

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij medicine

Aleksandar Katić

PROMJENE POKAZATELJA UPALE U

VISCERALNOM MASNOM TKIVU

SPRAGUE DAWLEY ŠTAKORA

HRANJENIH MASNOM I SLATKOM

HRANOM NAKON TERAPIJE

METFORMINOM I LIRAGLUTIDOM

Diplomski rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij medicine

Aleksandar Katić

**PROMJENE POKAZATELJA UPALE U
VISCERALNOM MASNOM TKIVU
SPRAGUE DAWLEY ŠTAKORA
HRANJENIH MASNOM I SLATKOM
HRANOM NAKON TERAPIJE
METFORMINOM I LIRAGLUTIDOM**

Diplomski rad

Osijek, 2018.

Rad je ostvaren u: Katedra za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera i Klinički zavod za patologiju i sudsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Mentorica rada: prof. dr. sc. Marija Heffer.

Rad ima 29 listova i 9 slika.

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Mariji Heffer na entuzijazmu i strpljenju, savjetima i vođenju, ne samo u izradi diplomskog rada nego i suradnji kroz godine moga studiranja.

Zahvaljujem mag. biol. Miloradu Zjaliću na pomoći oko izrade preparata i mikroskopiranja, na strpljenju i savjetima koji su mi uveliko pomogli.

Zahvaljujem i svojoj obitelji, prijateljima i kolegama na podršci, razumijevanju i vjerovanju u mene tijekom godina studiranja.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA.....	II
1. UVOD.....	1
1.1. Pretilost.....	1
1.2. Masno tkivo.....	1
1.2.1. Građa i funkcija masnog tkiva.....	1
1.2.2. Visceralno masno tkivo	2
1.3. Makrofagi.....	2
1.4. Dijabetes.....	3
1.4.1. Klasifikacija dijabetesa.....	3
1.4.2. Liječenje dijabetesa	3
1.4.3. Metformin.....	4
1.4.4. Liraglutid	5
1.5. Upala kao podloga dijabetesa tipa 2.....	5
2. HIPOTEZA	6
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	7
4. MATERIJALI I METODE.....	8
4.1. Ustroj studije	8
4.2. Materijali	8
4.3. Metode.....	8
4.3.1 Mjerenje veličine masnih kapljica.....	8
4.3.2. Imunohistokemijsko bojanje makrofaga	9
4.4. Statističke metode	10
5. REZULTATI.....	11
5.1. Rezultati mjerenja površine masne kapljice u visceralnom masnom tkivu	11
5.2. Rezultati imunohistokemijskog bojanja na CD68 markere makrofaga	13
5.3. Rezultati imunohistokemijskog bojanja na CD163 markere makrofaga	15
6. RASPRAVA	18
7. ZAKLJUČAK.....	21
8. SAŽETAK	22
9. SUMMARY	23
10. LITERATURA	24
11. ŽIVOTOPIS.....	28

POPIS KRATICA

1f – 1. skupina ženki štakora hranjena standardnom dijetom

1m – 1. skupina mužjaka štakora hranjena standardnom dijetom

2f – 2. skupina ženki štakora hranjena dijetom bogatom mastima i šećerima

2m – 2. skupina mužjaka štakora hranjena dijetom bogatom mastima i šećerima

3f – 3. skupina ženki štakora tretiranih metforminom nakon dijete bogate mastima i šećerima

3m – 3. skupina mužjaka štakora tretiranih metforminom nakon dijete bogate mastima i šećerima

4f – 4. skupina mužjaka štakora tretiranih liraglutidom nakon dijete bogate mastima i šećerima

4m – 4. skupina mužjaka štakora tretiranih liraglutidom nakon dijete bogate mastima i šećerima

ALT – alanin aminotransferaza

AMPK – protein kinaza koju aktivira AMP (engl. *AMP-activated protein kinase*)

AST – aspartat aminotransferaza

BMI – indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)

CD68 – diferencijacijska skupina antigena 68 (od engl. *cluster of differentiation*)

CD163 – diferencijacijska skupina antigena 163 (engl. *cluster of differentiation*)

dH₂O – destilirana voda

GLP-1 – glukagonu sličan peptid 1 (engl. *glucagone like polipeptide*)

GUK – glukoza u krvi

HFHSD – dijeta bogata mastima i ugljikohidratima (engl. *high fat high sugar diet*)

HRZZ – Hrvatska zaklada za znanost

IFN- γ – interferon gama

IL – interleukin

M1 – makrofazi 1

M2 – makrofazi 2

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

Th1 – pomoćnički T-limfociti tipa 1

Th2 – pomoćnički T-limfociti tipa 2

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

1. UVOD

1.1. Pretilost

Pretilost je poremećaj u kojem je povećan udio masti u organizmu koji nastaje kada je unos energije veći nego njezino iskorištavanje. Ona je rizični čimbenik za nastanak bolesti poput dijabetesa tipa 2, određenih tipova malignih bolesti, osteoporoze, kardiovaskularnih bolesti, bolesti bubrega i apneje u spavanju (1). Udio masti u organizmu može se odrediti antropometrijskim mjerenjima debljine kožnog nabora, bioelektričnom vodljivošću, podvodnim vaganjem ili, najzastupljenije u kliničkoj praksi, izračunavanjem indeksa tjelesne mase (engl. *body mass index*, BMI). BMI se računa kao tjelesna masa u kilogramima podijeljena s tjelesnom visinom u metrima na kvadrat. Normalan indeks tjelesne mase iznosi od 20 do 24,9 kg/m², indeks ispod 20 kg/m² smatra se pothranjenošću, indeks od 25 do 29,9 kg/m² smatra prekomjernom tjelesnom težinom, dok Svjetska zdravstvena organizacija definira pretilost kao BMI iznad 30 kg/m². Izračunavanje BMI jednostavna je i brza metoda određivanja pretilosti, ali ona ima i nedostatke. Osobe koje su izrazito visoke ili imaju povećanu mišićnu masu, imaju visok BMI iako nemaju povećan udio masti u organizmu (2). Novije studije pokazuju da je za nastanak bolesti bitno visceralno ili abdominalno masno tkivo. Mjerenje opsega struka dobar je pokazatelj abdominalne pretilosti, a to je opseg struka veći od 102 cm u muškaraca, to jest 88 cm u žena. Još jedan pokazatelj abdominalne pretilosti omjer je opsega struka i bokova, muškarci su pretili ako je omjer veći od 0,9, a žene ako je veći od 0,85 (3, 4). Trenutno rašireni životni stil u kojem prevladava manjak tjelesne aktivnosti te lako dostupna visokokalorijska hrana doveli su do porasta prevalencije pretilosti u svijetu, kao i bolesti za koje je pretilost rizičan čimbenik (5).

1.2. Masno tkivo

1.2.1. Građa i funkcija masnog tkiva

Masno je tkivo vrsta vezivnog tkiva u kojem prevladavaju adipociti. Iznosi 15 – 20 % tjelesne težine muškaraca, odnosno 20 – 25 % tjelesne težine žena. To je najveća zaliha energije u organizmu i koristi se za energiju nakon što je glikogen jetara i mišića iskorišten. Osim zalihe energije služi i za ublažavanje pritiska i udaraca, toplinski je izolator, proizvodi hormone, ispunjava prostor između tkiva i organa te ih učvršćuje. U organizmu je raspoređeno na potkožno (engl. *subcutaneous adipose tissue*, SAT), abdominalno (engl. *visceral adipose tissue*, VAT), masno tkivo u ekstremitetima te retroorbitalno masno tkivo.

Adipociti su okrugle stanice promjera od 50 do 150 μm . Sastoje se od velike kapljice masti koja je ponajviše sastavljena od triglicerida te tanke citoplazme koja u svom najdebljem dijelu sadrži jezgru, mitohondrije, Golgijev kompleks te obiluje hrapavim endoplazmatskim retikulumom. Pod svjetlosnim mikroskopom adipociti izgledaju poput prstena pečatnjaka jer se tijekom histološkog bojenja koristi alkohol i ksilol koji otapaju kapljicu masti, a jezgra je spljoštena i potisnuta na rub te postoji tanki obroč citoplazme. Masno tkivo nepotpuno je podijeljeno u režnjice vezivnim tkivom te je dobro vaskularizirano i inervirano (6, 7).

Adipociti su hormonski aktivni, na njih djeluju drugi hormoni poput hormona rasta, glukokortikoida, prolaktina, hormona štitnjače i inzulina, a sami sintetiziraju hormone leptin, adiponektin i rezistin. Također, simpatikus posredno djeluje na masno tkivo jer adipociti nisu inervirani nego krvne žile oko njih (8).

1.2.2. Visceralno masno tkivo

Visceralno masno tkivo intraabdominalno je masno tkivo, tj. masno tkivo mezenterija te velikog i malog omentuma i čini oko 6 % ukupnog masnog tkiva organizma. Ono je specifično po visokoj aktivnosti lipogeneze i lipolize. Akumulacija visceralnog masnog tkiva dovodi do pojačanog oslobađanja slobodnih masnih kiselina u portalni krvotok. Višak slobodnih masnih kiselina potiče sintezu lipida i glukoneogenezu, kao i inzulinsku rezistenciju, a time dovodi do hiperlipidemije, ateroskleroze i netolerancije na glukozu (9 - 11).

1.3. Makrofagi

Makrofagi su stanice imunskog sustava, fagocitiraju tumorske stanice, bakterije, strane tvari unesene u tijelo, ostatke stanica i matriksa te predočuju antigene. Promjera su od 10 do 30 μm , površina im je naborana, s brojnim izdancima i udubinama, što odgovara pinocitotskoj i fagocitnoj aktivnosti. Imaju razvijen Golgijev kompleks, hrapavi endoplazmatski retikulum i mnogo lizosoma. Prosječni životni vijek im je nekoliko mjeseci, ali mogu preživjeti godinama u tkivu. Nastaju od monocita, agranulocita, koji se nalaze u krvi.

Prilikom upale tkiva monociti i makrofagi reagiraju kemotaksijom na proizvode upale te migriraju u upaljeno tkivo. Monociti iz krvi prolaze dijapedezom kroz endotel krvne žile te se u tkivu diferenciraju u makrofage. Imaju veliku mogućnost fagocitoze, fagocitiraju i do 100 bakterija, ali mogu fagocitirati i veće čestice. Nakon što unesu česticu fagocitozom,

fagocitni mjehurić spaja se s lizosomima koji su ispunjeni proteolitičkim enzimima, lipazama i drugim citoplazmatskim zncima, te se stvara probavni mjehurić (6). Ovisno o podražaju, monociti se diferenciraju u makrofage raznih funkcija, a dva opća oblika diferencijacije su M1 i M2 makrofagi. M1 makrofagi su proinflamatorni makrofagi, potiču imunosti odgovor posredovan pomoćničkim T-limfocitima tipa 1 (engl. *type 1 T helper* - Th1) i tumoricidno djelovanje. Podražaj za M1 diferencijaciju makrofaga je interferon gama (IFN- γ), glavni produkt Th1 stanica. M2 makrofagi imaju regulacijsku ulogu u cijeljenju tkiva i poticanju imunosti odgovora posredovanog pomoćničkim T-limfocitima tipa 2 (engl. *type 1 T helper* – Th2), a podražaji za diferencijaciju M2 makrofaga su brojni, najčešće interleukin-2 (IL-2) koje proizvode Th2 stanice, interleukin-10 (IL-10) i glukokortikoidi. (6, 12, 13)

1.4. Dijabetes

Dijabetes je bolest u kojoj je poremećen metabolizam ugljikohidrata, bjelančevina i lipida. Etiologija i patogeneza različite su, kao i klinička slika te terapija. Očituje se povećanom razinom glukoze u krvi (GUK), simptomima povećane žeđi, povećane gladi te učestalim mokrenjem. Bolest je progresivna te dovodi do makrovaskularnih (koronarna bolest, bolest perifernih arterija i moždani udar) i mikrovaskularnih (retinopatija, neuropatija i nefropatija) komplikacija koje znatno smanjuju kvalitetu života i životni vijek (14).

1.4.1. Klasifikacija dijabetesa

Svjetski prihvaćena klasifikacija dijabetesa klasifikacija je Američke dijabetološke udruge koja dijabetes dijeli na dijabetes tip 1 ili dijabetes ovisan o inzulinu te dijabetes tipa 2 ili dijabetes neovisan o inzulinu. Uzrok je dijabetesa tipa 1 propadanje β stanica Langerhansovih otočića gušterače, stanica koje proizvode inzulin. Razlog nastanka dijabetesa tipa 1 nije posve razjašnjen, ali veliku ulogu ima autoimuna reakcija protiv β stanica Langerhansovih otočića. Dijabetes tipa 2 nastaje zbog rezistencije tkiva na inzulin. Ako se uz inzulinsku rezistenciju javljaju i drugi metabolički poremećaji poput hiperlipidemije, hipertenzije i pretilosti, govorimo o metaboličkom sindromu (14). Vodeći rizični čimbenik za nastanak dijabetesa tipa 2 je pretilost, tj. s njom povezana subklinička sustavna upala koja dovodi do inzulinske rezistencije (15, 16).

1.4.2. Liječenje dijabetesa

Liječenje dijabetesa tipa 1 i 2 razlikuje se. Osnovni ciljevi liječenja dijabetesa jesu kontrola glikemije, sprječavanje komplikacija bolesti i osiguranje što bolje kvalitete života

pacijenta. Bitna je edukacija pacijenta o pravilnoj prehrani te primjerenoj tjelesnoj aktivnosti, samopraćenju i zbrinjavanju bolesti. Dijabetes tipa 1 mora se liječiti inzulinom, dok dijabetes tipa 2 to ne zahtijeva. Ako dijetetske mjere i tjelesna aktivnost ne uspijevaju regulirati GUK u dijabetesu tipa 2, potrebno je uvesti oralne antidijabetske lijekove. Lijekovi smanjuju apetit ili unos i proizvodnju monosaharida u organizmu (14).

Lijekovi za liječenje dijabetesa tipa 2 su derivati sulfonilureje (glipizid, glimepirid, gliburid), glitinidi (repaglinid, nateglinid), bigvanidi (metformin), tiazolidindioni (rosiglitazon, pioglitazon), inhibitori α glukozidaza (akarboza, miglitol), lijekovi na bazi inkretina (liraglutid, eksenatid, sitagliptin) i analog amilina (pramlintid). Ti lijekovi smanjuju osjet gladi, tj. unos energije, ili smanjuju proizvodnju glukoze u organizmu. Mogu se uzimati kao monoterapija, ali češće se kombinira više antidijabetskih lijekova kako bi se postigao zadovoljavajuć GUK i izbjegle nuspojave lijekova. Zbog svoje relativne sigurnosti i dobrog reguliranja GUK-a lijek izbora je metformin. Ako nakon uvođenja metformina GUK i dalje nije zadovoljavajuć, uvodi se dodatan antidijabetski lijek (17).

Druge metode liječenja uključuju protuupalne lijekove, nekoliko bolesti izazvanih upalom poput psorijaze, reumatoidnog artritisa i Crohnove bolesti povezano je s dijabetesom te se razmatra uporaba imunomodulatora koji bi djelovali na zajednički patofiziološki čimbenik tih bolesti (18). Također, provode se i barijatrijske operacije, to jest operacije resekcije želuca koje rezultiraju trajnim gubitkom težine i boljom kontrolom GUK-a, a time i boljom kvalitetom života i preživljenjem, a troškovi liječenja i komplikacije manji su nego kod medikamentozne terapije (19, 20). Istraživanje na štakorima pokazalo je da operacija otklanjanja visceralnog masnog tkiva smanjuje inzulinsku rezistenciju (21, 22).

1.4.3. Metformin

Metformin se ubraja u skupinu bigvanida. Mehanizam djelovanja bigvanida nije u cijelosti razjašnjen, no zna se da oni primarno smanjuju proizvodnju glukoze u jetrima aktivacijom enzima protein-kinaze koju aktivira adenozin monofosfat (AMPK), a mogući mehanizam djelovanja je i smanjenje glukoneogeneze u bubrezima, usporavanje apsorpcije glukoze iz probavnog trakta, izravna stimulacija glikolize u tkivima, povećano odstranjivanje glukoze iz krvi i smanjenje razine glukagona u plazmi. Uveden je u terapiju dijabetesa tipa 2 prije 40 godina i istaknuo se kao najsigurniji lijek, lake primjene i dobre kontrole GUK-a. Poluvijek eliminacije mu je 1,5 do 3 sata, ne veže se za proteine plazme, ne metabolizira se i izlučuje se u aktivnom obliku isključivo bubrezima. Blokira glukoneogenezu u jetrima te time

dovodi do povećanog stvaranja mliječne kiseline u jetrima. Kod bolesnika s bubrežnom insuficijencijom kod kojih se metformin ne može izlučiti iz organizma povećava se rizik od laktacidoze, te se metformin kod njih ne smije primjenjivati. Metformin šteti inzulin, ne povećava tjelesnu težinu niti dovodi do hipoglikemije i to mu je prednost nad drugim lijekovima za liječenje dijabetesa tipa 2 (17). Metformin, za razliku od drugih peroralnih antidijabetika, smanjuje rizik od makrovaskularnih i mikrovaskularnih bolesti (23). Ako monoterapija metforminom nije dovoljna, rabi se u kombinaciji s inzulinskim sekretagogima (meglitinidi, derivati sulfonilureje) ili tiazolidindionima (17).

1.4.4. Liraglutid

Liraglutid je agonist receptora za glukagonu sličan peptid 1, GLP-1 (engl. *glucagon-like polypeptide*), hormona koji se ubraja u skupinu inkretina. Oni potiču sintezu i otpuštanje inzulina, a smanjuju izlučivanje glukagona. Također, inkretini usporavaju pražnjenje želuca i imaju anoreksični učinak te poboljšavaju kontrolu GUK-a i dovode do smanjenja tjelesne težine. Iako potiču otpuštanje inzulina, uzrokuju manje hipoglikemijskih epizoda u usporedbi s drugim oralnim antidijabeticima (24). Liraglutid se primjenjuje subkutanom injekcijama, a zbog farmakokinetičkih svojstava lijeka dovoljna je jedna primjena dnevno, tj. dovoljna za kontrolu GUK-a tijekom 24 sata (25). Siguran je, nuspojave se dobro podnose i smanjuje razinu jetrenih enzima povezanih s oštećenjem jetre alanin aminotransferaze (AST) i aspartat aminotransferaze (ALT) u krvi (26). Liraglutid djeluje i na druge sustave, smanjuje rizik nastanka kardiovaskularnih bolesti (27) i snižava sistolički tlak (28), smanjuje uremiju izazvanu aterosklerozom i upalom bubrega u miševa (29) te dovodi do smanjenja simptoma metaboličkog sindroma (30).

1.5. Upala kao podloga dijabetesa tipa 2

Nove spoznaje o endokrinoj ulozi visceralnog masnog tkiva te o upali u istom tkivu kao podlozi nastanka inzulinske rezistencije, a time i dijabetesa tipa 2, nova su meta istraživanja i nada u borbi protiv te i njoj pridruženih bolesti (15, 16, 18). Monoterapija antidijabeticima rijetko je dovoljna kako bi se održavao primjeren GUK te se koriste kombinacije antidijabetika. Do sada su ispitivana farmakodinamska svojstva tih lijekova na metabolizam ugljikohidrata i lipida u krvi, ali malo je istraženo utječu li na stupanj upale u drugim tkivima. Pretilost, tj. povećan volumen masnog tkiva bitan je rizični čimbenik za razvoj dijabetesa tipa 2 te se možda odgovor krije u samom masnom tkivu.

2. HIPOTEZA

Dijeta bogata mastima i ugljikohidratima dovodi do povećanja masne kapljice visceralnih adipocita.

Antidijabetici metformin i liraglutid djeluju na povećanje masne kapljice adipocita i smanjuju stupanj upale u visceralnim adipocitima.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Izmjeriti veličinu masnih kapljica u visceralnom masnom tkivu te usporediti životinje hranjene standardnom dijetom i dijetom bogatom mastima i šećerima.
2. Izmjeriti veličinu masnih kapljica u visceralnom masnom tkivu te usporediti životinje tretirane metforminom i liraglutidom s kontrolnom skupinom koja je bila na dijeti bogatoj mastima i šećerima, ali nije bila tretirana antidijabeticima.
3. Kvantificirati imunohistokemijsko bojanje na makrofage (markeri upale CD68 i CD163) u visceralnom masnom tkivu i usporediti stupanj upale u ispitivanim skupinama.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Studija je ustrojena kao istraživanje parova (životinje na standardnoj dijeti u usporedbi sa životinjama na dijeti bogatoj mastima i šećerima, i životinjama koje su pored masne i slatke hrane tretirane metforminom i liraglutidom; životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima u usporedbi sa životinjama koje su pored masne i slatke hrane tretirane metforminom i liraglutidom).

4.2. Materijali

Studija obuhvaća arhivski materijal masnog tkiva *Sprague Dawley* štakora (lat. *Rattus norvegicus*) iz HRZZ projekta „Patofiziološke posljedice promjena sastava lipidnih splavi“ pod brojem IP-2014-09-2324, čija je voditeljica prof. dr. sc. Marija Heffer. Odobreno je od strane Etičkog povjerenstva za istraživanje Medicinskog fakulteta Osijek te Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede, a vodi se pod urudžbenim brojem (Klasa:602-04/16-08/15; Broj: 2158-61-07-16-143; dana 16.prosinca 2016.) Tkiva su sakupljena, fiksirana i uklopljena u parafin nakon protokola hranjenja masnom hranom i tretiranja antidijabeticima metforminom i liraglutidom kako je opisano u odobrenju Etičkog povjerenstva. U studiju su uključena tkiva 4 skupine životinja: životinje hranjene standardnom hranom, životinje hranjene masnom i slatkom hranom (HFHSD) od 45. do 64. tjedna života, životinje tretirane metforminom od 51. do 64. tjedna života uz protokol hranjenja masnom i slatkom hranom od 45. do 64. tjedna života, i životinje tretirane liraglutidom od 51. do 64. tjedna života uz protokol hranjenja masnom i slatkom hranom od 45. do 64. tjedna života. U svakoj skupini bilo je 8 ženki i 8 mužjaka.

4.3. Metode

4.3.1 Mjerenje veličine masnih kapljica

Bojanje i kvantifikacija masnih kapljica visceralnog masnog tkiva rađeni su na Katedri za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Visceralno masno tkivo fiksirano je 4 %-tnim paraformaldehidom tijekom 48 sati, dehidrirano u alkoholu te uklopljeno u parafin. Tkiva smo rezali na debljinu od 6 μ m pomoću mikrotoma, nanosili na stakalca i deparafinirali po protokolu: ksilol 2 x 5 min, 100 %-tni etanol 2 x 3 min, 96 %-tni etanol 3 min, 70 %-tni etanol 3 min, 50 %-tni etanol 2 min, destilirana voda (dH₂O) 1 – 2 min. Tkiva su obojena hematoksilinom i eozinom

po sljedećem protokolu: na preparat se nanese Mayerov hematoksilin (Applichem, Maryland Heights, MO, SAD) i ostavi 10 min, zatim se preparat uroni u vodovodnu vodu 1 – 2 min te dH₂O 2 x 2 min. Nakon toga nanosi se 1 % eozin (Sigma, Taufkirchen, Njemačka) koji odstoji 30 – 45 s i ispiri se s 2 x 2 dH₂O. Nakon što se preparati osuše nanese se medij Histomount (National Diagnostics, Nottingham, Velika Britanija) te poklopi pokrovnim stakalcem. Preparati su prikazani mikroskopom Zeiss Axioskop 2 MOT pri povećanju od 200 x i fotografirani Olympus D70 digitalnim fotoaparatom.

Fotografije su kvantificirane u programu ImageJ na sljedeći način: fotografije u boji su pretvorene u fotografije crno-bijelih tonova, čime smo dobili crne tonove na mjestu membrane i citoplazme samih adipocita, dok su bijeli tonovi masne kapljice, čija nas veličina zanima. Odredili smo intenzitet bijele boje te za pojedine vakuole izmjerili broj piksela. U svakom je preparatu nasumično odabrano deset vakuola, a za svaku životinju analizirano je tri preparata (48).

4.3.2. Imunohistokemijsko bojenje makrofaga

Imunohistokemijsko bojenje CD68 i CD163 provedeno je na Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu Kliničke bolnice Osijek. CD68 je membranska bjelančevina i najčešći je marker za identifikaciju makrofaga. CD163 je glikoprotein koji se ubraja u superobitelj *scavenger* receptora bogatih cisteinom i marker je za M2 diferencirane makrofage. Za imunohistokemiju korišten je Ventana BenchMark Ultra sustav s potpuno automatiziranim načinom rada koji imitira ručni način bojenja tkiva rutinski obavljan u imunohistokemiji. Protutijela CD68 i CD163 unesena su u sustav Ventana BenchMark Ultra te je pokrenut protokol preporučan od strane proizvođača protutijela. Svako stakalce dobilo je svoj barkod. Stakalce s parafinskim rezom preparata uloženo je u uređaj te se u njemu obavila automatizirana deparafinizacija pomoću EZ Prep koncentrata (LOT 206236-01, REF 950-102). Protutijela su vizualizirana pomoću Ultra View Universal DAB Detection kita koji se sastoji od sljedećih otopina: UltraView Universal DAB Inhibitor (3 % H₂O₂), UltraView Universal HRP Multimer, UltraView Universal DAB Chromogen (0,2 % DAB), UltraView DAB H₂O₂ (0,4 % H₂O₂) te UltraView Universal DAB Copper (CuSO₄ g/L). Nakon vezivanja protutijela i vizualizacije preparat se automatizirano obojio hematoksilinom, obavilo se ispiranje te je pokriven stakalcem automatskim pokrivačem Dako Sakura (Dako, Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, SAD).

Brojanje CD68 i CD163 pozitivnih stanica obavljeno je pod svjetlosnim mikroskopom Zeiss Axioskop 2 MOT pri povećanju od 200x, gdje su pozitivne stanice bile obojene smeđom bojom te su načinjene fotografije Olympus D70 digitalnim fotoaparatom na Katedri za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

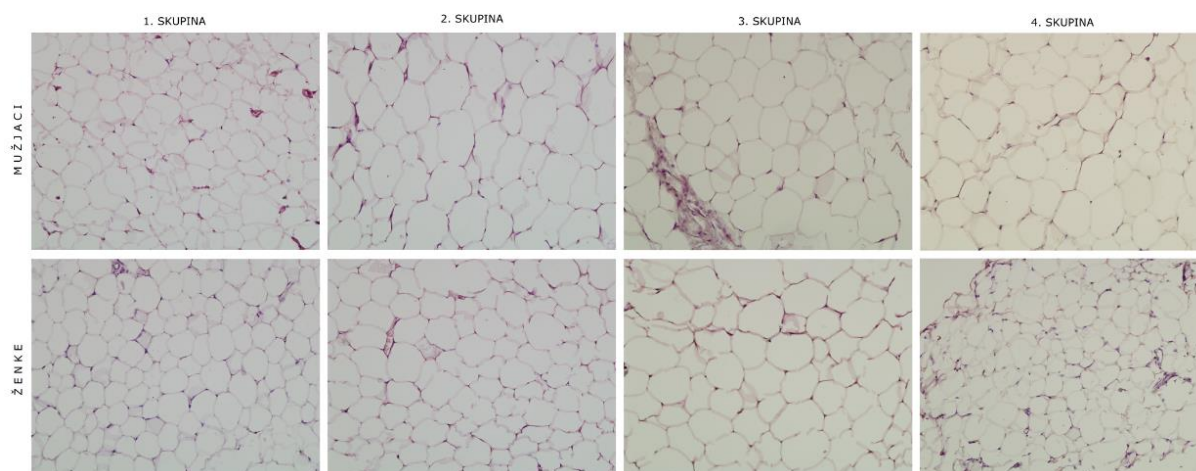
4.4. Statističke metode

Normalna raspodjela numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Numerički podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju raspodjela koje slijede normalnu, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane su Studentovim t-testom, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyevim U testom. Sve P vrijednosti dvostrane su. Razina značajnosti postavljena je na $\alpha = 0,05$. Za statističku analizu korišten je statistički program SPSS, verzija 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

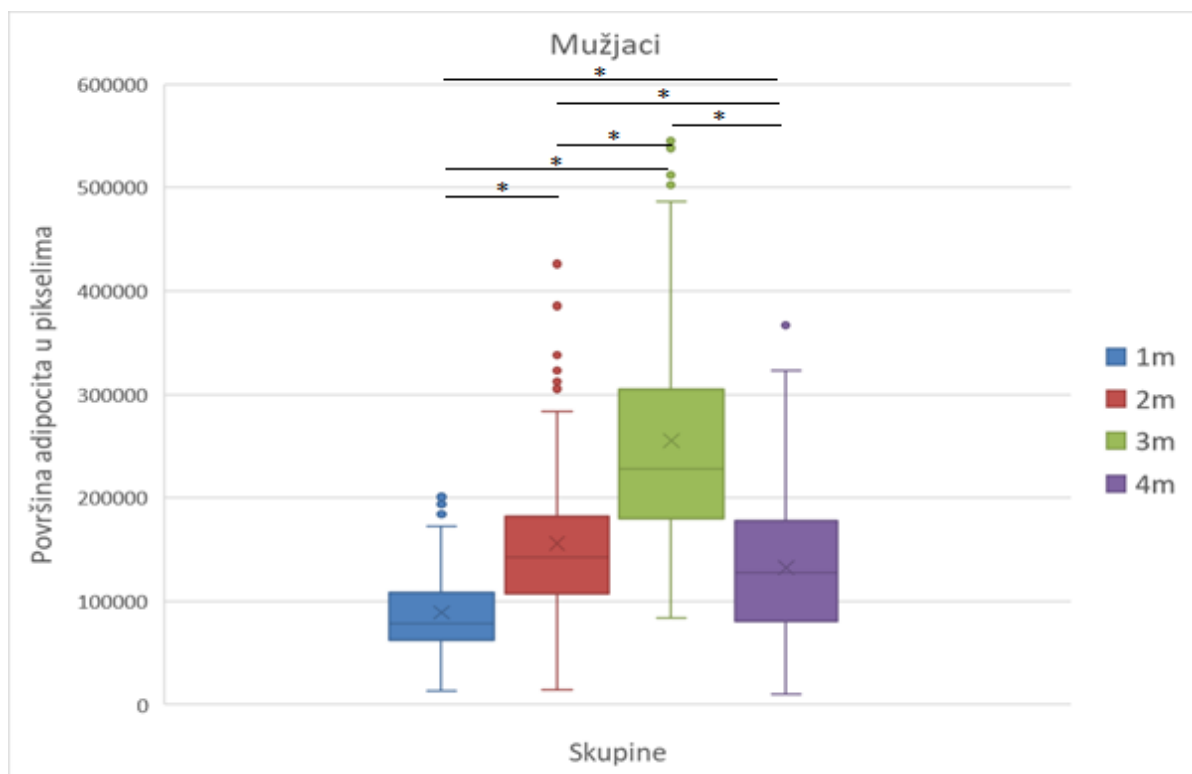
5. REZULTATI

5.1. Rezultati mjerenja površine masne kapljice u visceralnom masnom tkivu

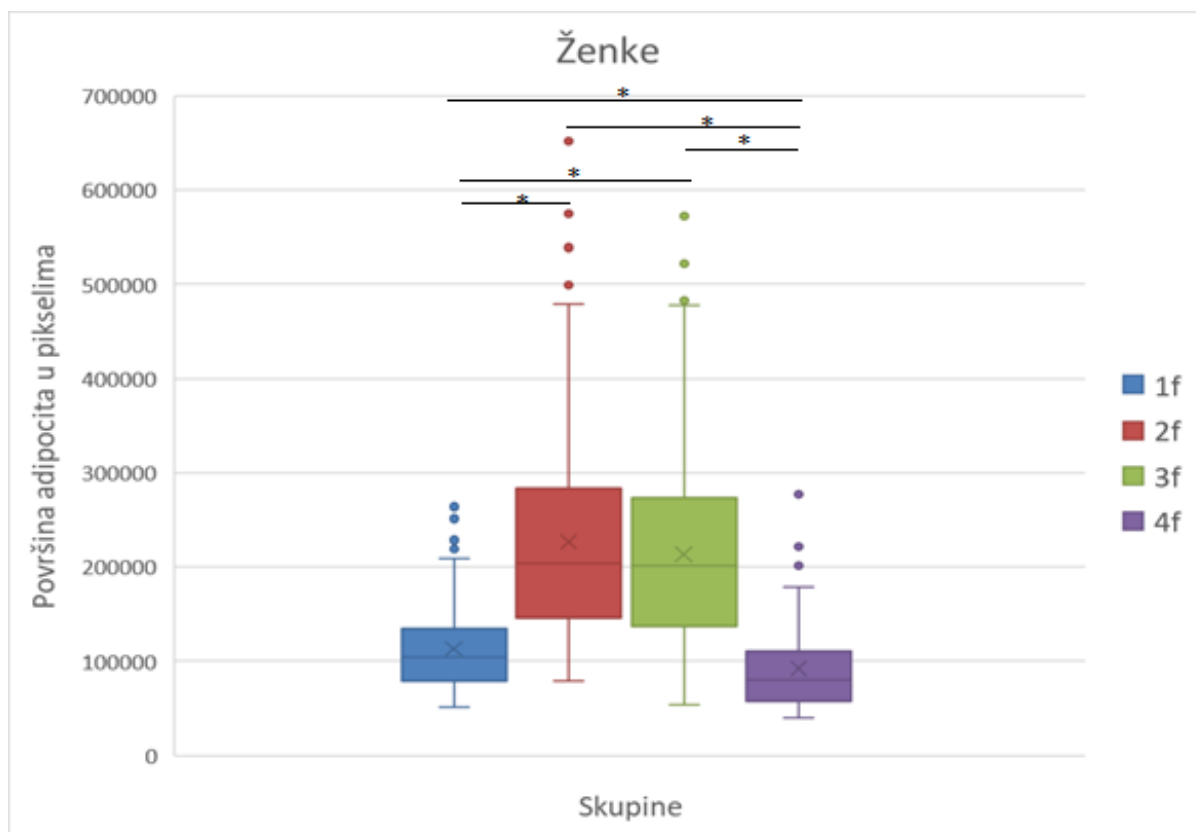
U svakom uzorku nasumično su odabrane 3 skupine adipocita i izračunata je površina njihovih masnih kapljica. Dobiveni rezultati uspoređeni su između 4 skupine životinja kod mužjaka i ženki. Štakori hranjeni masnom i slatkim hranom (2m i 2f skupine) kao i štakori hranjeni masnom i slatkim hranom koji su tretirani metforminom (3m i 3f skupine) imali su veću površinu adipocita od štakora hranjenih standardnom dijetom (1m i 1f skupine). Također, skupina štakora mužjaka hranjenih masnom i slatkim hranom koji su tretirani metforminom imala je izrazito povećane masne kapljice u usporedbi sa skupinom mužjaka koja je hranjena masnom i slatkim hranom bez metformina. Skupina mužjaka hranjena masnom i slatkim hranom na terapiji liraglutidom (4m) imala je povećanu površinu adipocita, dok je skupina ženki hranjena masnom i slatkim hranom na terapiji liraglutidom (4f) imala smanjenu površinu adipocita u usporedbi sa štakorima hranjenima standardnom dijetom.



Slika 1. Preparati visceralnog masnog tkiva obojeni histološkim bojama hematoksilinom i eozinom. Prikazane su četiri skupine mužjaka i ženki: 1. skupina hranjena standardnom dijetom, 2. skupina hranjena HFHSD-om, 3. Skupina hranjena HFHSD-om i tretirana metforminom te 4. skupina hranjena HFHSD-om i tretirana liraglutidom. Fotografirano Olympus D70 digitalnim fotoaparatom, povećanje 200x.



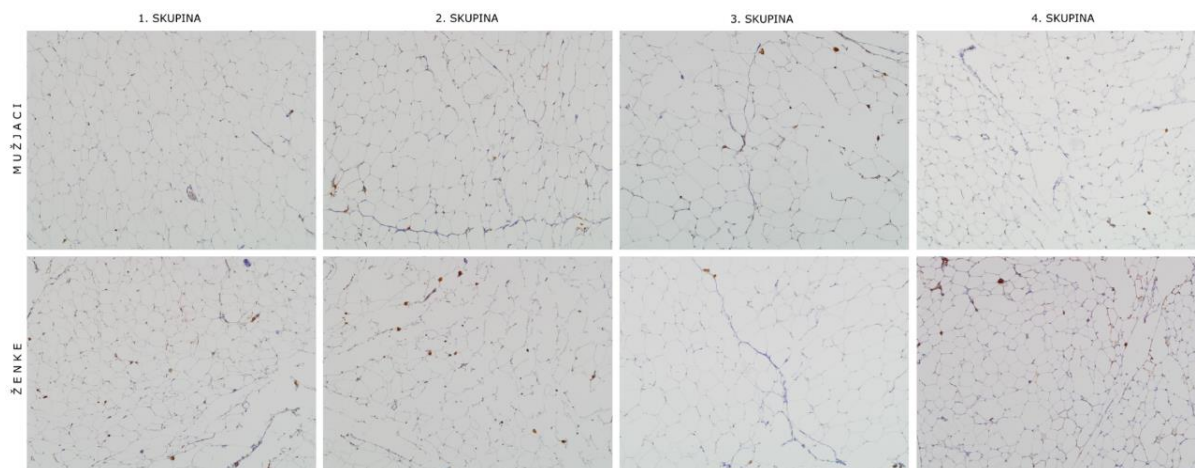
Slika 2. Mužjaci – visceralno masno tkivo. Površina masnih kapljica izražena u pikselima mjerene u skupinama štakora: 1 – hranjeni standardnom hranom; 2 – hranjeni HFHSD; 3 – tretirani metforminom nakon HFHSD; 4 – tretirani liraglutidom nakon HFHSD; m – mužjaci (* - $P < 0,001$). Mann Whitneyev U test



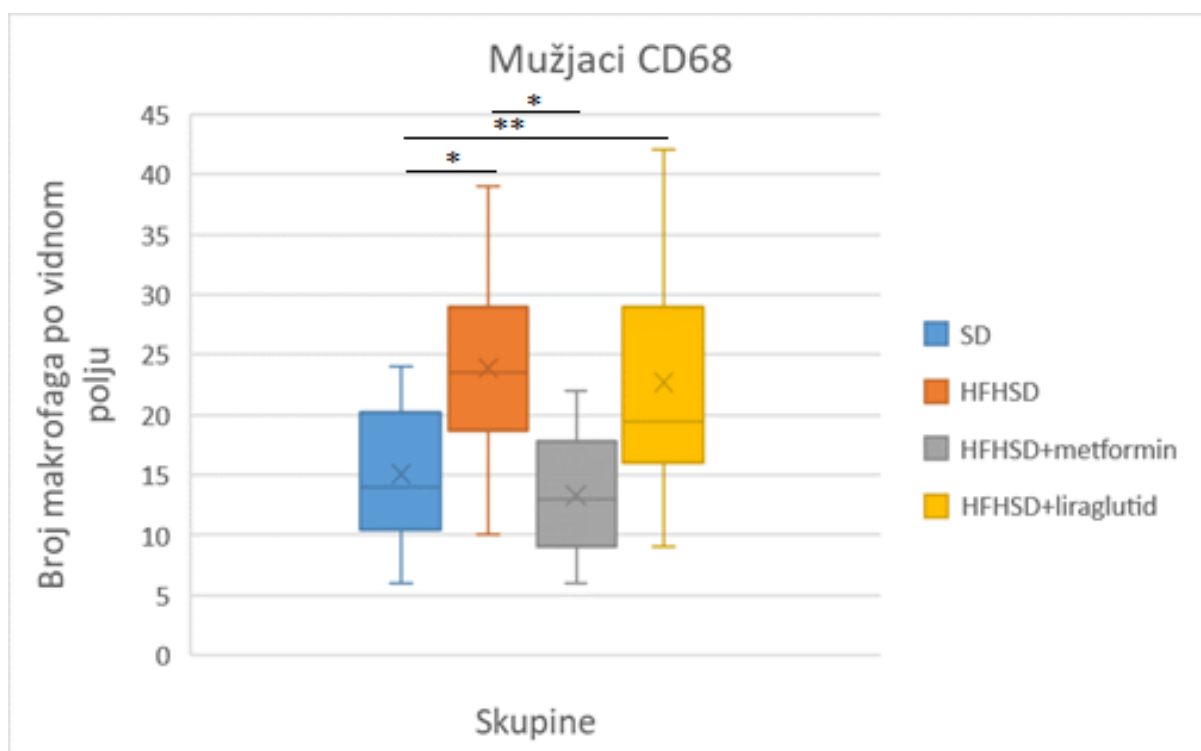
Slika 3. Ženke – visceralno masno tkivo. Površina masnih kapljica izražena u pikselima mjerena u skupinama štakora: 1 – hranjeni standardnom hranom; 2 – hranjeni HFHSD; 3 – tretirani metforminom nakon HFHSD; 4 – tretirani liraglutidom nakon HFHSD; f – ženke (* - $P < 0,001$). Mann Whitneyev U test

5.2. Rezultati imunohistokemijskog bojenja visceralnog masnog tkiva na CD68 markere makrofaga

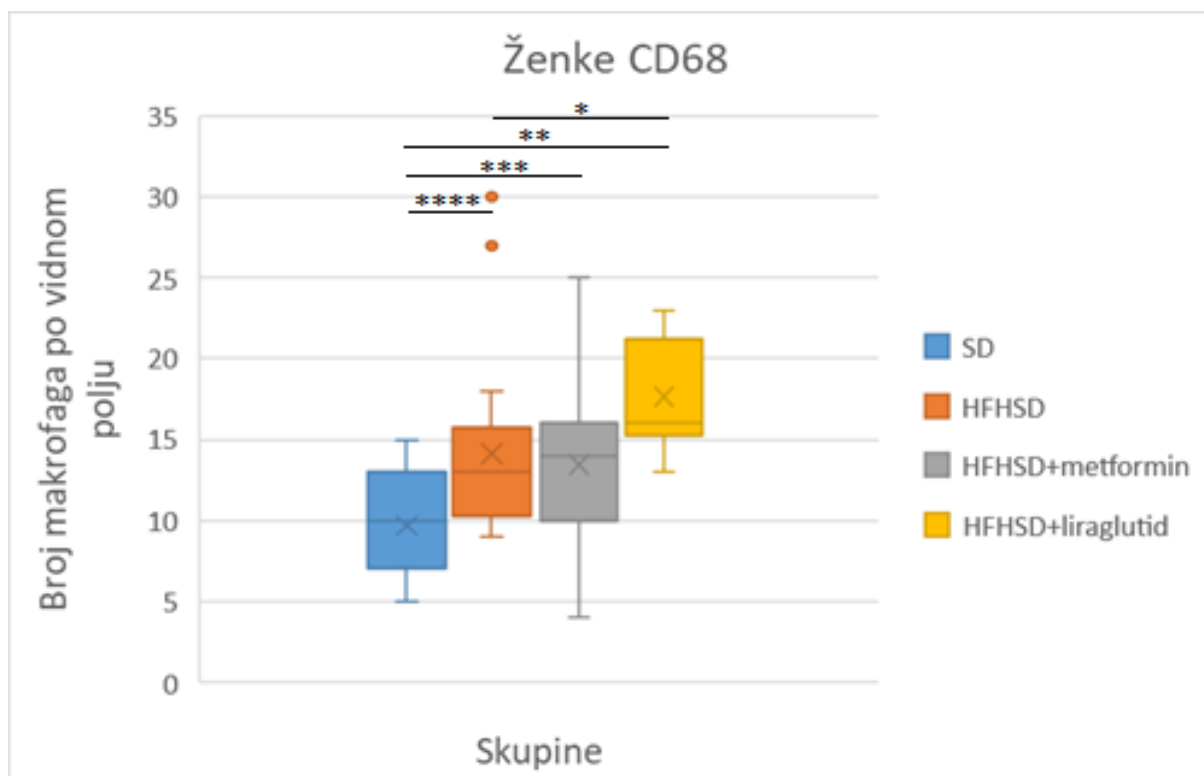
Postoji povećanje broja makrofaga u skupini mužjaka i ženki koji su hranjeni masnom i slatkom hranom (2m i 2f) kao i u skupini mužjaka i ženki koji su hranjeni masnom i slatkom hranom te primali terapiju liraglutidom (4m i 4f) u usporedbi s kontrolnom skupinom mužjaka i ženki koji su hranjeni standardnom hranom (1m i 1f). U skupini koja je hranjena masnom i slatkom hranom te primala terapiju metforminom, kod mužjaka (3m) nema značajnog porasta broja makrofaga, dok kod ženki (3f) postoji značajni porast u usporedbi s kontrolnom skupinom.



Slika 4. Preparati visceralnog masnog tkiva imunohistokemijski obojeni na marker CD68. Prikazane su četiri skupine mušjaka i ženki: 1. skupina hranjena standardnom dijetom, 2. skupina hranjena HFHSD-om, 3. skupina hranjena HFHSD-om i tretirana metforminom te 4. skupina hranjena HFHSD-om i tretirana liraglutidom. Fotografirano Olympus D70 digitalnim fotoaparatom, povećanje 200x.



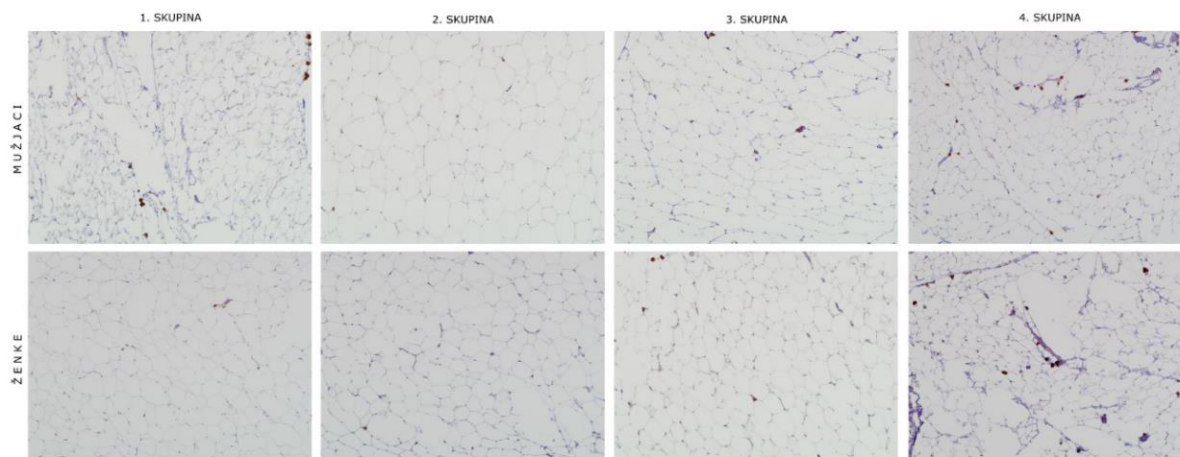
Slika 5. Mušjaci – Broj CD68 makrofaga. Broj CD68 makrofaga u vidnom polju mjereno u skupinama štakora mušjaka. (* - $P < 0,001$; ** - $p < 0,005$). Mann Whitneyev U test



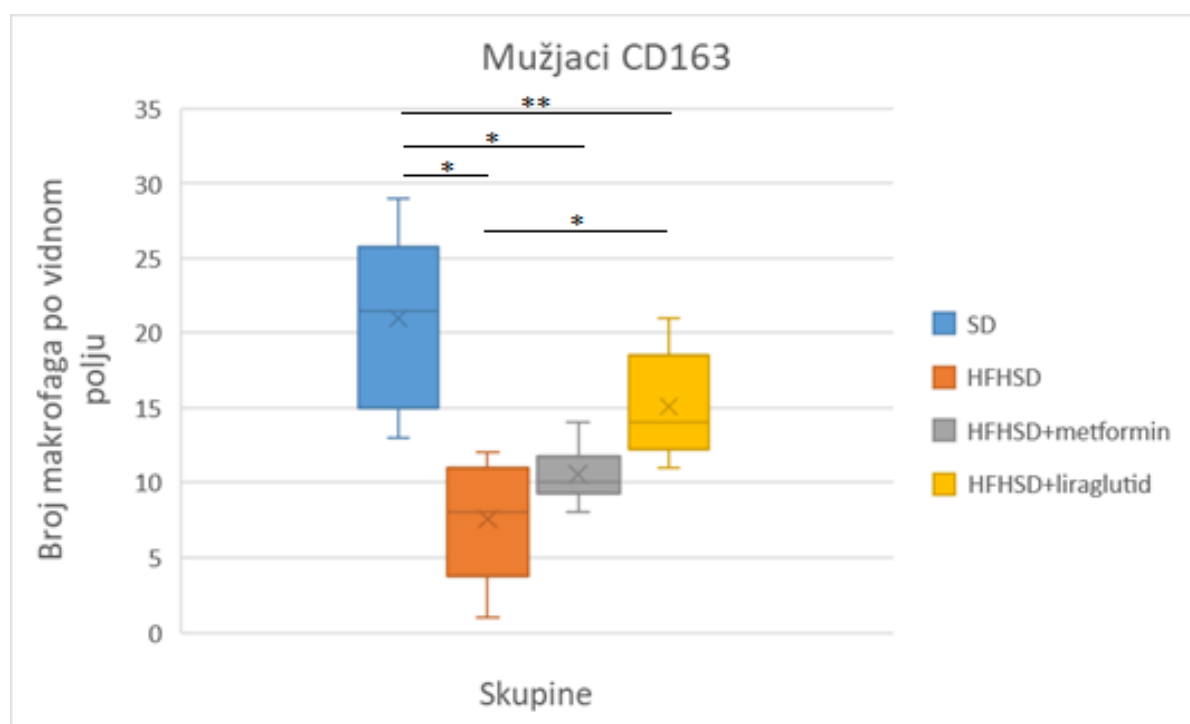
Slika 6. Ženke – Broj CD68 makrofaga. Broj CD68 makrofaga u vidnom polju mjereno u skupinama štakora ženki. (* - $P < 0,006$; ** - $p < 0,001$; *** - $P < 0,02$; **** - $p < 0,002$). Mann Whitneyev U test

5.3. Rezultati imunohistokemijskog bojenja visceralnog masnog tkiva na CD163 markere makrofaga

Na svakom preparatu pri povećanju od 200x nasumično je odabrano područje u kojem je izbrojan broj M2 makrofaga dobiven imunohistokemijskim bojanjem na CD163. Rezultati su uspoređivani među 4 skupine životinja kod mužjaka i ženki. U usporedbi s kontrolnom skupinom mužjaka (1m) sve ostale skupine mužjaka (2m, 3m, 4m) imaju značajno smanjen broj M2 makrofaga. Također 4m skupina mužjaka tretirana liraglutidom ima značajno povećan broj M2 makrofaga u usporedbi s HFHSD skupinom. U skupinama ženki pad u broju M2 makrofaga značajan je u skupini hranjenoj masnom i slatkim hranom koji su primali terapiju metforminom (3f) u usporedbi s kontrolnom skupinom (1f) te u usporedbi sa skupinom hranjenom masnom i slatkim hranom (2f).



Slika 7. Preparati visceralnog masnog tkiva imunohistokemijski obojeni na marker CD163. Prikazane su četiri skupine mužjaka i ženki. 1. skupina hranjena standardnom dijetom, 2. skupina hranjena HFHSD-om, 3. skupina hranjena HFHSD-om i tretirana metforminom, te 4. skupina hranjena HFHSD-om i tretirana liraglutidom. Fotografirano Olympus D70 digitalnim fotoaparatom, povećanje 200x.



Slika 8. Mužjaci – Broj CD163 makrofaga. Broj CD163 makrofaga u vidnom polju mjereno u skupinama štakora mužjaka. (* - $P < 0,001$; ** - $p < 0,01$). Mann Whitneyev U test



Slika 9. Ženke – Broj CD163 makrofaga. Broj CD163 makrofaga u vidnom polju mjereno u skupinama štakora ženki. (* - $P < 0,005$; ** - $p < 0,03$). Mann Whitneyev U test

6. RASPRAVA

U ovom istraživanju ispitivan je utjecaj HFHSD-a na visceralno masno tkivo štakora, veličinu masnih kapljica i stupanj upale u tkivu te utjecaj HFHSD-a i dva antidijabetska lijeka, metformina i liraglutida na veličinu masnih kapljica i stupanj upale u tkivu.

Istraživanje je pokazalo da postoji povećanje masnih kapljica visceralnih masnih stanica kod štakora na HFHSD-u, tj. HFHSD dovodi do pretilosti. Antidijabetici metformin i liraglutid imaju o spolu specifičan učinak na veličinu masnih kapljica kod štakora na HFHSD-u. Metformin kod mužjaka povećava veličinu masnih kapljica, dok liraglutid smanjuje veličinu masnih kapljica u oba spola, pri čemu je zabilježeno izražajnije smanjenje kod ženki štakora.

Visceralno masno tkivo aktivan endokrini je organ i izlučuje hormone poput leptina, adiponektina, dijelova komplementa, proteina renin-angiotenzin sustava i druge citokine koji su uključeni u imunost i upalni odgovor (11). Povećan broj makrofaga u visceralnom masnom tkivu nakon HFHSD-a ukazuje na to da se javlja upala. Broj protuupalnih M2 makrofaga kod mužjaka porastao je, dok je kod ženki ostao isti. Antidijabetici metformin i liraglutid utječu na broj makrofaga i imaju o spolu specifičan učinak. Metformin u mužjaka smanjuje ukupni broj makrofaga do razine kontrolne skupine, dok kod ženki ne utječe na broj ukupnih makrofaga, ali smanjuje broj protuupalnih makrofaga. Liraglutid povećava ukupni broj makrofaga u ženki štakora u usporedbi s netretiranom skupinom na HFHSD te povećava broj protuupalnih makrofaga u mužjaka štakora.

HFHSD, dijeta s povećanim kalorijskim unosom dovela je do povećanog spremanja energije u obliku triglicerida u vakuolama masnog tkiva kod mužjaka i ženki štakora. Slična istraživanja na drugim vrstama pokazala su iste rezultate (31, 32). Antidijabetik liraglutid, koji osim poticanja izlučivanja inzulina ima i anoreksično djelovanje, doveo je do smanjenja veličine masnih kapljica, dok antidijabetik metformin koji, iako također ima anoreksično djelovanje nije imao takav učinak, već je doveo do povećanja masne kapljice u mužjaka. Tu razliku možda upravo objašnjava bolje anoreksično djelovanje liraglutida u usporedbi s metforminom (33). Anoreksično djelovanje metformina upitno je, radovi drugih autora pokazuju različite rezultate, da metformin nema utjecaj na smanjenje volumena visceralnog masnog tkiva (34), da ima utjecaj na smanjenje visceralnog masnog tkiva, ali sveukupno masno tkivo ostaje nepromijenjeno (35), ili da postoji anoreksično djelovanje metformina

(36, 37). Objašnjenje različitih rezultata istraživanja može biti u dodatnim mjerama redukcije masnog tkiva ili odsutnost istih te komorbiditetima u gore spomenutim istraživanjima.

Nakupljanje lipida uzrokovalo je subklinički upalni odgovor, došlo je do povećanja sveukupnog broja makrofaga kod mužjaka i ženki štakora. Odredili smo i broj M2 diferenciranih makrofaga, tj. protuupalnih makrofaga. Kod mužjaka štakora nakupljanjem lipida smanjio se broj protuupalnih makrofaga, dok je kod ženki štakora ostao isti. Terapija antidijabetskim lijekovima kod HFHSD-a pokazala je specifičnost ovisnu o spolu. Metformin u mužjaka štakora smanjuje broj sveukupnih makrofaga, odnosno smanjuje upalni odgovor u visceralnom masnom tkivu, dok kod ženki štakora smanjuje broj protuupalnih makrofaga. Liraglutid ima suprotan učinak, povećava broj protuupalnih makrofaga kod mužjaka štakora, a kod ženki štakora povećava broj sveukupnih makrofaga. Rezultati pokazuju da su mužjaci štakora podložniji na upalu nego ženke pri povećanju volumena visceralnog masnog tkiva. Metformin i liraglutid smanjuju stupanj upale u mužjaka, no takav učinak nemaju kod ženki štakora. Ta spolno specifična razlika može se objasniti protektivnim učinkom estrogena (38, 40). Ženke štakora nemaju protuupalni odgovor na antidijabetsku terapiju koji se vidi kod mužjaka.

Originalnost ove studije je u tome što smo uspoređivali učinak dvaju antidijabetskih lijekova koji imaju različit mehanizam djelovanja na kontrolu glikemije. Također, uspoređivali smo broj sveukupnih makrofaga i protuupalnih M2 makrofaga kako bismo odredili stupanj upale u tkivu.

Prednosti ove studije je ispitivanje učinka pojedinačnog antidijabetskog lijeka. Ograničenje ove studije je u tome što nije provedeno istraživanje kombinacije antidijabetskih lijekova, nije postojala skupina koja bi pokazala kako lijekovi djeluju prilikom zajedničke primjene.

Poznat je povoljan i siguran učinak metformina i liraglutida u glikemijskoj kontroli te sinergističko djelovanje tih antidijabetika (41). Oni imaju pozitivan učinak i na druge bolesti. Za razliku od samostalne terapije metforminom, kombinacija s liraglutidom dovodi do značajnog gubitka tjelesne težine u žena sa sindromom policističnog jajnika (42, 43). Metformin i liraglutid pojedinačno imaju kardioprotektivni učinak, a njihova kombinacija ima sinergistički učinak na disfunkciju endotela, kao i na smanjenje volumena masnog tkiva u epikardu koje je po svojoj fiziologiji slično visceralnom masnom tkivu i čimbenik je rizika za kardiovaskularne bolesti. (44, 45). Poboljšavaju funkciju jetre u masnoj bolesti jetre kod

bolesnika s komorbiditetom dijabetesa tipa 2 (46). U kombinaciji ti antidijabetici imaju sinergistički protutumorski učinak na tumorske stanice adenokarcinoma gušterače koji je vjerojatno povezan s aktivacijom AMPK signalizacije (47).

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na spolno specifičan učinak antidijabetika na metabolizam visceralnog masnog tkiva, metformin, kao i liraglutid, smanjuju stupanj upale u mužjaka štakora. S obzirom na kliničku upotrebu kombinacije tih antidijabetika, zbog njihovog sinergičkog učinka na kontrolu glikemije trebali bi biti razmatrani kao terapija dijabetesa tipa 2 kod muškaraca koji su pretili s prisutnim metaboličkim sindromom, pogotovo ako postoje i znakovi krvožilnog oboljenja. Kombinacija tih antidijabetika mogla bi biti korisna i kod žena u postmenopauzi, nakon što razina estrogena, a time i njegov protektivni učinak, opadne.

Kao nastavak studije trebalo bi napraviti isto istraživanje na ovarijektomiranim štakoricama, odnosno provjeriti je li spolno specifična razlika djelovanja antidijabetika uzrokovana protektivnim djelovanjem estrogena.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- HFHSD dovodi do povećanja masnih kapljica u visceralnom masnom tkivu štakora.
- Liraglutid smanjuje veličinu masnih kapljica kod ženki štakora.
- HFHSD dovodi do povećanja broja sveukupnih makrofaga u visceralnom masnom tkivu.
- HFHSD dovodi do smanjenja broja M2 makrofaga u visceralnom masnom tkivu kod mužjaka štakora,
- Metformin smanjuje broj sveukupnih makrofaga u visceralnom masnom tkivu kod mužjaka štakora na HFHSD-u, dok kod ženki štakora smanjuje broj M2 makrofaga.
- Liraglutid povećava broj sveukupnih makrofaga u visceralnom masnom tkivu kod ženki štakora na HFHSD-u, dok kod mužjaka štakora na HFHSD-u povećava broj M2 makrofaga.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Glavni je cilj ovog istraživanja odrediti postoji li razlika u veličini masne kapljice i stupnju upale u visceralnom masnom tkivu nakon dijete bogate mastima i ugljikohidratima (HFHSD engl. *high fat high sugar diet*) te nakon iste dijete, ali uz primjenu monoterapije metformina i liraglutida.

Nacrt studije: Istraživanje je provedeno kao studija parova.

Materijali i metode: U istraživanje su uključene 64 životinje podijeljene u 8 skupina, 4 skupine mužjaka i 4 skupine ženki. Prva je skupina bila na standardnoj dijeti, druga skupina na HFHSD-u, treća skupina na HFHSD-u i tretirana metforminom te četvrta skupina na HFHSD-u tretirana liraglutidom. Primijenjeno je histološko bojenje hematoksilinom i eozinom te je određena veličina masnih kapljica u skupinama. Stupanj upale mjerio se imunohistokemijskim bojenjem na markere makrofaga. Rezultati su kvantificirani ImageJ programom.

Rezultati: Veličina masne kapljica povećana je u drugoj i trećoj skupini mužjaka i ženki štakora, dok je u četvrtoj skupini ženki štakora veličina masne kapljice smanjena. Metformin u mužjaka štakora smanjuje broj sveukupnih makrofaga, dok kod ženki štakora smanjuje broj protuupalnih makrofaga. Liraglutid povećava broj protuupalnih makrofaga kod mužjaka štakora, a kod ženki štakora povećava broj sveukupnih makrofaga.

Zaključak: HFHSD dovodi do povećanja masne kapljice i do subkliničke upale u visceralnom masnom tkivu. Antidiijabetici metformin i liraglutid djeluju na metabolizam visceralnog masnog tkiva i postoji o spolu ovisno djelovanje. Metformin i liraglutid smanjuju stupanj upale u mužjaka, no takav učinak nemaju kod ženki štakora.

Ključne riječi: visceralno masno tkivo, upala, *Sprague Dawley* štakori, liraglutid, metformin

9. SUMMARY

Changes in visceral fat tissue inflammatory markers in Sprague Dawley rats on high fat high sugar diet after treatment with metformin and liraglutide

Objectives: The main goal of this study is to determine whether there is a difference between the size of lipid vacuole and degree of inflammation in visceral fat tissue after a diet rich in fat and sugar, and the same diet in subjects treated with metformin and liraglutide.

Study design: The study was conducted as a matched pair study.

Materials and Methods: 64 animals were divided into 8 groups, 4 female and 4 male groups. The first group had the standard diet; the second had the high fat high sugar diet (HFHSD); third and fourth also had HFHSD, but additionally the third group was given metformin, and the fourth group liraglutide. Hematoxylin and eosin histological staining of visceral adipose tissue was used to measure the size of lipid vacuole. The degree of inflammation is estimated immunohistochemically by using CD68 and CD163 markers. The results were quantified using ImageJ software.

Results: The size of lipid vacuoles increased in the second group in both male and female rats. Metformin caused a decrease of overall macrophage number in male rats, and decrease in the number of anti-inflammatory macrophages in female rats. Liraglutide increased the number of anti-inflammatory macrophages in male rats, and increased the overall number of macrophages in female rats.

Conclusion: HFHSD increases the size of adipocytes and causes a sub-clinical inflammation in the visceral adipose tissue. Anti-diabetics metformin and liraglutide have a sex specific effect on visceral fat; they decrease the inflammation in the tissue of male rats, but don't have the same effect on female rats.

Key words: visceral adipose tissue, inflammation, *Sprague Dawley* rats, liraglutide, metformin

10. LITERATURA

1. Hubert H, Feinleib M, McNamara P, Castelli W. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26 year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 1983;67(5):968-977.
2. Nuttall F. Body Mass Index. *Nutrition Today*. 2015;50(3):117-128.
3. Janssen I, Katzmarzyk P, Ross R. Waist circumference and not body mass index explains obesity-related health risk. *Am J Clin Nut*. 2004;79(3):379-384.
4. Brown J, Harhay M, Harhay M. Anthropometrically-predicted visceral adipose tissue and mortality among men and women in the third national health and nutrition examination survey (NHANES III). *Am J Hum Biol*. 2017;29(1).
5. Seidell J. Time Trends in Obesity: An Epidemiological Perspective. *Horm Metab Res*. 1997;29(04):155-158.
6. Junqueira LC, Carneiro J. *Osnove histologije*. 10. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2005.
7. Guyton AC, Hall JE. *Medicinska fiziologija*. 12. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2012.
8. Kershaw E, Flier J. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Clinl Endocr Metab*. 2004;89(6):2548-2556.
9. Matsuzawa Y, Shimomura i, Nakamura T, Keno Y, Kotani K, Tokunaga K. Pathophysiology and pathogenesis of visceral fat obesity. *Obes Res*. 1995;Suppl 2:187S-194S.
10. Montague C, O'Rahilly S. The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes*. 2000;49(6):883-888.
11. Hanauer S. Obesity and visceral fat: a growing inflammatory disease. *Nat Clin Prac Gastroent Hepat*. 2005;2(6):245-245.
12. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J of Clin Inv*. 2012;122(3):787-795.
13. Martinez F, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports*. 2014;6.
14. Vrhovac B i sur. *Interna medicina*. 4. izd. Zagreb: Naklada Ljevak, 2008.
15. Schmidt M, Saad M, Duncan B. Subclinical inflammation and obesity, diabetes and related disorders. *Drug Disc Today Dis Mech*. 2005;2(3):307-312.
16. Hotamisligil G. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860-867.

17. Katzung B, Masters B, Trevor A. *Temeljna i klinička farmakologija*. 11. izd. Zagreb: Medicinska naklada, 2011.
18. Donath M. Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start. *Nat Rev Drug Disc*. 2014;13(6):465-476.
19. Mingrone G, Panunzi S, De Gaetano A, Guidone C, Iaconelli A, Nanni G, i sur. Bariatric–metabolic surgery versus conventional medical treatment in obese patients with type 2 diabetes: 5 year follow-up of an open-label, single-centre, randomised controlled trial. *The Lancet*. 2015;386(9997):964-973.
20. Pok E. Gastrointestinal metabolic surgery for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *W J Gastroent*. 2014;20(39):14315.
21. Barzilai N, She L, Liu B, Vuguin P, Cohen P, Wang J, i sur.. Surgical removal of visceral fat reverses hepatic insulin resistance. *Diabetes*. 1999;48(1):94-98.
22. Gabriely I, Ma X, Yang X, Atzmon G, Rajala M, Berg A, i sur. Removal of Visceral Fat Prevents Insulin Resistance and Glucose Intolerance of Aging: An Adipokine-Mediated Process?. *Diabetes*. 2002;51(10):2951-2958.
23. The United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) Implications for the Pharmacotherapy of Type 2 Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocr Dia*. 2009;106(05):369-372.
24. Ishii H, Niiya T, Ono Y, Inaba N, Jinnouchi H, Watada H. Improvement of quality of life through glycemic control by liraglutide, a GLP-1 analog, in insulin-naive patients with type 2 diabetes mellitus: the PAGE1 study. *Diabet Metab Sy*. 2017;9(1).
25. Jacobsen L, Flint A, Olsen A, Ingwersen S. Liraglutide in Type 2 Diabetes Mellitus: Clin Pharmacokin Pharmacodyn Clin Pharmacokin. 2015;55(6):657-672.
26. Armstrong M, Houlihan D, Rowe I, Clausen W, Elbrønd B, Gough S, i sur. Safety and efficacy of liraglutide in patients with type 2 diabetes and elevated liver enzymes: individual patient data meta-analysis of the LEAD program. *Alim Pharm Therap*. 2012;37(2):234-242.
27. Marso S, Daniels G, Brown-Frandsen K, Kristensen P, Mann J, Nauck M, i sur. Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Eng J Med*. 2016;375(4):311-322.
28. Deacon C. Potential of liraglutide in the treatment of patients with type 2 diabetes. *Vasc H Risk Manag*. 2009;5:199-211.

29. Bisgaard L, Bosteen M, Fink L, Sørensen C, Rosendahl A, Mogensen C, i sur. Liraglutide Reduces Both Atherosclerosis and Kidney Inflammation in Moderately Uremic LDLr^{-/-} Mice. *PLOS ONE*. 2016;11(12):e0168396.
30. Rizzo M, Rizvi A, Patti A, Nikolic D, Giglio R, Castellino G, i sur. Liraglutide improves metabolic parameters and carotid intima-media thickness in diabetic patients with the metabolic syndrome: an 18-month prospective study. *CardiovascDiabet*. 2016;15(1).
31. Costa R, Villela N, Souza M, Boa B, Cyrino F, Silva S, i sur. High fat diet induces central obesity, insulin resistance and microvascular dysfunction in hamsters. *Microvasc R*. 2011;82(3):416-422.
32. Tang L, Tang X, Li X, Yu H, Xie Z, Liu X. Effect of high-fat or high-glucose diet on obesity and visceral adipose tissue in mice. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2014;36(6):614-9.
33. Jensterle Sever M, Kocjan T, Pfeifer M, Kravos N, Janez A. Short-term combined treatment with liraglutide and metformin leads to significant weight loss in obese women with polycystic ovary syndrome and previous poor response to metformin. *Eur J Endocrinol*. 2014;170(3):451-459.
34. Lord J, Thomas R, Fox B, Acharya U, Wilkin T. The effect of metformin on fat distribution and the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome—a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *BJOG*. 2006;113(7):817-824.
35. Hoeger K, Davidson K, Kochman L, Cherry T, Kopin L, Guzick D. The Impact of Metformin, Oral Contraceptives, and Lifestyle Modification on Polycystic Ovary Syndrome in Obese Adolescent Women in Two Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trials. *J Clin Endocrin Metab*. 2008;93(11):4299-4306.
36. Tokubuchi I, Tajiri Y, Iwata S, Hara K, Wada N, Hashinaga T, i sur. Beneficial effects of metformin on energy metabolism and visceral fat volume through a possible mechanism of fatty acid oxidation in human subjects and rats. *PLOS ONE*. 2017;12(2):e0171293.
37. Lee A, Morley J. Metformin Decreases Food Consumption and Induces Weight Loss in Subjects with Obesity with Type II Non-Insulin-Dependent Diabetes. *Obe R*. 1998;6(1):47-53.
38. Evans M, Eckert A, Lai K, Adelman S, Harnish D. Reciprocal Antagonism Between Estrogen Receptor and NF-kappa B Activity In Vivo. *Circ R*. 2001;89(9):823-830.

39. Fairweather D. Sex Differences in Inflammation during Atherosclerosis. *Clin Med Insights Cardiol.* 2014;8s3:CMC.S17068.
40. Zore T, Palafox M, Reue K. Sex differences in obesity, lipid metabolism, and inflammation—A role for the sex chromosomes?. *Mol Met.* 2018;15:35-44.
41. Zinman B, Gerich J, Buse J, Lewin A, Schwartz S, Raskin P, i sur. Efficacy and Safety of the Human Glucagon-Like Peptide-1 Analog Liraglutide in Combination With Metformin and Thiazolidinedione in Patients With Type 2 Diabetes (LEAD-4 Met+TZD). *Diab Care.* 2009;32(7):1224-1230.
42. Jensterle Sever M, Kocjan T, Pfeifer M, Kravos N, Janez A. Short-term combined treatment with liraglutide and metformin leads to significant weight loss in obese women with polycystic ovary syndrome and previous poor response to metformin. *Eur J Endocrin.* 2014;170(3):451-459.
43. Jensterle M, Goricar K, Janez A. Metformin as an initial adjunct to low-dose liraglutide enhances the weight-decreasing potential of liraglutide in obese polycystic ovary syndrome: Randomized control study. *Expl Ther Med.* 2016;11(4):1194-1200.
44. Ke J, Liu Y, Yang J, Lu R, Tian Q, Hou W, i sur. Synergistic effects of metformin with liraglutide against endothelial dysfunction through GLP-1 receptor and PKA signalling pathway. *Sci Rep.* 2017;7(1).
45. Iacobellis G, Mohseni M, Bianco S, Banga P. Liraglutide causes large and rapid epicardial fat reduction. *Obesity.* 2017;25(2):311-316.
46. Kenji Sakai T. Liraglutide With or Without Metformin Ameliorates Liver Function and Fatty Liver in Obese Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diab Metab.* 2015;06(09).
47. Lu R, Yang J, Wei R, Ke J, Tian Q, Yu F, i sur. Synergistic anti-tumor effects of liraglutide with metformin on pancreatic cancer cells. *PLOS ONE.* 2018;13(6):e0198938.
48. Schneider, C. A.; Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nat methods* 2012;9(7): 671-67

11. ŽIVOTOPIS

Opći podatci:

- Ime i prezime: Aleksandar Katić
- Datum i mjesto rođenja: 2. 7. 1991. Osijek
- Adresa stanovanja: Ulica Vjekoslava Celestina 33 Sarvaš, 31000 Osijek
- Kontakt: +385-97-702-4443
- e-mail: aleksankatic@gmail.com

OBRAZOVANJE

- 1998. – 2006. Osnovna škola „Bijelo Brdo“, Bijelo Brdo
- 2006. – 2010. Tehnička škola i prirodoslovna gimnazija Ruđera Boškovića Osijek, prirodoslovna gimnazija
- 2010. – 2018. Medicinski fakultet Osijek, integrirani preddiplomski i diplomski studij medicine

OSTALE AKTIVNOSTI

- Organizator projekta Tjedan mozga Studentske sekcije za neuroznanost SENZOS, 2015., 2016., 2017., 2018. godine
- Voditelj projekta prevođenja TED govora s engleskog jezika na hrvatski jezik
- Aktivan sam član dviju studentskih udruga Medicinskog fakulteta: CroMsic (Croatian Medical Student's International Committee) i EMSA (European Medical Students' Association)
- Voditelj Twinning projekta razmjene studentske udruge EMSA (2015. i 2016. godina)
- Dobitnik Dekanove nagrade 2016. godine
- Odrađena ljetna praksa u Psihijatrijskoj bolnici „Sveti Ivan“ 2016. godine
- Aktivno sudjelovanje na kongresima
 - 2016. NeuRi Student Congress of Neuroscience
 - 2016. Summer School on Stress
 - 2016. Upoznaj me – kongres o uključivanju osoba s mentalnim izazovima u zajednicu
 - 2017. Upoznaj me – simpozij o inkluziji djece s mentalnim izazovima

- 2017. Mind & BRAIN – 57TH INTERNATIONAL NEUROPSYCHIATRIC CONGRESS
- 2017. 6. Hrvatski kongres neuroznanosti
- 2018. RECOOP – FK student science forum
- Organizacijski tim na konresima:
 - 5. hrvatski kongres neurorehabilitacije i restauracijske neurologije
 - 6. hrvatski kongres neurorehabilitacije i restauracijske neurologije
- Tečajevi:
 - 2016. Tečaj osnovnih medicinskih vještina
- Online tečajevi:
 - Fundamental of neuroscience, part I, HarvardX, EdX
 - Understanding the Origins of Crime, Griffith university, Open2Study
 - Foundations of psychology, RMIT university, Open2Study