrf2 u rWAT, kao ni nakon dugotrajnog izlaganja starih pacova niskoj temperaturi. Sa druge strane, ekspresija PGC-1 α pokazuje specifične promene tokom hronološkog starenja i nakon dugotrajnog izlaganja starih pacova hladnoći. Naime, proteinska ekspresija PGC-1 α je snižena kod pacova starosti 24 meseca ($p < 0,05$) i 6 meseci ($p < 0,01$) u poređenju sa tromesečnim pacovima koji su boravili na sobnoj temperaturi, a izrazito povišena ($p < 0,001$) kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi (Sl. 21).



Sl. 21. Proteinska ekspresija pAMPK, PGC-1 α i Nrf2 u **rWAT** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -aktin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D. * Razlike između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). # Razlika između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C i pacova istog uzrasta koji su boravili na 4 ± 1 °C (### $p < 0,001$).

4.4.6. Proteinska ekspresija kompleksa respiratornog lanca i ATP sintaze

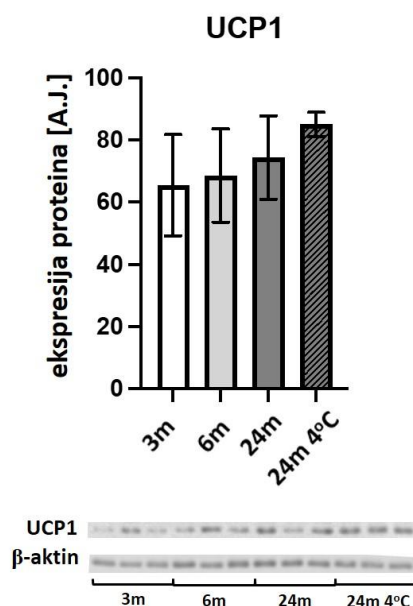
Proteinska ekspresija kompleksa II i kompleksa III nije se značajno menjala tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi u rWAT, kao ni pod uticajem dugotrajnog izlaganja starih pacova hladnoći. Proteinska ekspresija kompleksa I je snižena kod pacova starosti 24 meseca u poređenju sa tromesečnim i šestomesečnim ($p < 0,01$) jedinkama koje su boravile na sobnoj temperaturi. Proteinska ekspresija kompleksa I je povišena ($p < 0,05$), dok je proteinska ekspresija ATP sintaze snižena ($p < 0,01$) kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi (u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi), uz opadajući trend ekspresije tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi (Sl. 22).



Sl. 22. Ekspresija kompleksa I, II i III respiratornog lanca i ATP sintaze u rWAT pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -aktin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D. * Razlike između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C (** $p < 0,01$). # Razlika između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C i pacova istog uzrasta koji su boravili na 4 ± 1 °C ($^{\#}p < 0,05$; $^{\#\#}p < 0,01$).

4.4.7. Proteinska ekspresija UCP1

Proteinska ekspresija UCP1 u rWAT se nije značajno menjala tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, niti su zabeležene značajne promene u ekspresiji ovog proteina kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi, osim progresivno rastućeg trenda između grupa (Sl. 23).

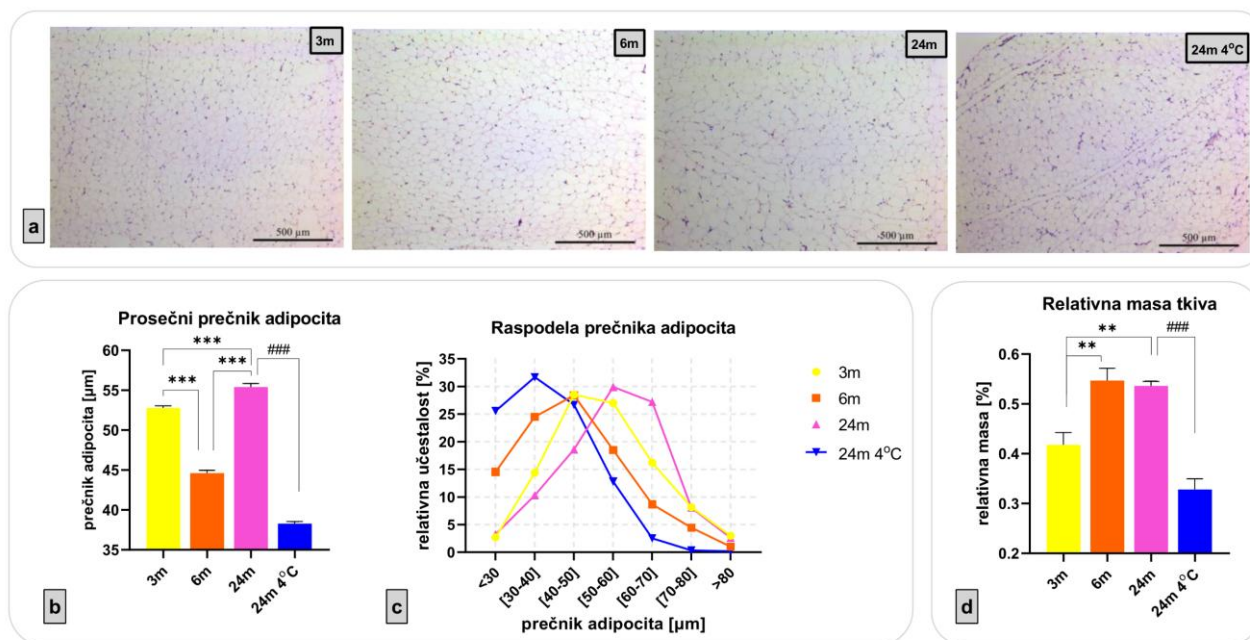


Sl. 23. Proteinska ekspresija dekupljujućeg proteina 1 (UCP1) u **rWAT** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -aktin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D.

4.5. Analiza strukturnog remodeliranja i redoks-metaboličkog reprogramiranja gWAT tokom hronološkog starenja pacova na sobnoj temperaturi i na hladnoći

4.5.1. Morfometrijska analiza

U gWAT, histološka analiza tkiva otkrila je tipične unilokulusne adipocite (Sl. 24a). Relativna masa gWAT povećavala se sa starenjem ($p < 0,01$; Sl. 24d), što je praćeno većim prosečnim prečnikom adipocita ($p < 0,001$; Sl. 24b), kod pacova starosti 24 meseca u odnosu na tromesečne jedinke na sobnoj temperaturi. Nasuprot tome, dugotrajno izlaganje hladnoći kod starih pacova bilo je povezano sa smanjenjem relativne mase depoa ($p < 0,001$) i dijametra adipocita ($p < 0,001$), u odnosu na stare pacove (24m) koji su boravili na sobnoj temperaturi. Ove promene odrazile su se na raspodelu veličine adipocita, gde su pacovi stari 24 meseca pokazali veću učestalost krupnih adipocita, dok je izlaganje hladnoći bilo povezano sa pomeranjem ka većem broju sitnijih ćelija (Sl. 24c).



Sl. 24. Morfometrijska analiza gWAT tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. (a) Reprezentativne mikrofografije preseka gWAT obojenih hematoksilinom. Bar: 500 μ m. (b) Prosečan prečnik adipocita. (c) Raspodela prečnika adipocita po klasama veličine. (d) Relativna masa gWAT. * Razlike između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$); # Razlike između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C i pacova istog uzrasta koji su boravili na 4 ± 1 °C (### $p < 0,001$). Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ SEM.

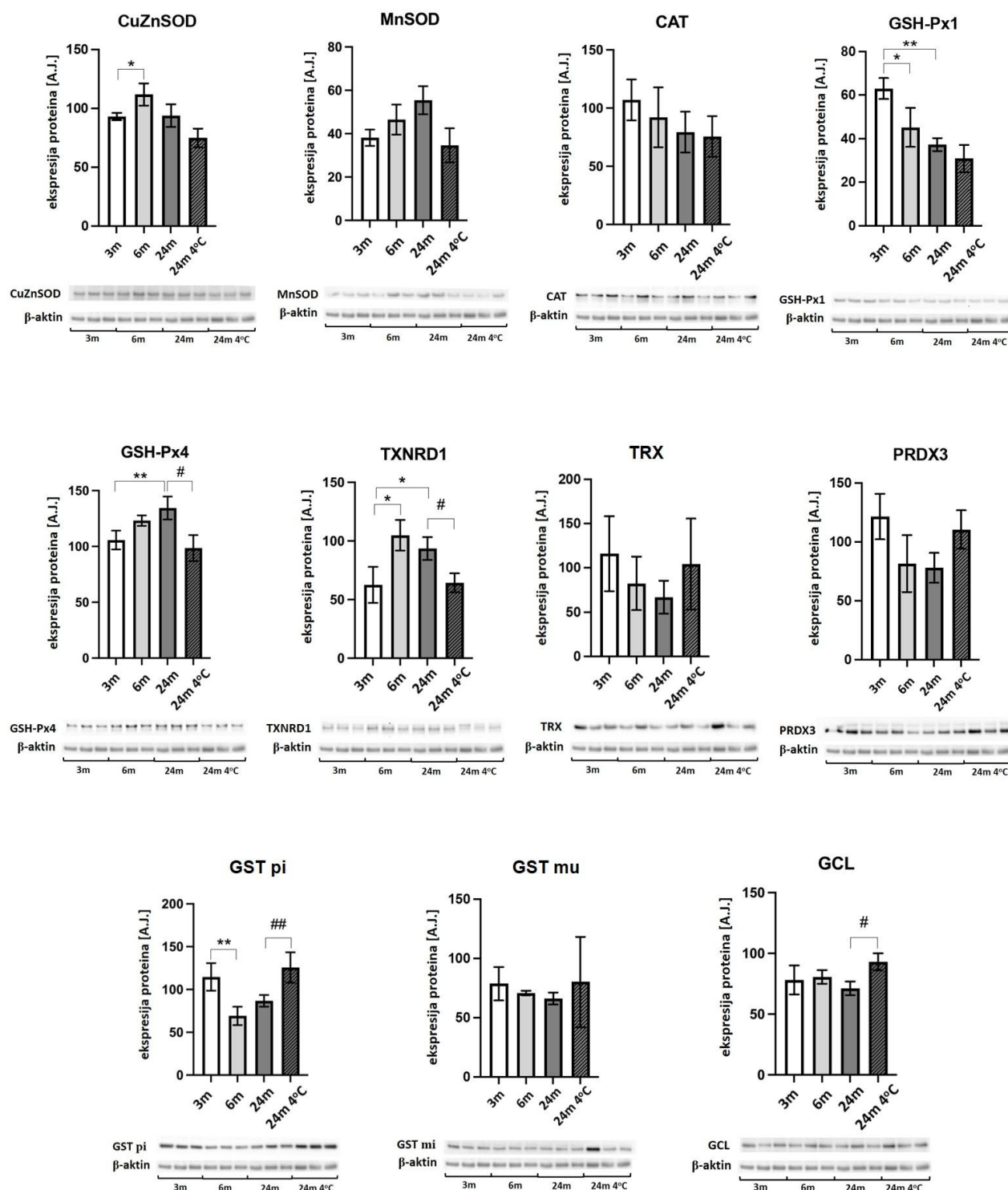
4.5.2. Proteinska ekspresija komponenti antioksidativne odbrane

Analiza proteinske ekspresije komponenti AD u gWAT (prikazana na Sl. 25) obuhvatila je enzime koji vrše dismutaciju $O_2^{\bullet-}$, enzime uključene u uklanjanje peroksida, kao i ostale komponente glutationskog i tioredoksinskog ogranka AD.

Tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, proteinska ekspresija MnSOD nije se značajno menjala. Međutim, proteinska ekspresija CuZnSOD je povišena ($p < 0,05$) kod pacova starosti 6 meseci u poređenju sa tromesečnim pacovima koji su boravili na sobnoj temperaturi. Proteinska ekspresija CuZnSOD i MnSOD nije se značajno menjala kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi.

U pogledu enzima uključenih u uklanjanje peroksida, proteinska ekspresija CAT i PRDX3 nije se značajno menjala tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi. Proteinska ekspresija GSH-Px1 je snižena ($p < 0,01$), dok je proteinska ekspresija GSH-Px4 povišena ($p < 0,01$) kod pacova starosti 24 meseca u poređenju sa tromesečnim pacovima koji su boravili na sobnoj temperaturi. Proteinska ekspresija GSH-Px4 je snižena ($p < 0,05$) kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi, dok se ekspresije CAT, GSH-Px1 i PRDX3 nisu značajno menjale pod uticajem hladnoće.

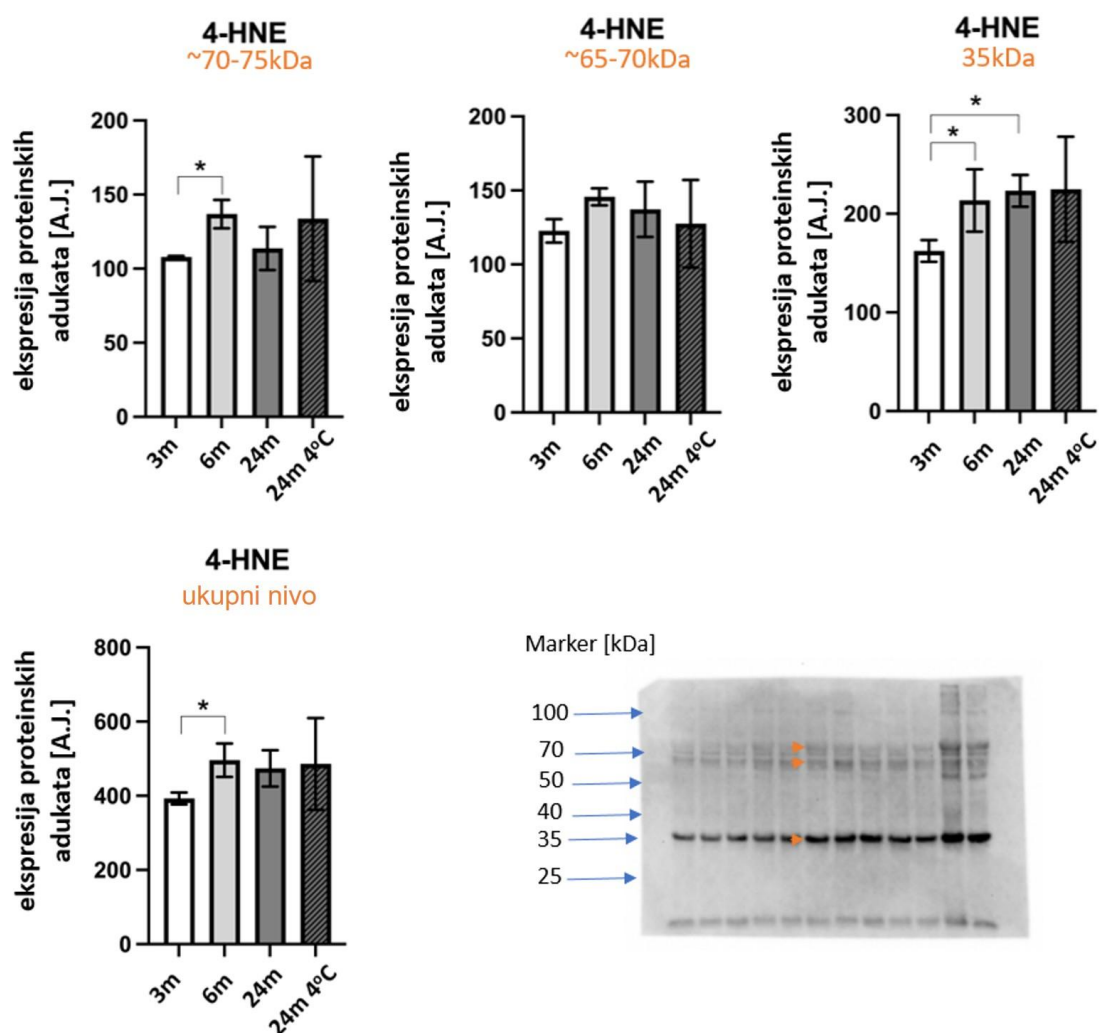
Kada je reč o ostalim komponentama glutationskog i tioredoksinskog sistema, proteinska ekspresija TRX, GST mu i GCL nije se značajno menjala tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi. Proteinska ekspresija GST pi je snižena ($p < 0,01$) kod pacova starosti 6 meseci, dok je proteinska ekspresija TR povišena ($p < 0,05$) kod pacova starosti 24 meseca u poređenju sa tromesečnim i šestomesečnim jedinkama na sobnoj temperaturi. Proteinska ekspresija GCL ($p < 0,05$) i GST pi ($p < 0,01$) je povišena, dok je proteinska ekspresija TR ($p < 0,05$) snižena kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi. Proteinska ekspresija TRX i GST mu se nije značajno menjala pod uticajem hladnoće.



Sl. 25. Ekspresija proteina komponenti AD u gWAT pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -aktin kao konstitutivno ekspimirani protein. Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D. * Razlike između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca koji su boravili na $22 \pm 1^\circ\text{C}$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). # Razlike između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na $22 \pm 1^\circ\text{C}$ i pacova istog uzrasta koji su boravili na $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$; ## $p < 0,01$).

4.5.3. Nivo proteinskih adukata sa 4-HNE

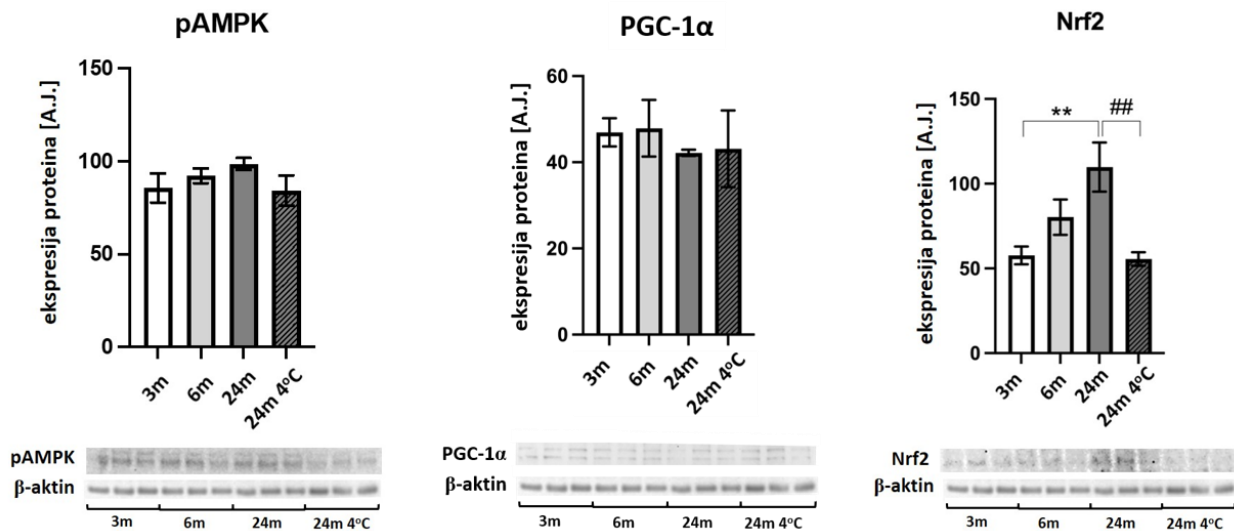
Analiza nivoa proteina koji su modifikovani posredstvom 4-HNE obuhvatila je detekciju i kvantifikaciju adukata različitih molekulskih masa u gWAT. Tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, nivo 4-HNE modifikovanih proteina molekulskih masa od 65 do 70 kDa nije se značajno menjao. Nivo adukata molekulske mase 35 kDa je povišen kod pacova starosti 6 meseci i 24 meseca ($p < 0,05$) u poređenju sa tromesečnim jedinkama koje su boravile na sobnoj temperaturi, dok je nivo adukata molekulske mase oko 70-75kDa, kao i ukupan nivo adukata (svih kvantifikovanih traka), viši kod šestomesečnih pacova u odnosu na mlade ($p < 0,05$). Nasuprot tome, nivo proteinskih adukata sa 4-HNE nije se značajno menjao kod starih pacova dugotrajno izlaganih hladnoći u odnosu na životinje iste starosti (24 meseca) koje su boravile na sobnoj temperaturi (Sl. 26).



Sl. 26. Ekspresija adukata proteina sa 4-HNE u gWAT pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -actin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D. * Razlike između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C (* $p < 0,05$).

4.5.4. Proteinska ekspresija pAMPK, PGC-1 α i Nrf2

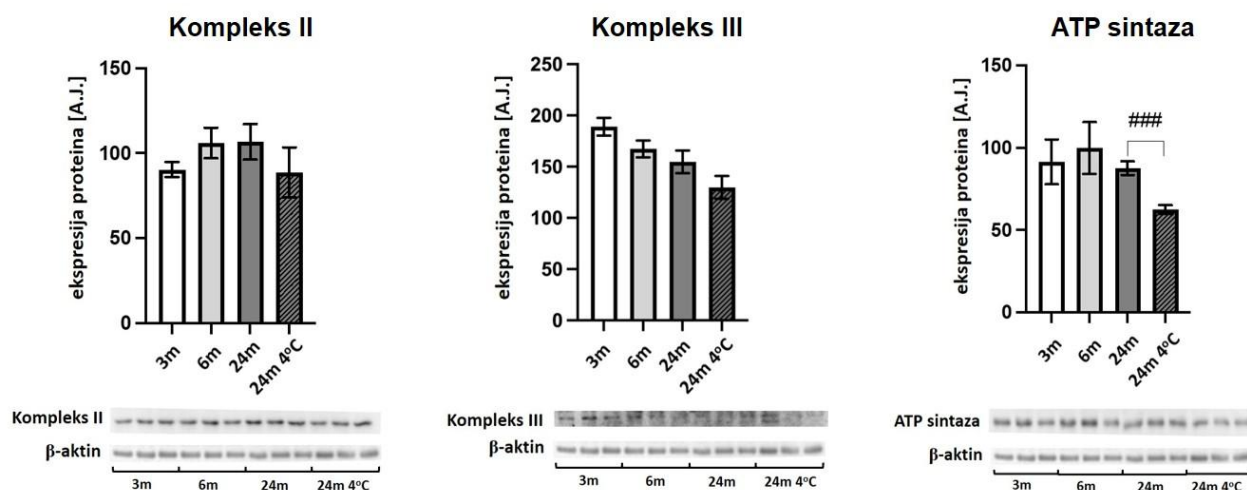
Tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, nije zabeležena značajna promena u proteinskoj ekspresiji pAMPK i PGC-1 α u gWAT, kao ni nakon dugotrajnog izlaganja starih pacova niskoj temperaturi. Sa druge strane, ekspresija Nrf2 pokazuje specifične promene tokom hronološkog starenja i nakon dugotrajnog izlaganja starih pacova hladnoći. Naime, proteinska ekspresija Nrf2 je povišena kod pacova starosti 24 meseca ($p < 0,01$) u poređenju sa tromesečnim pacovima koji su boravili na sobnoj temperaturi, a snižena ($p < 0,01$) kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi, vraćajući se na nivo ekspresije zabeležen u grupi tromesečnih pacova (Sl. 27).



Sl. 27. Proteinska ekspresija pAMPK, PGC-1 α i Nrf2 u gWAT pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -aktin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D. * Razlika između pacova starosti 3 i 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C (** $p < 0,01$). # Razlika između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C i pacova istog uzrasta koji su boravili na 4 ± 1 °C (## $p < 0,01$).

4.5.5. Proteinska ekspresija kompleksa respiratornog lanca i ATP sintaze

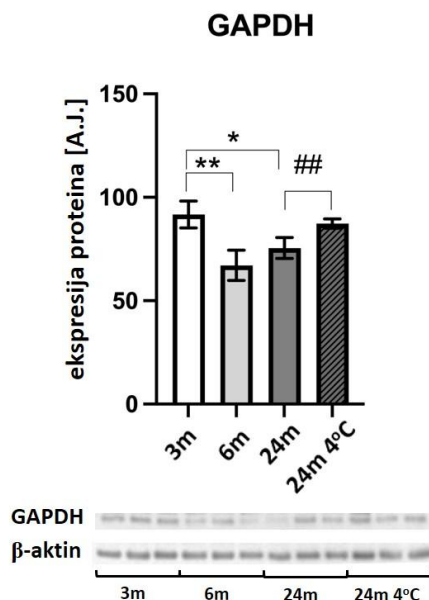
Proteinska ekspresija kompleksa II, kompleksa III i ATP sintaze nije se značajno menjala tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi u gWAT. Iako se proteinska ekspresija ispitanih kompleksa respiratornog lanca nije značajno menjala ni pod uticajem hladnoće, uz trendove smanjenja, proteinska ekspresija ATP sintaze je značajno snižena ($p < 0,001$) kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi (Sl. 28).



Sl. 28. Proteinska ekspresija kompleksa respiratornog lanca (II i III) i ATP sintaze u gWAT pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -aktin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D. # Razlika između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C i pacova istog uzrasta koji su boravili na 4 ± 1 °C (### $p < 0,001$).

4.5.6. Proteinska ekspresija glikolitičkog enzima GAPDH

Proteinska ekspresija GAPDH u gWAT je snižena kod pacova starosti 6 ($p < 0,01$) i 24 meseca ($p < 0,05$) u odnosu na tromesečne jedinke. Nasuprot tome, kod starih pacova dugotrajno izlaganih niskoj temperaturi proteinska ekspresija GAPDH je povišena u odnosu na grupu pacova iste starosti koja je boravila na sobnoj temperaturi ($p < 0,01$) (Sl. 29).

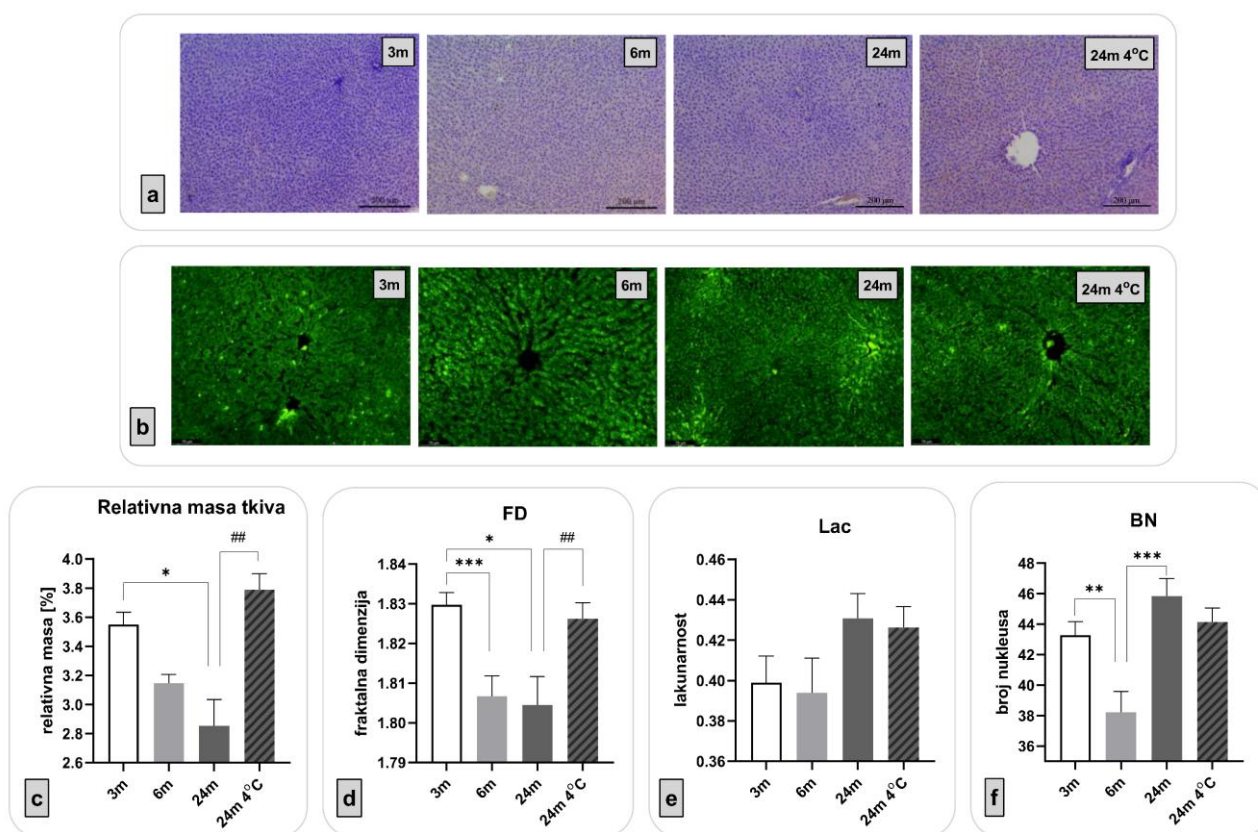


Sl. 29. Proteinska ekspresija gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH) u **gWAT** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -aktin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na grafikonu su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D. * Razlike između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$). # Razlika između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C i pacova istog uzrasta koji su boravili na 4 ± 1 °C ($##p < 0,01$).

4.6. Analiza strukturnog remodeliranja i redoks-metaboličkog reprogramiranja jetre tokom hronološkog starenja pacova na sobnoj temperaturi i na hladnoći

4.6.1. Fraktalna i morfometrijska analiza

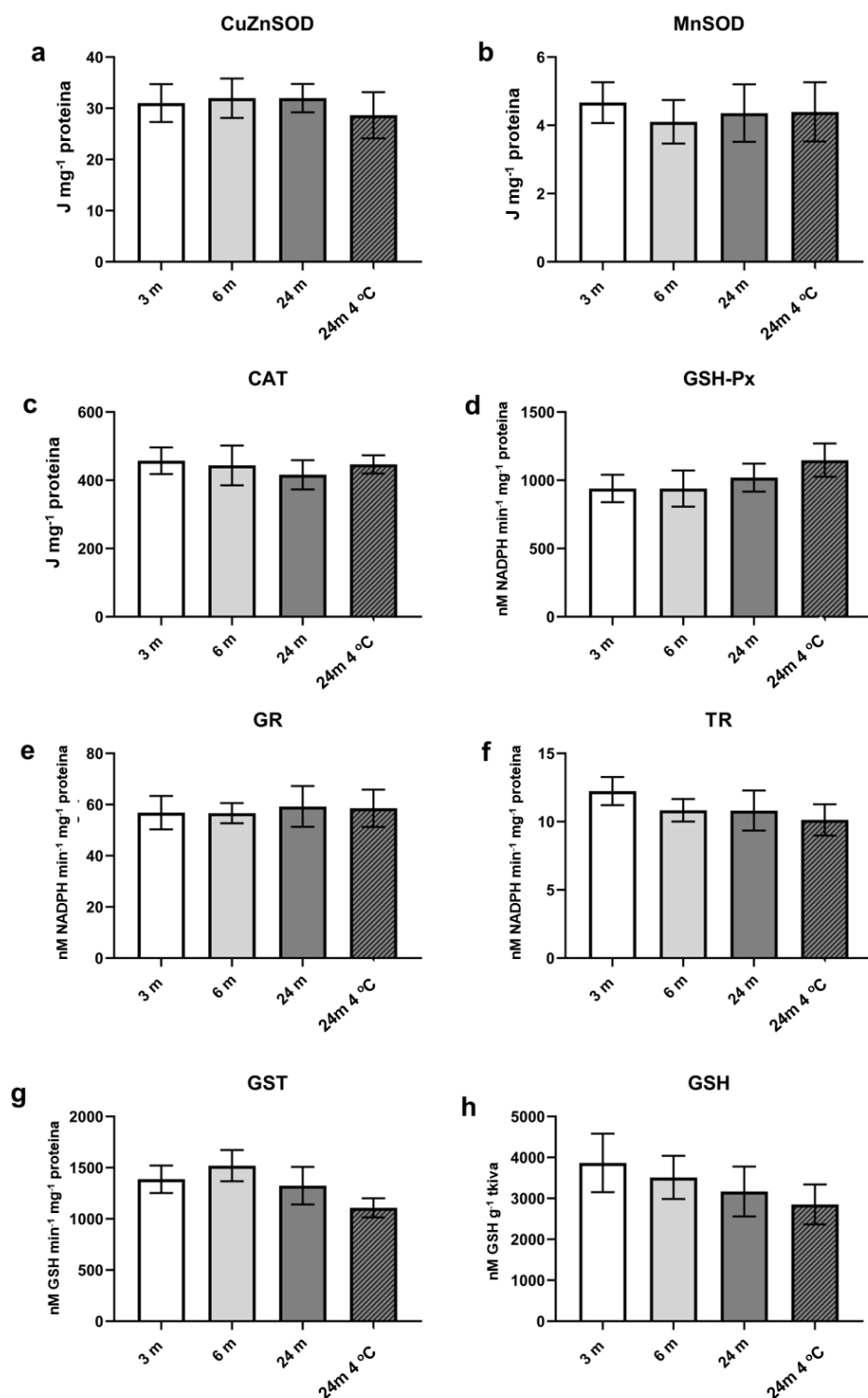
Mikrografije histoloških preseka jetre nisu pokazale očigledne promene između grupa (Sl. 30a). Autofluorescentne mikrografije otkrile su slabo primetne nizove hepatocita ispresecane tamnim, praznim prostorima koji odgovaraju sinusoidama (Sl. 30b). Jetra starih pacova pokazala je smanjenu relativnu masu ($p < 0,05$; Sl. 30c) i FD ($p < 0,05$; Sl. 30d) u poređenju sa grupom od 3 meseca. Međutim, dugotrajno izlaganje hladnoći kod starih pacova bilo je povezano sa suprotnim profilom istih parametara, odnosno povećanjem relativne mase i FD ($p < 0,01$) u odnosu na grupu iste starosti na sobnoj temperaturi. Lac se nije značajno menjala ni u jednoj od poređenih grupa (Sl. 30e). BN je bio smanjen kod zrelih adulta u poređenju sa mladim pacovima ($p < 0,01$), dok je kod starih pacova uočen porast BN u odnosu na zrele ($p < 0,001$; Sl. 30f).



Sl. 30. Fraktalna i morfometrijska analiza **jetre** tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. (a) Reprezentativne mikrografije preseka jetre obojenih hematoksilinom. Bar: 200 μm. (b) Reprezentativne mikrografije autofluorescencije hepatičnog tkiva. Bar: 75 μm. (c) Relativna masa tkiva. (d) Fraktalna dimenzija (FD). (e) Lakunarnost (Lac). (f) Broj nukleusa (BN). * Razlike između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$); # Razlike između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na 4 ± 1 °C i pacova istog uzrasta koji su boravili na 22 ± 1 °C (** $p < 0,01$). Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti ± SEM.

4.6.2. Aktivnosti enzima antioksidativne odbrane i količina glutationa

U jetri, svi mereni parametri AD (aktivnosti CuZnSOD, MnSOD, CAT, GSH-Px, GR, TR, GST i ukupan sadržaj GSH) nisu se značajno menjali između oglednih grupa, pokazujući stabilnost tokom hronološkog starenja i nakon dugotrajnog izlaganja hladnoći (Sl. 31).



Sl. 31. Aktivnosti enzima AD i ukupan GSH u **jetri** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. (a) CuZnSOD; (b) MnSOD; (c) CAT; (d) GSH-Px; (e) GR; (f) TR; (g) GST; (h) ukupan GSH. Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ SD.

4.6.3. Proteinska ekspresija komponenti antioksidativne odbrane

Analiza proteinske ekspresije komponenti AD u jetri (prikazana na Sl. 32) obuhvatila je enzime koji vrše dismutaciju $O_2^{\bullet-}$, enzime uključene u uklanjanje peroksida, kao i ostale komponente glutationskog i tioredoksinskog ogranka AD.

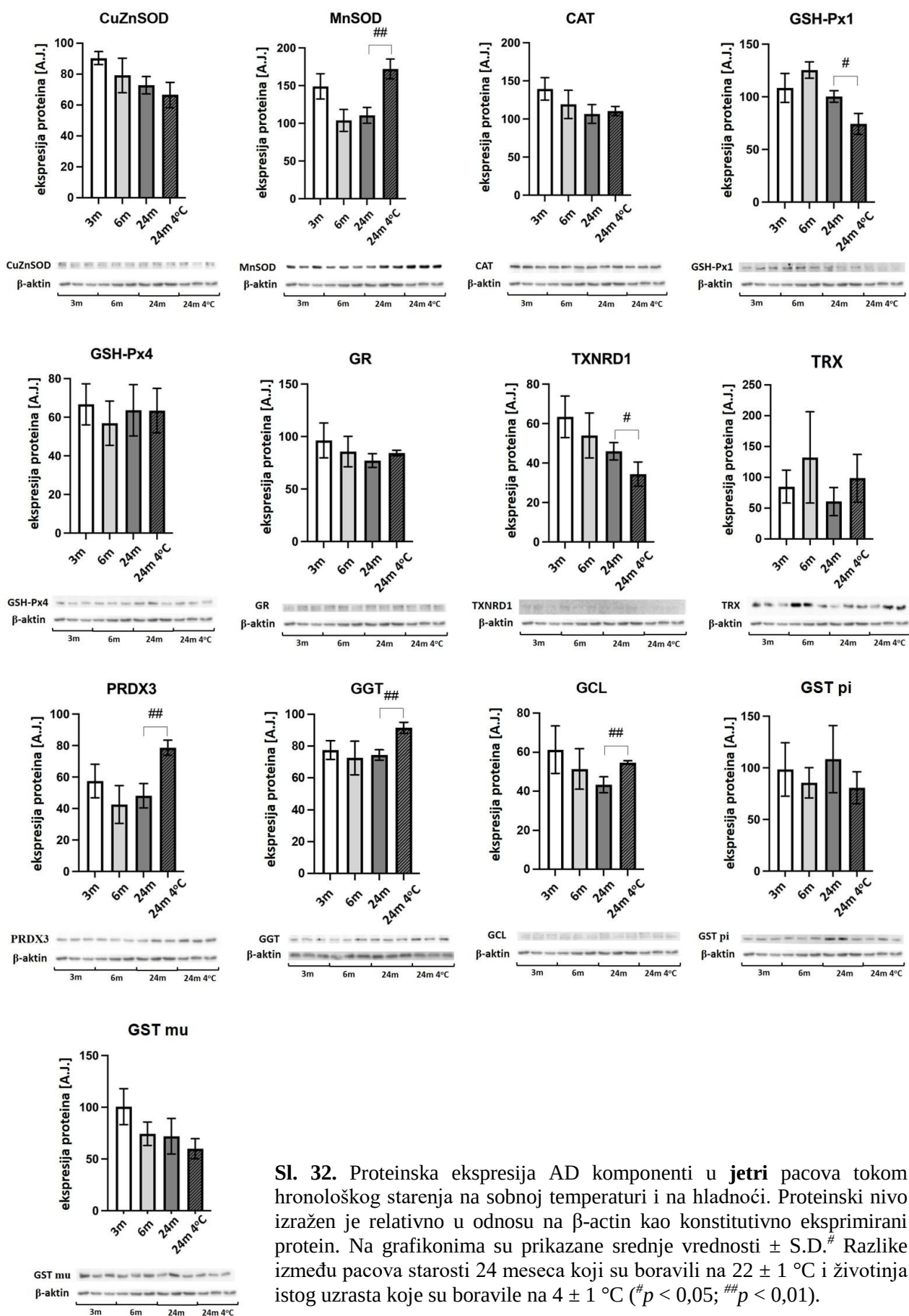
Tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, proteinska ekspresija svih ispitanih komponenti AD (CuZnSOD, MnSOD, CAT, GSH-Px1, GSH-Px4, GR, TR, TRX, PRDX3, GGT, GCL, GST pi i GST mu) nije se značajno menjala između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca.

Kada je reč o efektima hladnoće, proteinska ekspresija mitohondrijskih enzima MnSOD i PRDX3 je povišena ($p < 0,01$), što je praćeno istosmernom promenom ekspresije enzima uključenih u metabolizam glutationa, GGT i GCL ($p < 0,01$), kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi. Sa druge strane, ekspresija citoplazmatskih enzima GSH-Px1 i TR je snižena ($p < 0,05$) kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa životinjama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi. Proteinska ekspresija CuZnSOD, CAT, GSH-Px4, GR, TRX, GST pi i GST mu nije se značajno menjala ni pod uticajem hladnoće.

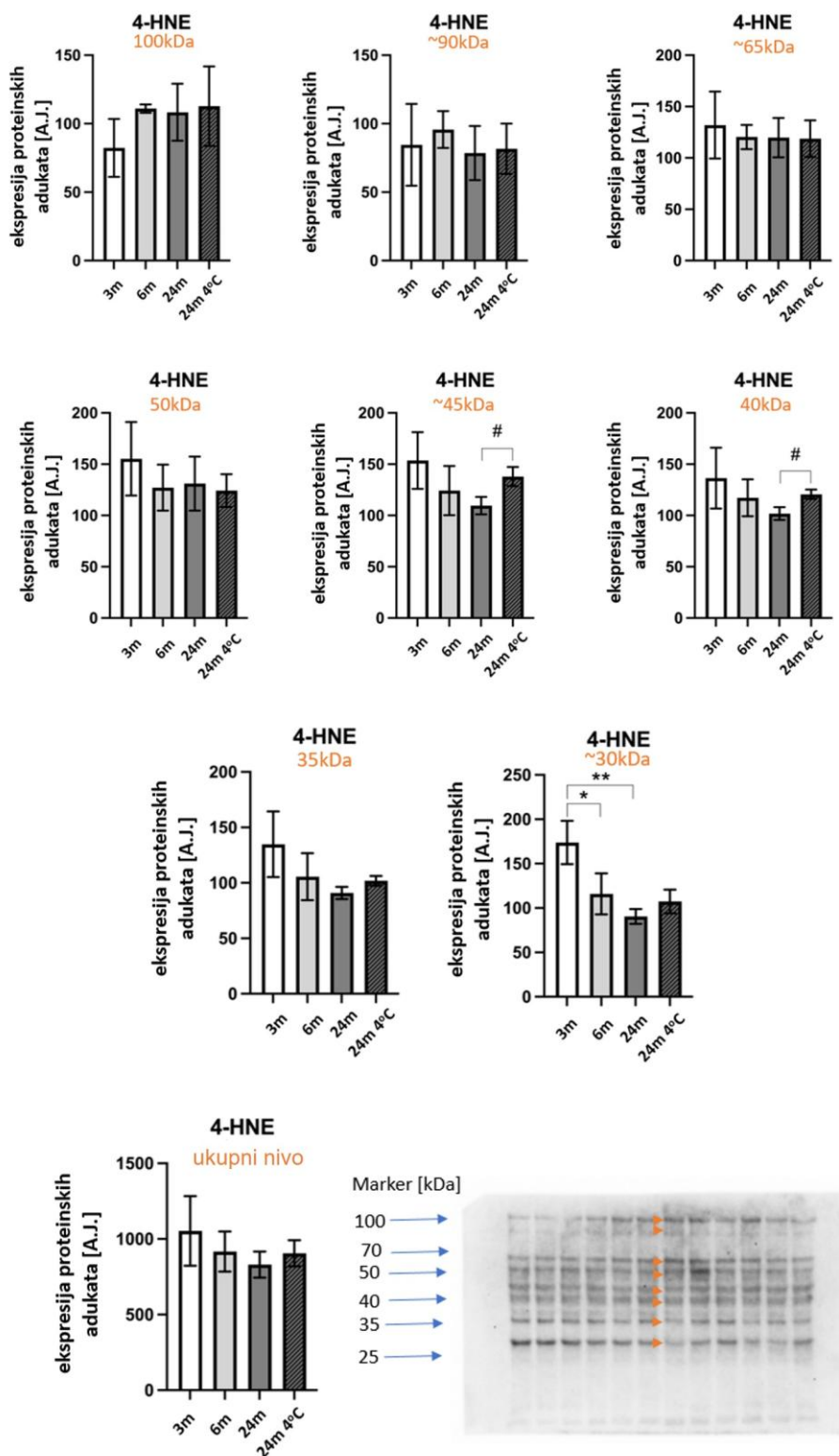
4.6.4. Nivo proteinskih adukata sa 4-HNE

Analiza nivoa proteina koji su modifikovani posredstvom 4-HNE obuhvatila je detekciju i kvantifikaciju adukata različitih molekulskih masa u jetri (Sl. 33). Tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, nivo 4-HNE modifikovanih proteina molekulskih masa između 35 i 100 kDa, kao i ukupnih adukata (sve trake), nije se značajno menjao. Međutim, analiza nivoa ekspresije adukata proteina oko 30 kDa sa 4-HNE pokazuje pad tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, kod pacova starosti 6 i 24 meseca u odnosu na mlade jedinke ($p < 0,05$ i $p < 0,01$, respektivno).

Nasuprot tome, nivo 4-HNE modifikovanih proteina molekulskih masa oko 45 kDa i 40 kDa je povišen ($p < 0,05$) kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi. Nivo ostalih adukata, kao i ukupnih adukata, nije se značajno menjao pod uticajem hladnoće (Sl. 33).



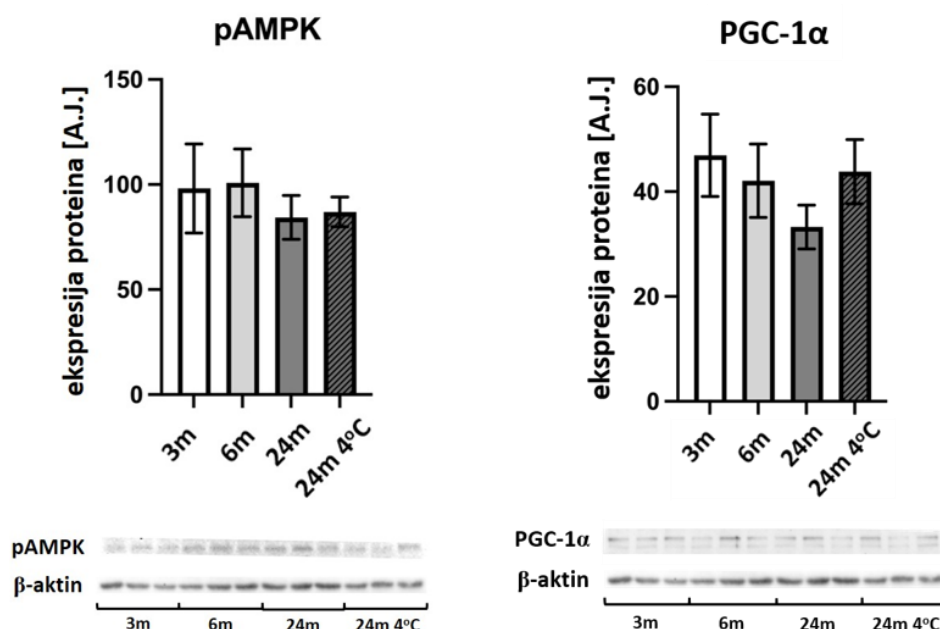
Sl. 32. Proteinska ekspresija AD komponenti u **jetri** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -aktin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D.[#] Razlike između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na $22 \pm 1^\circ\text{C}$ i životinja istog uzrasta koje su boravile na $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ([#] $p < 0,05$; ^{##} $p < 0,01$).



SI. 33. Ekspresija adukata proteina sa 4-HNE u **jetri** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -actin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D.* Razlike između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca koji su boravili na $22 \pm 1^\circ\text{C}$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). # Razlike između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na $22 \pm 1^\circ\text{C}$ i životinja istog uzrasta koje su boravile na $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$).

4.6.5. Proteinska ekspresija pAMPK i PGC-1 α

Tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, proteinska ekspresija pAMPK i PGC-1 α nije se značajno menjala u jetri. Takođe, proteinska ekspresija pAMPK i PGC-1 α nije se značajno menjala kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi (Sl. 34).

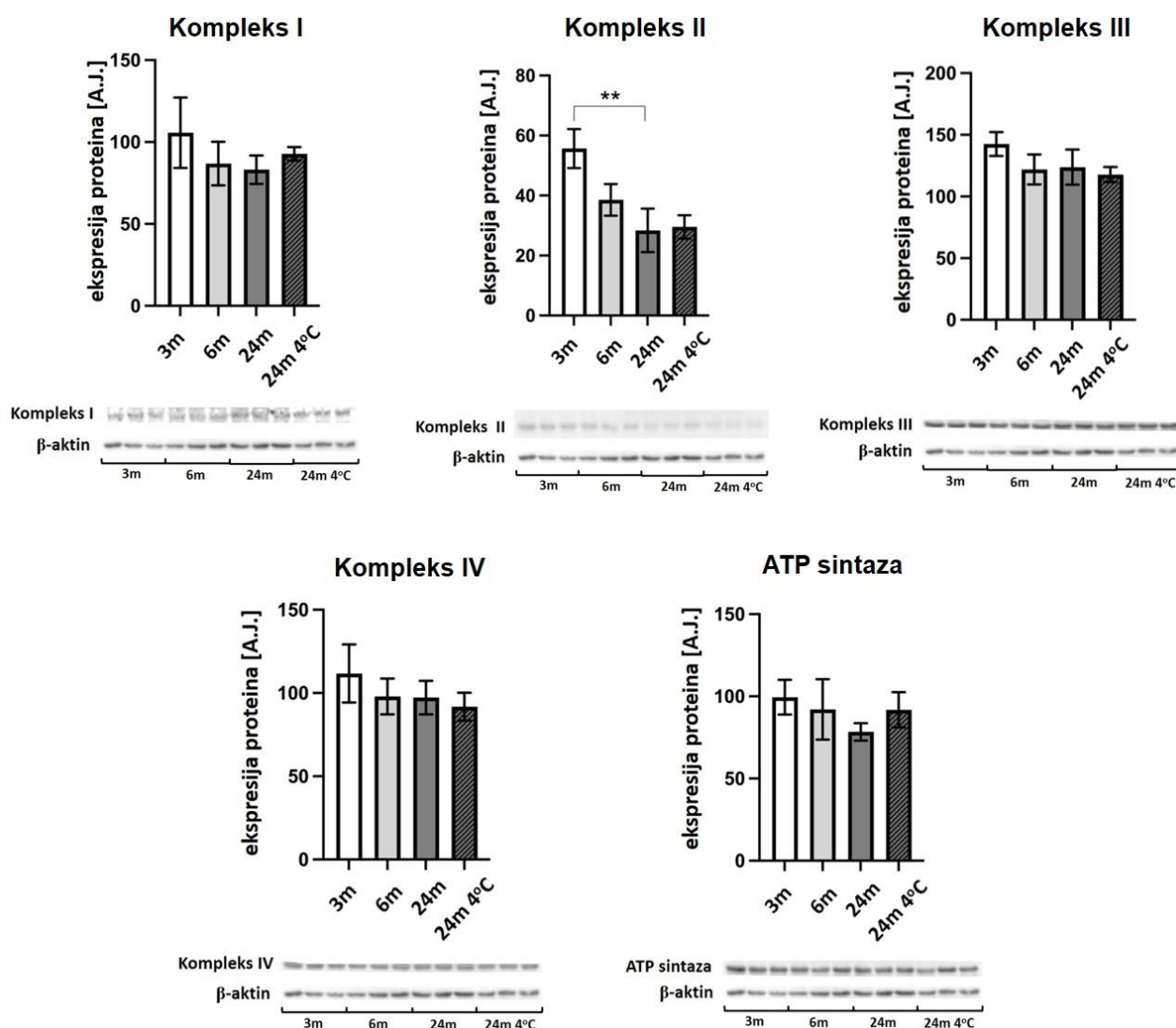


Sl. 34. Proteinska ekspresija pAMPK i PGC-1 α u **jetri** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -aktin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D.

4.6.6. Proteinska ekspresija kompleksa respiratornog lanca i ATP sintaze

Tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, proteinska ekspresija kompleksa I, kompleksa III, kompleksa IV i ATP sintaze nije se značajno menjala. Proteinska ekspresija kompleksa II je snižena ($p < 0,01$) kod pacova starosti 24 meseca u poređenju sa tromesečnim pacovima koji su boravili na sobnoj temperaturi.

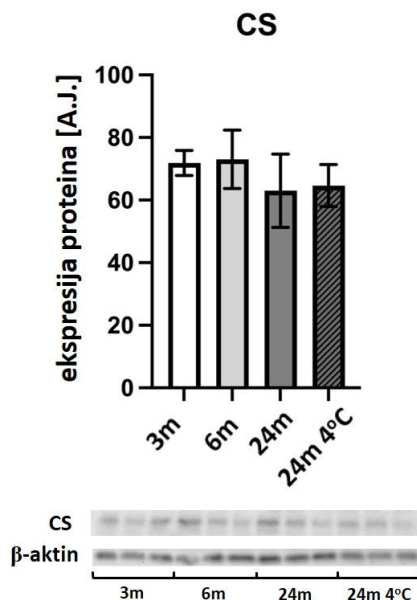
Proteinska ekspresija kompleksa respiratornog lanca (I-IV) i ATP sintaze nije se značajno menjala kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi (Sl. 35).



Sl. 35. Ekspresija kompleksa respiratornog lanca (I-IV) i ATP sintaze u **jetri** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -aktin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D. * Razlika između pacova starosti 3 i 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C (** $p < 0,01$).

4.6.7. Proteinska ekspresija citrat sintaze

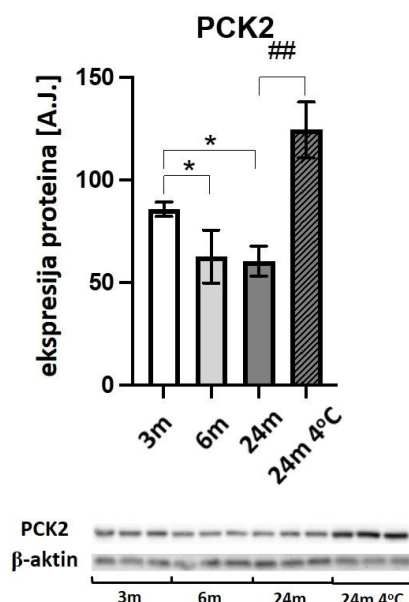
Proteinska ekspresija citrat sintaze (CS) u jetri se nije značajno menjala tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, niti su zabeležene značajne promene u ekspresiji ovog proteina kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi (Sl. 36).



Sl. 36. Proteinska ekspresija citrat sintaze (CS) u **jetri** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -aktin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na grafikonu su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D.

4.6.8. Proteinska ekspresija PCK2, mitohondrijskog enzima glukoneogeneze

Proteinska ekspresija PCK2 je snižena kod pacova starosti 6 meseci i 24 meseca ($p < 0,05$) u poređenju sa tromesečnim jedinkama koje su boravile na sobnoj temperaturi. Nasuprot tome, proteinska ekspresija PCK2 je povišena ($p < 0,01$) kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi (Sl. 37).

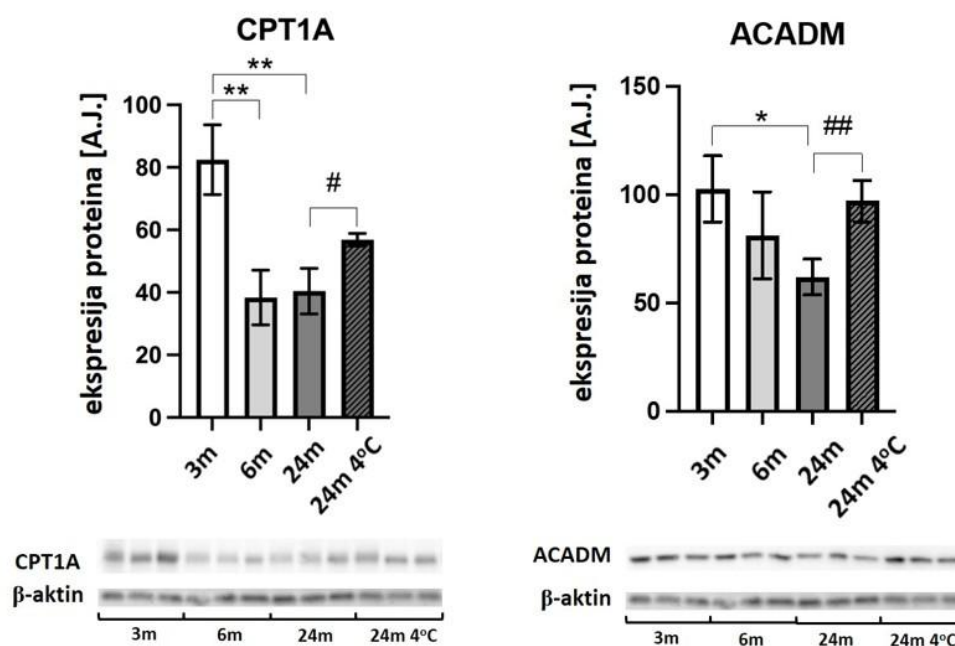


Sl. 37. Proteinska ekspresija fosfoenolpiruvat karboksikinaze 2 (PCK2) u **jetri** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -aktin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na grafikonu su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D. * Razlike između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C (* $p < 0,05$). # Razlika između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C i pacova istog uzrasta koji su boravili na 4 ± 1 °C (## $p < 0,01$).

4.6.9. Ekspresija mitohondrijskih proteina uključenih u transport i β -oksidaciju masnih kiselina

Proteinska ekspresija CPT1A je snižena kod pacova starosti 6 meseci i 24 meseca ($p < 0,01$), dok je proteinska ekspresija ACADM snižena kod pacova starosti 24 meseca ($p < 0,05$) u poređenju sa tromesečnim pacovima koji su boravili na sobnoj temperaturi (Sl. 38).

Kada je reč o uticaju hladnoće, proteinska ekspresija CPT1A ($p < 0,05$) i ACADM ($p < 0,01$) je povišena kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi (Sl. 38).

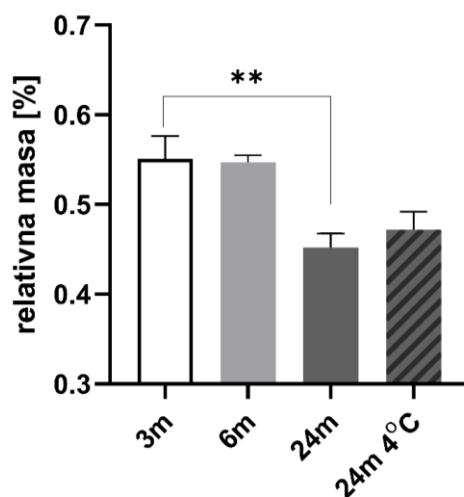


Sl. 38. Proteinska ekspresija karnitin palmitoiltransferaze 1A (CPT1A) i acil-CoA dehidrogenaze (ACADM) u **jetri** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -aktin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D. * Razlike između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). # Razlike između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C i pacova istog uzrasta koji su boravili na 4 ± 1 °C (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$).

4.7. Analiza redoks-metaboličkog reprogramiranja skeletnog mišića tokom hronološkog starenja pacova na sobnoj temperaturi i na hladnoći

4.7.1. Relativna masa

Relativna masa skeletnog mišića je snižena kod pacova starih 24 meseca u poređenju sa tromesečnim pacovima ($p < 0,01$). Dugotrajno izlaganje starih pacova hladnoći nije bilo povezano sa značajnim promenama u relativnoj masi mišića u odnosu na pacove iste starosti (24 meseca) koji su boravili na sobnoj temperaturi (Sl. 39).



Sl. 39. Relativna masa **skeletnog mišića** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. * Razlika između pacova starosti 3 i 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C (** $p < 0,01$). Na grafikonu su prikazane srednje vrednosti $\pm$ SEM.

4.7.2. Aktivnosti enzima antioksidativne odbrane i količina glutationa

U skeletnom mišiću, hronološko starenje bilo je povezano sa povećanjem aktivnosti GST u poređenju sa grupama starim 3 ($p < 0,001$) i 6 meseci ($p < 0,01$). Nisu zabeležene značajne razlike u aktivnostima ostalih enzima AD (SOD, GSH-Px, GR, TR) između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca na sobnoj temperaturi. Dugotrajno izlaganje hladnoći kod starih pacova povezano je sa povećanjem aktivnosti GSH-Px ($p < 0,01$), GR ($p < 0,05$), GST ($p < 0,001$) i TR ($p < 0,01$) u poređenju sa pacovima iste starosti koji su boravili na sobnoj temperaturi. Aktivnosti izoformi SOD i količina GSH nisu se značajno menjali između grupa (Sl. 40). Aktivnost CAT u mišiću nije bila merljiva.

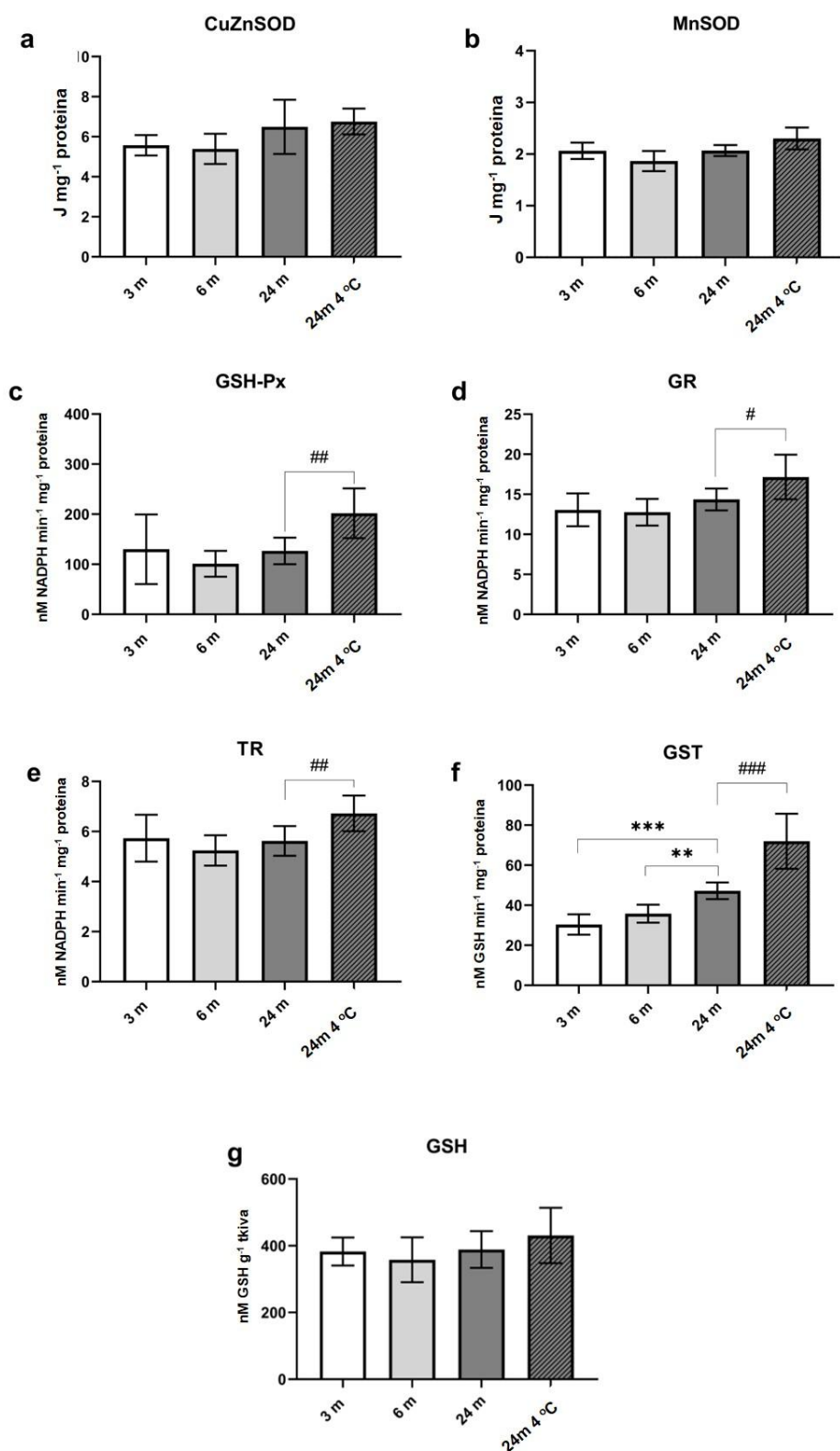
4.7.3. Proteinska ekspresija komponenti antioksidativne odbrane

Analiza proteinske ekspresije komponenti AD u skeletnom mišiću (prikazana na Sl. 41) obuhvatila je enzime koji vrše dismutaciju $O_2^{\cdot-}$, enzime uključene u uklanjanje peroksida, kao i ostale komponente glutationskog i tioredoksinskog ogranka AD.

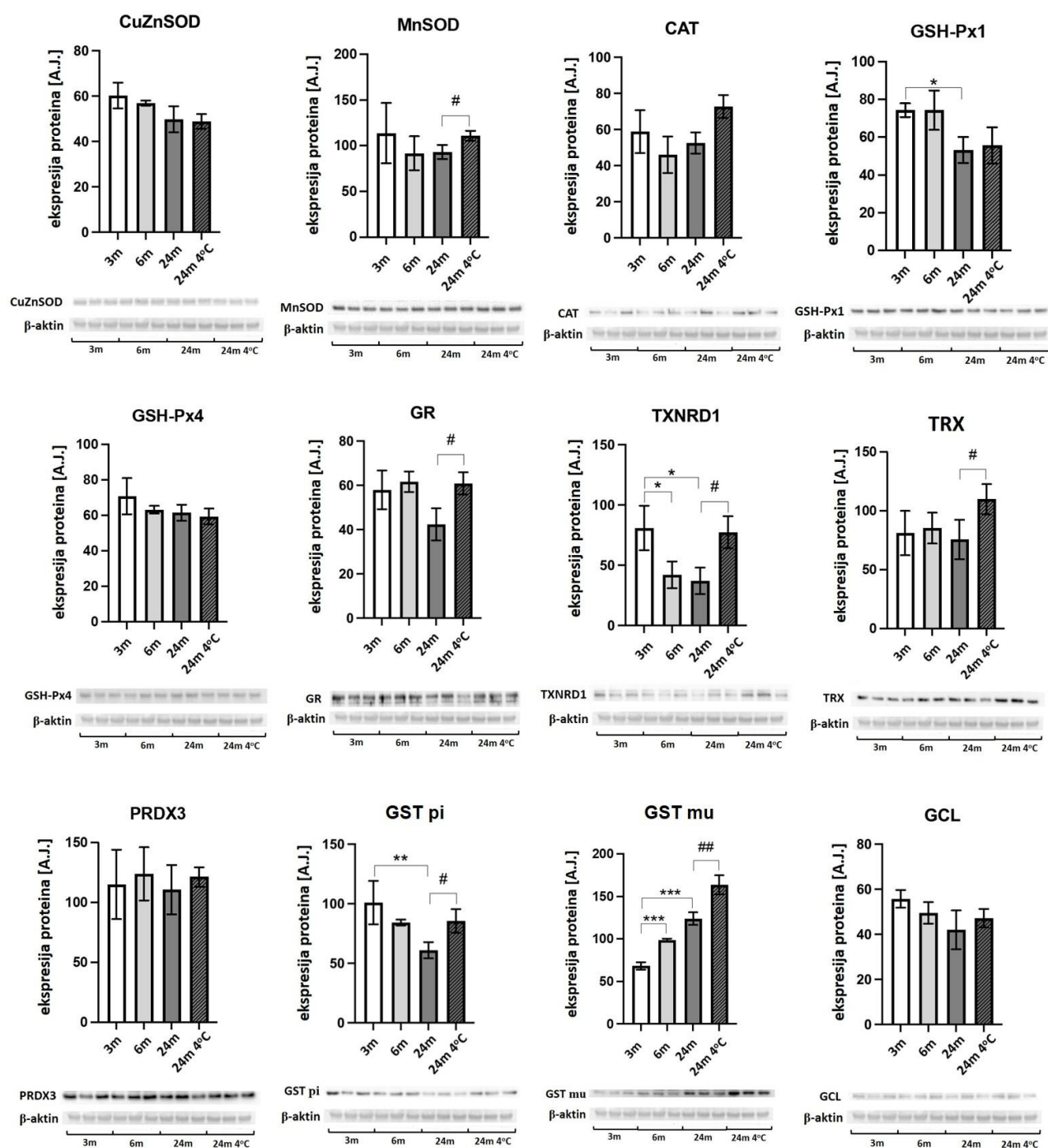
Tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, proteinska ekspresija CuZnSOD i MnSOD nije se značajno menjala između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca. Proteinska ekspresija MnSOD ($p < 0,05$) je povišena kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi, dok se ekspresija CuZnSOD nije značajno menjala pod uticajem hladnoće.

U kontekstu enzima uključenih u uklanjanje peroksida, proteinska ekspresija CAT, GSH-Px4 i PRDX3 nije se značajno menjala tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi. Proteinska ekspresija GSH-Px1 je snižena ($p < 0,05$) kod pacova starosti 24 meseca u poređenju sa tromesečnim pacovima koji su boravili na sobnoj temperaturi. Proteinska ekspresija CAT, GSH-Px1, GSH-Px4 i PRDX3 nije se značajno menjala kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi.

Kada je reč o ostalim komponentama glutationskog i tioredoksinskog sistema, proteinska ekspresija GR, TRX i GCL nije se značajno menjala tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi. Proteinska ekspresija TR ($p < 0,05$) i GST pi ($p < 0,01$) je snižena, dok je proteinska ekspresija GST mu ($p < 0,001$) povišena kod pacova starosti 24 meseca u poređenju sa tromesečnim jedinkama na sobnoj temperaturi. Proteinske ekspresije GR, TR i TRX ($p < 0,05$), kao i izoformi GST, pi ($p < 0,05$) i mu ($p < 0,01$), povišene su kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi. Proteinska ekspresija GCL se nije značajno menjala ni pod uticajem hladnoće.



Sl. 40. Aktivnosti enzima AD i ukupan GSH **skeletnog mišića** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. (a) CuZnSOD; (b) MnSOD; (c) GSH-Px; (d) GR; (e) TR; (f) GST; (g) ukupan GSH. * Razlike između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca na 22 ± 1 °C (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). # Razlike između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C i pacova istog uzrasta koji su boravili na 4 ± 1 °C (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$). Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ SD.

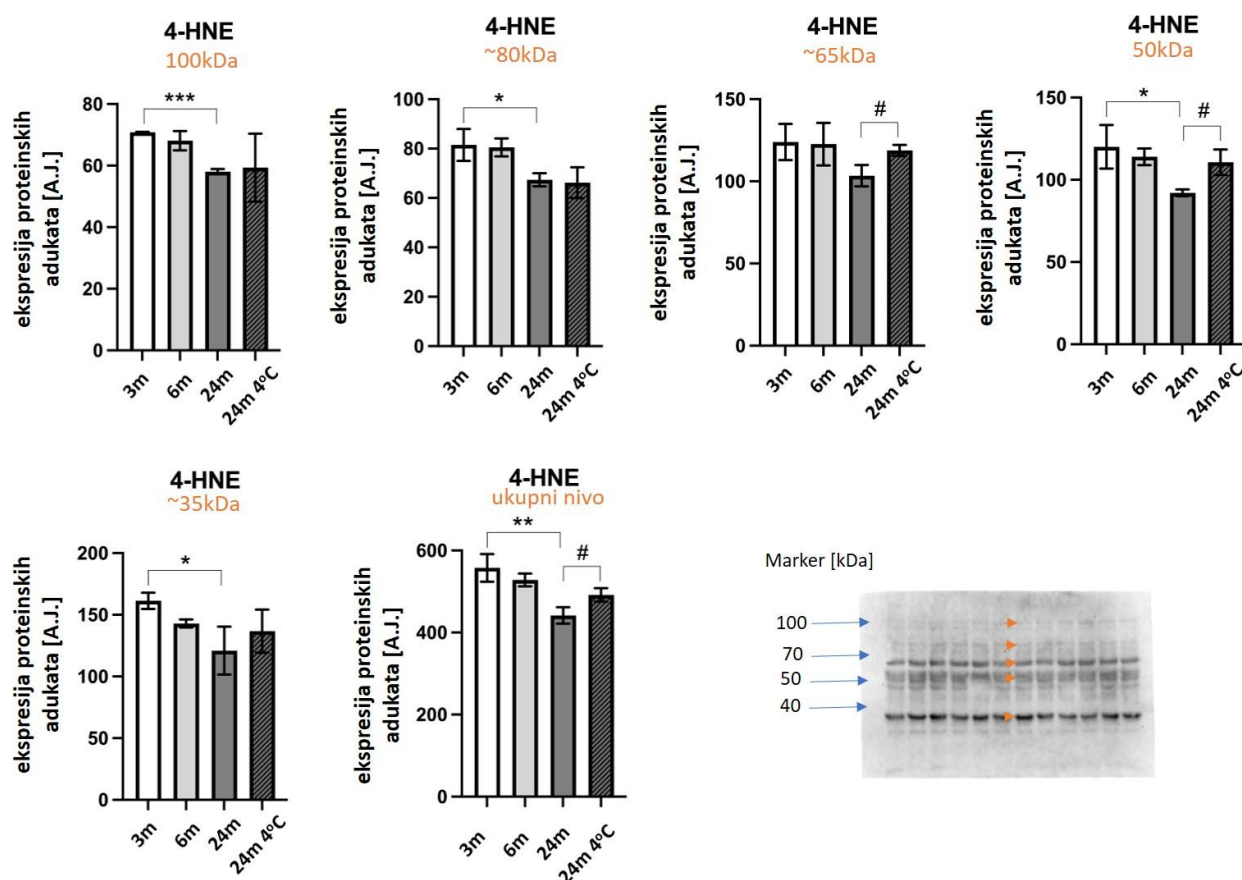


Sl. 41. Ekspresija proteina AD komponenti u **skeletnom mišiću** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -aktin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D. * Razlike između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca koji su boravili na $22 \pm 1^\circ\text{C}$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). # Razlike između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na $22 \pm 1^\circ\text{C}$ i pacova istog uzrasta koji su boravili na $4 \pm 1^\circ\text{C}$ (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$).

4.7.4. Nivo proteinskih adukata sa 4-HNE

Analiza nivoa proteina koji su modifikovani posredstvom 4-HNE obuhvatila je detekciju i kvantifikaciju adukata različitih molekulskih masa u skeletnom mišiću (Sl. 42). Tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, nivo 4-HNE modifikovanih proteina molekulskih masa 100 kDa ($p < 0,001$), oko 80 kDa, 50 kDa i oko 35 kDa ($p < 0,05$), kao i ukupnih adukata ($p < 0,01$), snižen je kod pacova starosti 24 meseca u poređenju sa tromesečnim jedinkama koje su boravile na sobnoj temperaturi.

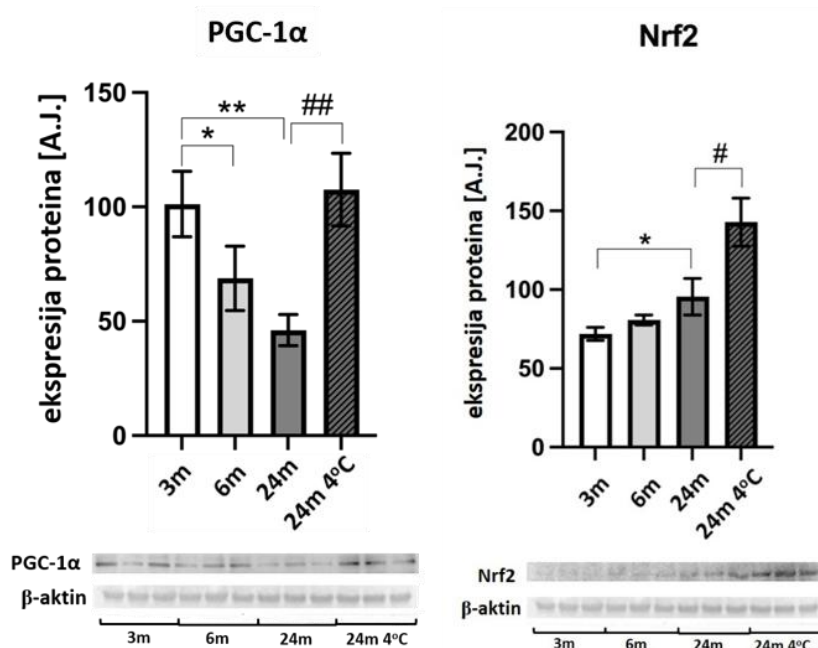
Nivo 4-HNE modifikovanih proteina molekulskih masa oko 65 kDa i 50 kDa, kao i ukupnih adukata ($p < 0,05$), povišen je kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi. Nivo proteinskih adukata molekulske mase oko 100 kDa, oko 80 kDa i oko 35 kDa nije se značajno menjao pod uticajem hladnoće.



Sl. 42. Ekspresija adukata proteina sa 4-HNE u **skeletnom mišiću** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -actin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D. * Razlike između pacova starosti 3 i 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). # Razlike između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C i pacova istog uzrasta koji su boravili na 4 ± 1 °C (# $p < 0,05$).

4.7.5. Proteinska ekspresija PGC-1 α i Nrf2

Tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, proteinska ekspresija PGC-1 α i Nrf2 u skeletnom mišiću pokazuje suprotne profile. Naime, proteinska ekspresija PGC-1 α ($p < 0,01$) je snižena, dok je proteinska ekspresija Nrf2 ($p < 0,05$) povišena kod pacova starosti 24 meseca u poređenju sa tromesečnim pacovima koji su boravili na sobnoj temperaturi. Sa druge strane, efekat hladnoće je povezan sa istosmernom promenom ekspresije oba ispitana proteina: i PGC-1 α ($p < 0,01$) i Nrf2 ($p < 0,05$) pokazuju povišenu ekspresiju kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi. Dakle, dok se proteinska ekspresija PGC-1 α kod starih pacova dugotrajno izlaganih hladnoći vraća na nivoe zabeležene kod tromesečnih pacova na sobnoj temperaturi, proteinska ekspresija Nrf2 pokazuje kontinuiran rast tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i nakon dugotrajnog izlaganja životinja hladnoći (Sl. 43).

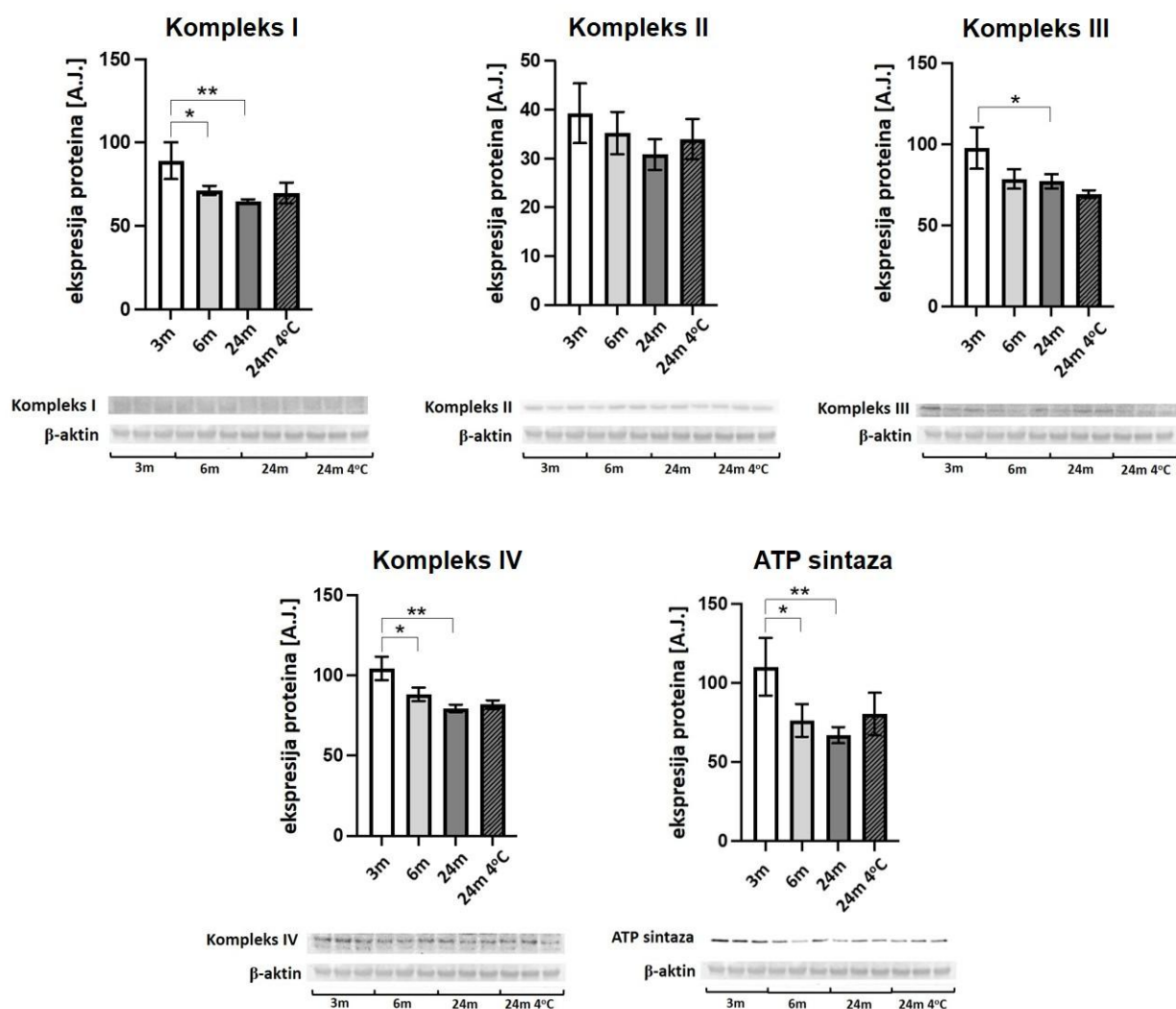


Sl. 43. Proteinska ekspresija PGC-1 α i Nrf2 u **skeletnom mišiću** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -aktin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D. * Razlike između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). # Razlike između pacova starosti 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C i životinja istog uzrasta koje su boravile na 4 ± 1 °C (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$).

4.7.6. Proteinska ekspresija kompleksa respiratornog lanca i ATP sintaze

Tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, proteinska ekspresija kompleksa II nije se značajno menjala. Proteinska ekspresija kompleksa I ($p < 0,01$), kompleksa III ($p < 0,05$), kompleksa IV i ATP sintaze ($p < 0,01$) je snižena kod pacova starosti 24 meseca u poređenju sa tromesečnim pacovima koji su boravili na sobnoj temperaturi. Pored toga, ekspresija kompleksa I, kompleksa IV i ATP sintaze je snižena i kod pacova starosti 6 meseci u odnosu na tromesečne jedinke ($p < 0,05$).

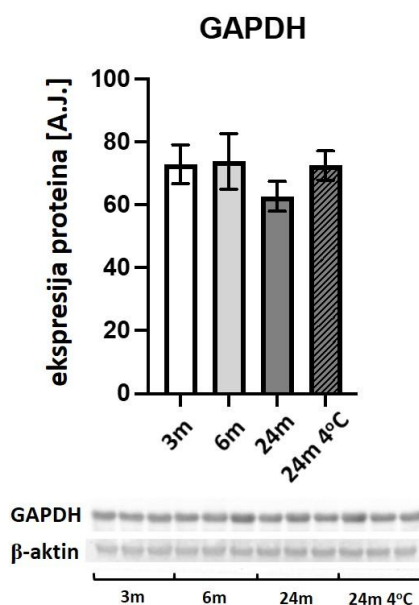
Proteinska ekspresija kompleksa respiratornog lanca (I-IV) i ATP sintaze nije se značajno menjala kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi, uz primetan blagi rastući trend ekspresije kompleksa I i II i ATP sintaze (Sl. 44).



Sl. 44. Proteinska ekspresija kompleksa respiratornog lanca (I-IV) i ATP sintaze u **skeletnom mišiću** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -aktin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na grafikonima su prikazane srednje vrednosti $\pm$ S.D. * Razlike između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca koji su boravili na 22 ± 1 °C (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

4.7.7. Proteinska ekspresija glikolitičkog enzima GAPDH

Proteinska ekspresija GAPDH u skeletnom mišiću nije se značajno menjala tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, uz primetan opadajući trend kod pacova starosti 24 meseca u odnosu na tromesečne jedinke. Nisu zabeležene ni značajne promene u ekspresiji ovog proteina kod pacova starosti 24 meseca koji su bili dugotrajno izlagani niskoj temperaturi u poređenju sa jedinkama iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi, osim primetno rastućeg trenda (Sl. 45).



Sl. 45. Proteinska ekspresija gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH) u **skeletnom mišiću** pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći. Proteinski nivo izražen je relativno u odnosu na β -aktin kao konstitutivno eksprimirani protein. Na grafikonu su prikazane srednje vrednosti $\pm$ SD.

5. DISKUSIJA

Hronološko starenje odlikuje se narušavanjem strukturnog i funkcijskog ustrojstva organizma koje uslovljava reprogramiranje redoks-metaboličke homeostaze. Novije studije ukazuju da temperatura sredine predstavlja jedan od dominantnih abiotičkih faktora koji mogu modulirati obeležja starenja (Kalia i sar., 2022; Ni i sar., 2023; Kallio i sar., 2025; Argentieri i sar., 2025; Shiels i sar., 2025). Specifično, izlaganje mladih glodara hladnoći aktivira termogene mehanizme u BAT i skeletnim mišićima (Cannon i Nedergaard, 2004; Izumi-Mishima i sar., 2025) i mobilise lipidne rezerve iz WAT (Vanholt i sar., 2009; Bartelt i sar., 2011), omogućavajući efikasnije korišćenje energetske rezervi i doprinoseći reprogramiranju metabolizma. Hiperfagija i smanjenje telesne mase koje smo zabeležili kod pacova dugotrajno izlaganih hladnoći u odnosu na jedinke iste starosti (24 meseca) na sobnoj temperaturi odgovaraju povišenoj metaboličkoj stopi kako kod mladih, tako i kod starih glodara izlaganih niskoj temperaturi (Asaki i Iriki, 1994; Selman i sar., 2008; Vanholt i sar., 2009).

U ovoj disertaciji po prvi put je ispitan uticaj dugoročnog izlaganja hladnoći na morfo-funkcijske, redoks-metaboličke profile tkiva/organa (BAT, rWAT, gWAT, skeletnog mišića i jetre) ključnih za uspostavljanje i održavanje termogenog odgovora i sistemske homeostaze (Bartelt i sar., 2011; Periasamy i sar., 2017; Sepa-Kishi i sar., 2018; Tokizane i Imai, 2024; Tsuji i Tseng, 2026) tokom hronološkog starenja.

Kod starih pacova koji su boravili na sobnoj temperaturi pokazano je strukturno pojednostavljenje, uz očuvanje relativno stabilnog redoks-metaboličkog profila BAT i jetre, dok hladnoća ostvaruje suprotan efekat. BAT i jetru dvogodišnjih pacova dugotrajno izlaganih hladnoći karakterišu fiziološka hipertrofija i usložnjavanje strukture, praćeni povećanjem kapaciteta redoks-metaboličkog odgovora, što predstavlja fenotipske promene u osnovi održanja endotermije. Sličan profil zabeležen je i u skeletnom mišiću kod kojeg se tokom starenja na sobnoj temperaturi smanjuje relativna masa, dok se nakon izlaganja hladnoći snažno povećavaju redoks-metabolički kapaciteti. Depoi WAT tokom starenja na sobnoj temperaturi pokazuju tendenciju ka hipertrofiji i smanjenje redoks-metaboličkog kapaciteta. Nasuprot tome, hladnoća mobilise redoks-metaboličke kapacitete WAT i dovodi do izražene atrofije depoa i smanjenja veličine adipocita u odnosu na pacove iste starosti (24 meseca) na sobnoj temperaturi. Uz izmenjeni sistemski lipidni status, ove promene ukazuju na preraspodelu energetske resursa i koordinisana prilagođavanja tkiva/organa u osnovi aklimacije na hladnoću.

Sveukupno posmatrano, naši rezultati oslikavaju tkivno-specifične promene tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, kao i nakon dugotrajnog izlaganja pacova hladnoći. Po prvi put je pokazana povezanost dugotrajnog izlaganja hladnoći sa pretežno suprotnim redoks-metaboličkim profilima određenih tkiva/organa i sistemskih parametara u odnosu na one okarakterisane tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi. Ovi nalazi doprinose proceni tkivno-specifične, biološke starosti koja je ujedno i potpis fenotipskih promena u osnovi aklimacije, doprinoseći razumevanju uticaja niske temperature sredine na proces starenja.

U narednim redovima biće prodiskutovani profili BAT, rWAT, gWAT, skeletnog mišića i jetre, integrisani u odnosu na sistemske promene tokom starenja na sobnoj temperaturi i na hladnoći.

5.1. Od morfološkog pojednostavljenja BAT tokom starenja na sobnoj temperaturi do usložnjavanja i redoks-metaboličkog reprogramiranja na hladnoći

Dosadašnja ispitivanja BAT tokom hronološkog starenja iznedrila su oprečne rezultate. Pojedini autori izveštavaju o atrofiji tkiva čiji fenotip postaje nalik WAT („beljenje“, eng. *whitening*), uz pad termogenog i proliferativnog kapaciteta tokom hronološkog starenja (Horan i sar., 1988; Scarpace i sar., 1988; Florez-Duquet i sar., 1998; Gonçalves i sar., 2017; Cui i sar., 2019),

dok drugi sugerišu da BAT ostaje strukturno i funkcijski kompetentan i u poznom životnom dobu (Kawate i sar., 1993; Scarpacci i sar., 1994; Morroni i sar., 1995).

Slika hronološkog starenja BAT na sobnoj temperaturi dobijena u ovoj disertaciji sugeriše da se promene odvijaju različitom dinamikom na strukturnom i molekulskom nivou. Sa jedne strane, primenom fraktalne analize detektovan je gubitak parenhimske složenosti uz povećanje relativne mase tkiva, što je u skladu sa alteracijama opisanim kod starih miševa, poput hipertrofije BAT i mrkih adipocita i uvećanja lipidnih tela (Gonçalves i sar., 2017) sa pratećim ultrastrukturnim promenama (Crabtree i sar., 2024a; 2024b). Ovaj gubitak strukturne kompleksnosti odvijao se bez očiglednih histoloških manifestacija „beljenja“ ili značajnih promena u broju ćelija. Gubitak negativne korelacije između složenosti i broja ćelija, koja je bila prisutna kod mladih životinja, sugeriše da sam broj ćelija nije primarni pokretač ovog strukturnog narušavanja, već da je reč o suptilnijoj reorganizaciji tkiva. Ovo je potkrepljeno i značajnim razlikama u odseccima kriva regresija (eng. *regression intercepts*), što implicira da se složenost tkiva razlikuje između grupa nezavisno od broja ćelija. Štaviše, nelinearnu dinamiku heterogenosti karakteriše dvofazni trend: povećanje kod zrelih odraslih jedinki, a zatim, u grupi dvogodišnjih pacova, povratak na nivoe zabeležene kod mladih jedinki. S obzirom na stabilnost broja ćelija uprkos porastu relativne mase tkiva sa starošću, otvara se pitanje u kojoj meri promene u teksturi odražavaju morfološko remodeliranje lipidnih tela (Crabtree i sar., 2024b): inicijalnu fazu strukturne dezorganizacije koja vodi povećanju heterogenosti, a zatim biva smenjena novom, uniformnijom arhitekturom parenhima kod starih životinja. U osnovi ovih promena moglo bi biti usporavanje oksidativnog metabolizma tokom hronološkog starenja u BAT (Tajima i sar., 2019; Sarver i sar., 2024).

Sa druge strane, nisu uočene značajne promene u aktivnosti većine ispitanih enzima AD, niti u ukupnom sadržaju GSH tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi. Izuzetno, aktivnost GSH-Px je bila snižena već kod zrelih adultnih pacova (6m), održavajući isti nivo i u poznom životnom dobu (24m), što je konzistentno sa ranijim nalazima (Lopez-Torres i sar., 1991). Dakle, čini se da BAT starih pacova pokazuje znake strukturnog pojednostavljenja, ali zadržava bazalni redoks kapacitet. U prilog tome idu povišene proteinske ekspresije Nrf2 i komponenti AD koji su pod kontrolom ovog transkripcionog faktora (CAT, GSH-Px4, GST pi/mu), što sugeriše da narušavanje Nrf2 signalizacije koje se obično dovodi u vezu sa starenjem (Smith i sar., 2015; Zhang i sar., 2015; Schmidlin i sar., 2019; Buttari i sar., 2025) nije izraženo u BAT dvogodišnjih pacova na sobnoj temperaturi. Odsustvo promene nivoa ekspresije adukata proteina sa 4-HNE između grupa na sobnoj temperaturi potkrepljuje uspešnost uklanjanja lipidnih hidroperoksida, što je u skladu sa povišenom ekspresijom GSH-Px4 i GST pi tokom hronološkog starenja i istovremeno sugeriše održanje bazalnih nivoa 4-HNE usled signalnih uloga koje ovaj molekul može imati (Zhang i Forman, 2017). Takođe, snižena ekspresija UCP1 u grupi starih pacova na sobnoj temperaturi u odnosu na mlade korespondira sa nalazima Florez-Duquet i saradnika (1998) i sa prethodno zabeleženim smanjenjem mitohondrijske respiracije tokom hronološkog starenja (Thirupathi i sar., 2019; Sarver i sar., 2024). Međutim, rezultati ove studije nisu pokazali značajno smanjenje proteinske ekspresije respiratornih kompleksa u grupi starih pacova na sobnoj temperaturi u poređenju sa mladima. Naprotiv, stari pacovi na sobnoj temperaturi imali su povišenu ekspresiju kompleksa I u BAT u odnosu na mlade jedinke, što može biti odraz kompenzatorne regulacije kapaciteta respiratornog lanca, posebno stope oksidacije NADH. Stoga, sveukupne promene koje smo opservirali ukazuju na održanje mitohondrijskog i AD kapaciteta mrkih adipocita u granicama fiziološkog starenja koje je praćeno strukturnim pojednostavljenjem.

Za razliku od strukturnog pojednostavljenja povezanog sa hronološkim starenjem na sobnoj temperaturi, dugotrajno izlaganje hladnoći kod starih pacova izazvalo je sveobuhvatnu transformaciju BAT, ukazujući da ono zadržava visok kapacitet plastičnosti. Na strukturnom nivou, zabeleženo je izrazito remodeliranje koje se ogleda u povišenoj relativnoj masi, složenosti i broju ćelija i sniženoj heterogenosti tkiva. Ovakav snažan hipertrofični i hiperplastični odgovor, praćen angiogenezom i multilokularizacijom lipidnih tela, nalazi se u osnovi termogenog odgovora BAT (Steiner i Cahill, 1964; Cannon i Nedergaard, 2004). Značaj ovog remodeliranja naglašen je

pojavom jake pozitivne korelacije između složenosti i broja ćelija isključivo u grupi izloženoj hladnoći, što implicira adaptivno sprežanje strukture i funkcije i dodatno je naglašeno razlikama u nagibima regresionih kriva između dvogodišnjih pacova dugotrajno izlaganih niskoj temperaturi u odnosu na jedinke iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi. Dakle, dok se tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi struktura BAT pojednostavljuje nezavisno od broja ćelija, na hladnoći je usložnjavanje spregnuto sa hiperplazijom. Ova rekonfiguracija strukture sa plauzibilnim širenjem kapilarne mreže (Cannon i Nedergaard, 2004; Muhammad i sar., 2025), praćena je specifičnim molekulskim promenama.

Očuvanje funkcionalnog integriteta respiratornog lanca od ključnog je značaja ne samo za odvijanje mitohondrijske respiracije, već i termogeneze zavisne od UCP1 (Naren i sar., 2026; Paulo i sar., 2026). Povišena proteinska ekspresija UCP1, ATP sintaze, kompleksa I i GAPDH kod starih pacova dugotrajno izlaganih hladnoći (u odnosu na grupu iste starosti na sobnoj temperaturi) sugerise da su paralelno sa deкупlovanjem i termogenezom pospešeni i glikoliza i oksidativna fosforilacija kako bi se nadomestila izrazita energetska potrošnja, što korespondira sa rezultatima metaboličke analize BAT mladih odraslih pacova akutno izloženih hladnoći (Hiroshima i sar., 2018). Ovo je u kontrastu sa profilom zabeleženim tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, gde stabilna proteinska ekspresija GAPDH i pad UCP1 ukazuju na metaboličku pasivnost tkiva. Nasuprot tome, hladnoća uspeva da premosti usporavanje metabolizma tokom starenja, mobilisuići glikolitički i respiratorni kapacitet do nivoa koji značajno nadilaze čak i vrednosti kod mladih jedinki. Ovo je u skladu sa efikasnim korišćenjem glukoze kod starih pacova akutno izloženih hladnoći (McDonald i sar., 1994) i sa intenziviranom oksidacijom glukoze u BAT mladih miševa hronično izlaganih niskoj temperaturi (Wang i sar., 2020; Cutler i sar., 2025). Iako pregled literature sugerise da je celovita ATP sintaza gotovo odsutna u aktiviranom BAT usled niske ekspresije podjedinice c (Nedergaard i Cannon, 2018), naši rezultati pokazuju visoku proteinsku ekspresiju α -podjedinice F1 domena ATP sintaze (ATP5A) u BAT starih pacova dugotrajno izlaganih hladnoći. Ovaj nalaz je u saglasju sa najnovijim otkrićima koja redefinišu ulogu ATP sintaze u termogenom tkivu (Brunetta i sar., 2025; Jie i sar., 2026). Naime, nedavno je pokazano da ATP sintaza u BAT tokom izlaganja hladnoći može imati ulogu i u hidrolizi ATP (Brunetta i sar., 2024). Tokom intenzivne termogeneze posredovane UCP1, dolazi do rasipanja mitohondrijskog membranskog potencijala. Kako bi se održao fiziološki nivo elektrohemijskog gradijenta neophodan za termogenezu, Brunetta i sar. (2024) pretpostavljaju da ATP sintaza može preći u „reverzni mod“ i hidrolizovati ATP radi ispumpavanja protona u međumembranski prostor. Ovaj proces navodno je omogućen specifičnim padom inhibitornog faktora 1 na hladnoći, čime se smanjuje inhibicija hidrolitičke aktivnosti ATP sintaze (Brunetta i sar., 2024). Pored predloženog sinergističkog funkcionisanja sa UCP1, visoka ekspresija ATP sintaze u BAT koju smo detektovali na hladnoći potencijalno može podržavati dodatne mehanizme termogeneze koji ne zavise od UCP1, već od ATP, mada neki autori osporavaju doprinos kreatin–fosfokreatin ciklusa termogenezi u BAT (Nicholls i Brand, 2023). Štaviše, sama količina ATP sintaze može biti pouzdani indikator metaboličke aktivnosti BAT/WAT prilikom stimulacije β_3 receptora za adrenalin (Jie i sar., 2026). Stoga, visoka ekspresija ATP5A u našoj grupi starih pacova na hladnoći verovatno odražava visoku metaboličku opremljenost BAT za održanje energetske i termogene homeostaze. Shodno tome, proteinska ekspresija UCP1 prati profil ekspresije ATP sintaze i ovde je po prvi put pokazana kod dvogodišnjih pacova koji su bili izlagani niskoj temperaturi od 6. meseca starosti. Pre toga, u drugačijem ogledu, Florez-Duquet i saradnici (1998) su pokazali sniženu količinu UCP1 kod pacova starih 26 meseci koji su boravili 5 dana na 6 °C, dok su Morroni i saradnici (1995) našli hipertrofiran BAT sa adipocitima pozitivnim na UCP1 i mitohondrijama koje odlikuje tipični termogeni fenotip (loptast oblik i izdužene kriste), nakon izlaganja dvogodišnjih pacova temperaturi od 4 °C tokom 4 nedelje. Štaviše, dvogodišnji pacovi koji su 7 do 9 nedelja boravili na 5 °C, a zatim bili 3 časa izloženi temperaturi od –10 °C, pokazali su bolje performanse od neaklimiranih vršnjaka, uz naznaku da je odgovor bio specifičan za soj; naime, dvogodišnji F344 pacovi su bolje tolerisali tročasovni ledeni izazov od tromesečnih *Sprague-Dawley* pacova prethodno aklimiranih na 5 °C (Kiang-Ulrich i Horvath, 1985). Dakle, opservirani efekti mogu zavisiti kako od dužine izlaganja

hladnoći, tako i od uzrasta, soja i vrste ogledne životinje. Rezultati ove disertacije ukazuju da Mil Hil soj dvogodišnjih pacova, nakon godinu i po dana boravka na 4 °C, zadržava kapacitet za strukturno remodeliranje i funkcijsko reprogramiranje BAT. Odsustvo promene u ukupnoj proteinskoj ekspresiji PGC-1 α između grupa u BAT nije u kontradikciji sa okarakterisanim fenotipom. Naime, transkripciona aktivnost PGC-1 α u BAT primarno je diktirana post-translacionim modifikacijama, pre svega fosforilacijom posredovanom kinazama AMPK i p38 MAPK (eng. *p38 mitogen-activated protein kinase*) i deacetilacijom od strane sirtuina 1, koje se indukuju adrenalinskom stimulacijom (Puigserver i sar., 2001; Cantó i Auwerx, 2009). Stoga, čini se da u stanju dugotrajne aklimacije BAT može održavati mitohondriogenezu i visoku ekspresiju efektorskih proteina (UCP1, ATP sintaza) kroz post-translacionu aktivaciju postojećih zaliha PGC-1 α , bez potrebe za daljim povećanjem njegove ukupne proteinske ekspresije.

Metaboličko intenziviranje na hladnoći nosi rizik od narušavanja redoks ravnoteže u poznom životnom dobu. Povišena potrošnja O₂ i intenzivirana oksidacija masnih kiselina (koja obezbeđuje energiju za termogenezu), predstavljaju značajne izvore ROS, posebno H₂O₂ (Anderson i sar., 2009; Chouchani i sar., 2016). Kao odgovor na ovaj izazov, uočili smo široko pospešivanje komponenti AD: aktivnost i proteinska ekspresija CAT i GSH-Px(1), aktivnost TR, kao i ukupan sadržaj GSH, povišeni su u grupi dugotrajno izlaganoj niskoj temperaturi u poređenju sa pacovima iste starosti na sobnoj temperaturi. Ovo je u skladu sa povišenom aktivnošću enzima AD (Spasić i sar., 1993), odnosno sadržaja GSH i glicina (Gong i sar., 2023), u BAT mladih odraslih glodara aklimiranih na hladnoću, kao i sa povišenom ekspresijom enzima AD u sličnim uslovima (Vučetić i sar., 2013), što ukazuje na kompenzatornu strategiju kojom se tkivo nosi sa većim oksidativnim opterećenjem. Ipak, prilagođavanje AD profila BAT pacova na hladnoću nije bilo uniformno, što se ogleda u sniženoj proteinskoj ekspresiji GSH-Px4 i GST pi, enzima koji uklanjaju lipidne peroksidi i širi spektar organskih hidroperoksida, respektivno, što je u saglasnosti sa studijom koja pokazuje da GSH-Px4 nije neophodan za termogenezu u BAT (Zhang i sar., 2026). Ovo se može objasniti time što hiperplazija tkiva zahteva sintezu velike količine novih biomembrana, što može smanjiti relativni udeo postojećih hidroperoksida u BAT (*cf.* Cho i sar., 2023), uz prisustvo alternativnih puteva zaštite od (lipidne) peroksidacije koji nisu posredovani ispitanim enzimima (Zhang i sar., 2026). Štaviše, nivo adukata proteina od 40 i 50 kDa sa 4-HNE je niži kod pacova starosti 24 meseca dugotrajno izlaganih hladnoći u odnosu na jedinke iste starosti koje su boravile na sobnoj temperaturi, što je u skladu sa mehanizmima brze degradacije oksidovanih proteina karakterističnim za BAT, ali ne i jetru i mišić (Selman i sar., 2002). Ova diskretna promena koja obuhvata samo proteine određene molekulske mase, uz odsustvo promene nivoa ukupnih adukata proteina sa 4-HNE, verovatno upućuje na regulatorne uloge aldehida pri karbonilaciji proteina (Schaub i sar., 2015) u ovoj oglednoj grupi.

Naši rezultati su pokazali da su aktivnosti CuZnSOD i MnSOD ostale nepromenjene, dok je proteinska ekspresija MnSOD snižena kod starih pacova dugotrajno izlaganih hladnoći, što korespondira sa nalazima kod mladih pacova gde je prijavljeno smanjenje aktivnosti SOD na hladnoći (Petrović i sar., 2005). Ova relativna stabilnost SOD, u svetlu širokog intenziviranja drugih komponenti, sugerise specifično reprogramiranje profila AD. Ovako nijansiran odgovor verovatno je neophodan za balansiranje dve suprotstavljene potrebe: ograničavanje oksidativnih oštećenja i očuvanje esencijalne ROS signalizacije. Noviji podaci ističu da mitohondrijske ROS nisu samo štetni nusproizvodi, već ključni signali za aktivaciju termogeneze (Chouchani i sar., 2016), te bi neselektivna supresija svih izvora ROS mogla biti kontraproduktivna, čak štetna. Shodno tome, prethodna studija u BAT mladih miševa dugotrajno izlaganih hladnoći zabeležila je povišenu ekspresiju oksidoreduktaze (eng. *putative monoxygenase p33*) koja proizvodi O₂^{•-} (Cutler i sar., 2025). Stoga, dinamičko pospešivanje komponenti vezanih za glutation i tioredoksin (povezanih sa procesima uklanjanja H₂O₂), uz održavanje stabilne aktivnosti SOD u grupi pacova dugotrajno izlaganih hladnoći (u odnosu na pacove iste starosti na sobnoj temperaturi) predstavlja deo precizne kompenzatorne strategije BAT tokom starenja na niskoj temperaturi sredine. Ovo omogućava ćeliji da održi bazalni nivo O₂^{•-} za signalne potrebe, putem dismutacije u H₂O₂. Time se dodatno balansira

potencijalno smanjenje curenja elektrona sa respiratornog lanca dekuplovanjem i nastanak $O_2^{\cdot-}$ (Skulachev, 1998; Brookes, 2005; Keipert i sar., 2010), dok selektivno pospešuje kapacitet za neutralizaciju H_2O_2 čije je stvaranje neminovno pojačano usled metaboličkih zahteva termogeneze, poput plauzibilnog povećanja oksidacije masnih kiselina (Cannon i Nedergaard, 2004; Anderson i sar., 2009; Chouchani i sar., 2016). Stabilna aktivnost SOD, uprkos dekuplovanju, mogla bi se povezati sa opisanom *podelom rada* kako među mrkim adipocitima, tako i među mitohondrijama iste ćelije – na manje ili više termogeno aktivne (Cinti i sar., 2002; Gonzalez-Hurtado i sar., 2018; Song i sar., 2020; Cohen i Kajimura, 2021; Chang, 2023) i potencijalno odražavati uprosečen neto ishod merenja iz proteinskog izolata celog tkiva. Naime, u skladu sa spomenutom morfo-funkcijskom mozaičnošću („Harlekin efektom“), aktivnost SOD bi mogla biti viša u termogeno pasivnim, a niža u aktivnim ćelijama. Mozaičnost bi mogla biti i u osnovi istovremenog porasta ekspresije UCP1 i ATP sintaze kod starih pacova na hladnoći u odnosu na sobnu temperaturu.

Dakle, potencijalno intenziviranje glikolitičkog i respiratornog kapaciteta, kao i dekuplovanja povezanog sa izlaganjem hladnoći u BAT, praćeno je koordinisanim povećanjem aktivnosti i ekspresije određenih komponenti AD kako bi se održao optimalni nivo ROS. Sveukupno, naši rezultati pokazuju da BAT starih pacova zadržava izuzetnu plastičnost. Kao odgovor na dugotrajno izlaganje hladnoći, tkivo prolazi kroz koordinisano strukturno remodeliranje (povećanje mase i složenosti) i redoks-metaboličko reprogramiranje (pospešivanje komponenti AD, dekuplovanja i oksidativnog metabolizma).

5.2. Redoks-metabolička mobilizacija i inverzija hipertrofičnog fenotipa depoa WAT kod starih pacova na hladnoći

Poznato je da visceralni depoi WAT prolaze kroz značajne promene tokom starenja koje uključuju hipertrofiju praćenu smanjenim proliferativnim kapacitetom adipocita i povećanim skladištenjem lipida (Cui i sar., 2019; Nguyen i Corvera, 2024). Naši rezultati morfometrijske analize potkrepljuju ovaj obrazac: hronološko starenje na sobnoj temperaturi bilo je povezano sa hipertrofijom u oba ispitivana depoa (rWAT i gWAT). Zabeleženo je povećanje relativne mase tkiva i prosečnog prečnika adipocita, pri čemu je analiza raspodele veličine ćelija otkrila veći udeo krupnih adipocita kod starih pacova u odnosu na mlade. Ovakva ekspanzija, vođena povećanjem veličine adipocita, konzistentna je sa akumulacijom lipida u visceralnim depoima (Gonçalves i sar., 2017) koja se povezuje sa insulinskom rezistencijom (Tchkonia i sar., 2010; Cui i sar., 2019) i smanjenim lipolitičkim kapacitetom u starenju (Camell i sar., 2017; Gao i sar., 2020a; Mitrović i sar., 2026). Štaviše, naše šestomesečne pacove odlikuje povećanje mase depoa WAT uprkos smanjenju veličine adipocita, što je u skladu sa hiperplastičnom ekspanzijom karakterističnom za rast (Tchkonia i sar., 2010) koji se ogleda i u kontinuiranom povećanju telesne mase pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi.

Ekspanzija lipidnih tela na koju ukazuje strukturna analiza preslikava se na funkcijski profil rWAT. Naime, uočili smo smanjenje aktivnosti širokog spektra enzima AD (CAT, GSH-Px, GR, GST i TR), kao i smanjenje proteinske ekspresije CAT, PGC-1 α i kompleksa I tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi. Pad aktivnosti većine ovih enzima, kao i proteinske ekspresije PGC-1 α , zabeležen je već kod šestomesečnih pacova u poređenju sa mladim adultima, što ukazuje da do usporavanja redoks-metaboličke aktivnosti u rWAT dolazi znatno pre ulaska u pozno životno doba. Ovi podaci odgovaraju smanjenju lipolitičkog (Hotta i sar., 1999; Camell i sar., 2017; Gao i sar., 2020a) i mitohondrijskog kapaciteta tokom starenja, pri čemu se potonje ogleda u padu aktivnosti respiratornih kompleksa u WAT starih pacova (Gómez-Serrano i sar., 2017; Sarver i sar., 2024). Navedena metabolička pasivnost na nivou tkiva praćena je i sistemskim promenama lipidnog profila, gde porast ukupnog holesterola i LDL tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi odgovara prethodnim nalazima kod starih glodara (Lacko i Davis, 1979; Van Lenten i Roheim, 1982). Sa druge strane, povišena proteinska ekspresija GSH-Px4 i GST pi u rWAT starih pacova, uz sniženu ekspresiju ukupnih adukata proteina sa 4-HNE, može ukazivati na uspešno uklanjanje

produkata lipidne peroksidacije i/ili na nižu stopu njihovog nastanka usled slabije metaboličke aktivnosti. Snižena aktivnost enzima AD uključenih u uklanjanje peroksida u rWAT tokom hronološkog starenja može biti uslovljena potencijalnim smanjenjem lipolitičke aktivnosti (Hotta i sar., 1999; Camell i sar., 2017; Gao i sar., 2020a), imajući u vidu da oksidacija masnih kiselina može biti izvor nastanka ROS. Smanjenje AD kapaciteta tokom hronološkog starenja odgovara akumulaciji lipidnih rezervi oličenoj i u hipertrofiji i uvećanju lipidnih tela u rWAT starih pacova.

Poput rWAT, u gWAT se takođe beleži povišena ekspresiju GSH-Px4 tokom hronološkog starenja, ali i Nrf2 i TR, uz porast nivoa ekspresije adukata proteina sa 4-HNE (35 kDa). Ovi rezultati mogu ukazivati na specifičan redoks-senzitivan odgovor u gWAT tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi koji povlači regulaciju ekspresije enzima AD posredstvom Nrf2, radi održanja redoks homeostaze. Treba uzeti u obzir i prethodne studije koje su pokazale da 4-HNE može aktivirati Nrf2 modifikacijom Keap1, usled čega se sprečava ubikvitinacija i posledična degradacija ovog transkripcionog faktora (Fang i sar., 2013; Parvez i sar., 2015; Gao i sar., 2020b; Milković i sar., 2023), što dodatno usložnjava kontekst redoks regulacije. Naši rezultati povišene proteinske ekspresije Nrf2 u gWAT kod starih jedinki u odnosu na mlade na sobnoj temperaturi upućuju na značaj translacione i transkripcione regulacije AD.

Sveukupno posmatrano, tokom hronološkog starenja uočena je depo-specifičnost WAT, uprkos uniformnom trendu hipertrofije tkiva kroz uvećanje adipocita. Ovakva strukturna ekspanzija ukazuje na dominaciju lipogenetskih nad lipolitičkim procesima. U rWAT se ovo metaboličko preusmeravanje ogleda kroz značajan pad mitohondrijskog kapaciteta, potkrepljen istovremenim smanjenjem proteinske ekspresije PGC-1 α i kompleksa I. Nasuprot tome, gWAT zadržava stabilnu ekspresiju PGC-1 α , ali ispoljava smanjenje glikolitičkog kapaciteta, odnosno proteinske ekspresije GAPDH. Ova metabolička divergencija praćena je različitim redoks potpisom: dok gWAT, usled nakupljanja produkata lipidne peroksidacije (porast 4-HNE adukata), mobilise Nrf2, rWAT zadržava bazalni nivo ovog transkripcionog faktora uz niske nivoe adukata 4-HNE sa proteinima. Ovakvi rezultati sugerišu da visceralni depoi pokazuju različit stepen očuvanosti metaboličkih programa i redoks-senzitivnog odgovora.

Nasuprot jasnoj hipertrofiji i slabljenju redoks-metaboličkih kapaciteta WAT tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, dugotrajno izlaganje hladnoći kod dvogodišnjih pacova povezano je sa suprotnim fenotipom WAT u poređenju sa pacovima iste starosti koji su boravili na sobnoj temperaturi. Na strukturnom nivou, došlo je do smanjenja relativne mase WAT i prečnika adipocita, uz pomeranje raspodele veličine ka sitnijim ćelijama. Ovi rezultati podupiru dobro poznatu činjenicu da izlaganje hladnoći dovodi do mobilizacije energetske rezerve iz WAT (Vanholt i sar., 2009). U skladu sa smanjenim kapacitetom WAT starih pacova da se transformišu u bež masno tkivo (eng. *beige adipose tissue*; Song i Wang, 2023), na morfološkom planu nisu uočene kardinalne odlike *browning* fenomena u oba depoa, što može ukazivati i na odsustvo *de novo* biogeneze lipidnih tela. Iako su nedavne studije pokazale da je aktivacija Nrf2 povezana sa adaptivnim prelaskom belih u bež adipocite, kao i sa povišenom ekspresijom UCP1 (Bauzá-Thorbrügge i sar., 2023; Chen i sar., 2025a), naši rezultati snižene proteinske ekspresije Nrf2 u gWAT starih pacova izlaganih niskoj temperaturi, bez promene ekspresije UCP1 u rWAT, uz odsustvo multilokulusnog fenotipa u oba depoa, mogu predstavljati regulatorni mehanizam kojim se suprimira termogeni program na hladnoći. Ovo sugeriše da uočena atrofija primarno odražava intenzivnu lipolizu radi snabdevanja BAT supstratima za termogenezu (Bartelt i sar., 2011), pre nego masovno transdiferenciranje u bež fenotip.

Intenzivna mobilizacija lipidnih rezervi iz WAT pod uticajem (nor)adrenalina jasno se ogleda i u sistemske cirkulaciji. Iako su pojedine studije na mladim odraslim miševima pokazale pad holesterola (Gong i sar., 2023) i lipoproteina na hladnoći (He i sar., 2021), naše analize cirkulacije starih pacova izlaganih niskoj temperaturi beleže porast koncentracije ukupnog holesterola i HDL i aktivnosti lipoproteinske lipaze, u odnosu na stare pacove koji su boravili na sobnoj temperaturi. Ovo ukazuje na ubrzan reverzni transport holesterola zaostalog nakon periferne hidrolize TAG, najverovatnije od strane BAT koji preuzima masne kiseline radi termogeneze, gde

se kolesterol pakuje u HDL čestice i usmerava ka jetri, što je mehanizam prethodno opisan kod mladih miševa izlaganih hladnoći (Worthmann i sar., 2017). Holesterol dopremljen u jetru koristi se za sintezu žučnih kiselina koje, povratno, mogu učestvovati u regulaciji termogeneze u BAT (Worthmann i sar., 2017). Štaviše, ovakva sistemska preraspodela rezultuje padom faktora rizika za CVD (uz opadajući trend IA), sugerišući da dugotrajna aklimacija na hladnoću uspostavlja protektivniji lipidni profil kod starih jedinki, sa manjim rizikom za kardiovaskularna oboljenja (Raaij i sar., 2024). Naime, stari pacovi koji su dugotrajno izlagani niskoj temperaturi imali su faktor rizika za CVD na nivou mladih pacova sa sobne temperature, a skoro duplo niži u odnosu na dvogodišnje pacove na sobnoj temperaturi, što odgovara sniženoj telesnoj masi i odsustvu gojaznog fenotipa pacova na hladnoći.

Analize nivoa ekspresije ključnih metaboličkih enzima otkrile su specifičnu strategiju bioenergetskog reprogramiranja WAT kod starih pacova dugotrajno izlaganih niskoj temperaturi (u odnosu na stare pacove sa sobne temperature). Zabeležena snižena ekspresija ATP sintaze u oba depoa, uz povišenu ekspresiju GAPDH u gWAT na hladnoći, sugerise metaboličko preusmeravanje ka glikolizi. S obzirom na to da je masivna lipoliza izuzetno energetski zahtevan proces, pojačana glikoliza u uslovima smanjenog kapaciteta oksidativne fosforilacije obezbeđuje neophodan ATP za kontinuiranu mobilizaciju masnih kiselina (Lagarde i sar., 2021). Dodatno, ovakav glikolitički fluks može rezultovati pojačanom produkcijom laktata koji se eksportuje u cirkulaciju, služeći kao supstrat za hepatičnu glukoneogenezu (Cutler i sar., 2025), čime se objašnjava doprinos WAT sistemske homeostazi na hladnoći primarno kao donora supstrata. Ovakav metabolički profil, u kojem visceralni depoi WAT izbegavaju masivnu aktivaciju oksidativne fosforilacije, saglasan je sa nedavnim analizama koje potkrepljuju izraženu depo-specifičnost na hladnoći; naime, pokazano je da visceralno WAT, za razliku od potkožnog (Elsukova i sar., 2025), ne pospešuje ekspresiju gena koji kodiraju komponente kompleksa respiratornog lanca (Zhou i sar., 2022). Iako rWAT pokazuje povišenu proteinsku ekspresiju kompleksa I respiratornog lanca kod dvogodišnjih pacova dugotrajno izlaganih hladnoći u odnosu na vršnjake koji su boravili na sobnoj temperaturi, ona je duplo niža od nivoa ekspresije kod tromesečnih jedinki. Uz nižu proteinsku ekspresiju ATP sintaze na hladnoći, ovo sugerise smanjen respiratorni kapacitet koji se može dovesti u vezu sa povišenom mobilizacijom lipidnih rezervi iz rWAT, usled čega tkivo atrofira. Naime, masne kiseline se verovatno pretežno oslobađaju u cirkulaciju i ne oksiduju primarno u mitohondrijama belih adipocita, što bi se moglo odraziti na količinu NADH, a time i na proteinsku ekspresiju kompleksa I. Dodatno, metabolički profil WAT ne zavisi samo od uzrasta jedinke, već i od dužine izlaganja hladnoći, kao što je pokazano u našim prethodnim studijama na mladim adultnim pacovima (Janković i sar., 2013).

U skladu sa smanjenjem relativne mase tkiva i mobilizacijom lipidnih rezervi, naši rezultati su zabeležili snažno pospešivanje AD u rWAT nakon dugotrajnog izlaganja hladnoći: aktivnost GR, GST, TR, GSH-Px, aktivnost i proteinska ekspresija CAT, proteinska ekspresija PRDX3, kao i nivo ukupnog GSH, bili su povišeni u poređenju sa grupom iste starosti na sobnoj temperaturi. Profil AD u rWAT na hladnoći je velikim delom suprotan u odnosu na hronološko starenje na sobnoj temperaturi, tokom kojeg su zabeležene snižene aktivnosti CAT, GSH-Px, GR, GST i TR, kao i snižena proteinska ekspresija CAT u odnosu na tromesečne pacove. Promene AD na hladnoći konzistentne su sa zabeleženim porastom PRDX3 u potkožnom WAT kod miševa intermitentno izlaganih hladnoći (Elsukova i sar., 2025) i sa hipotezom o očuvanom adaptivnom odgovoru na povišenu metaboličku aktivnost. U prilog tome ide i povišena proteinska ekspresija GCL u gWAT i ukupnog GSH u rWAT, što ukazuje na pojačan kapacitet za *de novo* sintezu GSH neophodnog za održanje redoks ravnoteže tokom intenzivne mobilizacije lipida. Naime, poznato je da hladnoća stimuliše transkripcione programe metabolizma masnih kiselina (Li i sar., 2021a; Zhou i sar., 2022), pre svega lipolize (Bartelt i sar., 2011), ali i biogeneze mitohondrija (Shams i sar., 2023) što odgovara povišenoj ekspresiji PGC-1 α u rWAT kod starih pacova dugotrajno izlaganih hladnoći u poređenju sa grupom iste starosti na sobnoj temperaturi. Povišen fluks masnih kiselina i metabolička regrutacija tkiva na hladnoći mogu značajno uticati na redoks status WAT (Janković i sar., 2009).

Stoga, uočeno pospešivanje kapaciteta AD verovatno predstavlja neophodan kompenzatorni mehanizam za održavanje redoks homeostaze u uslovima intenziviranog metabolizma i mobilizacije supstrata koji predstavljaju izvor ROS. Budući da se porast proteinske ekspresije CAT i PRDX3 u rWAT na hladnoći odvija bez značajne promene ekspresije Nrf2, a praćeno je porastom proteinske ekspresije PGC-1 α , može se spekulirati da je ekspresija gena za navedene enzime AD pospešena usled koaktivacije transkripcionih faktora poput FOXO3a ili NRF1/2 sa PGC-1 α (St-Pierre i sar., 2006; Cantó i Auwerx, 2009). Dalje, snižena ekspresija GSH-Px4 u oba depoa WAT asocirana sa izlaganjem hladnoći odgovara povišenom (rWAT), odnosno nepromenjenom (gWAT) nivou ukupnih adukata proteina sa 4-HNE i potencijalno oslikava razlike depoa po pitanju podložnosti lipidnoj peroksidaciji. Snižena proteinska ekspresija određenih enzima AD na hladnoći (GSH-Px1 i GST mu u rWAT i TR u oba depoa) odgovara kompenzatornom povećanju ukupne aktivnosti ovih enzima u rWAT, odnosno smanjenju proteinske ekspresije Nrf2 u gWAT, što pretpostavlja jačanje kapaciteta AD putem post-translacionih modifikacija, a ne primarno kontrolom genske ekspresije posredstvom Nrf2.

Sveukupno, naši rezultati pokazuju da WAT starih pacova zadržava visoku plastičnost, uz određene promene specifične za depo, posebno na nivou transkripcione kontrole redoks-metaboličke homeostaze (posredovane regulacijom nivoa proteinske ekspresije PGC-1 α u rWAT i Nrf2 u gWAT). Dok hronološko starenje vodi ka hipertrofiji praćenoj slabljenjem AD u oba depoa, dugotrajno izlaganje hladnoći menja ovaj fenotip, dovodeći do smanjenja veličine adipocita uz istovremeno prilagođavanje redoks-metaboličkih kapaciteta, što ukazuje na sistemsku preraspodelu resursa i očuvanu sposobnost WAT pacova da odgovori na metaboličke zahteve tokom starenja na niskoj temperaturi sredine.

5.3. Od redukcije mase skeletnog mišića tokom starenja na sobnoj temperaturi do redoks-metaboličke mobilizacije na hladnoći

Tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi zabeležen je pad relativne mase ispitnog mišića (*musculus gastrocnemius*), što je u saglasju sa progresivnom atrofijom mišićnog tkiva, odnosno sarkopenijom, jednim od ključnih markera starenja (Fulle i sar., 2004; Huang i sar., 2019). Takođe, tokom hronološkog starenja nisu pokazane značajne razlike u aktivnostima većine enzima AD (SOD, GSH-Px, GR, TR), uz sniženu proteinsku ekspresiju GSH-Px1, TR i GST pi. Ovaj nalaz je u kontrastu sa prethodnim studijama na starim glodarima koje su izvestile o povećanju aktivnosti (Ji i sar., 1990; Hollander i sar., 2000) i ekspresije (Lombardi i sar., 2009) različitih enzima AD u skeletnom mišiću. Međutim, aktivnosti enzima ne moraju nužno odgovarati ekspresiji proteina ili gena, verovatno usled posttranskripcionih ili post-translacionih modifikacija (Hollander i sar., 2000). Povećanje aktivnosti GST i proteinske ekspresije GST mu i Nrf2 tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi u našoj studiji u skladu je sa sniženom ekspresijom adukata proteina sa 4-HNE. Budući da GST ima ulogu u uklanjanju proizvoda lipidne peroksidacije (poput 4-HNE) konjugacijom sa GSH (Hayes i sar., 2005), povišena aktivnost GST i ekspresija GST mu sa starenjem u skeletnom mišiću je konzistentna sa odgovorom na ROS (Ji i sar., 1990; Fulle i sar., 2004; Lombardi i sar., 2009; Li i sar., 2019). Štaviše, progresivno povišena ekspresija Nrf2 tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, uz navedene promene u nivoima proteinske ekspresije enzima AD pod kontrolom ovog transkripcionog faktora, sugerise da skeletni mišić odlikuje napor za održanjem redoks homeostaze, naročito imajući u vidu da se pad, a ne povećanje ekspresije Nrf2 u ovom organu vezuje za senescenciju i slabljenje kapaciteta AD (Huang i sar., 2019). Dakle, povišena ekspresija Nrf2 u skeletnom mišiću tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi u našem ogledu, zajedno sa povišenom aktivnošću GST i ekspresijom GST mu i sledstvenim padom ekspresije adukata proteina sa 4-HNE, ukazuje na efikasnost AD odgovora. Ovo pospešivanje količine Nrf2 je naročito značajno imajući u vidu da je njegovo prisustvo ključno za održanje redoks homeostaze u skeletnom mišiću starih glodara (Miller i sar., 2012). Međutim, uprkos kompenzatornom povećanju proteinske ekspresije Nrf2, zabeležili smo pad ekspresije određenih enzima AD (GSH-Px1, TR, GST pi), što se poklapa sa istovremeno sniženom proteinskom

ekspresijom PGC-1 α , budući da i on može biti uključen u pozitivnu regulaciju ekspresije enzima AD (Austin i St-Pierre, 2012), koja kod starih pacova na sobnoj temperaturi možda izostaje.

Takođe, snižena proteinska ekspresija PGC-1 α , ATP sintaze, kompleksa I, III i IV zabeležena je kod dvogodišnjih pacova na sobnoj temperaturi u odnosu na mlade jedinke. Pritom, pad ekspresije ATP sintaze, kao i kompleksa I i IV, prisutan je već kod šestomesečnih pacova, znatno pre gubitka relativne mišićne mase (uočenog tek sa 24 meseca). Ovo rano usporavanje oksidativnog metabolizma korespondira sa prethodnim studijama na skeletnom mišiću starih jedinki koje beleže narušavanje biogeneze, dinamike i morfološkog integriteta mitohondrija (Huang i sar., 2019) i sniženu aktivnost respiratornih kompleksa (Lombardi i sar., 2009; García-Domínguez i sar., 2026), ističući da je respiratorni kontrolni odnos (količnik stope mitohondrijske respiracije u stanju 3 – u prisustvu supstrata i ADP – i stanju 4 bez ADP koji odražava stepen dekaplovanja) zapravo viši kod starih u odnosu na mlade, što ukazuje na veću energetska efikasnost kojom se kompenzuju promene povezane sa starenjem, poput atrofije (Lombardi i sar., 2009). Autori pokazuju i da se u mišićnim mitohondrijama starih pacova ova efikasnost postiže većom zastupljenošću tzv. teških respirozoma (grupacija respiratornih kompleksa sa većim udelom težeg kompleksa IV), uz smanjeno oslanjanje na oksidaciju glukoze kao izvor energije (Lombardi i sar., 2009), što se poklapa sa sniženim trendom proteinske ekspresije GAPDH i značajnim padom proteinske ekspresije kompleksa I koji smo zabeležili kod starih pacova na sobnoj temperaturi u odnosu na mlade. Međutim, pregled naučne evidencije sugerise da upravo veća energetska efikasnost starih skeletnih mišića usled visoke spregnutosti respiracije i oksidativne fosforilacije dovodi do niže stope oksidacije supstrata, zato što je iskoristivost ovih supstrata u vidu ATP molekula proizvedenih po jedinici utrošenog O₂ viša (Crescenzo i sar., 2015). Ovo bi moglo rezultovati sniženom β -oksidacijom i nakupljanjem lipida u mišićima (Russ i sar., 2025) u starenju. Povišeni nivoi ukupnog holesterola i LDL u cirkulaciji naših pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi mogli bi da odražavaju ovu pasivnost katabolizma lipida u mišićima, budući da se povišen LDL povezuje sa sarkopenijom (Jiang i sar., 2023).

Dakle, skeletni mišić starih pacova tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi pokazuje održanje kapaciteta AD uz atrofiju i slabiji odgovor povezan sa regulacijom mitohondriogeneze i optimalnom konstitucijom respiratornog lanca. Potencijalno snižen kapacitet za mitohondrijsku respiraciju kod starih pacova u odnosu na mlade u skladu je sa odsustvom masivnog pospešivanja komponenti AD, imajući u vidu korelaciju između nastanka ROS tokom respiracije i posledične regulacije koncentracije ROS putem AD.

Nasuprot sarkopeničnoj atrofiji i metaboličkom *usporavanju* (praćenom padom ekspresije PGC-1 α i respiratornih kompleksa) opaženim tokom starenja na sobnoj temperaturi, kod starih pacova dugotrajno izlaganih hladnoći došlo je do snažne mobilizacije redoks-metaboličkih kapaciteta, što se primarno ogleda u povećanju aktivnosti većine enzima AD u skeletnom mišiću. Konkretno, uočili smo povećanja aktivnosti GSH-Px, aktivnosti i proteinske ekspresije GR, zatim aktivnosti TR i proteinske ekspresije TR i TRX, aktivnosti GST i proteinske ekspresije GST pi/mu, MnSOD i Nrf2 u mišiću kao odgovor na hroničnu hladnoću, što je u skladu sa prethodnim studijama na mladim adultnim glodarima koje su izvestile o povećanju kako aktivnosti različitih enzima AD (Selman i sar., 2000; Terblanche i sar., 2000; Petrović i sar., 2008), tako i ekspresije proteina (Vučetić i sar., 2013) nakon izlaganja hladnoći. Nedavni nalazi morfo-funkcijskih promena u skeletnim mišićima mladih pacova izlaganih hladnoći dodatno podupiru koncept tkivno-specifične plastičnosti pod sredinskim uticajem, pokazujući da izlaganje hladnoći indukuje smanjenje površine poprečnog preseka mišićnih vlakana radi olakšane difuzije kiseonika (Santocildes i sar., 2025), uz istovremeni porast aktivnosti kompleksa II (Matoba i Murakami, 1981; Sánchez-Nuño i sar., 2024), što ukazuje na povećan aerobni kapacitet tkiva (Johannsen i sar., 2026). Trend smanjenja koncentracije kreatinina koji smo opservirali u cirkulaciji starih pacova izlaganih niskoj temperaturi može odražavati fenomen diureze indukovane hladnoćom i povišene glomerulske filtracije usled periferne vazokonstrikcije i hipertenzije (Fregly i sar., 1989), ali i potencijalne promene u metabolizmu mišića. Za razliku od BAT gde se termogeni program verovatno održava post-

translacionom aktivacijom, u skeletnom mišiću je zabeleženo značajno povećanje proteinske ekspresije PGC-1 α , glavnog regulatora transkripcionog programa mitohondriogeneze (Chung i sar., 2017), što ukazuje na tkivno-specifične strategije aklimacije na hladnoću. Da bi odgovorio na sistemske metaboličke zahteve i održao kapacitet za oksidaciju lipida mobilisanih iz WAT, stari skeletni mišić, atrofirani u odnosu na mladi, mora kompenzatorno da pospeši sintezu PGC-1 α proteina, oslanjajući se na kvantitet kako bi prevazišao potencijalne deficite u post-translacionoj aktivaciji. Ovo je praćeno rastućim trendom ekspresije kompleksa I i II, ATP sintaze i GAPDH, što generalno odgovara obrascu pojačanog oslanjanja na oksidativni metabolizam. Potencijalno intenzivirana mitohondrijska oksidacija masnih kiselina i ubrzan protok elektrona kroz respiratorni lanac mogu biti značajan izvor H₂O₂ (Petrović i sar., 2008; Anderson i sar., 2009). Stoga, povećanje nivoa proteinskih adukata sa 4-HNE koje smo zabeležili kod starih pacova dugotrajno izlaganih hladnoći svedoči o povišenom peroksidativnom opterećenju na koje mišić odgovara kompenzatornim povećanjem proteinske ekspresije Nrf2, aktivnosti GSH-Px, aktivnosti GST i ekspresije GST pi/mu. Dodatno, povećanja aktivnosti GR i TR i proteinske ekspresije TR, TRX i MnSOD sugerišu koordinisan odgovor komponenti AD, prvenstveno povezanih sa glutationom i tioredoksinom, u funkciji održavanja redoks ravnoteže pod zahtevima hronične hladnoće. Ovi rezultati specifični za mišić stoga ističu da je profil AD oblikovan složenom interakcijom između promena povezanih sa starenjem i specifičnog trajanja i intenziteta sredinskog činioca. Pospešivanje komponenti AD koje je podstaklo dugotrajno izlaganje hladnoći u našoj studiji je u suprotnosti sa sniženom ekspresijom gena prijavljenom kod akutnog, lokalnog hlađenja mišića (Kano i sar., 2025) ili odgovorima zavisnim od intenziteta zabeleženim kod povremenog izlaganja hladnoći kod brojlera (Li i sar., 2017). Međutim, intermitentno izlaganje odraslih pacova hladnoći beleži porast proteinskih adukata sa 4-HNE u *musculus gastrocnemius* (Sánchez-Nuño i sar., 2024), što se poklapa sa našim rezultatom. Kada je u pitanju proteinska ekspresija PGC-1 α , prethodna studija beleži da stare pacove, za razliku od mladih, odlikuje niža ekspresija ovog transkripcionog koaktivatora nakon izlaganja hladnoći u trajanju od 24 časa (Derbré i sar., 2012), dok su naši stari pacovi izlagani niskoj temperaturi tokom 18 meseci pokazali nivo ekspresije koji se vraćaju na vrednosti bliske grupi tromesečnih pacova na sobnoj temperaturi. Imajući u vidu paralelno povišenu proteinsku ekspresiju PGC-1 α i Nrf2 kod starih pacova na hladnoći, naši rezultati su u saglasju sa poznatom sinergističkom regulacijom ovih transkripcionih regulatora. Naime, PGC-1 α može aktivirati Nrf2 inhibicijom GSK3 β (negativnog regulatora Nrf2) što omogućava da se Nrf2 translocira u nukleus gde se može vezati za promotor gena za PGC-1 α i pospešiti njegovu transkripciju, čime se ostvaruje koordinisana mobilizacija AD i oksidativnog metabolizma u mitohondrijama kao jednog od glavnih izvora ROS (Gureev i sar., 2019).

Razmatrani u celini, naši rezultati u mišiću u skladu su sa mogućim adaptivnim odgovorom na hroničnu hladnoću putem kompenzatornog pospešivanja komponenti AD i regulacije oksidativnog metabolizma radi nošenja sa peroksidativnim opterećenjem koje prati termogene zahteve organizma (Saltykova, 2019). Dugotrajno izlaganje starih pacova niskoj temperaturi nije uticalo na relativnu masu mišića, što znači da hladnoća niti dodatno produbljuje starosnu atrofiju, niti izaziva kompenzatornu hipertrofiju. Istovremeno, izlaganje hladnoći je pospešilo odgovor AD i mobilisalo oksidativni metabolizam, što sugerise da skeletni mišić zadržava kapacitet za redoks-metaboličko reprogramiranje.

5.4. Specifičan redoks-metabolički profil jetre tokom starenja u osnovi razrastanja i usložnjavanja organa na hladnoći

Za razliku od promena uočenih u BAT, WAT i skeletnim mišićima, jetra je pokazala jedinstven profil odgovora koji karakterišu strukturno remodeliranje i stabilnost AD. Iako svi organi neizbežno stare, smatra se da stopa opadanja hepatične funkcije ne mora biti sinhronizovana sa promenama u drugim organima (Rando i Wyss-Coray, 2021; Xiong i sar., 2025), što se pripisuje izuzetno visokom regenerativnom, proliferativnom i redoks-metaboličkom kapacitetu jetre (Chance i sar., 1979; Schmucker, 1998; Hunt i sar., 2019).

Naši rezultati pružaju uvid u strukturne promene koje prate ovaj tkivno-specifični tempo starenja. Hronološko starenje na sobnoj temperaturi bilo je povezano sa smanjenjem relativne mase i složenosti jetre. Ovo pojednostavljenje parenhima najbolje se može razumeti kao kompozitna mera dva istovremena procesa. S jedne strane, autofluorescentna mikroskopija detektuje tačkastu akumulaciju molekula poput lipofuscina, što doprinosi promenama teksture. S druge strane, pojednostavljenje parenhima odražava početak arhitektonskog remodeliranja, poput pseudokapilarizacije i dilatacije sinusoida, kolagenizacije Diseovih prostora i blage fibroze (Cogger i sar., 2003; Maeso-Díaz i sar., 2018; Hunt i sar., 2019). Iako histološki suptilni u početnim fazama, ovi procesi mogu uticati na organizaciju hepatocitnih nizova, smanjujući razmensku površinu između hepatocita i kapilarne mreže, što se manifestuje kao pad složenosti i potencijalno odražava na efikasnost i/ili brzinu distribucije nutrijenata.

Ovi rezultati dopunjuju podatke o smanjenju složenosti hromatina u nukleusima hepatocita starih miševa (Pantić i sar., 2016), objedinjujući starenje sa podćelijskog na nivo parenhima. Dinamika broja nukleusa dodatno oslikava obrazac starenja jetre: zabeleženo je smanjenje kod šestomesečnih pacova u odnosu na mlade, praćeno povećanjem kod dvogodišnjaka u odnosu na zrele jedinke. Iako ploidija nije direktno merena, ovo kasno povećanje broja nukleusa saglasno je sa angažovanjem kompenzatornih mehanizama poput poliploidizacije, poznatog odgovora na ćelijsku senescenciju koji se manifestuje većom učestalošću dvojedarnih hepatocita (Gentric i Desdouets, 2014). Važno je napomenuti da je Lac ostala stabilna tokom starenja (za razliku od BAT), što sugerise da se gubitak složenosti odvija bez značajnog povećanja heterogenosti parenhimske teksture ili formiranja praznina, što je u skladu sa odsustvom izražene akumulacije lipida (steatoze). Dakle, predlažemo da uočena strukturna simplifikacija verovatno prethodi očiglednim patologijama poput inflamacije (Maldonado-Rengel i sar., 2024), steatoze (Croce i sar., 2022) i fibroze (Gaudio i sar., 2005) koje se mogu očekivati u kasnijim etapama hronološkog starenja. Štaviše, zabeleženo pojednostavljenje parenhima jetre tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi može ukazivati na narušavanje morfo-funkcijskog ustrojstva lobulusa, a time i metaboličke zonalnosti.

Nasuprot ovim strukturnim promenama AD profil jetre pokazao je izuzetnu stabilnost. Nismo detektovali značajne promene u aktivnostima enzima AD (SOD, CAT, GSH-Px, GR, TR, GST) niti u ukupnom sadržaju GSH tokom hronološkog starenja do 24. meseca (na sobnoj temperaturi i na hladnoći). Takođe nismo uočili ni značajne promene u proteinskoj ekspresiji ispitanih komponenti AD (CuZnSOD, MnSOD, CAT, GSH-Px1/4, GR, TR, TRX, PRDX3, GGT, GCL i GST pi/mu) između pacova starosti 3, 6 i 24 meseca koji su boravili na sobnoj temperaturi. Ova relativna stabilnost AD generalno se slaže sa rezultatima Vyskočilove i saradnika (2013), ali je u suprotnosti sa studijama koje izveštavaju o padu aktivnosti određenih enzima povezanog sa starenjem, poput MnSOD (Navarro i Boveris, 2004), CuZnSOD, GST (Ji i sar., 1990) i CAT (Carrillo i sar., 1992) ili o povećanju aktivnosti mitohondrijske GR i GSH-Px (Ji i sar., 1990). Podaci o sadržaju GSH i ekspresiji enzima uključenih u njegovu sintezu u jetri starih glodara takođe variraju, delimično usled razlika u soju i starosnim grupama koje se porede (Maher, 2005). Štaviše, prijavljeno povećanje ekspresije SOD1, SOD2, GSH-Px, GR, GCL i glutation sintetaze u jetri starih pacova (Yang i sar., 2015) nije zabeleženo tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi u našem ogledu. Stabilan kapacitet AD jetre, uz stabilan ukupan nivo adukata proteina sa 4-HNE tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, praćen je usporavanjem oksidativnog metabolizma, što je potkrepljeno sniženom proteinskom ekspresijom ključnih metaboličkih enzima (kompleks II, CPT1A, ACADM i PCK2) kod dvogodišnjih pacova na sobnoj temperaturi u odnosu na tromesečne. Međutim, opadanje kapaciteta za β -oksidaciju (CPT1A) i glukoneogenezu (PCK2), kao i pad ekspresije kompleksa II, zabeleženi su već kod šestomesečnih pacova. Ovakav profil ukazuje na globalno smanjenje energetskog fluksa kroz hepatocyte koje nastupa u zreloj dobi i održava se tokom starenja. Naš nalaz o smanjenoj proteinskoj ekspresiji PCK2 kod starih pacova na sobnoj temperaturi predstavlja važnu dopunu prethodnim studijama. Naime, Horn i saradnici (1997) su pokazali da tokom starenja opadaju aktivnost i genska ekspresija citoplazmatske izoforme fosfoenolpiruvat karboksikinaze (PCK1), dok aktivnost mitohondrijske izoforme (PCK2) ostaje

nepromenjena. Naši rezultati, međutim, ukazuju da hronološko starenje ipak zahvata i mitohondrijski glukoneogeni kapacitet na nivou snižene proteinske ekspresije PCK2. Dodatno, poznato je da stari hepatociti gube sposobnost adekvatne aktivacije glukoneogenog programa u odgovoru na kateholamine, usled brže desenzitizacije β -adrenalinских receptora pri stimulaciji epinefrinom (Kim i sar., 2009). Stoga, istovremeni pad proteinske ekspresije kompleksa II, CPT1A, ACADM i PCK2 u našem ogledu u saglasju je sa intrinzičkim usporavanjem mitohondrijskog energetskog metabolizma i smanjenim kapacitetom za obradu kako lipidnih, tako i glukoneogenih supstrata tokom hronološkog starenja. Ovo globalno usporavanje hepatičnog metabolizma na sobnoj temperaturi jasno se ogleda i u sistemskoj cirkulaciji kroz porast koncentracije mokraćne kiseline kod dvogodišnjih pacova u odnosu na tromesečne. Za razliku od ljudi, glodari u peroksizomima jetre poseduju enzim urikazu (urat-oksidadu) koji metaboliše mokraćnu kiselinu u alantoin (Wu i sar., 1992). Povećanje nivoa mokraćne kiseline u cirkulaciji starih pacova stoga može ukazivati na slabljenje funkcije peroksizoma (Vercaemst i sar., 2026) i usporavanje purinskog metabolizma u jetri, što je u saglasnosti sa našim nalazima koji upućuju na smanjen kapacitet za mitohondrijsku β -oksidaciju. Kao što smo videli, potencijalno smanjenje oksidacije masnih kiselina nije se odrazilo na povećanje strukturne heterogenosti, u skladu sa odsustvom steatotične slike parenhima. Kada su u pitanju prethodna ispitivanja aktivnosti i ekspresije komponenti respiratornog lanca u staroj jetri, podaci su varijabilni: zabeleženo je smanjenje proteinske ekspresije kompleksa I i ATP sintaze (Bakala i sar., 2013; Sarver i sar., 2024) i smanjenje aktivnosti kompleksa I, II i IV (Witte i sar., 2023), ali i pretežno povećanje ekspresije komponenti kompleksa I–IV (Huang i sar., 2021) kod starih glodara u odnosu na mlade.

Dakle, tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi jetra pokazuje znake strukturnog pojednostavljenja uz smanjenje relativne mase i odsustvo morfoloških obeležja steatoze, održavajući stabilan, bazalni kapacitet AD praćen slabljenjem metaboličkog kapaciteta mitohondrija. Sa druge strane, hronično izlaganje hladnoći kod starih pacova povezano je sa suprotnim obrascima promena u jetri. Na morfološkom nivou, dugotrajno izlaganje niskoj temperaturi je kod starih pacova dovelo do povećanja relativne mase jetre i povratka složenosti na nivoe zabeležene kod mlađih životinja. Ova izražena hipertrofija jetre na hladnoći, bez prateće hiperplazije, verovatno predstavlja prilagođavanje na povišene metaboličke zahteve usled aklimacije na nisku temperaturu (Bartelt i sar., 2011). Povišene proteinske ekspresije PCK2, ACADM i CPT1A povezane sa hladnoćom koje je naša studija zabeležila, odgovaraju profilu intenzivirane glukoneogeneze i oksidacije masnih kiselina u jetri mladih glodara izlaganih hladnoći (Nakagawa i Nagai, 1971; Sepa-Kishi i sar., 2018; Cutler i sar., 2025). Ovo ukazuje da jetra menja preferenciju supstrata: pojačano sagoreva masne kiseline kako bi obezbedila energiju za glukoneogenezu. Intenzivirana glukoneogeneza zahteva ugljenične skelete (poreklom od glukogenih aminokiselina poput glutamata, glutamina i aspartata), koji predstavljaju intermedijere Krebsovog ciklusa. U uslovima izuzetno visokih energetskih zahteva na hladnoći, pojačan katabolizam aminokiselina dovodi do intenzivne deaminacije u jetri, što rezultuje pojačanom produkcijom i eksportom uree (Nakagawa i Nagai, 1971). Preostali ugljenični skeleti se u mitohondrijama prevode u oksaloacetat, koji PCK2 direktno konvertuje u fosfoenolpiruvat za potrebe glukoneogeneze. Stoga, istovremeni porast proteinske ekspresije PCK2 u jetri i koncentracije uree u cirkulaciji kod starih pacova dugotrajno izlaganih hladnoći u našem ogledu ukazuje na to da jetra intenzivira korišćenje aminokiselina kao glukoneogenih supstrata koje primarno dobija iz hrane, u skladu sa zabeleženom hiperfagijom. Pored pojačanog ciklusa uree, metabolička reaktivacija jetre na hladnoći potkrepljena je i opadajućim trendom koncentracije mokraćne kiseline u plazmi. Intenzivirana oksidacija masnih kiselina u mitohondrijama, na koju ukazuje porast CPT1A i ACADM kod pacova izlaganih hladnoći, u saglasju je sa biogeneom peroksizoma u hepatocitima radi obrade dugolančanih i razgranatih masnih kiselina zabeleženom kod mladih pacova koji su boravili na niskoj temperaturi sredine (Pollera i sar., 1983). Međutim, pitanje potencijalnog jačanja kapaciteta peroksizoma kod starih pacova dugotrajno izlaganih hladnoći ostaje otvoreno, imajući u vidu narušavanje morfo-funkcijskih kapaciteta ovih organela tokom starenja na sobnoj temperaturi (Beier i sar., 1993; Vercaemst i sar., 2026), posebno β -oksidacije (Yang i sar., 2014), što može biti povezano sa lipidnim profilom koji se na hladnoći

menja. Budući da se disregulacija jednog tipa organela tokom starenja, kroz poremećaje saradnje, prenosi i na druge tipove (Vercaemst i sar., 2026), izmenjen peroksisomski kapacitet kod starih pacova na hladnoći bi mogao da utiče i na mitohondrije. Iako se porast uree često pripisuje starosnom narušavanju bubrežne funkcije (Bowker i sar., 1992; Higgins, 2016), u oglednoj grupi na hladnoći on prati metaboličke zahteve aklimacije. Uprkos pojačanom preuzimanju glukoze od strane BAT (Beck i sar., 1967), održavanje stabilne glikemije kod starih pacova na hladnoći svedoči o izuzetnoj efikasnosti hepatične glukoneogeneze. Ovi rezultati su u saglasju sa nedavnom studijom koja pokazuje da uprkos promenama u koncentracijama pojedinačnih metabolita stari miševi održavaju stabilnost glavnih metaboličkih flukseva (Jankowski i sar., 2025). Dodatno, povišena proteinska ekspresija CPT1A koju smo zabeležili u grupi starih pacova dugotrajno izlaganih niskoj temperaturi (u odnosu na stare jedinke na sobnoj temperaturi) sugerise pojačanu konverziju masnih kiselina u acil-karnitine koji se, alternativno, mogu eksportovati u cirkulaciju i poslužiti kao gorivo za termogenezu u BAT (Simcox i sar., 2017).

Takođe, ispitivanja komponenti AD jetre pokazala su da stari pacovi dugotrajno izlagani hladnoći pružaju divergentan odgovor, gde ekspresija mitohondrijskih enzima raste (MnSOD i PRDX3), dok citoplazmatskih opada (GSH-Px1 i TR), što sugerise kompartmentalizaciju redoks-zavisnog odgovora. Jetra na hladnoći primarno reguliše nivo H_2O_2 u mitohondrijskom matriksu, nastalog intenzivnom β -oksidacijom (kroz MnSOD/PRDX3 osovinu), dok se citoplazmatski ogranak AD (GSH-Px1 i TR) potencijalno suprimira radi očuvanja zaliha redukovano glutatona (GSH) koji se može distribuirati u ekstrahepatična tkiva. Naime, povišena proteinska ekspresija GCL i GGT, uz trend smanjenja ukupne količine GSH u jetri starih pacova na hladnoći, ukazuje na visok obrt i pojačano izlučivanje GSH iz hepatocita. Ovakav transportni fluks neophodan je kako bi se odgovorilo na sistemske zahteve, imajući u vidu da druga ispitana tkiva na hladnoći uglavnom pospešuju kapacitete AD koji zavisi od GSH. Sumarno, naša ispitivanja profila AD jetre starih pacova svedoče o održanju bazalnog kapaciteta AD koji je dovoljan da odgovori na metaboličke zahteve termogeneze bez potrebe za dodatnim pospešivanjem aktivnosti enzima AD, za razliku od skeletnog mišića, BAT i depoa WAT. Jetru odlikuju fina podešavanja nivoa proteinske ekspresije enzima AD, što predstavlja specifično redoks-metaboličko reprogramiranje u odgovoru na povišeno oksidativno opterećenje usled intenzivirane β -oksidacije pod uticajem hladnoće. Štaviše, novija ispitivanja pokazuju da se međuorganska komunikacija može odvijati i posredstvom molekula koji se transportuju putem cirkulacije, poput lipidnih peroksida poreklom iz WAT koji mogu da utiču na regulaciju AD u jetri preko Nrf2 (Cai i sar., 2018). Povišena koncentracija HDL koju smo zabeležili na hladnoći u cirkulaciji, uz povišen ukupni nivo adukata 4-HNE sa proteinima u rWAT, otvara mogućnost suptilnije komunikacije između jetre i ovog depoa koja bi nadilazila (reverzni) transport holesterola i drugih lipidnih supstrata.

Sveukupno, naši rezultati pokazuju da jetra na sobnoj temperaturi prolazi kroz starenje na morfološkom nivou (strukturno pojednostavljenje i redukcija mase), dok njen kapacitet za održanje redoks-metaboličke homeostaze ostaje očuvan. Hladnoća indukuje strukturnu plastičnost (hipertrofiju i povratak složenosti), ali ne zahteva drastičnu rekonfiguraciju AD, potkrepljujući centralnu ulogu jetre u regulaciji sistemske redoks-metaboličke homeostaze čak i u uslovima starenja i niske temperature sredine koja, kako se čini, ne predstavlja remetilački činilac za ovaj organ. Štaviše, izgleda da jetra starih pacova zadržava kapacitet za morfo-funkcijsko reprogramiranje tokom aklimacije na hladnoću, preuzimajući ulogu centralnog distributera energetskih supstrata. Sagorevajući masne kiseline dopremljene iz hrane i razmenjene sa WAT, jetra obezbeđuje neprekidan fluks novosintetisane glukoze ka aktiviranom BAT, čime se zatvara krug metaboličke kooperacije neophodne za preživljavanje na niskoj temperaturi sredine.

5.5. Intertkivna integracija: redoks-metaboličko reprogramiranje tokom starenja na hladnoći

Sumirajući dobijene rezultate, uočeni tkivno-specifični obrasci morfo-funkcijskog reprogramiranja naglašavaju promene koje leže u osnovi aklimacije starih pacova na hladnoću i odražavaju fluktuacije u međuorganskoj komunikaciji (Tokizane i Imai, 2024). Ova sistemski preraspodela resursa u osnovi održanja termogeneze potkrepljena je usaglašenim obrascima promena na strukturnom i molekulskom nivou pojedinačnih tkiva/organa. Naši nalazi snažno sugerišu da BAT starih pacova, kroz mehanizme hipertrofije, hiperplazije i istovremenog pospešivanja AD, oksidativne fosforilacije i deкупlovanja, zadržava kapacitet da odreaguje na hladnoću. Naime, BAT najverovatnije povlači energetske resurse iz drugih organa (Park i sar., 2023), prvenstveno iz depoa WAT koji prolaze kroz atrofiju i redoks-metaboličko reprogramiranje, i jetre koja odgovara kompenzatornom hipertrofijom, uz stabilan redoks profil i metaboličke kapacitete preusmerene na oksidaciju masnih kiselina i glukoneogenezu. Konačno, očuvan kapacitet za redoks-metaboličko reprogramiranje u poznom životnom dobu predstavlja osnovni preduslov za preživljavanje u uslovima niskih temperatura. Stoga, čini se da aklimacija starih pacova na hladnoću predstavlja složen kompromis između održanja fenotipske plastičnosti i dugoročne sistemske cene (Speakman i Garratt, 2014), odnosno alostatskog opterećenja (Sterling i Eyer, 1988; McEwen i Stellar, 1993) i hormetičkog odgovora (Calabrese i Mattson, 2017). Budući da se aklimacija odvija pod teretom hronološkog starenja, to se odražava na odsustvo produženog preživljavanja kod glodara doživotno praćenih na hladnoći (Johnson i sar., 1963; Kibler i sar., 1963; Selman i sar., 2008; Vaanholt i sar., 2009). Naši tkivno-specifični rezultati, naglašeni sistemskim lipidnim statusom koji smanjuje faktor rizika za CVD, idu u prilog stanovištu da životinje bivaju uspešno aklimirane na hladnoću, ali otvaraju i pitanje kompromitovanja ovog procesa u kasnijim, uznapređovalim fazama starenja usled pratećih patologija. Ovo je u saglasju sa dosadašnjim saznanjima o oprečnim učincima hroničnog izlaganja hladnoći, bilo da pogoršava ili pospešuje određene zdravstvene aspekte (Heroux i Campbell, 1960; Holloszy i Smith, 1986; Ni i sar., 2023; Boulares i sar., 2025; Kallio i sar., 2025). Dodatno, strukturno pojednostavljenje tkiva povezano sa hronološkim starenjem na sobnoj temperaturi koje se uslođjava kod pacova iste starosti na hladnoći, doprinosi proceni tkivno-specifične, biološke starosti koja je ujedno i potpis fenotipskih promena u osnovi aklimacije. Dakle, fiziološko starenje karakteriše se održanjem kapaciteta za široku normu reakcije (Gladyshev i Gladyshev, 2016; McDonald, 2019; Canguilhem, 2020). Štaviše, gotovo suprotni redoks-metabolički i morfološki profili ispitanih tkiva kod pacova dugotrajno izlaganih hladnoći u odnosu na stare pacove na sobnoj temperaturi, ukazuju da niska temperatura sredine kroz intenziviranje metabolizma može sprečiti iscrpljivanje morfo-funkcijskih kapaciteta koje se povezuje sa starenjem. Cena ovakve asinhronizacije biološke u odnosu na hronološku starost (u korist pređašnje) možda je upravo izostanak značajnog produženja životnog veka na hladnoći (Johnson i sar., 1963; Kibler i sar., 1963; Selman i sar., 2008; Vaanholt i sar., 2009). U tom slučaju trebalo bi razlikovati kvantitet od kvaliteta života, u kontekstu koncepta „zdravog starenja“ (eng. *healthy ageing*; Menassa i sar., 2023).

6. ZAKLJUČCI

Rezultati ove disertacije su po prvi put detaljno okarakterisali redoks-metabolički profil jetre, skeletnog mišića i masnih tkiva starih pacova dugotrajno izlaganih niskoj temperaturi u kontekstu molekulskih i strukturnih potpisa starenja. Na osnovu dobijenih rezultata, izvedeni su sledeći zaključci:

- Nakon dugotrajnog izlaganja hladnoći u poznom životnom dobu tkiva zadržavaju visok kapacitet za morfo-funkcijsko reprogramiranje. Odgovor na izmenjene sredinske uslove se ne odvija izolovano, već kroz strogo koordinisanu sistemsku preraspodelu resursa u kojoj masna tkiva, jetra i skeletni mišići funkcionišu kao integrisana redoks-metabolička mreža.
- Fraktalna analiza, po prvi put primenjena na istovremenu kvantifikaciju promena u parenhimu mrkog masnog tkiva i jetre pacova, pokazala je da se hronološko starenje na sobnoj temperaturi karakteriše specifičnim strukturnim pojednostavljenjem (smanjenom složenošću parenhimske arhitekture), a da je dugotrajno izlaganje starih pacova hladnoći povezano sa fenotipom koji daje suprotnu, složeniju sliku. Time je demonstrirana sposobnost fraktalne analize da proceni biološku starost tkiva i razluči hronološko starenje od biološkog kapaciteta za strukturno remodeliranje tkiva koje leži u osnovi aklimacije na hladnoću.
- Tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, uočava se jasna morfološka i redoks-metabolička varijabilnost između ispitivanih tkiva. Jetra i skeletni mišić podležu redukciji mase, mrko masno tkivo i jetra pokazuju izraženo strukturno pojednostavlјivanje, dok depoi belog masnog tkiva pokazuju tendenciju ka hipertrofiji. Ove promene su praćene padom ekspresije određenih proteina uključenih u održanje energetskog metabolizma u skeletnom mišiću (PGC-1 α , ATP sintaza, kompleksi I, III i IV respiratornog lanca), jetri (ACADM, CPT1A, PCK2, kompleks II respiratornog lanca) i retroperitonealnom belom masnom tkivu (PGC-1 α , kompleks I respiratornog lanca). Navedeni rezultati ukazuju na slabljenje oksidativnog energetskog metabolizma tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi u većini ispitanih tkiva.
- Slabija metabolička aktivnost tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi u skladu je sa zabeleženim sniženim nivoom proteinskih adukata sa 4-hidroksinonenalom, krajnjim proizvodom lipidne peroksidacije u jetri (oko 30 kDa), skeletnom mišiću i retroperitonealnom belom masnom tkivu. Istovremeno, ispitana tkiva pokazuju adaptivni odgovor putem kompenzatorne regulacije antioksidativne odbrane, prvenstveno kroz povišenu proteinsku ekspresiju transkripcionog faktora Nrf2 (u mrkom masnom tkivu, gonadalnom belom masnom tkivu i skeletnom mišiću) i povišenu ekspresiju GSH-Px4, enzima specifičnog za uklanjanje lipidnih hidroperoksida (u sva tri ispitana masna tkiva). Retroperitonealno belo masno tkivo, za razliku od mrkog masnog tkiva, skeletnog mišića i jetre, pokazuje smanjenje aktivnosti većine enzima antioksidativne odbrane (CAT, GSH-Px, GR, TR, GST) sa starenjem na sobnoj temperaturi, što odgovara smanjenom oksidativnom metabolizmu i zabeleženoj hipertrofiji. U većini ispitanih tkiva/organa tokom hronološkog starenja na sobnoj temperaturi, kao i nakon dugotrajnog izlaganja starih pacova niskoj temperaturi, pokazano je da se CuZnSOD i MnSOD moduliraju na nivou proteinske ekspresije, dok im aktivnost ostaje stabilna.
- Dugotrajno izlaganje hladnoći kod starih pacova izaziva snažno morfo-funkcijsko reprogramiranje koje je gotovo suprotno promenama uočenim kod starih pacova na sobnoj temperaturi. Dolazi do masivne mobilizacije energetskih rezervi iz depoa belog masnog tkiva (atrofija i smanjenje prečnika adipocita), dok jetra i mrko masno tkivo prolaze kroz hipertrofiju i povratak strukturne složenosti, uz hiperplaziju koja prati mrko masno tkivo, spregnuta sa kompleksnošću i homogenošću, strukturnim parametrima koji odražavaju aktivirani fenotip.

- Aklimacija na hladnoću kod starih pacova rezultuje sistemskim intenziviranjem metabolizma koje se ogleda u smanjenju telesne mase, kao i mase masnih tkiva, uprkos izraženijoj hiperfagiji kod starih pacova dugotrajno izlaganih niskoj temperaturi. Mrko masno tkivo pospešuje termogeni i respiratorni kapacitet (porast proteinske ekspresije UCP1, ATP sintaze, kompleksa I respiratornog lanca i GAPDH), dok jetra preuzima ulogu centralnog snabdevača glukozom i masnim kiselinama, pojačavajući β -oksidaciju i glukoneogenezu (porast proteinske ekspresije ACADM, CPT1A, PCK2) kako bi podržala sistemske energetske zahteve. Istovremeno, skeletni mišić i retroperitonealno belo masno tkivo pokazuju povišenu proteinsku ekspresiju transkripcionog regulatora mitohondriogeneze (PGC-1 α). Pri tome, belo masno tkivo specifično prilagođava svoj glikolitički i respiratorni kapacitet smanjenjem proteinske ekspresije ATP sintaze u oba depoa, kao i povećanjem proteinske ekspresije kompleksa I respiratornog lanca u retroperitonealnom, i povećanjem proteinske ekspresije GAPDH u gonadalnom depou kako bi podržalo kontinuiranu lipolizu i eksport supstrata ka termogenim tkivima. Ovo na sistemskom nivou rezultuje ubrzanim prometom lipoproteina i uspostavljanjem protektivnijeg lipidnog profila.
- Intenziviranje energetskog metabolizma na hladnoći utiče na oksidativno opterećenje, što se manifestuje porastom ekspresije adukata proteina sa 4-HNE u jetri (40 i oko 45 kDa), skeletnom mišiću i retroperitonealnom belom masnom tkivu. Tkiva starih pacova zadržavaju kapacitet da specifično odgovore na ovu promenu, pokazujući izuzetnu plastičnost kroz sinhronizovano pospešivanje antioksidativne odbrane u retroperitonealnom belom masnom tkivu (aktivnost CAT, GSH-Px, GR, TR, GST i ukupna količina GSH), mrkom masnom tkivu (aktivnost CAT, GSH-Px, TR i ukupna količina GSH) i skeletnom mišiću (aktivnost GSH-Px, GR, TR, GST), praćenu povećanjima ekspresije proteina u mrkom masnom tkivu (CAT, GSH-Px1), skeletnom mišiću (MnSOD, GR, TRX, TR) i u retroperitonealnom (CAT, PRDX3) i gonadalnom (GST pi, GCL) belom masnom tkivu. Za razliku od odgovora navedenih tkiva na dugotrajno izlaganje niskoj temperaturi, jetra održava redoks homeostazu isključivo moduliranjem nivoa ekspresije AD enzima, što ukazuje na njenu robusnu ulogu u pojačanoj sintezi i sistemskoj distribuciji glutationa.

Sveukupno, rezultati ove disertacije pokazuju da dvogodišnji pacovi imaju očuvan kapacitet za morfo-funkcijsko, redoks-metaboličko reprogramiranje, specifično pri dugotrajnom podvrgavanju abiotičkom činiocu kakva je niska temperatura sredine. Ovaj proces uspostavljanja nove redoks-metaboličke homeostaze zahteva visoko koordinisanu međutkivnu saradnju, što je potkrepljeno morfo-funkcijskim modifikovanjem biološke starosti u odgovoru na metaboličke zahteve okoline. Očuvanje kapaciteta za morfo-funkcijsku plastičnost mrkog masnog tkiva, depoa belog masnog tkiva, kao i jetre i skeletnog mišića tokom starenja na hladnoći pruža doprinos razumevanju biološke starosti u kontekstu intenziviranih metaboličkih zahteva u izmenjenim uslovima spoljašnje sredine.

7. LITERATURA

- Ali, S. S., Marcondes, M. C. G., Bajova, H., Dugan, L. L., & Conti, B. (2010). Metabolic depression and increased reactive oxygen species production by isolated mitochondria at moderately lower temperatures. *Journal of Biological Chemistry*, 285(42), 32522-32528. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.155432>
- Anderson, E. J., Lustig, M. E., Boyle, K. E., Woodlief, T. L., Kane, D. A., Lin, C.-T., Price, J. W., III, Kang, L., Rabinovitch, P. S., Szeto, H. H., Houmard, J. A., Cortright, R. N., Wasserman, D. H., & Neuffer, P. D. (2009). Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *Journal of Clinical Investigation*, 119(3), 573-581. <https://doi.org/10.1172/JCI370482>
- Argentieri, M. A., Amin, N., Nevado-Holgado, A. J., Sproviero, W., Collister, J. A., Keestra, S. M., Kuilman, M. M., Ginos, B. N. R., Ghanbari, M., Doherty, A., Hunter, D. J., Alvergne, A., & van Duijn, C. M. (2025). Integrating the environmental and genetic architectures of aging and mortality. *Nature Medicine*, 31(3), 1016-1025. <https://doi.org/10.1038/s41591-024-03483-9>
- Asaki, Y., & Iriki, M. (1994). Acclimation of aged rats to cold. In: Schönbaum, E., & Lomax, P. (Eds.), *Thermal balance in health and disease: Recent basic research and clinical progress* (pp. 161–165). Birkhäuser. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7429-8_21
- Austin, S., & St-Pierre, J. (2012). PGC-1 α and mitochondrial metabolism—emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *Journal of cell science*, 125(21), 4963-4971. <https://doi.org/10.1242/jcs.113662>
- Bakala, H., Ladouce, R., Baraibar, M. A., & Friguet, B. (2013). Differential expression and glycation damage affect specific mitochondrial proteins with aging in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1832(12), 2057-2067. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.07.015>
- Bal, N. C., Singh, S., Reis, F. C., Maurya, S. K., Pani, S., Rowland, L. A., & Periasamy, M. (2017). Both brown adipose tissue and skeletal muscle thermogenesis processes are activated during mild to severe cold adaptation in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 292(40), 16616-16625. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.790451>
- Bartelt, A., Bruns, O. T., Reimer, R., Hohenberg, H., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M. G., Tromsdorf, U. I., Weller, H., Waurisch, C., Eychmüller, A., Gordts, P. L. S. M., Rinninger, F., Bruegelmann, K., Freund, B., Nielsen, P., Merkel, M., & Heeren, J. (2011). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nature Medicine*, 17(2), 200-205. <https://doi.org/10.1038/nm.2297>
- Bauzá-Thorbrügge, M., Peris, E., Zamani, S., Micallef, P., Paul, A., Bartesaghi, S., Benrick, A., & Wernstedt Asterholm, I. (2023). NRF2 is essential for adaptive browning of white adipocytes. *Redox Biology*, 68, 102951. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102951>
- Beck, L. V., Zaharko, D. S., & Kalser, S. C. (1967). Variation in serum insulin and glucose of rats with chronic cold exposure. *Life Sciences*, 6(14), 1501-1504. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(67\)90330-X](https://doi.org/10.1016/0024-3205(67)90330-X)
- Beier, K., Völkl, A., & Fahimi, H. D. (1993). The impact of aging on enzyme proteins of rat liver peroxisomes: quantitative analysis by immunoblotting and immunoelectron microscopy. *Virchows Archiv B*, 63(1), 139-146. <https://doi.org/10.1007/BF02899254>
- Benador, I. Y., Veliova, M., Liesa, M., & Shirihai, O. S. (2019). Mitochondria bound to lipid droplets: where mitochondrial dynamics regulate lipid storage and utilization. *Cell Metabolism*, 29(4), 827-835. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.02.011>
- Benzie, I. F. (2000). Evolution of antioxidant defence mechanisms. *European Journal of Nutrition*, 39(2), 53-61. <https://doi.org/10.1007/s003940070030>
- Bernard, C. (1865). *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale*. Paris: J.B. Baillière et fils.
- Bertholet, A. M., & Kirichok, Y. (2017). UCP1: A transporter for H⁺ and fatty acid anions. *Biochimie*, 134, 28-34. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.10.013>
- Beutler, E. (1975). *A manual of biochemical methods*. Grune & Stratton.

- Bianco, A. C., Sheng, X. Y., & Silva, J. E. (1988). Triiodothyronine amplifies norepinephrine stimulation of uncoupling protein gene transcription by a mechanism not requiring protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 263(34), 18168-18175.
- Bligh-Tynan, M. E., Bhagwat, S. A., & Castonguay, T. W. (1993). The effects of chronic cold exposure on diurnal corticosterone and aldosterone rhythms in Sprague-Dawley rats. *Physiology & Behavior*, 54(2), 363-367. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(93\)90124-X](https://doi.org/10.1016/0031-9384(93)90124-X)
- Boulares, A., Jdidi, H., & Douzi, W. (2025). Cold and longevity: can cold exposure counteract aging? *Life Sciences*, 349, 123431. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2025.123431>
- Bowker, L. K., Briggs, R. S., Gallagher, P. J., & Robertson, D. R. (1992). Raised blood urea in the elderly: a clinical and pathological study. *Postgraduate Medical Journal*, 68(797), 174. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1589374/>
- Brookes, P. S. (2005). Mitochondrial H⁺ leak and ROS generation: an odd couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(1), 12-23. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.10.016>
- Brouse, B., Jr., Rowland, C., & Taylor, R. P. (2024). Relating the Morphology of Bipolar Neurons to Fractal Dimension. *Fractal and Fractional*, 9(1), 9. <https://doi.org/10.3390/fractalfract9010009>
- Brunetta, H. S., Jung, A. S., Valdivieso-Rivera, F., de Campos Zani, S. C., Guerra, J., Furino, V. O., Francisco, A., Berçot, M., Moraes-Vieira, P. M., Keipert, S., Jastroch, M., Martinez, L. O., Sponton, C. H., Castilho, R. F., Mori, M. A., & Bartelt, A. (2024). IF1 is a cold-regulated switch of ATP synthase hydrolytic activity to support thermogenesis in brown fat. *The EMBO Journal*, 43(21), 4870. <https://doi.org/10.1038/s44318-024-00215-0>
- Brunetta, H. S., Mori, M. A., & Bartelt, A. (2025). Oxidative Phosphorylation in Uncoupled Mitochondria. *BioEssays*, 47(9), e70038. <https://doi.org/10.1002/bies.70038>
- Bunk, J., Hussain, M. F., Delgado-Martin, M., Samborska, B., Ersin, M., Shaw, A., Rahbani, J. F., & Kazak, L. (2025). The Futile Creatine Cycle powers UCP1-independent thermogenesis in classical BAT. *Nature Communications*, 16(1), 3221. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-58294-4>
- Buttari, B., Tramutola, A., Rojo, A. I., Chondrogianni, N., Saha, S., Berry, A., Giona, L., Miranda, J. P., Profumo, E., Davinelli, S., Daiber, A., Cuadrado, A., & Di Domenico, F. (2025). Proteostasis decline and redox imbalance in Age-Related diseases: the therapeutic potential of NRF2. *Biomolecules*, 15(1), 113. <https://doi.org/10.3390/biom15010113>
- Cai, J., Pires, K. M., Ferhat, M., Chaurasia, B., Buffolo, M. A., Smalling, R., Sargsyan, A., Atkinson, D. L., Summers, S. A., Graham, T. E., & Boudina, S. (2018). Autophagy ablation in adipocytes induces insulin resistance and reveals roles for lipid peroxide and Nrf2 signaling in adipose-liver crosstalk. *Cell Reports*, 25(7), 1708-1717. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.040>
- Calabrese, E. J., & Mattson, M. P. (2017). How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? *npj Aging and Mechanisms of Disease*, 3(1), 13. <https://doi.org/10.1038/s41514-017-0013-z>
- Camell, C. D., Sander, J., Spadaro, O., Lee, A., Nguyen, K. Y., Wing, A., Goldberg, E. L., Youm, Y.-H., Purandare, S., Qi, Y., & Dixit, V. D. (2017). Inflammasome-driven catecholamine catabolism in macrophages blunts lipolysis during ageing. *Nature*, 550(7674), 119-123. <https://doi.org/10.1038/nature24022>
- Canguilhem, G. / Kangilem, Ž. (2020). Normalno i patološko (O. Petronić, prev.). Mediterranean Publishing.
- Cannon, B., & Nedergaard, J. A. N. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological Reviews*, 84(1), 277-359. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2003>
- Cannon, W. B. (1932). *The Wisdom of the Body*. New York, NY: W. W. Norton & Company.
- Cantó, C., & Auwerx, J. (2009). PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Current opinion in lipidology*, 20(2), 98-105. <https://doi.org/10.1097/mol.0b013e328328d0a4>

- Carrillo, M. C., Kanai, S., Sato, Y., & Kitani, K. (1992). Age-related changes in antioxidant enzyme activities are region and organ, as well as sex, selective in the rat. *Mechanisms of Ageing and Development*, 65(2-3), 187-198. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(92\)90035-c](https://doi.org/10.1016/0047-6374(92)90035-c)
- Chai, Y. C., & Mielal, J. J. (2023). Glutathione and glutaredoxin: key players in cellular redox homeostasis and signaling. *Antioxidants*, 12(8), 1553. <https://doi.org/10.3390/antiox12081553>
- Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 59(3), 527-605. <https://doi.org/10.1152/physrev.1979.59.3.527>
- Chang, J. S. (2023). Recent insights into the molecular mechanisms of simultaneous fatty acid oxidation and synthesis in brown adipocytes. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1106544. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1106544>
- Chen, H., Guan, Q., Gong, S., Du, Y., Zhang, Z., Liu, Y., Zhou, L., Liu, L., Xin, B., Guo, Y., Zhang, H., Zhou, Z., Pei, T., Yu, G., Yin, S., & Li, L. (2025a). NRF2-REGγ-ACADM/KLF15 Signaling Pathway Regulates the Browning of White Adipose Tissue to Modulate Obesity. *Advanced Science*, 12(46), e09429. <https://doi.org/10.1002/adv.202509429>
- Chen, Q. C., Cai, W. F., Ni, Q., Lin, S. X., Jiang, C. P., Yi, Y. K., Liu, L., Liu, Q., & Shen, C. Y. (2025b). Endocrine regulation of metabolic crosstalk between liver and brown adipose tissue by natural active ingredients: Adipocyte and Cell Biology. *International Journal of Obesity*, 49(9), 1688-1703. <https://doi.org/10.1038/s41366-025-01793-7>
- Chen, Y., Hu, Q., Wang, C., & Wang, T. (2023). The crosstalk between BAT thermogenesis and skeletal muscle dysfunction. *Frontiers in Physiology*, 14, 1132830. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1132830>
- Cho, Y. K., Lee, S., Lee, J., Doh, J., Park, J. H., Jung, Y. S., & Lee, Y. H. (2023). Lipid remodeling of adipose tissue in metabolic health and disease. *Experimental & Molecular Medicine*, 55(9), 1955-1973. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01071-4>
- Chouchani, E. T., & Kajimura, S. (2019). Metabolic adaptation and maladaptation in adipose tissue. *Nature Metabolism*, 1(2), 189-200. <https://doi.org/10.1038/s42255-018-0021-8>
- Chouchani, E. T., Kazak, L., Jedrychowski, M. P., Lu, G. Z., Erickson, B. K., Szpyt, J., Pierce, K. A., Laznik-Bogoslavski, D., Vetrivelan, R., Clish, C. B., Robinson, A. J., Gygi, S. P., & Spiegelman, B. M. (2016). Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1. *Nature*, 532(7597), 112-116. <https://doi.org/10.1038/nature17399>
- Chung, N., Park, J., & Lim, K. (2017). The effects of exercise and cold exposure on mitochondrial biogenesis in skeletal muscle and white adipose tissue. *Journal of exercise nutrition & biochemistry*, 21(2), 39. <https://doi.org/10.20463/jenb.2017.0020>
- Cinti, S., Cancelli, R., Zingaretti, M. C., Ceresi, E., De Matteis, R., Giordano, A., Himms-Hagen, J., & Ricquier, D. (2002). CL316,243 and cold stress induce heterogeneous expression of UCP1 mRNA and protein in rodent brown adipocytes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 50(1), 21-31. <https://doi.org/10.1177/002215540205000103>
- Cogger, V. C., Warren, A., Fraser, R., Ngu, M., McLean, A. J., & Le Couteur, D. G. (2003). Hepatic sinusoidal pseudocapillarization with aging in the non-human primate. *Experimental Gerontology*, 38(10), 1101-1107. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2003.07.002>
- Cohen, P., & Kajimura, S. (2021). The cellular and functional complexity of thermogenic fat. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(6), 393-409. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00350-0>
- Conti, B., Sanchez-Alavez, M., Winsky-Sommerer, R., Morale, M. C., Lucero, J., Brownell, S., Fabre, V., Huitron-Resendiz, S., Henriksen, S., Zorrilla, E. P., de Lecea, L., & Bartfai, T. (2006). Transgenic mice with a reduced core body temperature have an increased life span. *Science*, 314(5800), 825-828. <https://doi.org/10.1126/science.1132191>
- Crabtree, A., Neikirk, K., Marshall, A. G., Vang, L., Whiteside, A. J., Williams, Q., Altamura, C. T., Owens, T. C., Stephens, D., Shao, B., Koh, A., Killion, M., Garza Lopez, E., Lam, J., Rodriguez, B., Mungai, M., Stanley, J., Dean, E. D., Koh, H.-J., Gaddy, J. A., Scudese, E., Sweetwyne, M. T., Davis, J., Zaganjor, E., Murray, S. A., Katti, P., Damo, S. M., Vue, Z., & Hinton, A., Jr. (2024a). Defining mitochondrial cristae morphology changes induced by aging

- in brown adipose tissue. *Advanced Biology (Weinh)*, 8(1), e2300186. <https://doi.org/10.1002/adbi.202300186>
- Crabtree, A., Neikirk, K., Pinette, J. A., Whiteside, A., Shao, B., Bedenbaugh, J., Vue, Z., Vang, L., Le, H., Demirci, M., Ahmad, T., Owens, T. C., Oliver, A., Zeleke, F., Beasley, H. K., Garza Lopez, E., Scudese, E., Rodman, T., Kabugi, K., Koh, A., Navarro, S., Lam, J., Kirk, B., Mungai, M., Sweetwyne, M., Koh, H.-J., Zaganjor, E., Damo, S. M., Gaddy, J. A., Kirabo, A., Murray, S. A., Cooper, A., Williams, C., McReynolds, M. R., Marshall, A. G., & Hinton, A., Jr. (2024b). Quantitative assessment of morphological changes in lipid droplets and lipid-mito interactions with aging in brown adipose. *Journal of Cellular Physiology*, 239(9), e31340. <https://doi.org/10.1002/jcp.31340>
- Crescenzo, R., Bianco, F., Mazzoli, A., Giacco, A., Liverini, G., & Iossa, S. (2015). Skeletal muscle mitochondrial energetic efficiency and aging. *International journal of molecular sciences*, 16(5), 10674-10685. <https://doi.org/10.3390/ijms160510674>
- Croce, A. C., Palladini, G., Ferrigno, A., & Vairetti, M. (2022). Autofluorescence Label-Free Imaging of the Liver Reticular Structure. In G. Bottiroli (Ed.), *Histochemistry of Single Molecules: Methods and Protocols* (pp. 29-35). Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6788-9>
- Cui, X., Xiao, W., You, L., Zhang, F., Cao, X., Feng, J., Zhang, G., Lu, R., Wu, M., Liu, Y., He, Y., Xu, J., Yang, C., Du, Y., & Gao, F. (2019). Age-induced oxidative stress impairs adipogenesis and thermogenesis in brown fat. *FEBS Journal*, 286(14), 2753-2768. <https://doi.org/10.1111/febs.14859>
- Cutler, H. B., Jall-Rogg, S., Thillainadesan, S., Cooke, K. C., Masson, S. W. C., Sligar, J. M., Crowston, J. G., Carroll, L., Stöckli, J., James, D. E., & Madsen, S. (2025). Cold exposure stimulates cross-tissue metabolic rewiring to fuel glucose-dependent thermogenesis in brown adipose tissue. *Science Advances*, 11(24), eadt7369. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adt7369>
- Davies, K. J. (2016). Adaptive homeostasis. *Molecular Aspects of Medicine*, 49, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.04.007>
- Derbré, F., Gomez-Cabrera, M. C., Nascimento, A. L., Sanchis-Gomar, F., Martinez-Bello, V. E., Tresguerres, J. A. F., Fuentes, T., Gratas-Delamarche, A., Monsalve, M., & Viña, J. (2012). Age associated low mitochondrial biogenesis may be explained by lack of response of PGC-1 α to exercise training. *Age*, 34(3), 669-679. <https://doi.org/10.1007/s11357-011-9264-y>
- Elchuri, S., Oberley, T. D., Qi, W., Eisenstein, R. S., Roberts, L. J., Van Remmen, H., Epstein, C. J., & Huang, T.-T. (2005). CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene*, 24(3), 367-380. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208207>
- Elsukova, E., Zamay, T., Kichkailo, A., Yakunenkoy, A., Veprintsev, D. V., Minic, Z., Berezovski, M. V., & Glazyrin, Y. (2025). Intermittent Cold Exposure Induces Distinct Proteomic Signatures in White Adipose Tissue of Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(16), 7898. <https://doi.org/10.3390/ijms26167898>
- Fang, X., Fu, Y., Long, M. J., Haegele, J. A., Ge, E. J., Parvez, S., & Aye, Y. (2013). Temporally controlled targeting of 4-hydroxynonenal to specific proteins in living cells. *Journal of the American Chemical Society*, 135(39), 14496-14499. <https://doi.org/10.1021/ja405400k>
- Ferrucci, L., Gonzalez-Freire, M., Fabbri, E., Simonsick, E., Tanaka, T., Moore, Z., Salimi, S., Sierra, F., & de Cabo, R. (2020). Measuring biological aging in humans: A quest. *Aging Cell*, 1(1), 29-39. <https://doi.org/10.1111/accel.13080>
- Finck, B. N., & Kelly, D. P. (2006). PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(3), 615-622. <https://doi.org/10.1172/JCI27794>
- Florez-Duquet, M., Horwitz, B. A., & McDonald, R. B. (1998). Cellular proliferation and UCP content in brown adipose tissue of cold-exposed aging Fischer 344 rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 274(1), R196-R203. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.274.1.R196>

- Flurkey, K., Astle, C. M., & Harrison, D. E. (2010). Life extension by diet restriction and N-acetyl-L-cysteine in genetically heterogeneous mice. *Journal of Gerontology: Biological Sciences and Medical Sciences*, 65(12), 1275-1284. <https://doi.org/10.1093/gerona/glq155>
- Fregly, M. J., Kikta, D. C., Threatte, R. M., Torres, J. L., & Barney, C. C. (1989). Development of hypertension in rats during chronic exposure to cold. *Journal of Applied Physiology*, 66(2), 741-749. <https://doi.org/10.1152/jappl.1989.66.2.741>
- Fulle, S., Protasi, F., Di Tano, G., Pietrangelo, T., Beltramin, A., Boncompagni, S., Vecchiet, L., & Fanò, G. (2004). The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing. *Experimental Gerontology*, 39(1), 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2003.09.012>
- Galarraga, M., L-López, S., Muñoz, M., De la Cruz, F., & Diéguez, C. (2012). Adiposoft: an automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. *Journal of Lipid Research*, 53(12), 2791-2796. <https://doi.org/10.1194/jlr.D023788>
- Gao, H., Arner, P., Beauchef, G., Guéré, C., Vie, K., Dahlman, I., Mejhert, N., & Rydén, M. (2020a). Age-induced reduction in human lipolysis: a potential role for adipocyte noradrenaline degradation. *Cell Metabolism*, 32(1), 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.06.007>
- Gao, Q., Zhang, G., Zheng, Y., Yang, Y., Chen, C., Xia, J., Liang, L., Lei, C., Hu, Y., Cai, X., Zhang, W., Tang, H., Chen, Y., Huang, A., Wang, K., & Tang, N. (2020b). SLC27A5 deficiency activates NRF2/TXNRD1 pathway by increased lipid peroxidation in HCC. *Cell Death & Differentiation*, 27(3), 1086-1104. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0399-1>
- García-Domínguez, E., García-Domínguez, C., Cabrera-Alarcón, J. L., Muñoz-Hernández, M. D. M., Hernansanz-Agustín, P., Curtabbi, A., Domenech-Fernandez, J., Calvo, E., Vázquez, J., Serrano, A. L., Muñoz-Cánoves, P., Olaso-González, G., Enríquez, J. A., & Gómez-Cabrera, M. C. (2026). Mitochondrial remodeling in skeletal muscle underlies exercise-induced reversal of age-associated functional decline in mice and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 123(14), e2508286123. <https://doi.org/10.1073/pnas.2508286123>
- Gaudio, E., Pannarale, L., Onori, P., & Riggio, O. (2005). Fractal and Fourier analysis of the hepatic sinusoidal network in normal and cirrhotic rat liver. *Journal of Anatomy*, 207(2), 107-115. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2005.00436.x>
- Gentric, G., & Desdouets, C. (2014). Polyploidization in liver tissue. *American Journal of Pathology*, 184(2), 322-331. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.06.035>
- Gladyshev, T. V., & Gladyshev, V. N. (2016). A disease or not a disease? Aging as a pathology. *Trends in Molecular Medicine*, 22(12), 995-996. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.09.009>
- Glatzle, D., Vuilleumier, J. P., Weber, F., & Decker, K. (1974). Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia*, 30, 665-667. <https://doi.org/10.1007/BF01921531>
- Goldberger, A. L., Amaral, L. A. N., Hausdorff, J. M., Ivanov, P. Ch., Peng, C.-K., & Stanley, H. E. (2002). Fractal dynamics in physiology: alterations with disease and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(Suppl 1), 2466-2472. <https://doi.org/10.1073/pnas.012579499>
- Gómez-Serrano, M., Camafeita, E., López, J. A., Rubio, M. A., Bretón, I., García-Consuegra, I., García-Santos, E., Lago, J., Sánchez-Pernaute, A., Torres, A., Vázquez, J., & Peral, B. (2017). Differential proteomic and oxidative profiles unveil dysfunctional protein import to adipocyte mitochondria in obesity-associated aging and diabetes. *Redox Biology*, 11, 415-428. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.013>
- Gonçalves, L. F., Machado, T. Q., Castro-Pinheiro, C., de Souza, N. G., Oliveira, K. J., & Fernandes-Santos, C. (2017). Ageing is associated with brown adipose tissue remodelling and loss of white fat browning in female C57 BL/6 mice. *International journal of experimental pathology*, 98(2), 100-108. <https://doi.org/10.1111/febs.14838>
- Gong, L., Zhao, S., Chu, X., Yang, H., Li, Y., Wei, S., Li, F., Zhang, Y., Li, S., & Jiang, P. (2023). Assessment of cold exposure-induced metabolic changes in mice using untargeted

- metabolomics. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 10, 1228771. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1228771>
- Gonzalez-Hurtado, E., Lee, J., Choi, J., & Wolfgang, M. J. (2018). Fatty acid oxidation is required for active and quiescent brown adipose tissue maintenance and thermogenic programming. *Molecular Metabolism*, 7, 45-56. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.11.004>
- Griffith, O. W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*, 106, 207-212. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90139-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90139-6)
- Gureev, A. P., Shaforostova, E. A., & Popov, V. N. (2019). Regulation of mitochondrial biogenesis as a way for active longevity: interaction between the Nrf2 and PGC-1 α signaling pathways. *Frontiers in genetics*, 10, 435. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00435>
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130-7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
- Halliwell, B. (2024). Understanding mechanisms of antioxidant action in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 25(1), 13-33. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00645-4>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). Free radicals in biology and medicine. Oxford university press.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3), 298-300. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 51-88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>
- He, F., Su, W., Wu, R., Li, H., Lou, L., Wu, A., Xie, L., Du, Y., & Wu, S. (2021). The effect of cold exposure on serum cholesterol is dependent upon ApoE. *Journal of Thermal Biology*, 99, 102972. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.102972>
- Heroux, O., & Campbell, J. S. (1960). A study of the pathology and life span of 6 degree C-and 30 degree C.-acclimated rats. *Laboratory Investigation*, 9, 305-315.
- Higgins, C. (2016). Urea and the clinical value of measuring blood urea concentration. *Acute Care Testing Org*, 22, 1-6.
- Hiroshima, Y., Yamamoto, T., Watanabe, M., Baba, Y., & Shinohara, Y. (2018). Effects of cold exposure on metabolites in brown adipose tissue of rats. *Molecular genetics and metabolism reports*, 15, 36-42. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2018.01.005>
- Hollander, J., Bejma, J., Ookawara, T., Ohno, H., & Ji, L. L. (2000). Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific effect of age. *Mechanisms of Ageing and Development*, 116(1), 33-45. [https://doi.org/10.1016/s0047-6374\(00\)00130-5](https://doi.org/10.1016/s0047-6374(00)00130-5)
- Holloszy, J. O., & Smith, E. K. (1986). Longevity of cold-exposed rats: a reevaluation of the "rate-of-living theory". *Journal of Applied Physiology*, 61(5), 1656-1660. <https://doi.org/10.1152/jappl.1986.61.5.1656>
- Horan, M. A., Little, R. A., Rothwell, N. J., & Stock, M. J. (1988). Changes in body composition, brown adipose tissue activity and thermogenic capacity in BN/BiRij rats undergoing senescence. *Experimental Gerontology*, 23(6), 455-461. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(88\)90057-5](https://doi.org/10.1016/0531-5565(88)90057-5)
- Horn, D. B., Podolin, D. A., Friedman, J. E., Scholnick, D. A., & Mazzeo, R. S. (1997). Alterations in key gluconeogenic regulators with age and endurance training. *Metabolism*, 46(4), 414-419. [https://doi.org/10.1016/s0026-0495\(97\)90058-5](https://doi.org/10.1016/s0026-0495(97)90058-5)
- Horrell, H. D., Lindeque, A., Farrell, A. P., Seymour, R. S., White, C. R., Kruger, K. M., & Snelling, E. P. (2022). Relationship between capillaries, mitochondria and maximum power of the heart: a meta-study from shrew to elephant. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 289(1968). <https://doi.org/10.1098/rspb.2021.2461>
- Hotta, K., Bodkin, N. L., Gustafson, T. A., Yoshioka, S., Ortmeyer, H. K., & Hansen, B. C. (1999). Age-related adipose tissue mRNA expression of ADD1/SREBP1, PPAR γ , lipoprotein lipase,

- and GLUT4 glucose transporter in rhesus monkeys. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 54(5), B183-B188. <https://doi.org/10.1093/gerona/54.5.B183>
- Huang, C. H., Huang, Y. L., Shen, Z. Q., Lin, C. H., & Tsai, T. F. (2021). Cisd2 preserves the youthful pattern of the liver proteome during natural aging of mice. *Biomedicines*, 9(9), 1229. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091229>
- Huang, D. D., Fan, S. D., Chen, X. Y., Yan, X. L., Zhang, X. Z., Ma, B. W., Yu, D. Y., Xiao, W. Y., Zhuang, C.-L., & Yu, Z. (2019). Nrf2 deficiency exacerbates frailty and sarcopenia by impairing skeletal muscle mitochondrial biogenesis and dynamics in an age-dependent manner. *Experimental Gerontology*, 119, 61-73. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.01.022>
- Hubatsch, I., Ridderström, M., & Mannervik, B. (1998). Human glutathione transferase A4-4: An alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation. *Biochemical Journal*, 330(1), 175-179. <https://doi.org/10.1042/bj3300175>
- Hunt, N. J., Kang, S. W. S., Lockwood, G. P., Le Couteur, D. G., & Cogger, V. C. (2019). Hallmarks of aging in the liver. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 1151-1161. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.07.021>
- Ibayashi, Y., Hasuzawa, N., Nomura, S., Kabashima, M., Nagayama, A., Iwata, S., Kitamura, M., Ashida, K., Moriyama, Y., Yamamoto, K., Nomura, M., Wang, L., & Li, H. (2024). Mitochondrial fission is required for thermogenesis in brown adipose tissue. *Plos one*, 19(12), e0312352. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0312352>
- Izumi-Mishima, Y., Tsutsumi, R., Shiuchi, T., Fujimoto, S., Taniguchi, M., Sugiuchi, M., Tsutsumi, M., Okamatsu-Ogura, Y., Yoneshiro, T., Kuroda, M., Nomura, K., & Sakaue, H. (2025). Brown adipose tissue and skeletal muscle coordinately contribute to thermogenesis in mice. *eLife*, 13, RP99982. <https://doi.org/10.7554/eLife.99982.1>
- Janković, A., Buzadžić, B., Korać, A., Petrović, V., Vasiljević, A., & Korać, B. (2009). Antioxidative defense organization in retroperitoneal white adipose tissue during acclimation to cold—the involvement of l-arginine/NO pathway. *Journal of Thermal Biology*, 34(7), 358-365. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2009.07.004>
- Janković, A., Golić, I., Markelić, M., Stančić, A., Otašević, V., Buzadžić, B., Korać, A., & Korać, B. (2015). Two key temporally distinguishable molecular and cellular components of white adipose tissue browning during cold acclimation. *The Journal of Physiology*, 593(15), 3267-3280. <https://doi.org/10.1113/JP270805>
- Janković, A., Korać, A., Buzadžić, B., Otašević, V., Stančić, A., Vučetić, M., Markelić, M., Veličković, K., Golić, I., & Korac, B. (2013). Endocrine and metabolic signaling in retroperitoneal white adipose tissue remodeling during cold acclimation. *Journal of Obesity*, 2013(1), 937572. <https://doi.org/10.1155/2013/937572>
- Jankowski, C. S. R., Samarah, L. Z., MacArthur, M. R., Mitchell, S. J., Weilandt, D. R., Hunter, C. J., Zeng, X., McReynolds, M. R., & Rabinowitz, J. D. (2025). Aged mice exhibit widespread metabolic changes but preserved major fluxes. *Cell Metabolism*, 37(11), 2280-2294. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2025.09.009>
- Janovska, P., Zouhar, P., Bardova, K., Otahal, J., Vrbacky, M., Mracek, T., Adamcova, K., Lenkova, L., Funda, J., Cajka, T., Drahota, Z., Stanic, S., Rustan, A. C., Horakova, O., Houstek, J., Rossmeisl, M., & Kopecky, J. (2023). Impairment of adrenergically-regulated thermogenesis in brown fat of obesity-resistant mice is compensated by non-shivering thermogenesis in skeletal muscle. *Molecular Metabolism*, 69, 101683. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2023.101683>
- Jeremić, R., Rajković, N., Peković, S., Dacić, S., Lavrnja, I., Bjelobaba, I., Jeremić, M., Baščarević, V., Brkić, P., Milošević, N. T., & Zaletel, I. (2025). Fractal and Multifractal Analysis as Methods of Quantifying Dendritic Complexity Changes in the Traumatic Brain Injury Model. *Fractal and Fractional*, 9(9), 590. <https://doi.org/10.3390/fractalfract9090590>

- Ji, L. L., Dillon, D., & Wu, E. (1990). Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 258(4), R918-R923. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1990.258.4.R918>
- Jiang, Y., Xu, B., Zhang, K., Zhu, W., Lian, X., Xu, Y., Chen, Z., Liu, L., & Guo, Z. (2023). The association of lipid metabolism and sarcopenia among older patients: a cross-sectional study. *Scientific reports*, 13(1), 17538. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44704-4>
- Jie, C. V. M. L., Delparente, A., Wang, T., Reichert, L., Krajnovic, P., Schläppi, M., Reininger, L., Brandt, L. T. L., Keller, C., Orts, J., Riek, R., Krämer, S. D., Stoffel, M., Wolfrum, C., Schibli, R., & Mu, L. (2026). ATP synthase is a promising target for identifying activated and non-activated adipose tissues. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-026-71343-w>
- Johannsen, M., O'Brien, K., & Oliver, S. R. (2026). Chronic cold induces some similar effects to endurance exercise on body morphometrics and skeletal muscle structure in rats. *Journal of Comparative Physiology B*, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s00360-026-01660-5>
- Johnson, H. D., Kintner, L. D., & Kibler, H. H. (1963). Effects of 48 F. (8.9 C.) and 83 F. (28.4 C.) on Longevity and Pathology of Male Rats. *Journal of Gerontology*, 18(1), 29-36. <https://doi.org/10.1093/geronj/18.1.29>
- Jones, D. P., & Sies, H. (2015). The redox code. *Antioxidants & Redox Signaling*, 23(9), 734-746. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6247>
- Kajimura, S., Spiegelman, B. M., & Seale, P. (2015). Brown and beige fat: physiological roles beyond heat generation. *Cell Metabolism*, 22(4), 546-559. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.009>
- Kalia, V., Belsky, D. W., Baccarelli, A. A., & Miller, G. W. (2022). An exposomic framework to uncover environmental drivers of aging. *Exposome*, 2(1), osac002. <https://doi.org/10.1093/exposome/osac002>
- Kallio, A. E., Davydova, E. A., Mishchenko, T. A., Sivtseva, T. M., Nikolaeva, M. M., Burmistrov, D. E., Bolshakova, A. D., Tsybusov, S. N., Zakharova, R. N., & Vedunova, M. V. (2025). Age-Related Human Adaptation to Extreme Climatic Factors and Environmental Conditions. *Biology*, 14(12), 1668. <https://doi.org/10.3390/biology14121668>
- Kano, R., Takeda, R., Sotani, Y., Takagi, R., Tabuchi, A., Shirakawa, H., Poole, D. C., Kano, Y., & Hoshino, D. (2025). Cooling-induced changes in intracellular hydrogen peroxide and gene expression in mouse skeletal muscle in vivo. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00014.2025>
- Karperien, A. (2013). FracLac for ImageJ. <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/fracLac/FLHelp/Introduction.htm>
- Kawate, R., Talan, M. I., & Engel, B. T. (1993). Aged C57BL/6J mice respond to cold with increased sympathetic nervous activity to interscapular brown adipose tissue. *Journal of Gerontology*, 48(5), B180-B183. <https://doi.org/10.1093/geronj/48.5.b180>
- Keipert, S., Klaus, S., Heldmaier, G., & Jastroch, M. (2010). UCP1 ectopically expressed in murine muscle displays native function and mitigates mitochondrial superoxide production. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797(3), 324-330. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.11.008>
- Kenkel, N. C., & Walker, D. J. (1996). Fractals in the biological sciences. *Coenoses*, 77-100.
- Kesić, S., & Spasić, S. Z. (2016). Application of Higuchi's fractal dimension from basic to clinical neurophysiology: a review. *Computer methods and programs in biomedicine*, 133, 55-70. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2016.05.014>
- Kiang-Ulrich, M., & Horvath, S. M. (1985). Age-related differences in response to acute cold challenge (-10°C) in male F344 rats. *Experimental Gerontology*, 20(3-4), 201-209. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(85\)90038-5](https://doi.org/10.1016/0531-5565(85)90038-5)
- Kibler, H. H., Silsby, H. D., & Johnson, H. D. (1963). Metabolic trends and life span of rats living at 9 C and 28 C. *Journal of Gerontology*, 18(3), 235-239. <https://doi.org/10.1093/geronj/18.3.235>

- Kim, K., Cho, S. C., Cova, A., Jang, I. S., & Park, S. C. (2009). Alterations of epinephrine-induced gluconeogenesis in aging. *Experimental & Molecular Medicine*, 41(5), 334-340. <https://doi.org/10.3858/emm.2009.41.5.037>
- Ku, H. H., & Sohal, R. S. (1993). Comparison of mitochondrial pro-oxidant generation and anti-oxidant defenses between rat and pigeon: possible basis of variation in longevity and metabolic potential. *Mechanisms of Ageing and Development*, 72(1), 67-76. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(93\)90132-b](https://doi.org/10.1016/0047-6374(93)90132-b)
- Ku, H. H., Brunk, U. T., & Sohal, R. S. (1993). Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radical Biology and Medicine*, 15(6), 621-627. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90165-q](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90165-q)
- Lacko, A. G., & Davis, J. L. (1979). Age-related changes in rat and primate plasma cholesterol metabolism. *Journal of the American Geriatrics Society*, 27(5), 212-217. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1979.tb06458.x>
- Lagarde, D., Jeanson, Y., Portais, J. C., Galinier, A., Ader, I., Casteilla, L., & Carrière, A. (2021). Lactate fluxes and plasticity of adipose tissues: a redox perspective. *Frontiers in Physiology*, 12, 689747. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.689747>
- Li, F. H., Sun, L., Wu, D. S., Gao, H. E., & Min, Z. (2019). Proteomics-based identification of different training adaptations of aged skeletal muscle following long-term high-intensity interval and moderate-intensity continuous training in aged rats. *Aging (Albany NY)*, 11(12), 4159. <https://doi.org/10.18632/aging.102596>
- Li, J., Huang, F., Li, X., Su, Y., Li, H., & Bao, J. (2017). Effects of intermittent cold stimulation on antioxidant capacity and mRNA expression in broilers. *Livestock Science*, 205, 78-84. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.08.004>
- Li, Y., Ping, X., Zhang, Y., Li, G., Zhang, T., Chen, G., Ma, X., Wang, D., & Xu, L. (2021a). Comparative transcriptome profiling of cold exposure and β 3-AR agonist CL316,243-induced browning of white fat. *Frontiers in Physiology*, 12, 667698. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.667698>
- Li, Z., Zhang, Z., Ren, Y., Wang, Y., Fang, J., Yue, H., Ma, S., & Guan, F. (2021b). Aging and age-related diseases: from mechanisms to therapeutic strategies. *Biogerontology*, 22(2), 165-187. <https://doi.org/10.1007/s10522-021-09910-5>
- Libertini, G., Rengo, G., & Ferrara, N. (2017). Aging and aging theories. *Journal of Gerontology and Geriatrics*, 65, 59-77. <https://doi.org/10.36150/2499-6564-2017-006>
- Lin, T. Y., Cantley, L. C., & DeNicola, G. M. (2016). NRF2 rewires cellular metabolism to support the antioxidant response. In *A Master Regulator of Oxidative Stress-The Transcription Factor Nrf2*. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/65141>
- Lipsitz, L. A., & Goldberger, A. L. (1992). Loss of 'complexity' and aging. Potential applications of fractals and chaos theory to senescence. *JAMA*, 267(13), 1806-1809.
- Liu, J., Huang, Q., & Liu, F. (2025b). Fat talks first: how adipose tissue sets the pace of aging? *Life Medicine*, 4(5), lna028. <https://doi.org/10.1093/lifemedi/lnaf028>
- Liu, X., He, A., Lu, D., Hu, D., Tan, M., Abere, A., Goodarzi, P., Ahmad, B., Kleiboeker, B., Finck, B. N., Zayed, M., Funai, K., Brestoff, J. R., Javaheri, A., Weisensee, P., Mittendorfer, B., Hsu, F.-F., Van Veldhoven, P. P., Razani, B., Semenkovich, C. F., & Lodhi, I. J. (2025a). Peroxisomal metabolism of branched fatty acids regulates energy homeostasis. *Nature*, 646(8087), 1223-1231. <https://doi.org/10.1038/s41586-025-09517-7>
- Lloyd, D., Aon, M. A., & Cortassa, S. (2001). Why homeodynamics, not homeostasis? *The Scientific World Journal*, 1, 133-145. <https://doi.org/10.1100/tsw.2001.20>
- Lombardi, A., Silvestri, E., Cioffi, F., Senese, R., Lanni, A., Goglia, F., de Lange, P., & Moreno, M. (2009). Defining the transcriptomic and proteomic profiles of rat ageing skeletal muscle by the use of a cDNA array, 2D-and Blue native-PAGE approach. *Journal of Proteomics*, 72(4), 708-721. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.02.007>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023). Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*, 186(2), 243-278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001>

- Lopez-Torres, M., Perez-Campo, R., Rojas, C., Cadenas, S., & Barja, G. (1993). Maximum life span in vertebrates: relationship with liver antioxidant enzymes, glutathione system, ascorbate, urate, sensitivity to peroxidation, true malondialdehyde, in vivo H₂O₂, and basal and maximum aerobic capacity. *Mechanisms of Ageing and Development*, 70(3), 177-199. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(93\)90047-u](https://doi.org/10.1016/0047-6374(93)90047-u)
- Lopez-Torres, M., Perez-Ocampo, R., & de Quiroga, G. B. (1991). Aging in brown fat: antioxidant defenses and oxidative stress. *Mechanisms of Ageing and Development*, 59(1-2), 129-137. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(91\)90082-t](https://doi.org/10.1016/0047-6374(91)90082-t)
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Luthman, M., & Holmgren, A. (1982). Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization. *Biochemistry*, 21, 6628-6633. <https://doi.org/10.1021/bi00269a003>
- Maeso-Díaz, R., Ortega-Ribera, M., Fernández-Iglesias, A., Hide, D., Muñoz, L., Hessheimer, A. J., Vila, S., Francés, R., Fondevila, C., Albillos, A., Peralta, C., Bosch, J., Tacke, F., Cogger, V. C., & Gracia-Sancho, J. (2018). Effects of aging on liver microcirculatory function and sinusoidal phenotype. *Aging Cell*, 17(6), e12829. <https://doi.org/10.1111/accel.12829>
- Maher, P. (2005). The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Research Reviews*, 4(2), 288-314. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2005.02.005>
- Maldonado-Rengel, R., Sócola-Barsallo, Z., & Vásquez, B. (2024). Alterations of Liver Morphology in Senescent Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(18), 9846. <https://doi.org/10.3390/ijms25189846>
- Malik, N., & Shaw, R. J. (2025). The AMPK pathway: Molecular rejuvenation of metabolism and mitochondria. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 41(1), 375-402. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-120420-094431>
- Mandelbrot, B. B. (1983). The fractal geometry of nature/Revised and enlarged edition. W. H. Freeman. New York.
- Masoro, E. J., Felts, J. M., & Panagos, S. S. (1957). Effect of prolonged cold exposure on hepatic lipogenesis. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 189(3), 479-482. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1957.189.3.479>
- Massie, H. R., Aiello, V. R., & Doherty, T. J. (1984). Dietary vitamin C improves the survival of mice. *Gerontology*, 30(6), 371-375. <https://doi.org/10.1159/000212659>
- Matoba, H., & Murakami, N. (1981). Histochemical changes of rat skeletal muscles induced by cold acclimation. *The Japanese Journal of Physiology*, 31(2), 273-278. <https://doi.org/10.2170/jjphysiol.31.273>
- McDonald, R. B. (2019). *Biology of Aging* (2nd ed.). Garland Science.
- McDonald, R. B., Murtagh, C. M., & Horwitz, B. A. (1994). Age and gender effects on glucose utilization in skeletal muscle and brown adipose tissue of cold-exposed rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 207(1), 102-109. <https://doi.org/10.3181/00379727-207-43798>
- McEwen, B. S., & Stellar, E. (1993). Stress and the individual: Mechanisms leading to disease. *Archives of Internal Medicine*, 153(18), 2093-2101. <https://doi.org/10.1001/archinte.1993.00410180039004>
- Menassa, M., Stronks, K., Khatami, F., Roa Díaz, Z. M., Pano Espinola, O., Gamba, M., Itodo, O. A., Buttia, C., Wehrli, F., Minder, B., Rivas Velarde, M., & Franco, O. H. (2023). Concepts and definitions of healthy ageing: a systematic review and synthesis of theoretical models. *EClinicalMedicine*, 56. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101821>
- Milković, L., Žarković, N., Marušić, Z., Žarković, K., & Jaganjac, M. (2023). The 4-hydroxynonenal-protein adducts and their biological relevance: are some proteins preferred targets? *Antioxidants*, 12(4), 856. <https://doi.org/10.3390/antiox12040856>
- Miller, C. J., Gounder, S. S., Kannan, S., Goutam, K., Muthusamy, V. R., Firpo, M. A., Symons, J. D., Paine, R., III, Hoidal, J. R., & Rajasekaran, N. S. (2012). Disruption of Nrf2/ARE signaling impairs antioxidant mechanisms and promotes cell degradation pathways in aged skeletal

- muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(6), 1038-1050. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.02.007>
- Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 247, 3170-3175. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)45228-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)45228-9)
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191(4784), 144-148. <https://doi.org/10.1038/191144a0>
- Mitrović, M., Horakova, O., Riecan, M., Kleinova, V., Cajka, T., Rossmeislova, L., Kuda, O., & Rossmeisl, M. (2026). Acute exercise-induced lipolysis and increase in levels of fatty acid esters of hydroxy fatty acids in adipose tissue are impaired in obese and aged mice. *Experimental Physiology*, 111, 4457-4497. <https://doi.org/10.1113/ep093561>
- Morroni, M., Barbatelli, G., Zingaretti, M. C., & Cinti, S. (1995). Immunohistochemical, ultrastructural and morphometric evidence for brown adipose tissue. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 19(2), 126-131.
- Mouisel, E., Bodon, A., Noll, C., Cassant-Sourdy, S., Marques, M.-A., Flores-Flores, R., Riant, E., Bergoglio, C., Vezin, P., Caspar-Bauguil, S., Fournes-Fraresso, C., Tavernier, G., Acheikh Ibn Oumar, K., Gourdy, P., Blondin, D. P., Denechaud, P.-D., Carpentier, A. C., & Langin, D. (2025). Cold-induced thermogenesis requires neutral-lipase-mediated intracellular lipolysis in brown adipocytes. *Cell Metabolism*, 37(2), 429-440. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2024.10.018>
- Muhammad, I., Steinberg, F., Larsen, J., & Rucker, R. B. (2025). Global warming and obesity: External heat exposure as a modulator of energy balance. *FASEB BioAdvances*, 7(4), e1487. <https://doi.org/10.1096/fba.2024-00140>
- Nakagawa, H., & Nagai, K. (1971). Cold adaptation I. Effect of cold exposure on gluconeogenesis. *The Journal of Biochemistry*, 69(5), 923-934.
- Naren, Q., Sousa-Filho, C. P. B., Pang, W., & Petrovic, N. (2026). Only a fraction of UCP1 is required to sustain adaptive nonshivering thermogenesis in the cold. *bioRxiv*, 2026-08. <https://doi.org/10.64898/2026.08.06.743367>
- Navarro, A., & Boveris, A. (2004). Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287(5), R1244-R1249. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00226.2004>
- Nedergaard, J., & Cannon, B. (2018). Brown adipose tissue as a heat-producing thermoeffector. *Handbook of clinical neurology*, 156, 137-152. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63912-7.00009-6>
- Nelson, D. L., Cox, M. M., & Hoskins, A. A. (2021). *Lehninger Principles of Biochemistry* (8th ed.). W.H. Freeman/Macmillan Learning.
- Neumann, C. A., Krause, D. S., Carman, C. V., Das, S., Dubey, D. P., Abraham, J. L., Bronson, R. T., Fujiwara, Y., Orkin, S. H., & Van Etten, R. A. (2003). Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature*, 424(6948), 561-565. <https://doi.org/10.1038/nature01819>
- Nguyen, T. T., & Corvera, S. (2024). Adipose tissue as a linchpin of organismal ageing. *Nature Metabolism*, 6(5), 793-807. <https://doi.org/10.1038/s42255-024-01046-3>
- Ni, W., Nikolaou, N., Ward-Caviness, C. K., Breitner, S., Wolf, K., Zhang, S., Wilson, R., Waldenberger, M., Peters, A., & Schneider, A. (2023). Associations between medium-and long-term exposure to air temperature and epigenetic age acceleration. *Environment International*, 178, 108109. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.108109>
- Nicholls, D. G., & Brand, M. D. (2023). A critical assessment of the role of creatine in brown adipose tissue thermogenesis. *Nature Metabolism*, 5(1), 21-28. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00718-2>
- Oeckl, J., Janovska, P., Adamcova, K., Bardova, K., Brunner, S., Dieckmann, S., Ecker, J., Fromme, T., Funda, J., Gantert, T., Giansanti, P., Hidrobo, M. S., Kuda, O., Kuster, B., Li, Y., Pohl, R., Schmitt, S., Schweizer, S., Zischka, H., Zouhar, P., & Klingenspor, M. (2022). Loss of UCP1

- function augments recruitment of futile lipid cycling for thermogenesis in murine brown fat. *Molecular Metabolism*, 61, 101499. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101499>
- Ostrander, C. M., Johnson, A. C., & Anbar, A. D. (2021). Earth's first redox revolution. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 49(1), 337-366. <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-072020-055249>
- Ozabrahamyan, S., Nirengi, S., Vidal, P., Baer, L. A., & Stanford, K. I. (2026). Sex-Dependent S1P-Related Gene Expression in Brown Adipose Tissue Across Exercise and Thermal Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 27(15), 6674. <https://doi.org/10.3390/ijms27156674>
- Page, M. M., Richardson, J., Wiens, B. E., Tiedtke, E., Peters, C. W., Faure, P. A., Burness, G., & Stuart, J. A. (2010). Antioxidant enzyme activities are not broadly correlated with longevity in 14 vertebrate endotherm species. *Age*, 32(2), 255-270. <https://doi.org/10.1007/s11357-009-9121-8>
- Paglia, D. E., & Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidases. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70, 158-169.
- Pamplona, R., Portero-Otin, M., Riba, D., Ledo, F., Gredilla, R., Herrero, A., & Barja, G. (1999). Heart fatty acid unsaturation and lipid peroxidation, and aging rate, are lower in the Canary and the parakeet than in the mouse. *Aging Clinical and Experimental Research*, 11(1), 44-49. <https://doi.org/10.1007/BF03339789>
- Pamplona, R., Prat, J., Cadenas, S., Rojas, C., Perez-Campo, R., & Torres, M. L. (1996). Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from long-lived species: the pigeon and human case. *Mechanisms of Ageing and Development*, 86(1), 53-66. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(95\)01677-x](https://doi.org/10.1016/0047-6374(95)01677-x)
- Pan, R., & Chen, Y. (2021). Management of oxidative stress: Crosstalk between brown/beige adipose tissues and skeletal muscles. *Frontiers in Physiology*, 12, 712372. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.712372>
- Pantić, I., Pantić, J. P., & Radojević-Škodrić, S. (2022). Application of fractal and textural analysis in medical physiology, pathophysiology and pathology. *Medicinska istraživanja*, 55(3). <https://doi.org/10.5937/medi55-40351>
- Pantić, I., Petrović, D., Paunović, J., Vučević, D., Radosavljević, T., & Pantić, S. (2016). Age-related reduction of chromatin fractal dimension in toluidine blue - stained hepatocytes. *Mechanisms of Ageing and Development*, 157, 30-34. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.07.002>
- Park, G., Haley, J. A., Le, J., Jung, S. M., Fitzgibbons, T. P., Korobkina, E. D., Li, H., Fluharty, S. M., Chen, Q., Spinelli, J. B., Trivedi, C. M., Jang, C., & Guertin, D. A. (2023). Quantitative analysis of metabolic fluxes in brown fat and skeletal muscle during thermogenesis. *Nature Metabolism*, 5(7), 1204-1220. <https://doi.org/10.1038/s42255-023-00825-8>
- Parvez, S., Fu, Y., Li, J., Long, M. J. C., Lin, H.-Y., Lee, D. K., Hu, G. S., & Aye, Y. (2015). Substoichiometric hydroxynonenylation of a single protein recapitulates whole-cell-stimulated antioxidant response. *Journal of the American Chemical Society*, 137(1), 10-13. <https://doi.org/10.1021/ja5084249>
- Paulo, E., Wu, Y., & Wang, B. (2026). Cox10-mediated mitochondrial respiration in brown adipocytes regulates adaptive thermogenesis and systemic metabolism. *iScience*, 29(7), 116442. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2026.116442>
- Penner, P. E., & Himms-Hagen, J. (1968). Gluconeogenesis in rats during cold acclimation. *Canadian journal of biochemistry*, 46(10), 1205-1213. <https://doi.org/10.1139/o68-180>
- Pérez, V. I., Cortez, L. A., Lew, C. M., Rodriguez, M., Webb, C. R., Van Remmen, H., Chaudhuri, A., Qi, W., Lee, S., Bokov, A., Fok, W., Jones, D., Richardson, A., Yodoi, J., Zhang, Y., Tominaga, K., Hubbard, G. B., & Ikeno, Y. (2011). Thioredoxin 1 overexpression extends mainly the earlier part of life span in mice. *Journal of Gerontology: Biological Sciences and Medical Sciences*, 66(12), 1286-1299. <https://doi.org/10.1093/gerona/glr125>

- Pérez, V. I., Lew, C. M., Cortez, L. A., Webb, C. R., Rodriguez, M., Liu, Y., Qi, W., Li, Y., Chaudhuri, A., Van Remmen, H., Richardson, A., & Ikeno, Y. (2008). Thioredoxin 2 haploinsufficiency in mice results in impaired mitochondrial function and increased oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(5), 882-892. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.11.018>
- Pérez-Campo, R., Lopez-Torres, M., Rojas, C., Cadenas, S., & Barja, G. (1994). Longevity and antioxidant enzymes, non-enzymatic antioxidants and oxidative stress in the vertebrate lung: a comparative study. *Journal of Comparative Physiology B*, 163(8), 682-689. <https://doi.org/10.1007/BF00301633>
- Pérez-Estrada, J. R., Hernández-García, D., Leyva-Castro, F., Ramos-León, J., Cuevas-Benítez, O., Díaz-Muñoz, M., Castro-Obregón, S., Ramírez-Solís, R., García, C., & Covarrubias, L. (2019). Reduced lifespan of mice lacking catalase correlates with altered lipid metabolism without oxidative damage or premature aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 135, 102-115. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.02.016>
- Periasamy, M., Herrera, J. L., & Reis, F. C. (2017). Skeletal muscle thermogenesis and its role in whole body energy metabolism. *Diabetes & metabolism journal*, 41(5), 327. <https://doi.org/10.4093/dmj.2017.41.5.327>
- Perperopoulou, F., Ataya, F. S., Fouad, D., Malik, A., Saeed, H. M., & Labrou, N. E. (2016). Biochemical characterization of the detoxifying enzyme glutathione transferase P1-1 from the camel *Camelus dromedarius*. *Cell biochemistry and biophysics*, 74(4), 459-472. <https://doi.org/10.1007/s12013-016-0761-6>
- Petrović, V. M., Milić, B., Spasić, M., & Saičić, Z. (1986). Copper-zinc containing and manganese containing superoxide dismutase in the ground squirrel *Citellus citellus*—the effect of hibernation. *Free Radical Research*, 1, 339-346. <https://doi.org/10.3109/10715768609080973>
- Petrović, V., Buzadžić, B., Korać, A., Vasiljević, A., Janković, A., & Mićunović, K. (2008). Antioxidative defence alterations in skeletal muscle during prolonged acclimation to cold: role of L-arginine/NO-producing pathway. *Journal of Experimental Biology*, 211(1), 114-120. <https://doi.org/10.1242/jeb.012674>
- Petrović, V., Korać, A., Buzadžić, B., & Korać, B. (2005). The effects of L-arginine and L-NAME supplementation on redox-regulation and thermogenesis in interscapular brown adipose tissue. *Journal of Experimental Biology*, 208(22), 4263-4271. <https://doi.org/10.1242/jeb.01895>
- Pollera, M., Locci-Cubeddu, T., & Bergamini, E. (1983). Effect of cold adaptation on liver peroxisomes and peroxisomal oxidative activities of rat. A morphometric/stereologic and biochemical study. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*, 91(1), 35-42. <https://doi.org/10.3109/13813458309106476>
- Puigserver, P., Rhee, J., Lin, J., Wu, Z., Yoon, J. C., Zhang, C.-Y., Krauss, S., Mootha, V. K., Lowell, B. B., & Spiegelman, B. M. (2001). Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPAR γ coactivator-1. *Molecular Cell*, 8(5), 971-982. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00390-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00390-2)
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M., & Spiegelman, B. M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92(6), 829-839. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81410-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81410-5)
- Raaj, I., Thalamati, M., Gowda, V., & Rao, A. (2024). The role of the atherogenic index of plasma and the Castelli risk index I and II in cardiovascular disease. *Cureus*, 16(11). <https://doi.org/10.7759/cureus.74644>
- Ran, Q., Liang, H., Ikeno, Y., Qi, W., Prolla, T. A., & Roberts, L. J. (2007). Reduction in glutathione peroxidase 4 increases life span through increased sensitivity to apoptosis. *Journal of Gerontology: Biological Sciences and Medical Sciences*, 62(9), 932-942. <https://doi.org/10.1093/gerona/62.9.932>
- Rando, T. A., & Wyss-Coray, T. (2021). Asynchronous, contagious and digital aging. *Nature Aging*, 1(1), 29-35. <https://doi.org/10.1038/s43587-020-00015-1>

- Russ, D. W., Manickam, R., & Tipparaju, S. M. (2025). Targeting intramyocellular lipids to improve aging muscle function. *Lipids in Health and Disease*, 24(1), 197. <https://doi.org/10.1186/s12944-025-02622-6>
- Saltykova, M. M. (2019). Cold adaptation as a means of increasing antioxidant protection. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 49(3), 323-331. <https://doi.org/10.1007/s11055-019-00735-x>
- Sánchez-Nuño, S., Santocildes, G., Rebull, J., Bardallo, R. G., Girabent-Farrés, M., Viscor, G., Carbonell, T., & Torrella, J. R. (2024). Effects of intermittent exposure to hypobaric hypoxia and cold on skeletal muscle regeneration: Mitochondrial dynamics, protein oxidation and turnover. *Free Radical Biology and Medicine*, 225, 286-295. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2024.09.032>
- Santocildes, G., Pagès, T., Viscor, G., & Torrella, J. R. (2025). Effects of intermittent exposure to hypobaria and cold on the microarchitecture and morphofunctional profile of rat gastrocnemius muscle. *Anatomical Record*, 1-15. <https://doi.org/10.1002/ar.70109>
- Sarver, D. C., Saqib, M., Chen, F., & Wong, G. W. (2024). Mitochondrial respiration atlas reveals differential changes in mitochondrial function across sex and age. *eLife*, 13, RP96926. <https://doi.org/10.7554/eLife.96926.4>
- Scarpace, P. J., Matheny, M., Borst, S., & Tümer, N. (1994). Thermoregulation with age: role of thermogenesis and uncoupling protein expression in brown adipose tissue. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 205(2), 154-161. <https://doi.org/10.3181/00379727-205-43691>
- Scarpace, P. J., Mooradian, A. D., & Morley, J. E. (1988). Age-associated decrease in beta-adrenergic receptors and adenylate cyclase activity in rat brown adipose tissue. *Journal of Gerontology*, 43(3), B65-B70. <https://doi.org/10.1093/geronj/43.3.b65>
- Schaur, R. J., Siems, W., Bresgen, N., & Eckl, P. M. (2015). 4-Hydroxy-nonenal—A bioactive lipid peroxidation product. *Biomolecules*, 5(4), 2247-2337. <https://doi.org/10.3390/biom5042247>
- Schmidlin, C. J., Dodson, M. B., Madhavan, L., & Zhang, D. D. (2019). Redox regulation by NRF2 in aging and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 134, 702-707. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.016>
- Schmucker, D. L. (1998). Aging and the liver: an update. *Journal of Gerontology: Biological Sciences and Medical Sciences*, 53(5), B315-B321. <https://doi.org/10.1093/gerona/53A.5.B315>
- Schriner, S. E., Linford, N. J., Martin, G. M., Treuting, P., Ogburn, C. E., Emond, M., Coskun, P. E., Ladiges, W., Wolf, N., Van Remmen, H., Wallace, D. C., & Rabinovitch, P. S. (2005). Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science*, 308(5730), 1909-1911. <https://doi.org/10.1126/science.1106653>
- Selman, C., Grune, T., Stolzing, A., Jakstadt, M., McLaren, J. S., & Speakman, J. R. (2002). The consequences of acute cold exposure on protein oxidation and proteasome activity in short-tailed field voles, *Microtus agrestis*. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(2), 259-265. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00874-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00874-2)
- Selman, C., McLaren, J. S., Collins, A. R., Duthie, G. G., & Speakman, J. R. (2000). Effect of long-term cold exposure on antioxidant enzyme activities in a small mammal. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(8), 1279-1285. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00263-x](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00263-x)
- Selman, C., McLaren, J. S., Collins, A. R., Duthie, G. G., & Speakman, J. R. (2008). The impact of experimentally elevated energy expenditure on oxidative stress and lifespan in the short-tailed field vole *Microtus agrestis*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1645), 1907-1916. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.0355>
- Selman, C., McLaren, J. S., Collins, A. R., Duthie, G. G., & Speakman, J. R. (2013). Deleterious consequences of antioxidant supplementation on lifespan in a wild-derived mammal. *Biology Letters*, 9(4), 20130432. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2013.0432>
- Sepa-Kishi, D. M., Katsnelson, G., Bikopoulos, G., Iqbal, A., & Ceddia, R. B. (2018). Cold acclimation reduces hepatic protein kinase B and AMP-activated protein kinase

- phosphorylation and increases gluconeogenesis in rats. *Physiological Reports*, 6(5), e13592. <https://doi.org/10.14814/phy2.13592>
- Shams, S., Amirinejad, M., Amani-Shalamzari, S., Rajabi, H., & Suzuki, K. (2023). Swimming in cold water upregulates genes involved in thermogenesis and the browning of white adipose tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 265, 110834. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2023.110834>
- Sharma, R., & Diwan, B. (2023). Lipids and the hallmarks of ageing: from pathology to interventions. *Mechanisms of Ageing and Development*, 215, 111858. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2023.111858>
- Shields, H. J., Traa, A., & Van Raamsdonk, J. M. (2021). Beneficial and detrimental effects of reactive oxygen species on lifespan: a comprehensive review. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 628157. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.628157>
- Shiels, P., Neytchev, O., Borland, G., Germushkina, P., Johnson, R., Stenvinkel, P., & Woods, T. (2025). Ignoring the planet: A critical blind spot for research on ageing. *Journal of Internal Medicine*, 298(6), 578-590. <https://doi.org/10.1111/joim.70032>
- Shinde, A. B., Song, A., & Wang, Q. A. (2021). Brown adipose tissue heterogeneity, energy metabolism, and beyond. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 651763. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.651763>
- Simcox, J., Geoghegan, G., Maschek, J. A., Bensard, C. L., Pasquali, M., Miao, R., Lee, S., Jiang, L., Huck, I., Kershaw, E. E., Donato, A. J., Apte, U., Longo, N., Rutter, J., Schreiber, R., Zechner, R., Cox, J., & Villanueva, C. J. (2017). Global analysis of plasma lipids identifies liver-derived acylcarnitines as a fuel source for brown fat thermogenesis. *Cell Metabolism*, 26(3), 509-522. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.08.006>
- Singh, S. P., Niemczyk, M., Saini, D., Sadovov, V., Zimniak, L., & Zimniak, P. (2010). Disruption of the mGsta4 gene increases life span of C57BL mice. *Journal of Gerontology: Biological Sciences and Medical Sciences*, 65(1), 14-23. <https://doi.org/10.1093/gerona/glp165>
- Skulachev, V. P. (1998). Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1363(2), 100-124. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(97\)00091-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(97)00091-1)
- Smith, E. J., Shay, K. P., Thomas, N. O., Butler, J. A., Finlay, L. F., & Hagen, T. M. (2015). Age-related loss of hepatic Nrf2 protein homeostasis: Potential role for heightened expression of miR-146a. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 1184-1191. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.003>
- Smith, T. G., Jr, Lange, G. D., & Marks, W. B. (1996). Fractal methods and results in cellular morphology--dimensions, lacunarity and multifractals. *Journal of Neuroscience Methods*, 69(2), 123-136. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(96\)00080-5](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(96)00080-5)
- Sohal, R. S., Sohal, B. H., & Brunk, U. T. (1990). Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species. *Mechanisms of Ageing and Development*, 53(3), 217-227. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(90\)90105-4](https://doi.org/10.1016/0047-6374(90)90105-4)
- Song, A., & Wang, Q. A. (2023). Becoming less beige with age. *eLife*, 12, e89700. <https://doi.org/10.7554/eLife.89700>
- Song, A., Dai, W., Jang, M. J., Medrano, L., Li, Z., Zhao, H., Shao, M., Tan, J., Li, A., Ning, T., Miller, M. M., Armstrong, B., Huss, J. M., Zhu, Y., Liu, Y., Gradinaru, V., Wu, X., Jiang, L., Scherer, P. E., & Wang, Q. A. (2020). Low-and high-thermogenic brown adipocyte subpopulations coexist in murine adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(1), 247-257. <https://doi.org/10.1172/JCI129167>
- Song, Z., Xiaoli, A. M., & Yang, F. (2018). Regulation and metabolic significance of de novo lipogenesis in adipose tissues. *Nutrients*, 10(10), 1383. <https://doi.org/10.3390/nu10101383>
- Spasić, M. B., Saičić, S., Buzadžić, B., Korać, B., Blagojević, D., & Petrović, V. M. (1993). Effect of long-term exposure to cold on the antioxidant defense system in the rat. *Free Radical Biology and Medicine*, 15(3), 291-299. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90076-7](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90076-7)

- Speakman, J. R., & Garratt, M. (2014). Oxidative stress as a cost of reproduction: beyond the simplistic trade-off model. *Bioessays*, 36(1), 93-106. <https://doi.org/10.1002/bies.201300108>
- Stančić, A., Buzadžić, B., Korać, A., Otašević, V., Janković, A., Vučetić, M., Markelić, M., Veličković, K., Golić, I., & Korać, B. (2013). Regulatory role of PGC-1 α /PPAR signaling in skeletal muscle metabolic recruitment during cold acclimation. *Journal of Experimental Biology*, 216(22), 4233-4241. <https://doi.org/10.1242/jeb.089334>
- Steiner, G., & Cahill Jr., G. F. (1964). Brown and white adipose tissue metabolism in cold-exposed rats. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 207(4), 840-844. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1964.207.4.840>
- Sterling, P., & Eyer, J. (1988). Allostasis: A new paradigm to explain arousal pathology. In: Fisher, S., Reason, J. (eds). *Handbook of Life Stress, Cognition and Health*. John Wiley & Sons.
- St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J. M., Rhee, J., Jäger, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., Simon, D. K., Bachoo, R., & Spiegelman, B. M. (2006). Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*, 127(2), 397-408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.024>
- Su, D., Zhou, T., Wang, Y., & Wang, L. (2023). Cold exposure regulates hepatic glycogen and lipid metabolism in newborn goats. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18), 14330. <https://doi.org/10.3390/ijms241814330>
- Tajima, K., Ikeda, K., Chang, H.-Y., Chang, C.-H., Yoneshiro, T., Oguri, Y., Jun, H., Wu, J., Ishihama, Y., & Kajimura, S. (2019). Mitochondrial lipoylation integrates age-associated decline in brown fat thermogenesis. *Nature Metabolism*, 1(9), 886-898. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0106-z>
- Tchkonina, T., Morbeck, D. E., Von Zglinicki, T., Van Deursen, J., Lustgarten, J., Scrable, H., Khosla, S., Jensen, M. D., & Kirkland, J. L. (2010). Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging cell*, 9(5), 667-684. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00608.x>
- Terblanche, S. E., Masondo, T. C., & Nel, W. (2000). Effects of chronic cold exposure on the activities of cytochrome c oxidase, glutathione peroxidase and glutathione reductase in rat tissues (*Rattus norvegicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 127(3), 319-324. [https://doi.org/10.1016/s0305-0491\(00\)00269-8](https://doi.org/10.1016/s0305-0491(00)00269-8)
- Tetzlaff, E. J., Hancock, C., Waddell, L., Gagnon, S. S., Mäkelä, K. A., Karhu, T., Peltonen, J. E., Herzig, K.-H., & Gagnon, D. D. (2026). Cold exposure and human metabolism: A heterogeneous response across tissues and organs. *Temperature*, 1-36. <https://doi.org/10.1080/23328940.2025.2599582>
- Thirupathi, A., da Silva Pieri, B. L., Peixoto Queiroz, J. A. M., Rodrigues, M. S., de Bem Silveira, G., Roxo de Souza, D., Luciano, T. F., Lock Silveira, P. C., & De Souza, C. T. (2019). Strength training and aerobic exercise alter mitochondrial parameters in brown adipose tissue and equally reduce body adiposity in aged rats. *Journal of physiology and biochemistry*, 75(1), 101-108. <https://doi.org/10.1007/s13105-019-00663-x>
- Tokizane, K., & Imai, S. I. (2024). Inter-organ communication is a critical machinery to regulate metabolism and aging. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 35(3), 164-175. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2024.11.013>
- Tsuji, T., & Tseng, Y. H. (2026). Adipose tissue as a humoral–neuronal hub in metabolic regulation. *Nature Reviews Endocrinology*, 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41574-026-01265-6>
- Vaanholt, L. M., Daan, S., Schubert, K. A., & Visser, G. H. (2009). Metabolism and aging: effects of cold exposure on metabolic rate, body composition, and longevity in mice. *Physiological and Biochemical Zoology*, 82(4), 314-324. <https://doi.org/10.1086/589727>
- Van Lenten, B. J., & Roheim, P. S. (1982). Changes in the concentrations and distributions of apolipoproteins of the aging rat. *Journal of Lipid Research*, 23(8), 1187-1195. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)38057-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)38057-3)
- Vera, D. L., Griffin, P. T., Leigh, D., Kras, J., Ramos, E., Bishof, I., Butler, A., Chwalek, K., Vogel, D. S., Kane, A. E., & Sinclair, D. A. (2025). Multiomic clocks to predict phenotypic age in

- mice. *Journal of Gerontology: Biological Sciences and Medical Sciences*, 80(11), glaf188. <https://doi.org/10.1093/gerona/glaf188>
- Vercaemst, A., Zhao, M., Chai, R., Lismont, C., & Fransen, M. (2026). Peroxisomes in Aging: Guardians of Cellular Resilience and Function. *Cells*, 15(3), 254. <https://doi.org/10.3390/cells15030254>
- Villarroya, F., Cereijo, R., Villarroya, J., & Giralt, M. (2017). Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(1), 26-35. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.136>
- Volke, L., & Krause, K. (2021). Effect of thyroid hormones on adipose tissue flexibility. *European Thyroid Journal*, 10(1), 1-9. <https://doi.org/10.1159/000508483>
- Vučetić, M., Stančić, A., Otašević, V., Janković, A., Korać, A., Markelić, M., Veličković, K., Golić, I., Buzadžić, B., Storey, K., & Korać, B. (2013). The impact of cold acclimation and hibernation on antioxidant defenses in the ground squirrel (*Spermophilus citellus*): an update. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 916-924. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.188>
- Vyskočilová, E., Szotáková, B., Skálová, L., Bártíková, H., Hlaváčová, J., & Boušová, I. (2013). Age-related changes in hepatic activity and expression of detoxification enzymes in male rats. *BioMed Research International*, 2013, 408573. <https://doi.org/10.1155/2013/408573>
- Wang, B., Han, J., Elisseff, J. H., & Demaria, M. (2024). The senescence-associated secretory phenotype and its physiological and pathological implications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 25(12), 958-978. <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00727-x>
- Wang, Z., Ning, T., Song, A., Rutter, J., Wang, Q. A., & Jiang, L. (2020). Chronic cold exposure enhances glucose oxidation in brown adipose tissue. *EMBO reports*, 21(11), e50085. <https://doi.org/10.15252/embr.202050085>
- Wei, P.-C., Hsieh, Y.-H., Su, M.-I., Jiang, X., Hsu, P.-H., Lo, W.-T., Weng, J.-Y., Jeng, Y.-M., Wang, J.-M., Chen, P.-L., Chang, Y.-C., Lee, K.-F., Tsai, M.-D., Shew, J.-Y., & Lee, W.-H. (2012). Loss of the oxidative stress sensor NPGPx compromises GRP78 chaperone activity and induces systemic disease. *Molecular Cell*, 48(5), 747-759. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.007>
- Weimer, S., Priebs, J., Kuhlrow, D., Groth, M., Priebe, S., Mansfeld, J., Merry, T. L., Dubuis, S., Laube, B., Pfeiffer, A. F., Schulz, T. J., Guthke, R., Platzner, M., Zamboni, N., Zarse, K., & Ristow, M. (2014). D-Glucosamine supplementation extends life span of nematodes and of ageing mice. *Nature Communications*, 5, 3563. <https://doi.org/10.1038/ncomms4563>
- Witte, S., Boshnakovska, A., Özdemir, M., Chowdhury, A., Rehling, P., & Aich, A. (2023). Defective COX1 expression in aging mice liver. *Biology Open*, 12(3), bio059844. <https://doi.org/10.1242/bio.059844>
- Worthmann, A., John, C., Rühlemann, M. C., Baguhl, M., Heinsen, F.-A., Schaltenberg, N., Heine, M., Schlein, C., Evangelakos, I., Mineo, C., Fischer, M., Dandri, M., Kremoser, C., Scheja, L., Franke, A., Shaul, P. W., & Heeren, J. (2017). Cold-induced conversion of cholesterol to bile acids in mice shapes the gut microbiome and promotes adaptive thermogenesis. *Nature Medicine*, 23(7), 839-849. <https://doi.org/10.1038/nm.4357>
- Wu, X., Muzny, D. M., Chi Lee, C., & Thomas Caskey, C. (1992). Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 34(1), 78-84. <https://doi.org/10.1007/BF00163854>
- Xiong, J., Zhu, X., Guo, Y., Tang, H., Dong, C., Wang, B., Liu, M., Li, Z., & Tu, Y. (2025). Multi-omic underpinnings of heterogeneous aging across multiple organ systems. *Cell Genomics*, 5(12), 101032. <https://doi.org/10.1016/j.xgen.2025.101032>
- Xue, J., Chen, D., Wang, C., Wang, J., Zhou, J., Li, W., Qian, J., Huang, Y., Fang, L., Song, H., He, B., & Zhao, X.-Y. (2026). WAT-to-BAT communication facilitates the sustained activation of BAT thermogenesis during cold exposure. *Cell Discovery*, 12(1), 37. <https://doi.org/10.1038/s41421-026-00891-8>

- Yang, L., Zhang, Y., Wang, S., Zhang, W., & Shi, R. (2014). Decreased liver peroxisomal β -oxidation accompanied by changes in brain fatty acid composition in aged rats. *Neurological Sciences*, 35(2), 289-293. <https://doi.org/10.1007/s10072-013-1509-3>
- Yang, W., Burkhardt, B., Fischer, L., Beirow, M., Bork, N., Wönne, E. C., Wagner, C., Husen, B., Zeilinger, K., Liu, L., & Nussler, A. K. (2015). Age-dependent changes of the antioxidant system in rat livers are accompanied by altered MAPK activation and a decline in motor signaling. *EXCLI Journal*, 14, 1273-1287. <https://doi.org/10.17179/excli2015-734>
- Yates, F. E. (1994). Order and complexity in dynamical systems: Homeodynamics as a generalized mechanics for biology. *Mathematical and Computer Modelling*, 19(6-8), 49-74.
- Yu, J., Zhang, S., Cui, L., Wang, W., Na, H., Zhu, X., Li, L., Xu, G., Yang, F., Christian, M., & Liu, P. (2015). Lipid droplet remodeling and interaction with mitochondria in mouse brown adipose tissue during cold treatment. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1853(5), 918-928. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.01.020>
- Yu, X. X., Lewin, D. A., Forrest, W., & Adams, S. H. (2002). Cold elicits the simultaneous induction of fatty acid synthesis and β -oxidation in murine brown adipose tissue: prediction from differential gene expression and confirmation in vivo. *FASEB Journal*, 16(2), 155-168. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0414fje>
- Zhang, H., & Forman, H. J. (2017). 4-hydroxynonenal-mediated signaling and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 111, 219-225. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.032>
- Zhang, H., Davies, K. J., & Forman, H. J. (2015). Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 88, 314-336. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.036>
- Zhang, Y., Li, C., Liu, Y., Wang, W., You, W., Ju, Z., Wang, F., & Hu, Q. (2026). GPX4 is not required for the thermogenesis function of brown adipose tissue in mice. *Ferroptosis and Oxidative Stress*, 2(4), 202616-202616. <https://doi.org/10.70401/fos.2026.0033>
- Zhao, L., Zhu, Q. J., Li, M. H., Yang, H. L., & Zhao, Y. J. (2025). Revisiting brown adipose tissue whitening: physiological mechanisms and pathophysiological consequences. *The Journal of Physiology*, 603(19), 5299-5326. <https://doi.org/10.1113/JP289263>
- Zhou, Y., Xu, Z., Wang, L., Ling, D., Nong, Q., Xie, J., Zhu, X., & Shan, T. (2022). Cold exposure induces depot-specific alterations in fatty acid composition and transcriptional profile in adipose tissues of pigs. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 827523. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.827523>
- Ziqubu, K., Dlodla, P. V., Mabhida, S. E., Jack, B. U., Keipert, S., Jastroch, M., & Mazibuko-Mbeje, S. E. (2024). Brown adipose tissue-derived metabolites and their role in regulating metabolism. *Metabolism*, 150, 155709. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2023.155709>

BIOGRAFIJA AUTORA

Strahinja M. Đurić rođen je u Beogradu. Osnovne akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu završio je 2018. godine na studijskom programu Molekularna biologija i fiziologija. Master akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu završio je 2019. godine na studijskom programu Molekularna biologija i fiziologija, modul Biologija ćelija i tkiva. Iste godine upisao je doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biologija, modul Biologija ćelija i tkiva.

Od 04.11.2019. godine je zaposlen na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu kao istraživač pripravnik, od 30.09.2022. godine kao istraživač saradnik, a od 17.09.2026. kao viši stručni saradnik. Od 2022. do 2025. godine bio je učesnik na projektu REFRAME (#7750238) programa IDEJE Fonda za nauku Republike Srbije.

Član je Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalnu fiziologiju i evropskih društava *Society for Free Radical Research – Europe* i *European Society for Mitochondrial Research and Medicine*. Kao koautor objavio je tri rada u vodećim međunarodnim časopisima (dva M21a i jedan M21), jedan rad u nacionalnom časopisu (M52), kao i šest saopštenja sa međunarodnih naučnih skupova.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Страхиња Ђурић

Број индекса Б3027/2019

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Редокс-метаболичка хомеостаза у јетри, мишићима, депоима белог и мрком масном ткиву током хронолошког старења пацова дуготрајно излаганих ниској температури

- 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, _____ год.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Страхиња Ђурић

Број индекса Б3027/2019

Студијски програм Биологија

Наслов рада Редокс-метаболичка хомеостаза у јетри,
мишићима, депоима белог и мрком масном ткиву током
хронолошког старења пацова дуготрајно излаганих ниској
температури

Ментори др Александра Кораћ, редовна професорка, Универзитет у Београду,
Биолошки факултет; др Александра Јанковић, научни саветник, Институт за биолошка
истраживања „Синиша Станковић” – Институт од националног значаја за Републику Србију,
Универзитет у Београду

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао 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, _____

Изјава о коришћењу

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

Редокс-метаболичка хомеостаза у јетри, мишићима, депоима белог и мрком масном ткиву
током хронолошког старења пацова дуготрајно излаганих ниској температури

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, _____

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.