

VOLUMETRIC ANALYSIS OF LYMPHOCYTE LIPID DROPLETS IN
TYPE 2 DIABETES MELLITUS PATIENTS WITH HYPERLIPIDEMIAVOLUMETRIJSKA ANALIZA LIPIDNIH KAPI U LIMFOCITIMA
BOLESNIKA SA TIP 2 DIJABETES MELITUSOM I
HIPERLIPIDEMIJOMAleksa Živković¹, Darko Ćirić², Tamara Martinović², Sofija Jovanović², Tamara Kravić Stevović²¹ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija² Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“, Beograd, Srbija**Correspondence:** aleksa19988@gmail.com**Abstract**

Introduction: Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a chronic metabolic disorder characterized by inadequate glucose homeostasis. A common occurrence of T2DM is diabetic dyslipidemia. Given lipid droplets' role in intracellular lipid storage, these structures lie at the center of lipid and energy homeostasis. Lipolysosomes are cell organelles that have the structure of lipid droplets surrounded by a membrane. Lipophagy is a selective form of autophagy that enables lipid droplet degradation, thus representing an important mechanism in the regulation of lipid droplet homeostasis.

Aim: The aim of our research was fractional volume analysis of lipid droplets, autophagic vesicles containing lipid droplets, and lipolysosomes in the lymphocytes of patients with T2DM and hyperlipidemia.

Material and methods: Mononuclear cells were isolated from the peripheral blood of T2DM patients with hyperlipidemia and from healthy individuals. Cells were fixed in glutaraldehyde and postfixed in 1% osmium tetroxide. After contrasting with 4.7% uranyl acetate, the samples were embedded in epoxy resins and cut by an ultramicrotome. The ultrathin sections were then contrasted with uranyl acetate and lead citrate and analyzed using transmission electron microscopy. The fractional volume of lipid droplets, autophagic vesicles containing lipid droplets, and lipolysosomes was determined using the double “coherent point” grid with dots distributed at two different densities.

Results: While there was no difference in the fractional volumes of lipid droplets and autophagic vesicles containing lipid droplets, the fractional volume of lipolysosomes was significantly higher in the lymphocytes of T2DM patients with hyperlipidemia compared to healthy individuals ($p < 0.05$).

Conclusion: A higher fractional volume of lipolysosomes revealed in the lymphocytes of T2DM patients with hyperlipidemia can be due to an increase in the activity of these organelles, as well as an overall increase in cellular lipid metabolism in these patients.

Keywords:type 2 diabetes
mellitus,
hyperlipidemia,
lipid droplets,
autophagic
vesicles containing
lipid droplets,
lipolysosomes

Sažetak

Uvod: Tip 2 dijabetes melitus (T2DM) je hronični metabolički poremećaj koji karakteriše neadekvatna homeostaza glukoze. Jedna od uobičajenih pojava kod T2DM je dijabetička dislipidemija. Lipidne kapi imaju ulogu u skladištenju lipida u ćeliji, te se kao takve nalaze u centru homeostaze lipida i energije. Lipolizozomi predstavljaju ćelijske organele koje imaju strukturu lipidnih kapi okruženih membranom. Lipofagija je jedan od selektivnih oblika autofagije u kome dolazi do razgradnje lipidnih kapi, što predstavlja značajan mehanizam regulacije homeostaze lipidnih kapi.

Cilj: Ciljevi našeg istraživanja bili su analiza zapreminskog udela lipidnih kapi, autofagijskih vezikula sa lipidnim kapima (lipofaga), kao i lipolizozoma u limfocitima bolesnika sa T2DM i hiperlipidemijom.

Materijal i metode: Iz krvi dobijene od bolesnika sa T2DM i hiperlipidemijom i od zdravih osoba izolovane su mononuklearne ćelije koje su potom fiksirane u glutaraldehidu i postfiksirane u 1% rastvoru osmijum tetroksida. Nakon kontrastiranja u 4,7% rastvoru uranilacetata, uzorci su kalupljeni u epoksi smolama, a potom sečeni na ultramikrotomu. Dobijeni ultratanki iseći su ponovo kontrastirani i zatim analizirani na transmisionom elektronskom mikroskopu. Zapreminski udeo lipidnih kapi, lipofaga i lipolizozoma je određivan primenom dvostruke „coherent point“ mrežice sa tačkama u dve različite gustine.

Rezultati: Zapreminski udeo lipidnih kapi i lipofaga nije se značajno razlikovao u limfocitima bolesnika sa T2DM i hiperlipidemijom i zdravih ispitanika, dok je zapreminski udeo lipolizozoma bio statistički značajno veći u limfocitima bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike ($p < 0,05$).

Zaključak: Povećan zapreminski udeo lipolizozoma, otkriven u limfocitima bolesnika sa T2DM i hiperlipidemijom, može govoriti u prilog pojačanoj aktivnosti ovih organela, a samim tim i povećanog lipidnog metabolizma u ćelijama kod ovih bolesnika.

Cljučne reči:
tip 2 dijabetes melitus, hiperlipidemija, lipidne kapi, lipofagi, lipolizozomi

Uvod

Tip 2 dijabetes melitus (T2DM) predstavlja hronični metabolički poremećaj čija rastuća prevalenca predstavlja veliki javnozdravstveni problem (1). Prouzrokovan je kombinacijom dva glavna faktora, neadekvatnom sekrecijom insulina od strane β -ćelija pankreasnih ostrvaca, kao i rezistencijom insulin-zavisnih tkiva na sekretovani insulin (2). Kao posledica neadekvatne homeostaze glukoze, dolazi do razvoja hiperglikemije, dok su oboleli od T2DM u povećanom riziku od razvoja makrovaskularnih (bolesti kardiovaskularnog sistema) i mikrovaskularnih (nefropatija, retinopatija i neuropatija) komplikacija (3). Pored toga, jedna od uobičajenih pojava u T2DM je i dijabetička dislipidemija, čije su glavne odlike povišenje serumskih nivoa triglicerida, trigliceridima bogatih lipoproteina (engl. *TG-rich lipoproteins* - TRLs), lipoproteina male gustine (engl. *low-density lipoproteins* - LDL) i smanjenje vrednosti lipoproteina velike gustine (engl. *high-density lipoproteins* - HDL) (2).

Lipidne kapi predstavljaju vrlo dinamične strukture sa ulogom u skladištenju lipida u ćeliji, te se kao takve nalaze u centru homeostaze lipida i energije (4). One poseduju jedinstvenu ultrastrukturu koja se sastoji od jezgra neutralnih lipida (triacilgliceroli i sterol estri), okruženog jednim slojem fosfolipida u čiji sastav su uključeni integralni i periferni proteini (4). U stanjima gladovanja i/ili povećanih zahteva za membranama u ćeliji lipidi uskladišteni u lipidnim kapima mogu biti mobilisani za proizvodnju energije, odnosno sintezu fosfolipida (4). Pored toga, u stanjima lipotoksičnosti lipidne kapi se ponašaju kao puferi koji

sekvestriranjem masnih kiselina sprečavaju nastanak oštećenja do kojih one mogu da dovedu (4).

Lipolizozomi, prema podacima iz literature, predstavljaju ćelijske organele koje imaju strukturu lipidnih kapi okruženih membranom, sa elektronski gustim nakupinama na ili oko membrane koje bi mogle predstavljati lipofuscin, pri čemu je pokazano da su unutar pomenutih nakupina lipolizozomi, za razliku od lipidnih kapi, pozitivni na aktivnost kisele fosfataze (5-7). Predložena je njihova podela na tri tipa: tip I, monolokularni, najmanji po veličini; tip II, multilokularni, srednji po veličini, koji sadrže veći broj lipidnih kapi u sebi i tip III, gigantski multilokularni, najveći po veličini, koji takođe u sebi sadrže veći broj manjih lipidnih kapi (5).

Do razgradnje lipidnih kapi može doći procesom autofagije. Autofagija je intracelularni proces degradacije makromolekula i organela (8) i predstavlja zaštitni mehanizam koji se aktivira kako u fiziološkim uslovima, tako i pri različitim vrstama ćelijskog stresa (9). Autofagija započinje formiranjem izolacione membrane, tj. fagofore koja svojim zatvaranjem obuhvata sadržaj citoplazme koji će se razgraditi i formira organelu sa dvostrukom membranom koja se naziva autofagozom (10). Autofagozom se potom fuzioniše sa lizozomom u autolizozom koji ima jednostruku membranu i u kome dolazi do konačne razgradnje supstrata (10). Na osnovu supstrata koji se razgrađuju, kao i mehanizama koji su uključeni u proces autofagije, autofagija se deli na selektivnu i neselektivnu (11). Lipofagija (engl. *lipophagy*) je jedan od selektivnih oblika autofagije u kome dolazi do razgradnje lipidnih kapi, a koji ujedno

podrazumeva značajan mehanizam regulacije homeostaze lipidnih kapi (12).

Ciljevi našeg istraživanja bili su analiza zapreminskog udela lipidnih kapi, autofagijskih vezikula sa lipidnim kapima (lipofaga), kao i lipolizozoma u limfocitima bolesnika sa T2DM i hiperlipidemijom.

Materijal i metode

Uzorci periferne krvi bolesnika

Uzorci periferne krvi uzeti su od 5 bolesnika sa T2DM i hiperlipidemijom, dok su kao kontrolni korišćeni uzorci periferne krvi 5 zdravih osoba. Obe grupe ispitanika bile su odgovarajućeg pola i starosne dobi, a uzorci su dobijeni sa Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Univerzitetskog kliničkog centra Srbije u Beogradu. Iz uzoraka periferne krvi izolovane su mononuklearne ćelije metodom gradijenta gustine (*LymphoPrep*, *Axis Shield*, *Oslo*, *Norway*).

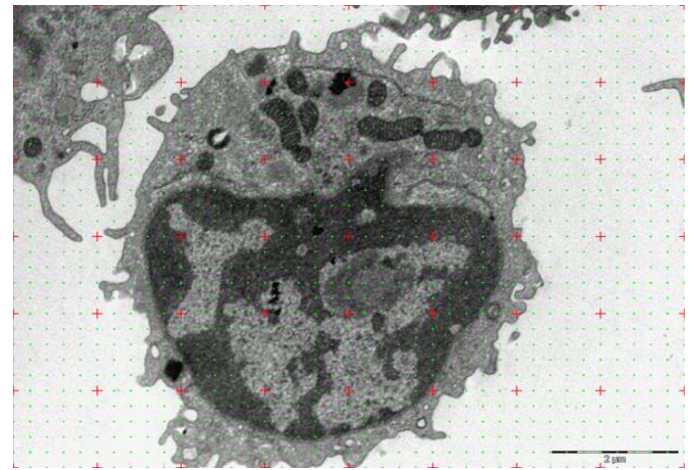
Priprema uzoraka za elektronsku mikroskopiju

Izolovani talog je zatim fiksiran u glutaraldehidu i postfiksiran u 1% rastvoru osmijum tetroksida. Nakon toga, uzorci su kontrastirani u 4,7% rastvoru uranilacetata, kalupljeni u epoksi smolama (*Epoxy Embedding Medium kit*, *Sigma-Aldrich*, *St. Louis*, *USA*), a potom sečeni na ultramikrotomu (*Leica UltraCut UCT*, *Leica Microsystems*, *Wetzlar*, *Germany*). Tako dobijeni ultratanki isecci kontrastirani su uranilacetatom i olovo citratom da bi, kao takvi, bili korišćeni za analize na transmissionom elektronskom mikroskopu (*Morgagni 268D*, *FEI*, *Hillsboro*, *OR*, *USA*).

Morfometrijska analiza

Za morfometrijsku analizu korišćeno je po 30 fotomikrografija limfocita 5 bolesnika sa T2DM i hiperlipidemijom i po 30 fotomikrografija limfocita 5 zdravih osoba. Ćelije su nasumično odabrane i slikane na elektronskom mikroskopu na uvećanju od 8900 x. Fotomikrografije su korišćene za analizu zapreminskog udela (engl. *Fractional volume analysis*) lipidnih kapi, lipofaga i lipolizozoma i citoplazme za svaku od pomenutih organela pojedinačno. Volumetrijska analiza citoplazme i pomenutih struktura izvršena je primenom dvostruke „*coherent point*“ mrežice sa tačkama u dve različite gustine, primenom formule: $X = \frac{\sum Pap}{(\sum Pcyt \times \rho)}$ u kojoj: $\sum Pap$ predstavlja broj tačaka mrežice veće gustine unutar strukture od interesa; $\sum Pcyt$ broj tačaka mrežice manje gustine unutar citoplazme; ρ konstantu koja predstavlja broj tačaka mrežice veće gustine koji odgovara svakoj tački mrežice manje gustine (slika 1). Primenom navedene formule dobijen je odnos površinske strukture od interesa i citoplazme, tj. površinski udeo organele od interesa u citoplazmi ćelije. Da bi se utvrdio odnos zapremine strukture i citoplazme, tj. zapreminski udeo organele u citoplazmi ćelije, primenjen je Deleseov

(*Delesse*) princip, po kome je površinski udeo proporcionalan zapreminskom (13).



Slika 1. Fotomikrografija limfocita bolesnika sa T2DM i hiperlipidemijom na kojoj je superponirana mrežica sa tačkama u dve različite gustine (8900 x).

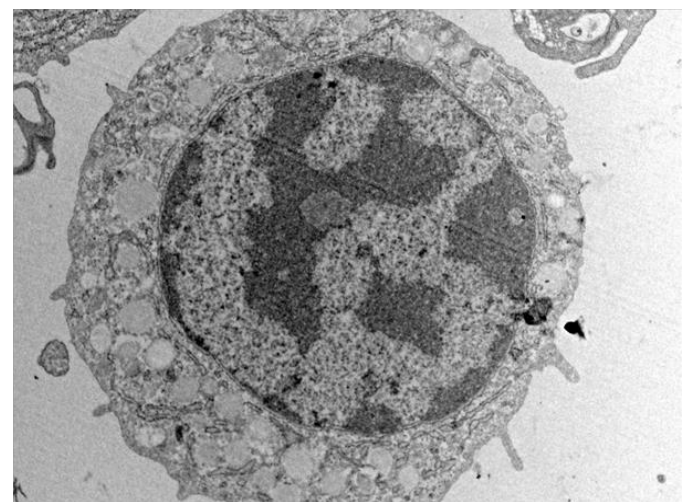
Statistička analiza podataka

U statističkoj analizi korišćeni su Studentov T-test i Fišerov test tačne verovatnoće, pri čemu je p vrednost manja od 0,05 smatrana statistički značajnom.

Rezultati

Analiza lipidnih kapi na elektronskom mikroskopu

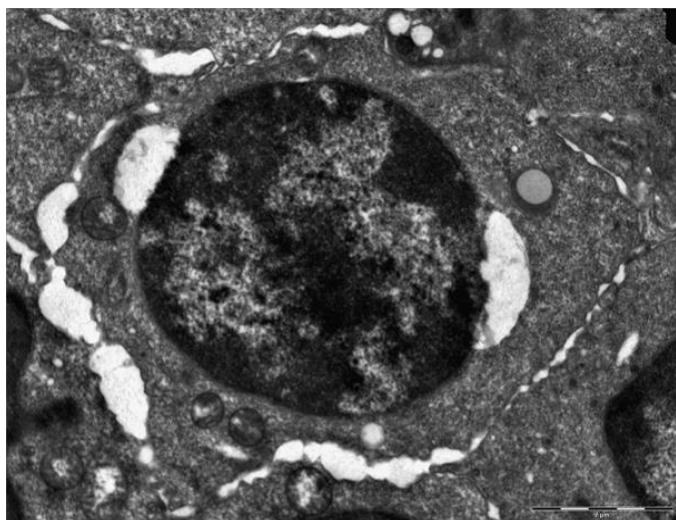
Lipidne kapi su identifikovane kao okrugle ili ovalne, translucetne strukture bez membrane (slika 2).



Slika 2. Fotomikrografija limfocita bolesnika sa T2DM i hiperlipidemijom na kojoj se jasno uočava mnoštvo lipidnih kapi u citoplazmi (8900 x).

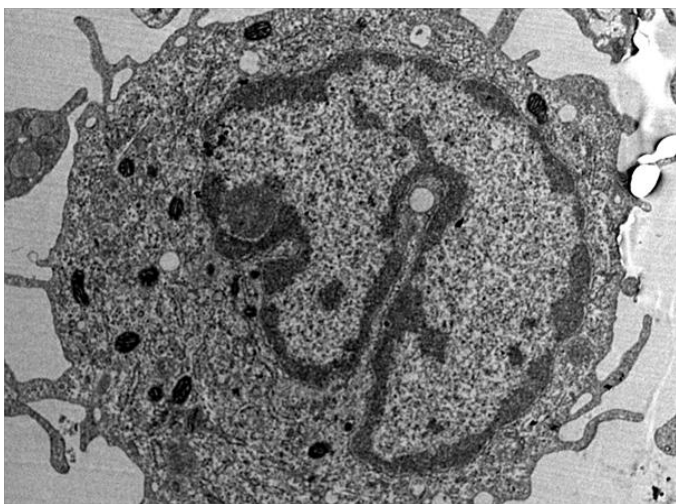
Lipofagi su identifikovani kao strukture obavijene jednom, jasno uočljivom membranom i ispunjene

delimično razgrađenim lipidnim kapima, sa ili bez dodatnog delimično razgrađenog sadržaja citoplazme (slika 3).



Slika 3. Fotomikrografija limfocita zdrave osobe na kojoj se može uočiti prisustvo lipofaga (8900 x).

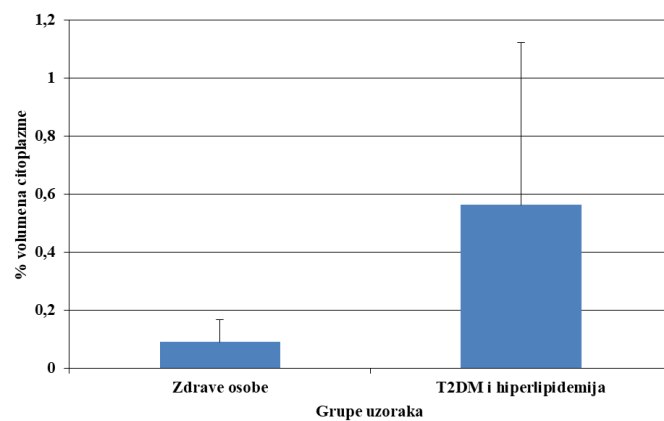
Lipolizozomi su elektronskim mikroskopom viđeni kao okrugle ili ovalne strukture različitih veličina okružene jednom, jasno uočljivom membranom, ispunjene jednom ili više lipidnih kapi (slika 4).



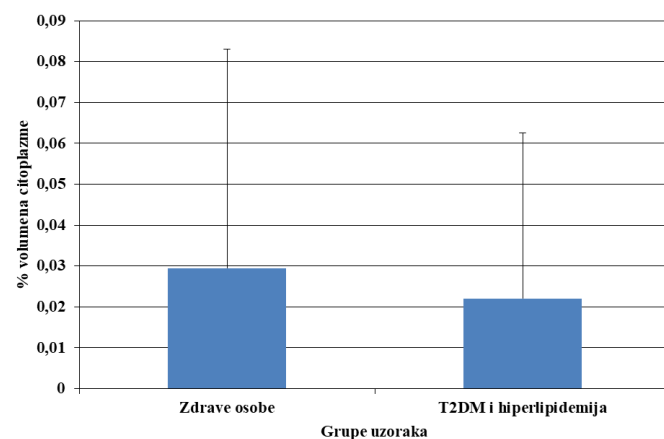
Slika 4. Fotomikrografija limfocita bolesnika sa T2DM i hiperlipidemijom na kojoj se jasno uočava prisustvo nekoliko lipolizozoma (8900 x).

Rezultati volumetrijske analize

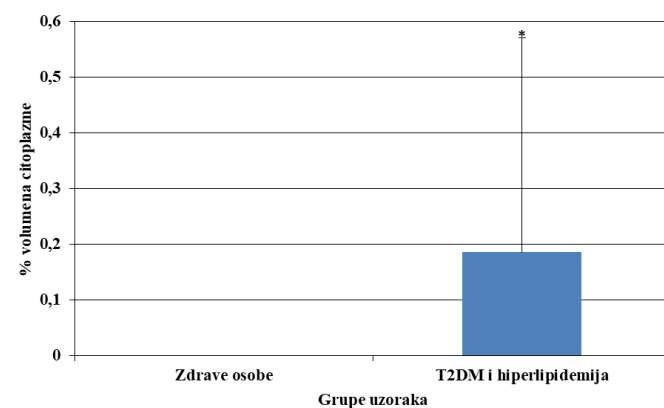
Analizom zapreminskog udela lipidnih kapi i lipofaga nije uočena statistički značajna razlika između kontrolne grupe i bolesnika sa T2DM i hiperlipidemijom (grafikon 1 i grafikon 2). Zapreminski udeo lipolizozoma u citoplazmi limfocita bolesnika sa T2DM i hiperlipidemijom bio je statistički značajno veći u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$) (grafikon 3).



Grafikon 1. Prosečne vrednosti zapreminskog udela lipidnih kapi u citoplazmi limfocita zdravih osoba i bolesnika sa T2DM i hiperlipidemijom, izražene u procentima.



Grafikon 2. Prosečne vrednosti zapreminskog udela lipofaga u citoplazmi limfocita zdravih osoba i bolesnika sa T2DM i hiperlipidemijom, izražene u procentima.



Grafikon 3. Prosečne vrednosti zapreminskog udela lipolizozoma u citoplazmi limfocita zdravih osoba i bolesnika sa T2DM i hiperlipidemijom, izražene u procentima; (* $p < 0,05$).

Diskusija

S obzirom na ulogu lipidnih kapi u zaštiti od lipotoksičnosti moguće je da stanja u kojima su skladišta masti u lipidnim kapima oštećena ili prepunjena mogu dovesti do nastanka oboljenja povezanih sa lipotoksičnošću, kakvo je T2DM (4, 14, 15). U metaboličkom sindromu dolazi do otpuštanja lipida u krvotok i njihovog ektopičnog nagomilavanja u drugim organima, kao što su jetra, skeletni mišići ili srce, što uzrokuje lipotoksičnost koja utiče na razvoj insulinske rezistencije u perifernim tkivima (14). Prema podacima iz literature, moglo bi se očekivati da je zapremina lipidnih kapi u limfocitima obolelih od T2DM sa dislipidemijom izmenjena u odnosu na zdrave osobe, pre svega zbog činjenice da su limfociti periferne krvi ćelije konstantno izložene povišenim koncentracijama lipida. Međutim, u našem istraživanju razlika u zapreminskom udelu lipidnih kapi se nije pokazala kao statistički značajna. Mogući uzrok izostanka očekivane razlike je relativno mali broj ispitanika uključenih u našu studiju.

Brojne studije su pokazale da je oštećenje lipofagije povezano sa nastankom poremećaja senzitivnosti na insulin i tolerancije na glukozu, ukazujući na činjenicu da bi regulacija lipofagije mogla predstavljati bitan faktor u insulinskoj senzitivnosti i homeostazi glukoze u dijabetesu (12, 16). Istraživanje sprovedeno na *Atg7* (engl. *autophagy-related 7*) deficijentnim nokaut miševima pokazalo je prisustvo brojnih strukturnih i funkcionalnih promena u β -ćelijama Langerhansovih ostrvaca ovih miševa, među kojima su neadekvatna sekrecija insulina sa smanjenjem serumskih nivoa insulina i hiperglikemija. S obzirom na ključnu ulogu ovog gena, tj. njegovog proteina u procesima autofagije, sugerisano je da autofagija igra važnu ulogu u razvoju insulinske rezistencije (17). Takođe je pokazano da povećana ekspresija *Atg7* u jetri dovodi do poboljšanja tolerancije glukoze, kao i osetljivosti na insulin (18). Pored toga, jedna studija je pokazala da oštećenje autofagije u zrelih adipocitima kod *Atg3* (engl. *autophagy-related 3*) i *Atg16L1* (engl. *autophagy-related 16 like 1*) deficijentnih miševa dovodi do nastanka disfunkcionalnih mitohondrija, inflamacije masnog tkiva, ali i razvoja insulinske rezistencije (19). Iako oskudna, određena ispitivanja koja su se bavila analizom autofagije u limfocitima kod obolelih od T2DM pokazala su da u određenim slučajevima dolazi do aktivacije autofagije u leukocitima osoba sa T2DM, dok je u drugim prisutna snižena aktivnost autofagije u mononuklearnim ćelijama periferne krvi ovih bolesnika (20, 21). Rezultati naše studije nisu pokazali statistički značajnu razliku u zapremini lipofaga između kontrolne i grupe bolesnika sa T2DM i hiperlipidemijom, a to bi moglo predstavljati posledicu otežanog identifikovanja ove organele na presecima zbog razgradnje sadržaja lipofaga, pored relativno malog broja ispitanika uključenih u studiju.

Podaci iz literature koji se tiču lipolizozoma veoma su oskudni i uglavnom se baziraju na ispitivanjima ćelija jetre. Ipak, pokazano je da je njihovo prisustvo povećano u stanjima prekomerne akumulacije lipida, tj. u poremećajima lipidnog metabolizma (5). Njihovo prisustvo je, pre

svega, primećeno u hepatocitima bolesnika sa Vilsonovom bolešću (22). Zatim, u studiji koja se bavila ispitivanjem lipolizozoma u hepatocitima bolesnika sa različitim oboljenjima jetre pokazano je njihovo prisustvo u 91% bolesnika sa masno izmenjenom jetrom i u 47% bolesnika bez masno izmenjene jetre. Ista studija je takođe pokazala da je kod bolesnika sa hroničnim hepatitisom sa masno izmenjenom jetrom odnos između broja lipolizozoma i ukupnog broja lipidnih vakuola značajno korelirao sa serumskim nivoima holesterola, kao i da je ovaj odnos korelirao sa serumskim nivoima holesterola kod bolesnika sa cirozom jetre bez obzira na prisustvo ili odsustvo masne promene jetre (7). Istraživanje sprovedeno na pedijatrijskim bolesnicima na 12 bolesnika sa različitim formama masno izmenjene jetre ukazalo je na prisustvo lipolizozoma u hepatocitima ovih bolesnika (5). Nedavna istraživanja su pokazala povećan broj lipolizozoma, ali i lipidnih kapi i autofagozoma kod bolesnika sa nealkoholnom masnom bolešću jetre (engl. *non-alcoholic fatty liver disease - NAFLD*) u odnosu na zdrave pojedince (23). Pored toga, nekoliko studija sprovedenih na animalnim modelima ukazalo je na ulogu holesterola kao induktora formiranja lipolizozoma (24, 25). I kod bolesnika sa dijabetesom i hiperholesterolemijom pokazano je da dolazi do povećanja zapremine lipolizozoma u ćelijama jetre (26). Rezultati našeg istraživanja pokazali su da je zapreminski udeo lipolizozoma bio povećan u limfocitima bolesnika sa tip 2 dijabetes melitusom i povišenim nivoima lipida u krvi, što je u skladu sa podacima iz literature.

Zaključak

Povećan zapreminski udeo lipolizozoma, koji je pokazan u našem istraživanju, može govoriti u prilog tome da je aktivnost ovih organela, a samim tim i lipidnog metabolizma pojačana u limfocitima bolesnika sa T2DM i hiperlipidemijom i da verovatno predstavlja uzrok ili posledicu brojnih metaboličkih poremećaja koji se javljaju u ovoj bolesti.

Literatura

1. Tomic D, Shaw JE, Magliano DJ. The burden and risks of emerging complications of diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2022; 18(9):525-39.
2. Galicia-García U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, et al. Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(17):6275.
3. DeDronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers.* 2015; 1:15019.
4. Olzmann JA, Carvalho P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019; 20(3):137-55.
5. Iancu TC, Manov I, Shaoul R, Haimi M, Lerner A. What's in a name?-"Lipolysosome": ultrastructural features of a lipid-containing organelle. *Ultrastruct Pathol.* 2013; 37(5):293-303.
6. Haimi M, Iancu TC, Shaffer LG, Lerner A. Severe lysosomal storage disease of liver in *del(1)(p36)*: a new presentation. *Eur J Med Genet.* 2011; 54(3):209-13.
7. Hayashi H, Sameshima Y, Lee M, Hotta Y, Kosaka T. Lipolysosomes in human hepatocytes: their increase in number associated with serum level of cholesterol in chronic liver diseases. *Hepatology.*

- 1983; 3(2):221-5.
8. Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20(3):460-73.
 9. Klionsky DJ, Petroni G, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, et al. Autophagy in major human diseases. *EMBO J*. 2021; 40(19):e108863.
 10. Lorincz P, Juhasz G. Autophagosome-lysosome fusion. *J Mol Biol*. 2020; 432(8):2462-82.
 11. Hu Y, Reggiori F. Molecular regulation of autophagosome formation. *Biochem Soc Trans*. 2022; 50(1):55-69.
 12. Shin DW. Lipophagy: Molecular mechanisms and implications in metabolic disorders. *Mol Cells*. 2020; 43(8):686-93.
 13. Lucocq JM, Hacker C. Cutting a fine figure: On the use of thin sections in electron microscopy to quantify autophagy. *Autophagy*. 2013; 9(9):1443-8.
 14. Krahmer N, Farese Jr RV, Walther TC. Balancing the fat: lipid droplets and human disease. *EMBO Mol Med*. 2013; 5(7):905-15.
 15. Greenberg AS, Coleman RA, Kraemer FB, McManaman JL, Obin MS, Puri V, et al. The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. *J Clin Invest*. 2011; 121(6):2102-10.
 16. Zhou K, Yao P, He J, Zhao H. Lipophagy in nonliver tissues and some related diseases: Pathogenic and therapeutic implications. *J Cell Physiol*. 2019; 234(6):7938-47.
 17. Jung HS, Chung KW, Kim JW, Kim J, Komatsu M, Tanaka K, et al. Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. *Cell Metab*. 2008; 8(4):318-24.
 18. Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab*. 2010; 11(6):467-78.
 19. Cai J, Pires KM, Ferhat M, Chaurasia B, Buffolo MA, Smalling R, et al. Autophagy ablation in adipocytes induces insulin resistance and reveals roles for lipid peroxide and Nrf2 signaling in adipose-liver crosstalk. *Cell Rep*. 2018; 25(7):1708-17.
 20. Rovira-Llopis S, Diaz-Morales N, Banuls C, Blas-Garcia A, Polo M, Lopez-Domenech S, et al. Is autophagy altered in the leukocytes of type 2 diabetic patients? *Antioxid Redox Signal*. 2015; 23(13):1050-6.
 21. Alizadeh S, Mazloom H, Sadeghi A, Emamgholipour S, Golestani A, Noorbakhsh F, et al. Evidence for the link between defective autophagy and inflammation in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetic patients. *J Physiol Biochem*. 2018; 74(3):369-79.
 22. Hayashi H, Sternlieb I. Lipolysosomes in human hepatocytes. Ultrastructural and cytochemical studies of patients with Wilson's disease. *Lab Invest*. 1975; 33(1):1-7.
 23. Carroti S, Aquilano K, Zalfa F, Ruggiero S, Valentini F, Zingariello M, et al. Lipophagy impairment is associated with disease progression in NAFLD. *Front Physiol*. 2020; 11:850.
 24. Nehemiah JL, Novikoff AB. Unusual lysosomes in hamster hepatocytes. *Exp Mol Pathol*. 1974; 21(3):398-423.
 25. Drevon CA, Hovig T. The effects of cholesterol/fat feeding on lipid levels and morphological structures in liver, kidney and spleen in guinea pigs. *Acta Pathol Microbiol Scand A*. 1977; 85A(1):1-18.
 26. Hayashi H, Hotta Y, Sakamoto N. Electron microscopic study on the floating lipids of human liver. Lysosomal involvement in the fatty liver associated with diabetes mellitus. *Acta Pathol Jpn*. 1983; 33(5):923-8.