

# PROUPALNI I REMODELACIJSKI PROCESI U SUBKUTANOM I VISCERALNOM MASNOM TKIVU DEFINIRANI KROZ AKTIVNOST IMUNOMETABOLIČKIH ADIPOCITOKINA KOD MUŠKE DJECE I ADOLESCENATA

---

Mujkić, Robert

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:872853>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Robert Mujkić

**PROUPALNI I REMODELACIJSKI PROCESI U SUBKUTANOM I VISCERALNOM  
MASNOM TKIVU DEFINIRANI KROZ AKTIVNOST IMUNOMETABOLIČKIH  
ADIPOCITOKINA KOD MUŠKE DJECE I ADOLESCENATA**

*Doktorska disertacija*

Osijek, 2022.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Robert Mujkić

**PROUPALNI I REMODELACIJSKI PROCESI U SUBKUTANOM I VISCERALNOM  
MASNOM TKIVU DEFINIRANI KROZ AKTIVNOST IMUNOMETABOLIČKIH  
ADIPOCITOKINA KOD MUŠKE DJECE I ADOLESCENATA**

*Doktorska disertacija*

Osijek, 2022.

Mentor rada: **izv. prof. dr. sc. Kristina Selthofer Relatić, dr. med.**

Komentor: **doc. dr. sc. Dalibor Divković, dr. med.**

Rad ima 95 stranica.

Doktorska disertacija u potpunosti je izrađena pri Medicinskom fakultetu Osijek i Kliničkom bolničkom centru Osijek uz pomoć Katedre za fiziologiju i imunologiju, Katedre za biologiju i medicinsku genetiku, Katedre za histologiju i embriologiju, Katedre za anatomiju i neuroznanost, Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu, Zavoda za dječju kirurgiju te Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Zahvaljujem se svim kolegama i kolegicama koji su sudjelovali na ovom projektu i koji su svojim znanjem, zalaganjem i savjetima omogućili da se ostvari i uspije sve što je bilo planirano. Velika zahvala mentorici izv. prof. dr. sc. Kristini Selthofer Relatić, dr. med. na savjetima i vođenju tijekom ovog projekta te pri izradi doktorske disertacije. Također veliko hvala komentoru doc. dr. sc. Daliboru Divkoviću, dr. med. bez čijeg zalaganja i svakodnevnog truda u operacijskoj sali ne bi bilo moguće provesti ovo istraživanje. Svakako se zahvaljujem svim anesteziolozima te medicinskim tehničarima i tehničarkama Kliničkog bolničkog centra Osijek na toplom pristupu i dostupnosti čime su mi omogućili da se u operacijskoj sali osjećam kao dio tima.

Također, želim se zahvaliti svojoj obitelji, prvenstveno supruzi i kćeri na razumijevanju i potpori tokom izrade doktorske disertacije te za vrijeme trajanja ovog projekta koji je zahtijevao svakodnevnu odsutnost i udaljenost od doma.

## SADRŽAJ

POPIS KRATICA.....	I
POPIS TABLICA .....	III
POPIS SLIKA.....	IV
1. UVOD.....	1
1.1. Pretilost u dječjoj dobi .....	1
1.2. Masno tkivo .....	2
1.2.1. Raspodjela i funkcija masnog tkiva.....	3
1.2.2. Subkutano masno tkivo.....	3
1.2.3. Visceralno masno tkivo .....	4
1.2.4. Smeđe masno tkivo.....	5
1.2.5. Bež masno tkivo .....	5
1.3. Izvanstanični matriks .....	6
1.4. Kolageni i remodeliranje masnog tkiva .....	7
1.5. Kolagen 6 podtip alfa 3.....	9
1.6. Makrofagi i krunaste strukture.....	10
1.7. Masno tkivo kao endokrini organ .....	11
1.7.1. Adipocitokini .....	12
1.7.2. Tumorski faktor nekroze alfa.....	12
1.7.3. Adiponektin .....	13
1.7.4. Omentin/Intelectin-1 .....	14
1.7.5. Visfatin .....	15
1.7.6. Interleukin 6.....	16
1.7.7. Interleukin 8.....	16
1.7.8. Kemerin .....	18
2. HIPOTEZA.....	19
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	20
4. ISPITANICI I METODE.....	21
4.1. Ustroj studije i ispitanici.....	21

4.2. Antropometrijska mjerenja .....	22
4.2.1. Indeks tjelesne mase i Z-vrijednosti indeksa tjelesne mase.....	22
4.3. Prikupljanje uzoraka krvi.....	23
4.4. Prikupljanje uzoraka subkutanog i visceralnog masnog tkiva.....	23
4.5. Biokemijska analiza krvi .....	23
4.6. Enzimsko imunokemijska metoda određivanja adipocitokina u serumu.....	24
4.6.1. Određivanje koncentracije kemerina u serumu .....	24
4.6.2. Određivanje koncentracije visfatina u serumu.....	26
4.6.3. Određivanje koncentracije adiponektina u serumu.....	27
4.6.4. Određivanje koncentracije Intelectina-1/Omentina u serumu .....	28
4.7. Određivanje relativnog izražaja gena metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu u subkutanom i visceralnom masnom tkivu .....	30
4.8. Priprema uzoraka za histološku analizu subkutanog i visceralnog masnog tkiva .....	31
4.8.1. Histološka analiza morfologije subkutanog i visceralnog masnog tkiva.....	32
4.8.2. Histološka analiza stupnja fibroze u subkutanom i visceralnom masnom tkivu tkivu .....	33
4.9. Imunohistokemijska analiza u subkutanom i visceralnom masnom tkivu .....	34
4.9.1. Protokol imunohistokemijske analize na CD163 <sup>+</sup> stanice u subkutanom i visceralnom masnom tkivu .....	34
4.9.2. Analiza uzoraka nakon imunohistokemijske analize na CD163 <sup>+</sup> stanice i krunaste strukture u subkutanom i visceralnom masnom tkivu .....	36
4.10. Statistička analiza .....	37
5. REZULTATI .....	38
5.1. Postoji razlika u antropometrijskim podacima između skupine ispitanika normalne tjelesne mase i skupine ispitanika prekomjerne tjelesne mase/pretilih.....	38
5.2. Postoji razlika u koncentraciji serumskog HDL kolesterola između skupina ispitanika .....	38
5.3. Postoji razlika u morfologiji adipocita subkutanog masnog tkiva između skupina ispitanika.....	39

5.4. Postoji razlika u broju CD163 <sup>+</sup> stanica u visceralnom masnom tkivu i broju krunastih struktura u subkutanom i visceralnom masnom tkivu .....	40
5.5. Postoji razlika u postotku kolagena u visceralnom masnom tkivu.....	41
5.6. Postoji razlika u izražaju gena kolagena 6 podtip $\alpha 3$ u subkutanom i visceralnom masnom tkivu te IL-6 i IL-8 u subkutanom masnom tkivu .....	43
5.7. Postoji povezanost antropometrijskih obilježja i serumskih parametara s površinom i brojem adipocita u subkutanom i visceralnom masnom tkivu .....	44
5.8. Postoji povezanost antropometrijskih obilježja i serumskih parametara s brojem CD163 <sup>+</sup> stanica i krunastih struktura u subkutanom i visceralnom masnom tkivu .....	46
5.9. Postoji povezanost antropometrijskih obilježja i serumskih parametara s izražajem gena TNF- $\alpha$ , kolagena 6 podtip $\alpha 3$ , IL-6 i IL-8.....	48
5.10. Postoji povezanost između antropometrijskih obilježja i serumskih parametara s površinom i brojem adipocita, brojem CD163 <sup>+</sup> stanica te krunastih struktura u subkutanom i visceralnom masnom tkivu i nakon podjele po dobi .....	50
6. RASPRAVA .....	53
6.1. Značajno je manja koncentracija lipoproteina velike gustoće kod pretilih ispitanika dječje dobi.....	53
6.2. Nije bilo značajne razlike u serumskoj razini adiponektina, omentina, visfatina i kemerina .....	55
6.3. Nađena je povećana površina adipocita u subkutanom i povišen broj adipocita u visceralnom masnom tkivu .....	57
6.4. Povećan je broj CD163 <sup>+</sup> stanica u visceralnom i krunastih struktura u subkutanom i visceralnom masnom tkivu .....	59
6.5. Povećan je postotak kolagena u visceralnom masnom tkivu kod skupine ispitanika prekomjerne tjelesne mase i pretilih .....	60
6.6. Značajno je veći izražaj gena IL-8 u subkutanom i kolagena 6 podtip $\alpha 3$ u subkutanom i visceralnom masnom tkivu kod skupine ispitanika prekomjerne tjelesne mase .....	61
6.7. Ograničenja u istraživanju .....	64
7. ZAKLJUČCI.....	65



8. SAŽETAK .....	67
9. SUMMARY .....	68
10. LITERATURA .....	70
11. ŽIVOTOPIS.....	90

## POPIS KRATICA

- BAT** – smeđe masno tkivo (engl. *brown adipose tissue*)
- BMI** – indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)
- CLS** – krunaste strukture (engl. *crown like structure*)
- CNS** – središnji živčani sustav (engl. *central nervous system*)
- COL6 $\alpha$ 3** – kolagen 6 pod tip alfa 3 (engl. *collagen type 6 alpha 3 chain*)
- COL6KO** – kolagen „knock out“ miš (engl. *collagen 6 knockout mice*)
- CVD** – kardiovaskularne bolesti (engl. *cardiovascular disease*)
- ECM** – izvanstanični matriks (engl. *extracellular matrix*)
- ELISA** – enzimski imunokemijska metoda (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)
- FFA** – slobodne masne kiseline (engl. *free fatty acids*)
- FGF** – faktor rasta fibroblasta (engl. *fibroblast growth factor*)
- HDL** – lipoprotein visoke gustoće (engl. *high density lipoprotein*)
- HFD** – prehrana visokozasićenim masnoćama (engl. *high-fat diet*)
- HRP** – konjugat streptavidin hren peroksidaza (engl. *conjugated streptavidin horseradish peroxidase*)
- IHC** – imunohistokemija (engl. *immunohistochemistry*)
- IL-1** – interleukin 1 (engl. *interleukin 1*)
- IL-6** – interleukin 6 (engl. *interleukin 6*)
- IL-8** – interleukin 8 (engl. *interleukin 8*)
- IR** – inzulinska rezistencija (engl. *insulin resistance*)
- LDL** – lipoprotein niske gustoće (engl. *low density lipoprotein*)
- LPS** – lipolisaharidi (enlg. *lipopolysaccharide*)
- LRP10** – protein vezan za receptor lipoproteina niske gustoće (engl. *low-density lipoprotein receptor-related protein 10*)
- M1** – klasično aktivirani makrofagi
- M2** – alternativno aktivirani makrofagi
- MCP-1** – monocitni kemotaktični protein 1 1 (engl. *monocyte chemoattractant protein-1*)
- MetS** – metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*)
- mRNA** – glasnička ribonukleinska kiselina (engl. *messenger ribonucleic acid*)
- MWAT** – mesenterično masno tkivo (engl. *mesenteric white adipose tissue*)
- NAFLD** – nealkoholni steatohepatitis (engl. *nonalcoholic fatty liver disease*)

**NAMPT** – nikotiamid fosforiboziltransferaza (engl. *nicotinamide phosphoribosyltransferase*)

**OWAT** – omentalno masno tkivo (engl. *omental white adipose tissue*)

**QC1** – kontrola kvalitete 1 (engl. *quality control 1*)

**QC2** – kontrola kvalitete 2 (engl. *quality control 2*)

**RCF** – relativna centrifugalna sila (engl. *relative centrifugal force*)

**RPM** – broj okretaja u minuti (engl. *revolutions per minute*)

**rtPCR** – lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (engl. *real-time polymerase chain*)

**RWAT** – retroperitonealno masno tkivo (engl. *retroperitoneal white adipose tissue*)

**SAT** – subkutano masno tkivo (engl. *subcutaneous adipose tissue*)

**THBS1** – trombospondin (engl. *thrombospondin 1*)

**TIMPs** – tkivni inhibitor metaloproteinaze (engl. *tissue inhibitors of metalloproteinases*)

**TNF- $\alpha$**  – tumorski faktor nekroze alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*)

**UCC1** – ultra stanični regeneratorski faktor 1 (engl. *ultra cell conditioner 1*)

**UTM** – ukupna tjelesna masnoća (engl. *total body fat*)

**VAT** – visceralno masno tkivo (engl. *visceral adipose tissue*)

**WAT** – bijelo masno tkivo (engl. *white adipose tissue*)

## POPIS TABLICA

<b>Tablica 5.1.</b> Srednje vrijednosti antropometrijskih podataka muških ispitanika dječje dobi i adolescenata.....	38
<b>Tablica 5.2.</b> Srednje vrijednosti serumskih analiza muških ispitanika dječje dobi i adolescenata.....	39
<b>Tablica 5.3.</b> Srednje vrijednosti broja CD163 <sup>+</sup> stanica i krunastih struktura u masnim tkivima muških ispitanika dječje dobi i adolescenata.....	41
<b>Tablica 5.4.</b> Relativni izražaj mRNA TNF- $\alpha$ , kolagena 6 podtip $\alpha$ 3, IL-6 i IL-8 između skupina ispitanika u subkutanom i visceralnom masnom tkivu.....	44
<b>Tablica 5.5.</b> Povezanost antropometrijskih obilježja i serumskih parametara s površinom i brojem adipocita u subkutanom i visceralnom masnom tkivu.....	45
<b>Tablica 5.6.</b> Povezanost serumskih parametara i antropometrijskih obilježja.....	46
<b>Tablica 5.7.</b> Povezanost antropometrijskih obilježja, serumskih analiza, površine i broja adipocita s brojem CD163 <sup>+</sup> stanica i krunastih struktura u subkutanom i visceralnom masnom tkivu.....	48
<b>Tablica 5.8.</b> Povezanost antropometrijskih obilježja i serumskih parametara s površinom i brojem adipocita u subkutanom i visceralnom masnom tkivu u skupini ispitanika dobi do 10 godina.....	50
<b>Tablica 5.9.</b> Povezanost serumskih i antropometrijskih obilježja u skupini ispitanika dobi do 10 godina.....	51
<b>Tablica 5.10.</b> Povezanost antropometrijskih obilježja, serumskih analiza, površine i broja adipocita s brojem CD163 <sup>+</sup> stanica i krunastih struktura u subkutanom i visceralnom masnom tkivu u skupini ispitanika dobi do 10 godina.....	52

## POPIS SLIKA

<b>Slika 4.1.</b> Reprezentativni prikaz analize morfometrije adipocita.....	33
<b>Slika 4.2.</b> Imunohistokemijska analiza na CD163 <sup>+</sup> stanice.....	36
<b>Slika 5.1.</b> Površina i broj adipocita u subkutanom i visceralnom masnom tkivu.....	40
<b>Slika 5.2.</b> Detekcija CD163 <sup>+</sup> stanica imunohistokemijskom metodom i analize kolagena trikromnim bojanjem po Massonu.....	42
<b>Slika 5.3.</b> Postotak kolagena u potkožnom i visceralnom masnom tkivu između skupina ispitanika.....	43
<b>Slika 5.4.</b> Povezanost broja CD163 <sup>+</sup> stanica s antropometrijskim i serumskim parametrima...	47
<b>Slika 5.5.</b> Povezanost izražaja gena s antropometrijskim i serumskim parametrima.....	49

## 1. UVOD

### 1.1. Pretilost u dječjoj dobi

Pretilost je danas prepoznata kao epidemija koja sa sobom nosi niz komplikacija, a koje se mogu pojaviti posljedično uzrokovane pretilošću kao što su hipertenzija, hiperlipidemija, inzulinska rezistencija, dijabetes tipa 2 te kardiovaskularna oboljenja (1). Kod odrasle se populacije u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD, engl. *United States of America*, USA) iz godine u godinu nastavlja povećavati prevalencija pretilosti i metaboličkih bolesti (2), te stvara ogroman teret na kvalitetu života, a samim time i rashode za zdravstveni sustav (3). Ono što je još izraženije je to što je stopa pretilosti kod djece jednaka i paralelno prati stopu pretilosti odraslih, što je dovelo do pojave niza oboljenja u dječjoj dobi od bolesti koje su primjerenije za javljanje u odrasloj dobi kao što su dislipidemija, nealkoholni steatohepatitis (engl. *nonalcoholic fatty liver disease*, NAFLD) te pojava dijabetesa tipa 2.

Najnoviji podatci pokazuju da prevalencija pretilosti kod djece u razdoblju od 1999. godine do 2014. godine nije opala nego se čak nastavila povećavati kod svih dobnih skupina, 17,4 % djece ima indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*, BMI) veći od 95 percentile za svoju dob i spol prema Svjetskoj Zdravstvenoj Organizaciji (SZO, engl. *World Health Organization*, WHO) (4). Ranije provedena opsežnija studija na području Europe pokazuje je da je prevalencija pretilosti u Europi vrlo alarmanta što potvrđuju statistički podatci u Norveškoj i Ujedinjenom Kraljevstvu koji pokazuju da se čak 15 - 20 % odrasle populacije klasificira kao pretile osobe. Ono što je još izraženije je to da je došlo do vrlo brze eskalacije epidemije pretilosti kod svih dječjih uzrasta gdje podatci pokazuju da skoro 30 % djece ima znakove ranog metaboličkog sindroma (engl. *metabolic syndrome*, MetS) te razvoja NAFLD (5). Čak 10,5 % adolescenata zadovoljava pedijatrijske modificirane kriterije metaboličkog sindroma (6), prevalencije koja prelazi dječje bolesti primjerenije toj dobi kao što su primjerice astma ili razne alergije na hranu.

Pretilost djece i adolescenata općenito se smatra jednim od najvažnijih javnozdravstvenih problema 21. stoljeća (7) iz razloga jer se ta pretilost u dječjoj dobi najčešće prenese i na odraslu dob što povećava rizik od razvoja raznih metaboličkih poremećaja koje dovode do disbalansa metabolizma (8). Podmukli simptomi metaboličke bolesti te ograničeni tretmani za sprječavanje nastanka i dugoročnog oboljenja metaboličkog sindroma na

kardiovaskularne bolesti (engl *cardiovascular disease*, CVD) čine pretilost kao veliku prijetnju zdravstvenom sustavu te cjelokupnom zdravlju djece i odraslih (9).

## 1.2. Masno tkivo

Desetljećima se masno tkivo smatralo inertnom masom pohranjene energije u suvišku s nekim osnovnim funkcijskim svojstvima kao što su izolatorna uloga te mehanička potpora strukturama oko kojih se nalazi. Naime, posljednjih petnaestak godina došlo je do vrlo bitnih otkrića što je dovelo do porasta interesa za proučavanje masnog tkiva, od njegove fiziologije do samog razvoja tijekom gestacijskog perioda. Razvoj masnog tkiva kompleksan je proces koji kod ljudi započinje već tijekom embrionalnog razvoja između 14. i 16. tjedna. Stanice masnog tkiva nazivaju se adipociti koji tijekom embrionalnog razvoja prolaze kroz pet morfoloških faza koje su vrlo povezane i usko prate angiogenezu, odnosno razvoj i formiranje krvnih žila (10). Značajnija ekspanzija i razvoj masnog tkiva započinje ulaskom u drugo gestacijsko tromjesečje te se dalje nastavlja tijekom cijelog života (11). Već pri rođenju su subkutano (engl. *subcutaneous adipose tissue*, SAT) i visceralno (engl. *visceral adipose tissue*, VAT) masno tkivo vrlo dobro razvijena te čine 16 % ukupne tjelesne mase novorođenčeta. Postnatalno se najbrži razvoj bijelog masnog tkiva (engl. *white adipose tissue*, WAT) može primijetiti u prvoj godini života u razdoblju između četvrtog i šestog mjeseca starosti, dok u dobi od 18 mjeseci bijelo masno tkivo čini približno 28 % ukupne tjelesne mase djeteta (12).

Neposredno nakon otkrića adipocitokina te niza drugih signalnih molekula kao što su protuupalni i proupalni adipocitokini masno tkivo počelo se klasificirati kao organ s endokrinom, autokrinom, parakrinom, regenerativnom te termogenetskom ulogom. Kod sisavaca se masno tkivo morfološki klasificira u bijelo masno tkivo WAT i smeđe masno tkivo (engl. *brown adipose tissue*, BAT). WAT se klasificira prema lokalizaciji na subkutano masno tkivo te unutarnje masno tkivo koje se još naziva visceralno masno tkivo, a koje se nalazi unutar abdominalne šupljine oko organa. U novije vrijeme je sve prisutnija još jedna klasifikacija masnog tkiva definirano kao bež masno tkivo (engl. *beige*). Bež masno tkivo je pojava BAT adipocita u depovima WAT (13). Većina masnog tkiva kod sisavaca otpada na bijelo masno tkivo koje je ujedno i mjesto skladištenja energije kao i energije koja nastaje prekomjernim nutritivnim unosom, dok je BAT prisutno većinom kod novorođenčadi i vrlo je bitno u ranom stadiju života za regulaciju tjelesne temperature termogenezom (14). U određenim uvjetima kao što su pojava pretilosti te lipodistrofija, WAT ima mogućnost da se širi ektopično u područja u kojima pojava masnog tkiva može utjecati na razvoj komorbiditeta kao što su dijabetes,

ateroskleroza te CVD. Takva ektopična WAT područja nazivaju se prema mjestu gdje je nakupljanje lokalizirano: epikardijalno (engl. *between heart and pericardium*, epiWAT), perivaskularno (engl. *around major blood vessels*, PWAT), mesenterično (engl. *around digestive organs*, MWAT), omentalno (engl. *around intestines, liver and stomach*, OWAT), retroperitonealno (engl. *around kidneys*, RWAT). MWAT, OWAT i RWAT se klasificiraju kao VAT (15).

### **1.2.1. Raspodjela i funkcija masnog tkiva**

Postoje znatne anatomske razlike u raspodjeli depoa masnog tkiva u tijelu. VAT je uglavnom prisutno oko mezenterija te omentuma i karakteristično je jer se drenira izravno u portalnu cirkulaciju jetre. Tijekom razvoja ukupna tjelesna masnoća (UTM, engl. *total body fat*, TBF) i SAT se gomilaju te prate rast i razvoj organizma ali se tokom dječje dobi uočavaju razlike između muškog i ženskog spola što ukazuje da spolno sazrijevanje uvelike utječe na raspodjelu masnog tkiva (16). Ženski spol akumulira znatno više UTM i SAT koji se za vrijeme i nakon puberteta odlaže prvenstveno u ginoidnim i ekstremitetnim regijama dok se kod muškog spola najveći dio masti odlaže u predjelu abdomena posebice kao VAT što može imati vrlo loš učinak za daljnji razvoj te dovesti do niza metaboličkih komplikacija i bolesti u odrasloj dobi (17).

### **1.2.2. Subkutano masno tkivo**

Primarno lokalizirano u gornjim i donjim tjelesnim depoima, SAT je najistaknutiji odjeljak WAT kod mršavih i zdravih osoba čineći više od 80 % ukupne količine masnog tkiva. SAT je najveći depo WAT te njegova važnost u skladištenju energije od velike je važnosti za energetske homeostazu metabolizma. Kao reakcija i odgovor za održavanje pozitivne energetske ravnoteže SAT prolazi kroz reorganizaciju promjenom broja i veličine zrelih adipocita. SAT djeluje kao metabolički „odljev“ (engl. *sink*) za skladištenje viška lipida (18). Kada dođe do popunjenja kapaciteta za skladištenje lipida zbog nemogućnosti stvaranja dovoljno novih adipocita zbog ograničene hiperplazije ili nemogućnosti daljnjeg širenja postojećih adipocita hipertrofijom, višak se tada počinje nakupljati ektopično. Hipertrofični adipociti luče adipocitokine koji regrutiraju preadipocitne stanice te potiču njihovu diferencijaciju u zrele adipocite i time potiču proces koji se naziva remodeliranje masnog tkiva.



Kada se širenje SAT postigne zbog prekomjernog nutritivnog unosa remodeliranjem masnog tkiva, WAT je u donekle u mogućnosti da zadrži svoje regulatorne funkcije što se definira kao „zdrava pretilost“ (engl. *good adiposity*). Gomilanje masnog tkiva može potencijalno imati tzv. protektivnu ulogu - „zdrava pretilost“, ali najčešće ima negativan učinak na organizam - „nezdrava pretilost“ (engl. *bad adiposity*), uzrokujući poremećaje metaboličkih procesa te izazivanja upalnog stanja niskog intenziteta što su dvije glavne poveznice s nastankom metaboličkog sindroma i inzulinske rezistencije (19). Neki od mehanizama za koje se pretpostavlja da objašnjavaju metabolički zdravu pretilost uključuju očuvanu osjetljivost na inzulin te veće nakupljanje masti u SAT nego u ostalim depozitima WAT. No međutim kada se dogodi da se SAT ne raspoređuje pravilno prilikom skladištenja lipida tada postaje disfunkcionalno što u nastavku dovodi do ektopičnog odlaganja lipida oko jetre, gušterače, mišića te srca što utječe na njihovu normalnu funkciju te dovodi do raznih metaboličkih posljedica.

Takvo disfunkcionalno SAT postaje otporno na inzulin te potiče produkciju proupalnih adipocitokina te odlaganje proteina izvanstaničnog matriksa (engl. *extracellular matrix*, ECM) koji zatim potiču infiltraciju te aktivaciju imunoloških stanica čime se stvara okružje za nastanak upale (20). SAT također djeluje kao izolator organizma, sprječava gubitak energije u obliku topline te služi kao zaštitna barijera od vanjskih utjecaja (21).

### 1.2.3. Visceralno masno tkivo

Omentalno, mesenterično i retroperitonealno masno tkivo se klasificiraju kao područja koja se ubrajaju u VAT. Kod mršavih ali zdravih osoba nisu prisutne velike količine VAT koja uvelike spada u kategoriju ektopičnog WAT. VAT je vrlo metabolički aktivno te neprestano oslobađa slobodne masne kiseline (engl. *free fatty acids*, FFA) u cirkulaciju. Sadržaj i količina visceralnog masnog tkiva uvelike doprinosi različitim značajkama MetS kao što su hiperinzulinemija, sistemska upala, dislipidemija te ateroskleroza (22). Visceralna pretilost je zasebna komponenta MetS i stupanj pretilosti je izravno povezan s konačnim ishodom. Prekomjerna akumulacija VAT definira kardiovaskularni profil rizika te povećava osjetljivost na ishemijsku bolest srca te razvoj arterijske hipertenzije (23).

VAT je hormonski jako aktivno tkivo, oslobađa veliki broj biomolekula i hormona koji utječu na metabolizam i energetske homeostazu kao što su adiponektin (engl. *adiponectin*), leptin, tumorski faktor nekroze alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- $\alpha$ ), rezistin te

interleukin 6 (engl. *interleukin 6*, IL-6). Adiponektin je možda i najbitniji adipocitokin radi svoje antiangiogene aktivnosti, također cirkulirajući adiponektin obrnuto korelira s količinom VAT dok su smanjenje koncentracije adiponektina povezane s nastankom dijabetesa tipa 2, povišenom razinom glukoze, hipertenzijom, kardiovaskularnim oboljenjima te drugom malignim bolestima (24).

#### **1.2.4. Smeđe masno tkivo**

Prvenstveno se smatralo da je BAT isključivo prisutno kod sisavaca koji imaju sposobnost hibernacije te kod drugih malih sisavaca, a da se kod ljudi nalazi u određenoj mjeri samo kod novorođenčadi, međutim nedavno se uspostavilo da i kod odraslih ljudi postoje funkcionalne razine BAT koje imaju sposobnost reagirati na hladnoću i aktivaciju simpatikusa (25), no to predstavlja samo 1 – 2 % ukupnih zaliha masti kod odraslog čovjeka, BAT je prvenstveno lokaliziran u cervikalnoj, aksilarnoj te paraspinalnoj regiji. Slično kao WAT, BAT sintetizira te luči batokine kao što su faktor rasta fibroblasta (engl. *fibroblast growth factor*, FGF), FGF21, neuregulin 4 (engl. *neuregulin 4*, NRG4), vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) te IL-6 (26). Obzirom na vrlo malu količinu prisutnog BAT koji se nalazi kod odraslih ljudi, endokrini potencijal s lučenjem batokina je još uvijek nedovoljno istražen, ali je vrlo jasno da metabolički spojevi koje izlučuje BAT imaju parakrine i endokrine funkcije.

Relativna masa BAT kod ljudi i glodavaca je vrlo mala kada se uspoređi s drugim depovima masnog tkiva, no ipak relativni doprinos BAT metaboličkom zdravlju može imati puno veći doprinos nego što je to do sada poznato te su potrebne detaljnije studije (27).

#### **1.2.5. Bež masno tkivo**

Bež masno tkivo se u literaturi opisuje kao prisutnost smeđih adipocita unutar klasičnih depoa WAT. Bež masno tkivo dijeli određene značajke klasičnog BAT kao što je sistemsko snižavanje triglicerida, smatra se da je než masno tkivo fiziološki različito od BAT s malo drugačijim izražajem određenih gena koji su uključeni u metabolizam, upale i transkripciju (28). Postoji nekoliko teorija o podrijetlu než adipocita te o njihovom utjecaju na energetske homeostazu. Bež adipociti mogu nastati *de novo* adipogenezom iz specifičnih progenitorskih stanica kada su stimulirani hladnoćom (29) ali mogu ostati u stanju mirovanja dok se naknadno

opet ne stimuliraju (30). Prvotno se smatralo da bež adipociti nastaju transdiferencijacijom iz stanica normalnih adipocita sa sposobnošću dediferencijacije no provedenim studijama se pokazalo da to nije slučaj (31).

Identitet prekursora bež adipocita nije poznat niti je u potpunosti razjašnjen, ali postoje neki dokazi iz izoliranih WAT stromalnih stanica koji sugeriraju da se bež adipocitni prekursori razlikuju od prekursora normalnih adipocita WAT (32).

### 1.3. Izvanstanični matriks

ECM kompleksna je struktura izgrađena i sastavljena od proteina, proteoglikana i polisaharida koji čine potporu i omogućavaju stanicama adheziju te moduliranje bioloških procesa poput migracija, popravljanja te razvijanja (33). ECM je ključna komponenta masnog tkiva i neophodna je za održavanje ravnoteže i integriteta same strukture tkiva. Stvaranje, održavanje i degradacija ECM masnog tkiva regulirano je mnogobrojnim komponentama masnog tkiva, uključujući adipocite pa čak i same upalne stanice (34). Pretilost je karakterizirana s povećanom ekspanzijom adipocita dok su remodeliranje ECM i reorganizacija neophodne za osiguravanje dovoljno mjesta za skladištenje uvećanih adipocita (hipertrofija) te za formiranje novih adipocita kroz proces adipogeneze preko stanica prekursora (hiperplazija), zreli adipociti pohranjuju energiju u obliku triglicerida, a to dovodi do snažnog mehaničkog naprezanja, koje se prenosi izvana u unutrašnjost stanica. (35). U masnom je tkivu ECM uglavnom sastavljen od kolagena tipa I, II, III i IV, fibronektina te male količine laminina (36,37). Naime, nekoliko komponenti kao što su A disintegrin i protein domene metaloproteinaze (engl. *a disintegrin and metalloproteinase*, ADAMs), osteopontin (engl. *osteopontin*, OPN), hijaluronan (engl. *hyaluronan*, HA), trombospondin (engl. *thrombospondin 1*, THBS1), matriks metaloproteinaze (engl. *matrix metalloproteinases*, MMPs), te tkivni inhibitor metaloproteinaze (engl. *tissue inhibitors of metalloproteinases*, TIMPs) igraju vrlo bitnu ulogu u remodeliranju ECM te u samoj funkciji masnog tkiva (38,39).

Spomenuti procesi zajedno omogućuju formiranje novih krvnih žila (angiogeneza) koje su od velike važnosti za normalnu i zdravu ekspanziju masnog tkiva. Ukoliko dođe do poremećaja ili prekida u funkcioniranju ovih procesa rezultat je nekroza i hipoksija adipocita što je okidač za pojavu kronične upale niskog intenziteta i nastanka fibroze koja uzrokuje daljnju disfunkciju masnog tkiva i naposljetku dovodi do vjerojatne pojave inzulinske rezistencije (IR, engl. *insulin resistance*) (35,40,41). Sva su skladišta masnog tkiva izrazito vaskularizirana preko guste kapilarne mreže koja zahvaća i same adipocite (42). Kod ljudi,

angiogeneza nije jednaka u svim segmentima masnog tkiva. Dokazano je da je angiogeneza veća i obuhvatnija u subkutanom masnom tkivu naspram visceralnog masnog tkiva (43). Na uzorcima masnog tkiva uzetih od pretilih osoba utvrđen je niži angiogenezni potencijal što je povezano s IR, što donekle potvrđuje teorije da pretilost smanjuje gustoću kapilarne mreže te općenito povećava volumen krvnih žila (44).

U pretilih ljudi dolazi do pojačanog odlaganja vezivnoga tkiva, prvenstveno kolagena, u ECM, te narušavanja morfologije i arhitektonike masnoga tkiva. Predominantno nakupljanje kolagenih vlakana praćeno je tinjajućom upalom koju karakterizira infiltracija upalnih stanica uz stvaranje proupalnih citokina pri čemu dolazi do fibroze (45). ECM vrlo aktivno orkestrira funkcije u procesu zacjeljivanja i regeneracije rana. U raznim tkivima komponente koje čine sami ECM te koje pružaju strukturnu potporu služe kao hvatišta za različite stanice koje variraju kvantitativno i kvalitativno u pojedinim tkivima. ECM služi kao posrednik i medijator u međustaničnoj komunikaciji te je stoga vrlo bitna komponenta svakog tkiva. Integrini su glavni tkivni receptori za staničnu adheziju na proteine ECM, a važnu ulogu imaju i u određenim procesima adhezije stanice na stanicu. ECM osigurava stanicama adheziju te njihovu organizaciju u tkivima, integrini ugrađeni u plazma membranu osiguravaju međusobnu komunikaciju između komponenti ECM i staničnog tkiva stoga svaka promjena koja se dogodi u ECM se odražava na stabilnost i strukturu samog tkiva (46).

#### **1.4. Kolageni i remodeliranje masnog tkiva**

Sposobnost masnog tkiva da se vrlo brzo prilagođava promjenjivom unosu nutrijenata u organizam nužno je za održavanje normalne metaboličke kontrole. Smanjen ili povećan unos nutrijenata utječe na organizaciju i funkcionalnost stanica masnog tkiva te potiče niz lančanih reakcija koje su međusobno isprepletene te dolazi do pojave poznate kao remodeliranje masnog tkiva.

Remodeliranje masnog tkiva obilježavaju procesi poput infiltracije upalnih stanica, razvoja upalnog procesa praćenog produkcijom proupalnih citokina – interleukin 1 (*engl. interleukin 1*, IL-1), IL-6, interleukin 18 (*engl. interleukin 18*, IL-18) TNF- $\alpha$ , transformirajući faktor rasta beta (*engl. transforming growth factor beta*, TGF- $\beta$ ), pojačane angiogeneze te povećanog odlaganja proteina izvanstaničnog matriksa koji se aktivno stvaraju dovodeći do morfoloških promjena masnoga tkiva i uzrokujući njegovo remodeliranje (47). Termin remodelacije masnog tkiva neki upotrebljavaju kako bi se opisale promjene koje se odvijaju u

staničnom sastavu tkiva stromalnih stanica kao odgovor na ekspanziju ili kontrakciju masnog tkiva uslijed promjena u nutritivnom unosu, dok drugi koriste remodeliranje za opis razlaganja i taloženja nestaničnih komponenti masnog tkiva koje doprinose njegovoj arhitektonici kao što je ECM (40,48). Kolagen je glavna nestanična komponenta ECM te značajno doprinosi ukupnoj količini nestanične mase masnog tkiva. Kolagen primarno proizvode adipociti, no preadipociti i endotelne stanice također imaju tu mogućnost. Kolageni doprinose staničnoj adheziji, migraciji, diferencijaciji, morfogenezi te cijeljenju rana i stvaranju ožiljaka u masnom tkivu. Između nekoliko tipova kolagena, kolagen IV je glavna komponenta bazalne membrane svakog adipocita što je vrlo bitno za preživljavanje adipocita (39,49).

Kolagen I je najviše zastupljen tip kolagena u ECM (50). Kod pretilosti prekomjerno nakupljanje kolagena uzrokuje fibrozu masnog tkiva uzrokujući smanjenu elastičnost i povećanu napetost masnog tkiva, smanjenu potrošnju masnog tkiva te izaziva pojavu IR (51). U masnom tkivu kod miševa koji su podvrgnuti dijeti bogatoj nezasićenim masnim kiselinama (engl. *high-fat diet*, HFD), utvrđeno je da je kolagen IV najzastupljeniji tip kolagena. Kolagen IV najviše je zastupljen u masnom tkivu pretilih osoba (52), ali također kolageni tipa I, III, V i VI su povišeno prisutni kod miševa koji su podvrgnuti HFD (53). Preadipocitna diferencijacija aktivira dinamičko taloženje svih tipova kolagena nakon čega slijedi degradacija ECM tokom kasnijih faza diferencijacija (54).

Jedinstvena je značajka masnog tkiva da sadrži najvišu koncentraciju kolagena tipa 6 u usporedbi s drugim tkivima. Dokazano je da kolagen 6 korelira s BMI, također je jasno da su i drugi kolageni osim kolagena 6 vrlo važni u procesu remodeliranja masnog tkiva kao što je primjer kod pretilice djece, gdje povećana razina kolagena u masnom tkivu korelira smanjivanjem veličine masnih stanica i BMI, dok ta korelacija nije povezana do sada s kolagenom 6 (34). Na studijama koje su provedene na ljudima, imamo pojavu fibroze u visceralnom masnom tkivu prikupljenu iz omentum majus ali ne i u subkutanom masnom tkivu što negativno korelira s razinom triglicerida u krvi te pozitivno korelira s razinom lipoproteina visoke gustoće (engl. *high density lipoprotein*, HDL) dok fibroza u visceralnom masnom tkivu omentum majus obrnuto korelira s veličinom adipocita kod pretilih osoba (45). Povezanost između fibroze i upale koja se odvija u masnom tkivu vrlo je kompleksna i isprepletana nizom procesa. Međutim, iako upala može voditi do nastanka fibroze, fibroza može nastupiti i neovisno o samoj upali (55).

Dokaz disfunkcionalnosti u procesu remodeliranja masnog tkiva uslijed povećanog ili smanjenog nutritivnog unosa je jedno od glavnih obilježja pretilosti povezane s pojavom metaboličkog sindroma. Mehanizmi koji su uključeni u ekspanziju masnog tkiva kod pretilosti

nisu potpuno uravnoteženi te obrasci skladištenja i ekspanzije masnog tkiva drugačiji su od osobe do osobe. Upravo ta razlika u načinu i mehanizmu skladištenja masnog tkiva kod pojedinaca dovodi do varijacija u nastanku i pojavi metaboličkih bolesti kod osoba sa jednakim stupnjem pretilosti (56,57).

### 1.5. Kolagen 6 podtip alfa 3

ECM masnog tkiva sadrži više vrsta kolagena uključujući tip I, IV, V, VI, VII, VIII te IX među kojima je kolagen 6 najzastupljeniji u masnom tkivu (58). Kolagen 6 je nefibrilarni kolagen građen od kratkih trostrukih spiralnih domena te većim globularnim domenama. Glasnička ribonukleinska kiselina (engl. *messenger ribonucleic acid*, mRNA) alfa 3 podjedinice kolagena 6 (engl. *collagen 6 subtype alpha 3*, COL6 $\alpha$ 3) je povišena kod pretilih miševa dok kod miševa s razvijenim dijabetesom kojima nedostaje gen COL6 $\alpha$ 3 (engl. *collagen VI  $\alpha$ 3 knockout mice*, COL6KO) prikazuje se puno bolji metabolički profil i dobivaju puno manje na težini kada se stave na HFD (59). Istraživanja su također pokazala da su COL6KO miševi puno osjetljiviji na inzulin unatoč većim adipocitima u SAT koji su tipično povezani sa smanjenom osjetljivošću na inzulin (60) što sugerira da COL6 $\alpha$ 3 ograničava skladištenje lipida u SAT. COL6KO miševi imaju i manji sadržaj makrofaga u masnom tkivu općenito te smanjen izražaj upalnih stanica uključujući kemoatraktivni monocitni protein 1 (engl. *monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1) te inflamatorni protein makrofaga (engl. *macrophage inflammatory protein-1*, MIP-1). COL6 $\alpha$ 3 smatra se da bi mogao djelovati izravno kroz receptore makrofaga koji povećavaju - lumikan ili smanjuju - dekorin nakupljanje makrofaga što pokazuje smanjen izražaj lumikana te povećan izražaj dekorina u masnom tkivu kod COL6KO miševa (58).

U masnom tkivu kod ljudi otkriveno je da su oksigenacija masnog tkiva te mRNA COL6 $\alpha$ 3 u značajnoj korelaciji pokazujući da osobe s većim izražajem COL6 $\alpha$ 3 imaju smanjenu oksigenaciju masnog tkiva (61), a smanjena oksigenacija usko je povezana s razvojem upalog procesa masnoga tkiva. Do danas je vrlo malo studija na ljudima okarakteriziralo ulogu COL6 $\alpha$ 3 kod osoba s pretilošću te nije u potpunosti razjašnjeno u kojem stupnju COL6 $\alpha$ 3 doprinosi ukupnoj strukturi kolagena ECM u masnom tkivu kod ljudi te neke studije pokazuju da čak postoji dvojaka uloga da COL6 $\alpha$ 3 može djelovati protuupalno i proupalno. U masnom tkivu kod ljudi, u skladu s istraživanjima provedenim na miševima povišena regulacija COL6 $\alpha$ 3 pozitivno se povezuje s upalom koja prati pojavu pretilosti,

inzulinskom rezistencijom te pojavom metaboličke disregulacije, a također može djelomično potaknuti inzulinsku rezistenciju ograničavanjem adipogeneze (62).

### 1.6. Makrofagi i krunaste strukture

Iako su adipociti ključni igrači koji kontroliraju lokalne promjene u svojoj okolini, ključnu ulogu u procesu remodeliranja imaju i makrofagi (63). Makrofagi su opće prepoznati kao predstavnici heterogene populacije stanica s varijabilnom funkcijom koja ovisi o polarizacijskom statusu, nalaze se u neposrednoj blizini miofibroblasta koji proizvode kolagen i time neosporno igraju ključnu ulogu u nastanku i procesu fibroze. Oni proizvode profibrotske posrednike koji izravno aktiviraju fibroblaste, uključujući transformaciju faktora rasta  $\beta 1$  i kontroliraju promet ECM reguliranjem ravnoteže različitih matriks metaloproteinaza i njihovih inhibitora. Makrofagi reguliraju fibrogenezu izlučivanjem kemokina koji zatim regrutiraju fibroblaste te druge proupalne stanice (64,65). Makrofagi se opisuju kao fagocitne stanice koje razgrađuju i uklanjaju stanične ostatke nakon što nastupi stanična smrt. To je jedno od njihovih ključnih funkcija u fibrogenezi. Međutim, hoće li fibroza napredovati brže ili sporije također ovisi i o vrsti tkiva koje je zahvaćeno. Ozljeda tkiva uzrokuje oštećenje parenhimskih stanica kao što su hepatociti koji zatim podliježu apoptozi ili nekrozi. Makrofagi uklanjaju mrtve stanice neovisno o načinu na koji je smrt stanice nastupila, ali zanimljivo je da pri apoptozi potiskuju upalnu reakciju dok kod stanica gdje je nastupila smrt nekrozom potiču upalni proces tijekom procesa uklanjanja staničnih ostataka (66).

Do sada su okarakterizirana dva tipa diferencijacije makrofaga, M1 – klasično aktivirani makrofagi i M2 – alternativno aktivirani makrofagi. M1 makrofagi su okarakterizirani kao proupalni fenotipovi koji imaju mogućnost promocije imunološkog odgovora T pomagača stanica tipa 1 (engl. *T helper type 1 cells*, Th1) te pokazuju tumorocidne aktivnosti dok M2 makrofagi pokazuju regulatorne funkcije pri obnavljanju oštećenog tkiva, remodeliranju te promociji imunološkog odgovora T pomagača stanica tipa 2 (engl. *T helper type 2 cells*, Th2) (67). M1 i M2 makrofagi razlikuju se i u tome što potiču izražaj različitih molekula, npr. inducibilna sintaza dušikovog oksida (engl. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS), metaloproteinaze i arginaze (64). U masnom tkivu pretilih ispitanika se nalazi povećani broj makrofaga koji proizvode ili otpuštaju određene citokine koji zatim doprinose lokalnoj sistemskoj upali masnog tkiva koja je niskog intenziteta (68).

Makrofagi koji se nalaze u masnom tkivu pretilih ispitanika često se mogu pronaći okupljeni oko mrtvih adipocita. Takva pojava naziva se „krunasta struktura“ (engl. *crown like*

*structure*, CLS) (69). CLS nastajaju spajanjem kako bi fagocitozirali zaostalu kapljicu lipida tvoreći jedno od opće prihvaćenih obilježja kronične upale niskog intenziteta, a također se i u velikom broju nalaze u fibroznim područjima masnog tkiva (44). M1 ili „klasično aktivirani makrofagi“ inducirani su uz pomoć lipopolisaharida (engl. *lipopolysaccharide*, LPS) i TNF- $\alpha$  te stvaraju proupalne citokine, dok M2 ili „alternativno aktivirani makrofagi“ inducirani su glukokortikoidima, interleukinom 4 (engl. *interleukin 4*, IL-4) i interleukinom 10 (engl. *interleukin 10*, IL-10) te proizvode protuupalne citokine (65,70,71).

U studijama provedenim na pretilim miševima zapaženo je da dolazi do povećeg nakupljanja makrofaga u masnom tkivu što je vrlo sličan mehanizam koji se događa i kod pretilih ljudi. Međutim, u istraživanjima koje koriste animalne modele, prvenstveno glodavce, pretilost je najčešće uzrokovana dijetnom prehranom te se time dovodi do promjene fenotipova makrofaga u masnom tkivu od M2 polariziranog tipa makrofaga kod mršavih životinja do M1 polariziranog tipa makrofaga kod pretilih životinja (72,73). Kod studija na ljudima rezultati koji se odnose na polarizacijske promjene kod pretilih ispitanika nisu toliko jasni i nije lako doći do zaključaka kao što je to kod istraživanja na animalnim modelima. Neke studije pokazuju da su kod pretilih ispitanika koncentracije proupalnih biljega u subkutanom masnom tkivu znatno povišene u usporedbi s mršavim ispitanicima (74,75). Također, pokazuju da gubitak tjelesne mase bilo da je izazvan niskoenergetskom dijetnom prehranom ili želučanom premosnicom inducira povećanu razinu protuupalnih biljega makrofaga te smanjenu razinu proupalnih biljega makrofaga u subkutanom masnom tkivu (76). Također, jedna od provedenih studija navodi da se makrofagi u subkutanom masnom tkivu s pojavom pretilosti mijenjaju u protuupalni fenotip (70).

Rezidencijalne makrofage u masnom tkivu smatra se metabolički korisnim za očuvanje zdravlja i funkcionalnosti adipocita u stanjima smanjenog nutritivnog unosa, te kod procesa remodeliranja masnog tkiva koje nastaje uslijed progresije pretilosti (77).

### **1.7. Masno tkivo kao endokrini organ**

Masno tkivo ima bitnu ulogu u održavanju i regulaciji energetske homeostaze i mnogobrojnih bioloških procesa. Osim što služi kao mjesto za pohranu energije adipociti luče posebne bioaktivne medijatore koji se nazivaju adipocitokini. Kod pretilosti adipociti su sastavni dio razvoja upale uzrokovane pretilošću što prati povećana produkcija proupalnih adipocitokina kao što su MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 i interleukin 8 (engl. *interleukin 8*, IL-8)



za koje su ranije provedene studije dokazale da potiču na direktan ili indirektan način nastanak IR (78,79). Masno tkivo sadrži metaboličke mehanizme koji omogućuju komunikaciju s udaljenim organima uključujući i središnji živčani sustav (engl. *central nervous system*, CNS). Također, masno tkivo ima sposobnost proizvodnje raznih receptora koji mu omogućuju odgovor na aferentne signale „tradicionalnih“ hormonskih sustava, kao i signale iz CNS.

Kroz kompleksnu interaktivnu mrežu masno tkivo je integralno uključeno u koordinaciju energetskeg metabolizma, neuroendokrinu funkciju te sudjeluje u imunološkom mehanizmu (80). Važna endokrina funkcija masnog tkiva posebno je naglašena metaboličkim posljedicama koje nastaju smanjenim ili povećanim nutritivnim unosom. Iako adipociti luče većinu adipocitokina postoje i drugi razni proteini koje stvaraju i luče ostale građevne i strukturne jedinice koje se nalaze u masnom tkivu (81).

### **1.7.1. Adipocitokini**

Adipocitokini su bioaktivne molekule koje su vrlo bitne u regulaciji mnogobrojnih bioloških procesa u organizmu te su uključeni u razvoj upale te u razne druge patofiziološke procese. Adipocitokini djeluju kao autokrini/parakrini/endokrini posrednici čija je glavna uloga u regulaciji apetita, metabolizma, imuniteta, kardiovaskularnih funkcija i ostalih kompleksnih bioloških procesa. Masno tkivo je vrlo bitno za metaboličku interakciju s drugim organima pa je njegovo pravilno funkcioniranje esencijalno za održavanje normalne energetske homeostaze (82).

### **1.7.2. Tumorski faktor nekroze alfa**

TNF- $\alpha$  je transmembranski protein veličine 26-kDa koji cijepanjem u 17-kDa postaje biološki najaktivniji preko receptora tip I te receptora tip II. TNF- $\alpha$  je proupalni adipocitokin za kojeg se prvenstveno smatralo da uzrokuje nekrozu tumora te se kasnije ustanovilo kroz istraživanja povezanost između pretilosti, upalnih procesa i dijabetesa tip 2 (83). Iako se smatralo da ga uglavnom luče adipociti većinu TNF- $\alpha$  luče makrofagi. TNF- $\alpha$  igra važnu ulogu u inzulinskoj rezistenciji smanjujući inzulinom stimuliranu fosforilaciju inzulinskog receptora te supstrata inzulinskog receptora 1 (engl. *insulin receptor supstrate 1*, IRS1) u mišićnom i masnom tkivu ali ne i u jetri čime potiče inzulinsku rezistenciju. Kod ljudi su razine TNF- $\alpha$

veće u krvnoj plazmi i masnom tkivu pretilih osoba. TNF- $\alpha$  je značajnije izražen u subkutanom nego što je u visceralnom masnom tkivu.

Istraživanja pokazuju da cirkulirajuća razina TNF- $\alpha$  opada kod pretilih ljudi s pojavom reduciranja ukupne mase, također je dokazano i da pozitivno korelira s drugim biljezima inzulinske rezistencije. Unatoč tome, akutnim liječenjem s inhibitorom TNF- $\alpha$  kod pretilih osoba s dijabetesom tip 2 došlo je do smanjenja ostalih sistemskih upalnih biljega bez smanjenja inzulinske rezistencije (84,85). TNF- $\alpha$  također ometa i destabilizira strukturnu mrežu inzulinske signalizacije te dolazi do povećane koncentracije masnih kiselina u serumu. Novija istraživanja liječenja inhibitorima TNF- $\alpha$  kroz duži period u osoba s metaboličkim sindromom pokazuju da dolazi do normalizacije razine šećera u krvi na tašte te da se povećava razina adiponektina u serumu što potvrđuje vrlo veliku ulogu TNF- $\alpha$  u nastanku inzulinske rezistencije povezane s pojavom pretilosti kod ljudi (86).

### 1.7.3. Adiponektin

Adiponektin je protein alternativno poznat još kao AdipoQ, apM1 (engl. *adipose most abundant gene transcript 1*, apM1), Acrp30 (engl. *a circulating protein synthesized in adipose tissue*, Acrp30) te želatinsko-vezni protein-28 (engl. *human gelatin-binding protein 28*, GBP28) sastavljen od 244 aminokiseline koji se izlučuje primarno iz masnog tkiva (87). Adiponektin je otkriven sredinom 1990-ih te je detaljno istražen. Njegov jedinstveni aspekt je taj da njegov izražaj i prisutna razina u cirkulaciji obrnuto je proporcionalna razini pretilosti. Također izražaj adiponektina se razlikuje između spolova, više razine su uočene kod ženskog nego kod muškog spola (88) te između depoa masnog tkiva s većim izražajem u SAT nego VAT (89).

Njegova svojstva koja potiču na inzulinsku osjetljivost vrlo dobro su poznata i istražena, a primjer toga je razvoj inzulinske rezistencije kod miševa s nedostatkom adiponektina te očuvanje inzulinske osjetljivosti kod miševa s prekomjernim adiponektinskim izražajem (90). Signalizacija adiponektina vrši se preko dva prevladavajuća receptora, adiponektinski receptor 1 (engl. *adiponectin receptor 1*, ADIPOR1) i adiponektinski receptor 2 (engl. *adiponectin receptor 2*, ADIPOR2) koji su 67% slični strukturno. To su transmembranski receptori kojima je izvan stanične membrane smještena C-terminalna domena dok je N-terminalna intracelularno. Vezujući se na njih adiponektin provodi aktivaciju 5' adenzin monofosfat aktiviranu protein kinazu (AMP kinazu, engl. *5' adenosin monophosphate-activated protein*

*kinase*, AMPK) te stimulira utilizaciju glukoze te inhibirajući fosfoenolpiruvat karboksilazu suzbija glukoneogenezu (91,92).

Adiponektin igra vrlo bitnu ulogu u modulaciji metabolizma glukoze i lipida u tkivu osjetljivom na inzulin kod ljudi i kod životinja. Istraživanja provedena na animalnim modelima pokazuju da niske razine adiponektina snažno utječu na razvoj insulinske rezistencije kod pretilosti i lipoatrofije. Kod ljudi niske razine adiponektina u serumu značajno su niže u stanjima insulinske rezistencije uključujući i dijabetes tipa 2, ali aplikacijom tiazolidindiona (engl. *thiazolidinediones*, TZD) dolazi do normaliziranja razine adiponektina (93). Razine adiponektina u serumu kod osoba s dijabetesom koji imaju pobol od koronarne arterijske bolesti (engl. *coronary artery disease*, CAD) niže su nego u bolesnika s dijabetesom koji nemaju pobol od koronarne arterijske bolesti što sugerira da adiponektin ima određena antiaterogena svojstva. Neke su studije pokazale da adiponektin ovisno o dozi suprimira izražaj molekula vaskularne adhezije za koje je poznato da moduliraju endotelne upalne odgovore, također niz kliničkih studija ukazuju na to da niske razine adiponektina su povezane s aterogeničkim lipidnim profilom.

Povezanost niske razine adiponektina s pretilošću, inzulinskom rezistencijom, kardiovaskularnim bolestima te dislipidemijom ukazuje na to da adiponektin može biti vrlo bitna karika kao biljeg metaboličkog sindroma (94).

#### **1.7.4. Omentin/Intelectin-1**

Omentin/Intelectin-1 je pravi endokrini cirkulirajući hormon sastavljen od 313 aminokiselina čije su razine znatno reducirane kod osoba s pretilošću i s pobolom od dijabetesa tipa 2 što je dovelo do raznih istraživanja i povezivanja omentina s glukoznom homeostazom (95). Naknadno provedene studije to potvrđuju na *in vitro* modelima dokazujući da omentin pojačava inzulinom stimuliranu apsorpciju glukoze u adipocitima kod ljudi aktiviranjem Akt signalnih puteva. Kod ljudi pokazuje značajnu negativnu korelaciju između serumske razine omentina i razine genskog izražaja mRNA omentina iz masnog tkiva s inzulinskom rezistencijom. Razina se omentina značajno povećava s reduciranjem tjelesne mase, također mnoge studije ukazuju da omentin ima protuupalna svojstva (82). U stanju pretilosti su izražaj i cirkulirajuće razine omentina znatno reducirane u VAT što pozitivno korelira s razinama adiponektina i HDL u serumu dok negativno korelira s opsegom struka, BMI, leptinom i razinom glukoze (95) te se kao takav smatra biljgom mršavosti.

Omentin ima pozitivan učinak na inzulinsku signalizaciju i upalu. U epikardijalnom masnom tkivu kod bolesnika s dijabetesom te onima bez dijabetesa liječenje omentinom poboljšava inzulinom reducirani unos glukoze te pojačava izražaj adiponektina adipogenezom i smanjuje izražaj TNF- $\alpha$  u zrelih adipocitima, dok u isto vrijeme povećava izražaj TNF- $\alpha$  u stromalnim stanicama (96). Kod miševa omentin potiče smanjenje proizvodnje proupalnih adipocitokina poput TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-1 $\beta$  i povećava proizvodnju protuupalnih adipocitokina poput adiponektina i IL-10, a kod ljudskih U937 makrofagima liječenim LPS-om zabilježeno je da omentin ima zaštitni učinak protiv oksidativnog stresa, mitohondrijske disfunkcije, izražaja i sekrecije proupalnih citokina poput IL-6, IL-8 i MCP-1 (97). Ljudska monocitna stanična linija, U937, izolirana je 1974. godine i jedna je od rijetkih staničnih linija koja izražava brojne monocitne karakteristike i često se koristi u proučavanju diferencijacije monocita (98).

Omentin donekle utišava, odnosno „otupljuje“ (engl. *blunts*) izražaj adipocitokina u endotelnim stanicama, stanicama glatkih mišića i masnog tkiva te je negativno povezan s sistemskim upalnim biljezima kao što su TNF- $\alpha$  i IL-6. Omentin se smatra biljgom za metaboličko zdravlje koji može znatno utjecati na učinke proupalnih adipocitokina i smanjiti simptome metaboličkih bolesti koje su usko vezane uz pojavu pretilosti (99).

### 1.7.5. Visfatin

Visfatin, poznat još kao faktor za povećanje kolonije pre-B stanica (engl. *pre-B cell colony enhancing factor*, PBEF) je protein veličine 52 kDa. U literaturi se visfatin još naziva i NAMPT zbog njegovog značajnog slijeda i funkcionalne homologije s nikotamid fosforiboziltrasferazom (engl. *nicotinamide phosphoribosyltransferase*, NAMPT), enzimom uključenim u biosintezu nikotinamid adenin-dinukleotida (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide*, NAD) iz nikotinamida (100,101).

Visfatin bi se mogao pokazati kao vrlo značajan adipocitokin za razumijevanje bioloških razlika između VAT i SAT i njihovog doprinosa u razvoju metaboličkog sindroma. Razine visfatina detektirane u serumu koreliraju s količinom VAT ali ne i sa SAT. Također, razina visfatina se povećava prateći HFD što sugerira ulogu u razvoju inzulinske rezistencije bilo da je inducirana dijetnom prehranom ili pretilošću (102). Visfatin se nameće kao idealan adipocitokinski kandidat kojeg prvenstveno izlučuje VAT, a koji bi mogao biti poveznica između širenja masnog tkiva te razvoja inzulinske rezistencije. Visfatin ima dvojnu funkciju u

VAT - autokrinu/parakrinu što olakšava diferencijaciju i skladištenje masnog tkiva te kao endokrinu kojom modulira inzulinsku osjetljivost u perifernim organima (103).

### 1.7.6. Interleukin 6

IL-6 je raznoliki pleiotropni adipocitokin koji je ključni igrač u regulaciji upalnog procesa, hematopoeze, imunološkog odgovora te obrambenog mehanizma. IL-6 sekretira VAT, skeletni mišići te jetra. Obzirom da jedna trećina cirkulirajućeg IL-6 kod zdravih osoba potječe iz masnog tkiva IL-6 se smatra adipocitokinom (104). Širenje masnog tkiva prati prekomjerna lipoliza adipocita te povišene razine FFA što dalje potiče adipocite na lučenje IL-6 (105). U masnom tkivu samo manji dio IL-6 zapravo luče adipociti dok većinu proizvode makrofagi. VAT proizvodi dva do tri puta veće razine IL-6 od SAT pružajući time potencijalni mehanizam za veći doprinos VAT na inzulinsku rezistenciju. Većina provedenih studija *in vitro* te na modelima miševa sugerira da IL-6 koji potječe iz masnog tkiva potiče inzulinsku rezistenciju jetre i stvara netoleranciju na glukozu (106). Slično kao i TNF- $\alpha$ , VAT i serumska razina IL-6 pozitivno koreliraju s povećanom tjelesnom masom, opsegom struka i razinom FFA, dok s redukcijom tjelesne mase opada i cirkulirajuća razina IL-6 (107). IL-6 je prihvaćen kao marker za visceralnu pretilost s obzirom da se najveće koncentracije IL-6 otpuštaju iz VAT. IL-6 može imati i dvojaku funkciju ovisno o tkivu u kojem se promatra i metaboličkom statusu.

Proizvodnja IL-6 je usko povezana i prati stopu proizvodnje TNF- $\alpha$  te inducira inzulinsku rezistenciju inhibiranjem unosa glukoze te ometanjem signalizacije i djelovanje inzulina. IL-6 kao i TNF- $\alpha$  može direktno utjecati na lipidni metabolizam te obavljati promoviranje puteva za povećanje prometa energije (79). IL-6 kod ljudi stimulira lipolizu te povećava razinu FFA. IL-6 djeluje tako da vrši supresiju na sekreciju adiponektin i vrši kontrolu njegove razine u serumu kao i da suprimira druge biljege adipocitne diferencijacije. Pretpostavlja se da IL-6 ima ključnu ulogu kod pretilosti tako što remeti kontrolu energetske homeostaze te time utječe na razvoj metaboličkih bolesti (79,108).

### 1.7.7. Interleukin 8

IL-8 je proupalni adipocitokin, a izlučuje ga nekoliko tipova stanica uključujući makrofage, T – stanice, adipocite, endotelne te epidermalne stanice i igra veliku ulogu u moduliranju upalnih odgovora (109). IL-8 se smatra multifunkcionalnim adipocitokinom koji

je snažan kemoatraktant i može biti odgovoran za regrutiranje neutrofila i T limfocita u subendotelni prostor, također inducira adheziju monocita na endotel te migraciju vaskularnih glatkih mišićnih stanica što potencijalno može dovesti do zadebljanja intime i razvoja ateroskleroze (110,111). Nekoliko studija prikazalo je ulogu IL-8 u regrutiranju i aktivaciji jetrenih makrofaga kod kronične bolesti jetre, te u patogenezi i progresiji NAFLD (112,113). Slično IL-8 potiče infiltraciju makrofaga u masno tkivo izazivajući time lokalnu i sistemsku upalu što predstavlja povezanost između disfunkcije masnog tkiva i inzulinske rezistencije. Kobayashi i sur. istraživali su potencijalne temeljne mehanizme koji dovode do povećane proizvodnje i lučenja IL-8 kod pretilosti i metaboličkih bolesti te su time opisali povezanost između IL-8 i jetrenih metaboličkih puteva kod ljudi (114).

Pokazalo se da IL-8 luče hepatociti pri stimulaciji s FFA kroz aktivaciju puteva nuklearnog faktora kappa - pojačivača lakog lanca aktiviranih B stanica (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF $\kappa$ B) i c-Jun-N-terminalne kinaze (engl. *c-Jun N-terminal kinases*, JNK) (115). IL-8 je čak povećao vlastiti izražaj (IL-8 mRNA) u adipocitima kod ljudi dok su adipociti eksprimirali receptor za IL-8 što je dovelo do autokrinog učinka na stanice. Takva upalna stimulacija stvara začarani krug proizvodnje IL-8 u adipocitima kod ljudi putem kinaza reguliranih izvanstaničnim signalom (engl. *extracellular signal-regulated kinases*, ERK) i/ili put mitogenom-aktivirane proteinske kinaze (engl. *mitogen-activated protein kinases*, MAPKs) (116). Ti podatci ukazuju na to da IL-8 igra ključnu ulogu u započinjanju i održavanju upalnog procesa u masnom tkivu. Također, in vitro studije pokazale su da IL-8 inducira inzulinsku rezistenciju inhibirajući inzulinom reduciranu Akt fosforilaciju u adipocitima kod ljudi. Inhibicija proizvodnje i/ili djelovanja IL-8 može predstavljati novu metu za prevenciju i/ili liječenje dijabetesa tip 2, a osim funkcije u regrutiranju upalnih stanica, IL-8 može igrati središnju ulogu u utjecaju na samu fiziologiju adipocita (114).

Druge provedene studije ukazuju na to da upalni proces može doprinijeti razvoju ateroskleroze te se smatra da IL-8 ima također i djelomičan aterogeni čimbenik koji tome uvelike doprinosi (117). Oksidirane čestice LDL imaju sposobnost stimulacije proizvodnje i izlučivanje IL-8 od strane makrofaga iz aterosklerotskih plakova te su pronađene visoke razine IL-8 u pjenastim (engl. *foam cell*) stanicama dobivenim iz makrofaga. Druga funkcija IL-8 je inhibicija tkivnog inhibitora izražaja metaloproteinaza što rezultira povećanim oslobađanjem metaloproteinaza koje razgrađuju matriks i posljedično dovode do nestabilnosti aterosklerotskog plaka (118).

### 1.7.8. Kemerin

Kemerin (engl. *chemerin*) se donekle smatra novim adipocitokinom koji igra ulogu u regulaciji adipogeneze, metabolizma adipocita kao i u homeostazi glukoze što je utvrđeno nizom studija provedenima na miševima. Proizvodnja kemerina i kemerin - kemokinu sličnog receptora 1 (engl. *chemerin chemokine like receptor 1*, CMKLR1) u masnom tkivu kod ljudi i miševa opisana je još 2007. godine kada se zapravo počelo smatrati da je kemerin sasvim jedan novi adipocitokin (119). Izražaj kemerina kod ljudi opisan je najviše u SAT i VAT (120). Kemerin potiče sazrijevanje adipocita, što ujedno povećava proizvodnju kemerina tako da su adipociti ujedno i proizvođači i mete za kemerin. Kemerin sudjeluje u metabolizmu masnog tkiva s pozitivnim regulatornim djelovanjem na inzulinom stimulirano uzimanje glukoze od strane 3T3-L1 adipocita, iako druga istraživanja pokazuju suprotan učinak liječenja kemerinom na 3T3-L1 adipocite (121). Jedan od najbolje standardiziranih *in vitro* modela za proučavanje diferencijacije adipocita je upravo spomenuta stanična linija preadipocita 3T3-L1 koja je izolirana iz neklonskih „Swiss 3T3“ stanica (122). U kliničkoj studiji pokazalo se da razine cirkulirajućeg kemerina su usko povezani s BMI, trigliceridima te krvnim tlakom kod odraslih zdravih osoba, dok su kod pretilih osoba s razvijenim metaboličkim sindromom razine kemerina povišene što se povezuje s kardiovaskularnim čimbenicima kao što su hiperglikemija, dislipidemija te hipertenzija (123).

Potencijalna povezanost kemerina s vaskularnim alternacijama kod pretilosti nije još dovoljno istražena iako neke studije povezuju povišenu razinu kemerina kod pacijenata s metaboličkim sindromom s razvojem bolesti koronarnih arterija. Prethodno provedena studija prikazuje povezanost između povišene razine cirkulirajućeg kemerina s pretilošću i dijabetesom tipa 2 kod ljudi te pozitivne korelacije s biljezima inzulinske rezistencije i upale (124). Kemerin je sposoban inducirati adheziju makrofaga na proteine ECM stimulirajući regrutiranje i zadržavanje makrofaga na mjestima upale (125). Cirkulirajuće razine kemerina također su u korelaciji s drugim proupalnim biljezima kao što su TNF- $\alpha$  i IL-6. Iako neke studije opisuju protuupalno djelovanje kemerina, on se uglavnom smatra proupalnim adipocitokinom (126).

## **2. HIPOTEZA**

Kod muških ispitanika dječje dobi, indeks tjelesne mase i dob imaju utjecaj na morfologiju adipocita subkutanog i visceralnog bijelog masnog tkiva, kao i na razvoj fibroze te promjene izražaja proupalnih i protuupalnih adipocitokina u izvanstaničnom matriksu.



### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U skupini muških ispitanika dječje dobi i adolescenata normalne tjelesne mase i skupini muških ispitanika dječje dobi i adolescenata prekomjerne tjelesne mase i pretilih ispitanika će se i, ovisno o Z-vrijednosti, usporediti:

- površina adipocita u visceralnom i subkutanom bijelom masnom tkivu;
- postotak kolagena u visceralnom i subkutanom bijelom masnom tkivu;
- zastupljenost proupalnih i protuupalnih adipocitokina u serumu te visceralnom i subkutanom bijelom masnom tkivu;
- izražajni profil proteina izvanstaničnog matriksa u visceralnom i subkutanom bijelom masnom tkivu;
- izražaj proupalnih i protuupalnih adipocitokina i proteina izvanstaničnog matriksa te površine adipocita visceralnog i subkutanog bijelog masnog tkiva;
- zastupljenost CD163<sup>+</sup> stanica po mm<sup>2</sup> visceralnog i subkutanog bijelog masnog tkiva.

## 4. ISPITANICI I METODE

### 4.1. Ustroj studije i ispitanici

Ova je studija presječno istraživanje (engl. *cross-sectional study*) u kojoj su ispitanici izabrani na temelju uključenih i isključenih kriterija (127).

Istraživanje je fokusirano isključivo na muškim ispitanicima dječje i adolescentske dobi zbog puno većeg broj elektivnih zahvata koji su se u vrijeme prikupljanja uzoraka obavljali (operacija abdominalne i ingvinalne hernije te orhidopeksija). Drugi faktor koji je bio isključan za ženski spol iz studije je što se odnos između pretilosti i ranog puberteta kod ženskog spola može objasniti i pojavom IR, a koja je povezana s pretilošću, konkretno povećana razina inzulina stimulira proizvodnju spolnih hormona djelovanjem na nadbubrežne žlijezde, jetru, jajnike, što ima vrlo veliki utjecaj na razvoj i normalnu funkciju masnog tkiva (128).

Ispitanici su bili hospitalizirani radi elektivnog abdominalnog zahvata na Zavodu za dječju kirurgiju, Klinike za kirurgiju Kliničkog bolničkog centra Osijek. U istraživanje je uključeno 75 ispitanika koji su zadovoljili uključne kriterije. Dob ispitanika uključenih u studiju je u rasponu od 2. do 18. godine života. Ispitanicima je određen BMI te s obzirom na dob određena je i Z-vrijednost (engl. *Z-score*). Z-vrijednost definirana je krivuljama koje pokazuju broj standardnih devijacija udaljenih od medijana populacije normalne distribucije i prema krivuljama SZO kod djece je u rasponu od -3 do +3 (129).

Uključni kriteriji za studiju:

- anamnestički zdravi ispitanici koji u anamnezi nemaju pobol od šećerne bolesti, kardiovaskularnih, neurovaskularnih, genetskih, hormonskih i malignih bolesti.

Isključni kriteriji za studiju:

- prisustvo pozitivne anamneze za teže i kronične bolesti, te od ranije poznatih bolesti (npr. malignih i genetskih bolestima); isključeni su pojedinci kojima je operirana uklještena ventralna hernija.

Prije početka istraživanja i uključnja u studiju svakom roditelju i skrbniku ispitanika koji su zadovoljili uključne kriterije dano je pisano objašnjenje i svrha istraživanja kao i obrazac koji je bilo potrebno vlastoručno potpisati kao potvrdu suglasnosti za sudjelovanje u istraživanju. Svim ispitanicima koji su zaprimljeni na Zavod za dječju kirurgiju, Klinike za

kirurgiju Kliničkog bolničkog centra Osijek radi elektivnog abdominalnog zahvata odrađen je klinički predoperativni pregled gdje su prikupljeni anamnestički podatci te su učinjena antropometrijska mjerenja.

Ovo istraživanje provedeno je prema svim smjernicama utvrđenim u Helsinškoj deklaraciji, a sve postupke koji su uključivali sudionike istraživačke studije odobrilo je Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Osijek (URBROJ: R2-16 905/2018.) te Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (KLASA: 602-04/20-08/07; URBROJ: 2158-61-07-20-113).

## **4.2. Antropometrijska mjerenja**

Antropometrijska mjerenja uključuju mjerenje tjelesne mase izražene u kilogramima (kg), mjerenje tjelesne visine izražene u centimetrima (cm), te mjerenje opsega struka i opsega bedara izražene u centimetrima (cm).

Tjelesna visina mjerena je standardnom tehnikom, vrpcom za mjerenje u uspravnom stavu, uz zid, bez obuće i pogledom usmjerenim prema naprijed s odstupanjem od  $\pm 0,5$  cm. Tjelesna masa je određena standardnom tehnikom pomoću mjerne vage, prije operativnog zahvata, na tašte, bez obuće i u vrlo laganoj odjeći s odstupanjem od  $\pm 0,1$  kg.

Opseg struka i bedra mjerio se vrpcom za mjerenje u centimetrima. Opseg struka odredio se u razini umbilikalnog dijela abdomena, a opseg bedara u središnjem dijelu natkoljenice.

### **4.2.1. Indeks tjelesne mase i Z-vrijednosti indeksa tjelesne mase**

Vrijednost indeksa tjelesne mase kao jedna od najrasprostranjenijih metoda za utvrđivanje pretilosti mjerilo je nutritivnog statusa pojedinca i određuje se prema zadanoj jednadžbi:  $BMI = TM \text{ (kg)} / \text{visina (m}^2\text{)}$ . Kod djece, Z-vrijednost je metoda za određivanje rasta i uhranjenosti, kao i rizika za pretilost ili pothranjenost. Z-vrijednost definirana je standardnim krivuljama SZO koje pokazuju broj standardnih devijacija udaljenih od medijana populacije normalne distribucije. Z-vrijednost od +1 označava rizik od preuhranjenosti, +2 označava prekomjernu tjelesnu masu, a +3 označava pretilost (129). Ispitanici su prema Z-vrijednosti podijeljeni u dvije skupine: skupinu koja obuhvaća ispitanike prekomjerne tjelesne mase i

pretile ispitanike (n=33) te drugu skupinu koja obuhvaća ispitanike normalne tjelesne mase (n=42).

U subanalizi su ispitanici podijeljeni prema dobi u skupinu ispitanika do 10 godina starosti (predpubertet) i skupinu ispitanika 10 godina i starijih (ulazak u pubertet) (130).

#### **4.3. Prikupljanje uzoraka krvi**

Uzorci venske krvi za biokemijsku analizu prikupljeni su neposredno pred operacijski zahvat, na tašte odnosno nakon posta koji je trajao najmanje 12 sati, a prije anesteziološke obrade te aplikacije lijekova za uvod u anesteziju.

#### **4.4. Prikupljanje uzoraka subkutanog i visceralnog masnog tkiva**

Uzorci subkutanog i visceralnog masnog tkiva prikupljeni su iz područja abdomena za vrijeme operativnog zahvata. Visceralno masno tkivo prikupljeno je prvo i to u trenutku kada je za to postojala najranija mogućnost za vrijeme operativnog zahvata iz područja velike trbušne marame (lat. *omentum majus*), dok je subkutano masno tkivo prikupljeno na kraju operativnog zahvata, a neposredno prije šivanja. Uzorci su zatim raspoređeni u duplikatu u sterilne plastične kriotubice, 2 mL (Cryovial, Bernard-Pilon, Beloeil QC, Kanada) koje su prethodno ispunjene netoksičnim reagensom (RNA later, Qiagen, Hilden, Njemačka) za očuvanje i stabilizaciju humane ribonukleinske kiseline te su pohranjeni na -80 °C do trenutka analize. Drugi dio tkivnih uzoraka je pohranjen u plastične tubice od 2 mL koje su prethodno ispunjene 4 % formaldehidom (Biognost, Zagreb, Hrvatska). Formaldehid je kemijski fiksativ koji osigurava stabilizaciju struktura, povezivanje bjelančevina te onemogućuje njihovo daljnje raspadanje kako bi uzorci bili pogodni za analizu i daljnja istraživanja. Uzorci su čuvani u formaldehidu do trenutka analize.

#### **4.5. Biokemijska analiza krvi**

Biokemijska analiza seruma venske krvi odrađena je u sklopu redovnog dijagnostičkog postupka na Kliničkom Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek gdje je indirektnom spektrofotometrijom određena koncentracija glukoze (Beckman Coulter, Inc., OSR 6221, Indianapolis, SAD) te je napravljen lipidni profil za određivanje razine

kolesterola (Beckman Coulter, Inc., OSR 6216, Indianapolis, SAD), triglicerida, lipoproteina velike gustoće (HDL) te lipoproteina male gustoće (LDL) (Beckman Coulter, Inc., OSR 61118, Indianapolis, SAD). Također je izmjerena i razina testosterona (MassChrom Steroids in Serum/Plasma Reagent Kit for LC-MS/MS Analysis, Chrtomsystems Instruments & Chemicals Gmbh, Gräfelfing, Njemačka) čije su vrijednosti tumačene pomoću referentnih tablica za steroidne hormone dostavljenih od strane proizvođača reagensa.

Uzorci krvi potrebni za određivanja koncentracije ciljanih adipocitokina - adiponektina, intelectina-1/omentina, visfatina te kemerina u serumu prikupljeni su u posebne epruvete bez antikoagulansa. Neposredno nakon uzorkovanja uzorci su centrifugirani (Rotina 380 R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Njemačka) na 3600 okretaja u minuti (engl. *revolutions per minute*, RPM), odnosno, relativna centrifugalna sila (engl. *relative centrifugal force*, RCF) je iznosila 2424 g sile. Izdvojeni serum pohranjen je na -80 °C do trenutka analize.

#### **4.6. Enzimaska imunokemijska metoda određivanja adipocitokina u serumu**

Enzimskom imunokemijskom metodom (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) iz seruma krvi određena je cirkulirajuća koncentracija adiponektina, kemerina, visfatina te Intelectina-1/Omentina (BioRad PR3100 TSC, BioRad, Marnes-la-Coquette, Francuska). ELISA je metoda pomoću koje se detektiraju i kvantificiraju specifični proteini u uzorcima pomoću protutijela ciljanih proteina imobiliziranih na površini jažica mikrotitarske pločice. Sve imunokemijske analize su provedene u Laboratoriju za imunologiju, Katedre za fiziologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

##### **4.6.1. Određivanje koncentracije kemerina u serumu**

Za određivanje koncentracije kemerina u serumu korišten je BioVendor Human Chemerin Imunoassay kit (#RD191136200R, BioVendor, Research and Diagnostics Products, Laboratorni medicina a.s., Brno, Češka) s kojim se odredila kvantitativna vrijednost cirkulirajućeg kemerina. Analiza te priprema uzoraka i kemikalija potrebnih za analizu je odrađena prema uputama dostavljenima od proizvođača.

Kemikalije koje su se nalazile u kitu dostavljenom od proizvođača:

1. Mikrotitarska pločica s 96 jažica prethodno obložena poliklonksim specifičnim protutijelom na kimerin
2. Biotinom obilježena protutijela u koncentraciji 40X
3. Konjugat Streptavidin-HRP
4. Kemerinski standard
5. Otopina za razrjeđivanje
6. Kontrola kvalitete – QC1
7. Kontrola kvalitete – QC2
8. Otopina za ispiranje
9. Razrjeđivač biotina
10. Supstrat TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin u puferu)
11. Stop otopina
12. Adhezivna traka

Prije same analize svi reagensi i uzorci zagrijani su na sobnu temperaturu od približno 25 °C. Uzorci su razrijeđeni otopinom za razrjeđivanje prema uputama proizvođača tako da se 5 µl uzorka doda u 495 µl otopine za razrjeđivanje. Zatim se pipetom dodalo po 100 µl otopine standarda, otopine za kontrolu kvalitete QC1 i QC2, pufera za razrjeđivanje te uzorka u duplikatima u odgovarajuće jažice na mikrotitarsku pločicu. Mikrotitarska pločica se zatim inkubirala 60 minuta na sobnoj temperaturi od približno 25 °C uz miješanje na orbitalnoj centrifugi za mikro ploče od 300 RPM. Jažice se nakon inkubacije od 60 minuta ispiru otopinom za ispiranje i ta se radnja ponavljala tri puta te nakon završetka postupka ispiranja mikrotitarska pločica se preokrenula te se laganim tapkanjem pločice po stražnjoj strani iz jažica potjerala zaostala otopina za ispiranje.

U svaku jažicu se zatim pipetiralo 100 µl biotinom obilježenih protutijela. Zatim se ponovio postupak inkubacije pri sobnoj temperaturi uz miješanje na orbitalnoj centrifugi za mikro ploče od 300 RPM. Nakon inkubacije ponavlja se postupak ispiranja otopinom za ispiranje tri puta. Nakon drugog slijeda ispiranja dodaje se u svaku jažicu po 100 µl konjugata streptavidin-HRP. Nakon dodavanja konjugata streptavidin-HRP mikrotitarska pločica se zatim opet inkubirala na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta uz miješanje na orbitalnoj centrifugi za mikro ploče od 300 RPM nakon čega se opet ponovio postupak ispiranja. Nakon ispiranja se pipetiralo u svaku jažicu po 100 µl otopine supstrata te se mikrotitarska ploča prekrila aluminijskom folijom kako bi se izbjeglo izlaganje izravnoj ili neizravnoj svjetlosti.

Nakon ovog koraka pločica se inkubirala na sobnoj temperaturi u trajanju 15 minuta i to bez miješanja.

Nakon inkubacije od 15 minuta u jažice se pipetira po 100  $\mu$ l stop otopine za zaustavljanje reakcije.

#### 4.6.2. Određivanje koncentracije visfatina u serumu

Za određivanje koncentracije visfatina korišten je BioVendor Visfatin (NAMPT) Human Immunoassay kit (#RAG004R, BioVendor, Research and Diagnostics Products, Laboratorni medicina a.s., Brno, Češka) s kojim se odredila kvantitativna vrijednost cirkulirajućeg visfatina. Analiza te priprema uzoraka i kemikalija potrebnih za analizu odrađena je prema uputama dostavljenima od proizvođača.

Kemikalije koje su se nalazile u kitu dostavljenom od proizvođača:

1. Mikrotitarska pločica s 96 jažica prethodno obložena s monoklonskim specifičnim protutijelom na visfatin
2. Pufirirani koncentrat za ispiranje
3. ELISA pufirirana otopina
4. Protutijelo za detekciju humanog visfatina
5. Enzimaska otopina (u puferu prethodno titriran konjugat streptavidin-hren peroksidaze, HRP)
6. Humani visfatin standard
7. Supstrat TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin u puferu)
8. Stop otopina
9. Adhezivna traka

Svi su reagensi i uzorci prije analize inkubirani na sobnoj temperaturi od približno 25 °C. U svaku jažicu na mikrotitarskoj pločici dodano je po 100  $\mu$ l humanog visfatin standarda i nerazrijeđenog uzorka u duplikatima te se prekrilo zaštitnom adhezivnom trakom koja je dostavljena od proizvođača te se preko noći pločica inkubirala na temperaturi od 4 °C. Nakon inkubacije uklonila se adhezivna traka te se mikrotitarska pločica ispirala s 300  $\mu$ l razrijeđene otopine za ispiranje prema uputama proizvođača gdje se 50 mL koncentrirane otopine za ispiranje u koncentraciji 10x doda u 450 mL deionizirane vode kako bi dobili otopinu za

ispiranje koncentracije 1x. Za ispiranje se koristila multikanalna pipeta te se postupak ponavljao tri puta. Nakon ispiranja se mikrotitarska pločica preokrenula te laganim tapkanjem po stražnjoj strani pločice smo se riješili zaostale otopine za ispiranje u jažicama prije prelaska na sljedeći korak. Nakon ispiranja se u svaku jažicu dodalo po 100  $\mu$ l otopine protutijela za detekciju humanog visfatina.

Zatim se pločica prekrila adhezivnom trakom te inkubirala na 37 °C 60 minuta. Nakon inkubacije se uklonila adhezivna traka te se pločica isprala s 300  $\mu$ l otopine po jažici koristeći se multikanalnom pipetom, taj se postupak ponavljao tri puta. Nakon ispiranja pločica se preokrenula te laganim tapkanjem po stražnjoj strani pločice smo se riješili zaostale otopine za ispiranje prije nastavka na sljedeći korak. Sljedeći korak je dodavanje 100  $\mu$ l razrijeđenog konjugata streptavidin-HRP prema uputama proizvođača gdje smo dodali 100  $\mu$ l konjugata u 10 mL ELISA pufera koncentracije 1x koji smo prethodno razrijedili s deioniziranom vodom prema uputama tako da se 20 mL ELISA puferirane otopine koncentracije 10x dodalo u 180 mL deionizirane vode te smo dobili ELISA puferiranu otopinu koncentracije 1x. Nakon toga je uslijedila inkubacija od 60 minuta na temperaturi od 37 °C. Nakon inkubacije se uklonila adhezivna traka te je opet uslijedio postupak ispiranja koji se ponavljao tri puta. U svaku jažicu se zatim dodalo po 100  $\mu$ l supstrata TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin u puferu) te se omogućila reakcija da se razvije boja tako da se pločica ostavila na sobnoj temperaturi u mraku u razdoblju od 10 minuta.

Reakcija je potom zaustavljena dodavanjem po 100  $\mu$ l stop otopine u svaku jažicu te se lagano tapkanjem po pločici omogućilo miješanje otopina u jažicama.

#### **4.6.3. Određivanje koncentracije adiponektina u serumu**

Za određivanje koncentracije adiponektina u serumu korišten je Humani Adiponectin Platinum Imunoassay kit (BMS2032/2, Affymetrix eBioscience, Bender MedSystems GmbH, Beč, Austrija) s kojim se odredila kvantitativna vrijednost cirkulirajućeg visfatina. Analiza te priprema uzoraka i kemikalija potrebnih za analizu je odrađena prema uputama dostavljenima od proizvođača.

Kemikalije koje su se nalazile u kitu dostavljenom od proizvođača:

1. Mikrotitarska pločica, 96 jažica prethodno obložena monoklonalnim specifičnim protutijelom za adiponektin



2. Konjugat (monoklonalno protutijelo na adiponektin konjugirano s biotinom)
3. Konjugat Streptavidin-HRP
4. Humani adiponektin standard
5. Koncentrat pufera za razrjeđivanje
6. Koncentrat otopine za ispiranje
7. Supstrat TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin u puferu)
8. Stop otopina (1M fosforna kiselina)
9. Adhezivna traka

Svi uzorci i reagensi prethodno su zagrijani na sobnu temperaturu prije nego se započelo s protokolom. Prije početka svi su se uzorci razrijedili prema uputama proizvođača s otopinom za razrjeđivanje na način da smo 10  $\mu$ l uzorka dodali u 490  $\mu$ l prethodno razrijeđenog pufera kako bi dobili koncentraciju prema uputama proizvođača. Zatim smo dodali 100  $\mu$ l razrijeđene otopine čistog pufera u prazne jažice koje će nam služiti kao test, u preostale jažice smo dodali po 50  $\mu$ l razrijeđenog uzorka u duplikatu te smo u iste jažice s uzorkom dodali i 50  $\mu$ l razrijeđene puferirane otopine. Nakon toga smo dodali 50  $\mu$ l konjugata u svaku jažicu te prekrili adhesivnom trakom i inkubirali na sobnoj temperaturi 120 minuta na orbitalnoj centrifugi mikro ploča na 400 RPM.

Nakon isteka 120 minuta uklonili smo adhezivnu traku te isprali mikrotitarsku ploču 6 puta za redom s 400  $\mu$ l otopine za ispiranje po jažici koja je prethodno razrijeđena na način da smo 50 mL koncentrata otopine za ispiranje dodali u 950 mL deionizirane vode te lagano promiješali kako bi izbjegli stvaranje sapunice pri površini. Nakon ispiranja dodali smo 100  $\mu$ l streptavidina-HRP u svaku jažicu te smo prekrili adhezivnom trakom i inkubirali pri sobnoj temperaturi 60 minuta na orbitalnoj centrifugi za mirko ploče na 400 RPM. Nakon isteka 60 minuta uklonili smo adhezivnu traku te ponovili postupak ispiranja. Nakon ponovljenog ispiranja dodali smo 100  $\mu$ l supstrata TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin u puferu) u svaku jažicu. Zatim smo mikrotitarsku pločicu inkubirali pri sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta prekrivenu aluminijskom folijom kako bi se izbjeglo izlaganje izravnoj ili neizravnoj svjetlosti. Nakon 30 minuta slijedilo je zaustavljanje reakcije dodavanjem 100  $\mu$ l stop otopine u svaku jažicu.

#### **4.6.4. Određivanje koncentracije Intelectina-1/Omentina u serumu**

Za određivanje koncentracije Intelectina-1/Omentina u serumu korišten je Human ITLN1 (Intelectin-1/Omentin) Imunoassay kit (E-EL-H2028, Elabscience, Wuhan, Kina) s kojim se odredila kvantitativna vrijednost cirkulirajućeg omentina-1. Analiza te priprema uzoraka i kemikalija potrebnih za analizu je odrađena prema uputama dostavljenima od proizvođača.

Kemikalije koje su se nalazile u kitu dostavljenom od proizvođača:

1. Mikrotitarska pločica, 96 jažica s prethodno obložena specifičnim protutijelom za Intelectin-1/Omentin
2. Standardna otopina za test
3. Koncentrirana biotinizirana otopina za detekciju protutijela
4. Koncentrat HRP konjugata
5. Otopina za razrijeđivanje
6. Otopina za ispiranje
7. Supstrat TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin u puferu)
8. Stop otopina
9. Adhezivna traka

Svi su reagensi i uzorci prethodno prema uputama proizvođača razrijeđeni te inkubirani na sobnoj temperaturi prije početka protokola. U jažice koje će nam služiti kao test dodali smo po 100 µl standardne otopine, a u ostale jažice po 100 µl uzorka. Nakon toga prekrili smo adhezivnom trakom te inkubirali 90 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije uklonili smo dodane otopine iz jažica mikrotitarske pločice ali nismo ispirali nego smo odmah dodali po 100 µl biotinizirane otopine za detekciju protutijela u svaku jažicu. Nakon toga mikrotitarsku pločicu smo opet prekrili adhezivnom trakom te laganim pokretima ruke promiješali i inkubirali 60 minuta na temperaturi od 37 °C. Nakon 60 minuta smo uklonili adhezivnu traku te pločicu preokrenuli i tapkanjem po stražnjem dijelu mikrotitarske pločice uklonili zaostalu otopinu iz jažica nakon čega smo svaku jažicu isprali s 350 µl otopine za ispiranje, zatim nakon ispiranja smo preokrenuli mikrotitarsku pločicu i tapkanjem uklonili zaostalu otopinu za ispiranje iz jažica te ponavljali taj postupak tri puta. Nakon završenog ispiranja u svaku jažicu dodali smo po 100 µl HRP konjugata nakon čega je uslijedila inkubacija na 37 °C u trajanju od 30 minuta. Nakon 30 minuta inkubacije ponovili smo postupak uklanjanja otopine iz jažica te postupak ispiranja koji se ponavljao pet puta.

U sljedećem koraku dodali smo 90  $\mu$ l otopine supstrata u svaku jažicu, zatim smo prekrili mikrotitarsku pločicu s adhezivnom trakom te inkubirali 15 minuta pri temperaturi od 37 °C, pločicu smo u ovom koraku prekrili aluminijskom folijom kako bi je zaštitili od izravne ili neizravne svjetlosti. Nakon 15 minuta uklanjamo adhezivnu traku te dodajemo 50  $\mu$ l stop otopine u svaku jažicu kako bi zaustavili reakciju.

Nakon zaustavljanja reakcije u svakom pojedinom postupku određivanja koncentracije kemberina, visfatina, adiponektina te omentina u serumu plava boja prelazi u žutu što je pozitivan znak da je reakcija zaustavljena i u roku od 30 minuta očitana je optička gustoća uzoraka pomoću spektrofotometrijskog čitača mikrotitarskih pločica koji je prethodno namješten na 450 nm (BioRad) te su pomoću dobivene standardne krivulje očitani konačni rezultati analiza. Također, važno je napomenuti da su određene analize rađene nakon drugog i trećeg ciklusa smrzavanja-odmrzavanja uzoraka što može utjecati na degradaciju adipocitokina te eventualno prikazati niže razine vrijednosti njihovih koncentracija u serumu.

#### **4.7. Određivanje relativnog izražaja gena metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu u subkutanom i visceralnom masnom tkivu**

Za određivanje relativnog izražaja ciljanih gena pomoću kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (engl. *real-time polymerase chain reaction*, rtPCR) za vrijeme operativnog postupka prikupljeni su uzorci subkutanog i visceralnog masnog tkiva. Visceralno masno tkivo prikupljeno je prvo i to u trenutku kada je za to postojala najranija mogućnost za vrijeme operacijskog zahvata dok je subkutano masno tkivo prikupljeno na samom kraju zahvata, a neposredno prije šivanja.

Uzorci su zatim raspoređeni u duplikatu u sterilne plastične kriotubice, 2 ml (Cryovial, Bernard-Pilon, Beloeil QC, Kanada) koje su prethodno ispunjene otopinom RNAlater<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Waltham, SAD) i to u omjeru 1:5 RNAlater<sup>®</sup> prema uputstvima proizvođača. Otopina RNAlater<sup>®</sup> je netoksičan reagens koji prodiranjem u tkivo omogućuje njegovo dugotrajno očuvanje te vrši deaktivaciju RNA-aze. Uzorci pohranjeni u RNAlater<sup>®</sup> se čuvaju na -80 °C do trenutka analize. Postupak homogenizacije uzoraka te izolacija ukupne RNA iz uzoraka je ekstrahirana pomoću TRI reagens (Life Technologies, Carlsbad, SAD), a prema standardnom protokolu ranije opisanom od strane Chomezynski i sur. (1987) (131).

Čistoća uzoraka i RNA koncentracija testirana je pomoću Nanophometer P300 UV / VIS (IMPLEN GmbH, München, Njemačka) dok je postojanost te prisutnost same RNA

provedena postavljanjem uzoraka na 1%-tnom agaroznom gelu. Pročišćavanje uzoraka te proces dobivanja cDNA je obavljeno prema uputama proizvođača: Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD) i Applied Biosystems. Analize određivanja relativnog izražaja gena metodom rtPCR provedene su u Laboratoriju za imunologiju, Katedre za fiziologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Određen je izražaj gena: kolagen 6 podtip-alfa 3 (*Col6α3*), tumorski faktor nekroze alfa (*TNF-α*), interleukin-6 (*IL-6*), interleukin-8 (*IL-8*), protein vezan za receptor lipoproteina niske gustoće 10 (engl. *low-density lipoprotein receptor-related protein 10*, LRP10) i importin 8 (*IPO8*). IPO8 pripada obitelji importin β receptora te igra ključnu ulogu u posredovanju transporta zrelih miRNA iz citoplazme u jezgru (132). Za normalizaciju izražaja gena odabrani su LRP10 i IPO8. Oba gena su analizirana u isto vrijeme sa svim uzorcima. Izražaj gena je normaliziran u odnosu na izražaj gena LRP10 koji se pokazao stabilan i jednako izražen u svim uzorcima, dok izražaj IPO8 gena nije bio stabilan niti jednako izražen u svim uzorcima ni nakon nekoliko ciklusa ponavljanja analize.

Određivanje izražaja svih navedenih gena izmjereno je u realnom vremenu na uređaju rtPCR-u (Bio Rad CFX96, BioRad Laboratories Inc., Singapur, Singapur).

#### **4.8. Priprema uzoraka za histološku analizu subkutanog i visceralnog masnog tkiva**

Na uzorcima tkiva prikupljenih iz subkutanog i visceralnog masnog tkiva učinjena je histološka analiza masnog tkiva. Prilikom uzorkovanja uzorci su pohranjeni u fiksativ – 4 % formaldehid. Fiksiranje je postupak kojim se pomoću kemijskog fiksativa osigurava stabilizacija struktura, povezivanje bjelančevina te se onemogućuje daljnje raspadanje i destabilizacija struktura unutar samog tkiva. Uzorci su zatim provedeni kroz standardni postupak za obrade i pripreme histoloških preparata gdje je uslijedilo dehidriranje tkiva uranjanjem u rastuće koncentracije etanola u određenom periodu vremena kako slijedi: 70 % - 10 minuta, 80 % - 10 minuta, 96 % - 10 minuta, 100 % - 10 minuta.

Nakon postupka dehidracije uzorci su zatim uklopljeni u parafinske blokove te su pomoću rotacijskog mikrotoma (CUT 4060, SLEE Medical GmbH, Nieder-Olm, Njemačka) rezani na debljinu 6 μm. Narezani uzorci postavljeni su na predmetna stakalca i standardnim postupkom uklonjen je parafin odnosno uslijedio je korak deparafinizacije i rehidracija uzoraka potapanjem u slijed otopina kroz određeni period vremena kako slijedi: 100 % ksilol - 2x10

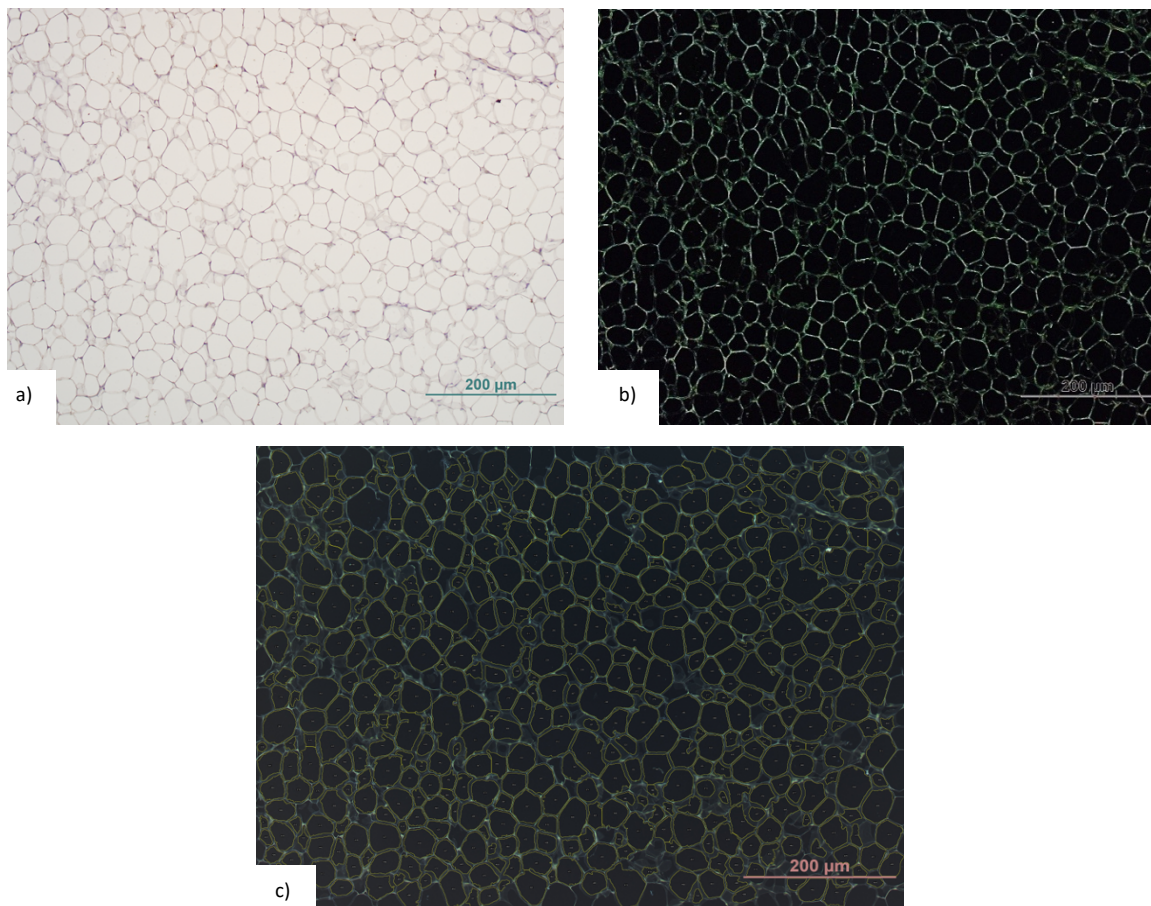
minuta, 100 % etanol - 2x10 minuta, 70 % etanol - 1x15 minuta, destilirana H<sub>2</sub>O - 1x10 minuta te su zatim uzorci postavljeni u kadice u kojima se vršilo bojanje hemalaunom i eozinom (engl. *hematoxylin and eosin*, HE) za određivanje morfologije masnog tkiva - procjenu brojnosti i veličine stanica masnog tkiva, adipocita. Također je odrađena i standardna metoda trikromnog bojanja prema Massonu (engl. *Masson's trichrome staining*) – za procjenu stupnja fibroze u masnom tkivu (133).

Jedan dio uzoraka prilikom rezanja na rotacijskom mikrotomu je nanesen na posebna adhezivna predmetna stakalca (DAKO, Glostrup, Danska) koja su se koristila u imunohistokemijskoj analizi masnog tkiva.

#### **4.8.1. Histološka analiza morfologije subkutanog i visceralnog masnog tkiva**

Za mjerenje veličine i određivanje brojnosti stanica u uzorcima subkutanog i visceralnog masnog tkiva, uzorci su prema prethodno opisanom postupku dehidrirani, narezani na debljinu 6 μm te obojani metodom hemalaunom i eozinom. Uzorci tkiva su zatim pregledani pomoću svjetlosnog Zeiss Axioskop 2 MOT mikroskopa (Carl Zeiss Microscopy, Pleasanton, SAD) te su pomoću digitalne kamere Olympus DP70 (Olympus, Tokyo, Japan) pričvršćene na mikroskop snimljene digitalne slike uzoraka.

Digitalne slike pohranjene su u nekomprimiranom formatu datoteke koji se koristi za pohranu slika visoke rezolucije do trenutka analize. Sve slike snimljene su pod istim uvjetima (povećanje od 200×, format TIFF). Analiza veličine te određivanje broja stanica masnog tkiva napravljena je pomoću besplatnog online programa za biološku analizu *Fiji* (134), distribucija programa *ImageJ* (135), s dodatkom za analizu brojnosti i veličine stanica masnog tkiva *Adiposoft* (136). Prije početka analize odredili su se parametri analize te se postavila mogućnost ručne korekcije unosa gdje se postavila opcija da se iz analize isključe sve stanice koje su rubne ili nisu u potpunosti unutar kadra (engl. *exclude on edges*) te se postavila zadana mjerna jedinica u kojoj su se podatci na kraju analize prikazali (Slika 4.1.).



**Slika 4.1.** Reprezentativni prikaz analize morfometrije adipocita: a) originalna slika prije obrade, b) invertirana slika s podebljanim rubovima adipocita, c) označeni, izmjereni i prebrojani adipociti. Povećanje: 200×

Zadnji je korak bio postavljanje analize pojedinačne slike ili skupa slika. Radi preciznijeg mjerenja analiza je odrađena slika po sliku uz ručne korekcije ako je za to bilo potrebe prateći upute autora programa (136).

#### **4.8.2. Histološka analiza stupnja fibroze u subkutanom i visceralnom masnom tkivu**

Uzorci subkutanog i visceralnog masnog tkiva prethodno su obojani standardnom metodom trikromnog bojanja prema Massonu za procjenu stupnja fibroze masnog tkiva, odnosno u ECM masnog tkiva gdje se vezivno tkivo od interesa, kolagen, oboja plavom bojom. Uzorci tkiva su zatim pregledani pomoću svjetlosnog Zeiss Axioskop 2 MOT mikroskopa (Carl

Zeiss Microscopy) te su pomoću digitalne kamere Olympus DP70 (Olympus) pričvršćene na mikroskop snimljene digitalne slike uzoraka koje su pohranjene u nekomprimiranom formatu datoteke koji se koristi za pohranu slika visoke rezolucije do trenutka analize.

Sve slike snimljene su pod istim uvjetima (povećanje od 200 $\times$ , format TIFF). Analiza određivanja postotka kolagena izvršena je korištenjem besplatnog online programa za analizu Fiji, distribucija ImageJ programa (134,135). Pojedinačno se analizirao svaki uzorak i to na način da se slika pokrenula s programskim paketom za analizu Fiji, te se zatim pretvorila u 8-bitnu sliku, odnosno u sliku s manjom gustoćom boje kako bi bila pogodnija za analizu. Slika se zatim procesuirala pomoću opcije postavljanja praga (engl. *thresholding*) gdje se ručnim podešavanjem dozvoli označavanje područja od interesa obojanih plavom bojom. Nakon podešavanja i odabira ciljanih područja za analizu nakon procesa obrade, sadržaj kolagena definiran je kao postotak (%) detektiranog kolagena podijeljen s ukupnom površinom tkiva u vidnom polju.

#### **4.9. Imunohistokemijska analiza u subkutanom i visceralnom masnom tkivu**

Imunohistokemija (engl. *immunohistochemistry*, IHC) je metoda pomoću koje detektiramo ciljane antigene u tkivu od interesa koristeći određena protutijela, princip rada je da se određeno protutijelo veže za točno određeni antigen. Imunohistokemija je glavna komponenta patološkog laboratorija pri detektiranju i klasifikaciji raznih bolesti. U istraživanju se IHC koristi za laboratorijska ispitivanja raznih bioloških procesa, uključujući i detekciju ciljanih proteina te identifikacije i položaja proteina u dijelovima tkiva od interesa. Imunohistokemija je dijagnostička metoda i snažno sredstvo koje pruža puno veći opseg informacija i daje nam širu sliku prilikom morfološke analize tkiva.

##### **4.9.1. Protokol imunohistokemijske analize na CD163<sup>+</sup> stanice u subkutanom i visceralnom masnom tkivu**

Imunohistokemijska analiza svih uzoraka subkutanog i visceralnog masnog tkiva na CD163<sup>+</sup> stanice provedena je pri Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu, Kliničkog bolničkog centra Osijek, koristeći BenchMark ULTRA potpuno automatizirani radni sustav (Ventana Medical systems IBC., Oro Valley, AZ, SAD) koristeći monoklonalno zečje primarno protutijelo Anti-CD163<sup>+</sup> (#ab182422, Abcam, Cambridge, UK) u koncentraciji 1:80 prema

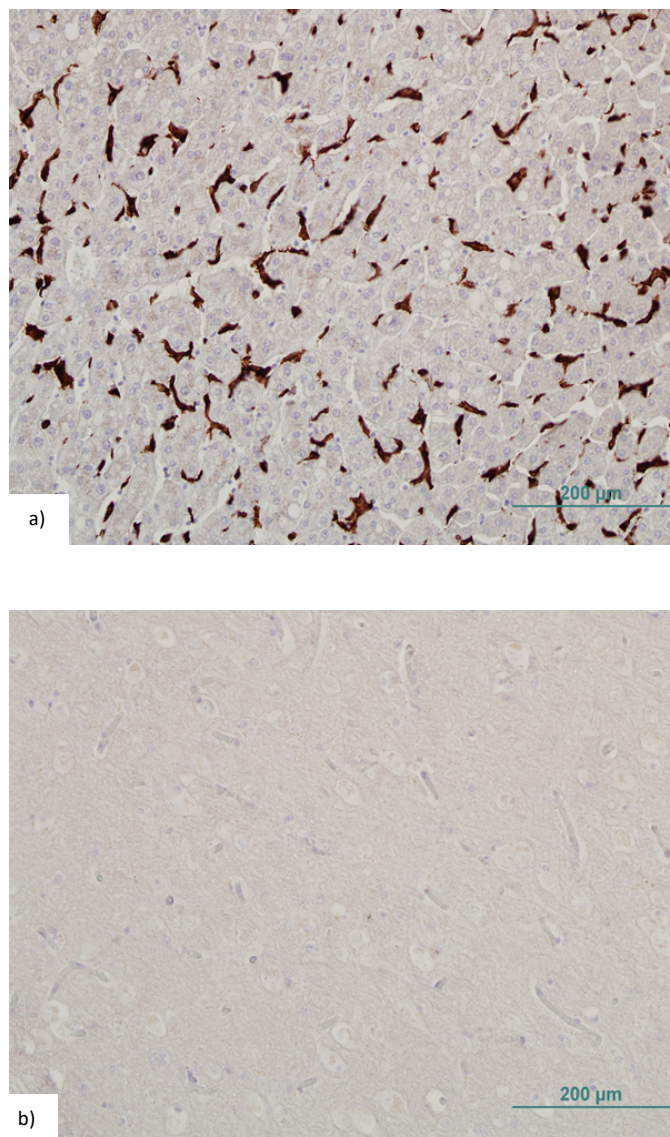
uputama proizvođača. Tkivo jetre i moždano tkivo koje se koristilo kao pozitivna i negativna kontrola su iz baze Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek koja se koriste u rutinskim dijagnostičkim metodama (Slika 4.2.).

Deparafinizacija uzoraka je izvršena na temperaturi od 72 °C u EZ PREP koncentratu (LOT 05279771001, Roche, Basel, Švicarska) nakon čega je uslijedilo ispiranje u ultra staničnom regeneratu 1 (engl. *ultra cell conditioner 1*, UCC1) pH 8,4 u trajanju od 20 minuta. Zatim se izvršila inhibicija endogene peroksidaze u UltraView Universal DAB inhibitoru (Roche, Basel, Švicarska) pomoću 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u trajanju od 5 minuta pri temperaturi 37 °C. Nakon ovog koraka je uslijedilo ponovno ispiranje Reaction buffer otopinom (Roche, Basel, Švicarska) - pH 7,6 u trajanju od 10 minuta. Uslijedila je zatim inkubacija kako bi se pojačala detekcija veznih mjesta antigen – antitijelo Ultra View Universal HRP multimerom (Roche, Basel, Švicarska) u trajanju od 4 minute na temperaturi 37 °C. U sljedećem koraku su se uzorci opet ispirali Reaction buffer otopinom kroz 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon ovog koraka nanoseno je bilo primarno protutijelo Anti-CD163<sup>+</sup> u trajanju od 30 minuta na 37 °C. Uslijedila je inkubacija s UCC1 u trajanju od 8 minuta na temperaturi od 95 °C, te nakon toga 36 minuta na temperaturi od 37 °C.

Zatim, kako bi se označila markirana vezna mjesta dodaje Ultra View DAB Copper (CuSO<sub>4</sub>) (Roche, Basel, Švicarska) otopina na 5 minuta pri 37 °C nakon čega slijedi ispiranje u trajanju od 10 minuta s Reaction buffer otopinom na temperaturi od 37 °C. Poslije ovog ispiranja se dodaje Ultra View Counterstain (Roche, Basel, Švicarska) otopina pH 7,8 u trajanju od 5 minuta na 37 °C nakon čega opet slijedi postupak ispiranja Reaction buffer otopinom u trajanju od 10 minuta pri 37 °C. Sljedeći korak je bojanje hemalaunom u trajanju od 12 minuta na sobnoj temperaturi i nakon toga slijedi ispiranje Reaction buffer otopinom u trajanju od 5 minuta. Nakon ovog koraka vrši se impregnacija u otopini ULTRA LCS (engl. *ultra liquid coverslip*), to je uljna otopina koja sprječava isušivanje tkiva i isparavanje reagensa te osigurava potpunu zaštitu uzorka. Zatim se ručno ispiru predmetna stakalca u mlakoj vodovodnoj vodi u trajanju od 5 minuta nakon čega slijedi dehidriranje uzoraka potapanjem u etanol rastuće koncentracije: 70 %, 80 %, 96 % i 100 %.

Nakon dehidracije uzoraka vrši se bistrenje preparata u otopini Xylen (Sakura Finetek, Torrance, SAD) u trajanju od 5 minuta nakon čega slijedi pokrivanje preparata pokrovnim stakalcem pomoću automatiziranog sustava Dako - Sakura (Sakura Finetek, Torrance, SAD).





**Slika 4.2.** Imunohistokemijska analiza na CD163<sup>+</sup> stanice: a) pozitivna kontrola – smeđe obojenje, tkivo jetre i b) negativna kontrola – bez smeđeg obojenja, moždano tkivo. Povećanje: 200×

#### **4.9.2. Analiza uzoraka nakon imunohistokemijske analize na CD163<sup>+</sup> stanice i krunaste strukture u subkutanom i visceralnom masnom tkivu**

Uzorci su nakon analize pažljivo pregledani uz pomoć patologa na svjetlosnom Zeiss Axioskop 2 MOT mikroskopu (Carl Zeiss Microscopy, NY, SAD) na kojem je bila montirana histomorfometrijska mrežica koja je predstavljala površinu od 0,17 mm<sup>2</sup>. Broj pozitivnih CD163 stanica se odredio tako da se u šest nasumično odabranih vidnih polja pod povećanjem

od 400× pobrojao broj CD163 pozitivnih stanica te se odredila srednja vrijednost broja pozitivnih CD163 stanica po mm<sup>2</sup> (137). CLS strukture su pobrojane u ukupnom vidnom polju na cijelom uzorku te se broj CLS struktura normalizirao prema ukupnom broju adipocita prema prethodno opisanoj metodi Fischer i sur. (138).

#### **4.10. Statistička analiza**

Za statističku se analizu koristio program IBM SPSS Statistica (inačica 21, IBM Corporation, Armonk, SAD). Podatci su testirani na normalnost distribucije Shapiro-Wilkovim testom. Svi rezultati prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Obzirom da nije bilo odstupanja od normalne raspodjele, razlike numeričkih varijabli dviju nezavisnih skupina testirane su Studentovim t-testom. Korelacije su ispitane pomoću Pearsonovog koeficijenta korelacije r. P vrijednost manja od 0,05 smatrala se statistički značajnom.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Postoji razlika u antropometrijskim podacima između skupine ispitanika normalne tjelesne mase i skupine ispitanika prekomjerne tjelesne mase/pretilih

Ukupan broj ispitanika normalne tjelesne mase iznosio je 42, a ispitanika prekomjerne tjelesne mase/pretilih 33. Nije bilo značajne razlike između skupina ispitanika u dobi te visini, dok su tjelesna masa, BMI, Z-vrijednost te opseg struka i natkoljenice bili značajno veći kod ispitanika prekomjerne tjelesne mase/pretilih (Tablica 5.1.).

**Tablica 5.1.** Srednje vrijednosti antropometrijskih podataka muških ispitanika dječje dobi i adolescenata.

	Normalna tjelesna masa	Prekomjerna tj. masa/pretili	p*
n	42	33	
Dob (godine)	5,08±3,17	6,24±3,85	0,157
Tjelesna masa (kg)	20,31±9,61	32,35±20,07	0,001
Visina (cm)	110,76±21,71	114,73±30,16	0,510
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	19,75±1,43	26,72±5,18	<0,001
Z-vrijednost	0,40±1,00	2,36±1,49	<0,001
Opseg struka (cm)	50,65±10,97	58,61±13,83	0,008
Opseg natkoljenice (cm)	34,74±11,63	43,71±14,96	0,005

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija

\*Studentov t-test (crveno označene p vrijednosti statistički su značajne)

BMI – indeks tjelesne mase

### 5.2. Postoji razlika u koncentraciji serumskog HDL kolesterola između skupina ispitanika

Nije pronađena značajna razlika između skupina ispitanika kod analize razine glukoze, triglicerida, ukupnog kolesterola, LDL kolesterola, omjera HDL i ukupnog kolesterola, testosterona, adiponektina, kemerina, omentina i visfatina u serumu (Tablica 5.2.).

HDL kolesterol je bio značajno viši kod skupine ispitanika normalne tjelesne mase u odnosu na ispitanike prekomjerne tjelesne mase/pretile (p=0,040, Studentov t-test; Tablica 5.2.).

Navedeni rezultati rađeni su bez korekcije na dob ispitanika obzirom da ne postoji značajna razlika u dobi između skupina.

**Tablica 5.2.** Srednje vrijednosti serumskih analiza muških ispitanika dječje dobi i adolescenata.

	Normalna tjelesna masa	Prekomjerna tj. masa/pretili	p*
n	42	33	
Glukoza (mmol/L)	4,98±1,00	5,12±0,92	0,385
Trigliceridi (mmol/L)	0,95±0,45	1,05±0,45	0,319
Kolesterol (mmol/L)	4,05±0,75	3,96±0,79	0,604
HDL kolesterol (mmol/L)	1,40±0,30	1,26±0,29	<b>0,040</b>
LDL kolesterol (mmol/L)	2,40±0,59	2,30±0,61	0,486
Omjer HDL/uk. kolesterol (%)	34,49±5,69	33,42±7,01	0,480
Testosteron (nmol/L)	0,45±0,94	0,56±1,40	0,698
Adiponektin (µg/ml)	111,56±3,10	111,06±3,71	0,525
Kemerin (ng/ml)	146,65±36,61	154,85±44,41	0,383
Omentin (ng/ml)	26,69±8,85	24,92±8,21	0,377
Visfatin (ng/ml)	1,10±1,15	1,03±1,62	0,833

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija

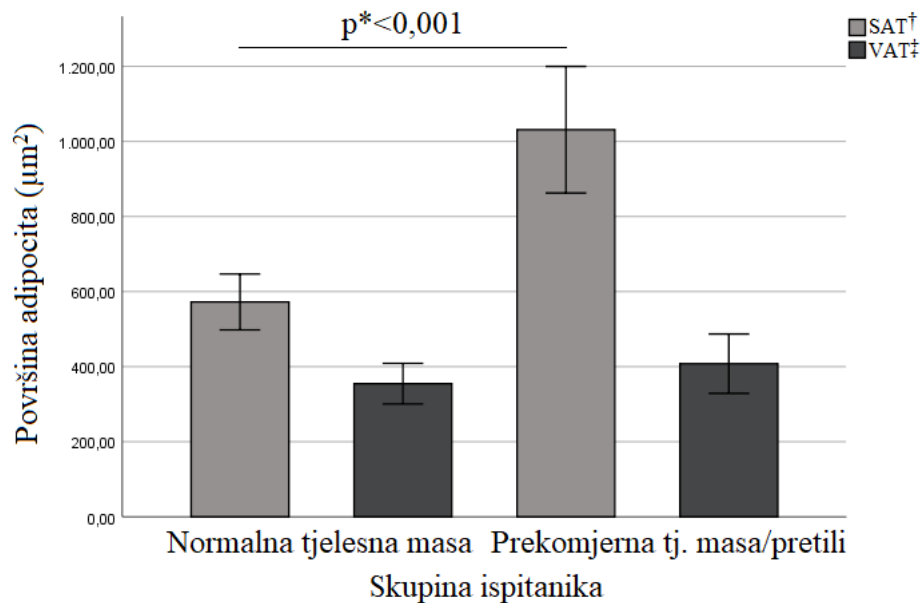
\*Studentov t-test (crveno označene p vrijednosti statistički su značajne)

### 5.3. Postoji razlika u morfologiji adipocita subkutanog masnog tkiva između skupina ispitanika

Površina adipocita u subkutanom masnom tkivu iznosila je 1031,15±327,95 µm<sup>2</sup> u skupini ispitanika prekomjerne tjelesne mase/pretilih (n=33), što je bilo značajno veće u odnosu na površinu adipocita u grupi ispitanika normalne tjelesne mase (n=42) koja je iznosila 572,21±191,95 µm<sup>2</sup> (p<0,001, Studentov t-test, Slika 5.1.), no nije bilo značajne razlike u broju adipocita (p=0,817, Studentov t-test; broj adipocita u skupini ispitanika normalne tjelesne mase 363,52±98,91; broj adipocita u skupini ispitanika prekomjerne tjelesne mase/pretilih 358,24±96,85).

U visceralnom masnom tkivu površina adipocita kod ispitanika prekomjerne tjelesne mase/pretilih iznosila je 407,87±153,69 µm<sup>2</sup>, a kod ispitanika normalne tjelesne mase 354,52±139,59 µm<sup>2</sup> te nije pronađena značajna razlika u površini adipocita između skupina

ispitanika ( $p=0,238$ , Studentov t-test), no nađen je veći broj adipocita po  $\mu\text{m}^2$  u ovome tkivu kod skupine ispitanika prekomjerne tjelesne mase/pretilih u odnosu na skupinu ispitanika normalne tjelesne mase ( $p=0,001$ , Studentov t-test; broj adipocita u skupini ispitanika normalne tjelesne mase  $656,88 \pm 152,15$ ; broj adipocita u skupini ispitanika prekomjerne tjelesne mase/pretilih  $771,06 \pm 143,47$ ).



**Slika 5.1.** Površina adipocita u subkutanom i visceralnom masnom tkivu između skupina ispitanika.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $n=42$  ispitanika normalne tjelesne mase,  $n=33$  ispitanika prekomjerne tjelesne mase/pretilih)

\*Studentov t-test

†subkutano masno tkivo

‡visceralno masno tkivo

#### 5.4. Postoji razlika u broju $\text{CD163}^+$ stanica u visceralnom masnom tkivu i broju krunastih struktura u subkutanom i visceralnom masnom tkivu

U subkutanom masnom tkivu nije bilo značajne razlike u broju  $\text{CD163}^+$  stanica između skupina. U visceralnom masnom tkivu bilo je značajno više  $\text{CD163}^+$  stanica kod ispitanika prekomjerne tjelesne mase/pretilih u odnosu na ispitanike normalne tjelesne mase ( $p < 0,001$ , Studentov t-test; Tablica 5.3., Slika 5.2. a i b).

Broj krunastih struktura je bio značajno veći u oba masna tkiva kod ispitanika prekomjerne tjelesne mase/pretilih u odnosu na ispitanike normalne tjelesne mase (Tablica 5.3.).

**Tablica 5.3.** Srednje vrijednosti broja CD163<sup>+</sup> stanica i krunastih struktura u masnim tkivima muških ispitanika dječje dobi i adolescenata.

	Normalna tjelesna masa	Prekomjerna tj. masa/pretili	p*
n	42	33	
Broj CD163 <sup>+</sup> stanica			
<i>Subkutano masno tkivo</i>	73,36±34,26	84,29±34,60	0,403
<i>Visceralno masno tkivo</i>	98,57±20,74	168,18±33,13	<0,001
Broj krunastih struktura			
<i>Subkutano masno tkivo</i>	0,50±0,70	1,12±1,08	0,004
<i>Visceralno masno tkivo</i>	2,93±1,73	4,36±2,32	0,003

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija

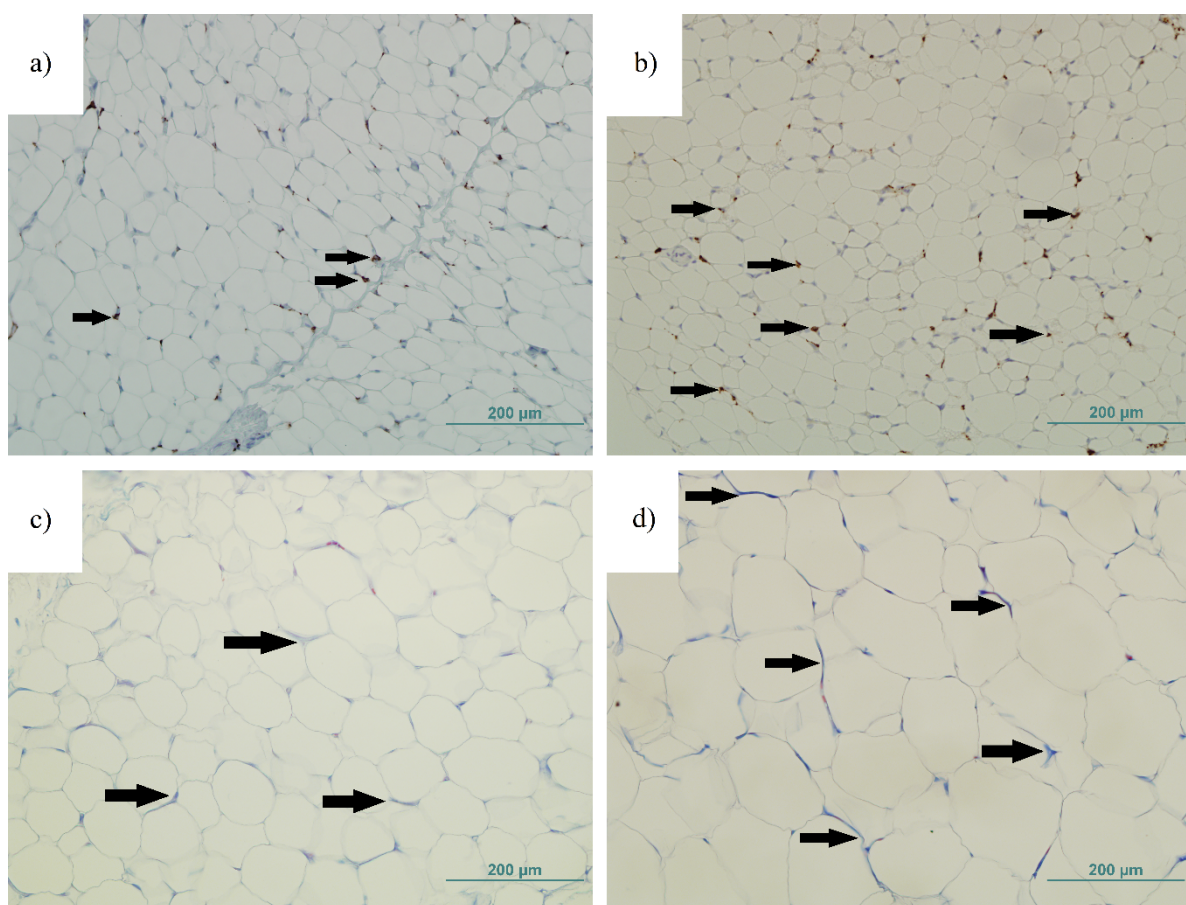
\*Studentov t-test (crveno označene p vrijednosti statistički su značajne)

### 5.5. Postoji razlika u postotku kolagena u visceralnom masnom tkivu

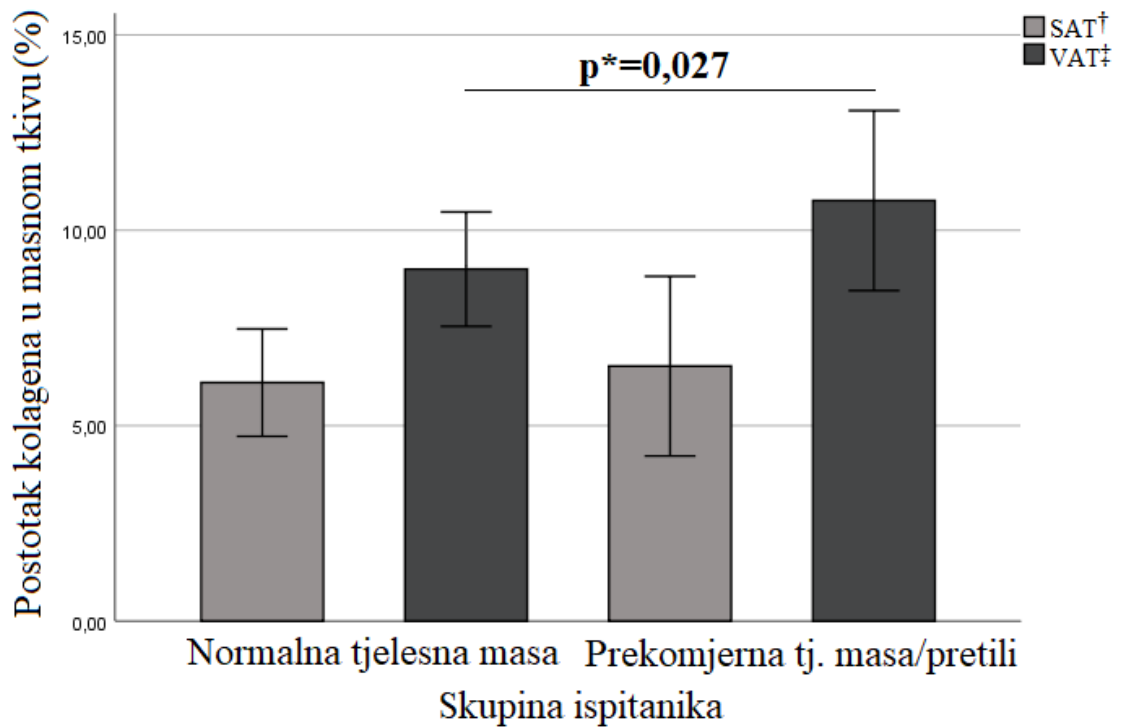
U subkutanom masnom tkivu nije bilo značajne razlike u postotku kolagena u vidnom polju između skupina muških ispitanika dječje dobi i adolescenata (p=0,065, Studentov t-test).

U visceralnom masnom tkivu postotak kolagena podijeljen s ukupnom površinom masnog tkiva u vidnom polju bio je veći u skupini ispitanika prekomjerne tjelesne mase/pretilih (11,54±4,58 %) u odnosu na ispitanike normalne tjelesne mase (8,29±3,36 %) (p=0,027, Studentov t-test; Slika 5.2. c, d, Slika 5.3.).





**Slika 5.2.** Detekcija CD163<sup>+</sup> stanica imunohistokemijskom metodom i analize kolagena trikromnim bojanjem po Massonu. Reprezentativni prikaz detekcije CD163<sup>+</sup> stanica imunohistokemijskom metodom u visceralnom masnom tkivu: a) u grupi ispitanika normalne tjelesne mase, b) u grupi ispitanika prekomjerne tjelesne mase i pretilih ispitanika; reprezentativni prikaz analize kolagena u subkutanom masnom tkivu: c) u grupi ispitanika normalne tjelesne mase, d) u grupi ispitanika prekomjerne tjelesne mase i pretilih ispitanika. Povećanje: 200×



**Slika 5.3.** Postotak kolagena u potkožnom i visceralnom masnom tkivu između skupina ispitanika.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (n=42 ispitanika normalne tjelesne mase, n=33 ispitanika prekomjerne tjelesne mase/pretilih)

\*Studentov t-test

†subkutano masno tkivo

‡visceralno masno tkivo

### 5.6. Postoji razlika u izražaju gena kolagena 6 podtip $\alpha 3$ u subkutanom i visceralnom masnom tkivu te IL-6 i IL-8 u subkutanom masnom tkivu

Nije bilo značajne razlike u izražaju gena TNF- $\alpha$  između skupina ispitanika ni u subkutanom ni u visceralnom masnom tkivu (subkutano masno tkivo  $p=0,395$ , visceralno masno tkivo  $p=0,714$ ; Tablica 5.4.).

Pronađen je značajno veći izražaj kolagena 6 podtip  $\alpha 3$  u visceralnom masnom tkivu u skupini ispitanika prekomjerne tjelesne mase/pretilih u odnosu na ispitanike normalne tjelesne mase ( $p<0,001$ ), kao i u subkutanom masnom tkivu ( $p=0,001$ ; Studentov t-test).

Značajno je veći izražaj IL-6 i IL-8 u subkutanom masnom tkivu u skupini ispitanika prekomjerne tjelesne mase/pretilih u odnosu na ispitanike normalne tjelesne mase ( $p=0,007$  za IL-6 i  $p<0,001$  za IL-8; Studentov t-test), dok u visceralnom masnom tkivu nije bilo statistički značajne razlike (Tablica 5.4.).



**Tablica 5.4.** Relativni izražaj mRNA TNF- $\alpha$ , kolagena 6 podtip  $\alpha$ 3, IL-6 i IL-8 između skupina ispitanika u subkutanom i visceralnom masnom tkivu.

	Normalna tjelesna masa	Prekomjerna tj. masa/pretili	p*
n	12	8	
TNF- $\alpha$ u SAT	0,96 $\pm$ 0,35	1,06 $\pm$ 0,13	0,395
TNF- $\alpha$ u VAT	0,79 $\pm$ 0,09	0,81 $\pm$ 0,10	0,714
Kolagen 6 $\alpha$ 3 u SAT	0,83 $\pm$ 0,15	1,14 $\pm$ 0,18	0,001
Kolagen 6 $\alpha$ 3 u VAT	0,68 $\pm$ 0,04	0,84 $\pm$ 0,08	<0,001
IL-6 u SAT	0,68 $\pm$ 0,31	0,99 $\pm$ 0,06	0,007
IL-6 u VAT	0,72 $\pm$ 0,08	0,77 $\pm$ 0,08	0,334
IL-8 u SAT	0,81 $\pm$ 0,25	1,50 $\pm$ 0,45	<0,001
IL-8 u VAT	0,81 $\pm$ 0,24	0,69 $\pm$ 0,23	0,401

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija

\*Studentov t-test (crveno označene p vrijednosti statistički su značajne)

SAT – subkutano masno tkivo (engl. *subcutaneous adipose tissue*); VAT – visceralno masno tkivo (engl. *visceral adipose tissue*)

### 5.7. Postoji povezanost antropometrijskih obilježja i serumskih parametara s površinom i brojem adipocita u subkutanom i visceralnom masnom tkivu

Nađena je statistički značajna pozitivna povezanost broja adipocita u visceralnom masnom tkivu sa Z-vrijednosti, tjelesnom masom, indeksom tjelesne mase, opsegom struka i natkoljenice i površinom adipocita subkutanog masnog tkiva (Tablica 5.5.).

Površina adipocita subkutanog masnog tkiva značajno pozitivno korelira s tjelesnom masom, indeksom tjelesne mase, Z-vrijednosti i koncentracijom triglicerida u serumu, a površina visceralnog masnog tkiva s tjelesnom masom (Tablica 5.5.).

Statistički značajna negativna povezanost nađena je između koncentracije omentina u serumu i površine adipocita visceralnog masnog tkiva (Tablica 5.5.). Omentin značajno negativno korelira s opsegom struka te masom ispitanika (Tablica 5.6.), a tjelesna masa ispitanika još pozitivno korelira sa serumskom koncentracijom visfatina (Tablica 5.6.).

Sa serumskom koncentracijom visfatina pozitivno korelira i koncentracija kimerina, a koncentracija kimerina značajno pozitivno korelira i s BMI, koncentracijom triglicerida u serumu te LDL kolesterolom (Tablica 5.6.).

Serumska koncentracija adiponektina negativno je povezana s tjelesnom masom i opsegom struka (Tablica 5.6.).

**Tablica 5.5.** Povezanost antropometrijskih obilježja i serumskih parametara s površinom i brojem adipocita u subkutanom i visceralnom masnom tkivu.

	Površina adipocita SAT	Površina adipocita VAT	Broja adipocita u SAT	Broj adipocita u VAT
n	75	75	75	75
Dob	r=0,200, p=0,189	r=0,236, p=0,118	r=-0,002, p=0,988	r=0,169, p=0,147
Z-vrijednost	<b>r=0,685, p&lt;0,001</b>	r=0,175, p=0,251	r=-0,069, p=0,557	<b>r=0,554, p&lt;0,001</b>
BMI	<b>r=0,745, p&lt;0,001</b>	r=0,255, p=0,092	r=0,051, p=0,663	<b>r=0,540, p&lt;0,001</b>
Tjelesna masa	<b>r=0,378, p=0,010</b>	<b>r=0,339, p=0,023</b>	r=0,133, p=0,254	<b>r=0,301, p=0,009</b>
Opseg struka	r=0,272, p=0,071	r=0,210, p=0,167	r=-0,029, p=0,809	<b>r=0,286, p=0,014</b>
Opseg natkoljenice	r=0,262, p=0,082	r=0,241, p=0,110	r=0,144, p=0,225	<b>r=0,238, p=0,043</b>
Trigliceridi	<b>r=0,319, p=0,035</b>	r=-0,039, p=0,810	r=-0,108, p=0,367	r=0,023, p=0,850
Omentin	r=0,010, p=0,947	<b>r=-0,337, p=0,024</b>	r=-0,104, p=0,376	r=0,084, p=0,475
Visfatin	r=0,079, p=0,607	r=0,095, p=0,534	r=0,220, p=0,058	r=0,017, p=0,884
Kemerin	r=0,212, p=0,162	r=0,180, p=0,237	r=0,166, p=0,115	r=0,059, p=0,617
Adiponektin	r=-0,057, p=0,712	r=0,097, p=0,524	r=-0,077, p=0,509	r=0,006, p=0,957
Površina adipocita SAT	N/P	r=0,228, p=0,132	r=-0,016, p=0,919	<b>r=0,343, p=0,021</b>

Pearsonova korelacija (crveno označene korelacije statistički su značajne)

SAT – subkutano masno tkivo (engl. *subcutaneous adipose tissue*); VAT – visceralno masno tkivo (engl. *visceral adipose tissue*); BMI – indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*); N/P – nije primjenjivo

**Tablica 5.6.** Povezanost serumskih parametara i antropometrijskih obilježja.

	Omentin	Visfatin	Kemerin	Adiponektin
n	75	75	75	75
Visfatin	r=-0,065, p=0,588	N/P	r=0,312, p=0,008	r=-0,093, p=0,425
Kemerin	r=-0,045, p=0,701	r=0,312, p=0,008	N/P	r=0,022, p=0,853
Tjelesna masa	r=-0,324, p=0,005	r=0,281, p=0,015	r=0,197, p=0,091	r=-0,360, p=0,001
BMI	r=-0,129, p=0,269	r=0,011, p=0,925	r=0,269, p=0,020	r=-0,089, p=0,450
Opseg struka	r=-0,321, p=0,005	r=0,062, p=0,604	r=0,130, p=0,271	r=-0,335, p=0,004
Trigliceridi	r=-0,024, p=0,844	r=-0,134, p=0,240	r=0,784, p=0,002	r=-0,154, p=0,196
LDL kolesterol	r=0,049, p=0,685	r=-0,116, p=0,334	r=0,275, p=0,018	r=0,-074, p=0,537

Pearsonova korelacija (crveno označene korelacije statistički su značajne)

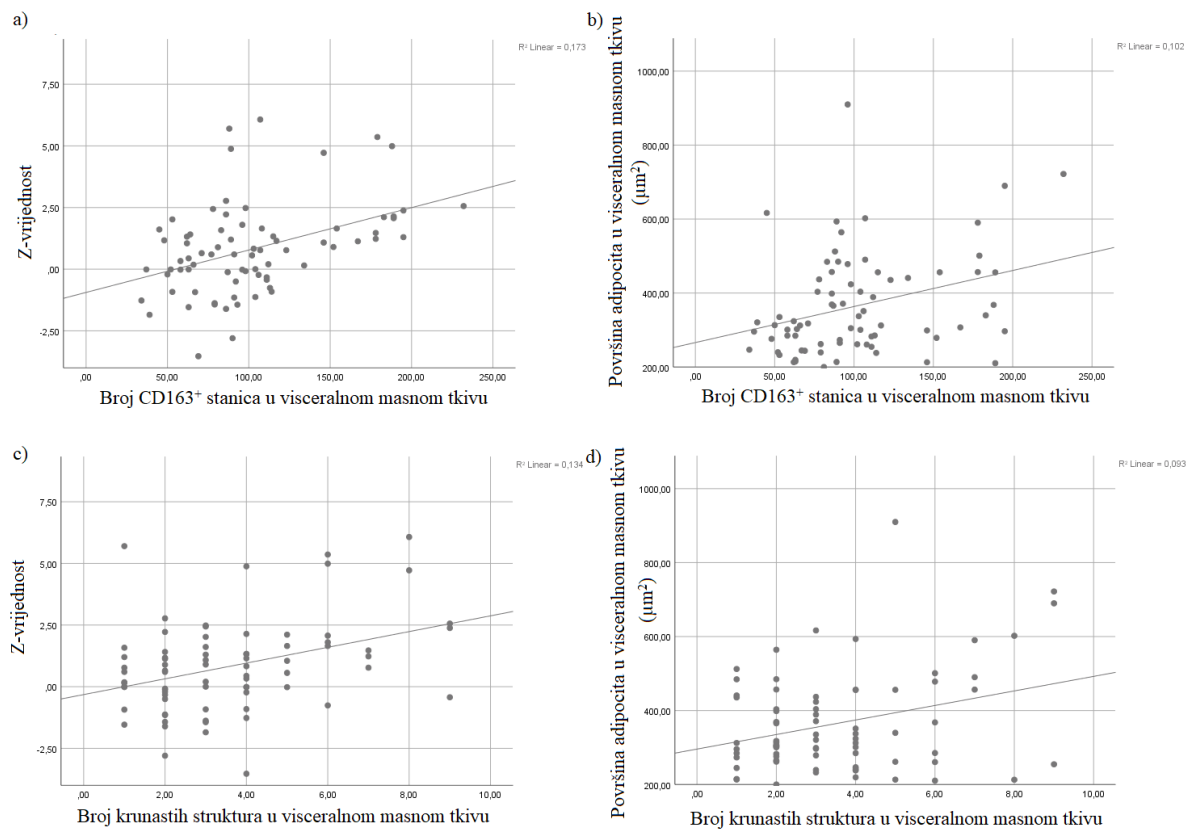
N/P – nije primjenjivo; BMI – indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)

### 5.8. Postoji povezanost antropometrijskih obilježja i serumskih parametara s brojem CD163<sup>+</sup> stanica i krunastih struktura u subkutanom i visceralnom masnom tkivu

Koncentracija adiponektina u serumu značajno negativno korelira s brojem CD163<sup>+</sup> stanica i u subkutanom i u visceralnom masnom tkivu. Broj CD163<sup>+</sup> stanica u visceralnom masnom tkivu značajno pozitivno korelira sa svim ostalim ispitanim parametrima (Tablica 5.7.; Slika 5.4 a i b).

Broj CD163<sup>+</sup> stanica u subkutanom masnom tkivu značajno pozitivno korelira s dobi ispitanika, tjelesnom masom i opsegom struka (Tablica 5.7.).

Broj krunastih struktura u subkutanom i visceralnom masnom tkivu značajno pozitivno korelira s indeksom tjelesne mase, Z-vrijednosti, površinom adipocita subkutanog masnog tkiva i brojem CD163<sup>+</sup> stanica u visceralnom masnom tkivu, a broj krunastih struktura u visceralnom masnom tkivu još značajno pozitivno korelira s dobi, tjelesnom masom, opsegom natkoljenice i površinom adipocita u visceralnom masnom tkivu (Tablica 5.7., Slika 5.4. c i d). Broj krunastih struktura također značajno pozitivno korelira i između oba masna tkiva (Tablica 5.7.).



**Slika 5.4.** Povezanost broja CD163<sup>+</sup> stanica sa: a) Z-vrijednosti, b) površinom adipocita u visceralnom masnom tkivu te povezanost broja krunastih stanica u visceralnom masnom tkivu sa: c) Z-vrijednosti i d) površinom adipocita u visceralnom masnom tkivu (Pearsonova korelacija; n=75).

**Tablica 5.7.** Povezanost antropometrijskih obilježja, serumskih analiza, površine i broja adipocita s brojem CD163<sup>+</sup> stanica i krunastih struktura u subkutanom i visceralnom masnom tkivu.

	CD163 <sup>+</sup> u SAT	CD163 <sup>+</sup> u VAT	CLS u SAT	CLS u VAT
n	75	75	75	75
Dob	r=0,379, p=0,010	r=0,553, p<0,001	r=-0,013, p=0,909	r=0,243, p=0,036
Z-vrijednost	r=0,060, p=0,696	r=0,725, p<0,001	r=0,316, p=0,006	r=0,366, p=0,001
BMI	r=0,133, p=0,383	r=0,813, p<0,001	r=0,372, p=0,001	r=0,517, p<0,001
Tjelesna masa	r=0,304, p=0,042	r=0,725, p<0,001	r=0,133, p=0,254	r=0,390, p=0,001
Opseg struka	r=0,484, p=0,001	r=0,620, p<0,001	r=0,154, p=0,194	r=0,227, p=0,053
Opseg natkoljenice	r=0,154, p=0,311	r=0,532, p<0,001	r=0,185, p=0,117	r=0,330, p=0,004
Trigliceridi	r=0,146, p=0,343	r=0,384, p=0,010	r=0,098, p=0,411	r=0,185, p=0,120
Adiponektin	r=-0,364, p=0,014	r=-0,320, p=0,032	r=-0,043, p=0,712	r=-0,011, p=0,922
Površina adipocita SAT	r=-0,033, p=0,829	r=0,563, p<0,001	r=0,425, p=0,004	r=0,519, p<0,001
Površina adipocita VAT	r=-0,060, p=0,698	r=0,325, p=0,029	r=0,092, p=0,548	r=0,317, p=0,034
Broj adipocita u VAT	r=0,076, p=0,619	r=0,335, p=0,025	r=0,195, p=0,174	r=0,377, p=0,001
CD163 <sup>+</sup> u SAT	N/P	r=0,292, p=0,052	r=0,201, p=0,186	r=-0,080, p=0,600
CD163 <sup>+</sup> u VAT	r=0,292, p=0,052	N/P	r=0,323, p=0,030	r=0,559, p<0,001
CLS u SAT	r=0,201, p=0,186	r=0,323, p=0,030	N/P	r=0,309, p=0,007
CLS u VAT	r=-0,080, p=0,600	r=0,559, p<0,001	r=0,309, p=0,007	N/P

Pearsonova korelacija (crveno označene korelacije statistički su značajne)

SAT – subkutano masno tkivo (engl. *subcutaneous adipose tissue*); VAT – visceralno masno tkivo (engl. *visceral adipose tissue*); CLS – krunaste strukture (engl. *crown-like structures*); BMI – indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*); N/P – nije primjenjivo

### 5.9. Postoji povezanost antropometrijskih obilježja i serumskih parametara s izražajem gena TNF- $\alpha$ , kolagena 6 podtip $\alpha 3$ , IL-6 i IL-8

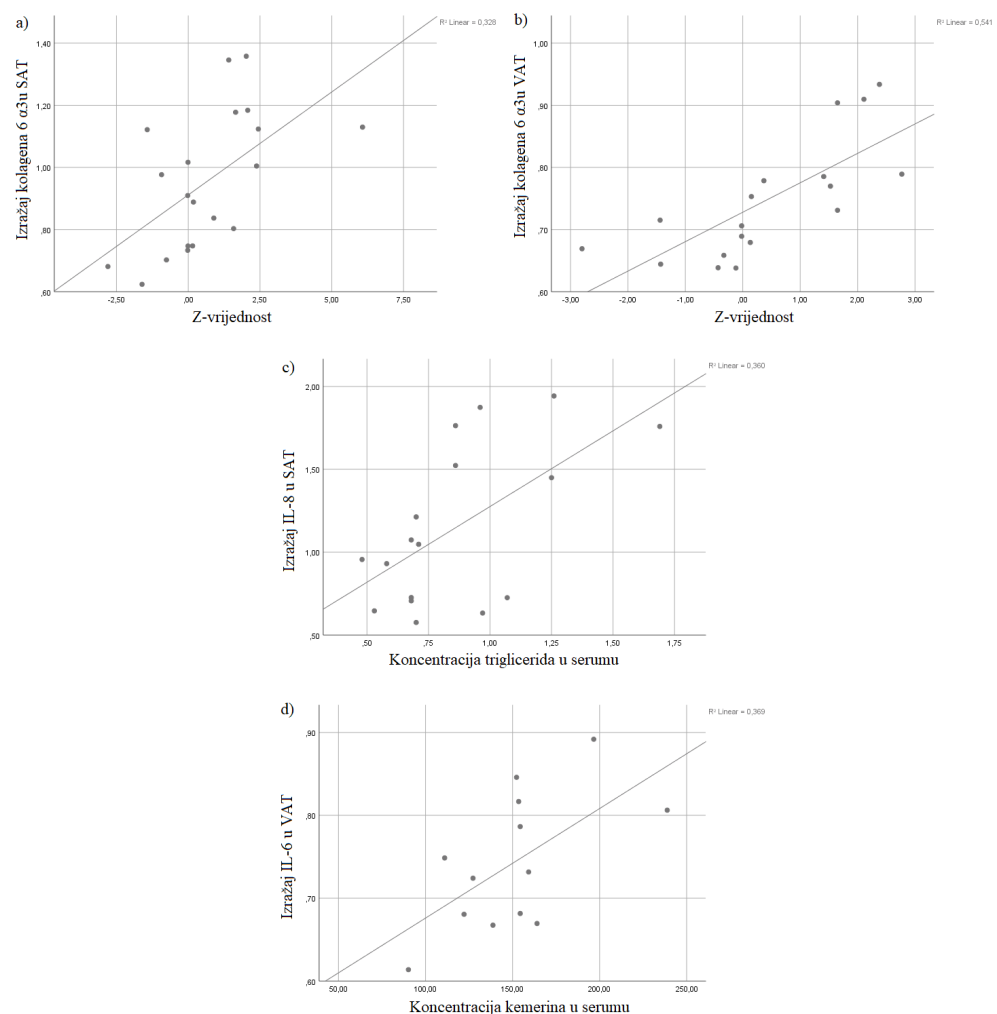
Izražaj kolagena 6 podtip  $\alpha 3$  u SAT pozitivno je korelirao sa Z-vrijednosti (r=0,366, p=0,001; Slika 5.5. a), te izražajem IL-8 (r=0,616, p=0,004) i TNF- $\alpha$  (r=0,538, p=0,014) u subkutanom masnom tkivu.

Statistički značajna pozitivna povezanost izražaja kolagena 6 podtip  $\alpha 3$  u VAT pronađena je sa Z-vrijednosti (r=0,735, p=0,003; Slika 5.5. b), koncentracijom kimerina u serumu (r=0,662, p=0,010) te izražajem IL-6 (r=0,653, p=0,016) i TNF- $\alpha$  (r=0,549, p=0,042) u visceralnom masnom tkivu.

Izražaj IL-8 u subkutanom masnom tkivu pozitivno je korelirao s površinom adipocita u istom masnom tkivu ( $r=0,758$ ,  $p=0,004$ ), Z-vrijednosti ( $r=0,644$ ,  $p=0,003$ ), koncentracijom triglicerida u serumu ( $r=0,600$ ,  $p=0,011$ ) (Slika 5.6. c), brojem CD163<sup>+</sup> stanica u VAT ( $r=0,679$ ,  $p=0,015$ ), broju krunastih struktura u SAT ( $r=0,462$ ,  $p=0,047$ ) i VAT ( $r=0,563$ ,  $p=0,012$ ).

Izražaj IL-6 u visceralnom masnom tkivu još je pozitivno korelirao s koncentracijom kimerina u serumu ( $r=0,608$ ,  $p=0,028$ ) (Slika 5.6. d) te izražajem TNF- $\alpha$  u istom masnom tkivu ( $r=0,894$ ,  $p<0,001$ ).

Značajna pozitivna povezanost izražaja IL-6 u subkutanom masnom tkivu pronađena je s brojem CD163<sup>+</sup> stanica u visceralnom masnom tkivu ( $r=0,600$ ,  $p=0,039$ ).



**Slika 5.5.** Povezanost izražaja gena s antropometrijskim i serumskim parametrima: a) izražaja kolagena 6  $\alpha 3$  u SAT sa Z-vrijednosti, b) izražaja kolagena 6  $\alpha 3$  u VAT sa Z-vrijednosti, c) izražaja IL-8 u SAT s koncentracijom triglicerida u serumu i d) izražaja IL-6 u VAT s koncentracijom kimerina u serumu (Pearsonova korelacija;  $n=20$ ).

SAT – subkutano masno tkivo (engl. *subcutaneous adipose tissue*); VAT – visceralno masno tkivo (engl. *visceral adipose tissue*)

### 5.10. Postoji povezanost između antropometrijskih obilježja i serumskih parametara s površinom i brojem adipocita, brojem CD163<sup>+</sup> stanica te krunastih struktura u subkutanom i visceralnom masnom tkivu i nakon podjele po dobi

Nakon podjele skupina po dobi, u skupini ispitanika do 10 godina (n=63) postoji pozitivna povezanost Z-vrijednosti, BMI i tjelesne mase s površinom adipocita oba depoa masnog tkiva i broja adipocita u visceralnom masnom tkivu. Površina adipocita u visceralnom masnom tkivo pozitivno korelira i s opsegom struka, površiom adipocita u subkutanom masnom tkivu te negativno s koncentracijom omentina u serumu (Tablica 5.8.).

**Tablica 5.8.** Povezanost antropometrijskih obilježja i serumskih parametara s površinom i brojem adipocita u subkutanom i visceralnom masnom tkivu u skupini ispitanika dobi do 10 godina.

	Površina adipocita SAT	Površina adipocita VAT	Broja adipocita u SAT	Broj adipocita u VAT
n	63	63	63	63
Z-vrijednost	r=0,731, p<0,001	r=0,293, p=0,020	r=-0,144, p=0,260	r=0,598, p=0<0,001
BMI	r=0,807, p<0,001	r=0,411, p=0,001	r=-0,057, p=0,658	r=0,582, p=0<0,001
Tjelesna masa	r=0,293, p=0,020	r=0,365, p=0,004	r=0,023, p=0,855	r=0,308, p=0,014
Opseg struka	r=0,208, p=0,117	r=0,341, p=0,007	r=-0,112, p=0,390	r=0,250, p=0,052
Omentin	r=0,064, p=0,619	r=-0,287, p=0,023	r=-0,095, p=0,485	r=0,138, p=0,280
Površina adipocita SAT	N/P	r=0,402, p=0,001	r=-0,087, p=0,499	r=0,524, p<0,001

Pearsonova korelacija (crveno označene korelacije statistički su značajne)

SAT – subkutano masno tkivo (engl. *subcutaneous adipose tissue*); VAT – visceralno masno tkivo (engl. *visceral adipose tissue*); BMI – indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*); N/P – nije primjenjivo

U skupini ispitanika starijih od 10 godina (n=12) nađena je samo pozitivna korelacija broja adipocita u visceralnom masnom tkivu s tjelesnom masom (r=0,607, p=0,036).

U skupini ispitanika do 10 godina starosti (n=63) postoji pozitivna povezanost kimerina s visfatinom, BMI, koncentracijom triglicerida i LDL kolesterola u serumu. Omentin pozitivno korelira s tjelesnom masom. Koncentracija adiponektina negativno korelira s opsegom struka (Tablica 5.9.)

**Tablica 5.9.** Povezanost serumskih i antropometrijskih obilježja u skupini ispitanika dobi do 10 godina.

	Omentin	Visfatin	Kemerin	Adiponektin
n	63	63	63	63
Visfatin	r=-0,029, p=0,821	N/P	r=0,351, p=0,006	r=-0,060, p=0,639
Kemerin	r=-0,001, p=0,946	r=0,351, p=0,006	N/P	r=-0,037, p=0,771
Tjelesna masa	r=-0,261, p=0,042	r=-0,069, p=0,543	r=0,227, p=0,074	r=-0,209, p=0,100
BMI	r=0,043, p=0,736	r=0,027, p=0,835	r=0,266, p=0,035	r=0,038, p=0,769
Opseg struka	r=-0,183, p=0,152	r=-0,129, p=0,322	r=0,222, p=0,086	r=-0,261, p=0,042
Trigliceridi	r=-0,044, p=0,739	r=-0,176, p=0,178	r=0,715, p=0,013	r=-0,026, p=0,842
LDL kolesterol	r=0,062, p=0,640	r=-0,250, p=0,154	r=0,262, p=0,043	r=0,101, p=0,444

Pearsonova korelacija (crveno označene korelacije statistički su značajne)

N/P – nije primjenjivo; BMI – indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)

U skupini ispitanika od 10 godina i starijih (n=12) postojala je negativna korelacija serumske koncentracije visfatina s koncentracijom omentina (r=-0,518, p=0,048) i pozitivna korelacija koncentracije visfatina s tjelesnom masom (r=0,592, p=0,042). Koncentracija kemerina pozitivno je korelirala s koncentracijom LDL kolesterola (r=0,647, p=0,023). Nije bilo korelacije koncentracije adiponektina s ispitivanim parametrima u ovoj skupini.

U skupini ispitanika dobi do 10 godina (n=63) postoji pozitivna korelacija broja CD163<sup>+</sup> stanica u subkutanom masnom tkivu s dobi, tjelesnom masom, opsegom struka i natkoljenice, a broj krunastih struktura u subkutanom masnom tkivo pozitivno je povezan sa Z-vrijednosti, BMI, površinom adipocita u SAT, brojem CD163<sup>+</sup> stanica i krunastih struktura u visceralnom masnom tkivu (Tablica 5.9.). U visceralnom masnom tkivu broj CD163<sup>+</sup> stanica i krunastih struktura pozitivno je povezan s brojnim parametrima navedenim u Tablici 5.10.



**Tablica 5.10** Povezanost antropometrijskih obilježja, serumskih analiza, površine i broja adipocita s brojem CD163<sup>+</sup> stanica i krunastih struktura u subkutanom i visceralnom masnom tkivu u skupini ispitanika dobi do 10 godina.

	CD163 <sup>+</sup> u SAT	CD163 <sup>+</sup> u VAT	CLS u SAT	CLS u VAT
n	63	63	63	63
Dob	r=0,394, p=0,014	r=0,469, p=0,003	r=0,003, p=0,983	r=0,092, p=0,472
Z-vrijednost	r=0,076, p=0,652	r=0,434, p<0,001	r=0,334, p=0,007	r=0,409, p=0,001
BMI	r=0,004, p=0,794	r=0,519, p<0,001	r=0,420, p=0,001	r=0,521, p<0,001
Tjelesna masa	r=0,367, p=0,023	r=0,493, p<0,001	r=0,201, p=0,115	r=0,265, p=0,036
Opseg struka	r=0,384, p=0,017	r=0,263, p=0,041	r=0,161, p=0,215	r=0,162, p=0,213
Opseg natkoljenice	r=0,348, p=0,032	r=0,442, p<0,001	r=0,241, p=0,061	r=0,253, p=0,049
Trigliceridi	r=0,181, p=0,284	r=0,325, p=0,049	r=0,156, p=0,234	r=0,130, p=0,232
Površina adipocita SAT	r=0,052, p=0,684	r=0,515, p<0,001	r=0,390, p=0,002	r=0,495, p<0,001
Površina adipocita VAT	r=0,176, p=0,168	r=0,367, p=0,003	r=0,161, p=0,207	r=0,298, p=0,018
Broj adipocita u VAT	r=0,116, p=0,364	r=0,420, p=0,001	r=0,140, p=0,273	r=0,437, p<0,001
CD163 <sup>+</sup> u SAT	N/P	r=0,309, p=0,059	r=0,027, p=0,836	r=0,155, p=0,227
CD163 <sup>+</sup> u VAT	r=0,309, p=0,059	N/P	r=0,409, p=0,011	r=0,480, p<0,001
CLS u SAT	r=0,027, p=0,836	r=0,409, p=0,011	N/P	r=0,483, p<0,001
CLS u VAT	r=0,155, p=0,227	r=0,480, p<0,001	r=0,483, p<0,001	N/P

Pearsonova korelacija (crveno označene korelacije statistički su značajne)

SAT – subkutano masno tkivo (engl. *subcutaneous adipose tissue*); VAT – visceralno masno tkivo (engl. *visceral adipose tissue*); CLS – krunaste strukture (engl. *crown-like structures*); BMI – indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*); N/P – nije primjenjivo

U skupini muške djece starije od 10 godina (n=12) vidi se samo pozitivna korelacija broja CD163<sup>+</sup> stanica u subkutanom masnom tkivu s opsegom struka (r=0,644, p=0,024), a u visceralnom masnom tkivu s BMI (r=0,595, p=0,041), opsegom struka (r=0,609, p=0,035) i tjelesnom masom (r=0,682, p=0,001). Nema korelacija krunastih struktura u subkutanom i visceralnom masnom tkivu s tablično navedenim parametrima u Tablici 5.10.

## 6. RASPRAVA

Ova je studija korak dalje u istraživanju pretilosti i metaboličkih oboljenja koja su izravno ili neizravno izazvana pretilošću te postaju sve veći problem ne samo starije populacije, nego svih uzrasta. Utvrđivanjem izražajnih profila ciljanih proteina i adipocitokina uz utvrđivanje broja makrofaga te određivanje količine kolagena s obzirom na indeks tjelesne mase i dob dobit će se nove spoznaje o proupalnim i remodelacijskim procesima unutar izvanstaničnog matriksa visceralnog i subkutanog masnog tkiva. Dinamika tih procesa zabilježena već u ranoj životnoj dobi dodatno će pojasniti procese pretvaranje fiziološkog masnog tkiva u patološko masno tkivo, što će pridonijeti boljem razumijevanju pojave simptoma metaboličkog sindroma kod djece i odraslih.

### **6.1. Značajno je manja koncentracija lipoproteina velike gustoće kod pretilih ispitanika dječje dobi**

Ovo istraživanje obuhvaćalo je ispitanike muškog spola dječje i adolescentske dobi koji su bili podijeljeni prema Z-vrijednostima u dvije skupine: skupina ispitanika normalne tjelesne mase te skupina prekomjerne tjelesne mase i pretilih ispitanika u dobi od 2. do 18. godine života. Ispitanicima su odrađene serumske analize venske krvi koja je prikupljena na dan zahvata, a neposredno prije uvida u anesteziju te je izdvojen serum za daljnje biokemijske analize. Kod skupine s prekomjernom tjelesnom masom i pretilih ispitanika pronašli smo značajno manju koncentraciju HDL kolesterola u usporedbi sa skupinom ispitanika normalne tjelesne mase. Jedna od karakteristika pretilosti je dislipidemija koju definira povećana razina FFA, sniženi HDL te normalno ili blago povišeni LDL (139). Pretilost ne samo da utječe na koncentraciju HDL nego utječe i na njegovu funkcionalnost, a novi dokazi upućuju na to da HDL može izgubiti svoju zaštitnu aktivnost te pod određenim uvjetima postati aterogen (140). Istraživanja provedena na animalnim modelima otkrila su da inhibicija kolesterol ester transfer proteina (engl. *cholesteryl ester transfer protein*, CETP) blokira i utječe na izmjenu između triglicerida i kolesterola što za učinak ima povećanje razine HDL (141).

U našoj studiji nismo dobili značajne razlike u razini triglicerida kao ni za LDL, ali smo imali statističku značajnost za HDL što bi moglo ukazati na rani stadij početka pogoršanja metaboličkog stanja te narušavanja energetske homeostaze. Linsel-Nitschke i sur. navode da na razine LDL kolesterola predominantno utječu genetski faktori dok to nije slučaj s trigliceridima na koje u našem slučaju mogu vrlo bitno utjecati okolni čimbenici kao što su na primjer

sjedilački način života, dob ispitanika i okolišni faktori (142). Kontrola tih čimbenika rizika u dječjoj dobi mogla bi biti vrlo korisna kao prevencija razvoja težih metaboličkih oboljenja u adolescentskoj i starijoj dobi. Analizom povezanosti određenih parametara dobili smo pozitivnu korelaciju triglicerida s površinom adipocita u subkutanom masnom tkivu. Ranije provedene studije pokazale su da veći adipociti akumuliraju puno više triglicerida te oslobađaju više FFA od manjih adipocita (143).

Također pozitivna korelacija postoji kada se uspoređi razina triglicerida s brojem CD163<sup>+</sup> stanica u visceralnom masnom tkivu. Kod istraživanja pretilosti uzrokovane prehranom potvrđeno je da makrofage masnog tkiva metabolički aktiviraju FFA koje se oslobađaju lipolizom triglicerida iz adipocita ili lipoproteina bogatih trigliceridima pomoću lipoprotein lipaze sudjelovanjem Cd36 receptora. Kod modela pretilih miševa utvrđeno je da je Cd36 receptor za čišćenje klase B i djeluje kao transporter masnih kiselina uz promicanje povećanog unosa masnih kiselina. Smatra se da ima ulogu medijatora u komunikaciji između adipocita i makrofaga i poticanja izlučivanja adipocitokina iz makrofaga (144,145).

Značajna razlika između skupina ispitanika kod analize razina glukoze nije pronađena u ovom istraživanju, a subanalizom nakon podjele u predpubertetsku i pubertetsku skupinu nije bilo razlike u rezultatu. Jedan od razloga može biti taj da je metabolički profil homogeniji kod pretilih djece koja nisu stupila u pubertet (146), no obzirom da se studija temelji većinom na ispitanicima pretpubertetske dobi i malim dijelom pubertetske dobi ovu tezu bi trebalo možda detaljnije istražiti kroz neku drugu studiju. Povezane bolesti koje prate stupanj i trajanje pretilosti povećavaju se s dobi, obzirom da je ovo presječno istraživanje s relativno manjim brojem ispitanika moguće je da je to doprinijelo nedostatku statističke značajnosti između stupnja pretilosti i razine glukoze.

Nedostatak povezanosti određenih parametara između skupina ispitanika u ovom istraživanju može se povezati s prethodno provedenom studijom gdje je prikazano da se ulaskom u pubertet, odnosno prijelazom iz djetinjstva u adolescenciju odvija metabolička oluja praćena poremećajem lipidnog profila kao rezultat hormonskih promjena u organizmu, a što ne znači nužno i promjenu u količini masnog tkiva (147). Na promjene lipidnog profila mogu utjecati hormonalne promjene na početku puberteta uslijed spolnog sazrijevanja snažnije nego nakupljanje masnog tkiva. Ti čimbenici mogu utjecati na dosadašnja saznanja da lipidni profil i količina masnog tkiva moraju biti donekle u suodnosu, što je slučaj kod odraslih osoba, a što očito nije slučaj kod povezanosti antropometrijskih obilježja i lipidnog profila u dječjoj i adolescentskoj dobi (16). Potrebne su dugotrajnije studije u dječjoj dobi kod pretilih djece i

adolescenata, a koje će pratiti promjene lipidnog profila kroz određeni period vremena uz antropometrijska obilježja kako bi se dobili precizniji podatci i donijeli zaključci.

U našem istraživanju nisu zabilježene povećane koncentracije testosterona kod pretila djece te ne postoje razlike između koncentracija testosterona kada se usporede pretila djeca i djeca normalne tjelesne mase što je u skladu s drugim studijama (148), a u našem slučaju može biti povezano sa srednjom dobi ispitanika te time da je u ispitivanju sudjelovalo samo 12 djece starije od 10 godina. Pojedine studije ukazuju da ipak postoji razlika u koncentracijama testosterona kada se usporede pretili adolescenti i adolescenti normalne tjelesne mase što ovom studijom nije obuhvaćeno te otvara eventualno mogućnost da se to istraži naknadno uz veći broj ispitanika adolescentske dobi (149,150).

## **6.2. Nije bilo značajne razlike u serumskoj razini adiponektina, omentina, visfatina i kemerina**

U serumskoj analizi cirkulirajućih adipocitokina nije pronađena statistička značajnost kada se usporede ispitanici normalne tjelesne mase te ispitanici prekomjerne tjelesne mase i pretili. Jedan od razloga zašto je to tako moglo bi se objasniti već ranije spomenutim homogenijim metaboličkim profilom kod djece koja nisu stupila u pubertet (146), a učinjenom subanalizom nakon podjele djece u predpubertetsku i pubertetsku skupinu također nije bilo povezanosti, no svakako bi se trebalo uzeti u obzir i to da su uzorci prošli kroz nekoliko ciklusa odmrzavanja-smrzavanja što može utjecati na konačne vrijednosti kada se radi o analizama u serumu ispitanika.

U istraživanju smo pronašli da koncentracija adiponektina u serumu umjereno negativno korelira s brojem CD163<sup>+</sup> stanica i u subkutanom i u visceralnom masnom tkivu, a subanalizom na predpubertetsku i pubertetsku djecu se ta korelacija gubi u obje skupine. Statistički značajna negativna povezanost nađena je između koncentracije omentina u serumu i površine adipocita visceralnog masnog tkiva. Značajna negativna korelacija omentina nađena je i s opsegom struka te tjelesnom masom ispitanika koja pozitivno korelira sa serumskom koncentracijom visfatina. Sa serumskom koncentracijom visfatina pozitivno korelira i koncentracija kemerina, a koncentracija kemerina značajno pozitivno korelira i s BMI, koncentracijom triglicerida u serumu te LDL kolesterolom.

Istraživanje koje su proveli Morales i sur. otkrilo je da se razina adiponektina kod djece i adolescenata s dijabetesom tipa 1 ne razlikuju kada se usporede sa zdravim ispitanicima (151), što bi odgovaralo i našim rezultatima. Ono što ostaje nerazjašnjeno kada se radi o pretilosti u

dječjoj dobi je to da se kod zdrave djece i adolescenata razine adiponektina značajno razlikuju kada se usporede muški i ženski spol. Kod zdrave djece ulaskom u pubertet razina adiponektina smanjuje se neovisno o tjelesnoj masi i puno su veće vrijednosti cirkulirajućeg adiponektina prisutne kod ženskog spola u pubertetu, da bi na kraju puberteta koncentracija cirkulirajućeg adiponektina kod muškog spola bila još niže vrijednosti, a to pokazuje statističku značajnost kada se usporedi sa ženskim spolom (152).

Galler i sur. proveli su, također, opsežno istraživanje temeljeno na djeci i adolescentima koji imaju pobol od dijabetesa tipa 1 i dolaze do sličnih podataka kao Morales i sur. - koncentracija adiponektina opada tijekom puberteta kod muškog spola, ali se ne razlikuje od razina adiponektina kod ženskog spola na kraju puberteta. Autori navode kako razlog za to ostaje nejasan što zapravo može sugerirati da su ipak razni drugi čimbenici uključeni u regulaciju lučenja adiponektina kod djece prije, za vrijeme puberteta i tijekom određenih pobola u dječjoj dobi te nagađaju da bi upravo utjecaj ulaska u pubertet mogao imati potencijalne implikacije u tome radi hormonskih promjena koje tada nastupaju (153). Tsou i sur. pokazali su pak prolazni pad razine adiponektina u pubertetu koji je bio u korelaciji s povećanim testosteronom kod djece muškog spola u dobi od 10 do 12 godina (154). Drugi autori, također, navode saznanja o spolnim razlikama između razine adiponektina u dječjoj dobi, a te su razlike su uvelike ovisne o pubertetu i stupnju pretilosti u dječjoj i adolescentskoj dobi (155). Subanalizom po dobi dobili smo pozitivnu korelaciju serumske koncentracije adiponektina s opsegom struka u skupini ispitanika dobi do 10 godina, dok se kod starijih ispitanika ta korelacija gubi, što bi moglo biti u skladu s gore navedenim istraživanjima Gallera, Moralesa i Tsoua.

Kao najzastupljeniji adipocitokin u tijelu, adiponektin ima višestruka zaštitna protuupalna svojstva u stanju pretilosti te kod razvoja kardiovaskularnih oboljenja. Dokazano je da je smanjena regulacija adiponektina povezana s visokim razinama upalnih biljega i raznim metaboličkim stanjima (156,157). Postoje opsežne studije koje pokazuju da adiponektin djeluje kao protuupalni posrednik kroz regulaciju proliferacije makrofaga iz tipa M1 u tip M2, adiponektin potiskuje aktivaciju M1 makrofaga i potiče proliferaciju M2 makrofaga što je jedan od čimbenika njegove protuupalne aktivnosti (158), a u našoj studiji pronašli smo negativnu korelaciju razine adiponektina i broja proupalnih makrofaga u masnim tkivima. Nedostatak adiponektina ili njegova niska razina *in vivo* dovodi do aktivacije klasično aktiviranog fenotipa makrofaga – M1, a rekombinantni adiponektin djeluje tako da potiče prijelaz na protuupalni fenotip – M2 (159). Istraživanja provedena na ljudima pokazuju da adiponektin, također,

inducira proliferaciju M2 makrofaga u masnom tkivu, što upućuje da je adiponektin vrlo bitan modulator proliferacije makrofaga u M2 fenotip (160).

Poznato je da razine cirkulirajućeg omentina značajno negativno koreliraju s BMI, koncentracijom triglicerida i tjelesnom masom (95), što smo potvrdili ovim istraživanjem, ali smo dobili značajno negativnu korelaciju s površinom adipocita u visceralnom masnom tkivu. Studija koju su proveli Tan i sur. potvrđuje naše rezultate, gdje prikazuju da razina cirkulirajućeg omentina odražava njegov izražaj u visceralnom masnom tkivu, a koja se smanjuje s povećanjem visceralne pretilost (161), što se može povezati dobivenom negativnom korelacijom s površinom adipocita u visceralnom masnom tkivu. Yang i sur. prikazali su da omentin pojačava inzulinom stimuliranu apsorpciju glukoze u adipocitima kod ljudi te da može regulirati osjetljivost na inzulin (162).

Pozitivna korelacija serumske razine kemerina s BMI, trigliceridima i LDL kolesterolom pronađena u ovoj studiji očekivana je i potvrđuje rezultate ranije studije koju su proveli El-Mesallamy i sur. koji su dobili slične rezultate, a to potvrđuje pozitivnu povezanost kemerina s određenim parametrima MetS kao što su inzulinska rezistencija, dislipidemija i hipertenzija (163). Visfatin u ovom istraživanju pozitivno korelira s tjelesnom masom, što potvrđuju i druge studije (103), a subanalizom ta pozitivna korelacija perzistira samo u skupini ispitanika od 10 godina i starijih, što upućuje da bi to moglo imati veze s dobi. Također, u ovoj studiji pronađena je i pozitivna korelacija između koncentracije visfatina i razine kemerina u serumu što se može povezati s tim da se oba smatraju proupalnim adipocitokinima i promotorima upalnih procesa. Ranije provedena studija Sawicka i sur. potvrdila je njihovu pozitivnu korelaciju s upalnim markerima kod kroničnih bolesti kao što je razvoj sistemske skleroze (164).

### **6.3. Nađena je povećana površina adipocita u subkutanom i povišen broj adipocita u visceralnom masnom tkivu**

U ovom istraživanju ispitali smo razlike u morfologiji između subkutanog i visceralnog masnog tkiva kod skupine djece i adolescenata normalne tjelesne mase i skupine prekomjerne tjelesne mase i pretilih ispitanika. U subkutanom masnom tkivu kod skupine prekomjerne tjelesne mase i pretilih ispitanika površina adipocita bila je značajno veća u odnosu na površinu adipocita u grupi ispitanika normalne tjelesne mase, a broj adipocita bio je povećan u visceralnom masnom tkivu. Provedene studije na animalnim modelima prikazuju da se adipogeneza u subkutanom masnom tkivu javlja već u ranoj embriogenezi, a da nakon rođenja

broj adipocita ostaje stabilan, dok se s druge strane adipociti u visceralnom masnom tkivu tek postnatalno diferenciraju (165). Kod ljudi se subkutano masno tkivo formira od 14. do 24. gestacijskog tjedna i to od glave i vrata prema kaudalno (166), a broj adipocita nakon prve godine života ostaje uglavnom stabilan do adolescencije (167). To bi mogao biti razlog zašto smo u našem istraživanju pronašli promjene veličine adipocita samo u subkutanom, a broja adipocita u visceralnom masnom tkivu.

Visceralno masno tkivo ostaje smanjeno i bez promjena do ulaska u adolescentsku dob (168,169) i to bi mogao biti jedan od razloga zašto smo pronašli promjene u površini adipocita samo u subkutanom masnom tkivu, što sugerira da je stanična hipertrofija prisutna samo u subkutanom masnom tkivu, ali ne i u visceralnom masnom tkivu. Od korelacijskih odnosa u ovom istraživanju pronađena je statistički značajna pozitivna povezanost između broja adipocita u visceralnom masnom tkivu s tjelesnom masnom, indeksom tjelesne mase te površinom adipocita subkutanog masnog tkiva, dok je pozitivna korelacija pronađena za površinu adipocita subkutanog masnog tkiva s koncentracijom triglicerida u serumu, a slične rezultate su potvrdili von Kruchen i sur. u svojoj studiji (170). Nakon subanalize navedene korelacije broja adipocita visceralnog masnog tkiva perzistiraju i dalje u skupini predpubertetske djece. Drugi autori također prikazuju saznanja o većim adipocita u subkutanom masnom tkivu kod pretilih djece što sugerira da hipertrofija i hiperplazija započinju već u ranoj životnoj dobi (171,172). Rezultati studije Arner i sur. prikazuju da osobe s hipertrofijom adipocita imaju puno nepovoljniji metabolički profil od onih s hiperplazijom (173). Također, postoje razlike u morfologiji adipocita među depoima masnog tkiva, a slijedom toga Tarabra i sur. su prikazali su u svom istraživanju da su adipociti prikupljeni iz visceralnog masnog tkiva, i to iz područja omentuma, puno manji, brojniji i imaju veću lipolitičku aktivnost od adipocita subkutanog masnog tkiva prikupljenog iz područja abdomena pretilih adolescenata u dobi od 16. do 22. godine (174). U našem istraživanju izmjerena površina adipocita visceralnog masnog tkiva bila je manja, a broj stanica u vidnom polju veći.

Naše rezultate potvrđuje i studija Landgraf i suradnika provedena na ispitanicima dječje dobi u kojoj su dobili slične korelacijske odnose kada su uspoređivali ispitanike normalne tjelesne mase i pretilih ispitanike. Prikazali su da je površina adipocita u subkutanom masnom tkivu u skupini ispitanika prekomjerne tjelesne mase bila značajno veća kada se uspoređi s adipocitima u skupini ispitanika normalne tjelesne mase. Kod ispitanika normalne tjelesne mase zabilježili su da su se broj i površina adipocita povećavali u stopu prateći normalne stadije razvoja od dječje dobi do adolescencije, dok je kod pretilih djece površina adipocita u dobi od 6. do 8. godine života već bila značajno povećana, a zatim je ostala relativno konstantna u

pubertetu do rane odrasle dobi što ukazuje da veličina adipocita može doseći svoj vrhunac već u djetinjstvu (175). Prikazali su također da se u masnom tkivu kod djece prije navršene 2. godine veličina adipocita ubrzano povećava, dok je broj adipocita konstantan što potvrđuje ranije provedena studija Knittle i sur. (167).

#### **6.4. Povećan je broj CD163<sup>+</sup> stanica u visceralnom i krunastih struktura u subkutanom i visceralnom masnom tkivu**

Broj CD163<sup>+</sup> stanica u ovom istraživanju bio je puno veći u visceralnom masnom tkivu kod skupine ispitanika s prekomjernom tjelesnom masom i pretilih ispitanika. Manji broj CD163<sup>+</sup> stanica prisutan je u subkutanom masnom tkivu kod ispitanika normalne tjelesne mase, ali ne postoji značajna razlika kada se uspoređuju te dvije skupine ispitanika. Osim makrofaga koji su prisutni u masnom tkivu potencijalni izvor makrofaga su i Kupfferove stanice. Kod bolesti jetre koji su karakterizirani upalnim procesom i pojavom fibroze zabilježen je snažan porast broja makrofaga, a također je zabilježen porast broja makrofaga kod pretila djece koja imaju visoki pedijatrijski indeks za razvoj NAFLD fibroze (176,177). Ono što je karakteristično je da je sadržaj masnog tkiva u jetri usko povezan sa stupnjem pretilosti, ali puno je više zastupljeno kod pretilih osoba s dijagnozom dijabetesa tipa 2 nego kod osoba s istim stupnjem indeksa tjelesne mase, ali bez pobola od dijabetesa tipa 2 (178).

Broj CD163<sup>+</sup> stanica u našem istraživanju bio je veći u visceralnom masnom tkivu kod skupine ispitanika prekomjerne tjelesne mase i pretilih te je bio u pozitivnoj korelaciji s dobi, BMI i Z-vrijednosti. Broj krunastih struktura u subkutanom i visceralnom masnom tkivu bio je značajno povišen u skupini ispitanika prekomjerne tjelesne mase i pretilih ispitanika te je značajno pozitivno korelirao s indeksom tjelesne mase, površinom adipocita potkožnog masnog tkiva i brojem CD163<sup>+</sup> stanica u visceralnom masnom tkivu, a broj krunastih struktura u visceralnom masnom tkivu još značajno pozitivno korelira s dobi, tjelesnom masom, opsegom natkoljenice i površinom adipocita. Naši rezultati podupiru dosadašnja saznanja o većoj prisutnosti krunastih struktura kod ispitanika prekomjerne tjelesne mase i pretilih u subkutanom i visceralnom masnom tkivu što je u korelaciji s prethodno provedenim studijama (175,179). To je jedan od pokazatelja koji bi mogao ukazati da je upala niskog intenziteta već prisutna u ranoj životnoj dobi kod djece s pretilošću.

Povišen broj i prisutnost krunastih struktura je glavno obilježje disfunkcije u metabolizmu masnog tkiva što je ranije već opisano u ovoj studiji. Broj je krunastih struktura u našem istraživanju bio povišen u subkutanom i visceralnom masnom tkivu kod ispitanika



prekomjerne tjelesne mase i pretilih, ali veći je broj bio prisutan u visceralnom masnom tkivu, dok studija koju su proveli Murano i sur. (180) na animalnim modelima prikazuje prisutnost krunastih struktura u puno većem broju isključivo u visceralnom masnom tkivu, što donekle slijede i naši rezultati. Povišen broj krunastih struktura u visceralnom masnom tkivu usko je povezan s pogoršanjem jetrenih fibroinflammatory lezija, što svakako sugerira da krunaste strukture doprinose progresiji nastanka NAFLD (181). Naše rezultate još više podupire i ranije spomenuta studija Landgrafa i sur. (175), međutim, dosta je nepoznanica o točnom „okidaču“ koji započinje proces remodeliranja masnog tkiva u dječjoj dobi, ali studija Cintija i sur. koja je provedena na odraslim ispitanicima s pretilošću prikazali su dvostruko više makrofaga u visceralnom masnom tkivu nego u subkutanom (69), a isto smo dobili i u našoj studiji kod skupine s prekomjernom tjelesnom masom i pretilih ispitanika.

Jedan od razloga zašto se akumulira veći broj krunastih struktura u visceralnom masnom tkivu mogao bi biti taj da adipociti u visceralnom masnom tkivu puno ranije dosegnu „kritičnu točku“ do koje mogu ići procesom hipertrofije dovodeći do propadanja stanica puno ranije nego što se to dogodi s adipocitima u subkutanom masnom tkivu. Tome, također, još ide u prilog da naši rezultati ukazuju na to da adipociti u subkutanom masnom tkivu imaju puno veću površinu nego adipociti u visceralnom masnom tkivu, a pronađena je i pozitivna korelacija između veličine adipocita i broja krunastih struktura što je još jedan od čimbenika koji sugerira da infiltraciju makrofaga privlače hipertrofični adipociti, a to i potvrđuju prethodno provedene studije (40,180).

### **6.5. Povećan je postotak kolagena u visceralnom masnom tkivu kod skupine ispitanika prekomjerne tjelesne mase i pretilih**

U ECM subkutanog masnog tkiva nije bilo značajne razlike u postotku kolagena između skupina muških ispitanika dječje dobi i adolescenata dok je u visceralnom masnom tkivu postotak kolagena u ECM bio veći u skupini prekomjerne tjelesne mase i pretilih ispitanika u odnosu na ispitanike normalne tjelesne mase. Tam i sur. su kroz svoje istraživanje otkrili da djeca s prekomjernom tjelesnom masom imaju manji postotak kolagena u masnom tkivu (182). Iako se naši rezultati razlikuju od njihovih kada govorimo o ispitanicima dječje dobi, druge studije provedena na odraslim pretilim ispitanicima pokazuju da se kolagen u ECM masnog tkiva pojačano odlaže i prati rast BMI te da pretile osobe s visokim postotkom kolagena u ECM imaju veću zastupljenost masnog tkiva (52,59) što naši rezultati prikazuju. Zoller i sur. u rezultatima svoje studije sugeriraju da su kolageni nužni za nakupljanje triglicerida u

progenitorima adipocita tijekom ranih faza diferencijacije u zrele adipocite (183), a smatra se i da veće taloženje određenih tipova kolagena dovodi do pojave fibroze u ECM te ograničava i blokira daljnje širenje i razvoj masnog tkiva (33). Naša ranije provedena preliminarna studija koja je obuhvaćala mušku djecu dječje i adolescentske dobi (184) također potvrđuje ove rezultate, što nam sugerira da je patološka priroda nastajanja fibroze i početak procesa patološkog remodeliranja ECM možda više povezano s tipom kolagena nego sa samim opsegom fibroze.

Naši rezultati koji potvrđuju prisutnost adipocita veće površine u subkutanom masnom tkivu kod skupine prekomjerne tjelesne mase i pretilih ispitanika mogli bi ukazivati na precizniju sliku u vezi dinamičkog remodeliranja masnog tkiva s promjenama u strukturi ECM, a koja se već počinje događati kod pretilosti u ranoj životnoj dobi. U masnom tkivu ECM prolazi kroz konstantno remodeliranje kako bi omogućio adipocitima da se normalno šire ili smanjuju, ovisno o nutritivnom unosu (49). Međutim, kod pretilih osoba prekomjerno nakupljanje i odlaganje kolagena u ECM potiče nastanak fibroze te smanjuje elastičnost i onemogućava daljnje zdravo širenje masnog tkiva te izaziva pojavu IR (51).

Kolagen IV je glavna komponenta bazalne membrane adipocita i nužna je za preživljavanje dok je kolagen I najzastupljenija komponenta ECM (50). Istraživanje Hynesa i sur. (185) prikazuje da su kolageni I, III i V povišeni u pretilosti, da je kolagen IV znatno povećan u ECM masnog tkiva dok je izražaj kolagena 6 iznimno visok što potvrđuju i naši rezultati u ovoj studiji.

#### **6.6. Značajno je veći izražaj gena IL-8 u subkutanom i kolagena 6 podtip $\alpha 3$ u subkutanom i visceralnom masnom tkivu kod skupine ispitanika prekomjerne tjelesne mase**

Nije bilo značajne razlike u izražaju gena TNF- $\alpha$  između skupina ispitanika ni u subkutanom ni u visceralnom masnom tkivu što je dosta neočekivano, međutim studija koju su proveli Kern i sur. prikazuju dosta varijabilnosti u analizi izražaja gena TNF- $\alpha$  u masnom tkivu ispitanika različitog stupnja pretilosti, relativno mali izražaj su objasnili kao neuspjeh TNF- $\alpha$  u funkcioniranju kao „*adipostata*“ te sugeriraju da je razina izražaja TNF- $\alpha$  uključena u regulaciju akumulacije lipida i razvoj IR, te da kod nekih osoba niža razina izražaja TNF- $\alpha$  dovodi do učinkovitije akumulacije lipida i povećane inzulinske rezistencije (186).

Pronađen je značajno veći izražaj COL6 $\alpha 3$  u oba depoa masnog tkiva u skupini prekomjerne tjelesne mase i pretilih ispitanika u odnosu na ispitanike normalne tjelesne mase.

Statistički značajna pozitivna povezanost izražaja COL6 $\alpha$ 3 u visceralnom masnom tkivu pronađena je sa Z-vrijednosti i razinom TNF- $\alpha$ , a ta povezanost je pronađena i u subkutanom masnom tkivu. Adipociti su ugrađeni u ECM koji omogućava širenje masnog tkiva te pruža mehaničku potporu i sudjeluje u provođenju signalnih puteva među stanicama. COL6 $\alpha$ 3 je bitna komponenta ECM masnog tkiva i njegova odsutnost rezultira nesputanim širenjem pojedinačnih adipocita i paradoksalno je povezan s značajnim poboljšanjem energetske homeostaze (59). Fibrilarni COL6 $\alpha$ 3 u masnom tkivu usko je povezan s pretilošću, upalom, inzulinskom rezistencijom i pojavom raka.

Spencer i sur. navode u svojoj studiji da je pojava fibroze i povišena razina izražaja COL6 $\alpha$ 3 u subkutanom masnom tkivu u snažnoj je korelaciji s BMI (70). U našoj studiji dobili smo iste rezultate, pozitivnu korelaciju izražaja COL6 $\alpha$ 3 sa Z-vrijednosti kod skupine s prekomjernom tjelesnom masom i pretilih ispitanika i u visceralnom i subkutanom masnom tkivu, dok su Spencer i sur. analizirali samo subkutano masno tkivo. Stupanj fibroze je sam po sebi povezan s razvojem IR, dok je više makrofaga prisutno u fibriznim područjima. Provedena studija na animalnim modelima s COL6KO miševima sugerira da ECM može jako ograničiti širenje adipocita što ima za posljedicu nastanak nekroze adipocita i formiranje krunastih struktura (59). Naši rezultati potvrđuju gore navedene teorije i prikazane rezultate ranije spomenutih studija u tekstu da COL6 $\alpha$ 3 može izravno utjecati na ograničavanje skladištenja lipida (187). Iako izravna povezanost s upalom niskog intenziteta još nije u potpunosti jasna, dva odvojena istraživanja koja su proveli Pasarica i sur. te Hosogai i sur. sugeriraju da hipoksija i smanjena gustoća kapilara kao posljedica pretjerane fibroze u masnom tkivu mogu biti kemotakse makrofaga i razvoja upale masnog tkiva (61,188). Ono što je još zanimljivo je da smo u visceralnom masnom tkivu dobili i veći broj CD163<sup>+</sup> stanica, vjerojatno radi većeg izražaja proupalnih adipocitokina kao što je TNF- $\alpha$  s kojim je genski izražaj COL6 $\alpha$ 3 u pozitivnoj korelaciji što nam dodatno sugerira da visoki genski izražaj COL6 $\alpha$ 3 doprinosi upali masnog tkiva kod pretilih osoba što također navode Wang i sur. (189).

Značajno je veći izražaj IL-6 i IL-8 u subkutanom masnom tkivu u skupini prekomjerne tjelesne mase i pretilih ispitanika u odnosu na ispitanike normalne tjelesne mase dok u visceralnom masnom tkivu nije bilo statistički značajne razlike. Jonas i sur. su u svojoj studiji ukazali na eventualno jaču sintezu adipocitokina u subkutanom masnom tkivu gdje su prikazali rezultate s većim genskim izražajem IL-6 u subkutanom, nego u visceralnom masnom tkivu kod pretilih ispitanika, a također su pronašli veću koncentraciju IL-1 $\beta$  u subkutanom masnom tkivu što je vrlo bitno jer IL1 $\beta$  inducira sintezu i izražaj IL-8 (190). To je dosljedno našim rezultatima jer smo također zabilježili veći izražaj IL-6 i IL-8 u subkutanom masnom tkivu kod

skupine prekomjerne tjelesne mase i pretilih ispitanika. Nekoliko studija dovodi u pitanje dominantnu ulogu visceralnog masnog tkiva u razvoju metaboličkih bolesti povezanih s pretilošću, a jedna od provedenih studija prikazuje da su razine mRNA nekolicine proupalnih interleukina kao što su na primjer zabilježene u ovoj studiji IL-6 i IL-8 bile jače izražene u subkutanom nego u visceralnom masnom tkivu kod pretilih ispitanika (191,192). Centralna adipoznost je obično povezana s visokim količinama abdominalnog subkutanog masnog tkiva koje ima jedinstveni izražajni profil gena, a koji se uvelike razlikuje od profila subkutanog masnog tkiva prikupljenog iz drugih depoa subkutanog masnog tkiva (193). Razlike u genskom izražaju rezultiraju većom metaboličkom aktivnošću subkutanog masnog tkiva u abdominalnom području u usporedbi s subkutanom masnim tkivom iz gluteofemoralne regije (194).

Povećani izražaj gena IL-6 kod pretilih osoba mogu doprinijeti razvoju komplikacija posljedično povezanih s pretilošću kao što je na primjer IR. Procjenjuje se da 15-35 % ukupnog cirkulirajućeg IL-6 potječe upravo iz masnog tkiva (195,196). Naši rezultati posljedično ukazuju na to da je subkutano masno tkivo s obzirom da se puno ranije i brže razvija za razliku od visceralnog masnog tkiva veći i jači izvor određenih adipocitokina kod djece s pretilošću. U našoj studiji pronađena je još značajna pozitivna povezanost izražaja IL-6 u subkutanom masnom tkivu s brojem CD163<sup>+</sup> stanica u visceralnom masnom tkivu, što studija Rakotoarivelo i sur. također prikazuje (197). Izražaj IL-6 u visceralnom masnom tkivu još je pozitivno korelirao s koncentracijom kemerina u serumu te izražajem TNF- $\alpha$  u istom masnom tkivu, ranije provedene studije također prikazuju slične rezultate (198,199), samo što su oni analizirali međusobne povezanosti cirkulirajućih adipocitokina u serumu dok smo mi određivali genski izražaj IL-6, a cirkulirajuću razinu kemerina, no dobili su pozitivnu povezanost između razine kemerina u serumu s TNF- $\alpha$  i IL-6 što dodatno podupire naše rezultate u ovoj studiji.

Spoto i sur. u svojoj studiji dobili su zanimljive rezultate izražaja IL-8 gdje su prikazali da je izražaj IL-8 pojačan u subkutanom masnom tkivu pretilih ispitanika i da je njegov izražaj 20 puta veći u subkutanom nego u visceralnom masnom tkivu, a da je značajno povećanje IL-8 u subkutanom masnom tkivu paralelno je s povećanim izražajem njegovih receptora CXCR1 i CXCR2, koje mi u ovoj studiji nismo istraživali, a što ukazuje na vrlo bitnu ulogu signalizacije IL-8 u subkutanom masnom tkivu kod pretilih osoba (200). Veći izražaj IL-8 u subkutanom masnom tkivu u odnosu na visceralno masno tkivo kod skupine djece prekomjerne tjelesne mase pronašli smo i u našem istraživanju, no sada nije dovoljno statistički obrađeno, što nam sugerira da bi se to trebalo eventualno detaljnije ispitati u novim istraživanjima jer je očigledno da subkutano masno tkivo ima puno veću funkciju u proizvodnji adipocitokina u stanju

pretilosti u dječjoj dobi s obzirom da ima puno veći kapacitet za skladištenje energije koja nastaje prekomjernim nutritivnim unosom. U istraživanju smo još utvrdili pozitivnu korelaciju između izražaja IL-8 u subkutanom masnom tkivu s površinom adipocita, Z-vrijednosti, koncentracijom triglicerida u serumu, brojem CD163<sup>+</sup> stanica u VAT, što potvrđuju i rezultati prikazani u studiji Hasana i sur. (201) u kojoj zaključuju da povećana razina izražaja IL-8 u masnom tkivu orkestrira akumulaciju makrofaga i time potiče proces upale.

### **6.7. Ograničenja u istraživanju**

Ova je studija presječno istraživanje te, nažalost, nije bilo moguće analizirati u određenom vremenskom razdoblju uzročni odnos između izražaja gena u masnom tkivu i serumske koncentracije ciljanih adipocitokina s ostalim parametrima. Dodatne analize, uzorkovanje te metode mjerenja nije bilo moguće ponoviti kao ni uzeti u obzir eventualne inherentne varijabilosti laboratorijskih testova jer su pojedini ispitanici nakon operativnog postupka isti dan otpušteni iz Kliničkog bolničkog centra Osijek na kućnu njegu s obzirom da se radilo o vrlo malom i kratkom zahvatu. Također važno je napomenuti da su određene analize rađene nakon drugog i trećeg ciklusa smrzavanja-odmrzavanja uzoraka što može utjecati na degradaciju adipocitokina te eventualno prikazati niže razine vrijednosti njihovih koncentracija u serumu. Prema dobivenim rezultatima i značajnostima ova studija imala je dovoljan broj ispitanika što prikazuju rezultati u kojima se vidi prikaz velikog broja značajnih povezanosti svih ispitivanih parametara.

## 7. ZAKLJUČCI

Slijedom provedenog istraživanja i dobivenih rezultata donijeli smo sljedeće zaključke:

- Prekomjerna tjelesna masa i pretilost dovode do povećanja površine adipocita u subkutanom masnom tkivu i broja adipocita u visceralnom masnom tkivu;
- Prekomjerna tjelesna masa i pretilost dovode do povećanja broja krunastih struktura u subkutanom i visceralnom masnom tkivu;
- Prekomjerna tjelesna masa i pretilost dovode do većeg postotka kolagena u visceralnom masnom tkivu;
- Prekomjerna tjelesna masa i pretilost nije dovela do značajne razlike kod analize koncentracije adiponektina, kimerina, visfatina i ometina;
- Prekomjerna tjelesna masa i pretilost dovode do značajno većeg izražaja interleukina 6 i interleukina 8 u subkutanom bijelom masnom tkivu;
- Prekomjerna tjelesna masa i pretilost dovode do značajno većeg izražaja kolagena 6 alfa podtip 3 u subkutanom i visceralnom depou masnog tkiva;
- Prekomjerna tjelesna masa i pretilost dovode do većeg broja CD163<sup>+</sup> stanica u visceralnom bijelom masnom tkivu;
- Povećanje površine adipocita subkutanog masnog tkiva povezano je s povećanjem Z-vrijednosti, BMI, tjelesne mase te koncentracije triglicerida u serumu, a povećanje površine adipocita visceralnog masnog tkiva s povećanjem tjelesne mase;
- Povećanje broja adipocita visceralnog masnog tkiva povezano je s povećanjem antropometrijskih mjera ispitanika;
- Povećanje broja CD163<sup>+</sup> stanica u subkutanom masnom tkivu povezano je sa starijom dobi, većom tjelesnom masom i većim opsegom struka ispitanika, dok je u visceralnom masnom tkivu povećanje broja CD163<sup>+</sup> stanica povezano gotovo sa svim tjelesnim obilježjima, višom koncentracijom triglicerida u serumu, većom površinom adipocita i većim brojem krunastih struktura u oba depoa masnog tkiva;
- Povećanje tjelesne mase, opsega struka i površine adipocita visceralnog masnog tkiva povezano je sa smanjenjem koncentracije omentina u serumu;
- Povećanje tjelesne mase povezano je s povećanjem koncentracije visfatina;
- Smanjenje koncentracije adiponektina povezano je s povećanjem broja CD163<sup>+</sup> stanica u oba depoa masnog tkiva;

- Povećanje izražaja IL-6 povezano je s koncentracijom kimerina i izražajem TNF- $\alpha$  u visceralnom masnom tkivu;
- Povećanje izražaja IL-8 povezano je s povećanjem površine adipocita subkutanog masnog tkiva, Z-vrijednosti, koncentracije triglicerida u serumu, brojem krunastih struktura u oba depoa masnog tkiva te brojem CD163<sup>+</sup> stanica u visceralnom masnom tkivu.

## 8. SAŽETAK

**Cilj:** Pretilost u dječjoj dobi ozbiljan je javnozdravstveni problem koji se često prenese i u odraslu dob gdje se povezuje s nizom metaboličkih oboljenja koje zatim znatno utječu na kvalitetu života. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati procese koji utječu na remodeliranje izvanstaničnog matriksa u masnom tkivu zdrave muške djece i adolescenata ovisno o njihovoj tjelesnoj masi.

**Ispitanici i metode:** Za vrijeme elektivnog abdominalnog zahvata prikupljeni su uzorci subkutanog masnog tkiva (SAT) i visceralnog masnog tkiva (VAT) od 75 zdravih ispitanika muškog spola dječje i adolescentske dobi koji su podvrgnuti elektivnom zahvatu orhidopeksije ili popravku hernije. Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine prema Z-vrijednostima. Na prikupljenim uzorcima je provedena analiza morfometrije masnog tkiva histološkom metodom bojanja hemalaun eozinom te procjena stupnja fibroze u izvanstaničnom matriksu masnog tkiva standardnim trikromnim bojanjem po Massonu za detekciju kolagena; imunohistokemijska metoda za određivanje broja CD163<sup>+</sup> stanica i detekciju krunastih struktura (CLS); enzimska imunokemijska metoda za utvrđivanje razine adipocitokina u serumu - kemerin, visfatin, adiponektin i omentin te na 20 uzoraka metoda lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (rtPCR) za određivanje relativnog izražaja gena – interleukina 6 (IL-6), interleukina 8 (IL-8), tumorskog faktora nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ) i kolagena 6 alfa 3 (COL6 $\alpha$ 3).

**Rezultati:** Kod ispitanika prekomjerne tjelesne mase i pretilih ispitanika pronađeni su adipociti veće površine u SAT, veći broj CD163<sup>+</sup> stanica u VAT, više CLS u oba depoa masnog tkiva, veći postotak kolagena u VAT te veći izražaj COL6 $\alpha$ 3 u oba depoa masnog tkiva i veći izražaj IL-6 i IL-8 u SAT. Pretilost i prekomjerna tjelesna masa pozitivno je povezana s površinom adipocita u SAT, brojem adipocita u VAT te brojem CD163<sup>+</sup> stanica i krunastih struktura u oba masna tkiva.

**Zaključak:** Kod muške djece i adolescenata pretilost može dovesti do hipertrofije adipocita u SAT, povećanog taloženja kolagena u VAT, pojačanog izražaja COL6 $\alpha$ 3 te time potaknuti promjenu u polarizaciji makrofaga, utjecati na njihovo nakupljanje, strukturnu stabilnost izvanstaničnog matriksa kao i na razvoj upalnog procesa.

**Ključne riječi:** pretilosti, dječja dob, kolagen, upala, makrofagi, masno tkivo



## 9. SUMMARY

### **Proinflammatory and remodeling processes in subcutaneous and visceral adipose tissue defined through the activity of immunomodulatory adipocytokines in male children and adolescents**

**Objective:** Childhood obesity is a serious public health problem that is often transmitted in adulthood where it is associated with a numerous metabolic diseases wich significantly affect quality of life. The aim of this study was to examine the processes affecting the remodeling of the extracellular matrix in adipose tissue of healthy male children and adolescents depending on their body weight.

**Methods:** During the elective abdominal procedure, subcutaneous adipose tissue (SAT) and visceral adipose tissue (VAT) samples were collected from 75 healthy male and adolescent subjects who underwent elective orchidopexy or hernia repair. Subjects were divided into two groups according to their body mass index Z-score. On the collected samples, analysis of adipose tissue morphometry was performed by histological staining method hematoxylin and eosin and the assessment of fibrosis in extracellular matrix of adipose tissue was performed by Massons's standard trichrome staining method for collagen detection; immunohistochemistry was performed for determining the number of CD163<sup>+</sup> cells and detection of crown like structures (CLS); enzyme linked immunosorbent assay was performed for determination of serum adipocytokine levels for - chemerin, visfatin, adiponectin and omentin. Real-time polymerase chain reaction (rtPCTR) was performed for determination of relative gene expression for – interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), collagen VI subtype alpha 3 (COL6 $\alpha$ 3) on 20 samples.

**Results:** Overweighth and obese subjects were found to have larger surface area adipocytes in SAT, higher number CD163<sup>+</sup> cells in VAT, higher number of CLS in both adipose tissue depots, higher collagen staining in VAT and significantly higher gene expression of COL6 $\alpha$ 3 in both depots and higher gene expression of IL-8 and IL-6 in SAT. Overweight and obesity was positively correlated with larger surface area in SAT, higher number of adipocytes in VAT, CD163<sup>+</sup> cells and CLS in both depots of adipose tissue.

**Conclusion:** In male children and adolescents, obesity can lead to subcutaneous adipocyte hypertrophy, increased collagen deposition in VAT, increase COL6 $\alpha$ 3 expression and promote changes in macrophage polarization, affect their accumulation, structural stability of the extracellular matrix and the development of inflammation process.

**Key words:** obesity; early years; collagen; inflammation; macrophages; adipose tissue

## 10. LITERATURA

1. Datta R, Podolsky MJ, Atabai K. Fat fibrosis: friend or foe? *JCI Insight*. 2018 Oct 4 ;3(19):e122289.
2. Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM. Prevalence of Childhood and Adult Obesity in the United States, 2011–2012. *JAMA*. 2014 Feb 26;311(8):814.
3. Hammond RA, Levine R. The economic impact of obesity in the United States. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2010 Aug 30;3:285–95.
4. Skinner AC, Perrin EM, Skelton JA. Prevalence of obesity and severe obesity in US children, 1999–2014. *Obesity*. 2016 May 1;24(5):1116–23.
5. Haugen F, Dreven CA. The interplay between nutrients and the adipose tissue: Plenary Lecture. *Proc Nutr Soc*. 2007 May;66(2):171–82.
6. Miller JM, Kaylor MB, Johannsson M, Bay C, Churilla JR. Prevalence of metabolic syndrome and individual criterion in US adolescents: 2001–2010 National Health and Nutrition Examination Survey. *Metab Syndr Relat Disord*. 2014 Dec 1;12(10):527–32.
7. Noncommunicable diseases: Childhood overweight and obesity. Dostupno na adresi: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/noncommunicable-diseases-childhood-overweight-and-obesity>. Datum pristupa: 03.02.2022.
8. Ward ZJ, Long MW, Resch SC, Giles CM, Cradock AL, Gortmaker SL. Simulation of Growth Trajectories of Childhood Obesity into Adulthood. *N Engl J Med*. 2017 Nov 30;377(22):2145–53.
9. Agirbasli M, Tanrikulu AM, Berenson GS. Metabolic Syndrome: Bridging the Gap from Childhood to Adulthood. *Cardiovasc Ther*. 2016 Feb 1;34(1):30–6.
10. Poissonnet CM, Burdi AR, Bookstein FL. Growth and development of human adipose tissue during early gestation. *Early Hum Dev*. 1983 Mar;8(1):1–11.
11. Laharrague P, Casteilla L. The Emergence of Adipocytes. *Endocr Dev*. 2010 Mar;19:21–30.
12. Butte NF, Hopkinson JM, Wong WW, Smith EO bria., Ellis KJ. Body Composition during the First 2 Years of Life: An Updated Reference. *Pediatr Res* 2000 475.

- 2000;47(5):578–85.
13. Chusyd DE, Wang D, Huffman DM, Nagy TR, Even PC, Nagy TR. Relationships between Rodent white Adipose Fat Pads and Human white Adipose Fat Depots. *Front Nutr*. 2016 Apr 19;3:10.
  14. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2006 610. 2006 Sep 22;6(10):772–83.
  15. Rutkowski JM, Stern JH, Scherer PE. Beyond the cell: The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol*. 2015;208(5):501.
  16. Staiano AE, Katzmarzyk PT. Ethnic and sex differences in body fat and visceral and subcutaneous adiposity in children and adolescents. *Int J Obes (Lond)*. 2012;36(10):1261.
  17. Palmer BF, Clegg DJ. The sexual dimorphism of obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 2015 Feb;0:113.
  18. Freedland ES. Role of a critical visceral adipose tissue threshold (CVATT) in metabolic syndrome: implications for controlling dietary carbohydrates: a review. *Nutr Metab (Lond)*. 2004 Nov 5;1:12.
  19. Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, et al. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int J Mol Sci*. 2019 May 1;20(9).
  20. Jung CH, Lee WJ, Song KH. Metabolically healthy obesity: a friend or foe? *Korean J Intern Med*. 2017 Jul 1;32(4):611.
  21. Kwok KHM, Lam KSL, Xu A. Heterogeneity of white adipose tissue : molecular basis and clinical implications. *Exp & Mol Med*. 2016 Marc 4;48(3):e215-12.
  22. Ebbert JO, Jensen MD. Fat Depots, Free Fatty Acids, and Dyslipidemia. *Nutrients*. 2013 Feb 7;5(2):498.
  23. Shuster A, Patlas M, Pinthus JH, Mourtzakis M. The clinical importance of visceral adiposity: a critical review of methods for visceral adipose tissue analysis. *Br J Radiol*. 2012 Jan;85(1009):1.
  24. Choe EK, Kim D, Kim HJ, Park KJ. Association of visceral obesity and early colorectal

- neoplasia. *World J Gastroenterol*. 2013;19(45):8349.
25. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *N Engl J Med*. 2009 Apr 9;360(15):1509.
  26. Lee MW, Lee M, Oh KJ. Adipose Tissue-Derived Signatures for Obesity and Type 2 Diabetes: Adipokines, Adipokines and MicroRNAs. *J Clin Med*. 2019 Jun 14;8(6):854.
  27. Srivastava S, Veech RL. Brown and Brite: The Fat Soldiers in the Anti-obesity Fight. *Front Physiol*. 2019 Jan 30;10:38.
  28. Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige Adipocytes are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell*. 2012 Jul 20;150(2):366.
  29. Barbatelli G, Murano I, Madsen L, Hao Q, Jimenez M, Kristiansen K, et al. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2010 Jun;298(6):1244–53.
  30. Shao M, Wang QA, Song A, Vishvanath L, Busbuso NC, Scherer PE, et al. Cellular Origins of Beige Fat Cells Revisited. *Diabetes*. 2019 Oct 1;68(10):1874.
  31. Altshuler-Keylin S, Shinoda K, Hasegawa Y, Ikeda K, Hong H, Kang Q, et al. Beige adipocyte maintenance is regulated by autophagy-induced mitochondrial clearance. *Cell Metab*. 2016 Sep 13;24(3):402.
  32. Xue R, Lynes MD, Dreyfuss JM, Shamsi F, Schulz TJ, Zhang H, et al. Clonal analyses and gene profiling identify genetic biomarkers of human brown and white preadipocyte thermogenic potential. *Nat Med*. 2015 Jul 9;21(7):760.
  33. Ruiz-Ojeda FJ, Méndez-Gutiérrez A, Aguilera CM, Plaza-Díaz J. Extracellular matrix remodeling of adipose tissue in obesity and metabolic diseases. *Int J Mol Sci*. 2019 Oct 2;20(19):4888.
  34. Martínez-Santibañez G, Nien-Kai Lumeng C. Macrophages and the Regulation of Adipose Tissue Remodeling. *Annu Rev Nutr*. 2014 Jul; 1734(1):57–76.
  35. Schoettl T, Fischer IP, Ussar S. Heterogeneity of adipose tissue in development and

- metabolic function. *J Exp Biol.* 2018 Mar 7;221(Pt Suppl 1):jeb162958.
36. Nakajima I, Yamaguchi T, Ozutsumi K, Aso H. Adipose tissue extracellular matrix: Newly organized by adipocytes during differentiation. *Differentiation.* 1998 Aug;63(4):193-200.
  37. Mori S, Kiuchi S, Ouchi A, Hase T, Murase T. Characteristic expression of extracellular matrix in subcutaneous adipose tissue development and adipogenesis; Comparison with visceral adipose tissue. *Int J Biol Sci.* 2014;10(8):825–33.
  38. Poltavets V, Kochetkova M, Pitson SM, Samuel MS. The role of the extracellular matrix and its molecular and cellular regulators in cancer cell plasticity. *Front Oncol.* 2018 Oct 9;8:431.
  39. Lin D, Chun TH, Kang L. Adipose extracellular matrix remodelling in obesity and insulin resistance. *Biochem Pharmacol.* 2016 Nov 1;119:8-16.
  40. Sun K, Tordjman J, Clément K, Scherer PE. Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab.* 2013 Oct 1;18(4):470-7.
  41. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest.* 2011 Jun 1;121(6):2094–101.
  42. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Hosoya Y, Yamashita H, Fujita H, et al. Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes.* 2007 Jun;56(6):1517-26.
  43. Gealekman O, Guseva N, Hartigan C, Apotheker S, Gorgoglione M, Gurav K, et al. Depot-specific differences and insufficient subcutaneous adipose tissue angiogenesis in human obesity. *Circulation.* 2011 Jan 18;123(2):186-94.
  44. Spencer M, Unal R, Zhu B, Rasouli N, McGehee RE, Peterson CA, et al. Adipose tissue extracellular matrix and vascular abnormalities in obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Dec;96(12):E1990-8.
  45. Divoux A, Tordjman J, Lacasa D, Veyrie N, Hugol D, Aissat A, et al. Fibrosis in human adipose tissue: Composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes.* 2010 Nov;59(11):2817-25.
  46. Raghov R. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and

- fibrosis. *FASEB J.* 1994 Aug;8(11):823–31.
47. Chun T-H. Peri-adipocyte ECM remodeling in obesity and adipose tissue fibrosis. *Adipocyte.* 2012 Apr 1;1(2):89–95.
  48. Han J, Lee JE, Jin J, Lim JS, Oh N, Kim K, et al. The spatiotemporal development of adipose tissue. *Development.* 2011 Nov;138(22):5027-37.
  49. Mariman ECM, Wang P. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell Mol Life Sci.* 2010 Apr;67(8):1277-92.
  50. Liu X, Xu Q, Liu W, Yao G, Zhao Y, Xu F, et al. Enhanced migration of murine fibroblast-like 3T3-L1 preadipocytes on type I collagen-coated dish is reversed by silibinin treatment. *Mol Cell Biochem.* 2018 Apr;441(1-2):35-62.
  51. Buechler C, Krautbauer S, Eisinger K. Adipose tissue fibrosis. *World J Diabetes.* 2015 May 15;6(4):548-53.
  52. Pasarica M, Gowronska-Kozak B, Burk D, Remedios I, Hymel D, Gimble J, et al. Adipose tissue collagen VI in obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Dec;94(12):5155–62.
  53. Williams AS, Kang L, Wasserman DH. The extracellular matrix and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab.* 2015 Jul;26(7):357-66.
  54. Huber J, Löffler M, Bilban M, Reimers M, Kadl A, Todoric J, et al. Prevention of high-fat diet-induced adipose tissue remodeling in obese diabetic mice by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Int J Obes.* 2007 Jun;31(6):1004-13.
  55. Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(2):461S-465S.
  56. Hammarstedt A, Graham TE, Kahn BB. Adipose tissue dysregulation and reduced insulin sensitivity in non-obese individuals with enlarged abdominal adipose cells. *Diabetol Metab Syndr.* 2012 Sep 19;4(1):42.
  57. Isakson P, Hammarstedt A, Gustafson B, Smith U. Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: Role of Wnt, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and inflammation. *Diabetes.* 2009 Jul;58(7):1550-7.
  58. Scherer PE, Bickel PE, Kotler M, Lodish HF. Cloning of cell-specific secreted and

- surface proteins by subtractive antibody • screening. *Nat Biotechnol.* 1998 Jun;16(6):581-6.
59. Khan T, Muise ES, Iyengar P, Wang Z V., Chandalia M, Abate N, et al. Metabolic Dysregulation and Adipose Tissue Fibrosis: Role of Collagen VI. *Mol Cell Biol.* 2009 Mar 15;29(6):1575–91.
60. Lundgren M, Svensson M, Lindmark S, Renström F, Ruge T, Eriksson JW. Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and “hyperleptinaemia.” *Diabetologia.* 2007 Mar 10;50(3):625–33.
61. Pasarica M, Sereda OR, Redman LM, Albarado DC, Hymel DT, Roan LE, et al. Reduced Adipose Tissue Oxygenation in Human Obesity Evidence for Rarefaction, Macrophage Chemotaxis, and Inflammation Without an Angiogenic Response. *Diabetes.* 2009 Mar 1;58(3):718–25.
62. Dankel SN, Grytten E, Bjune JI, Nielsen HJ, Dietrich A, Blüher M, et al. COL6A3 expression in adipose tissue cells is associated with levels of the homeobox transcription factor PRRX1. *Sci Reports* 2020 101. 2020 Nov 19;10(1):1–11.
63. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005 Dec;5(12):953-64.
64. Wynn TA, Barron L. Macrophages: Master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis.* 2010 Aug;30(3):245-57.
65. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. *Annu Rev Immunol.* 2009 Apr;27(1):451–83.
66. Rock KL, Kono H. The Inflammatory Response to Cell Death. *Annu Rev Pathol.* 2008;3:99-126.
67. Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol.* 2010 Apr;22(2):231-7.
68. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003 Dec;112(12):1796–808.
69. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death



- defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res.* 2005 Nov;46(11):2347–55.
70. Spencer M, Yao-Borengasser A, Unal R, Rasouli N, Gurley CM, Zhu B, et al. Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *Am J Physiol Metab.* 2010 Dec;299(6):E1016–27.
  71. Dalmas E, Clément K, Guerre-Millo M. Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. *Trends Immunol.* 2011 Jul;32(7):307-14.
  72. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007 Jan;117(1):175-84.
  73. Nguyen MTA, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, et al. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem.* 2007 Nov 30;282(48):35279-92.
  74. Aron-Wisnewsky J, Tordjman J, Poitou C, Darakhshan F, Hugol D, Basdevant A, et al. Human adipose tissue macrophages: M1 and M2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Nov;94(11):4619-23.
  75. Canello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes.* 2005 Aug;54(8):2277-86.
  76. Clement K, Viguerie N, Poitou C, Carette C, Pelloux V, Curat CA, et al. Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB J.* 2004 Nov;18(14):1657-69.
  77. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* 2013 Apr 25;496(7446):445-55.
  78. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Mar 1;92(3):1023–33.

79. Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) Induces Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes and Is, Like IL-8 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Overexpressed in Human Fat Cells from Insulin-resistant Subjects. *J Biol Chem*. 2003 Nov 14;278(46):45777–84.
80. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the Release of Adipokines by Adipose Tissue, Adipose Tissue Matrix, and Adipocytes from Visceral and Subcutaneous Abdominal Adipose Tissues of Obese Humans. *Endocrinology*. 2004 May 1;145(5):2273–82.
81. Ahima RS, Flier JS. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Trends Endocrinol Metab*. 2000 Oct 1;11(8):327–32.
82. Feijóo-Bandín S, Aragón-Herrera A, Moraña-Fernández S, Anido-Varela L, Tarazón E, Roselló-Lletí E, et al. Adipokines and Inflammation: Focus on Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 2;21(20):1–34.
83. Cawthorn WP, Sethi JK. TNF- $\alpha$  and adipocyte biology. *FEBS Lett*. 2008 Jan 9;582(1):117–31.
84. Piya MK, McTernan PG, Kumar S. Adipokine inflammation and insulin resistance: the role of glucose, lipids and endotoxin. *J Endocrinol*. 2013 Jan 1;216(1):T1–15.
85. Hivert MF, Sullivan LM, Fox CS, Nathan DM, D'Agostino RB, Wilson PWF, et al. Associations of Adiponectin, Resistin, and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  with Insulin Resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(8):3165.
86. Stanley TL, Zanni M V., Johnsen S, Rasheed S, Makimura H, Lee H, et al. TNF- $\alpha$  Antagonism with Etanercept Decreases Glucose and Increases the Proportion of High Molecular Weight Adiponectin in Obese Subjects with Features of the Metabolic Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(1):E146.
87. Ghoshal K, Bhattacharyya M. Adiponectin: Probe of the molecular paradigm associating diabetes and obesity. *World J Diabetes*. 2015;6(1):151.
88. Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ, et al. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: Evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia*. 2003 Apr 10;46(4):459–69.
89. Samaras K, Botelho NK, Chisholm DJ, Lord R V. Subcutaneous and Visceral Adipose

- Tissue Gene Expression of Serum Adipokines That Predict Type 2 Diabetes. *Obesity*. 2010 May 1;18(5):884–9.
90. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 2002 87. 2002 Jun 17;8(7):731–7.
  91. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nat* 2003 4236941. 2003 Jun 12;423(6941):762–9.
  92. Halberg N, Schraw TD, Wang Z V., Kim JY, Yi J, Hamilton MP, et al. Systemic Fate of the Adipocyte-Derived Factor Adiponectin. *Diabetes*. 2009 Sep;58(9):1961.
  93. Yu JG, Javorschi S, Hevener AL, Kruszynska YT, Norman RA, Sinha M, et al. The Effect of Thiazolidinediones on Plasma Adiponectin Levels in Normal, Obese, and Type 2 Diabetic Subjects. *Diabetes*. 2002 Oct 1;51(10):2968–74.
  94. Antoniadou C, Antonopoulos AS, Tousoulis D, Stefanadis C. Adiponectin: from obesity to cardiovascular disease. *Obes Rev*. 2009 May 1;10(3):269–79.
  95. De Souza Batista CM, Yang RZ, Lee MJ, Glynn NM, Yu DZ, Pray J, et al. Omentin Plasma Levels and Gene Expression Are Decreased in Obesity. *Diabetes*. 2007 Jun 1;56(6):1655–61.
  96. Miroshnikova V V., Polyakova EA, Pobozeva IA, Panteleeva AA, Razgildina ND, Kolodina DA, et al. FABP4 and omentin-1 gene expression in epicardial adipose tissue from coronary artery disease patients. *Genet Mol Biol*. 2021;44(4).
  97. Wang J, Gao Y, Lin F, Han K, Wang X. Omentin-1 attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced U937 macrophages activation by inhibiting the TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling. *Arch Biochem Biophys*. 2020 Jan 15;679:108187.
  98. Sundström C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer*. 1976;17(5):565–77.
  99. Chait A, den Hartigh LJ. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med*. 2020 Feb 25;7:22.

100. Ray A. Adipokine leptin in obesity-related pathology of breast cancer. *J Biosci.* 2012 Jun 3;37(2):289–94.
101. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, et al. Evidence That the Diabetes Gene Encodes the Leptin Receptor: Identification of a Mutation in the Leptin Receptor Gene in db/db Mice. *Cell.* 1996 Feb 9;84(3):491–5.
102. Kralisch S, Klein J, Lossner U, Bluher M, Paschke R, Stumvoll M, et al. Interleukin-6 is a negative regulator of visfatin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2005 Oct;289(4 52-4):586–90.
103. Sethi JK, Vidal-Puig A. Visfatin: the missing link between intra-abdominal obesity and diabetes? *Trends Mol Med.* 2005;11(8):344.
104. Wueest S, Konrad D. The controversial role of IL-6 in adipose tissue on obesity-induced dysregulation of glucose metabolism. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2020 Sep 1;319(3):E607–13.
105. Zhang W, Mottillo EP, Zhao J, Gartung A, VanHecke GC, Lee JF, et al. Adipocyte Lipolysis-stimulated Interleukin-6 Production Requires Sphingosine Kinase 1 Activity. *J Biol Chem.* 2014 Nov 14;289(46):32178.
106. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and Subcutaneous Adipose Tissues of Obese Subjects Release Interleukin-6: Depot Difference and Regulation by Glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Mar 1;83(3):847–50.
107. Matsubara T, Mita A, Minami K, Hosooka T, Kitazawa S, Takahashi K, et al. PGRN is a key adipokine mediating high fat diet-induced insulin resistance and obesity through IL-6 in adipose tissue. *Cell Metab.* 2012 Jan 4;15(1):38–50.
108. Popko K, Gorska E, Stelmaszczyk-Emmel A, Plywaczewski R, Stoklosa A, Gorecka D, et al. Proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$  and the development of inflammation in obese subjects. *Eur J Med Res.* 2010 Nov 4;15(Suppl 2):120.
109. Remick DG. Interleukin-8. *Crit Care Med.* 2005 Dec;33 (12 Suppl):S466-7.
110. Yue TL, Wang X, Sung CP, Olson B, McKenna PJ, Gu JL, et al. Interleukin-8. A mitogen and chemoattractant for vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994 Jul;75(1):1–7.
111. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA, et al.

- MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature*. 1999 Apr 22;398(6729):718-23.
112. Zimmermann HW, Seidler S, Gassler N, Nattermann J, Luedde T, Trautwein C, et al. Interleukin-8 Is Activated in Patients with Chronic Liver Diseases and Associated with Hepatic Macrophage Accumulation in Human Liver Fibrosis. *PLoS One*. 2011;6(6):e21381.
  113. Xu L, Kitade H, Ni Y, Ota T. Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Obesity-Associated Insulin Resistance and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Biomolecules*. 2015 Jul 21;5(3):1563.
  114. Kobashi C, Asamizu S, Ishiki M, Iwata M, Usui I, Yamazaki K, et al. Inhibitory effect of IL-8 on insulin action in human adipocytes via MAP kinase pathway. *J Inflamm (Lond)*. 2009 Aug 27;6:25.
  115. Joshi-Barve S, Barve SS, Butt W, Klein J, McClain CJ. Inhibition of Proteasome Function Leads to NF- $\kappa$ B-Independent IL-8 Expression in Human Hepatocytes. *Hepatology*. 2003 Nov;38(5):1178–87.
  116. Zagotta I, Dimova EY, Debatin KM, Wabitsch M, Kietzmann T, Fischer-Posovszky P. Obesity and inflammation: Reduced cytokine expression due to resveratrol in a human in-vitro model of inflamed adipose tissue. *Front Pharmacol*. 2015 Apr 14;6:79.
  117. Bruun JM, Pedersen SB, Richelsen B. Regulation of Interleukin 8 Production and Gene Expression in Human Adipose Tissue in Vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Mar 1;86(3):1267–73.
  118. Moreau M, Brocheriou I, Petit L, Ninio E, Chapman MJ, Rouis M. Interleukin-8 Mediates Downregulation of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Expression in Cholesterol-Loaded Human Macrophages. *Circulation*. 1999 Jan 26;99(3):420–6.
  119. Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA, Zabel BA, Butcher EC, Parlee SD, et al. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J Biol Chem*. 2007 Sep 21;282(38):28175–88.
  120. Karczewska-Kupczewska M, Nikołajuk A, Stefanowicz M, Matulewicz N, Kowalska I, Strączkowski M. Serum and adipose tissue chemerin is differentially related to insulin sensitivity. *Endocr Connect*. 2020 May;9(5):360-369.

121. Sell H, Laurencikiene J, Taube A, Eckardt K, Cramer A, Horrigs A, et al. Chemerin Is a Novel Adipocyte-Derived Factor Inducing Insulin Resistance in Primary Human Skeletal Muscle Cells. *Diabetes*. 2009 Dec;58(12):2731.
122. Morrison S, McGee SL. 3T3-L1 adipocytes display phenotypic characteristics of multiple adipocyte lineages. *Adipocyte*. 2015 Mar;4(4):295.
123. Bozaoglu K, Segal D, Shields KA, Cummings N, Curran JE, Comuzzie AG, et al. Chemerin Is Associated with Metabolic Syndrome Phenotypes in a Mexican-American Population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Aug;94(8):3085-8.
124. Parlee SD, Ernst MC, Muruganandan S, Sinal CJ, Goralski KB. Serum Chemerin Levels Vary with Time of Day and Are Modified by Obesity and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . *Endocrinology*. 2010 Jun 1;151(6):2590–602.
125. Hart R, Greaves DR. Chemerin Contributes to Inflammation by Promoting Macrophage Adhesion to VCAM-1 and Fibronectin through Clustering of VLA-4 and VLA-5. *J Immunol*. 2010 Sep 15;185(6):3728–39.
126. Cash JL, Hart R, Russ A, Dixon JPC, Colledge WH, Doran J, et al. Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23. *J Exp Med*. 2008 Apr 14;205(4):767.
127. Setia MS. Methodology series module 3: Cross-sectional studies. *Indian J Dermatol*. 2016 May-Jun;61(3):261-4.
128. Burt Solorzano CM, McCartney CR. Obesity and the pubertal transition in girls and boys. *Reproduction*. 2010 Sep;140(3):399.
129. Obesity and overweight. Dostupno na adresi: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Datum pristupa: 20.01.2022.
130. Brix N, Ernst A, Lauridsen LLB, Parner ET, Arah OA, Olsen J, et al. Childhood overweight and obesity and timing of puberty in boys and girls: Cohort and sibling-matched analyses. *Int J Epidemiol*. 2021;49(3).
131. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr 1;162(1):156–9.
132. Wei Y, Li L, Wang D, Zhang CY, Zen K. Importin 8 Regulates the Transport of Mature

- MicroRNAs into the Cell Nucleus \*. *J Biol Chem.* 2014 Apr;289(15):10270–5.
133. Stainsfile - Original variant of Masson's Trichrome. Dostupno na adresi: [http://stainsfile.info/stain/conektv/masson\\_o2.htm](http://stainsfile.info/stain/conektv/masson_o2.htm). Datum pristupa: 24.01.2022.
  134. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012 Jun 28;9(7):676–82.
  135. Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC, Eliceiri KW. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol Reprod Dev.* 2015 Jul-Aug;82(7–8):518–29.
  136. Galarraga M, Campión J, Munõz-Barrutia A, Boqué N, Moreno H, Martínez JA, et al. Adiposoft: Automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. *J Lipid Res.* 2012 Dec;53(12):2791-6.
  137. van Steenberghe M, Schubert T, Guiot Y, Bouzin C, Bollen X, Gianello P. Enhanced vascular biocompatibility of decellularized xeno-/allogeneic matrices in a rodent model. *Cell Tissue Bank.* 2017 Jun 25;18(2):249–62.
  138. Fischer IP, Irmeler M, Meyer CW, Sachs SJ, Neff F, Hrabe De Angelis M, et al. A history of obesity leaves an inflammatory fingerprint in liver and adipose tissue. *Int J Obes (Lond).* 2018 Mar 1;42(3):507.
  139. Wang H, Peng DQ. New insights into the mechanism of low high-density lipoprotein cholesterol in obesity. *Lipids Health Dis.* 2011 Oct 12;10(1):1–10.
  140. Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, et al. Obesity and cardiovascular disease: Pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 May 1;26(5):968–76.
  141. De Grooth GJ, Klerkx AHM, Stroes ESG, Stalenhoef AFH, Kastelein JJP, Kuivenhoven JA. A review of CETP and its relation to atherosclerosis. *J Lipid Res.* 2004 Nov 1;45(11):1967–74.
  142. Linsel-Nitschke P, Götz A, Erdmann J, Braenne I, Braund P, Hengstenberg C, et al. Lifelong Reduction of LDL-Cholesterol Related to a Common Variant in the LDL-Receptor Gene Decreases the Risk of Coronary Artery Disease—A Mendelian Randomisation Study. *PLoS One.* 2008 Aug 20;3(8).

143. Alligier M, Gabert L, Meugnier E, Lambert-Porcheron S, Chansemaume E, Pilleul F, et al. Visceral Fat Accumulation During Lipid Overfeeding Is Related to Subcutaneous Adipose Tissue Characteristics in Healthy Men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Feb 1;98(2):802–10.
144. Klop B, Elte JWF, Cabezas MC. Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. *Nutrients.* 2013 Apr 12;5(4):1218.
145. Kennedy DJ, Kuchibhotla S, Westfall KM, Silverstein RL, Morton RE, Febbraio M. A CD36-dependent pathway enhances macrophage and adipose tissue inflammation and impairs insulin signalling. *Cardiovasc Res.* 2011 Feb 15;89(3):604.
146. Cali' AMG, Bonadonna RC, Trombetta M, Weiss R, Caprio S. Metabolic Abnormalities Underlying the Different Prediabetic Phenotypes in Obese Adolescents. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(5):1767.
147. Quadros TMB, Gordia AP, Silva RCR, Silva LR. Predictive capacity of anthropometric indicators for dyslipidemia screening in children and adolescents. *J Pediatr (Rio J).* 2015 Sep 1;91(5):455–63.
148. Reinehr T, De Sousa G, Roth CL, Andler W. Androgens before and after Weight Loss in Obese Children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Oct 1;90(10):5588–95.
149. Saenger P, DiMartino-Nardi J. Premature adrenarche. *J Endocrinol Invest.* 2001 Oct;24(9):724–33.
150. Niskanen L, Laaksonen DE, Punnonen K, Mustajoki P, Kaukua J, Rissanen A. Changes in sex hormone-binding globulin and testosterone during weight loss and weight maintenance in abdominally obese men with the metabolic syndrome. *Diabetes, Obes Metab.* 2004 May 1;6(3):208–15.
151. Morales A, Wasserfall C, Brusko T, Carter C, Schatz D, Silverstein J, et al. Adiponectin and Leptin Concentrations May Aid in Discriminating Disease Forms in Children and Adolescents With Type 1 and Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2004 Aug 1;27(8):2010–4.
152. Böttner A, Kratzsch J, Müller G, Kapellen TM, Blüher S, Keller E, et al. Gender Differences of Adiponectin Levels Develop during the Progression of Puberty and Are Related to Serum Androgen Levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Aug 1;89(8):4053–



- 61.
153. Galler A, Gelbrich G, Kratzsch J, Noack N, Kapellen T, Kiess W. Elevated serum levels of adiponectin in children, adolescents and young adults with type 1 diabetes and the impact of age, gender, body mass index and metabolic control: a longitudinal study. *Eur J Endocrinol.* 2007 Oct 1;157(4):481–9.
  154. Tsou PL, Jiang Y Der, Chang CC, Wei JN, Sung FC, Lin CC, et al. Sex-Related Differences Between Adiponectin and Insulin Resistance in Schoolchildren. *Diabetes Care.* 2004 Feb;27(2):308–13.
  155. Woo JG, Dolan LM, Daniels SR, Goodman E, Martin LJ. Adolescent Sex Differences in Adiponectin Are Conditional on Pubertal Development and Adiposity. *Obes Res.* 2005 Dec;13(12):2095–101.
  156. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, et al. Adipocyte-Derived Plasma Protein, Adiponectin, Suppresses Lipid Accumulation and Class A Scavenger Receptor Expression in Human Monocyte-Derived Macrophages. *Circulation.* 2001 Feb 1;103(8):1057–63.
  157. Luo Y, Liu M. Adiponectin: a versatile player of innate immunity. *J Mol Cell Biol.* 2016 Apr 1;8(2):120–8.
  158. Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood.* 2000 Sep;96(5):1723–32.
  159. Ohashi K, Parker JL, Ouchi N, Higuchi A, Vita JA, Gokce N, et al. Adiponectin Promotes Macrophage Polarization toward an Anti-inflammatory Phenotype. *J Biol Chem.* 2010 Feb 26;285(9):6153.
  160. Hui X, Gu P, Zhang J, Nie T, Pan Y, Wu D, et al. Adiponectin Enhances Cold-Induced Browning of Subcutaneous Adipose Tissue via Promoting M2 Macrophage Proliferation. *Cell Metab.* 2015 Aug 4;22(2):279–90.
  161. Tan BK, Adya R, Farhatullah S, Lewandowski KC, O’Hare P, Lehnert H, et al. Omentin-1, a Novel Adipokine, Is Decreased in Overweight Insulin-Resistant Women With Polycystic Ovary Syndrome Ex Vivo and In Vivo Regulation of Omentin-1 by Insulin

- and Glucose. *Diabetes*. 2008 Apr 1;57(4):801–8.
162. Yang RZ, Lee MJ, Hu H, Pray J, Wu H Bin, Hansen BC, et al. Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: Possible role in modulating insulin action. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2006 Jun;290(6):E1253–61.
  163. El-Mesallamy HO, El-Derany MO, Hamdy NM. Serum omentin-1 and chemerin levels are interrelated in patients with Type 2 diabetes mellitus with or without ischaemic heart disease. *Diabet Med*. 2011 Oct 1;28(10):1194–200.
  164. Sawicka K, Michalska-Jakubus M, Potembska E, Kowal M, Pietrzak A, Krasowska D. Visfatin and chemerin levels correspond with inflammation and might reflect the bridge between metabolism, inflammation and fibrosis in patients with systemic sclerosis. *Adv Dermatology Allergol Dermatologii i Alergol*. 2019 Oct;36(5):551.
  165. Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med*. 2013 Sep 1;19(10):1338–44.
  166. Poissonnet CM, Burdi AR, Garn SM. The chronology of adipose tissue appearance and distribution in the human fetus. *Early Hum Dev*. 1984 Sep;10(1–2):1–11.
  167. Knittle JL, Timmers K, Ginsberg-Fellner F, Brown RE, Katz DP. The growth of adipose tissue in children and adolescents. Cross-sectional and longitudinal studies of adipose cell number and size. *J Clin Invest*. 1979 Feb;63(2):239–46.
  168. Siegel MJ, Hildebolt CF, Bae KT, Hong C, White NH. Total and Intraabdominal Fat Distribution in Preadolescents and Adolescents: Measurement with MR Imaging. *Radiology*. 2007 Mar 23;242(3):846–56.
  169. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. Vol. 7, *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A.; 2016. p. 1.
  170. Mamo J, Takechi R, Lam V, Von Krüchten R, Lorbeer R, Müller-Peltzer K, et al. Association between Adipose Tissue Depots and Dyslipidemia: The KORA-MRI Population-Based Study. *Nutr* 2022, Vol 14, Page 797. 2022 Feb;14(4):797.
  171. Muir LA, Baker NA, Washabaugh AR, Neeley CK, Flesher CG, DelProposto JB, et al. Adipocyte hypertrophy-hyperplasia balance contributes to weight loss after bariatric surgery. *Adipocyte*. 2017 Apr 3;6(2):134.

172. Orsso CE, Colin-Ramirez E, Field CJ, Madsen KL, Prado CM, Haqq AM. Adipose tissue development and expansion from the womb to adolescence. *Nutrients*. 2020 Sep 8;12(9):2735.
173. Arner E, Westermark PO, Spalding KL, Britton T, Rydén M, Frisén J, et al. Adipocyte turnover: Relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes*. 2010 Jan;59(1):105–9.
174. Tarabra E, Nouws J, Vash-Margita A, Nadzam GS, Goldberg R, van Name M, et al. The omentum of obese girls harbors small adipocytes and browning transcripts. *JCI Insight*. 2020 Mar 26;5(6).
175. Landgraf K, Rockstroh D, Wagner I V., Weise S, Tauscher R, Schwartz JT, et al. Evidence of early alterations in adipose tissue biology and function and its association with obesity-related inflammation and insulin resistance in children. *Diabetes*. 2015 Apr 1;64(4):1249–61.
176. Kazankov K, Barrera F, Møller HJ, Bibby BM, Vilstrup H, George J, et al. Soluble CD163, a macrophage activation marker, is independently associated with fibrosis in patients with chronic viral hepatitis B and C. *Hepatology*. 2014 Aug 1;60(2):521–30.
177. Kazankov K, Møller HJ, Lange A, Birkebæk NH, Holland-Fischer P, Solvig J, et al. The macrophage activation marker sCD163 is associated with changes in NAFLD and metabolic profile during lifestyle intervention in obese children. *Pediatr Obes*. 2015 Jun 1;10(3):226–33.
178. Kotronen A, Juurinen L, Hakkarainen A, Westerbacka J, Cornér A, Bergholm R, et al. Liver Fat Is Increased in Type 2 Diabetic Patients and Underestimated by Serum Alanine Aminotransferase Compared With Equally Obese Nondiabetic Subjects. *Diabetes Care*. 2008 Jan 1;31(1):165–9.
179. Cha YJ, Kim ES, Koo JS. Tumor-associated macrophages and crown-like structures in adipose tissue in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2018 Jul 1;170(1):15–25.
180. Murano I, Barbatelli G, Parisani V, Latini C, Muzzonigro G, Castellucci M, et al. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res*. 2008 Jul;49(7):1562–8.
181. Canello R, Tordjman J, Poitou C, Guilhem G, Bouillot JL, Hugol D, et al. Increased

- Infiltration of Macrophages in Omental Adipose Tissue Is Associated With Marked Hepatic Lesions in Morbid Human Obesity. *Diabetes*. 2006 Jun;55(6):1554–61.
182. Tam CS, Tordjman J, Divoux A, Baur LA, Clément K. Adipose Tissue Remodeling in Children: The Link between Collagen Deposition and Age-Related Adipocyte Growth. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Apr 1;97(4):1320–7.
  183. Zöller N, Schreiner S, Petry L, Hoffmann S, Steinhorst K, Kleemann J, et al. Collagen I Promotes Adipocytogenesis in Adipose-Derived Stem Cells In Vitro. *Cells*. 2019 Apr 1;8(4):302.
  184. Mujkić R, Mujkić DŠ, Ilić I, Rođak E, Šumanovac A, Grgić A, et al. Early Childhood Fat Tissue Changes—Adipocyte Morphometry, Collagen Deposition, and Expression of CD163+ Cells in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue of Male Children. *Int J Environ Res Public Heal* 2021, Vol 18, Page 3627. 2021 Mar 31;18(7):3627.
  185. Hynes RO. Extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*. 2009 Nov 27;326(5957):1216.
  186. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest*. 1995 May;95(5):2111.
  187. Henegar C, Tordjman J, Achard V, Lacasa D, Cremer I, Guerre-Millo M, et al. Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol*. 2008 Jan;9(1):R14.
  188. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, et al. Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Its Impact on Adipocytokine Dysregulation. *Diabetes*. 2007 Apr 1;56(4):901-11.
  189. Wang B, Wood IS, Trayhurn P. Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. *Pflügers Arch* . 2007 Dec;455(3):479-92.
  190. Jonas MI, Kurylowicz A, Bartoszewicz Z, Lisik W, Jonas M, Wierzbicki Z, et al. Interleukins 6 and 15 Levels Are Higher in Subcutaneous Adipose Tissue, but Obesity Is Associated with Their Increased Content in Visceral Fat Depots. *Int J Mol Sci*. 2015 Oct 28;16(10):25817-30.

191. Alvehus M, Burén J, Sjöström M, Goedecke J, Olsson T. The Human Visceral Fat Depot Has a Unique Inflammatory Profile. *Obesity*. 2010 May 1;18(5):879–83.
192. Sam S, Haffner S, Davidson MH, D’Agostino RB, Feinstein S, Kondos G, et al. Relation of Abdominal Fat Depots to Systemic Markers of Inflammation in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2009 May;32(5):932-7.
193. Loh NY, Neville MJ, Marinou K, Hardcastle SA, Fielding BA, Duncan EL, et al. LRP5 Regulates Human Body Fat Distribution by Modulating Adipose Progenitor Biology in a Dose- and Depot-Specific Fashion. *Cell Metab*. 2015 Feb 3;21(2):262-273.
194. Koutsari C, Snozek CLH, Jensen MD. Plasma NEFA Storage in Adipose Tissue in the Postprandial State: Sex and Regional Differences. *Diabetologia*. 2008 Nov;51(11):2041-8.
195. Eder K, Baffy N, Falus A, Fulop AK. The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. *Inflamm Res*. 2009 Nov 19;58(11):727–36.
196. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, et al. Subcutaneous Adipose Tissue Releases Interleukin-6, But Not Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , in Vivo. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Dec 1;82(12):4196–200.
197. Rakotoarivelo V, Lacraz G, Mayhue M, Brown C, Rottembourg D, Fradette J, et al. Inflammatory Cytokine Profiles in Visceral and Subcutaneous Adipose Tissues of Obese Patients Undergoing Bariatric Surgery Reveal Lack of Correlation With Obesity or Diabetes. *EBioMedicine*. 2018 Apr;30:237-247.
198. Lehrke M, Becker A, Greif M, Stark R, Laubender RP, Von Ziegler F, et al. Chemerin is associated with markers of inflammation and components of the metabolic syndrome but does not predict coronary atherosclerosis. *Eur J Endocrinol*. 2009 Aug 1;161(2):339–44.
199. Pfau D, Bachmann A, Lössner U, Kratzsch J, Blüher M, Stumvoll M, et al. Serum Levels of the Adipokine Chemerin in Relation to Renal Function. *Diabetes Care*. 2010 Jan;33(1):171-3.
200. Spoto B, Di Betta E, Mattace-Raso F, Sijbrands E, Vilardi A, Parlongo RM, et al. Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in subcutaneous and visceral fat in severe obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014 Oct 1;24(10):1137–43.

201. Hasan A, Akhter N, Al-Roub A, Thomas R, Kochumon S, Wilson A, et al. TNF- $\alpha$  in Combination with Palmitate Enhances IL-8 Production via The MyD88- Independent TLR4 Signaling Pathway: Potential Relevance to Metabolic Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2019 Aug 23;20(17):4112.

## 11. ŽIVOTOPIS

### Opći podatci:

Ime i prezime: Robert Mujkić

Datum rođenja: 18.06.1985.

Adresa: Frankopanska ulica 130a, 31000 Osijek

Mobitel: 098/268 113

e-mail: robert.mujkic@gmail.com

### Zaposlenje:

15.09.2017. - u tijeku

Asistent

Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo, Katedra za anatomiju, histologiju, embriologiju, patološku anatomiju i patološku histologiju,

Crkvena 21, 31000 Osijek

01.11.2016. - 15.09.2017.

Asistent

Medicinski fakultet Osijek, Katedra za anatomiju i neuroznanost, Huttlerova 4, 31000 Osijek

24.11.2014. - 01.11.2016.

Nastavnik biologije

Osnovna škola Jagode Truhelke, Crkvena 23, 31000 Osijek

05.11.2014. - 21.11.2014.

Nastavnik kemije

Osnovna škola dr. Jure Turića,

Miroslava Kraljevića 15, 53000 Gospić

01.10.2013. - 30.09.2014.

Stručno osposobljavanje za profesora biologije i kemije

Srednja škola Valpovo,

Dr. Franje Tuđmana 2, 31550 Valpovo

2011. - 2013.

Volonter

Zavod za zaštitu bilja i monitoring alergogenih peludi, Fakultet agrobiotehničkih znanosti, Vladimira Preloga 1, 31000 Osijek

2008. - 2010.

Djelatnik službe za korisnike, Odjel za račune i prigovore potrošača  
Hrvatski Telekom, HT, Osijek

### **Školovanje:**

2017. - u tijeku

Poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo  
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Medicinski fakultet Osijek

- Znanstveno područje Biomedicina i zdravstvo
- Znanstveno polje temeljne medicinske znanosti
- Znanstvena grana Anatomija

2004. - 2010.

Diplomirani profesor biologije i kemije (mag. educ. biol. et chem.

Odjel za biologiju, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek

2000. – 2004.

Medicinska škola Osijek,  
Vukovarska ulica 209, 31000 Osijek

1992. - 2000.

Osnovna škola Matije Petra Katančića, 31550 Valpovo

### **Članstva:**

Hrvatsko društvo morfologa



**Stručne aktivnosti:**

08.02. - 22.02.2020.

Erasmus+ Staff Mobility

Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Bonn, Stiftplatz 12, 53111 Bonn  
(Njemačka)

23.10. - 27.10.2017.

Annual Flow Cytometry Course 2017

Zagreb, Dječja bolnica Srebrnjak

28.06. – 08.07.2017.

LabAnim

Položen tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama

- B kategorija

10.02. - 10.02.2017.

"How to report research on laboratory animals" workshop in organisation of CroLASA, Institut  
Ruđer Bošković

Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb (Hrvatska)

07.05. - 11.05.2012.

Fakultet agrobiotehničkih znanosti,

Vladimira Preloga 1, 31000 Osijek

- Weed Management and Control training activity

**Publikacije:****a) Znanstveni i stručni radovi**

Čekić, N.; Grgić, A.; Kokot, A.; Mujkić, R.; Šnajder Mujkić, D.; Bijelić, N.; Sablić, M.  
Influence of Maternal Diet and Intergenerational Change in Diet Type on Ovarian and Adipose  
Tissue Morphology in Female Rat Offspring. *Medicina* 2022, 58, 854.  
<https://doi.org/10.3390/medicina58070854>

Mujkić, R.; Šnajder Mujkić, D.; Ilić, I.; Rođak, E.; Šumanovac, A.; Grgić, A.; Divković, D.; Selthofer-Relatić, K. Early Childhood Fat Tissue Changes—Adipocyte Morphometry, Collagen Deposition, and Expression of CD163+ Cells in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue of Male Children. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2021, 18, 3627. <https://doi.org/10.3390/ijerph18073627>

Ilic, Ivana; Orsolich, Nada; Rodak, Edi; Odeh, Dyana; Lovric, Marko; Mujkic, Robert; Delas Azdajic, Marija; Grgic, Anđela; Tolusic Levak, Maja; Vargek, Martin et al.

The effect of high-fat diet and 13-cis retinoic acid application on lipid profile, glycemic response and oxidative stress in female Lewis rats // *PLoS One*, 15 (2020), 9; 0238600, 25 doi:10.1371/journal.pone.0238600 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Šumanovac, Antun; Selthofer, Robert; Kokić, Tomislav; Mujkić, Robert

Extensor digitorum tendon rupture after anterior ankle arthroscopy // *Medicina Fluminensis*, 56 (2020), 3; 341-344 doi:10.21860/medflum2020\_241514 (domaća recenzija, članak, stručni)

#### **b) Sažetci kongresnih priopćenja:**

Mujkić, Robert; Šnajder Mujkić Darija; Ilić Ivana; Grgić Anđela; Ćosić Anita; Divković Dalibor; Selthofer Relatić Kristina. Omentin and chemerin serum level and adipocyte morphology in male children // *Obesity Facts* 2021, Vol.14, Suppl. 1, May 2021 Malaga: S. Karger AG, 2021. str. 84-84 doi:10.1159/000515911 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Mujkić, Robert; Šnajder Mujkić, Darija; Ilić, Ivana; Grgić, Anđela; Rođak, Edi; Divković, Dalibor; Selthofer-Relatić, Kristina. Early childhood fat tissue changes – future risk for metabolic related diseases: subcutaneous and visceral fat adipose tissue CD163+ cells expression and collagen deposition in young male children // *13th Congress of the Croatian Cardiac Society with international participation under the patronage of the Croatian Academy of Sciences and Arts*

Hrvatska: Medical Publishing, d.o.o., 2021. str. 57-57 doi:10.15836/ccar2021.57 (poster, domaća recenzija, prošireni sažetak, ostalo)

Ilić Ivana; Rođak Edi; Mujkić Robert; Bijelić Nikola; Blažičević Valerija; Kopačin Vjekoslav; Tolušić Levak Maja; Grgić Anđela; Šnajder Mujkić Darija; Belovari Tatjana; Oršolić Nada

Histomorphometric and metabolic liver changes in female Lewis rats depending on the diet and retinoic acid application // *Obesity Reviews - Special Issue: Abstracts from the European and International Congress on Obesity*, Online: Wiley, 2020. str. 223-224 doi:<https://doi.org/10.1111/obr.13118> (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Mujkić Robert; Šnajder Mujkić Darija; Ilić Ivana; Grgić Anđela; Rođak Edi; Divković Dalibor; Selthofer Relatić Kristina

Expression of CD163+ cells and collagen deposition in subcutaneous and visceral adipose tissue of young male children // *Obesity Reviews - Special Issue: Abstracts from the European and International Congress on Obesity*, Online: Wiley, 2020. str. 126-127 doi:[10.1111/obr.13118](https://doi.org/10.1111/obr.13118) (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Ivana Lovrić; Dyana Odeh; Robert Mujkić; Edi Rođak; Anđela Grgić; Martin Vargek; Darija Šnajder; Nada Oršolić.

The effect of high-fat diet and retinoic acid application on oxidative stress, inflammation and insulin resistance in Lewis rats // *Obesity Facts*, Glasgow, UK: Karger, 2019. str. 187-187 doi:[10.1159/000489691](https://doi.org/10.1159/000489691) (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Šnajder, Darija; Mujkić, Robert; Lovrić, Ivana; Grgić Anđela; Perić Kačarević, Željka; Blažičević, Valerija

Determination of collagen content and number of CD68 and CD163 positive cells in white adipose tissue of male rat offspring depending on maternal and postnatal diet // *Obesity Facts*, Glasgow, Škotska, 2019. str. 80-81 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Šnajder, Darija; Mujkić, Robert; Perić Kačarević, Željka; Grgić, Anđela; Blažičević, Valerija; Radić, Radivoje

Effect of maternal and offspring diet on adipose tissue morphology and number of CD68 positive cells in male rat offspring // *Obesity Facts*, Vienna, Austria, 2018. str. 67-67 doi:[10.1159/000489691](https://doi.org/10.1159/000489691) (poster, međunarodna recenzija, sažetak, ostalo)

Švitek, Luka; Fenrich, Matija; Perić Kačarević, Željka; Šnajder, Darija; Mujkić, Robert; Radić, Radivoje

Učinak prehrane s visokim udjelom masti u majki i muških potomaka Sprague - Dawley štakora na masu bubrega // 12. osječki urološki dani, 5. osječki nefrološki dani Osijek, Hrvatska, 2017. (poster, sažetak, znanstveni)