UTJECAJ SIMVASTATINA I METFORMINA NA REGULACIJU ADIPOGENEZE IN VITRO

Jakab, Jelena

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:047723

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Jelena Jakab

UTJECAJ SIMVASTATINA I METFORMINA NA REGULACIJU ADIPOGENEZE *IN VITRO*

Doktorska disertacija

Osijek, 2022.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Jelena Jakab

UTJECAJ SIMVASTATINA I METFORMINA NA REGULACIJU ADIPOGENEZE *IN VITRO*

Doktorska disertacija

Osijek, 2022.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Blaženka Miškić, dr. med.
Komentor rada: izv. prof. dr. sc. Ivan Tušek, dr. med. dent.
Rad ima 146 stranica.

Tvoje oči postoje za svjetlo,
za bjelinu snijega, za zelenilo proljeća,
za sivilo oblaka i za plavetnilo neba,
za zvijezde u noći i za nevjerojatno čudo
da je oko tebe toliko divnih ljudi.
Tvoja usta postoje za riječ,
za svaku dobru riječ na koju netko drugi čeka.
I tvoje usne postoje za poljubac, a tvoje ruke
za nježnost i utjehu i zato da siromahu dadnu kruha.
Tvoje noge postoje za put koji vodi k onima koji trpe.
Tvoje srce postoji za ljubav, za toplinu,
za one koji su usamljeni, napušteni,
koji žive u hladnoći.
Tvoje tijelo postoji da se približiš drugima.
Bez tijela ti nisi nigdje. Sve ima svoj duboki smisao.
Zašto onda nisi sretan?
Zar su ti oči zatvorene?
Zar su ti usta puna gorčine?
Zar tvoje ruke mogu samo uzimati?
Ili ti se srce osušilo?
Stvoren si za radost.
Ne postojiš zato da hodaš okolo
mrzovoljasta lica
i povrijeđena srca, koje ne prašta.
Stvoren si za radost.

Phil Bosmans

…mojem ocu…

Hvala mentorici izv. prof. dr. sc. Blaženki Miškić i komentoru izv. prof. dr.sc. Ivanu Tušeku na stručnom vodstvu i nesebičnoj pomoći tijekom izrade doktorske disertacije.
Hvala mojim kolegicama i kolegama u laboratoriju, jer su naši zajednički napori i međusobna poticanja uvijek bili vjetar u leđa. Milorade, hvala ti na pomoći, slušanju, tješenju i učinkovitoj uštedi mog vremena i mojih živaca.
Hvala svim djelatnicima Medicinskog fakulteta i Fakulteta za dentalnu medicinu i zdravstvo, koji su cijelo vrijeme strpljivo i bez imalo sumnje čekali ovaj dan, svakodnevno me bodreći.
Veliko hvala mojim prijateljima. Svi ste savršeno znali kada me nasmijati, saslušati, opustiti, ali i pogurati. U vašim sam riječima mogla pronaći utjehu i snagu, i onda kada toga niste bili ni svjesni.
Najveće zahvale idu mojoj obitelji, na bezuvjetnoj potpori, razumijevanju za sva moja izbivanja, prilagođavanju svim mojim obavezama, i pružanju bezgranične ljubavi na koju sam se uvijek mogla osloniti i uz nju preživjeti sve teške trenutke.

Posebnu zahvalnost za završetak ovog poglavlja dugujem svom dekanu, prof. dr. sc. Aleksandru Včevu. Hvala Vam što ste uvijek vjerovali u mene i vješto me usmjeravali svojom nepogrešivom intuicijom i neprocjenjivim savjetima. Hvala vam što ste me vodili, inspirirali i pokazali mi pravi put. Hvala što ste mi pomogli da postanem ono što jesam.

Hvala!

Sadržaj

Popis kratica I
Popis tablica V
Popis slika VIII
1. Uvod 1
1.1. Masno tkivo i adipociti 1
1.2. Metabolizam lipida 2
1.3. Adipocitokini 4
1.4. Adipogeneza 7
1.4.1. Adipogeneza *in vitro* 8
1.5. Transkripcijska kontrola procesa adipogeneze 9
1.6. Proadipogeni čimbenici 12
1.7. Antiadipogeni čimbenici 14
1.8. Poremećaji masnog tkiva i metabolizma lipida 16
1.8.1. Liječenje 17
2. Hipoteza 20
3. Cilj istraživanja 21
4. Materijali i metode 22
4.1. Ustroj studije 22
4.2. Materijali 22
4.3. Metode 22
4.3.1. Uzgoj i diferencijacija stanica 22
4.3.2. Priprema pokrovnih stakalaca i pločica za uzgoj stanica 25
4.3.3. Analiza metaboličke aktivnosti stanica 26
4.3.4. Analiza unutarstaničnog nakupljanja lipida 27
4.3.5. Analiza ekspresije mRNA ciljanih transkripcijskih čimbenika i modulatora adipogeneze 28
4.3.6. Analiza proteinske ekspresije ciljanih transkripcijskih čimbenika i modulatora adipogeneze 31
4.3.7. Imunocitokemijska analiza 34
4.4. Statističke metode 35
5. Rezultati 36
5.1. Metabolička aktivnost stanica izmjerena MTT testom 36
5.2. Unutarstanično nakupljanje lipida 39
5.3. Ekspresija mRNA ciljanih transkripcijskih čimbenika i modulatora adipogeneze 41

5.4. Proteinska ekspresija ciljanih transkripcijskih čimbenika i modulatora adipogeneze.....58
5.4.1. Proteinska ekspresija određena Western blot metodom.....58
5.4.2. Proteinska ekspresija određena imunocitokemijom.....85
6. Rasprava.....102
6.1. Utjecaj metformina i simvastatina na stanično preživljenje.....102
6.2. Utjecaj metformina i simvastatina na unutarstanično nakupljanje lipida.....104
6.3. Utjecaj metformina i simvastatina na transkripcijsku kontrolu procesa adipogeneze.....107
6.3.1. Uloga i regulacija PPAR-γ i C/EBP-α tijekom adipogeneze.....112
6.3.2. Uloga i regulacija SREBP-1C tijekom adipogeneze.....115
6.3.3. Uloga i regulacija STAT3 tijekom adipogeneze.....116
6.3.4. Uloga i regulacija SMAD3 tijekom adipogeneze.....118
6.4. Mogućnosti u kliničkoj primjeni i daljnjim istraživanjima.....119
6.5. Ograničenja istraživanja.....120
7. Zaključak.....121
8. Sažetak.....122
9. Summary.....123
10. Literatura.....124
11. Životopis.....145

Popis kratica

ACC	acetil-CoA karboksilaza (engl. *acetyl-CoA carboxylase*)
ACP	protein prenositelj acilnih skupina (engl. *acyl carrier protein*)
ACTB	engl. *beta-actin*
ADD1	engl. *adipocyte determination and differentiation-dependent factor 1*
AdipoR	receptor adiponektina (engl. *adiponectin receptor*)
AgRP	peptid srodan agouti signalnom peptidu (engl. *agouti-related protein*)
AICAR	5-aminoimidazol-4-karboksiamid-1-β-d-ribofuranozid (engl. *5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-d-ribofuranoside*)
AMPK	protein kinaza aktivirana adenozin monofosfatom (engl. *adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase*)
AP-1	engl. *activator protein 1*
aP2	adipocitni protein 2
ATF	engl. *activating transcription factor*
ATGL	adipozna trigliceridna lipaza
ATP	adenozin trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)
BMI	indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)
BMP	koštani morfogenetski protein (engl. *bone morphogenic protein*)
BMPR1	engl. *bone morphogenetic protein receptor type 1*
BMPR2	engl. *bone morphogenetic protein receptor type 2*
BSA	goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*)
CACT	karnitin translokaza (engl. *carnitine-acylcarnitine translocase*)
cAMP	ciklički adenozin monofosfat (engl. *cyclic adenosine monophosphate*)
CART	kokainom i amfetaminom reguliran transkript (engl. *cocaine- and amphetamine- regulated transcript*)
C/EBP	protein koji veže CCAAT pojačivač (engl. *CCAAT/enhancer-binding protein*)
Cebpa	gen koji kodira protein α koji veže CCAAT pojačivač
CEBPA	protein α koji veže CCAAT pojačivač
CGI-58	engl. *comparative gene identification-58*
CNTF	cilijarni neurotrofni čimbenik (engl. *ciliary neurotrophic factor*)
CoA	koenzim A (engl. *coenzyme A*)
COPII	kompleks proteina koji oblaže vezikule (engl. *coat protein complex II*)
CPT1	karnitin palmitoil transferaza 1 (engl. *carnitine palmitoyl transferase 1*)
CPT2	karnitin palmitoil transferaza 2 (engl. *carnitine palmitoyl transferase 2)*
CREB	protein koji veže elemente odgovora na ciklički adenozin monofosfat (engl. *cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-response element-binding protein*)
CTGF	čimbenik rasta vezivnog tkiva (engl. *connective tissue growth factor*)
DAG	diacilglicerol
DAPI	4',6-diamidin-2'-fenilindol dihidroklorid (engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*)
DEPC	dietil pirokarbonat (engl. *diethyl pyrocarbonate*)
DGAT	diglicerid aciltransferaza
DHAP	dihidroksiaceton fosfat (engl. *dihydroxyacetone phosphate*)

DMEM	Dulbecco modificirani Eagle-ov medij (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
DMSO	dimetil sulfoksid (engl. *dimethyl sulfoxide*)
DMT2	šećerna bolest tip 2 (engl. *diabetes mellitus type 2*)
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)
ERK	kinaza regulirana izvanstaničnim signalom (engl. *extracellular signal-regulated kinase*)
FA	masna kiselina (engl. *fatty acid*)
fAPN	adiponektin pune duljine (engl. *full-length adiponectin*)
FAS	sintaza masnih kiselina (engl. *fatty acid synthase*)
FBS	fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum*)
FOXO1	engl. *forkhead box protein O1*
FPP	farnezil pirofosfat (engl. *farnesyl pyrophosphate*)
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (engl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)
gAPN	globularni adiponektin (engl. *globular adiponectin*)
GGPP	geranilgeranil pirofosfat (engl. *geranylgeranyl pyrophosphate)*
GLUT4	glukozni prijenosnik tip 4 (engl. *glucose transporter type 4*)
GSK-3β	kinaza glikogen sintaze 3 beta (engl. *glycogen synthase kinase 3 beta*)
HDL	lipoprotein visoke gustoće (engl. *high-density lipoprotein*)
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina
HMG-CoA	hidroksimetil-glutaril koenzim A (engl. *3-hydroxy-3-methyl-glutaril-coenzyme A*)
HMGCR	hidroksimetil-glutaril koenzim A reduktaza (engl. *3-hydroxy-3-methyl-glutaril-coenzyme A reductase*)
HSL	hormonski osjetljiva lipaza (engl. *hormone-sensitive lipase*)
IBMX	3-izobutil-1-metilksantin (engl. *3-isobutyl-1-methylxanthine*)
IDL	lipoprotein srednje gustoće (engl. *intermediate-density lipoprotein*)
IGF	inzulinu sličan čimbenik rasta (engl. *insulin-like growth factor*)
IGF-R	receptor za inzulinu sličan čimbenik rasta (engl. *insulin-like growth factor receptor*)
IL	interleukin
IR	inzulinski receptor
IRS	supstrat inzulinskog receptora (engl. *insulin receptor substrate*)
JAK	Janus kinaze
JDP	protein Jun dimerizacije (engl. *Jun dimerization protein*)
JNK	c-Jun N-terminalna kinaza (engl. *c-Jun N-terminal kinase*)
KLF	čimbenik sličan Krüppel genu (engl. *Krüppel-like factor*)
LDL	lipoprotein male gustoće (engl. *low-density lipoprotein*)
LDL-R	receptor za lipoprotein male gustoće (engl. *low-density lipoprotein receptor*)
LEP-R	leptinski receptor
LPL	lipoprotein lipaza
MAPK	protein kinaza aktivirana mitogenom (engl. *mitogen-activated protein kinase*)
MCE	mitotička klonalna ekspanzija (engl. *mitotic clonal expansion*)

MCP-1	monocitni kemotaktični protein 1 (engl. *monocyte chemoattractant protein 1*)
MGL	monogliceridna lipaza
mTOR	protein serin/treonin kinaza meta rapamicina (engl. *mammalian target of rapamycin*)
NPY	neuropeptid Y
PAI-1	inhibitor aktivatora plazminogena 1 (engl. *plasminogen activator inhibitor-1*)
PAP	fosfatidat fosfataza (engl. *phosphatidate phosphatase*)
PBS	fosfatni pufer (engl. *phosphate buffered saline*)
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)
PDE3B	fosfodiesteraza 3B (engl. *phosphodiesterase 3B*)
PE-Cy5	engl. *1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(Cyanine 5)*
PES	poli(eter-sulfon) (engl. *polyethersulfone*)
PFA	paraformaldehid
PKA	protein kinaza A
PKB	protein kinaza B
PKR	RNA-aktivirana protein kinaza (engl. *double-stranded RNA-dependent protein kinase*)
PI3K	fosfoinozitid 3-kinaza (engl. *phosphoinositide 3-kinase*)
PIP3	fosfatidilinozitol (3,4,5)-trifosfat (engl. *phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*)
PMSF	inhibitor proteaza (engl. *phenylmethylsulfonyl fluoride*)
POMC	proopiomelanokortin (engl. *proopiomelanocortin*)
Pref-1	preadipocitni čimbenik engl. *preadipocyte factor 1*
PPAR-γ	peroksisomskim proliferatorom aktivirani receptor gama (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*)
Pparg	gen koji kodira peroksisomskim proliferatorom aktivirani receptor gama (engl. peroxisome proliferator-activated receptor gamma)
PPARG	protein peroksisomskim proliferatorom aktiviranog receptora gama (engl. peroxisome proliferator-activated receptor gamma)
PPRE	element odgovora na peroksisomski proliferator (engl. *peroxisome proliferator response element*)
PVDF	poliviniliden difluorid (engl. *polyvinylidene difluoride*)
RBP4	retinol vezujući protein 4 (engl. *retinol binding protein 4*)
ROS	reaktivni spojevi kisika (engl. *reactive oxygen species*)
RXR	retinoidni X receptor
SCAP	protein cijepanja i aktivacije SREBP (engl. *SREBP cleavage-activating protein*)
SDS	natrijev dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*)
SDS-PAGE	elektroforeza u denaturirajućem poliakrilamidnom gelu (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)
Smad3	gen koji kodira član 3 obitelji transkripcijskih čimbenika SMAD
SMAD3	protein člana 3 obitelji transkripcijskih čimbenika SMAD
SMRT	posrednik utišavanja za receptore retinoida ili tiroidnih hormona (engl. *silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor*
SRE	regulacijski element sterola (engl. *sterol regulatory element*)

SREBP	protein koji veže regulacijski element sterola (engl. *sterol regulatory element-binding protein*)
Srebp1c	gen koji kodira protein 1C koji veže regulacijski element sterola
SREBP1C	protein 1C koji veže regulacijski element sterola
STAT	signalni transduktor i aktivator transkripcije
Stat3	gen koji kodira signalni transduktor i aktivator transkripcije 3
STAT3	protein signalnog transduktora i aktivatora transkripcije 3
TAE	Tris-Acetat EDTA
TAK1	kinaza 1 aktivirana transformirajućim čimbenikom rasta beta (engl. *transforming growth factor beta (TGF-β)-activated kinase 1*)
TCF/LEF	T-stanični čimbenik / čimbenik vezanja na limfoidni pojačivač (engl. *T-cell factor / lymphoid enhancer-binding factor*)
TEMED	tetrametiletilendiamin (engl. *tetramethylethylenediamine*)
TGF-β	transformirajući čimbenik rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*)
TNF-α	čimbenik nekroze tumora alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*)
UCP1	razvezujući protein 1 (engl. *uncoupling protein 1*)
VLDL	lipoprotein vrlo male gustoće (engl. *very low-density lipoprotein*)
ZFP	proteini cinkovog prsta (engl. *zinc finger proteins*)

Popis tablica

Tablica 4.1. Popis korištenih kemikalija, reagensa i otopina za uzgoj i diferencijaciju stanica……...22
Tablica 4.2. Shema protokola diferencijacije i vremenskih perioda tretiranja stanica lijekovima za inhibiciju diferencijacije……24
Tablica 4.3. Popis eksperimentalnih i kontrolnih skupina s obzirom na korišteni medij i koncentracije lijekova za inhibiciju diferencijacije……..25
Tablica 4.4. Popis korištenih kemikalija, reagensa i otopina za pripremu pokrovnih stakalaca i pločica za uzgoj stanica ……..25
Tablica 4.5. Popis korištenih kemikalija, reagensa i otopina za MTT test ……..26
Tablica 4.6. Popis korištenih kemikalija, reagensa i otopina za Oil Red O bojanje ……27
Tablica 4.7. Popis korištenih kemikalija, reagensa i otopina za lančanu reakciju polimerazom.……28
Tablica 4.8. Popis početnica s navedenim slijedom nukleotida i smjerom početnice…..29
Tablica 4.9. Reakcijske smjese za cDNA i PCR (ukupni volumen 20 µL)……..30
Tablica 4.10. Uvjeti PCR reakcija……..30
Tablica 4.11. Popis korištenih kemikalija, reagensa i otopina za Western blot…….31
Tablica 4.12. Popis primarnih protutijela korištenih za Western blot……32
Tablica 4.13. Sastav poliakrilamidnih gelova za WB…….33
Tablica 4.14. Popis korištenih kemikalija, reagensa i otopina za imunocitokemiju……34
Tablica 5.1. Metabolička aktivnost 3T3-L1 stanica nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima izražena kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica……...37
Tablica 5.2. Statistički značajne razlike u metaboličkoj aktivnosti 3T3-L1 stanica s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana…….38
Tablica 5.3. Nakupljanje lipida unutar 3T3-L1 stanica nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica……...41
Tablica 5.4. Relativna mRNA ekspresija *Pparg* u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica ……...43
Tablica 5.5. Statistički značajne razlike u relativnoj mRNA ekspresiji *Pparg* u 3T3-L1 stanicama s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana…….....44
Tablica 5.6. Relativna mRNA ekspresija *Cebpa* u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica ……...46
Tablica 5.7. Statistički značajne razlike u relativnoj mRNA ekspresiji *Cebpa* u 3T3-L1 stanicama s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana……....47
Tablica 5.8. Relativna mRNA ekspresija *Srebp1c* u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica…….....49

Tablica 5.9. Relativna mRNA ekspresija *Stat3* u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica…….....51
Tablica 5.10. Statistički značajne razlike u relativnoj mRNA ekspresiji *Stat3* u 3T3-L1 stanicama s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana…….…….....52
Tablica 5.11. Relativna mRNA ekspresija *Smad3* u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica…….……..54
Tablica 5.12. Statistički značajne razlike u relativnoj mRNA ekspresiji *Smad3* u 3T3-L1 stanicama s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana…….……...55
Tablica 5.13. Učinak metformina i simvastatina na mRNA razine ispitivanih transkripcijskih čimbenika i modulatora adipogeneze, u odnosu na kontrolne diferencirane stanice, s obzirom na vremenski period djelovanja……57
Tablica 5.14. Proteinska ekspresija PPARG u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica …….……..61
Tablica 5.15. Statistički značajne razlike u proteinskoj ekspresiji PPARG u 3T3-L1 stanicama s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana……62
Tablica 5.16. Proteinska ekspresija CEBPA u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica……...65
Tablica 5.17. Statistički značajne razlike u proteinskoj ekspresiji CEBPA u 3T3-L1 stanicama s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana……66
Tablica 5.18. Proteinska ekspresija SREBP1C u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica……...69
Tablica 5.19. Statistički značajne razlike u proteinskoj ekspresiji SREBP1C u 3T3-L1 stanicama s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana……70
Tablica 5.20. Proteinska ekspresija STAT3 u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica ……...73
Tablica 5.21. Statistički značajne razlike u proteinskoj ekspresiji STAT3 u 3T3-L1 stanicama s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana……74
Tablica 5.22. Proteinska ekspresija SMAD3 u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica ……...79

Tablica 5.23. Statistički značajne razlike u proteinskoj ekspresiji SMAD3 u 3T3-L1 stanicama s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana……80
Tablica 5.24. Učinak metformina i simvastatina na razine proteina ispitivanih transkripcijskih čimbenika i modulatora adipogeneze s obzirom na vremenski period djelovanja, određeno Western blot metodom u odnosu na kontrolne diferencirane stanice…….84
Tablica 5.25. Jačina signala imunofluorescencije PPARG u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica ……...88
Tablica 5.26. Jačina signala imunofluorescencije CEBPA u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica ……...90
Tablica 5.27. Statistički značajne razlike u jačini signala imunofluorescencije CEBPA u 3T3-L1 stanicama s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana……91
Tablica 5.28. Jačina signala imunofluorescencije SREBP1C u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica……...93
Tablica 5.29. Statistički značajne razlike u jačini signala imunofluorescencije SREBP1C u 3T3-L1 stanicama s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana……....94
Tablica 5.30. Jačina signala imunofluorescencije STAT3 u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica……...96
Tablica 5.31. Statistički značajne razlike u jačini signala imunofluorescencije STAT3 u 3T3-L1 stanicama s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana……97
Tablica 5.32. Jačina signala imunofluorescencije SMAD3 u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica……...99
Tablica 5.33. Statistički značajne razlike u jačini signala imunofluorescencije SMAD3 u 3T3-L1 stanicama s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana…….....100
Tablica 5.34. Učinak metformina i simvastatina na razine proteina ispitivanih transkripcijskih čimbenika i modulatora adipogeneze s obzirom na vremenski period djelovanja, određeno imunocitokemijom u odnosu na kontrolne diferencirane stanice……...101

Popis slika

Slika 5.1. Prikaz nakupljanja lipidnih kapljica histokemijskim Oil-Red-O bojanjem 3T3-L1 stanica nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima……....40

Slika 5.2. Prikaz agaroznog gela nakon elektroforeze PCR produkata *Pparg* iz uzoraka 3T3-L1 stanica nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima.……...42

Slika 5.3. Prikaz agaroznog gela nakon elektroforeze PCR produkata *Cebpa* iz uzoraka 3T3-L1 stanica nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima.……...45

Slika 5.4. Prikaz agaroznog gela nakon elektroforeze PCR produkata *Srebp1c* iz uzoraka 3T3-L1 stanica nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima.…….……..48

Slika 5.5. Prikaz agaroznog gela nakon elektroforeze PCR produkata *Stat3* iz uzoraka 3T3-L1 stanica nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima.……...50

Slika 5.6. Prikaz agaroznog gela nakon elektroforeze PCR produkata *Smad3* iz uzoraka 3T3-L1 stanica nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima.……53

Slika 5.7. Prikaz Western blot detekcije proteinskih vrpci PPARG i unutarnje kontrole GAPDH u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima……60

Slika 5.8. Prikaz Western blot detekcije proteinskih vrpci CEBPA i unutarnje kontrole GAPDH u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima……..…..64

Slika 5.9. Prikaz Western blot detekcije proteinskih vrpci SREBP1C i unutarnje kontrole GAPDH u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima..…..68

Slika 5.10. Prikaz Western blot detekcije proteinskih vrpci STAT3 i unutarnje kontrole GAPDH u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima…...……..72

Slika 5.11. Prikaz Western blot detekcije proteinskih vrpci SMAD3 i unutarnje kontrole GAPDH u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima…….78

Slika 5.12. Prikaz proteinske ekspresije PPARG fluorescentnim imunocitokemijskim bojanjem 3T3-L1 stanica nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima……87

Slika 5.13. Prikaz proteinske ekspresije CEBPA fluorescentnim imunocitokemijskim bojanjem 3T3-L1 stanica nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima…..…….……89

Slika 5.14. Prikaz proteinske ekspresije SREBP1C fluorescentnim imunocitokemijskim bojanjem 3T3-L1 stanica nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima……92

Slika 5.15. Prikaz proteinske ekspresije STAT3 fluorescentnim imunocitokemijskim bojanjem 3T3-L1 stanica nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima……95

Slika 5.16. Prikaz proteinske ekspresije SMAD3 fluorescentnim imunocitokemijskim bojanjem 3T3-L1 stanica nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima. ……..…98

1. Uvod

1.1. Masno tkivo i adipociti

Masno tkivo dugo se smatralo inertnim skladištem energije, no danas znamo da je to važan endokrini organ s funkcijom regulacije energetske ravnoteže i homeostaze glukoze u organizmu. Sastoji se od nekoliko vrsta stanica: masne stanice (adipociti), fibroblasti i preadipociti, te stanice imunološkog, hematološkog, krvožilnog i živčanog sustava (1). Masno tkivo čini 20 – 25% ukupne tjelesne mase zdravog organizma i podijeljeno je na nekoliko odjeljaka s razvojnim i funkcionalnim razlikama. Bijelo masno tkivo dijeli se na supkutano i visceralno, zauzima najveći volumen masnog tkiva u tijelu odraslog čovjeka i važno je za skladištenje energije, endokrinu komunikaciju i osjetljivost na inzulin. Višak energije pohranjuje se u bijelom masnom tkivu u obliku triglicerida, te se u energetskom deficitu otpušta u krv u obliku masnih kiselina (engl. *fatty acid,* FA) i glicerola koji služe kao izvor energije ostalim organima (2).

Bijeli adipociti sadrže centralno smještenu lipidnu kapljicu ispunjenu trigliceridima. Jezgra i ostale stanične organele lokalizirane su periferno unutar tanke citoplazmatske opne koja okružuje lipidnu kapljicu, što stanici daje histološki izgled prstena pečatnjaka. Nezreli adipociti sadrže nekoliko multilokularnih manjih lipidnih kapljica koje se procesom sazrijevanja adipocita spajaju u jednu veliku unilokularnu lipidnu kapljicu. Bijeli adipociti se zbog velikog kapaciteta skladištenja lipida mogu proširiti do 100 μm u promjeru, a njihova sposobnost povećanja broja i volumena razlikuje se s obzirom na smještaj unutar pojedinog odjeljka bijelog masnog tkiva (3).

Smeđe masno tkivo nalazimo u manjim količinama u supraklavikularnoj i torakalnoj regiji odraslog čovjeka, a zaslužno je za potrošnju energije putem termogeneze (1). Smeđi adipociti sadrže multilokularne masne kapljice i veliki broj mitohondrija s karakterističnom ekspresijom tzv. razvezujućeg proteina 1 (engl. *uncoupling protein,* UCP1) koji razdvajaju oksidaciju supstrata od sinteze adenozin trifosfata (engl. *adenosine triphosphate,* ATP) na način da se energija dobivena oksidacijom hranjivih tvari u ciklusu limunske kiseline ne koristi za sintezu ATP-a nego se raspršuje u obliku topline protonskim gradijentom kroz unutarnju membranu mitohondrija tijekom prolaska elektrona kroz respiracijski lanac (4). Smeđi adipociti su manji, s promjerom 15 – 50 μm. U novije vrijeme su unutar bijelog masnog tkiva čovjeka pronađene stanice tzv. bež masnog tkiva, odnosno bež adipociti koji posjeduju kombinirane karakteristike bijelih i smeđih adipocita (3). Genska ekspresija bež adipocita govori u prilog

termogenoj vrsti adipocita koji nastaju kao odgovor na stimulaciju hladnoćom, tjelovježbom, prehranom i adipocitokinima (5).

1.2. Metabolizam lipida

Tijekom dužeg razdoblja gladovanja ili intenzivne tjelesne aktivnosti nastupa proces lipolize kojim se trigliceridi hidroliziraju u FA i glicerol djelovanjem adipozne trigliceridne lipaze (ATGL), hormonski osjetljive lipaze (engl. *hormone-sensitive lipase,* HSL) i monogliceridne lipaze (MGL). Hormonska stimulacija glukagonom i noradrenalinom potiče stvaranje sekundarnog glasnika cikličkog adenozin monofosfata (engl. *cyclic adenosine monophosphate,* cAMP) s posljedičnom aktivacijom cAMP-ovisne protein kinaze A (PKA) koja stimulira lipolizu fosforiliranjem i aktiviranjem perilipina i HSL-a. Perilipin ima centralnu ulogu u regulaciji hidrolize triglicerida (6). U bazalnom ili anaboličkom stanju, perilipin je vezan za CGI-58 (engl. *comparative gene identification-58,* CGI-58), koji djeluje kao koaktivator ATGL-a, limitirajućeg enzima lipolize. Nakon adrenergičke stimulacije, CGI-58 se otpušta, ATGL se aktivira i dolazi na površinu lipidne kapljice gdje oslobađa prvu FA, tvoreći diacilglicerol. Zatim HSL iz diacilglicerola oslobađa drugu FA i monoacilglicerol, a proces završava MGL stvaranjem treće FA i molekule glicerola (7). Transportirajući se pretežno limfom, FA postaju dostupne za oksidaciju i sintezu ATP-a u cijelom organizmu, a glicerol služi kao supstrat za glukoneogenezu i glikolizu u jetri (8).

Oksidacija FA za proizvodnju energije odvija se primarno u matriksu mitohondrija. Bijelo masno tkivo tijekom adipogeneze prolazi kroz ekspanziju mitohondrija i povećava kapacitet za oksidaciju FA. Prije ulaska u matriks mitohondrija, FA se aktiviraju formirajući tioestersku vezu s acetil-koenzimom A (engl. *coenzyme A,* CoA) na vanjskoj membrani mitohondrija, što katalizira acil-CoA sintetaza. Aktivirane dugolančane FA prenose se kroz unutarnju mitohondrijsku membranu u dva koraka. U prvom koraku dolazi do konjugacije s karnitinom i stvaranja acil-karnitina, pri čemu se CoA oslobađa u citosol. Tu reakciju katalizira karnitin aciltransferaza I, također poznata kao karnitin palmitoil transferaza I (engl. *carnitine palmitoyl transferase I,* CPT1), vezana na vanjsku mitohondrijsku membranu. U drugom koraku karnitin translokaza (engl. *carnitine-acylcarnitine translocase,* CACT) prenosi acil karnitin kroz unutarnju mitohondrijsku membranu u matriks mitohondrija. Acilna skupina se tako oslobađa i ponovno veže za CoA, što katalizira karnitin aciltransferaza 2, odnosno karnitin palmitoil transferaza 2 (engl. *carnitine palmitoyl transferase 2,* CPT2*).* CACT prenosi oslobođeni karnitin u citoplazmu u zamjenu za nadolazeći acil karnitin. Sama oksidacija

zasićenih FA odvija se u četiri koraka: 1. oksidacija FA (dehidrogenacija flavin adenin dinukleotidom), odnosno stvaranje dvostruke veze između C2 i C3, što katalizira enzim acil-CoA dehidrogenaza; 2. hidratacija dvostruke veze između C2 i C3 enoil-CoA hidratazom; 3. oksidacija L-3-hidroksiacil-CoA dehidrogenazom, pri čemu se hidroksilna skupina na C3 konvertira u ketonsku skupinu uz redukciju nikotinamid adenin nukleotida iz NAD^+ u NADH, te nastaje 3-ketoacil-CoA; 4. tioliza, odnosno razdvajanje C2 i C3 3-ketoacil-CoA tiolnom skupinom koja pripada drugoj molekuli CoA, što katalizira β-ketotiolaza. Krajnji produkti su acetil-CoA i acil-CoA kraći za dva atoma ugljika (9).

Sinteza FA odvija se pomoću kompleksa enzima nazvanog sintaza masnih kiselina (engl. *fatty acid synthase,* FAS), iz prekursora acetil-CoA. Iako je sinteza FA po svojim osnovnim kemijskim reakcijama proces obrnut razgradnji FA, metabolički putevi sinteze i razgradnje FA su različiti. Sinteza FA započinje karboksilacijom acetil-CoA u malonil-CoA, katalizirano acetil-CoA karboksilazom (engl. *acetyl-CoA carboxylase,* ACC). Acetil-CoA i malonil-CoA se vežu za protein prenositelj acilnih skupina (engl. *acyl carrier protein,* ACP), formirajući acetil-ACP i malonil-ACP, čime započinje faza elongacije koja se odvija u nekoliko koraka, s konačnim rezultatom sinteze palmitata iz kojeg se mogu sintetizirati druge FA (9).

U postprandijalnom stanju trigliceridi uneseni prehranom prenose se hilomikronima do adipocita gdje se membranskim lipazama razgrađuju na FA i glicerol, a zatim se unutarstanično FA postupno ponovno esterificiraju s glicerolom u trigliceride i pohranjuju u lipidne kapljice. Tipičnom prehranom Zapadnog svijeta u organizam se unose dovoljne količine masti i lipida, te postoji mala potreba za *de novo* sintezom triglicerida iz nelipidnih metabolita kao što je glukoza (10). Iako je jetra glavno mjesto sinteze triglicerida, adipociti su također sposobni sintetizirati trigliceride iz suviška cirkulirajuće glukoze *de novo* lipogenezom. Tijekom razdoblja gladovanja, u masnom tkivu se 20 – 25% glukoze unesene u adipocite koristi za sintezu triglicerida (11). Početni korak pri sintezi je redukcija dihidroksiaceton fosfata (engl. *dihydroxyacetone phosphate,* DHAP), produkta glikolize, u glicerol-3-fosfat, koji se dodatkom dvije FA pretvara u fosfatidat, osnovu sinteze i pohrane triglicerida. Fosfatidat se zatim defosforilizira i formira diacilglicerol (DAG). Hidrolizu fosfatidata u DAG katalizira ključni enzim u regulaciji sinteze lipida, fosfatidat fosfataza (engl. *phosphatidate phosphatase,* PAP). Dodatkom FA u diacilglicerol, uz katalizu diglicerid aciltransferazom (DGAT), nastaje triglicerid (12). S druge strane, diacilglicerol može biti fosforiliran do fosfatidata pomoću diacilglicerol kinaze.

Kolesterol nastaje iz acetil-CoA kroz tri koraka: sinteza izopentenil-pirofosfata odvija se u citoplazmi, a kondenzacija šest molekula izopentenil-pirofosfata u skvalen i ciklizacija

skvalena u kolesterol odvijaju se u endoplazmatskom retikulumu. Sinteza kolesterola započinje sintezom mevalonata iz hidroksimetil-glutaril koenzima A (engl. *3-hydroxy-3-methyl-glutaril-coenzyme A,* HMG-CoA), što katalizira hidroksimetil-glutaril koenzim A reduktaza (engl. *3-hydroxy-3-methyl-glutaril-coenzyme A reductase,* HMGCR), i to je odlučujući korak u sintezi kolesterola. Kolesterol se u organizam može unijeti hranom ili se sintetizirati *de novo* u jetri kao primarnom mjestu sinteze kolesterola. Biosinteza kolesterola jedan je od najstrože kontroliranih metaboličkih puteva. Brzina sinteze kolesterola ovisi o staničnoj razini kolesterola, a ta povratna sprega kontrolirana je primarno količinom i aktivnošću HMGCR. Kontrola HMGCR odvija se na nekoliko razina: brzinu sinteze mRNA HMGCR kontrolira protein koji veže regulacijski element sterola (engl. *sterol regulatory element-binding protein,* SREBP), potičući transkripciju pri niskim razinama kolesterola; brzinu translacije mRNA HMGCR inhibiraju metaboliti mevalonata; povećanje koncentracije kolesterola dovodi do proteolitičkog razlaganja HMGCR; PKA fosforilira i inaktivira HMGCR u stanjima niske razine ATP-a. Kolesterol se prenosi krvotokom u sastavu lipoproteina. Lipoproteine prema gustoći čestice dijelimo na hilomikrone, ostatne hilomikrone, lipoproteine vrlo male gustoće (engl. *very low-density lipoprotein,* VLDL*),* lipoproteine male gustoće (engl. *low-density lipoprotein,* LDL) lipoproteine srednje gustoće (*engl. intermediate-density lipoprotein,* IDL) i lipoproteine visoke gustoće (engl. *high density lipoprotein,* HDL). Što je veća količina vezanih lipida, čestica ima manju gustoću. VLDL prenosi višak triglicerida i kolesterola iz jetre u druga tkiva. LDL je glavni prenositelj kolesterola u krvi, a njegova uloga je transport kolesterola u periferna tkiva i regulacija *de novo* sinteze kolesterola. HDL je odgovoran za reverzni transport kolesterola iz ekstrahepatičnih tkiva u jetru (13).

1.3. Adipocitokini

Adipociti ne služe samo kao skladište lipida, nego su ključni metabolički regulatori koji izlučuju adipocitokine, hormone i metaboličke supstrate, s utjecajem na metabolizam cijelog organizma. Adipocitokini imaju snažan utjecaj na imunološki sustav, krvne žile i inzulinsku osjetljivost. Kod pretilih osoba hipertrofični adipociti mijenjaju intracelularni metabolizam, a produkcija gotovo svih adipocitokina, osim adiponektina, u pretilosti se povećava (14). Promjene u izlučivanju adipocitokina prenose disfunkciju masnog tkiva na druga tkiva – jetru, mišiće i mozak, znatno pridonoseći pogoršanju metabolizma na razini cijelog organizma.

Adipocitokini su bioaktivni peptidi s učincima na regulaciju metabolizma, imunosti i upalnih procesa. U adipocitokine ubrajamo leptin, adiponektin, interleukin 6 (IL-6), monocitni

kemotaktični protein-1 (engl. *monocyte chemoattractant protein-1,* MCP-1), inhibitor aktivatora plazminogena 1 (engl. *plasminogen activator inhibitor-1,* PAI-1), retinol vezujući protein 4 (engl. *retinol binding protein 4,* RBP4), čimbenik nekroze tumora alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha,* TNF-α), visfatin, omentin, vaspin, progranulin, apelin i kemerin.

Adiponektin je protuupalni citokin koji djeluje antiaterogeno, antidijabetički i kardioprotektivno (15). Glavna mu je uloga povećanje osjetljivosti ciljnih tkiva na inzulin s posljedičnim smanjenjem inzulinske rezistencije. Njegovu sintezu i lučenje u velikoj mjeri kontrolira količina masnog tkiva – razina adiponektina smanjuje se s povećanjem količine masnog tkiva. Smanjena sekrecija adiponektina u pretilosti ima ključnu ulogu u razvoju komplikacija povezanih s pretilošću, kao što su dislipidemija, hipertenzija i šećerna bolest tipa 2 (engl. *diabetes mellitus type 2,* DMT2) (16). Adiponektin je po građi protein s 244 aminokiseline i četiri domene: amino-terminalna signalna sekvenca, varijabilna regija, kolagenska domena i karboksi-terminalna globularna domena. Sintetizira se kao monomer koji se može povezivati u homo-oligomere različite molekularne mase: trimeri niske molekularne mase, heksameri srednje molekularne mase te oligomeri visoke molekularne mase. U serumu postoje dvije forme monomera adiponektina, globularni adiponektin (engl. *globular adiponectin,* gAPN) i adiponektin pune duljine (engl. *full-length adiponectin,* fAPN). Povećane razine gAPN-a povezane su s poboljšanjem energetskog metabolizma i funkcije masnog tkiva. Oligomeri adiponektina su važni za inzulinsku osjetljivost i njihova niska razina predstavlja rizični čimbenik za razvoj metaboličkih poremećaja povezanih s pretilosti. Razina ukupnog adiponektina i oligomera adiponektina obrnuto je proporcionalna s indeksom tjelesne mase (engl. *body mass index,* BMI), razinom glukoze, inzulina i triglicerida, stupnjem inzulinske rezistencije i akumulacije visceralne masnoće (17). Dvije su vrste receptora adiponektina (engl. *adiponectin receptor,* AdipoR), AdipoR1 i AdipoR2. AdipoR1 je najviše izražen u mišićima i ima veći afinitet za gAPN, dok je AdipoR2 najviše izražen u jetri i ima veći afinitet za fAPN. U formi monomera, fAPN u jetri aktivira transport glukoze i inhibira glukoneogenezu putem AdipoR1, te povećava oksidaciju FA putem AdipoR2 receptora (18). U mišićnim stanicama gAPN i fAPN stimuliraju fosforilaciju acetil-CoA karboksilaze, oksidaciju FA i unos glukoze u stanicu. U masnom tkivu povećava bazalni unos glukoze i unos glukoze stimuliran inzulinom. Adiponektin povećava osjetljivost na inzulin putem peroksisomskim proliferatorom aktiviranog receptora gama (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma,* PPAR-γ), i njegova ekspresija se povećava 3 – 4 dana poslije diferencijacije adipocita te se smatra markerom kasne faze adipogeneze (19).

Leptin je peptidni hormon s važnim djelovanjem na energetsku ravnotežu, unos hrane i tjelesnu težinu. Također djeluje kao proupalni citokin koji povećava adheziju makrofaga i fagocitozu. Utječe i na krvni tlak, inzulinsku osjetljivost perifernog tkiva i funkciju β-stanica gušterače. Razine cirkulirajućeg leptina izravno su proporcionalne s količinom masnog tkiva u organizmu. Kada se količina masnog tkiva smanji, smanjuje se i razina leptina, što dovodi do povećanog unosa hrane u organizam. Povećanje tjelesne težine povisuje razine leptina, što utječe na smanjenje unosa hrane. Leptin ostvaruje svoj utjecaj na apetit preko dvije skupine hipotalamičkih neurona u nucleus arcuatusu, neurona koji oslobađaju neuropeptid Y (NPY) i peptid srodan agouti signalnom peptidu (engl. *agouti-related protein,* AgRP) koji stimuliraju unos hrane, te neurona koji oslobađaju proopiomelanokortin (engl. *proopiomelanocortin,* POMC) i kokainom i amfetaminom reguliran transkript (engl. *cocaine- and amphetamine-regulated transcript,* CART) koji inhibiraju unos hrane (20). Obje skupine izražavaju leptinski receptor (LEP-R), ali stimulacijom ostvaruju suprotne učinke. Leptin potiče ekspresiju anoreksičnih POMC gena, uz istodobno smanjenje ekspresije oreksigenih AgRP gena, potičući osjećaj sitosti i smanjeno uzimanje hrane. Na razini perifernih organa, leptin inhibira sintezu i sekreciju inzulina i glukagona iz gušterače, povećava iskorištavanje glukoze i oksidaciju FA u mišićnim stanicama, te potiče lipolizu i oksidaciju FA u adipocitima (21). U pretilosti su razine leptina visoke, što ukazuje na postojanje leptinske rezistencije, odnosno smanjene osjetljivosti organizma na leptin, karakterizirano povišenim razinama cirkulirajućeg leptina uz hiperfagiju i pretilost (22).

Rezistin je nedavno otkriveni hormon sa sposobnošću induciranja inzulinske rezistencije i inhibicije diferencijacije adipocita *in vitro*. Kod ljudi se najvećim dijelom izlučuje iz makrofaga, a studije pokazuju njegovu ulogu u metaboličkoj disfunkciji. Visoke razine rezistina povezane su s aterosklerozom, koronarnom bolesti, zatajenjem srca i autoimunim bolestima (3).

Hipertrofični adipociti proizvode velike količine MCP-1 koji potiču inflitraciju makrofaga u masno tkivo. Aktivirani makrofagi luče proinflamatorne molekule koje stimuliraju daljnju proizvodnju MCP-1. Hipertrofični adipociti i aktivirani makrofagi sinergistički izazivaju upalnu reakciju masnog tkiva što vodi do sve većeg poremećaja u proizvodnji adipocitokina. Stoga se produkcija MCP-1 može smatrati prvim korakom u nastanku komplikacija povezanih s pretilosti (14).

TNF-α je proupalni citokin kojeg luče makrofagi, adipociti i vaskularne endotelne stanice. Njegova ekspresija pozitivno korelira s BMI, stupnjem pretilosti i razinom inzulina, a smanjuje se pri gubitku tjelesne težine. Povećane razine TNF-α povezane su s povećanim

lučenjem ostalih proupalnih citokina i povećanom infiltracijom masnog tkiva makrofagima. U adipocitima mijenja inzulinsku unutarstaničnu signalizaciju i potiče inzulinsku rezistenciju prevencijom interakcije inzulina s inzulinskim receptorima. Aktivirajući HSL pokreće lučenje slobodnih FA iz masnog tkiva u krvotok što dovodi do njihovog nakupljanja u jetri i skeletnim mišićima (23).

IL-6 je proupalni citokin s važnom ulogom u hematopoetskom, neurološkom i endokrinom sustavu. Osim stanica imunološkog sustava, luče ga i adipociti te njegove razine pozitivno koreliraju s BMI i količinom masnog tkiva – razine IL-6 su povišene u pretilosti, što vodi nastanku inzulinske rezistencije i DMT2 (24).

Omentin je selektivno visoko eksprimiran u visceralnom omentalnom masnom tkivu. U humanim adipocitima pospješuje unos glukoze u stanice. U pretilosti i šećernoj bolesti njegove razine su smanjene i negativno koreliraju s markerima pretilosti kao što je BMI. Značajno povećanje razina omentina nastupa nakon gubitka tjelesne težine uslijed hipokalorijske prehrane, što je praćeno i poboljšanjem inzulinske osjetljivosti. Regulacija izlučivanja omentina iz masnog tkiva još nije u potpunosti razjašnjena, ali zna se da inzulin i glukoza smanjuju ekspresiju mRNA omentina u visceralnom masnom tkivu (25).

1.4. Adipogeneza

Adipogeneza je proces proliferacije nediferenciranih prekursora (preadipocita) i njihove diferencijacije u zrele adipocite, te je važna odrednica broja adipocita i ukupne količine masnog tkiva (26). Proces adipogeneze može se podijeliti u dva velika koraka: u prvom se pluripotentna matična stanica razvija u mezenhimalnu matičnu stanicu sa sposobnošću pretvorbe u adipocit, miocit, hondrocit ili osteocit; u drugom koraku mezenhimalna se stanica formira u preadipocit, koji se završno može diferencirati u zreli adipocit (5). Uslijed globalne epidemije pretilosti i dostupnosti modela staničnih kultura za detaljno ispitivanje procesa adipogeneze *in vitro*, adipogeneza je postala jedan od najistraživanijih bioloških procesa. Razumijevanje adipogeneze važno je u razvijanju novih lijekova za liječenje pretilosti, a kompleksna interakcija metaboličkih puteva tijekom adipogeneze još uvijek je predmet istraživanja.

1.4.1. Adipogeneza *in vitro*

Stanične kulture adipocita postale su neizostavan dio istraživanja adipocitne patofiziologije i energetskog metabolizma. Diferencijacija multipotentnih 3T3-L1 fibroblasta u zrele masne stanice jedan je od najčešće upotrebljavanih *in vitro* modela za proučavanje biologije masnog tkiva. 3T3-L1 klonalnu staničnu liniju razvili su Green i Kehinde kao podvrstu švicarskih 3T3 mišjih stanica sa sposobnošću akumulacije lipida (27,28). Nakon indukcije diferencijacije proadipogenim čimbenicima, ova linija pokazuje morfologiju, gensku ekspresiju i bazalnu bioenergetiku bijelog masnog tkiva (29). Zbog toga je ovaj model postao ključan za unapređenje razumijevanja adipogeneze, lipidnog metabolizma i djelovanja hormona.

Proces adipogeneze *in vitro* odvija se u četiri koraka: zaustavljanje staničnog ciklusa, mitotička klonalna ekspanzija (engl. *mitotic clonal expansion,* MCE), rana diferencijacija i završna diferencijacija (30). Tijekom eksponencijalnog rasta, 3T3-L1 stanice morfološki i biokemijski nalikuju ostalim fibroblastnim staničnim linijama koje imaju jako malo kapaciteta za adipogenezu. Nakon dostizanja pune konfluentnosti, kontaktnom inhibicijom se zaustavlja stanični ciklus i stanice mogu ostati u fazi mirovanja kroz duže vrijeme, te se diferencirati u zrele adipocite. Nakon početnog tretmana inzulinom, deksametazonom i 3-izobutil-1-metilksantinom (engl. *3-isobutyl-1-methylxanthine,* IBMX) (31) stanice ponovno sinkrono ulaze u stanični ciklus i prođu još nekoliko ciklusa mitoze (MCE). Nakon toga slijedi drugo, trajno zaustavljanje staničnog ciklusa, promjene u ekspresiji gena i proteina, te ekspresija fenotipa potpuno diferenciranog adipocita (32). Dakle, jednom kada stanice uđu u proces diferencijacije, izgube sposobnost nastavka staničnog rasta. MCE je važan preduvjet za proces diferencijacije – ako se stanicama spriječi ulazak u S fazu tijekom MCE, neće doći do ekspresije transkripcijskih čimbenika i regulatora adipogeneze te će diferencijacija biti blokirana (33). Mitoza stanice potrebna je za odmatanje DNA što omogućuje transkripcijskim čimbenicima pristup regulatornim elementima u genima uključenima u proces diferencijacije (34). Obilježje rane diferencijacije je morfološko zaobljavanje preadipocita, a završna faza diferencijacije karakterizirana je sintezom i transportom lipida, izlučivanjem proteina specifičnih za adipocite, te aktivacijom metaboličkih procesa i mehanizama povezanih s djelovanjem inzulina (35).

Povećana ekspresija adipogenih gena povećava unos glukoze u stanice i sintezu triglicerida, te stanice počinju pokazivati karakteristike nakupljanja lipida četiri dana nakon indukcije adipogeneze (36). U početku se pojavljuju stanice s brojnim manjim lipidnim kapljicama, koje podsjećaju na stanice smeđeg masnog tkiva. U kasnijim stadijima stanice

poprimaju izgled prstena pečatnjaka i nalikuju stanicama bijelog masnog tkiva, jer se manje lipidne kapljice skupe u jednu veliku centralnu lipidnu kapljicu okruženu tankim rubom citoplazme, s ekscentrično smještenom jezgrom. U stanicama s masivnom akumulacijom lipida možemo vidjeti i po dvije jezgre, jer se mitoza odvija bez citokineze (27). Stanice nekoliko tjedana provedu u anaboličkoj fazi tijekom koje skupljaju trigliceride – kada količina triglicerida dovoljno poraste, stanice postaju lakše od medija. Akumulacija lipida počinje u onim stanicama gdje je prvo nastupio zastoj staničnog ciklusa (stanice u sredini monosloja). Konverzija u adipocite događa se zbog povećanja sinteze triglicerida uslijed povećane aktivnosti enzima potrebnih za sintezu FA i triglicerida (37). Sinteza triglicerida poraste kada stanice prestanu rasti, ali akumulacija triglicerida počinje čak i kada se brzina sinteze triglicerida ne mijenja, jer zastoj staničnog rasta i diobe prevenira daljnju diluciju triglicerida među novim stanicama. Proces zahvaća 70-90% stanica koje podliježu morfološkim i metaboličkim promjenama, odražavajući učinak lipogenih i lipolitičkih enzima na sintezu i akumulaciju triglicerida tijekom procesa nastanka adipocita kod sisavaca (38).

1.5. Transkripcijska kontrola procesa adipogeneze

Proces adipogeneze je strogo reguliran transkripcijskom kaskadom i signalnim putevima. Na početku procesa adipogeneze, unutar 24h od indukcije diferencijacije, nastupa prolazno povećanje ekspresije proteina koji veže CCAAT pojačivač (engl. *CCAAT/enhancer-binding protein,* C/EBP) β i δ. Stanice ponovno ulaze u stanični ciklus i izlaze iz faze MCE sinkrono. Na prijelazu iz G1 u S fazu, kinaza glikogen sintaze 3 beta (engl. *glycogen synthase kinase 3 beta,* GSK-3β) i protein kinaza aktivirana mitogenom (engl. *mitogen-activated protein kinase,* MAPK) hiperfosforiliraju i aktiviraju C/EBP-β. U srednjoj fazi adipogeneze C/EBP-β i C/EBP-δ stimuliraju transkripciju C/EBP-α i PPAR-γ, ključnih transkripcijskih čimbenika u procesu adipogeneze (34). Iako ekspresija C/EBP-β počinje dva sata nakon indukcije diferencijacije, stimulacija transkripcije C/EBP-α i PPAR-γ događa se s vremenskim odmakom, istodobno s izlaskom stanica iz staničnog ciklusa. Taj vremenski odmak je neophodan jer C/EBP-α i PPAR-γ djeluju antimitotički, te bi njihova prerana ekspresija spriječila MCE koja je nužna za diferencijaciju (39). PPAR-γ i C/EBP-α putem pozitivne povratne sprege promiču diferencijaciju i indukciju leptina, adiponektina, lipoprotein lipaze (LPL), adipocitnog proteina 2 (aP2), FAS i perilipina u završnoj fazi diferencijacije (32). Do drugog dana ciklin D3 fosforilira C/EBP-α čime se inducira inhibicija stanične proliferacije i započinje terminalna faza diferencijacije. Do osmog dana, više od 90% adipocita sazrije (34).

Tijekom procesa adipogeneze *in vitro*, inzulin povećava uzimanje glukoze iz medija i njenu ugradnju u trigliceride; deksametazon putem glukokortikoidnog signalnog puta potiče ekspresiju C/EBP-δ te inhibira razgradnju masti, a IBMX povećava razine cAMP i povećava ekspresiju C/EBP-β (40). Najraniji događaj je morfološko zaobljavanje preadipocita i indukcija C/EBP-β i C/EBP-δ u ranoj fazi diferencijacije, praćeno povećanjem razine C/EBP-α i PPAR-γ te ekspresijom LPL, FAS, ACC i aP2 u završnoj fazi diferencijacije. Za održavanje terminalne faze diferencijacije potrebna je neprekidna ekspresija C/EBP-α koja ima mogućnost aktiviranja ostalih adipocitnih gena.

PPAR-γ pripada obitelji nuklearnih hormonskih receptora i ligandom je aktivirani transkripcijski čimbenik. Veže se na specifična mjesta na DNA, poznata kao elementi odgovora na peroksisomni proliferator (engl. *peroxisome proliferator response element,* PPRE) kao heterodimer s retinoidnim X receptorom (RXR) i modulira transkrpiciju gena uključenih u lipidni metabolizam (41). PPAR-γ vezan je za PPRE čak i kada nije aktivan, a aktivacijom endogenim (nezasićene FA) ili sintetičkim (lijekovi) ligandima PPAR-γ otpušta korepresore i veže koaktivatore. Na taj način dolazi do ligandom-ovisne transkripcijske aktivacije obližnjih gena, što predstavlja osnovni mehanizam prema kojemu ligandi PPAR-γ stimuliraju transkripciju ciljnih gena PPAR-γ (42). PPAR-γ se smatra glavnim regulatorom procesa adipogeneze (32), a osim toga ima dominantnu ulogu u metabolizmu glukoze i upalnom procesu (43). Aktivacija PPAR-γ potiče ekspresiju adiponektina (44), a mutacije gena za PPAR-γ rezultiraju inzulinskom rezistencijom i lipodistrofijom (45). PPAR-γ ostvaruje svoj učinak preko dvije izoforme, PPAR-γ2 čija je ekspresija ograničena na masno tkivo i PPAR-γ1 koji se može naći i u ostalim tkivima (46).

C/EBP pripada obitelji transkripcijskih čimbenika tipa leucinskih zatvarača uključenih u proliferaciju i diferencijaciju nekoliko vrsta stanica (47), a također su i važni regulatori adipogeneze. Stanice se u nedostatku ekspresije C/EBP-α mogu diferencirati u zrele adipocite, ali nakupljaju manje lipidnih kapljica i ne induciraju ekspresiju PPAR-γ, što naglašava važnost uzajamne regulacije ova dva čimbenika u održavanju procesa diferencijacije (48). C/EBP-β, osim što aktivira C/EBP-α i PPAR-γ, ima važnu ulogu u regulaciji MCE, neophodnoj za adipogenezu *in vitro* (49), te suprimiranju WNT signalnog puta koji djeluje kao negativni regulator adipogeneze (50).

SREBP-1c, nekad poznat kao ADD1 (engl. *adipocyte determination and differentiation factor 1*) član je obitelji leucinskih transkripcijskih čimbenika s motivom uzvojnica-omča-uzvojnica, povezan s procesom adipogeneze i homeostazom kolesterola (51). Kada je eksprimiran u fibroblastima, može se vezati na E-box slijedove i regulacijske elemente sterola

(engl. *sterol regulatory element,* SRE) u koordiniranju lipidnih metaboličkih puteva (52). Tri su izoforme, SREBP-1a, SREBP-1c i SREBP-2. U bijelom masnom tkivu je predominantno eksprimiran SREBP-1c kao važan regulator gena povezanih s lipogenezom (53). Induciran je u ranoj fazi adipogeneze i pospješuje adipogenezu povećanom proizvodnjom endogenog liganda za PPAR-γ te povećanom transkripcijom FAS i LPL (54).

Signalni transduktor i aktivator transkripcije (STAT) obitelj je transkripcijskih čimbenika aktiviranih fosforilacijom tirozina putem Janus kinaza (JAK). Fosforilacija inicira dimerizaciju proteina koji se premještaju u jezgru i vežu za DNA te reguliraju transkripciju ciljanih gena (55). Članovi STAT obitelji uključeni su u brojne procese stanične diferencijacije i reguliraju tkivno specifičnu ekspresiju gena (56). Hormon rasta inducira fosforilaciju JAK i posljedičnu aktivaciju STAT5 proteina, koji inducira ekspresiju PPAR-γ (57). JAK2/STAT3 put aktiviran je tijekom rane adipogeneze i odgovoran je za postizanje maksimalnog potencijala diferencijacije, vjerojatno putem modulacije transkripcije C/EBP-β (58). Iako je STAT3 uglavnom rasprostranjen u citosolu i jezgri, sve je više dokaza da se može naći i u mitohondrijima gdje utječe na staničnu respiraciju (59). Za proces adipogeneze to znači da STAT3 povećava produkciju reaktivnih spojeva kisika (engl. *reactive oxygen species,* ROS) što dovodi do povećane ekspresije C/EBP-β tijekom MCE (60).

Čimbenik sličan Krüppel genu (engl. *Krüppel-like factor,* KLF) dio je obitelji transkripcijskih čimbenika s motivom cinkovog prsta. KLF4 potiče ekspresiju C/EBP-β, koji inducira KLF5, što dovodi do ekspresije PPAR-γ u ranoj fazi adipogeneze (61). Tijekom srednje faze adipogeneze povećava se ekspresija KLF9, koji aktivira PPAR-γ direktno vezanjem na njegov promotor i indirektno vezanjem na C/EBP-α (62). KLF15 također ima važnu ulogu u adipogenezi – njegova inhibicija reducira ekspresiju PPAR-γ i blokira adipogenezu. Više razine ekspresije KLF15 kod zrelih adipocita nakon nakupljanja lipidnih kapljica sugeriraju njegovu ulogu u kasnijim fazama adipogeneze (63). Međutim, KLF 2/3/7 djeluju inhibitorno na proces adipogeneze te je njihova ekspresija tijekom procesa diferencijacije smanjena (64–66).

Članovi porodice AP-1 (engl. *activator protein 1*) su Jun proteini (c-Jun, Junb i JunD), Fos proteini (c-Fos, FosB, Fra1 i Fra2), ATF (engl. *activating transcription factor*) i proteini Jun dimerizacije (engl. *Jun dimerization protein,* JDP). Reguliraju brojne stanične procese uključujući diferencijaciju, proliferaciju i apoptozu. Tijekom adipogeneze u 3T3-L1 stanicama, razine mRNA proteina c-Fos, c-Jun, FosB i Fra1 značajno su podignute neposredno nakon indukcije diferencijacije (67). Kod ljudi mutacija gena za c-Fos reducira njegovu aktivnost i

razvoj adipocita te je povezana s lipodistrofijom (68). Proteini porodice AP-1 induciraju aktivnost aP2 promotora (69).

Proteini cinkovog prsta (engl. *zinc finger proteins,* ZFP) imaju značajnu ulogu u procesu adipogeneze. ZFP423 i ZFP467 potiču razvoj adipocita. Tijekom diferencijacije 3T3-L1 stanica, ekspresija mRNA i proteina ZFP638 inducirana je ubrzo nakon indukcije adipogeneze, što sugerira njegovu ulogu pozitivnog regulatora rane faze adipogeneze koji interakcijom s C/EBP potiče ekspresiju PPAR-γ (70). U proteine cinkovog prsta ubrajamo i transkripcijske čimbenike GATA2 i GATA3 koji inhibiraju adipogenezu zarobljavajući stanice u preadipocitnoj fazi, što je dijelom rezultat direktne supresije PPAR-γ, ali i vezanja na C/EBP-α i C/EBP-β čime ometaju njihovu transkripcijsku aktivnost (71).

Protein koji veže elemente odgovora na ciklički adenozin monofosfat (engl. *cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-response element-binding protein,* CREB) je transkripcijski čimbenik s potencijalnom ulogom u kontroli adipogeneze – njegova ekspresija u 3T3-L1 staničnoj kulturi dovoljna je za induciranje adipogeneze, što je vidljivo kroz akumulaciju triglicerida i ekspresiju PPAR-γ i FAS (72).

1.6. Proadipogeni čimbenici

Inzulin i inzulinu sličan čimbenik rasta (engl. *insulin-like growth factor,* IGF) imaju važnu ulogu u procesu nastanka masnog tkiva (73), a u staničnim kulturama potiču proliferaciju i diferencijaciju preadipocita. Adipociti su osjetljivi na djelovanje inzulina koji stimulira unos glukoze u stanice i modulira metabolizam lipida na način da povećava akumulaciju i smanjuje razgradnju triacilglicerola i posljedično otpuštanje slobodnih masnih kiselina u cirkulaciju (3). Svoje djelovanje ostvaruju preko inzulinskih receptora (IR) i receptora za inzulinu sličan čimbenik rasta (engl. *insulin-like growth factor receptor,* IGF-IR). Vezanje inzulina i IGF-a na receptore uzrokuje auto-fosforilaciju supstrata inzulinskog receptora (engl. *insulin receptor substrate,* IRS), koji se veže na p85 regulatornu podjedinicu fosfoinozitid 3-kinaze (engl. *phosphoinositide 3-kinase,* PI3K). To rezultira povećanjem razine fosfatidilinozitol (3,4,5)-trifosfata (engl. *phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate,* PIP3) i posljedičnom fosforilacijom protein kinaze B (PKB), koja dalje fosforilira brojne supstrate uključene u inzulinsku signalnu kaskadu (74). Inzulinski signalni put također uključuje MAPK i kinazu reguliranu izvanstaničnim signalom (engl. *extracellular signal-regulated kinase,* ERK), odnosno MAPK/ERK signalni put. MAPK fosforilira i aktivira C/EBP-β, dok aktivacija ERK tijekom

prvih 12 sati diferencijacije povećava ekspresiju C/EBP-α i PPAR-γ (75). Inzulin nadalje potiče adipogenezu supresijom inhibitorne aktivnosti FOXO1 *(*engl. *forkhead box protein O1*) transkripcijskog čimbenika koji se veže na PPAR-γ i time sprječava njegovo vezanje na RXR. Mehanizam je posredovan fosforilacijom FOXO1 čime se inhibira njegova translokacija u jezgru i posljedično ometanje transkripcijske aktivnosti PPAR-γ (76). Inzulin također ostvaruje svoje proadipogene učinke putem stimulacije transkripcije SREBP-1C, čime povećava ekspresiju glukoznog prijenosnika tipa 4 (engl. *glucose transporter type 4,* GLUT4) u masnom tkivu (77) i povećava unos glukoze u stanicu. GLUT4 je odgovoran za unos glukoze u masne stanice stimuliranu inzulinom i ima važnu ulogu u homeostazi glukoze. Ekspresija mu je povećana tijekom diferencijacije adipocita, ali smanjuje se u obesogenim uvjetima. Smanjena ekspresija GLUT4 i unos glukoze u stanice markeri su disfunkcije adipocita u hipertrofičnom masnom tkivu (78). Inzulin suprimira lipolizu putem fosforilacije i aktivacije fosfodiesteraze 3B (engl. *phosphodiesterase 3B,* PDE3B), prevenira fosforilaciju i aktivaciju ATGL i HSL, povećava aktivnost ACC i sprječava prijenos FA u mitohondrije (79). Inzulin također potiče lipogenezu aktivacijom LPL-a i povećanjem transkripcije lipogenih enzima (3).

Glukokortikoidi imaju pleiotropni učinak u masnom tkivu regulirajući lipidni metabolizam, produkciju adipokina i adipogenezu. Signalizacija glukokortikoida potrebna je u prvih 48 h diferencijacije *in vitro*. U 3T3-L1 staničnoj liniji ubrzavaju adipogenezu povećanjem ekspresije ključnih transkripcijskih čimbenika, supresijom preadipocitnog čimbenika Pref-1 (*engl. preadipocyte factor 1*) koji djeluje kao inhibitor adipogeneze (80), te pojačanom ekspresijom KLF15 (81). Deksametazon u 3T3-L1 preadipocitima inducira ekspresiju C/EBP-δ koji u koordinaciji s C/EBP-β inducira ekspresiju PPAR-γ (82).

Hormoni štitnjače reguliraju nekoliko aspekata energijske homeostaze uključujući bazalni metabolizam, termogenezu, te metabolizam glukoze i lipida. Disfunkcija štitnjače povezana je s promjenama u težini i konstituciji tijela, tjelesnom temperaturom i bazalnim metabolizmom (83), na način da manjak hormona štitnjače dovodi do povećanja tjelesne težine. U 3T3-L1 staničnoj kulturi trijodtironin se veže na C/EBP-α i inducira njegovu ekspresiju, a također povećava ekspresiju PPAR-γ (84).

Koštani morfogenetski protein (engl. *bone morphogenic protein,* BMP) član je obitelji transformirajućeg čimbenika rasta beta (engl. *transforming growth factor beta,* TGF-β). BMP je citokin uključen u brojne regulatorne procese uključujući i diferencijaciju adipocita. Signalizacija putem BMP-a je kompleksna i ovisna o sastavu receptora i ravnoteži BMP-a i njegovih agonista. BMP ostvaruje svoje biološke učinke putem aktivacije dviju vrsta transmembranskih receptora, BMPR1 (engl. *bone morphogenetic protein receptor type 1*) i

BMPR2 (engl. *bone morphogenetic protein receptor type 2*). Oba receptora imaju tri podtipa receptora, od kojih BMPR1A potiče adipogenezu, a BMPR1B osteogenezu (85). Vezanjem na svoje receptore BMP potiče kanonsku signalizaciju putem fosforilacije SMAD 1/5/8 i ne-kanonsku p38 MAPK signalizaciju putem kinaze 1 aktivirane transformirajućim čimbenikom rasta beta (engl. *transforming growth factor beta (TGF-β)-activated kinase 1,* TAK1). Oba signalna puta potiču adipogenezu aktivacijom PPAR-γ (86).

MikroRNA su nekodirajuće sekvence RNA koje djeluju kao regulatori ekspresije ciljne mRNA suprimiranjem translacije ili degradacijom mRNA, rezultirajući smanjenom produkcijom proteina (87). Većina ih djeluje na mezenhimalne matične stanice potičući adipogenezu i suprimirajući osteogenezu (86). Ekspresija miR-143 povećava se tijekom diferencijacije, a njena inhibicija smanjuje nakupljanje triglicerida i ekspresiju PPAR-γ2, FAS i GLUT4. MiR378/378 je također visoko eksprimiran tijekom adipogeneze, a njena prekomjerna ekspresija povećava akumulaciju triglicerida i ekspresiju PPAR-γ i GLUT4.

1.7. Antiadipogeni čimbenici

Protein kinaza aktivirana adenozin monofosfatom (engl. *adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase,* AMPK) je serin/treonin protein kinaza sa središnjom ulogom u regulaciji energetske ravnoteže. Djeluje kao senzor energije u regulaciji glukoznog i lipidnog metabolizma (88). AMPK se aktivira kada poraste stanična energetska potreba ili se smanji opskrba energijom (smanjenje unutarstanične razine ATP-a ili povećanje razine AMP-a) (89), dakle prilikom vježbanja, ishemije, deprivacije glukoze i hipoksije. Fosforilirana AMPK inhibira anaboličke puteve koji troše ATP, kao što su sinteza FA, kolesterola i izoprenoida te hepatička glukoneogeneza, istodobno potičući stvaranje ATP-a putem kataboličkih procesa kao što su oksidacija FA i mišićni transport glukoze. Aktivacija AMPK inhibira adipogenezu u MCE fazi redukcijom ekspresije C/EBP-β i posljedičnom inhibicijom PPAR-γ, C/EBP-α, te markera kasne adipogeneze – FAS, aP2 i SREBP-1c (90). Osim metaboličkog učinka, aktivacija AMPK ima i protuupalne učinke što je osobito važno kod pretilosti koja u podlozi ima metaboličku disfunkciju i kronično proupalno stanje organizma (91). Ove aktivnosti AMPK potiču pitanje mogućnosti liječenja pretilosti, DMT2 i inzulinske rezistencije putem stimulacije AMPK u metabolički aktivnim tkivima (92). Skupina antidijabetičkih lijekova bigvanida i tiazolidindiona djeluje putem stimulacije AMPK, iako još uvijek nije jasno u kolikoj mjeri je njihov klinički učinak rezultat isključivo aktivacije AMPK (93). Skupina lijekova za

smanjenje razine lipida, statini, kao i nekoliko adipocitokina i hormona (grelin, leptin, adiponektin), također aktiviraju AMPK u nekim tkivima, iako su mehanizmi tih učinaka još nerazjašnjeni (94). Iako je uloga AMPK u jetrenim i mišićnim stanicama opsežno proučavana, uloga u masnom tkivu još uvijek nije jasna. Aktivacija AMPK može djelovati kao zaštitni čimbenik protiv disfunkcije adipocita u stanjima visoke produkcije citokina (14).

Vitamin D pohranjen je u masnom tkivu i regulira nekoliko aspekata biološke funkcije masnog tkiva, uključujući adipogenezu, produkciju adipokina i metabolizam lipida. Manjak vitamina D čest je kod pretilih osoba i rizični je čimbenik za razvoj inzulinske rezistencije i DMT2 (95). U 3T3-L1 staničnoj kulturi vitamin D inhibira adipogenezu što je vidljivo smanjenom ekspresijom PPAR-γ i smanjenim nakupljanjem lipidnih kapljica (96). Također dolazi do smanjenja ekspresije mRNA i proteina C/EBP-β u kritičnoj fazi diferencijacije (97).

Razlike u distribuciji masnog tkiva kod žena i muškaraca dijelom su posljedica djelovanja spolnih hormona. Smanjene razine estrogena kod postmenopauzalnih žena povezane su sa centralnom pretilošću i povećanim rizikom za nastanak metaboličkog sindroma (98). U 3T3-L1 staničnoj kulturi estradiol suprimira nakupljanje lipida (99). Smanjene razine muških spolnih hormona dovode do povećanja količine masnog tkiva te kardiovaskularnih i metaboličkih bolesti (100). U 3T3-L1 staničnoj kulturi androgeni potiču translokaciju kompleksa androgenih receptora s β-kateninom u jezgru i posljedičnu aktivaciju WNT/β-katenin signalnih puteva, što inhibira adipogenezu (101).

Obitelj WNT signalnih proteina sastoji se od brojnih glikoproteina koji se posttranslacijski modificiraju dodatkom lipida. WNT signalizacija ima važnu ulogu u staničnoj proliferaciji i diferencijaciji, a može biti kanonska i nekanonska. Najbolje proučavana WNT kanonska signalizacija je WNT/β-katenin signalni put koji inhibira diferencijaciju adipocita *in vitro* blokiranjem ekspresije gena odgovornih za MCE, vodeći u disregulaciju staničnog ciklusa, te blokiranjem ekspresije PPAR-γ i C/EBP-α (102). Aktivacija signalnog puta WNT/β-katenin rezultira inhibicijom GSK-3β i izostankom fosforilacije β-katenina koji se translocira u jezgru i koaktivira transkripcijske čimbenike, T-stanični čimbenik / čimbenik vezanja na limfoidni pojačivač (engl. *T-cell factor / lymphoid enhancer-binding factor,* TCF/LEF), što vodi inhibiciji PPAR-γ i C/EBP-α (103). WNT/β-katenin signalni put pokazuje proosteoblastičnu i antiadipocitnu aktivnost, te njegova inhibicija suprimira osteogenezu i promovira adipogenezu (86). Tijekom diferencijacije 3T3-L1 stanica, razina β-katenina je smanjena djelovanjem IBMX-a, a djelovanje WNT-a ili stalno aktivnog β-katenina inhibira adipogenezu preveniranjem indukcije PPAR- γ i C/EBP-α.

TGF-β se veže na svoje receptore te putem kanonske signalizacije fosforilacijom i aktivacijom SMAD proteina kontrolira transkripciju gena. Fosforilirani SMAD2 i SMAD3 vežu se na SMAD4 i translociraju u jezgru gdje reguliraju gensku transkripciju. Signalna kaskada TGF-β putem SMAD 2/3/4 inhibira diferencijaciju adipocita smanjenjem transkripcijske aktivnosti C/EBP-β i δ (104). Serumske razine TGF-β su povišene u pretilosti i DMT2 (105). U staničnoj kulturi 3T3-L1 preadipocita TGF-β u ranoj fazi adipogeneze može inhibirati diferencijaciju što se očituje gotovo potpunim nedostatkom lipidnih kapljica (106). U kasnoj fazi adipogeneze taj je učinak oslabljen, ali i dalje vidljiv.

Čimbenik rasta vezivnog tkiva (engl. *connective tissue growth factor,* CTGF) se može vezati na BMP i TGF-β i tako simultano suprimirati adipogenezu inhibirajući proadipogeni učinak BMP-a i aktivirajući antiadipogeni učinak TGF-β (107). Njegova ekspresija tijekom diferencijacije 3T3-L1 stanica je smanjena (108). Ako djeluje prije početka adipogeneze, blokira indukciju C/EBP-β i posljedično smanjuje razine C/EBP-α putem SMAD3 signalnog puta (109).

1.8. Poremećaji masnog tkiva i metabolizma lipida

Najčešći i najveći zdravstveni problem današnjice povezan s poremećajima masnog tkiva je prekomjerno nakupljanje masnog tkiva, odnosno pretilost. Pretilost je sa svojim komorbiditetima prešla u epidemijske razmjere uslijed tranzicije na sjedilački način života s promjenom prehrane prema procesuiranoj i visokokaloričnoj hrani (3). Danas pretilost predstavlja veliki izazov u prevenciji i liječenju kroničnih bolesti diljem svijeta.

Pretilost je kronični metabolički poremećaj povezan s prekomjernim nakupljanjem i metaboličkom disfunkcijom masnog tkiva, uz kroničnu upalu bez vidljive infekcije ili poznatog autoimunog procesa (110). Rizični je čimbenik za razvoj metaboličkog sindroma te vodi do nastanka kardiovaskularnih bolesti, DMT2, hipertenzije, dislipidemije i zloćudnih bolesti (111). Prekomjerna akumulacija bijelog masnog tkiva nastaje uslijed neravnoteže između kalorijskog unosa i potrošnje energije, a rezultat je povećanja veličine (hipertrofija) i broja (hiperplazija) adipocita. Ekspanzija masnog tkiva u odgovoru na prekomjerni unos hrane je adaptivna mjera za prevenciju ektopične dispozicije lipida i lipotoksičnosti u drugim stanicama organizma (19). Hipertrofija adipocita u početnom stadiju pretilosti nastaje uslijed prekomjernog nakupljanja triglicerida u masnom tkivu. Veličina adipocita varira između različitih skladišta masnog tkiva, ali maksimalna težina adipocita doseže ∼1.2 μg lipida po adipocitu. Prosječna veličina

adipocita je manja kod osoba s normalnom tjelesnom težinom u odnosu na pretile osobe (1). Kronična dostupnost viška nutrijenata dovodi do povećanja lipidnih kapljica, što kulminira povećanjem skladišta masti i povećanjem tjelesne mase. Hipertrofijom adipocita dolazi do razvoja kroničnog proupalnog stanja i infiltracije makrofaga i leukocita u masno tkivo, što dalje potiče upalno stanje. Kapacitet disfunkcionalnog masnog tkiva za skladištenje triglicerida se smanjuje s posljedicom odlaganja triglicerida u drugim tkivima (112). Promjene u masnom tkivu koje uključuju hipertrofiju, stres i smrt adipocita dovode do nakupljanja adipocitnih ostataka. Kronično odlaganje tih ostataka uzrokuje kroničnu aktivaciju makrofaga u masnom tkivu što dovodi do kroničnog stanja upale (113). Veća koncentracija makrofaga u masnom tkivu povećava razinu citokina koji dovode do razvoja zrelih adipocita rezistentnih na inzulin (114). Citokini vode smanjenom odlaganju triglicerida i povećanju razine cirkulirajućih FA, što uzrokuje njihovo ektopično odlaganje i oštećenje transporta glukoze, s krajnjim rezultatom inzulinske rezistencije u masnim i mišićnim stanicama.

Metabolički sindrom skup je metaboličkih poremećaja koji povećavaju rizik nastanka DMT2 i kardiovaskularnih bolesti. Karakteriziran je visceralnom pretilošću, dislipidemijom, hipertenzijom i inzulinskom rezistencijom (115). Dislipidemija se odnosi na čitav spektar kvantitativnih poremećaja lipida u krvi i primarni je rizični čimbenik za nastanak kardiovaskularnih bolesti (116). Najčešći poremećaji u sklopu dislipidemije su povećane koncentracije triglicerida i LDL-a, te smanjene koncentracije HDL-a. DMT2 je karakteriziran kronično povišenim razinama glukoze u krvi nastale uslijed sistemske inzulinske rezistencije (117). U disfunkcionalnim adipocitima, neadekvatno skladištenje lipida povećava razine cirkulirajućih FA koje potiču inzulinsku rezistenciju. Kada adipociti postanu rezistentni na inzulin, narušava se inzulinsko djelovanje na inhibiciju lipolize i redukciju slobodnih zasićenih FA i glicerola. Višak cirkulirajućih lipida i povećanje razina lipidnih metabolita u perifernim tkivima uzrokuje ektopično odlaganje lipida u jetru i mišiće (118). Lipidni metaboliti aktiviraju kinaze koje ometaju inzulinski signalni put i suprimiraju translokaciju GLUT4 na staničnu membranu.

1.8.1. Liječenje

Uz promociju zdravog načina života pravilnom prehranom i tjelovježbom, jedan od važnih načina borbe suvremene medicine i znanosti protiv pretilosti je bolje razumijevanje fiziologije i poremećaja masnog tkiva. Trenutni lijekovi koji se koriste za liječenje metaboličkih

poremećaja povezanih uz pretilost, kao što su DMT2 i dislipidemije, pokazuju svoj učinak na masno tkivo u vidu smanjenja tjelesne težine i regulacije razine triglicerida.

Najčešći lijekovi koji se koriste u liječenju DMT2 i dislipidemija su metformin i statini. Sve je veći broj studija koje potvrđuju pleiotropno djelovanje kombinacije metformina i statina, sugerirajući da bi takvo liječenje moglo biti korisno u nekim bolestima, naročito kardiovaskularnim, zbog antihipertenzivnog, protuupalnog i antiadipogenog učinka. U jednoj studiji na 41 bolesniku s BMI > 25 kg/m^2, metformin u dozi od 1,7 g/dan kroz 16 tjedana značajno je smanjio BMI i opseg struka, a simvastatin u dozi od 20 mg/dan značajno je smanjio razine LDL-a i triglicerida (119).

Statini djeluju kao kompetitivni inhibitori HMGCR-a, sprječavajući pretvorbu HMG-CoA u mevalonat (120). Vezanjem na enzim većim afinitetom nego endogeni ligand HMG-CoA rezultiraju konformacijskom promjenom i inhibicijom HMGCR-a, čime smanjuju stvaranje kolesterola i unutarstaničnu razinu kolesterola u hepatocitima. U pokušaju neutraliziranja tog učinka statina, potiče se aktivnost proteaze koja cijepa proteinski prekursor SREBP u endoplazmatskom retikulumu. SREBP se translocira u jezgru i veže za SRE na promotoru gena koji kodira receptor za lipoprotein male gustoće (engl. *low-density lipoprotein receptor,* LDL-R), pojačavajući transkripciju gena za LDL-R što rezultira većom ekspresijom mRNA i pojačanom sintezom LDL-R proteina. LDL-R egzocitozom odlazi na površinu hepatocita gdje se na njega veže LDL, nakon čega slijedi endocitoza i lizosomalna degradacija LDL-a unutar hepatocita, što povećava unutarstanične razine kolesterola potičući vraćanje homeostatičkim razinama LDL-a. Krajnji rezultat ove kaskade događaja je smanjenje cirkulirajućih razina LDL-a uslijed veće gustoće LDL-R na površini hepatocita (121). Inhibirajući funkciju adipocita, statini pospješuju inzulinsku rezistenciju i oštećuju postprandijalnu toleranciju na glukozu – taj učinak može utjecati na glikemijsku kontrolu i povećati rizik razvoja DMT2 (122). Dijabetogeni učinak ostvaruju inhibicijom unosa glukoze u β-stanice i pojačanim unosom LDL-a što posljedično blokira konverziju glukoze u piruvat, te prekomjernim stvaranjem dušičnog oksida koji uzrokuje apoptozu β-stanica. Međutim, rizik razvoja DMT2 korištenjem statina je mali, i u usporedbi sa smanjenjem rizika od kardiovaskularnih bolesti, benefiti terapije statinima veći su od rizika (121). S druge strane, statini mogu reducirati lipotoksičnost, intoleranciju na glukozu uzrokovanu lipoproteinima bogatim trigliceridima, na način da smanjuju ukupni kolesterol i LDL, a podižu razine HDL kolesterola. Važan učinak statina je u smanjenju kardiovaskularnog rizika (123), koji može biti rezultat njihovog antioksidativnog i protuupalnog djelovanja, te smanjene produkcije ROS i potencijalne inhibicije razvoja ateroskleroze (124). Osim toga, primjenom simvastatina

otkriveno je njegovo svojstvo stimulacije osteogeneze uslijed negativne regulacije adipogene diferencijacije mezenhimalnih matičnih stanica, no točan mehanizam inhibicije adipogeneze još nije poznat (125).

Metformin je najčešće korišteni lijek za liječenje DMT2. Mehanizam djelovanja uključuje supresiju hepatičke proizvodnje glukoze te poboljšanje metabolizma masnog tkiva u jetri i mišićima, što dovodi do smanjenja razine glukoze u plazmi (126). Metformin reducira lipolizu, povećava unos glukoze u stanice skeletnog mišića, povećava intestinalno iskorištavanje glukoze, te poboljšava preživljenje β-stanica gušterače (127). Može smanjiti inzulinsku rezistenciju stimuliranjem translokacije GLUT4 na površinu stanice, na taj način pospješujući unos glukoze u stanice. Metformin ima pleiotropni učinak u smanjenju apetita, prevenciji kardiovaskularnih bolesti, poboljšanju endotelne funkcije, modulaciji upale i prevenciji karcinoma (128). Uz sve navedeno, metformin dovodi i do gubitka tjelesne težine, iako je mehanizam tog učinka još uvijek nepoznat. Učinak metformina na endokrinu funkciju masnog tkiva još uvijek je predmet rasprave, s obzirom na činjenicu da se pokazao učinkovitijim kod pretilih pacijenata s DMT2 nego kod onih koji imaju niži BMI (129). Iako kliničke studije pokazuju učinak metformina u smanjenju tjelesne težine, podaci o učinku metformina na adipogenezu *in vitro* su oskudni.

Razumijevanje biološkog procesa adipogeneze važno je u pronalaženju potencijalnih meta u terapijskom pristupu pretilosti. U ovom radu upotrijebilo se postojeće znanje o adipogenezi na definiranom adipogenom modelu u svrhu uočavanja molekularnih promjena nastalih uslijed tretmana simvastatinom i metforminom. Posebno se pratila modulacija mRNA i proteinske ekspresije PPAR-γ, C/EBP-α, SREBP-1c, STAT3 i SMAD3, uz vizualizaciju nakupljanja lipidnih kapljica u diferenciranim adipocitima.

2. Hipoteza

Primjena metformina i simvastatina u niskim dozama dovodi do inhibicije glavnih modulatora i čimbenika transkripcije adipogeneze *in vitro*.

3. Cilj istraživanja

Ciljevi ovog istraživanja sažeti su u sljedećim točkama:

1. Proučiti učinak različitih doza simvastatina i metformina kao monoterapije, te kao konkomitantne terapije na izražaj glavnih modulatora i čimbenika transkripcije adipogeneze

2. Proučiti učinak različitih vremenskih perioda primjene simvastatina i metformina kao monoterapije, te kao konkomitantne terapije na izražaj glavnih modulatora i čimbenika transkripcije adipogeneze

4. Materijali i metode

4.1. Ustroj studije

Istraživanje je ustrojeno kao randomizirani kontrolirani pokus.

4.2. Materijali

Svi pokusi izvodili su se na staničnoj kulturi mišjih fibroblasta (preadipocita) 3T3-L1 (Elabscience Biotechnology Inc., Houston, Teksas, SAD) ispod desete pasaže. Kemikalije, reagensi i otopine korištene u ovom radu prikazane su tablično u sklopu opisa odgovarajućih metoda.

4.3. Metode

4.3.1. Uzgoj i diferencijacija stanica

Materijali korišteni za uzgoj i diferencijaciju stanica prikazani su u tablici 4.1.

Tablica 4.1. Popis korištenih kemikalija, reagensa i otopina za uzgoj i diferencijaciju stanica

Naziv	Kratica	Sastav / karakteristike / proizvođač
Dulbecco modificirani Eagle-ov medij	DMEM	4500 mg/L glukoze, L-glutamin, natrijev hidrogenkarbonat Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat.br. D5796
Fetalni goveđi serum	FBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat.br. F9665
Penicilin/Streptomicin	P/S	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Njemačka, kat.br. PS-B
4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina	HEPES	1 molarna otopina HEPES-a: 23,831 g HEPES praha (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat.br. H-3375) u 100 mL destilirane vode, prilagođeno na pH 7,4 i filtrirano
Dimetil sulfoksid	DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat.br. D2650
Klorovodična kiselina	HCl	Carlo Erba Reagents, Barcelona, Španjolska, kat.br. 7647-01-0
3-izobutil-1-metilksantin	IBMX	Molarna masa 222.24 g/mol, ≥99 % (HPLC); prah, otopljen u DMSO Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat.br. I5879
Deksametazon		Molarna masa 392.46 g/mol, ≥98 % (HPLC); prah, otopljen u DMSO Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat.br. D1756
Inzulin		Prah, otopljen u 5 mM otopini HCl Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat.br. I6634
Metformin		Molarna masa 165.62 g/mol; prah, otopljen u DMSO Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat.br. PHR1084
Simvastatin		Molarna masa 418.57 g/mol, ≥97 % (HPLC), otopljen u DMSO Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat.br. S6196

3T3-L1 preadipociti uzgajani su u DMEM mediju s dodatkom 10 % FBS-a, 15 mM HEPES-a, i 1 %-tnom P/S otopinom na 37°C i 5 % CO2. Budući da je 3T3-L1 adherentna stanična kultura, koncentracija nasađivanja stanica sa ciljem dostizanja pune konfluentnosti nakon 24 sata određena je na 60 000 stanica / cm^2. Protokol diferencijacije stanica započinje dva dana nakon dostizanja pune konfluentnosti, što je označeno prvim danom diferencijacije. Tada se medij za uzgoj stanica zamijeni svježim medijem kojemu se doda 0,5 mM IBMX-a, 1 μM deksametazona i 10 μM inzulina – takav medij naziva se medijem za indukciju diferencijacije. Nakon 72 sata, medij za indukciju diferencijacije zamijeni se inzulinskim medijem, kojim označavamo medij za uzgoj stanica s dodanih 10 μM inzulina. Nakon 72 sata u inzulinskom mediju, stanicama se promijeni medij u čisti medij za uzgoj stanica u kojem se stanice drže naredna 72 sata, do devetog dana diferencijacije. Tijekom indukcije diferencijacije, stanice su tretirane lijekovima za inhibiciju diferencijacije, metforminom i simvastatinom, u različitim vremenskim periodima (tablica 4.2.) i različitim koncentracijama (tablica 4.3.). Eksperimenti su izvođeni četvrtog, sedmog i desetog dana diferencijacije. Svaka eksperimentalna grupa imala je pripadajuću kontrolu, a to su bile stanice nad kojima se provodio samo protokol diferencijacije, bez dodatka metformina i simvastatina. Osim toga, svakoj eksperimentalnoj grupi pridružena je i skupina nediferenciranih stanica koje su održavane u stadiju preadipocita, odnosno uzgajane u čistom mediju za uzgoj stanica. Nediferencirane stanice nisu bile uključene u statističku obradu jer je u radu analizirana razlika između diferenciranih stanica i tretiranih diferenciranih stanica, međutim slikovno su prikazane u rezultatima Oil Red O bojanja i imunocitokemije kao potvrda uspješnog protokola diferencijacije.

Tablica 4.2. Shema protokola diferencijacije i vremenskih perioda tretiranja stanica lijekovima za inhibiciju diferencijacije

Protokol diferencijacije po danima	Vremenski period tretiranja metforminom i simvastatinom			
	1. - 3. dan	4. - 6. dan	7. - 9. dan	1. - 9. dan
1. dan	Medij za indukciju diferencijacije + metformin i simvastatin	Medij za indukciju diferencijacije	Medij za indukciju diferencijacije	Medij za indukciju diferencijacije + metformin i simvastatin
2. dan	Medij za indukciju diferencijacije + metformin i simvastatin	Medij za indukciju diferencijacije	Medij za indukciju diferencijacije	Medij za indukciju diferencijacije + metformin i simvastatin
3. dan	Medij za indukciju diferencijacije + metformin i simvastatin	Medij za indukciju diferencijacije	Medij za indukciju diferencijacije	Medij za indukciju diferencijacije + metformin i simvastatin
4. dan	Eksperimenti	Inzulinski medij + metformin i simvastatin	Inzulinski medij	Inzulinski medij + metformin i simvastatin
5. dan		Inzulinski medij + metformin i simvastatin	Inzulinski medij	Inzulinski medij + metformin i simvastatin
6. dan		Inzulinski medij + metformin i simvastatin	Inzulinski medij	Inzulinski medij + metformin i simvastatin
7. dan		Eksperimenti	Medij za uzgoj stanica + metformin i simvastatin	Medij za uzgoj stanica + metformin i simvastatin
8. dan			Medij za uzgoj stanica + metformin i simvastatin	Medij za uzgoj stanica + metformin i simvastatin
9. dan			Medij za uzgoj stanica + metformin i simvastatin	Medij za uzgoj stanica + metformin i simvastatin
10. dan			Eksperimenti	Eksperimenti

Tablica 4.3. Popis eksperimentalnih i kontrolnih skupina s obzirom na korišteni medij i koncentracije lijekova za inhibiciju diferencijacije

Eksperimentalna skupina	Medij	Metformin	Simvastatin
ND	Medij za uzgoj stanica	/	/
D	Medij za diferencijaciju stanica prema protokolu	/	/
M1	Medij za diferencijaciju stanica prema protokolu	200 μM	/
M2	Medij za diferencijaciju stanica prema protokolu	2 mM	/
M3	Medij za diferencijaciju stanica prema protokolu	4 mM	/
S1	Medij za diferencijaciju stanica prema protokolu	/	100 nM
S2	Medij za diferencijaciju stanica prema protokolu	/	1 μM
S3	Medij za diferencijaciju stanica prema protokolu	/	2 μM
MS1	Medij za diferencijaciju stanica prema protokolu	200 μM	100 nM
MS2	Medij za diferencijaciju stanica prema protokolu	2 mM	1 μM
MS3	Medij za diferencijaciju stanica prema protokolu	4 mM	2 μM

ND = nediferencirane stanice; D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]

4.3.2. Priprema pokrovnih stakalaca i pločica za uzgoj stanica

Materijali korišteni za pripremu pokrovnih stakalaca i pločica za uzgoj stanica prikazani su u tablici 4.4.

Tablica 4.4. Popis korištenih kemikalija, reagensa i otopina za pripremu pokrovnih stakalaca i pločica za uzgoj stanica

Naziv	Formula	Sastav / karakteristike / proizvođač
Sulfatna kiselina	H_2SO_4	T.T.T d.o.o., Sveta Nedelja, Hrvatska, kat.br. 7664-93-9
Vodikov peroksid	H_2O_2	Gram mol, Zagreb, Hrvatska, kat.br. P154901
Metanol	CH_3OH	Kefo Croatia, Sisak, Hrvatska, kat.br. KE00.1307.2500*K
Polilizin		Santa Cruz, Dallas, Teksas, SAD, kat.br. sc-136156

Stanice za Oil Red O bojanje i imunocitokemiju uzgajane su u pločicama sa 6 jažica s prethodno pripremljenom podlogom, odnosno pokrovnim stakalcima koji su se kasnije iskoristili za izradu mikroskopskih preparata. Kako bi se pokrovna stakalca mogla koristiti za uzgoj stanica, potrebno je provesti oksidaciju organskih spojeva na njihovoj površini. Stakalca su stoga oprana, osušena i sterilizirana prema protokolu opisanom u radu autora Zjalić i sur (130). Stakalca su stavljena u Erlenmeyerovu tikvicu i prekrivena otopinom za pranje stakalaca napravljenom od 30%-tnog vodikovog peroksida i sulfatne kiseline u omjeru 1:9. Nakon 30 minuta stakalca su isprana destiliranom vodom kako bi se otopina za pranje stakalaca sigurno razrijedila i uklonila. Nakon toga, stakalca su ispirana u 200 mL destilirane vode na orbitalnoj miješalici tijekom 6 sati, prilikom čega se svakih sat vremena dodavala čista destilirana voda. Stakalca su zatim osušena odstranjivanjem destilirane vode i dodavanjem 100 mL metanola. Metanol je odstranjen nakon 5 minuta, preko otvora čaše sa stakalcima postavljena je aluminijska folija i stakalca su suho sterilizirana na 270 °C tijekom 5 sati.

Po jedno stakalce postavilo se u svaku jažicu pločice za uzgoj stanica i prekrilo s 1,25 mL polilizina (5 μg/mL). Nakon sat vremena inkubacije na 37˚C, polilizin se odstranio iz jažica i pločice su ostavljene 2 sata pod UV lampom u laminaru, nakon čega su spremne za uzgoj stanica.

4.3.3. Analiza metaboličke aktivnosti stanica

Materijali korišteni za analizu metaboličke aktivnosti stanica prikazani su u tablici 4.5.

Tablica 4.5. Popis korištenih kemikalija, reagensa i otopina za MTT test

Naziv	Kratica	Sastav / karakteristike / proizvođač
MTT test		
3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl tetrazolium Bromide	MTT	100 g Thiazolyl Blue praha (Cruz chemicals, Dallas, Teksas, SAD, kat.br. sc-359848) otopljeno u 20 mL 1x PBS-a i filtrirano kroz 0,2 μm PES filter
Klorovodična kiselina	HCl	Carlo Erba Reagents, Barcelona, Španjolska, kat.br. 7647-01-0
Izopropanol	C_3H_8O	Gram mol, Zagreb, Hrvatska, kat.br. 67-63-0

PBS = fosfatni pufer; PES = poli(eter-sulfon)

MTT test određuje metaboličku aktivnost mitohondrija i temelji se na aktivnosti stanične oksidoreduktaze ovisne o NAD(P)H koja u živim stanicama reducira topljivi tetrazolij bromid žute boje u netopljive kristale formazana ljubičaste boje. Količina nastalih kristala i intenzitet obojenja proporcionalan je broju metabolički aktivnih stanica.

Stanice su uzgajane u mikrotitarskim pločicama s 96 jažica ravnog dna u tri biološke replike za svaku eksperimentalnu skupinu, te diferencirane i tretirane metforminom i simvastatinom prema prethodno opisanom protokolu. U svaku jažicu dodano je 10 μL MTT otopine, nakon čega su stanice inkubirane 4 sata. Nakon inkubacije kristali formazana otopljeni su dodavanjem 100 μL otapala (izopropanol + klorovodična kiselina). Intenzitet nastalog obojenja očitao se na čitaču mikrotitarskih pločica (iMark, BIO RAD, Hercules, Kalifornija, SAD) na valnoj duljini od 595 nm. Krajnji rezultat je izražen kao postotak optičke gustoće u odnosu na diferencirane stanice. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina sa standardnom devijacijom, izračunato iz tri ponavljanja.

4.3.4. Analiza unutarstaničnog nakupljanja lipida

Materijali korišteni za analizu unutarstaničnog nakupljanja lipida prikazani su u tablici 4.6.

Tablica 4.6. Popis korištenih kemikalija, reagensa i otopina za Oil Red O bojanje

Naziv	Kratica / Formula	Sastav / karakteristike / proizvođač
Oil Red O boja		Molarna masa 408.49 g/mol, prah Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat.br. 1320-06-5
Izopropanol	C_3H_8O	Gram mol, Zagreb, Hrvatska, kat.br. 67-63-0
Paraformaldehid 4%	PFA 4%	36 %-tni PFA (Acros organics, Fair Lawn, New Jersey, SAD) otopljen u 1x PBS-u, prilagođeno na pH 7,4 i filtrirano kroz 0,2 μm PES filter

PBS = fosfatni pufer; PES = poli(eter-sulfon)

Oil Red O je liposolubilna diazo-boja koja se koristi za vizualizaciju neutralnih lipida i estera kolesterola. Pomoću Oil Red O bojanja moguće je detektirati, kvantificirati i lokalizirati unutarstanične lipidne kapljice. Koncentrirana otopina Oil Red O priprema se dodavanjem 0,5 g Oil Red O boje u 100 mL izopropanola, a radna otopina dobiva se miješanjem koncentrirane otopine s destiliranom vodom u omjeru 6:4.

Stanice su uzgajane u pločicama sa 6 jažica s pokrovnim stakalcima, u tri biološke replike za svaku eksperimentalnu skupinu – ukupno šest pojedinačnih pločica za svako vremensko razdoblje. Stanice su diferencirane i tretirane metforminom i simvastatinom prema prethodno opisanom protokolu, nakon čega se pristupilo fiksiranju i bojanju stanica. Iz jažica je uklonjen medij i stanice su fiksirane s 1 mL 4 %-tnog paraformaldehida 45 minuta na +4˚C. Jažice su zatim isprane dva puta s hladnim PBS-om, nakon čega se u svaku jažicu dodao po 1 mL radne otopine Oil Red O. Nakon 15 minuta stanice su isprane dva puta PBS-om, te je u svakoj jažici ostavljeno po 1 mL PBS-a. Stakalca su montirana na predmetnice i pokrivena fluorescentnim pokrivalom. Preparati su fotografirani kamerom Olympus DP70 (Olympus, Tokyo, Japan) montiranom na svjetlosni mikroskop Axioskop 2 MOT (Carl Zeiss AG, Jena, Njemačka), pomoću programa DP Controller 1.2.1.108. Unutarstanično nakupljanje lipida kvantificirano je u računalnom programu ImageJ (131) mjerenjem optičke gustoće lipidnih kapljica normalizirane prema broju stanica. Krajnji rezultat je izražen kao postotak u odnosu na diferencirane stanice. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina sa standardnom devijacijom, izračunato iz tri ponavljanja.

4.3.5. Analiza ekspresije mRNA ciljanih transkripcijskih čimbenika i modulatora adipogeneze

Materijali korišteni za analizu ekspresije mRNA ciljanih transkripcijskih čimbenika i modulatora adipogeneze prikazani su u tablici 4.7.

Tablica 4.7. Popis korištenih kemikalija, reagensa i otopina za lančanu reakciju polimerazom

Naziv	Kratica / Formula	Sastav / karakteristike / proizvođač
Trizol		Zymo Research, Irvine, Kalifornija, SAD, kat.br. R2050-1-200
Kloroform	$CHCl_3$	Carlo Erba Reagents, Barcelona, Španjolska, kat.br. 67-66-3
Izopropanol	C_3H_8O	Gram mol, Zagreb, Hrvatska, kat.br. 67-63-0
DEPC voda		Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat.br. 95284
Komplet za sintezu cDNA		High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD, kat.br. 4368814)
Komplet za PCR reakciju		Taq PCR Core Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka, kat.br. 201225)
Agaroza		Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, SAD, kat.br. BP160-500
Pufer za elektroforezu Tris-Acetat EDTA	TAE	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat.br. T8280
Boja za nukleinske kiseline		Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega, Madison, Wisconsin, SAD, kat.br. H1181)

DEPC = dietil pirokarbonat; PCR = lančana reakcija polimerazom

Stanice su uzgajane u pločicama sa 6 jažica, u tri biološke replike za svaku eksperimentalnu skupinu – ukupno šest pojedinačnih pločica za svako vremensko razdoblje. Stanice su diferencirane i tretirane metforminom i simvastatinom prema prethodno opisanom protokolu, nakon čega se pristupilo izolaciji i određivanju ukupne koncentracije RNA. Ukupna RNA izolirala se pomoću Trizola prema uputama proizvođača. Iz jažica je uklonjen medij te su jažice isprane hladnim PBS-om dva puta. U svaku jažicu dodano je 1 mL trizola pomoću kojeg su stanice odvojene od podloge, prebačene u Eppendorf tubice volumena 2 mL i vorteksirane. Nakon dodavanja 200 µL kloroforma, uzorci su centrifugirani 15 minuta na 12000 g. Supernatant RNA prebačen je u nove tubice, dodano je 500 µL izopropanola i centrifugirano 10 minuta na 12000g. Supernatant je uklonjen, dodano je po 1 mL 75 %-tnog etanola u DEPC vodi, te centrifugirano 5 minuta na 7500 g. Supernatant je uklonjen, i dodano je 40 µL DEPC vode. Koncentracija RNA i čistoća uzoraka određena je mjerenjem apsorbancije na spektrofotometru NanoPhotometer® P-Class P330-30 (Implen GmbH, München, Njemačka) pri valnim duljinama od 260 nm i 280 nm.

Prevođenje RNA u komplementarnu DNA (cDNA) te umnažanje cDNA PCR reakcijom odrađeni su pomoću komercijalnih kompleta (Tablica 4.7.) prema uputama proizvođača, u reakcijskim smjesama ukupnog volumena 20 µL, na uređaju DNA Engine® Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, SAD). Korištene oligonukleotidne početnice (Metabion, Planegg, Njemačka) za lančanu reakciju polimerazom (engl. *polymerase chain reaction,* PCR) prikazane su u tablici 4.8. Reakcijske smjese za sintezu cDNA i PCR prikazane su u tablici 4.9., a uvjeti PCR reakcija navedeni su u tablici 4.10.

Tablica 4.8. Popis početnica s navedenim slijedom nukleotida i smjerom početnice

Naziv početnice / smjer	Slijed nukleotida 5’ - 3’
PPARG/F	GCATGGTGCCTTCGCTGA
PPARG/R	TGGCATCTCTGTGTCAACCATG
CEBPA/F	CAAGAACAGCAACGAGTACCG
CEBPA/R	GTCACTGGTCAACTCCAGCAC
SREBP1C/F	GCGGTTGGCACAGAGCTT
SREBP1C/R	CTGTGGCCTCATGTAGGAATACC
STAT3/F	GCCACGTTGGTGTTTCATAATC
STAT3/R	TTCGAAGGTTGTGCTGATAGAG
SMAD3/F	GGAGAAATGGTGCGAGAAGG
SMAD3/R	GAAGGCGAACTCACACAGC
ACTB/F	CCTGTGCTGCTCACCGAGGC
ACTB/R	GACCCCGTCTCTCCGGAGTCCATC

F = unaprijed (engl. *forward*), R= unatrag (engl. *reverse*)

Tablica 4.9. Reakcijske smjese za cDNA i PCR (ukupni volumen 20 μL)

cDNA		PCR	
Komponenta	Količina za jednu reakciju (V / μL)	Komponenta	Količina za jednu reakciju (V / μL)
Ukupna RNA	10,0	Kalup (cDNA)	2,0
10x RT pufer	2,0	10X PCR pufer	2,0
25x dNTP smjesa	0,8	dNTP smjesa	0,4
10x RT nasumične početnice	2,0	Uzvodna početnica	0,5
Reverzna transkriptaza	1,0	Nizvodna početnica	0,5
Voda*	4,2	Taq DNA polimeraza	0,1
		Voda*	14,5

*Koristi se voda za molekularnu biologiju, bez nukleaza

Tablica 4.10. Uvjeti PCR reakcija

Korak / trajanje ciklusa / broj ciklusa	Temperature pojedinih koraka ciklusa ovisno o početnicama					
	PPARG	CEBPA	SREBP1C	STAT3	SMAD3	ACTB
Početna denaturacija / 3 min / 1	94˚C	94˚C	94˚C	94˚C	94˚C	94˚C
Kratka denaturacija / 45 sek / 30	94˚C	94˚C	94˚C	94˚C	94˚C	94˚C
Sparivanje početnica / 1 min / 30	56,1˚C	57,2˚C	61˚C	57,2˚C	56,1˚C	61˚C
Produljivanje lanca DNA / 45 sek / 30	72˚C	72˚C	72˚C	72˚C	72˚C	72˚C
Završno produljivanje lanca DNA / 10 min / 1	72˚C	72˚C	72˚C	72˚C	72˚C	72˚C

PCR produkti vizualizirani su elektroforezom na 2%-tnom agaroznom gelu u 1x TAE s dodatkom boje za nukleinske kiseline *Diamond Nucleic Acid Dye* i uslikani na uređaju Gel Doc™ XR+ System (BioRad Hercules, Kalifornija, SAD). Semikvantifikacija denzitometrijskom analizom vizualiziranih PCR produkata odrađena je u računalnom programu ImageJ (131). Relativna mRNA ekspresija ispitivanih transkripcijskih čimbenika i modulatora adipogeneze normalizirana je prema ekspresiji *housekeeping* gena β-aktina (ACTB) koji ima stabilnu ekspresiju u svim stanicama i služi kao kontrola za svaki pojedini uzorak. Krajnji rezultat je izražen kao postotak u odnosu na diferencirane stanice. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina sa standardnom devijacijom, izračunato iz tri ponavljanja.

4.3.6. Analiza proteinske ekspresije ciljanih transkripcijskih čimbenika i modulatora adipogeneze

Materijali korišteni za analizu proteinske ekspresije ciljanih transkripcijskih čimbenika i modulatora adipogeneze prikazani su u tablici 4.11.

Tablica 4.11. Popis korištenih kemikalija, reagensa i otopina za Western blot

Naziv	Kratica	Sastav / karakteristike / proizvođač
Fosfatni pufer	PBS	137 mM NaCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska); 2,7 mM KCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska); 10 mM Na_2HPO_4 (Kemika, Zagreb, Hrvatska); 1,8 mM KH_2PO_4 (Kemika, Zagreb, Hrvatska) prilagođeno na pH 7,4 i filtrirano kroz 0,2 μm PES filter (Nalgene ™ Thermo, Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
Homogenizacijski pufer		1x PBS; 0,32 M sukroze (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD); 1 mM PMSF (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD); 5mM NaF (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD); 1 mM Na_3VO_4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD); 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) + 1 tabletica inhibitora proteaze cOmplete Mini na 10 mL pufera (Roche, Basel, Švicarska)
Western blot pufer za kuhanje uzoraka		0,35 M Tris-HCl, 10% SDS, 30% glicerol, 9,3% DTT
PBST		0,1 % Tween™ 20 (Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD, kat.br. 9005-64-5) u 1x PBS
30% otopina akrilamida i bisakrilamid	AA/Bis	30 % akrilamid (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, SAD) 2,7 % bis-akrilamid (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, SAD)
3-molarna otopina Tris-HCl	3M Tris-HCl	36.342 g Tris baze (Santa Cruz, Dallas, Teksas, SAD, kat.br. 77-86-1), do 100 mL destilirane vode, prilagođeno na pH 8.8
1-molarna otopina Tris-HCl	1M Tris-HCl	12.114 g Tris baze (Santa Cruz, Dallas, Teksas, SAD, kat.br. 77-86-1), do 100 mL destilirane vode, prilagođeno na pH 6.8
1,5 % amonijev persulfat	1,5 % APS	1.5 g amonijevog persulfata (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat.br. A3678) u 100 mL destilirane vode
10 %-tni natrijev dodecil-sulfat	10 % SDS	10 g of SDS-a (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) u 100 mL destilirane vode
Tetrametiletilendiamin	TEMED	Tetramethylethylenediamine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD, kat.br. 17919)
Proteinski standard		SeeBlue 2 Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
Supstrat za detekciju kemiluminiscentnog signala		Immobilon ® Forte Western HRP Substrate, Millipore Burlington, Massachusetts, SAD
Pufer za elektroforezu		25 mM Tris baze (Santa Cruz, Dallas, Teksas, SAD, kat.br. 77-86-1), 192 mM glicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat.br. G-7126), 0,1% SDS u destiliranoj vodi
Towbin pufer za prijenos		25 mM Tris baze, 192 mM glicina, 20% metanola u destiliranoj vodi
Pufer za blokiranje		3 % BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) u 1x PBST

NaCl = natrijev klorid; KCl = kalijev klorid; Na_2HPO_4 = natrijev dihidrogenfosfat; KH_2PO_4 = kalijev dihidrogenfosfat; PES = poli(eter-sulfon); PMSF = inhibitor proteaza; NaF = natrijev fluorid; Na_3VO_4 = natrijev ortovanadat; EDTA = etilendiamintetraoctena kiselina; DTT = dithiothreitol; BSA = goveđi serumski albumin

Primarna protutijela korištena za Western blot prikazana su u tablici 4.12. Kao sekundarna protutijela korišteni su Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson Immunoresearch West Grove, Pennsylvania, SAD, kat. br. 111-035-144) i Peroxidase-AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson Immunoresearch West Grove, Pennsylvania, SAD, kat. br. 715-035-151) u razrjeđenju 1:20000.

Tablica 4.12. Popis primarnih protutijela korištenih za Western blot

Protutijelo	Klasa	Porijeklo	Proizvođač i kataloški broj	Razrjeđenje
Anti-PPAR-γ	IgG, poliklonsko	Zec	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD, kat. br. SAB4502262	1:1000
Anti-CEBPA	IgG, poliklonsko	Zec	antibodies-online.com, Ebsdorfergrund, Hessen, Njemačka, kat. br. ABIN1532230	1:1000
Anti-SREBP1	IgG, poliklonsko	Zec	Abcam, Cambridge, Engleska, kat. br. ab28481	1:1000
Anti-STAT3	IgG, poliklonsko	Zec	Abcam, Cambridge, Engleska, kat. br. ab83805	1:1000
SMAD3	IgG, poliklonsko	Zec	NSJ Bioreagents, San Diego, Kalifornija, SAD, kat. br. F52046	1:1000
HRP-conjugated GAPDH Monoclonal	IgG, monoklonsko	Miš	Proteintech, Rosemont, Illinois, SAD, kat. br. HRP-60004	1:5000

Stanice su uzgajane u pločicama sa 6 jažica, u tri biološke replike za svaku eksperimentalnu skupinu – ukupno šest pojedinačnih pločica za svako vremensko razdoblje. Stanice su diferencirane i tretirane metforminom i simvastatinom prema prethodno opisanom protokolu, nakon čega se pristupilo homogenizaciji uzoraka, izolaciji i određivanju ukupne količine proteina. Jažice su isprane tri puta s PBS-om, nakon čega je u svaku jažicu dodano 1 mL PBS-a, stanice su sastrugane strugalicom i prebačene u Eppendorf tubice volumena 1,5 mL. Uzorci su centrifugirani 5 min na 130 g, uklonjen je supernatant i dodano je 700 µL homogenizacijskog pufera. Uzorci su homogenizirani na ledu ultrazvučnim homogenizatorom Bandelin Sonopuls 2070 (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Njemačka) 15 sekundi u 9 ciklusa. Homogenat je centrifugiran 15 minuta na 1000 g i supernatant je prebačen u novu Eppendorf tubicu. Koncentracija proteina iz uzoraka izmjerena je na fluorometrijskom uređaju Qubit® 3.0 Fluorometer (Q33216, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD), prema protokolu proizvođača. Uzorci su dilutirani s 1x PBS-om kako bi se koncentracija proteina ujednačila na 0,5 mg/mL, pomiješani s Western blot puferom za kuhanje uzoraka u omjeru 1:5 (pufer:uzorak) i inkubirani 5 minuta na 95ºC u grijaćem bloku (Eppendorf Thermomixer Compact; Eppendorf, Hamburg, Njemačka).

Proteini su razdvojeni pomoću elektroforeze u denaturirajućem poliakrilamidnom gelu (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE). Sastav gelova za razdvajanje i sabijanje prikazan je u tablici 4.13. Uzorci su naneseni u volumenu od 20 µL što daje ukupnu količinu od 10 µg proteina po uzorku, uz 5 µL proteinskog standarda SeeBlue nanesenog u prvu jažicu. Elektroforeza je provođena u puferu za elektroforezu u Hoeffer mighty small sustavu za elektroforezu (Hoeffer inc. San Francisco, Kalifornija, SAD) uz konstantnu jakost struje od 15 mA po gelu tijekom 3 sata, s održavanjem temperature na 4°C.

Tablica 4.13. Sastav poliakrilamidnih gelova za WB

Kemikalije	Gel za razdvajanje (12 %) (V/mL)	Gel za sabijanje (5 %) (V/mL)
Destilirana voda	8,86	6,9
30% otopina akrilamida i bisakrilamid (AA/Bis)	8	1,125
3-molarna otopina Tris-HCl	2,5	/
1-molarna otopina Tris-HCl	/	1,125
10 %-tni natrijev dodecil-sulfat (SDS)	0,2	0,1
1,5 % amonijev persulfat (APS)	0,46	0,75
Tetrametiletilendiamin (TEMED)	0,01	0,01
Brom-fenol plavo	/	0,02

Za prijenos proteina s gelova na poliviniliden difluorid (engl. *polyvinylidene difluoride*, PVDF) membranu (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) korišten je TE22 Mighty small transfer tank (Hoeffer inc. San Francisco, Kalifornija, SAD). Prijenos se provodio u puferu za prijenos tijekom 2 sata uz jakost struje 200 mA i kontinuiranim održavanjem temperature na 4°C.

Membrane su nakon slikanja inkubirane u primarnim protutijelima (tablica 4.12.) preko noći na 4°C, ispirane 3 x 10 minuta u 1x PBST-u, te inkubirane u odgovarajućim sekundarnim protutijelima 2 sata na sobnoj temperaturi. Sve nespecifične reakcije blokirane su puferom za blokiranje koji je poslužio za razrjeđivanje protutijela. Nakon inkubacije sa sekundarnim protutijelom, membrane su ispirane 3 x 10 minuta u PBST-u i vizualizirane na uređaju ChemiDoc™ Imaging system. Kemiluminiscentni signal je razvijen pomoću Immobilon ® Forte Western HRP supstrata prema uputama proizvođača. Denzitometrijska analiza proteinske ekspresije odrađena je u računalnom programu ImageJ (131). Rezultati su normalizirani prema ekspresiji kontrolnog proteina gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (engl. *glyceraldehyde 3-*

phosphate dehydrogenase, GAPDH). Krajnji rezultat je izražen kao postotak u odnosu na diferencirane stanice. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina sa standardnom devijacijom, izračunato iz tri ponavljanja.

4.3.7. Imunocitokemijska analiza

Materijali korišteni za imunocitokemijsku analizu prikazani su u tablici 4.14.

Tablica 4.14. Popis korištenih kemikalija, reagensa i otopina za imunocitokemiju

Naziv	Kratica	Sastav / karakteristike / proizvođač
Fosfatni pufer	PBS	137 mM NaCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska); 2,7 mM KCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska); 10 mM Na_2HPO_4 (Kemika, Zagreb, Hrvatska); 1,8 mM KH_2PO_4 (Kemika, Zagreb, Hrvatska); prilagođeno na pH 7,4 i filtrirano kroz 0,2 μm PES filter (Nalgene ™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
Paraformaldehid 2 %	PFA 2 %	36 %-tni PFA (Acros organics, Fair Lawn, New Jersey, SAD) otopljen u 1x PBS-u, prilagođeno na pH 7,4 i filtrirano kroz 0,2 μm PES filter (Nalgene ™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
Paraformaldehid 0,05 %	PFA 0,05 %	Otopina 2%-tnog PFA (Acros organics, Fair Lawn, New Jersey, SAD) razrijeđena u 1x PBS-u do koncentracije 0,05%
Otopina za blokiranje		1% BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD); 2,5% kozjeg seruma (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) i 2,5% konjskog seruma (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) otopljeno u 1x PBS-u i filtrirano kroz 0,2 μm PES filter (Nalgene ™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
Fluorescentno pokrivalo		Fluorescent mounting medium with DAPI (Abcam, Cambridge, Engleska)

NaCl = natrijev klorid; KCl = kalijev klorid; Na_2HPO_4 = natrijev dihidrogenfosfat; KH_2PO_4 = kalijev dihidrogenfosfat; PES = poli(eter-sulfon); DAPI = 4',6-diamidin-2'-fenilindol dihidroklorid

Za imunocitokemiju su korištena primarna protutijela kao za Western blot (tablica 4.12.). Korišteno je sekundarno protutijelo Biotin-SP (long spacer) AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson Immunoresearch West Grove, Pennsylvania, SAD, kat. br. 111-065-144) u razrjeđenju 1:500, te tercijarni kompleks PE-Cy5 Streptavidin (BD Pharmingen™, kat. br. 554062) u razrjeđenju 1:1000.

Stanice su uzgajane u pločicama sa 6 jažica s pokrovnim stakalcima, u tri biološke replike za svaku eksperimentalnu skupinu – ukupno šest pojedinačnih pločica za svako vremensko razdoblje. Stanice su diferencirane i tretirane metforminom i simvastatinom prema prethodno opisanom protokolu, nakon čega se pristupilo fiksiranju stanica. Stanice su fiksirane

4 %-tnim PFA kroz 30 minuta na 4ºC i isprane hladnim 1x PBS-om. Pokrovna stakalca su izrezana i prebačena u pločice s 24 jažica u triplikatima. U svaku jažicu dodano je 500 µL otopine za blokiranje i inkubirano je 4 sata na 4ºC. Nakon inkubacije, otopina za blokiranje je uklonjena i dodano je 500 µL otopine primarnog protutijela. Poslije 48-satne inkubacije u primarnom protutijelu, jažice su ispirane 3 x 10 minuta hladnim PBS-om, a potom je dodano 500 µL otopine sekundarnog protutijela. Inkubacija je trajala 4 sata na 4ºC, a nakon nje uslijedilo je ispiranje 3x10 minuta hladnim PBS-om. U slučaju korištenja biotiniliranog sekundarnog protutijela, stanice su inkubirane 1 sat na 4ºC u otopini tercijarnog kompleksa, odnosno streptavidina obilježenog fluoroforom Cy5-PE (engl. 1,*2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(Cyanine 5)*) (tablica 4.4.). Nakon inkubacije jažice su ispirane 3 x 10 minuta hladnim PBS-om. Nakon zadnjeg ispiranja u jažice je dodan 1x PBS s 0,05 % PFA. Primarna i sekundarna protutijela, kao i tercijarni kompleks, pripremljena su u otopini za blokiranje u razrjeđenjima navedenim u tablicama 4.3. i 4.4.

Stakalca su montirana na predmetnice i pokrivena fluorescentnim pokrivalom, te fotografirana kamerom Olympus DP70 (Olympus, Tokyo, Japan) montiranom na svjetlosni mikroskop Axioskop 2 MOT (Carl Zeiss AG, Jena, Njemačka), pomoću programa DP Controller 1.2.1.108. Fotografije su analizirane u računalnom programu ImageJ (131) mjerenjem jačine signala imunofluorescencije normalizirane prema broju stanica. Krajnji rezultat je izražen kao postotak u odnosu na diferencirane stanice. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina sa standardnom devijacijom, izračunato iz tri ponavljanja.

4.4. Statističke metode

Statistička analiza odrađena je u programu Statistica 12.0 (TIBCO, Palo Alto, Kalifornija, SAD) uz odabranu razinu značajnosti $p < 0,05$, $p < 0,005$, i $p < 0,001$. Shapiro-Wilk test upotrijebljen je se za određivanje raspodjele. Razlike između varijabli nezavisnih skupina utvrđene su analizom varijance ANOVA.

5. Rezultati

5.1. Metabolička aktivnost stanica izmjerena MTT testom

Metabolička aktivnost 3T3-L1 stanica značajno je smanjena u odnosu na kontrolne diferencirane stanice djelovanjem najveće koncentracije metformina te kombinacije metformina i simvastatina u srednjoj koncentraciji, u vremenskim periodima tretiranja od 1. do 3. te od 4. do 6. dana diferencijacije (Tablica 5.1.). Do 9. dana diferencijacije metabolička aktivnost stanica u svim tretiranim skupinama ponovno je porasla. Veći porast metaboličke aktivnosti vidi se u skupini stanica koje su tretirane od 1. do 9. dana diferencijacije, što se očituje u statistički značajnim razlikama u usporedbi s drugim vremenskim periodima tretiranja jednakim koncentracijama lijekova (Tablica 5.2.). U tom vremenskom periodu djelovanje metformina u svim koncentracijama te kombinacije metformina i simvastatina u najvećoj koncentraciji povećalo je metaboličku aktivnost stanica u odnosu na kontrolne diferencirane stanice, ali to povećanje nije statistički značajno (Tablica 5.1.).

Tablica 5.1. Metabolička aktivnost 3T3-L1 stanica nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima, izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica

Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana										Dvosmjerna ANOVA					
	D – kontrola	M1	M2	M3	S1	S2	S3	MS1	MS2	MS3	F; (stupanj slobode)			p		
	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	VPT	KT	VPT x KT	VPT	KT	VPT x KT
1. - 3. dan	100,00; 4,30	91,24; 1,38	84,77; 4,07	82,10; 5,79	86,16; 4,36	76,44; 5,50	81,29; 5,37	91,93; 2,68	78,41; 0,91	92,10; 7,42	58,98 (3, 80)	5,588 (9, 80)	5,723 (27, 80)	<0,001	<0,001	<0,001
4. - 6. dan	100,00; 4,83	85,95; 1,62	87,29; 3,97	81,77; 0,79	102,79; 4,10	97,01; 1,73	93,58; 1,07	85,38; 3,98	79,05; 1,21	81,57; 1,67						
7. - 9. dan	100,00; 2,78	84,63; 4,16	95,50; 4,03	89,60; 2,31	102,54; 16,75	94,92; 4,90	95,58; 4,58	83,62; 2,30	96,90; 4,50	92,29; 15,07						
1. - 9. dan	100,00; 9,78	110,53; 1,81	117,14; 1,78	109,59; 4,38	98,23; 9,91	98,29; 1,94	98,73; 3,39	99,29; 4,83	96,96; 1,96	107,17; 7,92						

Dvosmjerna analiza varijance; $p < 0,05$. Rezultati predstavljaju aritmetičku sredinu sa standardnom devijacijom, izračunato iz tri ponavljanja.

D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]; AS = aritmetička sredina; SD = standardna devijacija; VPT = vremenski period tretiranja; KT = koncentracija tretmana

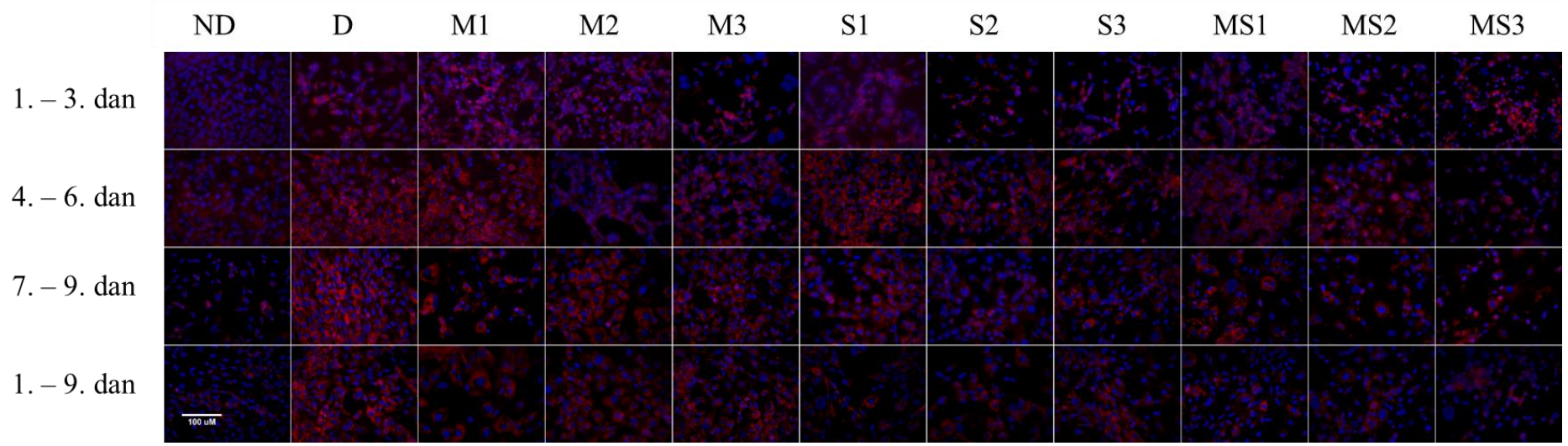
Tablica 5.2. Statistički značajne razlike u metaboličkoj aktivnosti 3T3-L1 stanica s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana

Prvi niz varijabli (A)		Drugi niz varijabli (B)		p (A vs B)
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	M3	0,048
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	S3	0,027
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	MS2	0,003
1. - 3. dan	M1	1. - 9. dan	M1	0,018
1. - 3. dan	M2	1. - 9. dan	M2	<0,001
1. - 3. dan	M3	1. - 9. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	S2	4. - 6. dan	S2	0,007
1. - 3. dan	S2	7. - 9. dan	S2	0,032
1. - 3. dan	S2	1. - 9. dan	S2	0,002
1. - 3. dan	MS2	7. - 9. dan	MS2	0,032
1. - 3. dan	MS2	1. - 9. dan	MS2	0,031
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	M3	0,038
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	MS2	0,005
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	M1	1. - 9. dan	M1	<0,001
4. - 6. dan	M2	1. - 9. dan	M2	<0,001
4. - 6. dan	M3	4. - 6. dan	S1	0,005
4. - 6. dan	M3	1. - 9. dan	M3	<0,001
4. - 6. dan	S1	4. - 6. dan	MS2	<0,001
4. - 6. dan	S1	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	S2	4. - 6. dan	MS2	0,046
4. - 6. dan	S2	4. - 6. dan	MS3	0,006
4. - 6. dan	MS2	7. - 9. dan	MS2	0,049
4. - 6. dan	MS2	1. - 9. dan	MS2	0,048
4. - 6. dan	MS3	1. - 9. dan	MS3	<0,001
7. - 9. dan	M1	7. - 9. dan	S1	0,048
7. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	M1	<0,001
7. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	M2	0,003
7. - 9. dan	M3	1. - 9. dan	M3	0,011
7. - 9. dan	S1	7. - 9. dan	MS1	0,0234
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	S1	0,024
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	S2	0,025
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	S3	0,034
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	MS1	0,049
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	MS2	0,009

Statistički značajni rezultati određeni su post-hoc Tukey HSD testom dvosmjerne analize varijance ($p < 0,05$).
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]

5.2. Unutarstanično nakupljanje lipida

Smanjenje unutarstaničnog nakupljanja lipidnih kapljica vidljivo je u stanicama tretiranima metforminom i simvastatinom od 1. do 9. dana diferencijacije (Slika 5.1.). Taj učinak postignut je sa svim ispitivanim koncentracijama lijekova, a najveći učinak postigao je tretman kombinacijom metformina i simvastatina u sve tri koncentracije (Tablica 5.3.). Iako je došlo do smanjenja nakupljanja lipidnih kapljica, razlika između diferenciranih i tretiranih skupina u tom vremenskom periodu nije statistički značajna. U stanicama tretiranima tijekom drugih vremenskih perioda lijekovi nemaju utjecaj na smanjenje nakupljanja lipidnih kapljica. Statistički značajna razlika između vremenskih perioda postoji samo za stanice tretirane kombinacijom metformina i simvastatina u srednjoj koncentraciji (post-hoc Tukey HSD test, $p = 0,012$).



Slika 5.1. Prikaz nakupljanja lipidnih kapljica histokemijskim Oil-Red-O bojanjem 3T3-L1 stanica nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima. Kontrolna skupina su diferencirane stanice bez tretiranja metforminom i simvastatinom. Plavo obojenje = DAPI, stanične jezgre; Crveno obojenje = Oil Red O, lipidne kapljice. Zabilježeno kamerom Olympus DP70 montiranom na svjetlosni mikroskop Axioskop 2 MOT pomoću programa DP Controller 1.2.1.108; uvećanje 400x; skala 100 µm.

ND = nediferencirane stanice; D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 µM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 µM]; S3 = simvastatin [2 µM]; MS1 = metformin [200 µM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 µM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 µM]; DAPI = 4',6-diamidin-2'-fenilindol dihidroklorid

Tablica 5.3. Nakupljanje lipida unutar 3T3-L1 stanica nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima, izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica

Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana										Dvosmjerna ANOVA					
	D – kontrola	M1	M2	M3	S1	S2	S3	MS1	MS2	MS3	F; (stupanj slobode)			p		
	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	VPT	KT	VPT x KT	VPT	KT	VPT x KT
1. - 3. dan	100,00; 8,09	115,95; 1,93	113,38; 3,40	80,77; 10,02	96,25; 11,66	115,23; 13,33	94,06; 15,62	122,53; 6,07	70,90; 8,73	102,29; 6,57	36,81 (3, 87)	1,435 (9, 87)	1,15 (27, 87)	<0,001	0,186	0,306
4. - 6. dan	100,00; 7,77	121,28; 4,88	121,23; 24,75	92,75; 4,50	130,46; 16,38	129,28; 33,05	104,29; 11,56	117,27; 21,14	127,93; 9,35	97,40; 4,90						
7. - 9. dan	100,00; 6,71	143,28; 15,31	143,17; 8,84	134,94; 4,97	151,16; 8,49	113,50; 19,34	107,22; 1,30	122,48; 13,75	120,33; 17,33	139,22; 22,01						
1. - 9. dan	100,00; 10,01	95,71; 5,10	90,38; 8,98	89,77; 9,79	77,27; 17,74	94,97; 13,48	78,47; 7,02	62,71; 10,88	72,74; 16,21	63,18; 9,10						

Dvosmjerna analiza varijance; $p < 0,05$. Rezultati predstavljaju aritmetičku sredinu sa standardnom devijacijom, izračunato iz tri ponavljanja.
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]; AS = aritmetička sredina; SD = standardna devijacija; VPT = vremenski period tretiranja; KT = koncentracija tretmana

5.3. Ekspresija mRNA ciljanih transkripcijskih čimbenika i modulatora adipogeneze

Najveći učinak na smanjenje mRNA ekspresije *Pparg* očituje se kod stanica tretiranih metforminom i simvastatinom od 1. do 9. dana diferencijacije (Tablica 5.4.). Razlike između kontrolnih diferenciranih stanica i tretiranih stanica u tom vremenskom periodu dosegle su statističku značajnost pri tretmanu najvišim koncentracijama metformina i simvastatina pojedinačno i u kombinaciji (Tablica 5.5.). Značajno smanjenje mRNA ekspresije *Pparg* u stanicama tretiranima u drugim vremenskim periodima u odnosu na kontrolne diferencirane stanice postignuto je samo kombinacijom metformina i simvastatina u najvećoj koncentraciji (Tablica 5.5.). Kombinacija metformina i simvastatina u svim koncentracijama smanjila je ekspresiju mRNA *Pparg* u odnosu na kontrolne diferencirane stanice u svim vremenskim periodima osim 1. do 9. dana diferencijacije, iako bez statističke značajnosti (Slika 5.2.).

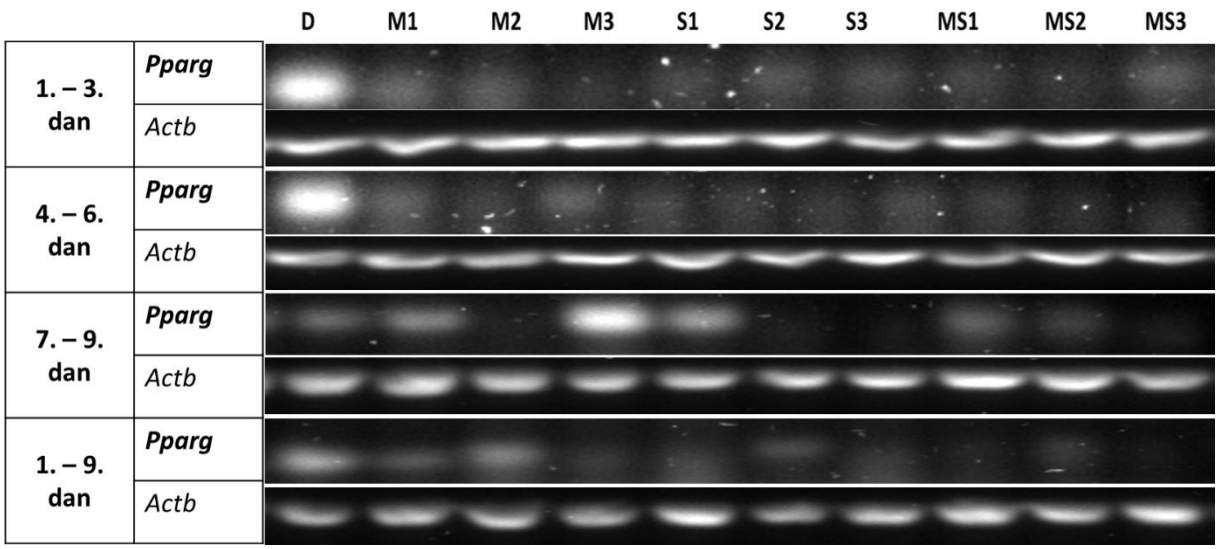
Tretman metforminom i simvastatinom imao je veći negativni učinak na mRNA ekspresiju *Cebpa* (Tablica 5.6.). U stanicama tretiranim od 1. do 9. dana diferencijacije, u usporedbi s kontrolnim diferenciranim stanicama, mRNA ekspresija *Cebpa* značajno je smanjena metforminom i simvastatinom u gotovo svim koncentracijama, pojedinačno i u kombinaciji, osim najniže koncentracije simvastatina i kombinacije lijekova u najnižoj koncentraciji (Tablica 5.7., Slika 5.3.). Stanice tretirane tijekom drugih vremenskih perioda također su imale značajno snižene razine mRNA *Cebpa*, no samo kod većih koncentracija lijekova (Tablica 5.7.). Odstupanje od preostalih tretmana vidljivo je u stanicama tretiranim najnižom koncentracijom simvastatina koje su imale značajno povišenu ekspresiju mRNA *Cebpa* s obzirom na ostale tretmane, no nije bilo statistički značajne razlike s obzirom na kontrolne diferencirane stanice (Tablica 5.6., Tablica 5.7.).

mRNA ekspresija *Srebp1c* najmanja je u stanicama tretiranima od 1. do 9. dana diferencijacije, iako bez statističke značajnosti u usporedbi s kontrolnim diferenciranim stanicama ili sa stanicama tretiranim u drugim vremenskim periodima (Tablica 5.8). Statistički značajna razlika vidljiva je u vremenskom periodu 1. do 9. dana diferencijacije između najmanje i najveće koncentracije kombiniranog tretmana (post-hoc Tukey HSD test, $p = 0{,}033$). Tretmani tijekom drugih vremenskih perioda nisu značajno promijenili mRNA ekspresiju *Srebp1c* (Slika 5.4.).

Na mRNA ekspresiju *Stat3* najveći učinak ima kombinirani tretman metforminom i simvastatinom u svim koncentracijama tijekom 1. do 9. dana diferencijacije, koji je značajno smanjio mRNA ekspresiju *Stat3* u usporedbi s kontrolnim diferenciranim stanicama te sa

stanicama tretiranima tijekom drugih vremenskih perioda (Tablica 5.9., Tablica 5.10., Slika 5.5).

Tretiranje stanica metforminom i simvastatinom rezultiralo je najvećim brojem značajnih razlika u mRNA ekspresiji *Smad3* između pojedinih tretmana i vremenskih perioda. Razlika između vremenskih perioda tretiranja najviše je uočljiva kombiniranim tretmanom metforminom i simvastatinom u srednjoj i najvećoj koncentraciji, gdje se vidi značajno smanjenje mRNA ekspresije *Smad3* u stanicama tretiranima od 1. do 9. dana diferencijacije u odnosu na ostale vremenske periode tretiranja (Tablica 5.11., Tablica 5.12.). U tom vremenskom periodu navedene su koncentracije lijekova značajno smanjile mRNA ekspresiju *Smad3* i u odnosu na diferencirane stanice, a isti učinak imao je i tretman simvastatinom u svim koncentracijama (Tablica 5.11., Tablica 5.12.). U stanicama tretiranima tijekom drugih vremenskih perioda značajno smanjenje mRNA ekspresije *Smad3* u odnosu na kontrolne diferencirane stanice konstantno je s kombiniranim tretmanom metforminom i simvastatinom u srednjoj koncentraciji (Tablica 5.11., Tablica 5.12.). Odstupanje od preostalih tretmana vidljivo je u stanicama tretiranima najmanjom koncentracijom simvastatina te najmanjom i srednjom koncentracijom metformina od 7. do 9. dana diferencijacije, koji su značajno podigli mRNA ekspresiju *Smad3* u odnosu na druge koncentracije lijekova (Tablica 5.11., Tablica 5.12., Slika 5.6.).



Slika 5.2. Prikaz agaroznog gela nakon elektroforeze PCR produkata *Pparg* iz uzoraka 3T3-L1 stanica nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima. Kontrolna skupina su diferencirane stanice bez tretiranja metforminom i simvastatinom, a *Actb* je korišten kao *housekeeping* gen.
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]

Tablica 5.4. Relativna mRNA ekspresija *Pparg* u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima, izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica

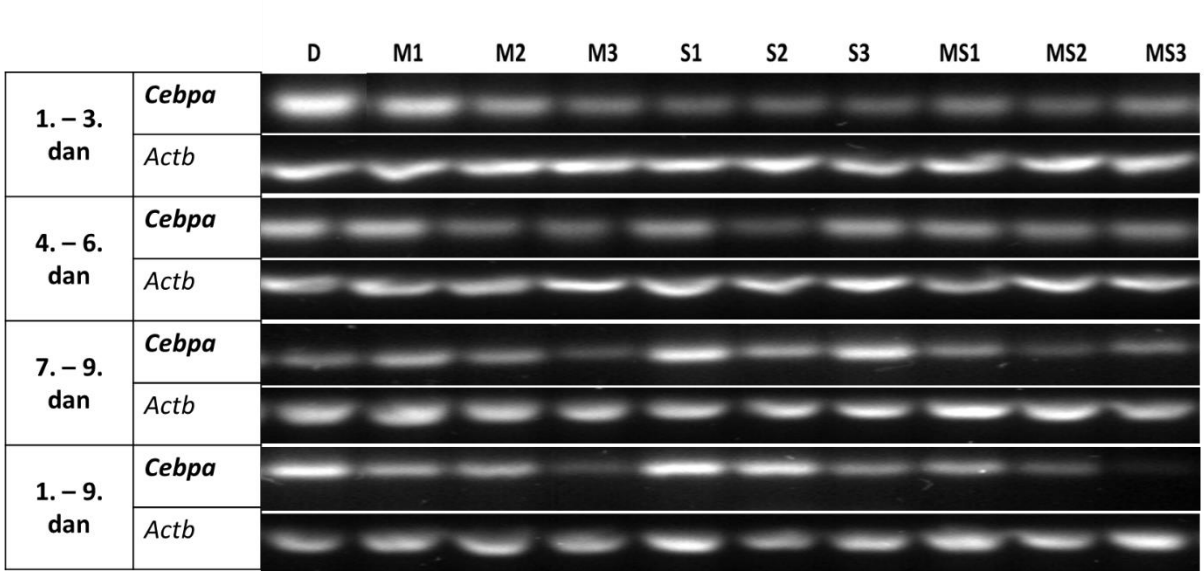
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana										Dvosmjerna ANOVA					
	D – kontrola	M1	M2	M3	S1	S2	S3	MS1	MS2	MS3	F; (stupanj slobode)			p		
	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	VPT	KT	VPT x KT	VPT	KT	VPT x KT
1. - 3. dan	100,00; 21,61	63,42; 12,77	67,11; 7,97	35,47; 2,01	59,83; 0,10	56,09; 0,04	46,73; 2,74	47,22; 3,16	39,03; 3,30	59,59; 1,67	17,09 (3, 80)	9,12 (9, 80)	2,857 (27, 80)	<0,001	<0,001	<0,001
4. - 6. dan	100,00; 69,14	121,34; 55,92	43,27; 17,19	99,34; 24,61	56,01; 11,39	98,94; 57,90	43,58; 11,66	40,56; 6,95	35,39; 10,51	20,31; 9,90						
7. - 9. dan	100,00; 45,43	91,96; 37,14	143,11; 6,05	46,70; 19,96	108,31; 3,15	96,38; 14,34	66,81; 6,36	67,25; 7,33	67,10; 8,66	40,38; 3,65						
1. - 9. dan	100,00; 39,92	32,98; 7,66	56,64; 20,21	21,33; 0,48	66,89; 42,48	13,45; 5,41	18,63; 7,62	45,84; 31,86	30,86; 7,12	9,09; 0,09						

Dvosmjerna analiza varijance; $p < 0,05$. Rezultati predstavljaju aritmetičku sredinu sa standardnom devijacijom, izračunato iz tri ponavljanja.
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]; AS = aritmetička sredina; SD = standardna devijacija; VPT = vremenski period tretiranja; KT = koncentracija tretmana

Tablica 5.5. Statistički značajne razlike u relativnoj mRNA ekspresiji *Pparg* u 3T3-L1 stanicama s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana

Prvi niz varijabli (A)		Drugi niz varijabli (B)		p (A vs B)
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	MS3	0,043
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	MS1	0,036
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	MS2	0,015
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	MS2	<0,001
4. - 6. dan	M1	1. - 9. dan	M1	0,010
4. - 6. dan	M2	7. - 9. dan	M2	0,001
4. - 6. dan	M3	4. - 6. dan	MS3	0,047
4. - 6. dan	S2	1. - 9. dan	S2	0,017
4. - 6. dan	MS1	7. - 9. dan	MS1	0,027
7. - 9. dan	M2	7. - 9. dan	M3	0,002
7. - 9. dan	M2	7. - 9. dan	MS3	<0,001
7. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	M2	0,014
7. - 9. dan	S2	1. - 9. dan	S2	0,025
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	M3	0,049
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	S2	0,014
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	S3	0,033
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	MS3	0,007

Statistički značajni rezultati određeni su post-hoc Tukey HSD testom dvosmjerne analize varijance ($p < 0,05$).
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]



Slika 5.3. Prikaz agaroznog gela nakon elektroforeze PCR produkata *Cebpa* iz uzoraka 3T3-L1 stanica nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima. Kontrolna skupina su diferencirane stanice bez tretiranja metforminom i simvastatinom, a *Actb* je korišten kao *housekeeping* gen.

D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]

Tablica 5.6. Relativna mRNA ekspresija *Cebpa* u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima, izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica

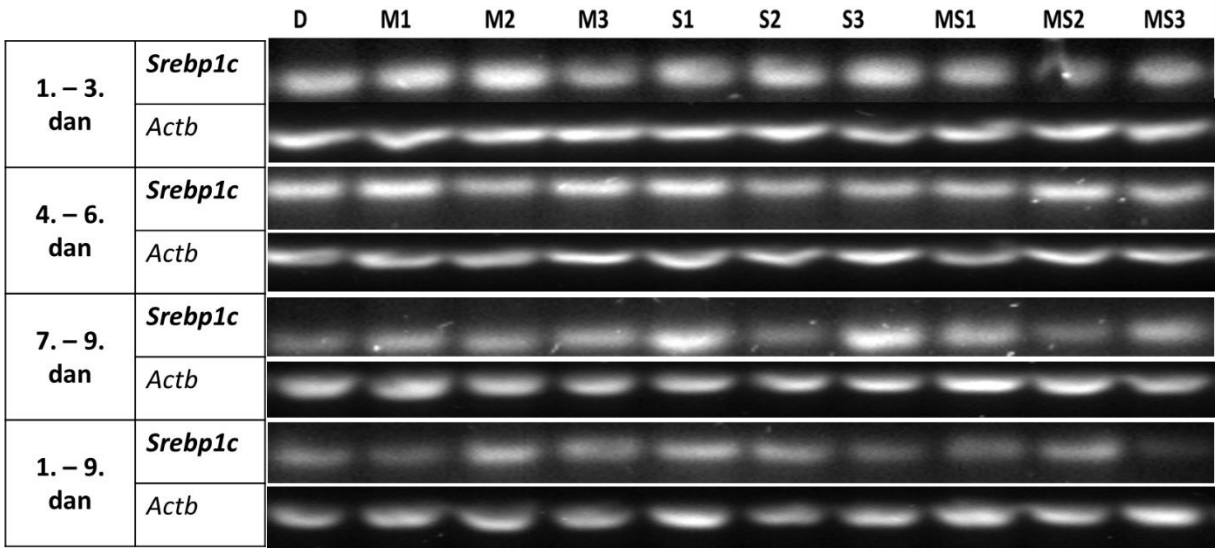
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana										Dvosmjerna ANOVA					
	D – kontrola	M1	M2	M3	S1	S2	S3	MS1	MS2	MS3	F; (stupanj slobode)			p		
	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	VPT	KT	VPT x KT	VPT	KT	VPT x KT
1. - 3. dan	100,00; 49,55	72,10; 17,22	54,47; 2,60	29,26; 1,76	58,34; 20,08	39,71; 10,91	40,24; 4,29	62,03; 14,34	31,59; 0,20	56,45; 4,94	20,35 (3, 80)	35,61 (7, 80)	3,921 (27, 80)	<0,001	<0,001	<0,001
4. - 6. dan	100,00; 12,65	50,09; 2,70	38,28; 1,24	57,51; 1,88	115,60; 1,31	56,48; 8,37	64,08; 35,95	47,19; 9,40	54,79; 15,09	38,54; 14,85						
7. - 9. dan	100,00; 5,48	90,93; 4,44	76,17; 5,87	64,81; 0,34	123,81; 8,47	51,25; 3,44	62,92; 36,94	100,80; 1,20	32,99; 4,66	51,80; 6,08						
1. - 9. dan	100,00; 17,47	53,42; 5,08	48,57; 1,25	36,86; 0,98	110,93; 4,08	37,98; 4,92	20,69; 1,61	59,12; 11,06	20,43; 0,99	5,06; 0,42						

Dvosmjerna analiza varijance; $p < 0,05$. Rezultati predstavljaju aritmetičku sredinu sa standardnom devijacijom, izračunato iz tri ponavljanja.
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]; AS = aritmetička sredina; SD = standardna devijacija; VPT = vremenski period tretiranja; KT = koncentracija tretmana

Tablica 5.7. Statistički značajne razlike u relativnoj mRNA ekspresiji *Cebpa* u 3T3-L1 stanicama s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana

Prvi niz varijabli (A)		Drugi niz varijabli (B)		p (A vs B)
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	S3	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	S1	4. - 6. dan	S1	0,002
1. - 3. dan	S1	7. - 9. dan	S1	<0,001
1. - 3. dan	S1	1. - 9. dan	S1	0,007
1. - 3. dan	MS3	1. - 9. dan	MS3	0,046
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	M1	0,016
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	M2	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	MS1	0,007
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	S1	<0,001
4. - 6. dan	M2	4. - 6. dan	S1	<0,001
4. - 6. dan	M3	4. - 6. dan	S1	0,001
4. - 6. dan	S1	4. - 6. dan	S2	<0,001
4. - 6. dan	S1	4. - 6. dan	S3	0,009
4. - 6. dan	S1	4. - 6. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	S1	4. - 6. dan	MS2	<0,001
4. - 6. dan	S1	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	MS1	7. - 9. dan	MS1	0,005
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	S2	0,022
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	MS2	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	MS3	0,026
7. - 9. dan	M1	7. - 9. dan	MS2	0,001
7. - 9. dan	M2	7. - 9. dan	S1	0,030
7. - 9. dan	M3	7. - 9. dan	S1	<0,001
7. - 9. dan	S1	7. - 9. dan	S2	<0,001
7. - 9. dan	S1	7. - 9. dan	S3	<0,001
7. - 9. dan	S1	7. - 9. dan	MS2	<0,001
7. - 9. dan	S1	7. - 9. dan	MS3	<0,001
7. - 9. dan	S2	7. - 9. dan	MS1	0,018
7. - 9. dan	MS1	7. - 9. dan	MS2	<0,001
7. - 9. dan	MS1	7. - 9. dan	MS3	0,021
7. - 9. dan	MS3	1. - 9. dan	MS3	0,039
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	M1	0,041
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	M2	0,010
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	M3	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	S2	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	S3	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	S1	0,002
1. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	MS3	0,025
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	S1	<0,001
1. - 9. dan	M3	1. - 9. dan	S1	<0,001
1. - 9. dan	S1	1. - 9. dan	S2	<0,001
1. - 9. dan	S1	1. - 9. dan	S3	<0,001
1. - 9. dan	S1	1. - 9. dan	MS1	0,009
1. - 9. dan	S1	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	S1	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	MS1	1. - 9. dan	MS3	0,005

Statistički značajni rezultati određeni su post-hoc Tukey HSD testom dvosmjerne analize varijance ($p < 0,05$).
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]



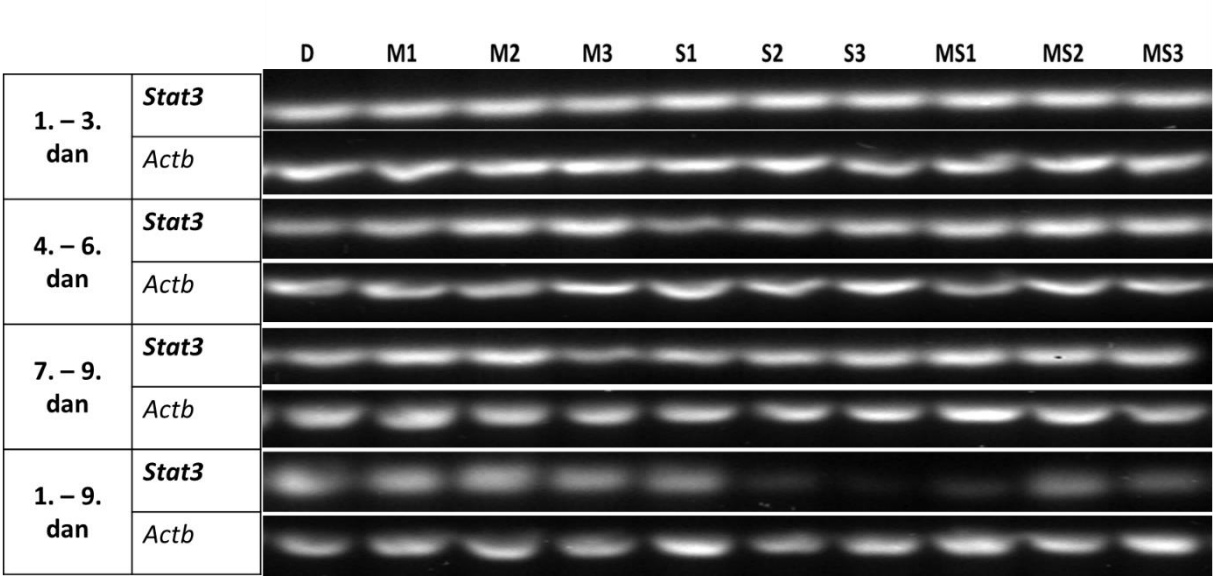
Slika 5.4. Prikaz agaroznog gela nakon elektroforeze PCR produkata *Srebp1c* iz uzoraka 3T3-L1 stanica nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima. Kontrolna skupina su diferencirane stanice bez tretiranja metforminom i simvastatinom, a *Actb* je korišten kao *housekeeping* gen.

D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]

Tablica 5.8. Relativna mRNA ekspresija *Srebp1c* u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima, izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica

Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana										Dvosmjerna ANOVA					
	D – kontrola	M1	M2	M3	S1	S2	S3	MS1	MS2	MS3	F; (stupanj slobode)			p		
	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	VPT	KT	VPT x KT	VPT	KT	VPT x KT
1. - 3. dan	100,00; 84,49	74,80; 62,28	77,57; 66,78	66,14; 39,92	76,32; 44,11	82,94; 20,36	81,96; 20,80	101,54; 18,42	86,09; 11,45	82,78; 11,62	9,362 (3, 80)	3,444 (9, 80)	1,594 (30, 80)	<0,001	0,001	0,058
4. - 6. dan	100,00; 18,96	102,54; 18,03	86,12; 7,86	107,62; 14,37	101,80; 35,99	71,94; 37,70	115,66; 6,78	70,89; 26,32	86,04; 26,94	75,24; 10,69						
7. - 9. dan	100,00; 28,90	60,31; 7,84	93,60; 5,94	73,07; 6,21	123,19; 16,19	67,79; 3,81	77,04; 3,92	84,86; 5,61	49,85; 9,07	85,50; 5,17						
1. - 9. dan	100,00; 7,75	38,98; 0,29	71,27; 7,38	67,58; 11,51	92,22; 16,90	22,71; 2,73	35,43; 2,04	100,61; 20,00	33,29; 8,13	10,16; 2,36						

Dvosmjerna analiza varijance; $p < 0,05$. Rezultati predstavljaju aritmetičku sredinu sa standardnom devijacijom, izračunato iz tri ponavljanja.
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]; AS = aritmetička sredina; SD = standardna devijacija; VPT = vremenski period tretiranja; KT = koncentracija tretmana



Slika 5.5. Prikaz agaroznog gela nakon elektroforeze PCR produkata *Stat3* iz uzoraka 3T3-L1 stanica nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima. Kontrolna skupina su diferencirane stanice bez tretiranja metforminom i simvastatinom, a *Actb* je korišten kao *housekeeping* gen.

D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]

Tablica 5.9. Relativna mRNA ekspresija *Stat3* u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima, izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica

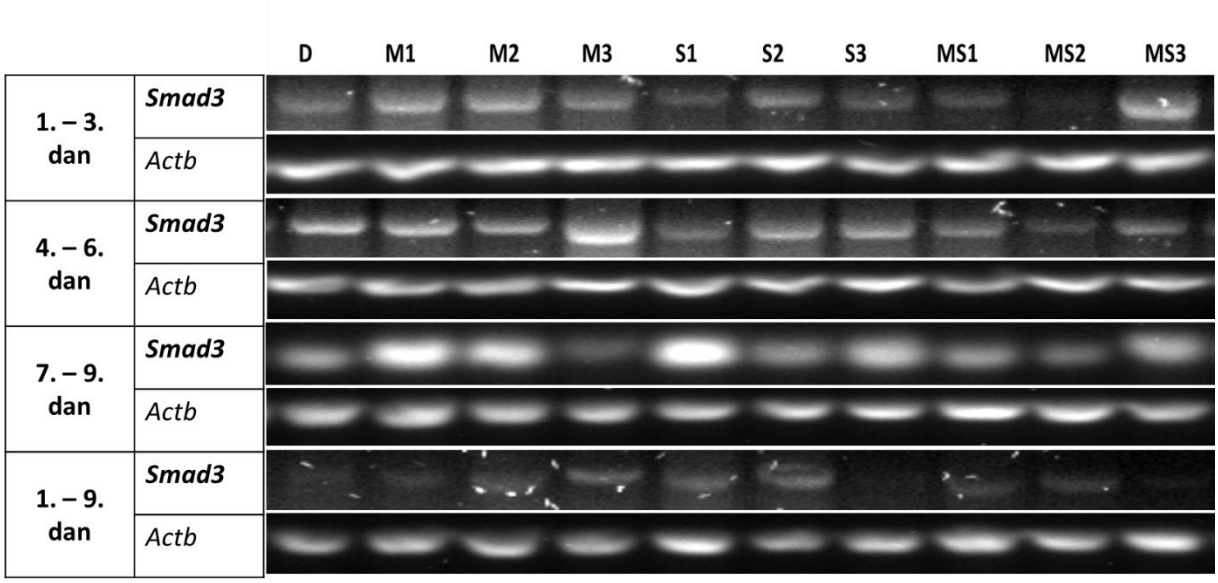
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana										Dvosmjerna ANOVA					
	D – kontrola	M1	M2	M3	S1	S2	S3	MS1	MS2	MS3	F; (stupanj slobode)			p		
	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	VPT	KT	VPT x KT	VPT	KT	VPT x KT
1. - 3. dan	100,00; 7,90	112,46; 2,85	104,19; 7,55	129,88; 33,20	102,73; 6,74	113,01; 25,27	73,86; 7,58	66,98; 0,43	79,28; 5,47	98,22; 15,14	99,16 (3, 80)	13,68 (9, 80)	6,399 (27, 80)	<0,001	<0,001	<0,001
4. - 6. dan	100,00; 5,59	130,78; 13,52	145,20; 38,59	147,81; 7,61	149,62; 50,69	134,26; 2,62	105,73; 0,60	52,93; 28,49	77,83; 9,35	100,47; 22,77						
7. - 9. dan	100,00; 24,41	112,02; 19,73	121,04; 9,75	45,23; 5,54	141,84; 50,39	78,06; 0,55	103,14; 1,57	103,19; 14,85	55,31; 10,44	140,87; 23,56						
1. - 9. dan	100,00; 3,70	48,91; 7,57	62,87; 8 ,46	68,56; 1,26	58,85; 11,13	5,15; 1,37	5,26; 1,15	26,27; 6,89	19,98; 4,50	10,63; 1,65						

Dvosmjerna analiza varijance; $p < 0,05$. Rezultati predstavljaju aritmetičku sredinu sa standardnom devijacijom, izračunato iz tri ponavljanja.
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]; AS = aritmetička sredina; SD = standardna devijacija; VPT = vremenski period tretiranja; KT = koncentracija tretmana

Tablica 5.10. Statistički značajne razlike u relativnoj mRNA ekspresiji *Stat3* u 3T3-L1 stanicama s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana

Prvi niz varijabli (A)		Drugi niz varijabli (B)		p (A vs B)
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	
1. - 3. dan	M1	1. - 9. dan	M1	0,019
1. - 3. dan	M3	1. - 9. dan	MS1	0,023
1. - 3. dan	M3	7. - 9. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	M3	1. - 9. dan	M3	0,032
1. - 3. dan	S2	1. - 9. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	S3	1. - 9. dan	S3	0,006
1. - 3. dan	MS2	1. - 9. dan	MS2	0,049
1. - 3. dan	MS3	1. - 9. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	M1	1. - 9. dan	M1	<0,001
4. - 6. dan	M2	4. - 6. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	M2	4. - 6. dan	MS2	0,008
4. - 6. dan	M2	1. - 9. dan	M2	<0,001
4. - 6. dan	M3	4. - 6. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	M3	4. - 6. dan	MS2	0,004
4. - 6. dan	M3	7. - 9. dan	M3	<0,001
4. - 6. dan	M3	1. - 9. dan	M3	<0,001
4. - 6. dan	S1	4. - 6. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	S1	4. - 6. dan	MS2	0,003
4. - 6. dan	S1	1. - 9. dan	S1	<0,001
4. - 6. dan	S2	4. - 6. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	S2	1. - 9. dan	S2	<0,001
4. - 6. dan	S3	1. - 9. dan	S3	<0,001
4. - 6. dan	MS3	1. - 9. dan	MS3	<0,001
7. - 9. dan	M1	7. - 9. dan	M3	0,009
7. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	M1	0,022
7. - 9. dan	M2	7. - 9. dan	M3	0,001
7. - 9. dan	M2	7. - 9. dan	MS2	0,012
7. - 9. dan	M3	7. - 9. dan	S1	<0,001
7. - 9. dan	M3	7. - 9. dan	MS3	<0,001
7. - 9. dan	S1	7. - 9. dan	S2	0,019
7. - 9. dan	S1	7. - 9. dan	MS2	<0,001
7. - 9. dan	S1	1. - 9. dan	S1	<0,001
7. - 9. dan	S2	7. - 9. dan	MS3	0,023
7. - 9. dan	S2	1. - 9. dan	S2	0,002
7. - 9. dan	S3	1. - 9. dan	S3	<0,001
7. - 9. dan	MS1	1. - 9. dan	MS1	<0,001
7. - 9. dan	MS2	7. - 9. dan	MS3	<0,001
7. - 9. dan	MS3	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	S2	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	S3	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	MS1	0,002
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	M3	1. - 9. dan	S2	0,021
1. - 9. dan	M3	1. - 9. dan	S3	0,021

Statistički značajni rezultati određeni su post-hoc Tukey HSD testom dvosmjerne analize varijance ($p < 0,05$).
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]



Slika 5.6. Prikaz agaroznog gela nakon elektroforeze PCR produkata *Smad3* iz uzoraka 3T3-L1 stanica nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima. Kontrolna skupina su diferencirane stanice bez tretiranja metforminom i simvastatinom, a *Actb* je korišten kao *housekeeping* gen.

D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 µM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 µM]; S3 = simvastatin [2 µM]; MS1 = metformin [200 µM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 µM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 µM]

Tablica 5.11. Relativna mRNA ekspresija *Smad3* u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima, izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica

Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana										Dvosmjerna ANOVA					
	D – kontrola	M1	M2	M3	S1	S2	S3	MS1	MS2	MS3	F; (stupanj slobode)			p		
	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	VPT	KT	VPT x KT	VPT	KT	VPT x KT
1. - 3. dan	100,00; 7,57	104,23; 4,03	82,60; 7,22	72,35; 1,74	80,21; 1,95	92,92; 2,00	62,68; 1,90	71,38; 3,17	48,39; 4,68	84,93; 12,35	104,6 (3, 80)	74,58 (9, 80)	20,15 (27, 80)	<0,001	<0,001	<0,001
4. - 6. dan	100,00; 12,95	100,28; 13,49	71,92; 5,10	92,14; 0,81	94,55; 7,33	84,03; 3,17	94,97; 15,96	78,82; 0,43	69,65; 0,50	41,89; 2,67						
7. - 9. dan	100,00; 6,34	111,25; 24,10	111,25; 10,34	95,73; 2,18	184,02; 1,43	78,15; 6,03	79,11; 10,01	114,10; 3,37	54,71; 5,34	106,48; 5,29						
1. - 9. dan	100,00; 6,23	61,10; 10,23	72,58; 14,56	77,62; 10,61	134,31; 16,89	44,13; 5,25	33,61; 5,11	93,10; 10,77	22,63; 0,08	9,79; 1,95						

Dvosmjerna analiza varijance; $p < 0,05$. Rezultati predstavljaju aritmetičku sredinu sa standardnom devijacijom, izračunato iz tri ponavljanja.
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]; AS = aritmetička sredina; SD = standardna devijacija; VPT = vremenski period tretiranja; KT = koncentracija tretmana

Tablica 5.12. Statistički značajne razlike u relativnoj mRNA ekspresiji *Smad3* u 3T3-L1 stanicama s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana

Prvi niz varijabli (A)		Drugi niz varijabli (B)		p (A vs B)
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	S3	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	MS1	0,039
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	M3	0,009
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	S3	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	MS1	0,005
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 9. dan	M1	<0,001
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	MS2	0,003
1. - 3. dan	M2	7. - 9. dan	M2	0,039
1. - 3. dan	S1	1. - 3. dan	MS2	0,009
1. - 3. dan	S1	7. - 9. dan	S1	<0,001
1. - 3. dan	S1	1. - 9. dan	S1	<0,001
1. - 3. dan	S2	1. - 3. dan	S3	0,019
1. - 3. dan	S2	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	S2	1. - 9. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	S3	4. - 6. dan	S3	0,007
1. - 3. dan	S3	1. - 9. dan	S3	0,032
1. - 3. dan	MS1	7. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	MS2	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	MS3	4. - 6. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	MS3	1. - 9. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	M2	0,049
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	MS2	0,018
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	M2	0,044
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	MS2	0,016
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	M1	1. - 9. dan	M1	<0,001
4. - 6. dan	M2	4. - 6. dan	MS3	0,021
4. - 6. dan	M2	7. - 9. dan	M2	<0,001
4. - 6. dan	M3	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	S1	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	S1	7. - 9. dan	S1	<0,001
4. - 6. dan	S1	1. - 9. dan	S1	<0,001
4. - 6. dan	S2	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	S2	1. - 9. dan	S2	<0,001
4. - 6. dan	S3	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	S3	1. - 9. dan	S3	<0,001
4. - 6. dan	MS1	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	MS1	7. - 9. dan	MS1	0,002
4. - 6. dan	MS2	1. - 9. dan	MS2	<0,001
4. - 6. dan	MS3	7. - 9. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	MS3	1. - 9. dan	MS3	0,007
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	S1	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	MS2	<0,001
7. - 9. dan	M1	7. - 9. dan	S1	<0,001
7. - 9. dan	M1	7. - 9. dan	S2	0,005
7. - 9. dan	M1	7. - 9. dan	S3	0,008
7. - 9. dan	M1	7. - 9. dan	MS2	<0,001
7. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	M1	<0,001
7. - 9. dan	M2	7. - 9. dan	S1	<0,001
7. - 9. dan	M2	7. - 9. dan	S2	0,005

Prvi niz varijabli (A)		Drugi niz varijabli (B)		p (A vs B)
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	
7. - 9. dan	M2	7. - 9. dan	S3	0,008
7. - 9. dan	M2	7. - 9. dan	MS2	<0,001
7. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	M2	<0,001
7. - 9. dan	M3	7. - 9. dan	S1	<0,001
7. - 9. dan	M3	7. - 9. dan	MS2	<0,001
7. - 9. dan	S1	7. - 9. dan	S2	<0,001
7. - 9. dan	S1	7. - 9. dan	S3	<0,001
7. - 9. dan	S1	7. - 9. dan	MS1	<0,001
7. - 9. dan	S1	7. - 9. dan	MS2	<0,001
7. - 9. dan	S1	7. - 9. dan	MS3	<0,001
7. - 9. dan	S1	1. - 9. dan	S1	<0,001
7. - 9. dan	S2	7. - 9. dan	MS1	0,001
7. - 9. dan	S2	7. - 9. dan	MS3	0,045
7. - 9. dan	S2	1. - 9. dan	S2	0,003
7. - 9. dan	S3	7. - 9. dan	MS1	0,002
7. - 9. dan	S3	1. - 9. dan	S3	<0,001
7. - 9. dan	MS1	1. - 9. dan	MS1	<0,001
7. - 9. dan	MS2	7. - 9. dan	MS3	<0,001
7. - 9. dan	MS2	1. - 9. dan	MS2	0,008
7. - 9. dan	MS3	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	M1	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	S1	0,003
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	S2	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	S3	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	S1	<0,001
1. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	MS1	0,008
1. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	S1	<0,001
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	S2	0,043
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	S3	<0,001
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	M3	1. - 9. dan	S1	<0,001
1. - 9. dan	M3	1. - 9. dan	S2	0,004
1. - 9. dan	M3	1. - 9. dan	S3	<0,001
1. - 9. dan	M3	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	M3	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	S1	1. - 9. dan	S2	<0,001
1. - 9. dan	S1	1. - 9. dan	S3	<0,001
1. - 9. dan	S1	1. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 9. dan	S1	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	S1	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	S2	1. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 9. dan	S2	1. - 9. dan	MS3	0,002
1. - 9. dan	S3	1. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 9. dan	MS1	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	MS1	1. - 9. dan	MS3	<0,001

Statistički značajni rezultati određeni su post-hoc Tukey HSD testom dvosmjerne analize varijance ($p < 0,05$).
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]

U tablici 5.13. prikazan je sumiran učinak pojedinih doza metformina i simvastatina te njihovih kombinacija na razine mRNA ispitivanih transkripcijskih čimbenika i modulatora adipogeneze.

Tablica 5.13. Učinak metformina i simvastatina na mRNA razine ispitivanih transkripcijskih čimbenika i modulatora adipogeneze, u odnosu na kontrolne diferencirane stanice, s obzirom na vremenski period djelovanja

		M1	M2	M3	S1	S2	S3	MS1	MS2	MS3
1. -3. dan	*Pparg*	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	Cebpa		↓	↓↓	↓	↓↓	↓↓	↓	↓↓	↓
	Srebp1c			↓						
	Stat3									
	Smad3						↓↓	↓↓	↓↓	
4. -6. dan	*Pparg*		↓		↓		↓	↓	↓	↓↓
	Cebpa	↓↓	↓↓	↓		↓	↓	↓↓	↓	↓↓
	Srebp1c							↓		
	Stat3	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓		
	Smad3		↓↓						↓↓	↓↓
7. -9. dan	*Pparg*			↓			↓	↓	↓	↓
	Cebpa			↓		↓↓	↓		↓↓	↓↓
	Srebp1c	↓				↓			↓	
	Stat3			↓	↑				↓	↑
	Smad3				↑↑				↓↓	
1. -9. dan	*Pparg*	↓	↓	↓↓	↓	↓↓	↓↓	↓	↓	↓↓
	Cebpa	↓↓	↓↓	↓↓		↓↓	↓↓	↓	↓↓	↓↓
	Srebp1c	↓		↓		↓	↓		↓	↓
	Stat3	↓	↓	↓	↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
	Smad3	↓↓			↑↑	↓↓	↓↓		↓↓	↓↓

D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]; ↑↑ = statistički značajno povećanje; ↓↓ = statistički značajno smanjenje; ↑ = primjetno povećanje, ali bez statističke značajnosti; ↓ = primjetno smanjenje, ali bez statističke značajnosti

5.4. Proteinska ekspresija ciljanih transkripcijskih čimbenika i modulatora adipogeneze

5.4.1. Proteinska ekspresija određena Western blot metodom

Značajan utjecaj na razinu proteina PPARG najviše je izražen u stanicama tretiranima od 7. do 9. dana diferencijacije, gdje su lijekovi pojedinačno i u kombinaciji značajno smanjili razinu PPARG u odnosu na kontrolne diferencirane stanice, neovisno o koncentraciji (Tablica 5.14., Tablica 5.15., Slika 5.7.). U stanicama tretiranima u ostalim vremenskim periodima konstantno je značajno smanjenje razine PPARG tretmanom simvastatinom u svim koncentracijama s obzirom na kontrolne diferencirane stanice (Tablica 5.14., Tablica 5.15.).

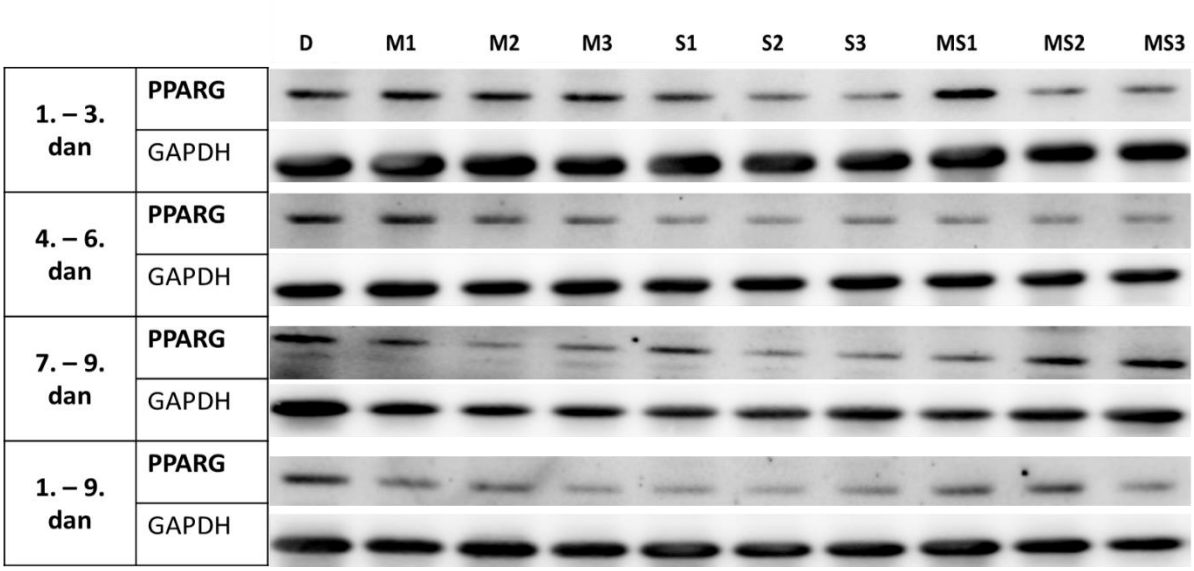
Sličan učinak tretmana uočen je i na razinu proteina CEBPA. U stanicama tretiranim od 7. do 9. i od 1. do 9. dana diferencijacije lijekovi su u svim koncentracijama značajno smanjili razinu CEBPA u odnosu na kontrolne diferencirane stanice, s izuzetkom srednje koncentracije simvastatina od 7. do 9. dana diferencijacije (Tablica 5.16., Tablica 5.17., Slika 5.8.). Tretmani od 1. do 3. dana diferencijacije značajno su smanjili razinu CEBPA samo u kombinaciji metformina i simvastatina u srednjoj i najvećoj koncentraciji, dok je u stanicama tretiranima od 4. do 6. dana značajno smanjenje razine CEBPA ostvario simvastatin u svim koncentracijama (Tablica 5.16., Tablica 5.17.).

Smanjenje razine proteina SREBP1C također je najuočljivije u stanicama tretiranim od 7. do 9. i 1. do 9. dana diferencijacije (Slika 5.9.). Značajno smanjenje u odnosu na kontrolne diferencirane stanice postignuto je svim koncentracijama lijekova s izuzetkom kombinacije metformina i simvastatina u najnižoj koncentraciji (Tablica 5.18., Tablica 5.19.). U stanicama tretiranima od 4. do 6. dana diferencijacije najniža koncentracija značajno je podigla razinu SREBP1C u odnosu na ostale tretirane stanice, no bez značajne razlike u odnosu na kontrolne diferencirane stanice (Tablica 5.18., Tablica 5.19.). U istom vremenskom periodu djelovanja tretmana, razina SREBP1C značajno je smanjena u odnosu na kontrolne diferencirane stanice tretmanom simvastatinom i kombiniranim tretmanom metforminom i simvastatinom u najnižoj i srednjoj koncentraciji (Tablica 5.18., Tablica 5.19.). U stanicama tretiranima od 1. do 3. dana diferencijacije statistički značajno smanjenje razine SREBP1C nalazimo kod kombiniranog tretmana metforminom i simvastatinom u srednjoj i najvećoj koncentraciji (Tablica 5.18., Tablica 5.19.).

Razina proteina STAT3 značajno je smanjena u odnosu na kontrolne diferencirane stanice u svim tretiranim stanicama neovisno o koncentraciji i vremenskom periodu djelovanja tretmana, uz izuzetak najmanje koncentracije metformina u stanicama tretiranima od 1. do 3. i

od 4. do 6. dana, i najveće koncentracije simvastatina u stanicama tretiranima od 1. do 3. dana (Tablica 5.20., Tablica 5.21., Slika 5.10.). Osim toga, vidljivo je kako kod stanica tretiranih unutar istog vremenskog perioda postoje statistički značajne razlike između kombiniranog i pojedinačnog tretmana u svim koncentracijama, a postoje i značajne razlike između vremenskih perioda djelovanja jednakih koncentracija lijekova, pojedinačno ili u kombinaciji (Tablica 5.21.).

Oprečan učinak istih koncentracija tretmana na razinu proteina SMAD3 vidljiv je u ovisnosti o vremenskom periodu djelovanja tretmana (Slika 5.11.). Djelovanjem tretmana od 1. do 3. i 4. do 6. dana diferencijacije vidi se trend povećanja razine SMAD3 u odnosu na kontrolne diferencirane stanice, dok se djelovanjem tretmana od 7. do 9. i od 1. do 9. dana diferencijacije vidi trend smanjenja razine SMAD3 (Tablica 5.22., Tablica 5.23.). Zbog takvog načina djelovanja na razinu SMAD3, nalaze se statistički značajne razlike između koncentracija tretmana unutar jednog vremenskog perioda, te između vremenskih perioda kod jednakih koncentracija lijekova (Tablica 5.23.). Izuzetak od pozitivne regulacije proteinske ekspresije SMAD3 vidi se kod kombiniranog tretmana metforminom i simvastatinom u srednjoj i najvećoj koncentraciji tijekom 1. do 3. dana diferencijacije, te tretmana simvastatinom u najmanjoj i srednjoj koncentraciji tijekom 4. do 6. dana diferencijacije (Tablica 5.22., Tablica 5.23.). Izuzetak od negativne regulacije proteinske ekspresije SMAD3 vidi se kod stanica tretiranih simvastatinom u vremenskim periodima od 7. do 9. i od 1. do 9. dana diferencijacije (Tablica 5.22., Tablica 5.23.).



Slika 5.7. Prikaz Western blot detekcije proteinskih vrpci PPARG i unutarnje kontrole GAPDH u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima. Kontrolna skupina su diferencirane stanice bez tretiranja metforminom i simvastatinom.

D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 µM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 µM]; S3 = simvastatin [2 µM]; MS1 = metformin [200 µM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 µM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 µM]

Tablica 5.14. Proteinska ekspresija PPARG u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima, izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica

Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana										Dvosmjerna ANOVA					
	D – kontrola	M1	M2	M3	S1	S2	S3	MS1	MS2	MS3	F; (stupanj slobode)			p		
	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	VPT	KT	VPT x KT	VPT	KT	VPT x KT
1. - 3. dan	100,00; 23,37	104,53; 6,21	96,84; 2,87	73,40; 11,82	56,63; 19,27	36,64; 6,62	34,61; 2,87	112,47; 23,37	37,08; 5,96	46,29; 12,23	67,51 (3, 80)	43,83 (9, 80)	8,828 (27, 80)	<0,001	<0,001	<0,001
4. - 6. dan	100,00; 24,16	120,24; 6,66	76,57; 5,81	80,94; 21,81	46,71; 19,53	48,44; 15,85	59,15; 16,84	36,61; 5,04	36,10; 5,71	39,99; 10,67						
7. - 9. dan	100,00; 6,59	46,26; 11,58	28,02; 11,50	25,23 5,31	16,91; 5,67	4,48; 1,05	6,16; 0,52	7,30; 0,48	23,97; 4,01	32,61; 7,37						
1. - 9. dan	100,00; 24,69	66,14; 8,47	131,20; 16,72	37,52; 15,56	37,67; 12,33	33,11; 12,06	53,97; 9,89	80,19; 8,42	77,72; 4,11	32,37; 7,81						

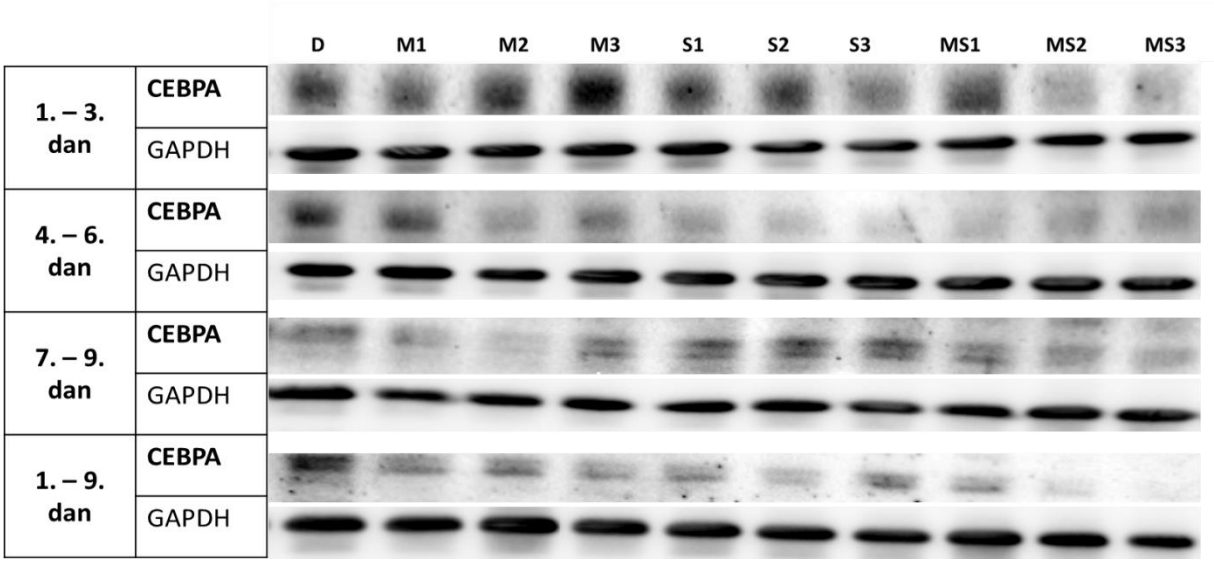
Dvosmjerna analiza varijance; $p < 0,05$. Rezultati predstavljaju aritmetičku sredinu sa standardnom devijacijom, izračunato iz tri ponavljanja.
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]; AS = aritmetička sredina; SD = standardna devijacija; VPT = vremenski period tretiranja; KT = koncentracija tretmana

Tablica 5.15. Statistički značajne razlike u proteinskoj ekspresiji PPARG u 3T3-L1 stanicama s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana

Prvi niz varijabli (A)		Drugi niz varijabli (B)		p (A vs B)
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	S1	0,028
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	S3	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	S1	0,006
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	S3	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	M1	7. - 9. dan	M1	<0,001
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	S3	<0,001
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	MS3	0,003
1. - 3. dan	M2	7. - 9. dan	M2	<0,001
1. - 3. dan	S1	1. - 3. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	S2	1. - 3. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	S3	1. - 3. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	MS1	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	MS1	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	MS1	4. - 6. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	MS1	7. - 9. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	S1	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	S2	0,002
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	MS2	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	M2	0,026
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	S1	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	S2	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	S3	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	MS2	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	M1	7. - 9. dan	M1	<0,001
4. - 6. dan	M1	1. - 9. dan	M1	<0,001
4. - 6. dan	M2	7. - 9. dan	M2	0,005
4. - 6. dan	M2	1. - 9. dan	M2	<0,001
4. - 6. dan	M3	4. - 6. dan	MS1	0,021
4. - 6. dan	M3	4. - 6. dan	MS2	0,018
4. - 6. dan	M3	7. - 9. dan	M3	<0,001
4. - 6. dan	M3	1. - 9. dan	M3	0,028
4. - 6. dan	S2	7. - 9. dan	S2	0,024
4. - 6. dan	S3	7. - 9. dan	S3	0,0011
4. - 6. dan	MS1	7. - 9. dan	MS1	0,026
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	M1	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	M2	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	M3	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	S1	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	S2	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	S3	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	MS1	<0,001

Prvi niz varijabli (A)		Drugi niz varijabli (B)		p (A vs B)
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	MS2	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	MS3	<0,001
7. - 9. dan	M1	7. - 9. dan	S2	0,045
7. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	M2	<0,001
7. - 9. dan	S3	1. - 9. dan	S3	0,007
7. - 9. dan	MS1	1. - 9. dan	MS1	<0,001
7. - 9. dan	MS2	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	M3	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	S1	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	S2	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	S3	0,012
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	M2	<0,001
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	M3	<0,001
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	S1	<0,001
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	S2	<0,001
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	S3	<0,001
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	MS1	0,002
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	M3	1. - 9. dan	MS1	0,035
1. - 9. dan	S1	1. - 9. dan	MS1	0,063
1. - 9. dan	S2	1. - 9. dan	MS1	0,009
1. - 9. dan	S2	1. - 9. dan	MS2	0,019
1. - 9. dan	MS1	1. - 9. dan	MS3	0,007
1. - 9. dan	MS2	1. - 9. dan	MS3	0,015

Statistički značajni rezultati određeni su post-hoc Tukey HSD testom dvosmjerne analize varijance ($p < 0,05$).
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]



Slika 5.8. Prikaz Western blot detekcije proteinskih vrpci CEBPA i unutarnje kontrole GAPDH u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima. Kontrolna skupina su diferencirane stanice bez tretiranja metforminom i simvastatinom.

D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]

Tablica 5.16. Proteinska ekspresija CEBPA u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima, izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica

Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana										Dvosmjerna ANOVA					
	D – kontrola	M1	M2	M3	S1	S2	S3	MS1	MS2	MS3	F; (stupanj slobode)			p		
	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	VPT	KT	VPT x KT	VPT	KT	VPT x KT
1. - 3. dan	100,00; 10,86	63,74; 8,27	81,21; 8,48	124,17; 0,82	85,87; 7,30	68,33; 9,80	62,03; 3,17	107,67; 6,82	43,91; 8,69	46,95; 9,19	74,49 (3, 80)	23,72 (9, 80)	8,645 (27, 80)	<0,001	<0,001	<0,001
4. - 6. dan	100,00; 16,20	101,18; 26,73	41,34; 21,03	65,99; 12,10	60,15; 1,45	50,37; 21,08	48,69; 29,46	75,10; 26,88	89,09; 21,91	79,13; 2,77						
7. - 9. dan	100,00; 14,72	47,35; 5,49	33,81; 4,32	50,54; 1,06	52,36; 4,08	62,13; 4,20	60,94; 6,85	51,53; 4,76	55,54; 9,69	31,60; 12,46						
1. - 9. dan	100,00; 5,82	56,57 6,85	56,03; 1,51	37,01; 1,55	37,44; 1,41	21,18; 1,55	21,24; 3,69	17,83; 4,85	10,21; 3,38	10,89; 6,46						

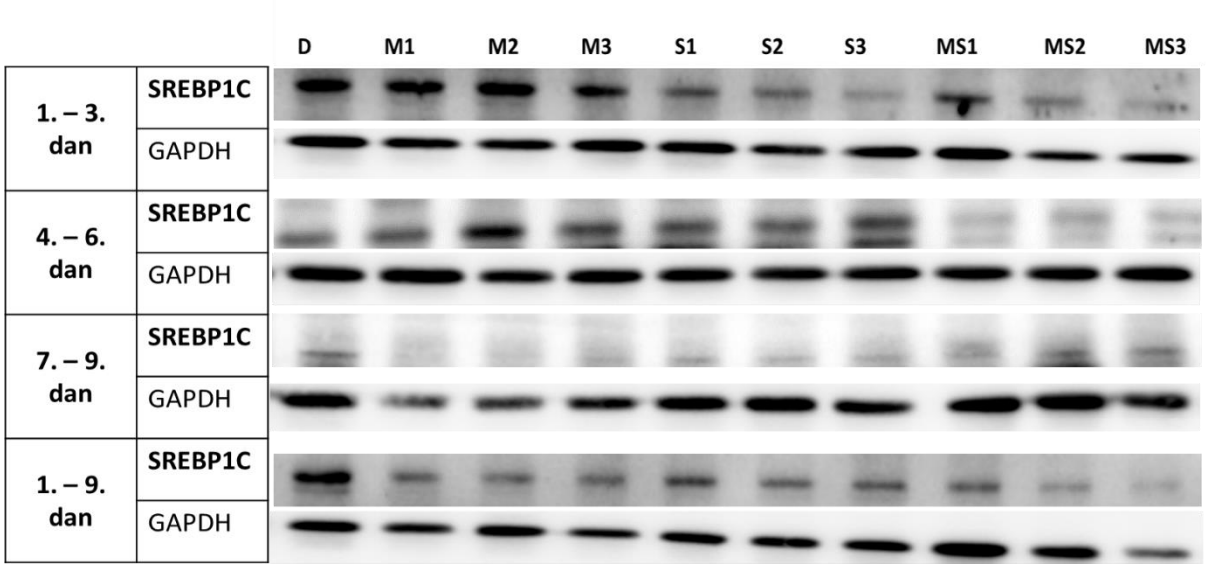
Dvosmjerna analiza varijance; $p < 0,05$. Rezultati predstavljaju aritmetičku sredinu sa standardnom devijacijom, izračunato iz tri ponavljanja.
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]; AS = aritmetička sredina; SD = standardna devijacija; VPT = vremenski period tretiranja; KT = koncentracija tretmana

Tablica 5.17. Statistički značajne razlike u proteinskoj ekspresiji CEBPA u 3T3-L1 stanicama s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana

Prvi niz varijabli (A)		Drugi niz varijabli (B)		p (A vs B)
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	MS1	0,009
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	M3	0,013
1. - 3. dan	M2	4. - 6. dan	M2	0,035
1. - 3. dan	M2	7. - 9. dan	M2	0,002
1. - 3. dan	M3	1. - 3. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	M3	1. - 3. dan	S3	<0,001
1. - 3. dan	M3	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	M3	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	M3	4. - 6. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	M3	7. - 9. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	M3	1. - 9. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	S1	1. - 3. dan	MS2	0,018
1. - 3. dan	S1	1. - 3. dan	MS2	0,047
1. - 3. dan	S1	1. - 9. dan	S1	0,002
1. - 3. dan	S2	1. - 3. dan	MS1	0,042
1. - 3. dan	S2	1. - 9. dan	S2	0,003
1. - 3. dan	S3	1. - 3. dan	MS1	0,005
1. - 3. dan	S3	1. - 9. dan	S3	0,003
1. - 3. dan	MS1	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	MS1	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	MS1	7. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	MS1	1. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	MS2	4. - 6. dan	MS2	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	M2	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	S1	0,035
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	S2	0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	S3	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	M2	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	S1	0,024
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	S2	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	S3	<0,001
4. - 6. dan	M1	7. - 9. dan	M1	<0,001
4. - 6. dan	M1	1. - 9. dan	M1	0,007
4. - 6. dan	M2	4. - 6. dan	MS2	0,002
4. - 6. dan	S2	4. - 6. dan	MS2	0,029
4. - 6. dan	MS1	1. - 9. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	MS2	1. - 9. dan	MS2	<0,001
4. - 6. dan	MS3	7. - 9. dan	MS3	0,002
4. - 6. dan	MS3	1. - 9. dan	MS3	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	M1	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	M2	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	M3	0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	S1	0,002
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	S3	0,045
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	MS1	0,002
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	MS2	0,007
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	MS3	<0,001
7. - 9. dan	S3	1. - 9. dan	S3	0,037
7. - 9. dan	MS2	1. - 9. dan	MS2	0,005
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	M1	0,011

Prvi niz varijabli (A)		Drugi niz varijabli (B)		p (A vs B)
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	M2	0,009
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	M3	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	S1	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	S2	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	S3	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	MS2	0,004
1. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	MS3	0,005
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	MS2	0,004
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	MS3	0,006

Statistički značajni rezultati određeni su post-hoc Tukey HSD testom dvosmjerne analize varijance ($p < 0,05$).
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]



Slika 5.9. Prikaz Western blot detekcije proteinskih vrpci SREBP1C i unutarnje kontrole GAPDH u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima. Kontrolna skupina su diferencirane stanice bez tretiranja metforminom i simvastatinom.

D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]

Tablica 5.18. Proteinska ekspresija SREBP1C u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima, izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica

Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana										Dvosmjerna ANOVA					
	D – kontrola	M1	M2	M3	S1	S2	S3	MS1	MS2	MS3	F; (stupanj slobode)			p		
	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	VPT	KT	VPT x KT	VPT	KT	VPT x KT
1. - 3. dan	100,00; 5,08	103,78; 4,37	91,59; 6,69	107,62; 4,35	105,11; 7,58	65,42; 5,10	67,46; 6,62	76,72; 5,58	18,61; 3,81	19,87; 3,43	68,25 (3, 80)	25,43 (9, 80)	17,62 (27, 80)	<0,001	<0,001	<0,001
4. - 6. dan	100,00; 6,76	132,42; 18,40	69,05; 9,92	71,93; 4,81	55,05; 2,24	39,87; 4,35	78,01; 7,58	47,34; 4,15	59,97; 5,94	74,19; 11,57						
7. - 9. dan	100,00; 12,22	15,92; 1,68	9,52; 2,05	13,19; 1,80	24,38; 3,19	29,43; 2,75	25,09; 2,16	37,70; 20,96	65,96; 39,68	56,42; 8,14						
1. - 9. dan	100,00; 8,73	32,28; 8,85	44,50; 8,73	40,70; 2,61	45,26; 4,28	31,22; 6,79	30,55; 8,77	118,81; 43,36	56,59; 5,15	22,25; 4,70						

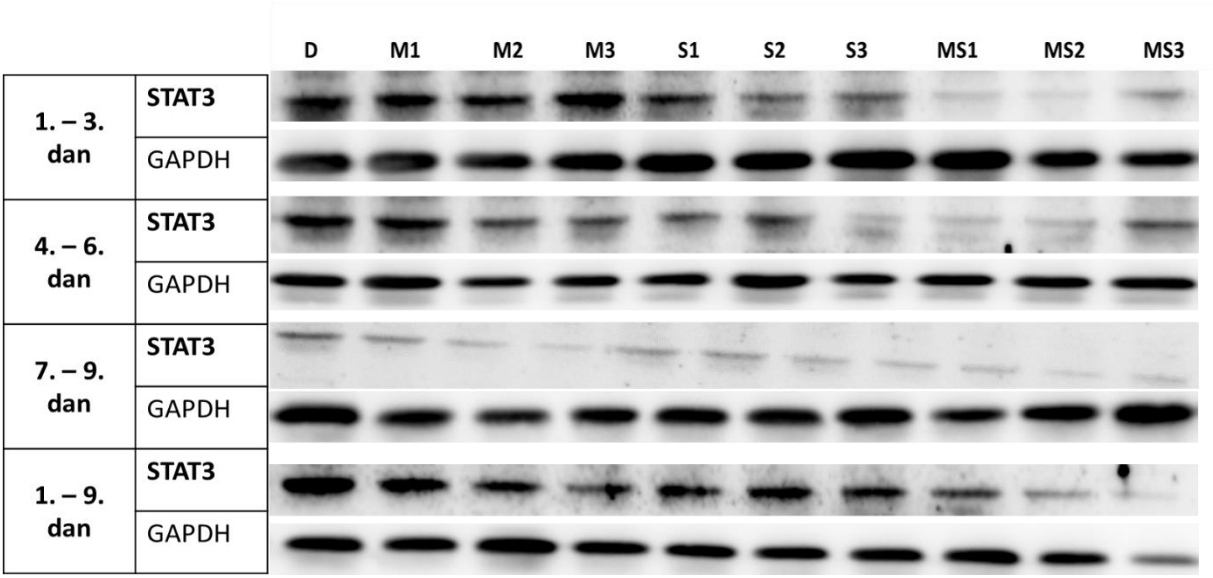
Dvosmjerna analiza varijance; $p < 0,05$. Rezultati predstavljaju aritmetičku sredinu sa standardnom devijacijom, izračunato iz tri ponavljanja.
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]; AS = aritmetička sredina; SD = standardna devijacija; VPT = vremenski period tretiranja; KT = koncentracija tretmana

Tablica 5.19. Statistički značajne razlike u proteinskoj ekspresiji SREBP1C u 3T3-L1 stanicama s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana

Prvi niz varijabli (A)		Drugi niz varijabli (B)		p (A vs B)
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	M1	7. - 9. dan	M1	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 9. dan	M1	<0,001
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	M2	7. - 9. dan	M2	<0,001
1. - 3. dan	M2	1. - 9. dan	M2	0,003
1. - 3. dan	M3	1. - 3. dan	S2	0,019
1. - 3. dan	M3	1. - 3. dan	S3	0,037
1. - 3. dan	M3	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	M3	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	M3	7. - 9. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	M3	1. - 9. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	S1	1. - 3. dan	S2	0,043
1. - 3. dan	S1	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	S1	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	S1	4. - 6. dan	S1	0,001
1. - 3. dan	S1	7. - 9. dan	S1	<0,001
1. - 3. dan	S1	1. - 9. dan	S1	<0,001
1. - 3. dan	S2	1. - 3. dan	MS2	0,004
1. - 3. dan	S2	1. - 3. dan	MS3	0,006
1. - 3. dan	S3	1. - 3. dan	MS2	0,002
1. - 3. dan	S3	1. - 3. dan	MS3	0,003
1. - 3. dan	S3	7. - 9. dan	S3	0,018
1. - 3. dan	MS1	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	MS1	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	MS1	1. - 9. dan	MS1	0,019
1. - 3. dan	MS2	4. - 6. dan	MS2	0,026
1. - 3. dan	MS2	7. - 9. dan	MS2	0,003
1. - 3. dan	MS3	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	S1	0,007
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	S2	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	MS2	0,038
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	M2	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	M3	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	S1	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	S2	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	S3	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	MS2	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	M1	7. - 9. dan	M1	<0,001
4. - 6. dan	M1	1. - 9. dan	M1	<0,001
4. - 6. dan	M2	7. - 9. dan	M2	<0,001
4. - 6. dan	M3	7. - 9. dan	M3	<0,001
4. - 6. dan	S3	7. - 9. dan	S3	<0,001
4. - 6. dan	S3	1. - 9. dan	S3	0,003
4. - 6. dan	MS1	1. - 9. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	MS3	1. - 9. dan	MS3	<0,001

Prvi niz varijabli (A)		Drugi niz varijabli (B)		p (A vs B)
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	M1	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	M2	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	M3	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	S1	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	S2	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	S3	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	MS1	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	MS3	0,012
7. - 9. dan	M1	7. - 9. dan	MS2	0,001
7. - 9. dan	M1	7. - 9. dan	MS3	0,033
7. - 9. dan	M2	7. - 9. dan	MS2	<0,001
7. - 9. dan	M2	7. - 9. dan	MS3	0,004
7. - 9. dan	M3	7. - 9. dan	MS2	<0,001
7. - 9. dan	M3	7. - 9. dan	MS3	0,013
7. - 9. dan	S1	7. - 9. dan	MS2	0,023
7. - 9. dan	S3	7. - 9. dan	MS2	0,029
7. - 9. dan	MS1	1. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	M1	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	M2	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	M3	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	S1	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	S2	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	S3	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	MS2	0,013
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 9. dan	M3	1. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 9. dan	S1	1. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 9. dan	S2	1. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 9. dan	S3	1. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 9. dan	MS1	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	MS1	1. - 9. dan	MS3	<0,001

Statistički značajni rezultati određeni su post-hoc Tukey HSD testom dvosmjerne analize varijance ($p < 0,05$).
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]



Slika 5.10. Prikaz Western blot detekcije proteinskih vrpci STAT3 i unutarnje kontrole GAPDH u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima. Kontrolna skupina su diferencirane stanice bez tretiranja metforminom i simvastatinom.

D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]

Tablica 5.20. Proteinska ekspresija STAT3 u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima, izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica

Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana										Dvosmjerna ANOVA					
	D – kontrola	M1	M2	M3	S1	S2	S3	MS1	MS2	MS3	F; (stupanj slobode)			p		
	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	VPT	KT	VPT x KT	VPT	KT	VPT x KT
1. - 3. dan	100,00; 0,97	93,07; 1,00	86,54; 1,30	136,55; 5,82	116,62; 6,07	76,79; 2,26	98,56; 6,77	24,18; 5,99	9,04; 2,26	26,70; 0,78	600,6 (3, 80)	423,3 (9, 80)	126,3 (27, 80)	<0,001	<0,001	<0,001
4. - 6. dan	100,00; 2,29	104,49; 5,05	40,50; 0,71	44,08; 1,17	39,10; 0,13	72,15; 0,54	19,99; 1,95	21,08; 3,29	20,38; 1,91	59,98; 2,68						
7. - 9. dan	100,00; 13,47	21,24; 0,61	11,86; 2,01	19,07; 4,86	28,78; 3,85	31,73; 2,79	36,01; 9,66	18,35; 6,32	30,69; 3,01	40,16; 1,68						
1. - 9. dan	100,00; 2,13	64,17; 1,44	74,74; 1,58	51,84; 1,44	54,88; 0,50	61,46; 0,29	56,48; 2,11	45,91; 0,99	15,00; 0,95	6,58; 0,94						

Dvosmjerna analiza varijance; $p < 0,05$. Rezultati predstavljaju aritmetičku sredinu sa standardnom devijacijom, izračunato iz tri ponavljanja.
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]; AS = aritmetička sredina; SD = standardna devijacija; VPT = vremenski period tretiranja; KT = koncentracija tretmana

Tablica 5.21. Statistički značajne razlike u proteinskoj ekspresiji STAT3 u 3T3-L1 stanicama s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana

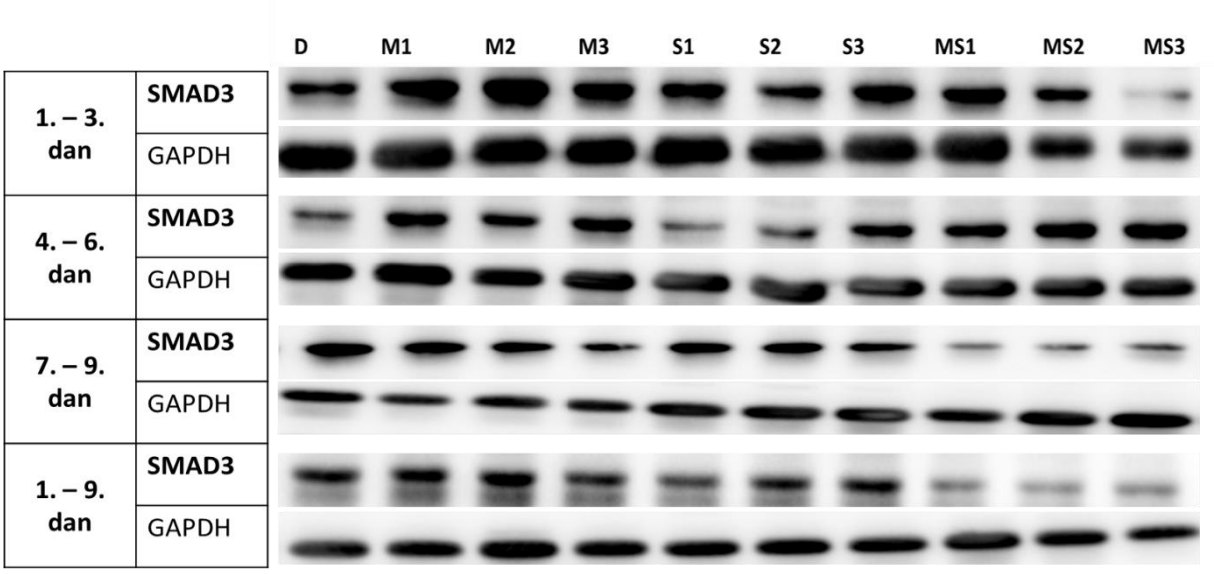
Prvi niz varijabli (A)		Drugi niz varijabli (B)		p (A vs B)
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	M2	0,033
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	S1	0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	S1	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	S2	0,002
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	M1	7. - 9. dan	M1	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 9. dan	M1	<0,001
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	S1	<0,001
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	M2	4. - 6. dan	M2	<0,001
1. - 3. dan	M2	7. - 9. dan	M2	<0,001
1. - 3. dan	M3	1. - 3. dan	S1	0,017
1. - 3. dan	M3	1. - 3. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	M3	1. - 3. dan	S3	<0,001
1. - 3. dan	M3	1. - 3. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	M3	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	M3	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	M3	4. - 6. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	M3	7. - 9. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	M3	1. - 9. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	S1	1. - 3. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	S1	1. - 3. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	S1	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	S1	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	S1	4. - 6. dan	S1	<0,001
1. - 3. dan	S1	7. - 9. dan	S1	<0,001
1. - 3. dan	S1	1. - 9. dan	S1	<0,001
1. - 3. dan	S2	1. - 3. dan	S3	<0,001
1. - 3. dan	S2	1. - 3. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	S2	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	S2	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	S2	4. - 6. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	S2	7. - 9. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	S2	1. - 9. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	S3	1. - 3. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	S3	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	S3	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	S3	4. - 6. dan	S3	<0,001
1. - 3. dan	S3	7. - 9. dan	S3	<0,001
1. - 3. dan	S3	1. - 9. dan	S3	<0,001

Prvi niz varijabli (A)		Drugi niz varijabli (B)		p (A vs B)
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	
1. - 3. dan	MS1	1. - 3. dan	MS2	0,006
1. - 3. dan	MS1	1. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	MS2	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	MS2	7. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	MS3	4. - 6. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	MS3	7. - 9. dan	MS3	0,032
1. - 3. dan	MS3	1. - 9. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	M2	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	M3	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	S1	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	S2	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	S3	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	MS2	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	M2	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	M3	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	S1	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	S2	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	S3	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	MS2	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	M1	7. - 9. dan	M1	<0,001
4. - 6. dan	M1	1. - 9. dan	M1	<0,001
4. - 6. dan	M2	4. - 6. dan	S2	<0,001
4. - 6. dan	M2	4. - 6. dan	S3	<0,001
4. - 6. dan	M2	4. - 6. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	M2	4. - 6. dan	MS2	<0,001
4. - 6. dan	M2	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	M2	7. - 9. dan	M2	<0,001
4. - 6. dan	M2	1. - 9. dan	M2	<0,001
4. - 6. dan	M3	4. - 6. dan	S2	<0,001
4. - 6. dan	M3	4. - 6. dan	S3	<0,001
4. - 6. dan	M3	4. - 6. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	M3	4. - 6. dan	MS2	<0,001
4. - 6. dan	M3	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	M3	7. - 9. dan	M3	<0,001
4. - 6. dan	S1	4. - 6. dan	S2	<0,001
4. - 6. dan	S1	4. - 6. dan	S3	<0,001
4. - 6. dan	S1	4. - 6. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	S1	4. - 6. dan	MS2	<0,001
4. - 6. dan	S1	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	S1	1. - 9. dan	S1	0,003
4. - 6. dan	S2	4. - 6. dan	S3	<0,001
4. - 6. dan	S2	4. - 6. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	S2	4. - 6. dan	MS2	<0,001
4. - 6. dan	S2	7. - 9. dan	S2	<0,001
4. - 6. dan	S3	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	S3	7. - 9. dan	S3	0,0021
4. - 6. dan	S3	1. - 9. dan	S3	<0,001
4. - 6. dan	MS1	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	MS1	1. - 9. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	MS2	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	MS3	7. - 9. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	MS3	1. - 9. dan	MS3	<0,001

Prvi niz varijabli (A)		Drugi niz varijabli (B)		p (A vs B)
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	M1	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	M2	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	M3	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	S1	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	S2	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	S3	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	MS1	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	MS2	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	MS3	<0,001
7. - 9. dan	M1	7. - 9. dan	S3	0,009
7. - 9. dan	M1	7. - 9. dan	MS3	<0,001
7. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	M1	<0,001
7. - 9. dan	M2	7. - 9. dan	S1	<0,001
7. - 9. dan	M2	7. - 9. dan	S2	<0,001
7. - 9. dan	M2	7. - 9. dan	S3	<0,001
7. - 9. dan	M2	7. - 9. dan	MS2	<0,001
7. - 9. dan	M2	7. - 9. dan	MS3	<0,001
7. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	M2	<0,001
7. - 9. dan	M3	7. - 9. dan	S3	<0,001
7. - 9. dan	M3	7. - 9. dan	MS3	<0,001
7. - 9. dan	M3	1. - 9. dan	M3	<0,001
7. - 9. dan	S1	1. - 9. dan	S1	<0,001
7. - 9. dan	S2	7. - 9. dan	MS1	0,035
7. - 9. dan	S2	1. - 9. dan	S2	<0,001
7. - 9. dan	S3	7. - 9. dan	MS1	<0,001
7. - 9. dan	S3	1. - 9. dan	S3	<0,001
7. - 9. dan	MS1	7. - 9. dan	MS3	<0,001
7. - 9. dan	MS1	1. - 9. dan	MS1	<0,001
7. - 9. dan	MS2	1. - 9. dan	MS2	<0,001
7. - 9. dan	MS3	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	M1	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	M2	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	M3	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	S1	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	S2	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	S3	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	M3	<0,001
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	S1	<0,001
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	S2	0,039
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	S3	<0,001
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	M3	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	M3	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	S1	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	S1	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	S2	1. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 9. dan	S2	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	S2	1. - 9. dan	MS3	<0,001

Prvi niz varijabli (A)		Drugi niz varijabli (B)		p (A vs B)
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	
1. - 9. dan	S3	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	S3	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	MS1	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	MS1	1. - 9. dan	MS3	<0,001

Statistički značajni rezultati određeni su post-hoc Tukey HSD testom dvosmjerne analize varijance ($p < 0,05$).
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]



Slika 5.11. Prikaz Western blot detekcije proteinskih vrpci SMAD3 i unutarnje kontrole GAPDH u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima. Kontrolna skupina su diferencirane stanice bez tretiranja metforminom i simvastatinom.

D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 µM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 µM]; S3 = simvastatin [2 µM]; MS1 = metformin [200 µM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 µM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 µM]

Tablica 5.22. Proteinska ekspresija SMAD3 u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima, izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica

Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana										Dvosmjerna ANOVA					
	D – kontrola	M1	M2	M3	S1	S2	S3	MS1	MS2	MS3	F; (stupanj slobode)			p		
	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	VPT	KT	VPT x KT	VPT	KT	VPT x KT
1. - 3. dan	100,00; 6,12	138,28; 3,76	155,25; 0,67	114,79; 0,99	112,82; 8,11	73,53; 8,56	108,87; 5,26	114,38; 7,12	45,99: 2,03	16,16; 2,74	1592 (3, 80)	191 (9, 80)	269,8 (27, 80)	<0,001	<0,001	<0,001
4. - 6. dan	100,00; 5,26	205,34; 0,55	113,68; 1,94	159,81; 1,48	76,31; 4,22	91,46; 0,90	127,72; 0,48	118,17; 3,37	140,67; 5,88	139,49; 3,02						
7. - 9. dan	100,00; 4,07	30,05; 1,33	38,76; 1,94	30,34; 1,30	97,52; 4,22	101,15; 4,41	81,27; 3,10	30,95; 1,46	57,43; 7,78	56,61; 4,77						
1. - 9. dan	100,00; 3,50	38,34; 3,21	49,46; 1,85	69,15; 1,37	117,01; 2,53	114,34; 1,82	107,95; 3,80	62,35; 4,39	29,94; 6,00	14,46; 0,35						

Dvosmjerna analiza varijance; $p < 0,05$. Rezultati predstavljaju aritmetičku sredinu sa standardnom devijacijom, izračunato iz tri ponavljanja.
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]; AS = aritmetička sredina; SD = standardna devijacija; VPT = vremenski period tretiranja; KT = koncentracija tretmana

Tablica 5.23. Statistički značajne razlike u proteinskoj ekspresiji SMAD3 u 3T3-L1 stanicama s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana

Prvi niz varijabli (A)		Drugi niz varijabli (B)		p (A vs B)
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	M1	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	M2	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	M3	0,013
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	MS1	0,019
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	M2	0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	S1	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	S3	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	M1	4. - 6. dan	M1	<0,001
1. - 3. dan	M1	7. - 9. dan	M1	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 9. dan	M1	<0,001
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	S1	<0,001
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	S3	<0,001
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	M2	4. - 6. dan	M2	<0,001
1. - 3. dan	M2	7. - 9. dan	M2	<0,001
1. - 3. dan	M2	1. - 9. dan	M2	<0,001
1. - 3. dan	M3	1. - 3. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	M3	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	M3	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	M3	4. - 6. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	M3	7. - 9. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	M3	1. - 9. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	S1	1. - 3. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	S1	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	S1	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	S1	4. - 6. dan	S1	<0,001
1. - 3. dan	S1	7. - 9. dan	S1	0,007
1. - 3. dan	S2	1. - 3. dan	S3	<0,001
1. - 3. dan	S2	1. - 3. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	S2	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	S2	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	S2	4. - 6. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	S2	7. - 9. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	S2	1. - 9. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	S3	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	S3	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	S3	4. - 6. dan	S3	<0,001
1. - 3. dan	S3	7. - 9. dan	S3	<0,001
1. - 3. dan	MS1	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	MS1	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	MS1	7. - 9. dan	MS1	<0,001

Prvi niz varijabli (A)		Drugi niz varijabli (B)		p (A vs B)
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	
1. - 3. dan	MS1	1. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	MS2	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	MS2	4. - 6. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	MS2	1. - 9. dan	MS2	0,003
1. - 3. dan	MS3	4. - 6. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	MS3	7. - 9. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	M1	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	M2	0,037
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	M3	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	S1	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	S3	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	MS2	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	M2	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	M3	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	S1	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	S2	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	S3	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	MS2	<0,001
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	M1	7. - 9. dan	M1	<0,001
4. - 6. dan	M1	1. - 9. dan	M1	<0,001
4. - 6. dan	M2	4. - 6. dan	M3	<0,001
4. - 6. dan	M2	4. - 6. dan	S1	<0,001
4. - 6. dan	M2	4. - 6. dan	S2	<0,001
4. - 6. dan	M2	4. - 6. dan	S3	0,026
4. - 6. dan	M2	4. - 6. dan	MS2	<0,001
4. - 6. dan	M2	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	M2	7. - 9. dan	M2	<0,001
4. - 6. dan	M2	1. - 9. dan	M2	<0,001
4. - 6. dan	M3	7. - 9. dan	S1	<0,001
4. - 6. dan	M3	4. - 6. dan	S2	<0,001
4. - 6. dan	M3	4. - 6. dan	S3	<0,001
4. - 6. dan	M3	4. - 6. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	M3	4. - 6. dan	MS2	<0,001
4. - 6. dan	M3	7. - 9. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	M3	7. - 9. dan	M3	<0,001
4. - 6. dan	M3	1. - 9. dan	M3	<0,001
4. - 6. dan	S1	4. - 6. dan	S2	0,009
4. - 6. dan	S1	4. - 6. dan	S3	<0,001
4. - 6. dan	S1	4. - 6. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	S1	4. - 6. dan	MS2	<0,001
4. - 6. dan	S1	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	S1	7. - 9. dan	S1	<0,001
4. - 6. dan	S1	1. - 9. dan	S1	<0,001
4. - 6. dan	S2	4. - 6. dan	S3	<0,001
4. - 6. dan	S2	4. - 6. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	S2	4. - 6. dan	MS2	<0,001
4. - 6. dan	S2	7. - 9. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	S3	7. - 9. dan	S3	<0,001
4. - 6. dan	S3	1. - 9. dan	S3	<0,001
4. - 6. dan	MS1	4. - 6. dan	MS2	<0,001
4. - 6. dan	MS1	4. - 6. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	MS1	7. - 9. dan	MS1	<0,001

Prvi niz varijabli (A)		Drugi niz varijabli (B)		p (A vs B)
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	
4. - 6. dan	MS1	1. - 9. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	MS2	7. - 9. dan	MS2	<0,001
4. - 6. dan	MS2	1. - 9. dan	MS2	<0,001
4. - 6. dan	MS3	7. - 9. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	MS3	1. - 9. dan	MS3	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	M1	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	M2	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	M3	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	S3	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	MS1	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	MS2	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	MS3	<0,001
7. - 9. dan	M1	7. - 9. dan	S1	<0,001
7. - 9. dan	M1	7. - 9. dan	S2	<0,001
7. - 9. dan	M1	7. - 9. dan	S3	<0,001
7. - 9. dan	M1	7. - 9. dan	MS2	<0,001
7. - 9. dan	M1	7. - 9. dan	MS3	<0,001
7. - 9. dan	M2	7. - 9. dan	S1	<0,001
7. - 9. dan	M2	7. - 9. dan	S2	<0,001
7. - 9. dan	M2	7. - 9. dan	S3	<0,001
7. - 9. dan	M2	7. - 9. dan	MS2	<0,001
7. - 9. dan	M2	7. - 9. dan	MS3	<0,001
7. - 9. dan	M3	7. - 9. dan	S1	<0,001
7. - 9. dan	M3	7. - 9. dan	S2	<0,001
7. - 9. dan	M3	7. - 9. dan	S3	<0,001
7. - 9. dan	M3	7. - 9. dan	MS2	<0,001
7. - 9. dan	M3	7. - 9. dan	MS3	<0,001
7. - 9. dan	M3	1. - 9. dan	M3	<0,001
7. - 9. dan	S1	7. - 9. dan	S3	0,0026
7. - 9. dan	S1	7. - 9. dan	MS1	<0,001
7. - 9. dan	S1	7. - 9. dan	MS2	<0,001
7. - 9. dan	S1	7. - 9. dan	MS3	<0,001
7. - 9. dan	S1	1. - 9. dan	S1	<0,001
7. - 9. dan	S2	7. - 9. dan	S3	<0,001
7. - 9. dan	S2	7. - 9. dan	MS1	<0,001
7. - 9. dan	S2	7. - 9. dan	MS2	<0,001
7. - 9. dan	S2	7. - 9. dan	MS3	<0,001
7. - 9. dan	S3	7. - 9. dan	MS1	<0,001
7. - 9. dan	S3	7. - 9. dan	MS2	<0,001
7. - 9. dan	S3	7. - 9. dan	MS3	<0,001
7. - 9. dan	S3	1. - 9. dan	S3	<0,001
7. - 9. dan	MS1	7. - 9. dan	MS2	<0,001
7. - 9. dan	MS1	7. - 9. dan	MS3	<0,001
7. - 9. dan	MS1	1. - 9. dan	MS1	<0,001
7. - 9. dan	MS2	1. - 9. dan	MS2	<0,001
7. - 9. dan	MS3	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	M1	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	M2	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	M3	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	S1	0,0011
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	S2	0,0195
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	M3	<0,001
1. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	S1	<0,001

Prvi niz varijabli (A)		Drugi niz varijabli (B)		p (A vs B)
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	
1. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	S2	<0,001
1. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	S3	<0,001
1. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	M3	<0,001
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	S1	<0,001
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	S2	<0,001
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	S3	<0,001
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	M2	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	M3	1. - 9. dan	S1	<0,001
1. - 9. dan	M3	1. - 9. dan	S2	<0,001
1. - 9. dan	M3	1. - 9. dan	S3	<0,001
1. - 9. dan	M3	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	M3	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	S1	1. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 9. dan	S1	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	S1	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	S2	1. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 9. dan	S2	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	S2	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	S3	1. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 9. dan	S3	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	S3	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	MS1	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 9. dan	MS1	1. - 9. dan	MS3	<0,001
1. - 9. dan	MS2	1. - 9. dan	MS3	0,0061

Statistički značajni rezultati određeni su post-hoc Tukey HSD testom dvosmjerne analize varijance ($p < 0,05$).
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]

U tablici 5.24. prikazan je sumiran učinak pojedinih doza metformina i simvastatina te njihovih kombinacija na razine proteina ispitivanih transkripcijskih čimbenika i modulatora adipogeneze.

Tablica 5.24. Učinak metformina i simvastatina na razine proteina ispitivanih transkripcijskih čimbenika i modulatora adipogeneze s obzirom na vremenski period djelovanja, određeno Western blot metodom u odnosu na kontrolne diferencirane stanice

		M1	M2	M3	S1	S2	S3	MS1	MS2	MS3
1. -3. dan	PPARG	↓			↓↓	↓↓	↓↓		↓↓	↓↓
	CEBPA								↓↓	↓↓
	SREBP1C					↓	↓		↓↓	↓↓
	STAT3		↓↓	↓↓	↓↓	↓↓		↓↓	↓↓	↓↓
	SMAD3	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑		↑↑		↓↓	↓↓
4. -6. dan	PPARG				↓↓	↓↓	↓	↓↓	↓↓	↓↓
	CEBPA		↓↓	↓	↓↓	↓↓	↓↓			
	SREBP1C		↓		↓↓	↓↓		↓↓	↓↓	
	STAT3		↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
	SMAD3	↑↑	↑↑	↑↑	↓↓		↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
7. -9. dan	PPARG	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
	CEBPA	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
	SREBP1C	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓	↓↓
	STAT3	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
	SMAD3	↓↓	↓↓	↓↓			↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
1. -9. dan	PPARG	↓		↓↓	↓↓	↓↓	↓↓			↓↓
	CEBPA	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
	SREBP1C	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓		↓↓	↓↓
	STAT3	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
	SMAD3	↓↓	↓↓	↓↓	↑↑	↑↑		↓↓	↓↓	↓↓

M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]; ↑↑ = statistički značajno povećanje; ↓↓ = statistički značajno smanjenje; ↓ = primjetno smanjenje, ali bez statističke značajnosti

5.4.2. Proteinska ekspresija određena imunocitokemijom

Tretman metforminom i simvastatinom izazvao je najviše statistički značajnih promjena ekspresije ispitivanih epitopa u odnosu na kontrolne diferencirane stanice u vremenskim periodima djelovanja od 1. do 3. i od 4. do 6. dana diferencijacije.

Kombinirani tretman metforminom i simvastatinom u najmanjoj koncentraciji tijekom 1. do 3. dana diferencijacije značajno je smanjio ekspresiju PPARG u odnosu na kontrolne diferencirane stanice (post-hoc Tukey HSD test, $p = 0,028$). Ekspresija PPARG u tom vremenskom periodu smanjena je u svakoj tretiranoj skupini stanica neovisno o koncentraciji lijeka, ali bez statističke značajnosti (Tablica 5.25., Slika 5.12.). Statistički značajna razlika između vremenskih perioda postoji za tretman najmanjom koncentracijom metformina između 1. do 3. i 1. do 9. dana diferencijacije (post-hoc Tukey HSD test, $p = 0,006$).

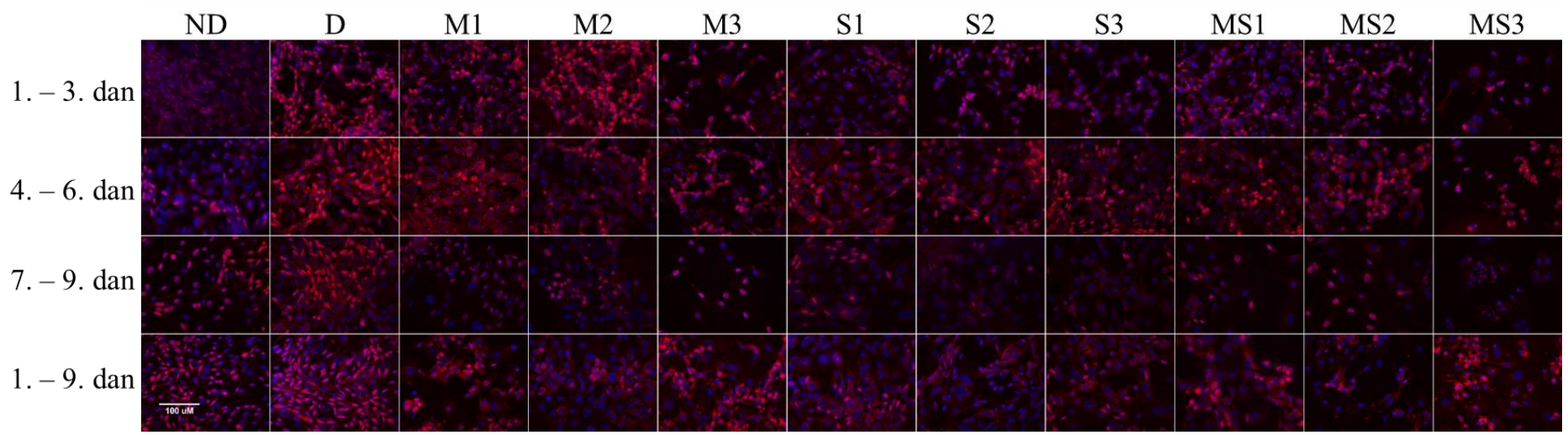
Ekspresija CEBPA statistički je značajno smanjena u svim tretiranim stanicama u odnosu na kontrolne diferencirane stanice tijekom vremenskog perioda djelovanja tretmana od 1. do 3. dana diferencijacije, neovisno o koncentraciji tretmana (Tablica 5.26., Tablica 5.27.). U stanicama tretiranima tijekom 4. do 6. dana diferencijacije, značajno smanjenje ekspresije CEBPA izazvao je simvastatin u srednjoj i najvećoj koncentraciji, te kombinirani tretman metforminom i simvastatinom u sve tri koncentracije (Tablica 5.26., Tablica 5.27.). Smanjenje ekspresije CEBPA vidljivo je u stanicama tretiranima kombinacijom metformina i simvastatina u svim koncentracijama tijekom 7. do 9. i 1. do 9. dana diferencijacije, ali bez statističke značajnosti (Tablica 5.26., Tablica 5.27., Slika 5.13.).

Ekspresija SREBP1C statistički je značajno smanjena u svim tretiranim stanicama u odnosu na kontrolne diferencirane stanice tijekom vremenskog perioda djelovanja tretmana 1. do 3. i 4. do 6. dana diferencijacije, uz izuzetak stanica tretiranih najmanjom koncentracijom metformina tijekom 4. do 6. dana diferencijacije (Tablica 5.28., Tablica 5.29.). Također postoji razlika između vremenskog perioda djelovanja tretmana od 1. do 3. dana diferencijacije i vremenskih perioda 7. do 9. i 1. do 9. dana diferencijacije za sve korištene koncentracije lijekova (Tablica 5.28., Tablica 5.29.). Tretman u periodima 7. do 9. i 1. do 9. dana diferencijacije nije pokazao značajan učinak na ekspresiju SREBP1C (Tablica 5.28., Tablica 5.29., Slika 5.14.).

Tretman najmanjom i srednjom koncentracijom metformina u periodu od 1. do 3. dana diferencijacije značajno je smanjio ekspresiju STAT3 u odnosu na kontrolne diferencirane stanice i ostale tretirane skupine (Tablica 5.30., Tablica 5.31.). Tretmani u periodima djelovanja od 4. do 6. i od 7. do 9. dana diferencijacije dovode do smanjenja ekspresije STAT3, ali bez

statistički značajne razlike u odnosu na kontrolne diferencirane stanice (Tablica 5.30., Tablica 5.31., Slika 5.15.). Najmanje koncentracije metformina i simvastatina u periodu djelovanja od 1. do 9. dana diferencijacije povisuju ekspresiju STAT3, no povišenje nije značajno u odnosu na kontrolne diferencirane stanice (Tablica 5.30., Tablica 5.31., Slika 5.15.).

Ekspresija SMAD3 statistički je značajno povišena u svim tretiranim stanicama u odnosu na kontrolne diferencirane stanice tijekom vremenskog perioda djelovanja tretmana od 1. do 3. dana diferencijacije, neovisno o koncentraciji lijeka, uz izuzetak najmanje koncentracije metformina koji također podiže ekspresiju SMAD3, ali bez statističke značajnosti (Tablica 5.32., Tablica 5.33.). Ekspresija SMAD3 u stanicama tretiranim tijekom drugih vremenskih perioda značajno je povišena u odnosu na kontrolne diferencirane stanice samo kod tretmana najmanjom koncentracijom metformina tijekom 7. do 9. dana diferencijacije, i kombiniranim tretmanom metforminom i simvastatinom u najvećoj koncentraciji tijekom 1. do 9. dana diferencijacije (Tablica 5.32., Tablica 5.33.). Druge koncentracije lijekova u tim vremenskim periodima, izuzev najmanje i srednje koncentracije simvastatina, također su povećale ekspresiju SMAD3, kao i svi tretmani tijekom vremenskog perioda od 4. do 6. dana diferencijacije, ali bez statističke značajnosti (Tablica 5.32., Tablica 5.33., Slika 5.16.).



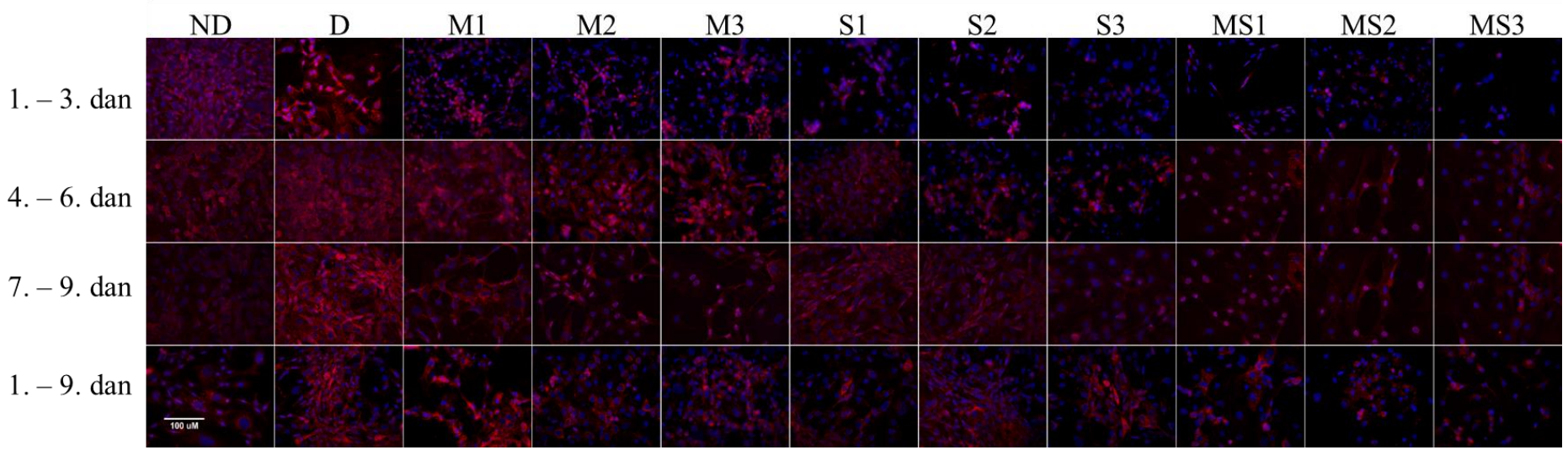
Slika 5.12. Prikaz proteinske ekspresije PPARG fluorescentnim imunocitokemijskim bojanjem 3T3-L1 stanica nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima. Kontrolna skupina su diferencirane stanice bez tretiranja metforminom i simvastatinom. Plavo obojenje = DAPI, stanične jezgre; Crveno obojenje = Cy5-PE, PPARG pozitivno bojanje. Zabilježeno kamerom Olympus DP70 montiranom na svjetlosni mikroskop Axioskop 2 MOT pomoću programa DP Controller 1.2.1.108; uvećanje 400x; skala 100 µm.

ND = nediferencirane stanice; D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 µM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 µM]; S3 = simvastatin [2 µM]; MS1 = metformin [200 µM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 µM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 µM]

Tablica 5.25. Jačina signala imunofluorescencije PPARG u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima, izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica

Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana										Dvosmjerna ANOVA					
	D – kontrola	M1	M2	M3	S1	S2	S3	MS1	MS2	MS3	F; (stupanj slobode)			p		
	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	VPT	KT	VPT x KT	VPT	KT	VPT x KT
1. - 3. dan	100,00; 34,58	68,16; 18,67	69,88; 5,75	83,41; 21,32	86,04; 7,85	72,43; 19,17	68,48; 11,79	50,05; 13,04	70,04; 3,21	76,90; 24,00	5,07 (3, 88)	3,37 (9, 88)	1,905 (27, 88)	0,003	0,001	0,013
4. - 6. dan	100,00; 18,02	100,21; 8,17	68,69; 16,69	46,61; 4,83	69,05; 8,67	67,99; 8,53	65,04; 2,98	86,91; 3,80	58,01; 5,41	86,02; 11,00						
7. - 9. dan	100,00; 9,73	77,07; 9,25	92,98; 55,09	78,60; 2,03	68,72; 4,20	65,94; 3,32	81,27; 22,48	105,26; 17,67	87,58; 26,52	73,41; 25,09						
1. - 9. dan	100,00; 24,36	130,65; 24,18	73,38; 3,42	75,95; 33,95	74,78; 11,30	70,34; 4,30	96,86; 12,57	104,16; 8,79	86,71; 2,62	86,56; 7,14						

Dvosmjerna analiza varijance; $p < 0,05$. Rezultati predstavljaju aritmetičku sredinu sa standardnom devijacijom, izračunato iz tri ponavljanja.
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]; AS = aritmetička sredina; SD = standardna devijacija; VPT = vremenski period tretiranja; KT = koncentracija tretmana



Slika 5.13. Prikaz proteinske ekspresije CEBPA fluorescentnim imunocitokemijskim bojanjem 3T3-L1 stanica nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima. Kontrolna skupina su diferencirane stanice bez tretiranja metforminom i simvastatinom. Plavo obojenje = DAPI, stanične jezgre; Crveno obojenje = Cy5-PE, CEBPA pozitivno bojanje. Zabilježeno kamerom Olympus DP70 montiranom na svjetlosni mikroskop Axioskop 2 MOT pomoću programa DP Controller 1.2.1.108; uvećanje 400x; skala 100 µm.

ND = nediferencirane stanice; D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 µM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 µM]; S3 = simvastatin [2 µM]; MS1 = metformin [200 µM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 µM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 µM]

Tablica 5.26. Jačina signala imunofluorescencije CEBPA u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima, izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica

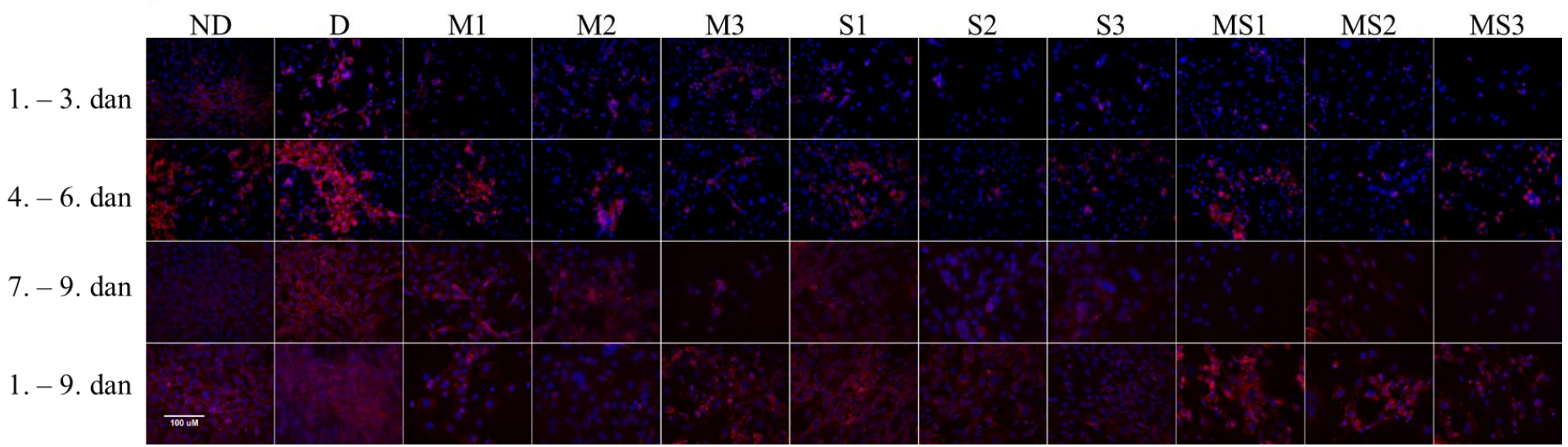
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana										Dvosmjerna ANOVA					
	D – kontrola	M1	M2	M3	S1	S2	S3	MS1	MS2	MS3	F; (stupanj slobode)			p		
	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	VPT	KT	VPT x KT	VPT	KT	VPT x KT
1. - 3. dan	100,00; 38,50	36,04; 5,98	26,68; 11,68	27,20; 11,53	21,27; 3,59	17,76; 10,21	20,45; 13,55	12,02; 7,77	23,60; 8,05	13,28; 5,93	52,16 (3, 87)	15,87 (9, 87)	2,15 (27, 87)	<0,001	<0,001	0,004
4. - 6. dan	100,00; 37,59	110,49; 9,61	76,38; 1,03	60,28; 11,14	53,21; 38,25	32,79; 6,59	31,54; 8,74	25,22; 0,80	20,60; 6,14	25,47; 15,11						
7. - 9. dan	100,00; 14,51	101,77; 12,46	68,96; 19,28	76,95; 17,04	60,59; 8,29	64,49; 2,00	42,11; 15,76	88,87; 18,40	82,80; 3,39	56,33; 17,02						
1. - 9. dan	100,00; 29,71	99,82; 16,13	102,94; 25,96	95,73; 43,49	96,02; 31,95	70,41; 9,15	46,90; 21,93	58,85; 9,89	57,77; 17,56	66,95; 5,43						

Dvosmjerna analiza varijance; $p < 0,05$. Rezultati predstavljaju aritmetičku sredinu sa standardnom devijacijom, izračunato iz tri ponavljanja.
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]; AS = aritmetička sredina; SD = standardna devijacija; VPT = vremenski period tretiranja; KT = koncentracija tretmana

Tablica 5.27. Statistički značajne razlike u jačini signala imunofluorescencije CEBPA u 3T3-L1 stanicama s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana

Prvi niz varijabli (A)		Drugi niz varijabli (B)		p (A vs B)
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	M1	0,0018
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	M2	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	S1	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	S3	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	M1	4. - 6. dan	M1	0,0071
1. - 3. dan	M1	7. - 9. dan	M1	0,0106
1. - 3. dan	M1	1. - 9. dan	M1	0,0156
1. - 3. dan	M2	1. - 9. dan	M2	<0,001
1. - 3. dan	M3	1. - 9. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	S1	1. - 9. dan	S1	0,0011
1. - 3. dan	MS1	7. - 9. dan	MS1	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	S2	0,0243
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	S3	0,0184
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	MS1	0,0226
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	MS2	0,0085
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	MS3	0,0226
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	S2	0,0119
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	S3	0,0091
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	MS1	0,0136
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	MS2	0,0055
4. - 6. dan	M1	4. - 6. dan	MS3	0,0136

Statistički značajni rezultati određeni su post-hoc Tukey HSD testom dvosmjerne analize varijance ($p < 0,05$).
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]



Slika 5.14. Prikaz proteinske ekspresije SREBP1C fluorescentnim imunocitokemijskim bojanjem 3T3-L1 stanica nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima. Kontrolna skupina su diferencirane stanice bez tretiranja metforminom i simvastatinom. Plavo obojenje = DAPI, stanične jezgre; Crveno obojenje = Cy5-PE, SREBP1C pozitivno bojanje. Zabilježeno kamerom Olympus DP70 montiranom na svjetlosni mikroskop Axioskop 2 MOT pomoću programa DP Controller 1.2.1.108; uvećanje 400x; skala 100 µm.

ND = nediferencirane stanice; D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 µM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 µM]; S3 = simvastatin [2 µM]; MS1 = metformin [200 µM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 µM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 µM]

Tablica 5.28. Jačina signala imunofluorescencije SREBP1C u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima, izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica

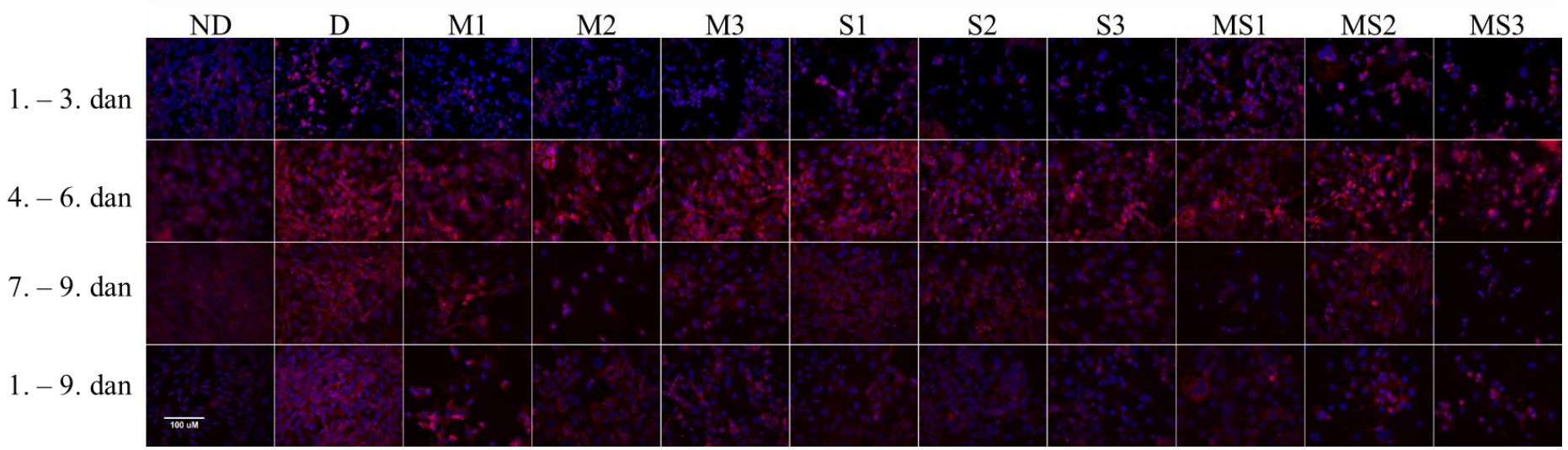
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana										Dvosmjerna ANOVA					
	D – kontrola	M1	M2	M3	S1	S2	S3	MS1	MS2	MS3	F; (stupanj slobode)			p		
	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	VPT	KT	VPT x KT	VPT	KT	VPT x KT
1. - 3. dan	100,00; 41,72	42,46; 4,55	24,22; 14,77	28,79; 7,02	25,86; 11,04	12,62; 5,97	15,46; 2,52	15,35; 7,09	9,16; 3,80	13,35; 2,59	130 (3, 88)	17,54 (9, 88)	1,181 (27, 88)	<0,001	<0,001	0,276
4. - 6. dan	100,00; 39,80	37,56; 3,58	15,59; 10,51	29,13; 15,82	25,65; 4,10	11,61; 3,49	20,10; 0,76	24,12; 12,64	12,73; 9,73	28,48; 4,16						
7. - 9. dan	100,00; 22,66	73,39; 9,83	79,16; 10,67	96,51; 6,93	98,60; 33,42	69,81; 41,82	65,07; 24,26	93,35; 36,00	97,99; 9,72	83,37; 34,28						
1. - 9. dan	100,00; 7,63	108,70; 8,04	84,67; 32,99	82,93; 16,45	94,03; 25,86	92,22; 8,97	68,91; 15,36	95,74; 14,33	98,24; 723,49	86,85; 15,62						

Dvosmjerna analiza varijance; $p < 0,05$. Rezultati predstavljaju aritmetičku sredinu sa standardnom devijacijom, izračunato iz tri ponavljanja.
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]; AS = aritmetička sredina; SD = standardna devijacija; VPT = vremenski period tretiranja; KT = koncentracija tretmana

Tablica 5.29. Statistički značajne razlike u jačini signala imunofluorescencije SREBP1C u 3T3-L1 stanicama s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana

Prvi niz varijabli (A)		Drugi niz varijabli (B)		p (A vs B)
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	M1	0,007
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	M2	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	S1	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	S3	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 9. dan	M1	<0,001
1. - 3. dan	M2	1. - 9. dan	M2	0,002
1. - 3. dan	M3	1. - 9. dan	M3	0,037
1. - 3. dan	S1	7. - 9. dan	S1	0,041
1. - 3. dan	S1	1. - 9. dan	S1	<0,001
1. - 3. dan	S2	7. - 9. dan	S2	0,036
1. - 3. dan	S2	1. - 9. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	S3	1. - 9. dan	S3	0,021
1. - 3. dan	MS1	7. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	MS1	1. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	MS2	7. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	MS2	1. - 9. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	MS3	7. - 9. dan	MS3	0,027
1. - 3. dan	MS3	1. - 9. dan	MS3	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	M2	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	M3	0,002
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	S1	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	S2	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	S3	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	MS1	0,003
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	MS2	<0,001
4. - 6. dan	D - kontrola	4. - 6. dan	MS3	0,009
4. - 6. dan	M1	1. - 9. dan	M1	<0,001
4. - 6. dan	M2	7. - 9. dan	M2	0,044
4. - 6. dan	M2	1. - 9. dan	M2	<0,001
4. - 6. dan	S1	1. - 9. dan	S1	0,004
4. - 6. dan	S2	1. - 9. dan	S2	<0,001
4. - 6. dan	MS1	7. - 9. dan	MS1	0,004
4. - 6. dan	MS1	1. - 9. dan	MS1	0,009
4. - 6. dan	MS2	7. - 9. dan	MS2	<0,001
4. - 6. dan	MS2	1. - 9. dan	MS2	<0,001

Statistički značajni rezultati određeni su post-hoc Tukey HSD testom dvosmjerne analize varijance ($p < 0,05$).
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]



Slika 5.15. Prikaz proteinske ekspresije STAT3 fluorescentnim imunocitokemijskim bojanjem 3T3-L1 stanica nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima. Kontrolna skupina su diferencirane stanice bez tretiranja metforminom i simvastatinom. Plavo obojenje = DAPI, stanične jezgre; Crveno obojenje = Cy5-PE, STAT3 pozitivno bojanje. Zabilježeno kamerom Olympus DP70 montiranom na svjetlosni mikroskop Axioskop 2 MOT pomoću programa DP Controller 1.2.1.108; uvećanje 400x; skala 100 µm.

ND = nediferencirane stanice; D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 µM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 µM]; S3 = simvastatin [2 µM]; MS1 = metformin [200 µM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 µM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 µM]

Tablica 5.30. Jačina signala imunofluorescencije STAT3 u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima, izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica

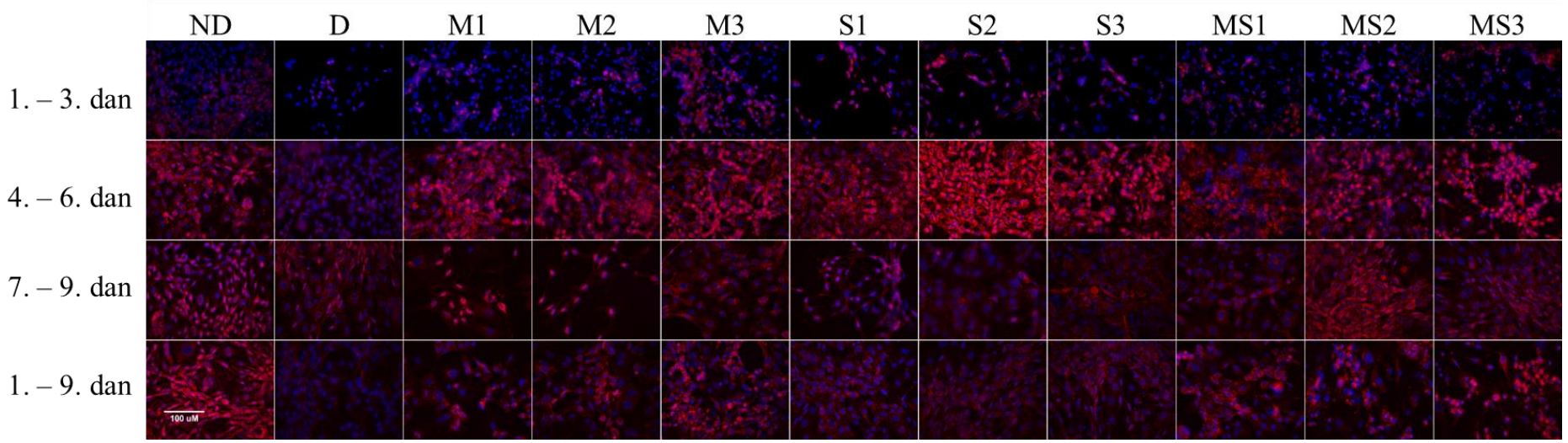
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana										Dvosmjerna ANOVA					
	D – kontrola	M1	M2	M3	S1	S2	S3	MS1	MS2	MS3	F; (stupanj slobode)			p		
	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	VPT	KT	VPT x KT	VPT	KT	VPT x KT
1. - 3. dan	100,00; 20,62	42,63; 15,59	33,08; 11,64	54,35; 15,43	97,16; 20,48	84,09; 23,45	77,74; 21,87	105,75; 14,83	83,21; 10,93	85,07; 13,00	6,415 (3, 74)	6,618 (9, 74)	4,254 (27, 74)	<0,001	<0,001	<0,001
4. - 6. dan	100,00; 19,50	88,01; 6,36	89,03; 12,44	84,34; 5,47	89,97; 15,51	53,04; 7,05	70,58; 9,50	88,33; 5,91	72,50; 6,89	88,09; 6,98						
7. - 9. dan	100,00; 13,53	89,46; 5,76	85,92; 5,38	65,78; 6,34	68,77; 10,51	76,79; 5,38	65,80; 2,72	73,73; 36,23	85,04; 5,75	96,18; 30,23						
1. - 9. dan	100,00; 26,30	138,87; 7,67	95,70; 25,44	76,80; 7,25	112,63; 11,06	78,71; 13,44	66,86; 8,47	88,28; 15,22	77,20; 2,41	86,81; 17,98						

Dvosmjerna analiza varijance; $p < 0,05$. Rezultati predstavljaju aritmetičku sredinu sa standardnom devijacijom, izračunato iz tri ponavljanja.
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]; AS = aritmetička sredina; SD = standardna devijacija; VPT = vremenski period tretiranja; KT = koncentracija tretmana

Tablica 5.31. Statistički značajne razlike u jačini signala imunofluorescencije STAT3 u 3T3-L1 stanicama s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana

Prvi niz varijabli (A)		Drugi niz varijabli (B)		p (A vs B)
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	M1	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	M2	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	S1	0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 9. dan	M1	<0,001
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	S1	<0,001
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	S2	0,028
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	MS2	0,034
1. - 3. dan	M2	4. - 6. dan	M2	0,021
1. - 3. dan	M2	1. - 9. dan	M2	<0,001
1. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	M3	0,004
1. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	S2	0,031
1. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	S3	0,002
1. - 9. dan	M1	1. - 9. dan	MS2	0,005

Statistički značajni rezultati određeni su post-hoc Tukey HSD testom dvosmjerne analize varijance ($p < 0,05$).
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]



Slika 5.16. Prikaz proteinske ekspresije SMAD3 fluorescentnim imunocitokemijskim bojanjem 3T3-L1 stanica nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima. Kontrolna skupina su diferencirane stanice bez tretiranja metforminom i simvastatinom. Plavo obojenje = DAPI, stanične jezgre; Crveno obojenje = Cy5-PE, SMAD3 pozitivno bojanje. Zabilježeno kamerom Olympus DP70 montiranom na svjetlosni mikroskop Axioskop 2 MOT pomoću programa DP Controller 1.2.1.108; uvećanje 400x; skala 100 µm.

ND = nediferencirane stanice; D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 µM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 µM]; S3 = simvastatin [2 µM]; MS1 = metformin [200 µM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 µM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 µM]

Tablica 5.32. Jačina signala imunofluorescencije SMAD3 u 3T3-L1 stanicama nakon tretmana metforminom i simvastatinom u različitim koncentracijama i vremenskim periodima, izraženo kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu diferenciranih stanica

Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana										Dvosmjerna ANOVA					
	D – kontrola	M1	M2	M3	S1	S2	S3	MS1	MS2	MS3	F; (stupanj slobode)			p		
	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	AS; SD	VPT	KT	VPT x KT	VPT	KT	VPT x KT
1. - 3. dan	100,00; 48,00	214,11; 35,52	261,79; 68,09	371,82; 70,19	396,13; 45,73	518,54; 45,73	277,87; 43,29	419,43; 2,27	333,64; 54,71	350,99; 66,33	132,4 (3, 67)	11,04 (9, 67)	5,231 (27, 67)	<0,001	<0,001	<0,001
4. - 6. dan	100,00; 25,10	112,95; 13,68	112,09; 8,34	122,29; 12,19	173,15; 41,26	158,10; 8,80	153,65; 6,33	115,86; 11,46	106,99; 11,62	116,42; 9,86						
7. - 9. dan	100,00; 6,66	234,84; 63,02	176,89; 18,81	154,78; 24,95	95,98; 30,67	74,28; 12,29	124,95; 7,47	116,27; 20,19	144,08; 48,29	104,14; 14,83						
1. - 9. dan	100,00; 15,91	220,42; 3,54	216,07; 28,97	175,93; 20,37	195,02; 68,10	215,39; 24,14	211,54; 41,60	246,97; 53,49	217,56; 37,51	256,25; 46,78						

Dvosmjerna analiza varijance; $p < 0,05$. Rezultati predstavljaju aritmetičku sredinu sa standardnom devijacijom, izračunato iz tri ponavljanja.
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]; AS = aritmetička sredina; SD = standardna devijacija; VPT = vremenski period tretiranja; KT = koncentracija tretman

Tablica 5.33. Statistički značajne razlike u jačini signala imunofluorescencije SMAD3 u 3T3-L1 stanicama s obzirom na vremenski period tretiranja i koncentraciju tretmana

Prvi niz varijabli (A)		Drugi niz varijabli (B)		p (A vs B)
Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	Vremenski period tretiranja	Koncentracija tretmana	
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	M2	0,003
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	S1	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	S3	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	D - kontrola	1. - 3. dan	MS3	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	M3	0,005
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	S1	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	M1	1. - 3. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	S1	0,003
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	S2	0,018
1. - 3. dan	M2	1. - 3. dan	MS1	0,023
1. - 3. dan	M2	4. - 6. dan	M2	0,011
1. - 3. dan	M3	4. - 6. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	M3	7. - 9. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	M3	1. - 9. dan	M3	<0,001
1. - 3. dan	S1	1. - 3. dan	S3	0,018
1. - 3. dan	S1	4. - 6. dan	S1	<0,001
1. - 3. dan	S1	7. - 9. dan	S1	<0,001
1. - 3. dan	S1	1. - 9. dan	S1	<0,001
1. - 3. dan	S2	4. - 6. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	S2	7. - 9. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	S2	1. - 9. dan	S2	<0,001
1. - 3. dan	S3	7. - 9. dan	S3	0,002
1. - 3. dan	MS1	4. - 6. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	MS1	7. - 9. dan	MS1	<0,001
1. - 3. dan	MS1	1. - 9. dan	MS1	0,027
1. - 3. dan	MS2	4. - 6. dan	MS2	<0,001
1. - 3. dan	MS2	7. - 9. dan	MS2	0,001
1. - 3. dan	MS3	4. - 6. dan	MS3	0,003
1. - 3. dan	MS3	7. - 9. dan	MS3	<0,001
7. - 9. dan	D - kontrola	7. - 9. dan	M1	0,044
7. - 9. dan	M1	7. - 9. dan	S2	0,004
7. - 9. dan	S2	1. - 9. dan	S2	0,025
7. - 9. dan	MS3	1. - 9. dan	MS3	0,036
1. - 9. dan	D - kontrola	1. - 9. dan	MS3	0,025

Statistički značajni rezultati određeni su post-hoc Tukey HSD testom dvosmjerne analize varijance ($p < 0,05$).
D = diferencirane stanice; M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]

U tablici 5.34. prikazan je sumiran učinak pojedinih doza metformina i simvastatina te njihovih kombinacija na razine proteina ispitivanih transkripcijskih čimbenika i modulatora adipogeneze.

Tablica 5.34. Učinak metformina i simvastatina na razine proteina ispitivanih transkripcijskih čimbenika i modulatora adipogeneze s obzirom na vremenski period djelovanja, određeno imunocitokemijom u odnosu na kontrolne diferencirane stanice

		M1	M2	M3	S1	S2	S3	MS1	MS2	MS3
1. -3. dan	PPARG	↓	↓	↓			↓	↓↓		
	CEBPA	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
	SREBP1C	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
	STAT3	↓↓	↓↓	↓						
	SMAD3	↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
4. -6. dan	PPARG		↓	↓	↓	↓	↓		↓	
	CEBPA			↓	↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
	SREBP1C	↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
	STAT3					↓				
	SMAD3				↑	↑	↑			
7. -9. dan	PPARG				↓	↓				
	CEBPA		↓		↓	↓	↓			↓
	SREBP1C					↓	↓			
	STAT3			↓	↓		↓			
	SMAD3	↑↑	↑	↑					↑	
1. -9. dan	PPARG									
	CEBPA						↓	↓	↓	↓
	SREBP1C						↓			
	STAT3						↓			
	SMAD3	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑↑

M1 = metformin [200 μM]; M2 = metformin [2 mM]; M3 = metformin [4 mM]; S1 = simvastatin [100 nM]; S2 = simvastatin [1 μM]; S3 = simvastatin [2 μM]; MS1 = metformin [200 μM] i simvastatin [100 nM]; MS2 = metformin [2 mM] i simvastatin [1 μM]; MS3 = metformin [4 mM] i simvastatin [2 μM]; ↑↑ = statistički značajno povećanje; ↓↓ = statistički značajno smanjenje; ↑ = primjetno povećanje, ali bez statističke značajnosti; ↓ = primjetno smanjenje, ali bez statističke značajnosti

6. Rasprava

Masno tkivo ima važnu ulogu u nastanku pretilosti i metaboličkih komplikacija uslijed promjena funkcije adipocita. S obzirom na to da su diferencijacija adipocita i akumulacija lipida usko povezane s razvojem pretilosti, njihova je modulacija jedan od mogućih pristupa liječenju pretilosti. U ovom istraživanju ispitivan je učinak metformina i simvastatina, kao najčešće propisivane skupine lijekova za liječenje metaboličkih poremećaja povezanih s pretilošću, na transkripcijske čimbenike i modulatore procesa adipogeneze. U kliničkoj praksi pokazano je da imaju povoljan učinak na redukciju masnog tkiva i razine triglicerida u krvi, no točan mehanizam njihovog djelovanja na proces adipogeneze još nije do kraja istražen. Uzimajući u obzir prijašnje studije, kao i rezultate kliničkih studija metformina i simvastatina, u ovom se istraživanju ispitao učinak na unutarstanično nakupljanje lipida i razine mRNA i proteina PPAR-γ, C/EBP-α, SREBP-1c, STAT3 i SMAD3. Također, kako se proces adipogeneze odvija u nekoliko koraka, od rane do kasne faze adipogeneze koje su kontrolirane različitim transkripcijskim čimbenicima, ispitano je djelovanje lijekova u različitim vremenskim periodima. Ovim se istraživanjem pokazalo da oba lijeka imaju značajan učinak na sve ispitivane čimbenike adipogeneze s posljedičnom redukcijom nakupljanja masnih kapljica.

6.1. Utjecaj metformina i simvastatina na stanično preživljenje

Prethodno utvrđivanju učinaka metformina i simvastatina na diferencijaciju adipocita, potrebno je provjeriti njihov utjecaj na preživljenje, odnosno metaboličku aktivnost stanica. U ovom istraživanju primjenom metformina i simvastatina došlo je do prolaznog smanjenja vijabilnosti stanica, s oporavkom do devetog dana diferencijacije. S obzirom da u prethodnim studijama metformin i simvastatin nisu djelovali citotoksično na 3T3-L1 stanice u puno većim dozama (atorvastatin do 30 μM i metformin do 100 mM) (132), te da u ovom istraživanju također nije pokazana citotoksičnost, odnosno promjena metaboličke aktivnosti, možemo zaključiti da su doze do 4 mM metformina i 2 μM simvastatina sigurne za korištenje na stanicama.

Mitohondriji utječu na razne stanične procese, uključujući homeostazu energije, apoptozu, autofagiju i upalne procese, reguliranjem svog broja i morfologije ili remodeliranjem svoje organizacije i distribucije (133). U masnom tkivu neophodni su za procese adipogeneze, metabolizma lipida i termogeneze (134). Osim toga, imaju važnu ulogu u kontroli inzulinske

osjetljivosti i metabolizma glukoze, te u komunikaciji između mišića i masnog tkiva (135). Diferencijacija adipocita karakterizirana je indukcijom mitohondrijskog metabolizma i stimulacijom mitohondrijske biogeneze (136). Unutar 4 dana od indukcije adipogeneze raste ekspresija mitohondrijskih proteina i broja mitohondrija, praćena promjenama u kompoziciji mitohondrija, uključujući promjene piruvat karboksilaze i akonitaze koje su uključene u metabolizam masnih kiselina (137). Povećana potrošnja kisika diferenciranih adipocita u odnosu na preadipocite jasan je dokaz aktivnosti mitohondrija tijekom diferencijacije adipocita (138). Indukcija mitohondrija važna je za produkciju ATP-a potrebnog za povećanje metaboličke aktivnosti tijekom procesa adipogeneze. Disfunkcija mitohondrija nepovoljno utječe na proces adipogeneze, što je potvrđeno inhibicijom adipogeneze pomoću inhibitora mitohondrijskih transportnih sustava dikarboksilata i trikarboksilata (139).

Uzimajući u obzir važnu ulogu mitohondrija u masnom tkivu, potrebno je naglasiti kako i metformin i simvastatin imaju određeni učinak na funkciju mitohondrija. Metformin stimulira aerobnu i anaerobnu respiraciju, β-oksidaciju masnih kiselina u mitohondrijima i peroksisomima, te povećava masu mitohondrija (140). Kako je već opisano, djelomično objašnjenje mehanizma djelovanja metformina je u njegovoj sposobnosti vezanja na kompleks I mitohondrijskog respiratornog lanca (141). Inhibicija kompleksa I smanjuje energetsku opskrbu što dovodi do povećanja AMP / ATP omjera i posljedične aktivacije AMPK (142). Metformin u milimolarnim koncentracijama direktno inhibira kompleks I u izoliranim mitohondrijima, dok kliničke, mikromolarne doze ostvaruju inhibiciju ovisno o dozi i vremenu (143). Moguće objašnjenje za takav mehanizam djelovanja leži u pozitivnom naboju metformina koji je zaslužan za njegovo sporo nakupljanje unutar matriksa mitohondrija, potaknuto transmembranskim elektrokemijskim potencijalom (144). Kompleks I mitohondrijskog respiratornog lanca je NADH : ubikvinon oksidoreduktaza koja združuje protok elektrona iz NADH prema ubikvinonu s protokom protona iz mitohondrijskog matriksa prema unutarnjoj membrani mitohondrija (145). Postoji u dva oblika, aktivnom i deaktiviranom D-obliku koji se može aktivirati oksidacijom NADH i redukcijom ubikvinona (146). Budući da metformin inhibira oksidaciju NADH, moguće mjesto vezanja metformina su filogenetski očuvane podjedinice kompleksa, koje ujedno predstavljaju amfipatske regije enzima jer u blizini imaju i hidrofilne i hidrofobne aminokiseline (144). Metformin na tom mjestu djeluje kao reverzibilni nekompetitivni inhibitor ograničavajućeg koraka povezanog s redukcijom ubikvinona, ali se ne veže kompetitivno na ubikvinonsko mjesto kompleksa I (144). AMPK djeluje kao glavni regulator metabolizma, i za njenu aktivaciju potrebno je povećanje unutarstaničnog omjera AMP : ATP, kao i fosforilacija treonina na mjestu 172 aktivacijske

petlje α-podjedinice (147). Osim toga, važne su i domene γ-podjedinice na koje se vežu adenin nukleotidi. U normalnim okolnostima na te domene vezan je ATP, međutim kada se omjer AMP / ATP poveća, dolazi do vezanja AMP-a i alosteričke promjene koja doprinosi aktivaciji AMPK (148). Nakon aktivacije, AMPK fosforilira svoje nizvodne mete, od kojih je najvažnija ACC (149). AMPK fosforilira serin na mjestu 79, prevenirajući pretvorbu acetil-CoA u malonil-CoA, što pogoduje ulasku dugolančanih masnih kiselina u mitohondrij (149). Ostale mete AMPK su HMGCR, što dovodi do inhibicije sinteze kolesterola, te PPAR-1α, što stimulira mitohondrijsku biogenezu (150).

Statini mogu interferirati s mitohondrijskom aktivnošću direktno, oštećenjem kompleksa respiracijskog lanca, i indirektno, deplecijom metabolita koji sudjeluju u putu mevalonata (151). Sve je više dokaza da su simptomi povezani s upotrebom statina većinom uzrokovani oštećenjem mitohondrijske funkcije, a ne njihovim učinkom na smanjenje kolesterola (152). Koenzim Q10 osnovna je sastavnica respiracijskog lanca, a inhibitorni učinak statina na put mevalonata može smanjiti razine koenzima Q10 za 15 – 64 %, time uzrokujući disfunkciju mitohondrija koje se očituje u poremećaju mitohondrijskog membranskog potencijala, inhibiciji kompleksa respiracijskog lanca, smanjenju broja kopija mitohondrijske DNA, ometanju oksidativne fosforilacije, bubrenju mitohondrija i otpuštanju citokroma c (153). Međutim, smanjenje plazmatske razine koenzima Q10 dijelom je uzrokovano i redukcijom cirkulirajućih lipoproteina, s obzirom na činjenicu da se oko 74 % koenzima Q10 prenosi apolipoproteinima (154). Toksičnost izazvana statinima može biti izazvana reduciranom fosforilacijom PKB i posljedičnim oštećenjem njenog puta, koji ima važnu ulogu u ispravnom funkcioniranju mitohondrija (155). Oštećenje vjerojatno izaziva smanjena transkripcija i translacija PGC-1α i PGC-1β, koji djeluju kao aktivatori PKB puta i smatraju se glavnim induktorima mitohondrijske biogeneze (156).

6.2. Utjecaj metformina i simvastatina na unutarstanično nakupljanje lipida

3T3-L1 stanična linija široko je rasprostranjeni model za proučavanje adipogeneze i ekspresije ključnih adipocitnih gena. Stimulacijom adipogeneze 3T3-L1 stanična linija poprima karakteristike bijelih adipocita i pokazuje fenotipske oznake zrele masne stanice (29). Nastanak masnih stanica iz preadipocita uključuje morfološke promjene, porast broja i veličine stanica, ekspresiju lipogenih enzima i akumulaciju lipidnih kapljica (157). Rani odgovor na medij za diferencijaciju je povećanje ekspresije gena koji upravljaju procesom adipogeneze, što

posljedično povećava unos glukoze i sintezu triglicerida te stanice počinju nakupljati lipidne kapljice (29). Nakupljanje lipidnih kapljica potvrđuje se Oil Red-O bojanjem za vizualizaciju triglicerida i lipida u zrelim adipocitima (157). Lipidne kapljice jasno se vide osmog do dvanaestog dana diferencijacije, a akumulacija lipida raste s vremenom do dvanaestog dana (158). U prva četiri dana u stanicama je vidljivo početno nakupljanje malih lipidnih kapljica, a već nakon 7 dana 90% preadipocita sadrži veliki broj lipidnih kapljica smještenih oko jezgre adipocita (122, 137). U ovom istraživanju također je vidljiv postupan rast u broju i veličini lipidnih kapljica Oil Red O bojanjem u kontrolnoj skupini diferenciranih stanica do devetog dana diferencijacije, što je pokazatelj uspješnog protokola diferencijacije i uspostave *in vitro* modela pretilosti za potrebe daljnjeg ispitivanja utjecaja lijekova na proces adipogeneze. Iako postoje male prilagodbe protokola diferencijacije između pojedinih istraživanja na staničnoj kulturi 3T3-L1 stanica, svima je zajednička upotreba medija za indukciju adipogeneze koji sadrži IBMX, deksametazon i inzulin na početku diferencijacije, uz promjenu u inzulinski medij nakon 48 – 72 sata. Protokol diferencijacije je također različitog trajanja u različitim istraživanjima, ali nalazi se u vremenskom okviru od 7 – 15 dana. Bez obzira na prilagodbe protokola unutar pojedinog istraživačkog procesa, u svakom je vidljivo očito nakupljanje lipidnih kapljica ili povećana razina unutarstaničnih triglicerida (161–164).

U ovom istraživanju je unutarstanično nakupljanje lipidnih kapljica smanjeno djelovanjem metformina i simvastatina, ali uz njihovu konstantnu primjenu tijekom cijelog procesa diferencijacije. Njihova primjena samo u određenim vremenskim periodima nije pokazala učinak na redukciju nakupljanja lipida. Takvi su rezultati u skladu s ishodima sličnih istraživanja. U jednom je istraživanju simvastatin u koncentraciji od 1 μM pokazao značajnu inhibiciju akumulacije lipida u 3T3-L1 staničnoj kulturi djelovanjem od četvrtog do dvanaestog dana diferencijacije (159). Učinak na akumulaciju lipida ispitan je i s drugim vrstama statina. Tako je u jednoj studiji atorvastatin u koncentraciji od 10 ng/ml pokazao slabi učinak na diferencijaciju adipocita kroz period prvog do trećeg dana, primjetnu inhibiciju od oko 70% kroz period trećeg do petog dana, i umjerenu supresiju diferencijacije kroz period petog do sedmog dana. Simvastatin je takav učinak imao tek u koncentraciji od 1000 ng/ml (165). Stanice tretirane metforminom u studiji koju su proveli Chen i sur. pokazale su manje nakupljane lipida i smanjenu ekspresiju proteina kasne faze adipogeneze, adiponektina i perilipina (117). Alexandre i suradnici u svojoj su studiji pokazali da metformin u koncentraciji 4 mM u staničnoj kulturi 3T3-L1 preadipocita uzrokuje fosforilaciju AMPK i značajno smanjenje nakupljanja lipidnih kapljica u tretiranim stanicama u odnosu na kontrolu, dok 2 mM stimulira adipogenezu i nakupljanje lipida (166). U jednoj studiji rađenoj na 3T3-L1 preadipocitima,

metformin u nanomolarnim i mikromolarnim koncentracijama nije pokazao utjecaj na njihovu diferencijaciju, dok je u koncentracijama iznad 1mM pokazao bifazično djelovanje. Vizualizacija Oil Red O bojanjem pokazala je povećan intenzitet kod stanica tretiranih s 1,25 – 2,5 mM metformina, ali koncentracije 5 – 10 mM su reducirale intenzitet obojenja u usporedbi s kontrolnim diferenciranim stanicama (128).

Kako je već spomenuto, stanice pohranjuju lipide pretvarajući slobodne masne kiseline u trigliceride i estera kolesterola, koji se akumuliraju u lipidnim kapljicama. Lipidne kapljice imaju jedinstvenu strukturu s hidrofobnom jezgrom neutralnih lipida okruženu monoslojem fosfolipidne membrane (167). Formacija lipidnih kapljica odvija se unutar fosfolipidnog dvosloja endoplazmatskog retikuluma u nekoliko koraka koji uključuju sintezu neutralnih lipida, njihovu progresivnu akumulaciju u endoplazmatskom retikulumu i krajnjoj formaciji u citoplazmi (168). Sve veći volumen nakupljenih lipida između dvosloja endoplazmatskog retikuluma premašuje njihovu topivost, te se lipidne kapljice odvoje, odnosno „skliznu“ iz fosfolipidnog dvosloja (169). Kada su jednom formirane, lipidne kapljice rastu zbog prevelike unutarstanične količine masnih kiselina, te dosežu maksimalnu veličinu koja se razlikuje između različitih vrsta stanica, pa čak i unutar iste vrste stanica, ovisno o patofiziološkim uvjetima (170). Mogući mehanizmi rasta lipidnih kapljica uključuju fuziju visoko mobilnih lipidnih kapljica manjeg volumena, ili direktan prijenos neutralnih lipida i površinskih enzima povezanih s lipidnim metabolizmom s endoplazmatskog retikuluma na obližnje lipidne kapljice (171).

S obzirom na sastav lipidnih kapljica kojeg pretežito čine neutralni lipidi, inhibicija mevalonatskog puta, jedan od glavnih učinaka statina, smanjuje unutarstanično nakupljanje lipidnih kapljica (172). Mevalonatski put kojim nastaje kolesterol, važan je za strukturu stanične membrane, žučnih kiselina, i steroidnih hormona (173). Osim toga, mevalonatski put proces je kojim nastaju izoprenoidi, GGPP i FPP, važni za proteinsku prenilaciju. Prenilacija uključuje post-translacijske procese koji modificiraju proteine uključene u glikozilaciju, unutarstaničnu signalizaciju, ekspresiju gena i stanični rast (174). Važan enzim mevalonatskog puta je HMGCR koja katalizira pretvorbu HMG-CoA u mevalonat. Samim time, disfunkcija HMGCR, ili njena inhibicija statinima, uzrokuje disfunkciju adipocita i inhibiciju nakupljanja unutarstaničnih lipidnih kapljica (175).

Aktivacija AMPK putem antidijabetičkih lijekova inhibira sintezu masnih kiselina i kolesterola u jetri, stimulira oksidaciju masnih kiselina u jetri i mišićima, te stimulira mitohondrijsku biosintezu u mišićima. Na taj način može smanjiti štetnost povećane lipidne biosinteze i mitohondrijske disfunkcije (92). U masnom tkivu aktivacija AMPK fosforilira i

inhibira ACC, reducirajući sintezu masnih kiselina u adipocitima (176). Nadalje, AMPK fosforilira HSL čime prevenira njenu aktivaciju lipolitičkim stimulansima (177). Produljena aktivacija AMPK inhibira diferencijaciju preadipocita u zrele masne stanice s povezanom redukcijom produkcije nekoliko proteina povezanih uz lipidni metabolizam, kao što su ACC, FAS i PPAR- γ (90). Povećana aktivnost AMPK kod pacijenata na metforminu inhibira diferencijaciju fibroblasta u adipocite i povezana je s povećanom fosforilacijom ACC, što inhibira sintezu malonil-CoA, smanjujući sintezu masnih kiselina (178). Budući da je aktivacija AMPK u adipocitima povezana sa smanjenom lipolizom i diferencijacijom preadipocita u zrele masne stanice, te smanjenim transportom glukoze u adipocite, takav učinak može skrenuti pohranu energije u obliku lipida prema pojačanom unosu glukoze u mišiće (179). Kako stimulacija AMPK u vaskularnim stanicama i makrofagima ima protuupalni učinak, njena aktivacija u masnim stanicama, ali i u drugim frakcijama masnog tkiva, kao što su stromalne i vaskularne stanice, moguće su objašnjenje pozitivnih metaboličkih učinaka metformina kod bolesnika sa DMT2 (180). Dodatno, metformin u bijelom masnom tkivu stimulira kataboličke puteve aktivacijom AMPK, reducirajući skladišta triglicerida što je vidljivo u stvaranju malih adipocita (181). Taj učinak postiže preko povećane lipolize i β-oksidacije, što bi impliciralo da nema otpuštanja masnih kiselina jer prolaze oksidaciju unutar samih adipocita (142).

6.3. Utjecaj metformina i simvastatina na transkripcijsku kontrolu procesa adipogeneze

Diferencijacija adipocita uključuje koordiniranu regulaciju ekspresije gena kompleksne transkripcijske kaskade u kojoj središnju ulogu ima indukcija C/EBP-α i PPAR-γ s aktivacijom transkripcije gena zaslužnih za oblikovanje i održavanje adipocitnog fenotipa (1). Supresija kaskade transkripcijskih čimbenika ključna je u kontroli adipogeneze, stoga je cilj mnogih studija reduciranje pretilosti putem smanjenja diferencijacije preadipocita, inhibiranja adipogeneze i povećanja lipolize (157). Analiza ekspresije mRNA i proteina PPAR-γ tijekom procesa adipogeneze pokazala je da genska ekspresija PPAR-γ počinje rasti dva dana nakon indukcije adipogeneze, a maksimum doseže nakon 8 dana. Razine proteina prate razinu ekspresije gena, s maksimumom desetog dana od indukcije adipogeneze (182). Takvi rezultati govore u prilog povećanju ekspresije PPAR-γ istovremeno s napredovanjem adipogeneze i akumulacijom lipida. Slično tome, genska ekspresija C/EBP-α povećana je od drugog do desetog dana adipogeneze, s povećanjem razine proteina šestog do devetog dana (183). Ekspresija SREBP-1c tijekom adipogeneze doseže maksimalne razine drugog dana od

indukcije adipogeneze, te je u brzom padu od četvrtog do desetog dana (184). Niske razine SREBP-1c prisutne su u 3T3-L1 staničnoj liniji u konfluentnoj fazi, a počinju rasti prvi dan diferencijacije, prethodno ekspresiji mRNA PPAR-γ i LPL (77). Akumulacija lipida u adipocitima petog i desetog dana adipogeneze podudara se s ekspresijom mRNA C/EBP-α i PPAR-γ (185). Razine STAT3, STAT5A i STAT5B su značajno povišene tijekom procesa diferencijacije 3T3-L1 stanica. Ekspresija STAT3 tijekom adipogeneze *in vitro* najuočljivija je tijekom MCE (186). SMAD3 eksprimiran je u nediferenciranim stanicama, a njegova bazalna signalna aktivnost je niska i minimalno inducirana tijekom adipogeneze (106). U ovom istraživanju prikazom fluorescentne imunocitokemije vidljivo je povećanje ekspresije pozitivnih regulatora adipogeneze PPAR-γ, C/EBP-α, SREBP-1c i STAT3 te smanjena ekspresija negativnog regulatora adipogeneze SMAD3 u diferenciranim stanicama u usporedbi s nediferenciranim stanicama.

Prikazom učinka metformina i simvastatina na mRNA razine ispitivanih transkripcijskih čimbenika i modulatora adipogeneze vidljivo je kako lijekovi ostvaruju najveći učinak u inhibiciji pozitivnih regulatora adipogeneze kada se primjenjuju kontinuirano tijekom cijelog procesa diferencijacije, a u najvećem broju slučajeva najučinkovitija je kombinacija oba lijeka u najvećoj koncentraciji. Kako je već spomenuto, razine ispitivanih transkripcijskih čimbenika rastu i ostaju povišene tijekom nekoliko dana, stoga je moguće da djelovanje lijekova u trajanju od samo 72 sata nije dovoljno za njihovu trajnu inhibiciju. mRNA razine SMAD3 kao negativnog regulatora adipogeneze pokazuju značajno povišenje samo na terapiju simvastatinom u koncentraciji 100 nm. Regulacija TGF-β/SMAD3 signalnog puta još nije dovoljno istražena, a učinak metformina i simvastatina na taj signalni put također je nedovoljno istražen. Poznato je da inhibitori adipogeneze povećavaju ekspresiju SMAD, međutim oni ostvaruju svoje učinke putem različitih mehanizama, a mehanizam inhibicije adipogeneze također se može razlikovati ovisno o primijenjenoj dozi istog lijeka. Rezultati ovog istraživanja sugeriraju da simvastatin u koncentraciji od 100 nm ostvaruje svoj učinak preko TGF-β/SMAD3 signalnog puta, no potrebne su dodatne studije kako bi se učinak simvastatina mogao usporediti s već opisanim mehanizmima poznatih TGF-β liganada.

Prikazom učinka metformina i simvastatina na razine proteina ispitivanih transkripcijskih čimbenika i modulatora adipogeneze vidljivo je kako lijekovi ostvaruju puno veći inhibitorni učinak na proteinskoj nego li na genskoj razini. Inhibicija se najviše očituje u skupini stanica tretiranih od 7. do 9. dana diferencijacije, te u onim stanicama koje su konstantno tretirane tijekom cijelog procesa diferencijacije. Razlozi ovakvih razlika u učinku na mRNA i proteinske razine mogu se dijelom objasniti dinamikom ekspresije ispitivanih

transkripcijskih čimbenika, gdje se mRNA razine povisuju ranije tijekom procesa adipogeneze, a proteinske razine počinju rasti kasnije, rezultirajući većim razlikama u supresiji proteinske ekspresije. Osim toga, razine mRNA nisu uvijek točni prediktori proteinske ekspresije jer regulatorni mehanizmi mogu svoje djelovanje ostvariti na jednom od brojnih koraka između transkripcije RNA i translacije u proteine, uz dodatne posttranslacijske modifikacije proteina.

Iako rezultati imunocitokemije sveukupno pokazuju sličan učinak lijekova na razine proteina kao što je prikazano i Western blot metodom, postoje razlike u postizanju statistički značajnih rezultata. Te razlike mogu proizlaziti i iz samih preduvjeta na kojima se zasnivaju ove metode. Pripremom uzoraka za Western blot proteini se denaturiraju, što nosi dvojaku prednost u odnosu na imunocitokemiju jer takvi proteini ne stupaju u interakcije s ostalim molekulama, a ciljni epitopi su dostupniji za vezanje protutijela. U imunocitokemiji proteini ostaju u svojoj nativnoj konformaciji uslijed čega ciljni epitopi mogu ostati sakriveni unutar trodimenzionalne strukture proteina. Nadalje, proteini u svojoj nativnoj formi stupaju u interakcije s drugim molekulama koje se mogu vezati na ciljno mjesto epitopa. Kako je već spomenuto, ciljni proteini ovog istraživanja uglavnom se aktiviraju dimerizacijom ili vezivanjem na regulatorne elemente, što može biti jedan od uzroka nedostupnosti epitopa.

Inhibicija adipogeneze smanjenjem ekspresije transkripcijskih čimbenika i posljedičnom redukcijom nakupljanja lipida *in vitro* predmet je brojnih istraživanja u novije vrijeme. Utjecaj na razine glavnih transkripcijskih čimbenika adipogeneze ispitivan je korištenjem brojnih lijekova i biljnih preparata koji su u kliničkoj praksi ili *in vivo* studijama pokazali antidijabetička i antiadipozna svojstva te pozitivan učinak na lipidni profil. U staničnoj kulturi 3T3-L1 stanica ispitivan je lanzoprazol koji je u kliničkim studijama pokazao učinak na poboljšanje glikemijske kontrole i razine cirkulirajućeg inzulina. Djelovanjem lanzoprazola na preadipocite značajno je smanjenja količina lipidnih kapljica i razina mRNA i proteina PPAR-γ, C/EBP-α i adiponektina (187). Ekstrakt ananasa je ispitivan zbog svojih antiadipoznih svojstava, te je u 3T3-L1 staničnoj kulturi ostvario značajno smanjenje nakupljanja lipidnih kapljica i razina PPAR-γ i C/EBP-α (26). Ekstrakt maslačka pokazao je protuupalna i antioksidativna svojstva koja bi mogla imati terapijski učinak na hiperglikemiju i hiperlipidemiju, a u kulturi 3T3-L1 stanica značajno je smanjio nakupljanje lipidnih kapljica i ekspresiju brojnih gena koji sudjeluju u adipogenoj diferencijaciji (188). Cvijet klitorije je u *in vivo* studijama pokazao antihiperglikemijska i antihiperlipidemijska svojstva, a na 3T3-L1 staničnoj kulturi značajno je smanjio nakupljanje lipidnih kapljica i triglicerida te povećao lipolizu. Osim toga, značajno je smanjio i razine proteina PPAR-γ, C/EBP-α i FAS (189). Ekstrakt mandžurskog prugastog javora pokazuje antioksidativno, protuupalno i antilipogeno

svojstvo, a u svrhu razumijevanja njegovog antiadipoznog svojstva ispitao se njegov učinak na diferencijaciju 3T3-L1 stanica. U *in vitro* studiji ostvario je značajno smanjenje nakupljanja lipidnih kapljica i triglicerida, te redukciju mRNA razina PPAR-γ, C/EBP-α i C/EBP-β (161). Za određene sastojke kave studije su pokazale njihovo antioksidativno, protuupalno i antibakterijsko svojstvo, te utjecaj na poboljšanje inzulinske osjetljivosti i redukciju pretilosti. Zbog toga se ispitao učinak bobica kave na adipogenezu 3T3-L1 stanica s rezultatima inhibitornog učinka na akumulaciju lipida (190). Aktivna komponenta ginsenozid iz biljke ginseng zbog svojih je protuupalnih i antidijabetičkih svojstava ispitivana na 3T3-L1 staničnoj kulturi, gdje je došlo do značajne inhibicije nakupljanja lipidnih kapljica i količine triglicerida, kao i redukcije C/EBP-β (191). Ekstrakti biljke akalifa bogati su flavonoidima i uspješno reguliraju razine lipida u krvi te imaju utjecaj na smanjenje tjelesne težine. U staničnoj kulturi 3T3-L1 preadipocita pokazali su učinak smanjenja broja i veličine lipidnih kapljica, kao i negativnu regulaciju PPAR-γ, C/EBP-α i aP2 (164). Kvercetin je flavonoid s potencijalnim blagotvornim učinkom na kardiovaskularno zdravlje, koji je u *in vivo* studijama pokazao inhibiciju unosa glukoze u adipocite i stimulaciju lipolize, a *in vitro* je značajno smanjio akumulaciju lipida i ekspresiju PPAR-γ1 (192). Iz navedenih studija može se zaključiti da inhibitori adipogeneze smanjuju nakupljanje lipida i ekspresiju mRNA i proteina PPAR-γ, C/EBP-α, SREBP-1C i STAT3 u adipocitima. S druge strane, inhibitori adipogeneze povećavaju razinu i aktivaciju SMAD2/3 trostruko u odnosu na nediferencirane stanice (106).

Rezultati ovog istraživanja o utjecaju metformina i simvastatina na ekspresiju mRNA i proteina transkripcijskih čimbenika i modulatora adipogeneze u skladu su s prethodno provedenim istraživanjima, iako je potrebno naglasiti da postoji manjak istraživanja učinka kombinacije metformina sa statinima, kao i istraživanja s proučavanim utjecajem lijekova u ovisnosti o različitim vremenskim periodima djelovanja.

Poznato je da metformin djeluje preko AMPK (193) i da sintetički aktivator AMPK, 5-aminoimidazol-4-karboksamid-1-β-d-ribofuranozid (engl. *5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-d-ribofuranoside,* AICAR), inhibira adipogenezu u 3T3-L1 staničnoj kulturi (90). Metformin interferira s oksidativnom fosforilacijom u mitohondrijima (194) i stimulira osteogenu diferencijaciju (195) preko AMPK, za koju se zna da promovira osteogenu i suprimira adipogenu diferencijaciju (196), iako je točan mehanizam tog djelovanja nepoznat. U animalnoj staničnoj kulturi hepatocita, metformin u koncentraciji nižoj od 50 μmol/L aktivira AMPK, a koncentracije iznad 5 mmol/L su potrebne za inhibiciju kompleksa I respiratornog lanca neovisno o AMPK, povećavajući AMP/ATP omjer i direktno inhibirajući glukoneogenezu (197). U humanim staničnim linijama, inhibicija kompleksa I respiratornog

lanca postiže se pri koncentracijama metformina od 0,45 do 1,2 mmol/L (58 – 155 mg/L) (198). Inhibicija adipogeneze dodatkom metformina potvrđena je u nekoliko studija (128,132,166). Chen i suradnici ispitali su djelovanje metformina u različitim koncentracijama petog i devetog dana od indukcije adipogeneze. U nanomolarnim i mikromolarnim koncentracijama metformin nije pokazao utjecaj na diferencijaciju 3T3-L1 stanica, dok je u koncentracijama iznad 1mM pokazao bifazično djelovanje – koncentracije metformina od 1,25 do 2,5 mM su inducirale, a koncentracije od 5 do 10 mM su inhibirale proadipogene gene (KLF5, PPAR-γ, C/EBP-α, SREBP-1C). Daljnjim istraživanjem pokazano je da indukcija adipogeneze nije posredovana AMPK signalizacijom, dok je inhibicija adipogeneze ovisna o aktivaciji AMPK (128). Gao i suradnici prvi su pokazali kako metformin može inhibirati adipocitnu i promovirati osteoblastnu diferencijaciju. Kvantifikacija adipogenih markera *real-time* PCR-om pokazala je niže razine mRNA i proteina PPAR-γ, C/EBP-α, i aP2 kod stanica tretiranih metforminom (100μM), pri čemu je smanjenje aP2, markera kasne faze adipogeneze, bilo najizraženije (198). U drugoj studiji pokazano je da metformin smanjuje aktivnost ACC i inhibira ekspresiju gena lipogenog enzima FAS i lipogenog transkripcijskog čimbenika SREBP-1 (193). Kim i suradnici pokazali su da 5 mM metformina u 3T3-L1 staničnoj kulturi značajno smanjuje ekspresiju C/EBP-α, aP2, leptina i GLUT4 (199). Dvije studije ispitivale su učinak 5 mM metformina, a jedna učinak 4 mM metformina s rezultatom značajne inhibicije diferencijacije i akumulacije lipida u 3T3-L1 i humanim adipocitima (142,199,200). Tebbe i suradnici u svojoj su studiji pokazali inhibitorni učinak metformina na adipogenezu u koncentracijama 1 – 5 mM, ovisno o dozi, inhibirajući ekspresiju C/EBP-α, C/EBP-β i PPAR-γ i aktivirajući fosforilaciju AMPK u 3T3-L1 adipocitima (201). Alexandre i suradnici u svojoj su studiji ispitivali učinak 2, 4, 8 i 16 mM metformina na adipogenezu u 3T3-L1 stanicama, gdje 2 mM nije pokazalo inhibitorni nego blago stimulirajući efekt na adipogenezu, dok su više koncentracije djelovale inhibitorno (166).

Statini inhibiraju adipogenezu smanjenjem ekspresije ključnih gena PPAR-γ, C/EBP-α i SREBP-1C, te markera adipogeneze, leptina, aP2 i adiponektina (202), što znači da imaju suprimirajući učinak na adipogenezu kroz cijeli životni vijek stanice. Atorvastatin je u staničnoj kulturi 3T3-L1 stanica izazvao smanjenje ekspresije mRNA i proteina PPAR-γ i C/EBP-α, i taj je učinak bio poboljšan u kombinaciji s metforminom. Isti učinak se pokazao i na mRNA razinu aP2, ciljnog gena PPAR-γ i C/EBP-α (132). Atorvastatin je također pokazao inhibitorni učinak na fosforilaciju i aktivaciju STAT3, što je bilo pospješeno u kombinaciji s metforminom, iako sam metformin nije pokazao takav učinak. Inhibicija STAT3 atorvastatinom i metforminom povećala je aktivnost AMPK i smanjila razine PPAR-γ, C/EBP-α i aP2 (132). Tretman atorvastatinom smanjio je i razine PPAR-γ i C/EBP-α, analizirano petog dana diferencijacije

(165). Osim direktnog utjecaja na transkripcijsku regulaciju adipogeneze, statini mogu moduliranjem početnih koraka sinteze kolesterola smanjiti koncentracije važnih izoprenoidnih intermedijera geranilgeranil pirofosfata (engl. *geranylgeranyl pyrophosphate*, GGPP) i farnezil pirofosfata (engl. *farnesyl pyrophosphate*, FPP) (203). Smanjenje unutarstanične razine GGPP-a inhibira prenilaciju i aktivaciju ključnih signalnih proteina, među kojima je i PI3K, što rezultira povećanjem unutarstanične razine cAMP, aktivacijom PKA i supresijom transkripcije leptinskog gena (159). U staničnoj kulturi humanih preadipocita, simvastatin i atorvastatin smanjuju razine mRNA i izlučivanje leptina (204). Simvastatin također smanjuje ekspresiju mRNA *Cebpa* i aP2 inhibicijom proteinske prenilacije i redukcijom geraniliranih proteina u 3T3-L1 stanicama. Dakle, redukcija ekspresije mRNA leptina dijelom je uzrokovana supresijom C/EBP-α (159). Dodatno, različite vrste statina različito djeluju na razine adiponektina koji je uključen u oksidativni stres i produkciju ROS, te posljedično imaju različit učinak na inzulinsku osjetljivost. Simvastatin i rosuvastatin smanjuju razine adiponektina i inzulinsku osjetljivost, dok ih pravastatin povećava (205,206). Nadalje, i*n vitro* studije pokazale su da liofilni statini, lovastatin i atorvastatin, mogu dovesti do strukturalnih promjena i oštećene ekspresije GLUT4, inhibirajući njihovu translokaciju i smanjujući unos glukoze u 3T3-L1 adipocite (207), dok hidrofilni statin pravastatin nije imao taj učinak (208). U isto vrijeme statini stimuliraju diferencijaciju osteoblasta, njihovu proliferaciju, sazrijevanje, i sintezu nove kosti (209).

6.3.1. Uloga i regulacija PPAR-γ i C/EBP-α tijekom adipogeneze

Prijašnje studije pokazale su da je rana indukcija C/EBP-β i C/EBP-δ odgovorna za inicijaciju ekspresije PPAR-γ, te da je ekspresija C/EBP-α ovisna o aktivnosti PPAR-γ (210). Aktivacija PPAR-γ odgovarajućim ligandima događa se u ranoj fazi adipogeneze te uključuje signalizaciju ovisnu o C/EBP-β i cAMP (210). Indukcija adipogeneze bez aktivacije cAMP signalnog puta aktivirat će ekspresiju PPAR-γ1, ali cijeli adipogeni program neće biti uspješno završen. Isto tako, postojanje dominantno negativne izoforme C/EBP-β blokirat će adipogenezu (211). Zbog toga se može zaključiti da C/EBP-β aktivira adipogeni program koji vodi sintezi molekula koje služe kao aktivatori PPAR-γ, te je važno identificirati signalne puteve koji kontroliraju C/EBP-β. Na primjer, stimulacija konfluentnih 3T3-L1 stanica inducira brzi prolazni odgovor MEK/ERK puta koji koincidira s indukcijom ekspresije C/EBP-β (75). C/EBP-β je aktivirana fosforilacijom represorskih regija koje sadrže nekoliko serina i treonina,

od kojih je najzanimljiviji treonin na mjestu 188 specifičan za vezanje ERK i GSK-3β, jer stimulacijom 3T3-L1 stanica adipogenim induktorima dolazi do njegove fosforilacije (211). Zamjenom treonina na mjestu 188 s alaninom dolazi do indukcije ekspresije PPAR-γ i pokretanja dijela adipogenog programa, ali bez stimulacije produkcije adiponektina, što je povezano sa smanjenom količinom C/EBP-α (211). Moguće je da C/EBP-β regulira ekspresiju koaktivatora PPAR-γ, koji su također potrebni za indukciju transkripcije C/EBP-α. GSK-3β dio je Wnt signalnog puta čija aktivacija na početku adipogeneze može održavati preadipocite u nediferenciranom stanju (212). Posljedično, započinjanjem procesa adipogeneze Wnt signalizacija se isključuje kako bi se olakšala ekspresija PPAR-γ i C/EBP-α (213). Važna komponenta Wnt signalnog puta je β-katenin koji se nalazi u citoplazmi vezan za elemente citoskeleta te se njegova razina održava kroz ubikvitin – proteasomski sustav. Proteasomska degradacija β-katenina regulirana je kroz fosforilaciju serina i treonina na N-kraju pomoću GSK-3β. Inhibicija GSK-3β pospješuje nakupljanje β-katenina u citoplazmi i njegovu relokaciju u jezgru gdje djeluje kao koaktivator transkripcijskih čimbenika Tcf/LEF (211). Visoka razina β-katenina u jezgrama preadipocita održava se još dva dana nakon stimulacije adipogenim induktorima, što se vremenski preklapa sa aktivacijom ciljnog gena Wnt puta ciklina D1 i progresijom preadipocita kroz stanični ciklus. Kako stanice prolaze kroz terminalnu fazu adipogeneze, dolazi do ekstenzivne negativne regulacije β-katenina na post-translacijskoj razini, što korelira s indukcijom ekspresije PPAR-γ (213). Tretman inhibitorima GSK-3β ili proteasoma prevenira negativnu regulaciju β-katenina, a defektni β-katenin u kojem je serin na mjestu 37 zamijenjen alaninom postaje otporan na degradacijske učinke PPAR-γ. Isto tako, mutirani oblik β-katenina blokira ekspresiju adiponektina i C/EBP-α. Takvi nalazi sugeriraju postojanje međusobne veze između β-katenina i PPAR-γ tijekom adipogeneze. Ako je GSK-3β funkcionalna, PPAR-γ može neometano sudjelovati u procesima koji vode β-katenin prema degradaciji te osigurati napredovanje procesa prema terminalnoj fazi adipogeneze. Ako je aktivnost GSK-3β ometena, β-katenin može izbjeći proteosomsku degradaciju i na taj način inhibirati ekspresiju ciljnih gena PPAR-γ kao što je adiponektin (211). Dodatni regulator PPAR-γ i C/EBP-α je posrednik utišavanja za receptore retinoida ili tiroidnih hormona (engl. *silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor,* SMRT) koji održava njihovu nisku razinu u preadipocitima (214). Osim toga, konstitutivna ekspresija Pref-1 u preadipocitima blokira adipogenezu i inhibira ekspresiju PPAR-γ i C/EBP-α, a indukcija adipogeneze glukokortikoidima dijelom se odvija kroz supresiju ekspresije Pref-1 (215).

Nicholson i suradnici u svojoj su studiji pokazali da pitavastatin i drugi statini inhibiraju adipogenezu putem inhibicije PPAR-γ, povećavajući ekspresiju Pref-1, što sugerira da je

inhibicija PPAR-γ neophodna za blokiranje adipogeneze u odgovoru na tretman statinima (216). Statini smanjuju ekspresiju ključnih gena adipogeneze kao što su PPAR-γ, C/EBP-α i SREBP-1C, te markere sazrijevanja adipocita kao što su leptin, aP2 i adiponektin (202), mogućim mehanizmom inhibicije sinteze izoprenoida te PI3K i MAPK signalnih puteva (217). Također je ustanovljeno da statini reduciranjem nesterolnih izoprenoida nastalih iz mevalonata, intermedijarnih metabolita biosinteze kolesterola ključnih za adipogenezu, mogu uzrokovati kompenzatorno povećanje aktivnosti HMGCR (218).

Transkripcijska regulacija također je povezana s genomskom organizacijom DNA u visoko dinamičnim strukturama kromatina koje mogu ometati pristup prema DNA, što je potvrđeno činjenicom da se transkripcijski čimbenici vežu na ograničen broj potencijalnih elemenata odgovora (219). Dodatna regulacija ostvarena je epigenomikom koja uključuje post-translacijsku modifikaciju histona i DNA hidroksimetilaciju. U interakciji transkripcijskih čimbenika s kromatinom potrebne su pionirske molekule koje iniciraju remodeliranje kromatina i posreduju transkripcijskim regulacijskim signalima (211). Tijekom adipogeneze, remodeliranje kromatina potrebno je za ispravnu aktivaciju i ekspresiju PPAR-γ, što se odvija kroz acetilaciju i metilaciju nekoliko uključenih histona i konačno dovodi do otpuštanja RNA polimeraze II i rezultira trimetilacijom H3K36 unutar PPAR-γ gena, što je oznaka regije aktivne transkripcije (220). Nadalje, C/EBP-β se veže na kondenzirani kromatin u preadipocitima i započinje neovisnu regrutaciju dodatnih transkripcijskih čimbenika uključujući glukokortikoidni receptor, STAT5, RXR i C/EBP-δ kako bi se smanjila represija PPAR-γ i C/EBP-α putem SMRT (221). Istraživanja su istaknula povezanost epigenetike i metabolizma na način da promijenjeni metabolizam može utjecati na aktivnost enzima koji modificiraju kromatin (222), što je povezano s modulacijom nekodirajućih RNA od kojih se kao važne ističu miRNA sa sposobnošću post-transkripcijske represije genske ekspresije (223). Vezanjem na komplementarna mjesta unutar mRNA, miRNA potiču njihovu degradaciju ili inhibiraju njihovu translaciju (224). Nekoliko miRNA ima važnu ulogu u procesu adipogeneze, kao što su miR-30, miR-21, miR-637 (225). Kao negativni regulatori terminalne diferencijacije ističu se miR-27a/b i miR-130a/b koje preveniraju transkripcijsku indukciju PPAR-γ u preadipocitima ciljajući 3'-neprevedenu regiju PPAR-γ, a njihova je ekspresija smanjena tijekom adipogeneze (226). Dodatno, određene miRNA indirektno reguliraju ekspresiju PPAR-γ, kao što su miR-31 i miR-155 koje direktno ciljaju mRNA C/EBP-α i C/EBPβ, što je sekundarno povezano sa smanjenjem ekspresije PPAR-γ (227).

Tretman metforminom mijenja profil miRNA i time suprimira diferencijaciju adipocita (228). Cruciani i suradnici u svojoj su studiji pokazali da metformin povećava ekspresiju miR-

145, a smanjuje ekspresiju miR-148 u matičnim stanicama adipoznog tkiva (229). Prethodno je pokazano da je miR-145 negativno regulirana tijekom adipogeneze, a njena povećana ekspresija inhibira adipogenezu reducirajući aktivnost PI3K / Akt i MAPK signalnih puteva (230). Ekspresija miR-148 također je pod utjecajem nakupljanja lipida, te promovira adipogenezu kada je inducirana, a inhibicija ekspresije miR-148 suprimira adipogenezu (231). S obzirom na sve navedeno, moguće je zaključiti da metformin interferira s mrežom miRNA u procesu adipogeneze.

6.3.2. Uloga i regulacija SREBP-1C tijekom adipogeneze

SREBP-1C ima centralnu ulogu u lipidnom metabolizmu, naročito u jetri i masnom tkivu. Payne i suradnici prvi su pokazali direktnu ulogu C/EBP u regulaciji SREBP-1C, inicijalnim vezanjem C/EBP-β i C/EBP-δ na promotore SREBP-1C i daljnjom regulacijom putem C/EBPα (232). Iako bi ovakav rezultat značio da se C/EBP nalazi uzvodno od SREBP-1C, promotor C/EBP-β opisan je kao direktna meta djelovanja SREBP-1C u zrelim adipocitima, sugerirajući da je SREBP-1C barem djelomično odgovoran za indukciju C/EBP-β u odgovoru na inzulin (233). Takav rezultat govori u prilog kompleksnoj mreži međusobne regulacije čiji slijed ovisi o ekstracelularnim signalima i statusu diferencijacije stanica.

Bez obzira na jasnu ulogu u lipidnom metabolizmu, SREBP se sintetizira u endoplazmatskom retikulumu i aktivira proteolitičkim cijepanjem u Golgijevom aparatu (234). Nakon što se N-terminalna domena otpusti proteolizom, zreli oblik SREBP ulazi u jezgru i povećava transkripciju ciljnih gena. U proteolitičkom procesuiranju SREBP, membranski protein endoplazmatskog retikuluma, protein cijepanja i aktivacije SREBP (engl. *SREBP cleavage-activating protein*, SCAP), služi kao senzor i transporter kolesterola. Prekursor SREBP-a, pre-SREBP, veže se na MELADL slijed u petlji 6 unutar SCAP proteina odmah nakon sinteze, i njihov kompleks se prenosi sa endoplazmatskog retikuluma na Golgijev aparat unutar vezikula obloženih kompleksom proteina (engl. *coat protein complex II*, COPII) (235). Kada je unutarstanična razina kolesterola niska, SCAP se veže na pre-SREBP i zajedno ulaze u Golgijev aparat gdje proteaze cijepaju pre-SREBP (236). Na taj način N-terminalni kraj SREBP (n-SREBP) ulazi u jezgru i veže se za SRE promovirajući ekspresiju lipogenih gena. Kada se kolesterol nakuplja u membranama endoplazmatskog retikuluma i prijeđe prag od 4 – 5 % ukupne količine lipida, SCAP veže kolesterol, uzrokujući njegovo vezanje za protein

endoplazmatskog retikuluma Insig, što prevenira prepoznavanje MELADL slijeda od strane COPII (237). Tada je transport SCAP-SREBP kompleksa u Golgijev aparat blokiran, a sinteza kolesterola i masnih kiselina opada (238).

Kompleks 1 protein serin/treonin kinaze mete rapamicina (engl. *mammalian target of rapamycin*, mTORC1) kontrolira transkripciju SREBP-1C kao nizvodni ogranak Akt signalnog puta. mTORC1 povećava količinu n-SREBP mehanizmom koji zahtijeva uključenost fosfatidat fosfataze Lipin-1, čije nakupljanje u jezgri suprimira transkripciju posredovanu SREBP-om (239). mTORC1 direktno fosforilira Lipin-1 što potiče njegov izlazak iz jezgre i nakupljanje u citoplazmi, zaustavljajući njegov negativan utjecaj na SREBP. Dakle, Akt može aktivirati SREBP putem dva mehanizma: povećanjem stabilnosti n-SREBP inhibicijom GSK-3β, ili povećanjem razine SREBP aktivacijom mTORC (240). Zaključno, mTORC1 promovira sintezu lipida, ekspresiju SREBP, te sintezu masnih kiselina i sterola. Potiče i adipogenezu, a njegova inhibicija prevenira aktivaciju PPAR-γ (241).

Pokazano je kako inhibitori HMGCR smanjuju nakupljanje lipida u preadipocitima inhibirajući Akt / mTOR fosforilaciju (242). Dodatno, u jednoj studiji pokazano je kako je mTORC1 put neophodan za simvastatinsku supresiju SREBP-1C, ali taj učinak neovisan je o inhibiciji HMGCR (243).

Metormin ostvaruje svoj učinak na SREBP aktivacijom AMPK koja inhibira cijepanje i transkripcijsku aktivaciju SREBP-1C. U odgovoru na svoje aktivatore, AMPK je dovoljna za supresiju proteolize SREBP-1C, nuklearne translokacije i genske ekspresije lipogenih enzima (244). AMPK fosforilira pre-SREBP i n-SREBP, a za inhibiciju cijepanja i autoregulacije SREBP-1C potrebna je fosforilacija serina na mjestu 372. To znači da je AMPK direktna uzvodna kinaza koja se veže na SREBP-1C i fosforilira ga, inhibira njegovo cijepanje, nuklearnu translokaciju i transkripcijsku aktivnost, te da je fosforilacija SREBP-1C serina na mjestu 372 od ključne terapeutske važnosti u preveniranju dislipidemije i DMT2 (244).

6.3.3. Uloga i regulacija STAT3 tijekom adipogeneze

Ekspresija STAT1, STAT5A i STAT5B značajno se povećava nakon indukcije diferencijacije, razine STAT3 blago se povećavaju, dok se ekspresija STAT6 ne mijenja. Ekspresija STAT1, STAT5A i STAT5B regulirana je putem PPAR-γ, što ukazuje na njihovu ulogu u terminalnoj fazi adipogeneze (245). Ekspresija STAT3 i STAT6 regulirana je uzvodno od C/EBP, što ukazuje na njihovu ulogu u ranoj fazi adipogeneze (245). Deng i suradnici

navode da je STAT3 fosforiliran i vezan za DNA za vrijeme proliferacije i u konfluentnoj fazi 3T3-L1 stanica, kao i tijekom mitotičke klonalne ekspanzije (246). Međutim, fosforilacija STAT3 izostaje u postkonfluentnim preadipocitima i diferenciranim adipocitima. Blokiranjem ekspresije STAT3 autori ovoga istraživanja ukazuju da smanjenje endogene ekspresije STAT3 značajno smanjuje prekonfluentnu proliferaciju preadipocita (246). Citokini i čimbenici rasta aktiviraju STAT3 putem receptora ili nereceptorskih tirozin kinaza koje fosforiliraju STAT3 na ključnom tirozinskom ostatku (56). Nakon aktivacije, STAT3 se dimerizira i translocira u jezgru gdje se veže na specifične DNA regulatorne slijedove kako bi stimulirao transkripciju ciljnih gena. STAT3 u adipocitima može biti aktiviran čimbenicima rasta, leptinom, IL-6 i cilijarnim neurotrofnim čimbenikom (engl. *ciliary neurotrophic factor*, CNTF) (247). Pokazalo se da ti citokini reguliraju tjelesnu težinu putem antilipogenog i prolipolitičkog djelovanja na adipocite (247). Budući da je STAT3 nizvodna meta leptina, IL-6 i CNTF signalizacije, pretpostavlja se da posreduje u učincima ovih citokina (248). Citokinski receptori, međutim, nemaju intrinzičnu kinaznu aktivnost, te potrebnu aktivnost tirozin kinaze osiguravaju citoplazmatski JAK proteini (249). Nakon vezanja liganda, ti se proteini vežu na unutarstanične domene citokinskog receptora i kataliziraju ligandom induciranu fosforilaciju intracelularnih tirozinskih ostataka citokinskog receptora (250). Fosforilirani tirozinski ostaci predstavljaju mjesta vezanja STAT čimbenika, koji također bivaju fosforilirani JAK kinazama. IL-6 i CNTF ostvaruju svoje metaboličko djelovanje kroz višejedinični receptor, čija aktivacija i dimerizacija dovodi do aktivacije JAK/STAT puta (251). Učinci leptina posredovani su putem LEP-R aktivacije Jak/STAT puta (252), iako je moguća i aktivacija alternativnih puteva, uključujući MAPK, PI3K i AMPK (253).

Metformin izravno utječe na endokrinu funkciju i inhibira lučenje leptina. Smanjenje razine leptina u osoba liječenih metforminom pronađeno je u nekoliko istraživanja (254,255). U prethodnom istraživanju na bijelim adipocitima štakora, također je ostvaren negativan utjecaj kronične izloženosti metforminu na lučenje leptina (256). U istraživanju kojeg je proveo Klein sa suradnicima, inhibicija signalizacije p44/p42 MAP kinaze spriječila je smanjenje lučenja leptina izazvano metforminom, što ukazuje na uključenost ovog važnog signalnog intermedijera čimbenika rasta u modulaciji funkcije endokrinih adipocita (257).

Poznato je da statini ostvaruju imunomodulatorne i protuupalne učinke, što je pokazano njihovom sposobnošću smanjenja razine CRP-a u plazmi (258). Signalni put uključuje vezanje IL-6 na receptor IL-6R i stvaranje kompleksa s molekulom za prijenos signala, gp130. Kompleks IL-6R/gp130 dalje inducira aktivaciju i fosforilaciju JAK kinaza, što dovodi do nizvodne aktivacije C/EBP i STAT3, a time i indukcije ekspresije CRP gena (259). Aktivacija

STAT3 posredovana IL-6 zahtijeva fosforilaciju tirozinskih i serinskih ostataka, a istraživanje Arnauda i suradnika pokazuje da statini značajno smanjuju fosforilaciju STAT3 na ostacima serina (260).

6.3.4. Uloga i regulacija SMAD3 tijekom adipogeneze

TGF-β signalizacija regulira brojne stanične procese kao što su apoptoza, upala, fibroza i diferencijacija adipocita (261). Strukturno i funkcionalno postoje dvije vrste unutar ove signalizacije: TGF-β i BMP (262). Dva para transmembranskih serin/treonin protein kinaza čine receptore za TGF-β: receptori tipa I II. Vezanje liganda na receptore aktivira puteve ovisne o SMAD-u (TGF-β/SMAD signalizacija) ili SMAD-neovisne puteve koji uglavnom potiču signalizaciju ERK, JNK i p38 MAPK kinaze (263). Ligandi uključeni u TGF-β/SMAD signalizaciju vežu se na receptore staničnih membrana kako bi aktivirali unutarstanične nizvodne SMAD proteine. SMAD proteini čine tri funkcionalne klase: SMAD regulirani receptorima (R-SMAD), zajednički partner SMAD (Co-SMAD) i inhibitorni SMAD (I-SMAD) (264). R-SMAD čine SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 i SMAD8; CoSMAD se odnosi samo na SMAD4; a I-SMAD čine SMAD6 i SMAD7. U stanju mirovanja R-SMAD se uglavnom nalazi u citoplazmi, Co-SMAD i u citoplazmi i u jezgri, a I-SMAD uglavnom ima tendenciju prema jezgri. Nakon vezanja liganda TGF-β, receptori regrutiraju i fosforiliraju SMAD2/3 i SMAD1/5/8 pomoću BMP liganda. Nakon C-terminalne fosforilacije R-SMAD, SMAD2/3 i SMAD1/5/8 se oslobađaju iz kompleksa receptora kako bi formirali trimerni kompleks koji se sastoji od dva R-SMAD-a i molekule SMAD4, koji se zatim translocira u jezgru kako bi regulirao ekspresiju specifičnih gena (265). Nakon što ovi geni odgovore na TGF-β/SMAD signalizaciju, kompleksi R-SMAD/SMAD4 u jezgri se defosforiliraju, a zatim se depolimeriziraju i ponovno ulaze u citoplazmu kroz nuklearne pore, ostvarujući R-SMAD i SMAD4 recikliranje (266). I-SMAD negativno regulira TGF-β/SMAD signalizaciju. Kada se ligandi vežu na receptore, SMAD7 prelazi iz jezgre u citoplazmu, a vezanje na receptor tipa I sprječava fosforilaciju R-SMAD te inhibira ekspresiju specifičnih gena (267). SMAD6 djeluje na drugačiji način, tako što se prolaskom iz jezgre u citoplazmu natječe sa SMAD1 za vezanje na SMAD4, služeći kao inhibitor TGF-β/SMAD signalizacije (268). Dokazano je da TGF-β/SMAD signalizacija ima dvostruku ulogu u procesu diferencijacije adipocita: BMP signalizacija potiče maturaciju adipocita, dok TGF-β signalizacija inhibira adipogenezu. TGF-β signalizacija inhibira diferencijaciju adipocita putem SMAD3 signalizacije (269), inhibicijom ekspresije C/EBP i PPAR-γ (270). Nedostatak TGF-β u mezenhimalnim stanicama rezultira

izrazitom ekspanzijom adipocita u koštanoj srži miševa i značajno povećava ekspresiju PPAR-γ i FABP4 (271).

TGF-β signalizacija je regulirana na više razina: na razini receptora, njihovim interakcijama, različitom distribucijom domena na membrani, endocitozom / recikliranjem, sintezom ili razgradnjom (272); te na razini nizvodne SMAD signalizacije, brojnim posttranslacijskim modifikacijama koje utječu na sastav SMAD kompleksa, njihovu aktivaciju, unutarstaničnu lokalizaciju i degradaciju (273). Svi ovi procesi podložni su modulaciji kolesterolom, čija je homeostaza strogo regulirana mehanizmima koji kontroliraju sintezu, unos i promet sterola, a koji reagiraju na unutarstanične promjene, kao i na signalne putove MAPK, PI3K i AMPK (274). Promjene u unutarstaničnoj razini kolesterola izazivaju višestruke stanične odgovore usmjerene na obnavljanje homeostaze kolesterola (275). Potencijalna regulacija nizvodnih komponenti TGF-β signalnog puta kolesterolom ima važne implikacije na upotrebu statina koji mogu mijenjati unutarstaničnu razinu kolesterola. Shapira i suradnici pokazali su mehanizam kojim smanjena razina kolesterola pojačava TGF-β signalizaciju nizvodno od receptora (276). U takvim okolnostima, prekomjerna aktivacija RNA-aktivirane protein kinaze (engl. *double-stranded RNA-dependent protein kinase*, PKR) i c-Jun N-terminalne kinaze (engl. *c-Jun N-terminal kinase*, JNK) rezultira poboljšanom translacijom i aktivacijom c-Jun. Zauzvrat, to podiže transkripciju i ekspresiju SMAD2/3, što rezultira pojačanim TGF-β – induciranim odgovorima posredovanim SMAD3. Degradacija mRNA SMAD2/3 u tom istraživanju nije bila pod utjecajem kolesterola, što sugerira da je povećanje mRNA SMAD2/3 posljedica njihove pojačane transkripcije, koja je rezultirala paralelnim i proporcionalnim povećanjem translacije (276).

6.4. Mogućnosti u kliničkoj primjeni i daljnjim istraživanjima

Regulacija adipogeneze čest je predmet istraživanja zbog mogućeg anti-adipogenog učinka lijekova koji se u kliničkoj praksi koriste za bolesti povezane s pretilošću, kao što su DMT2 i dislipidemija. Neki od tih lijekova pokazali su, uz svoje osnovno djelovanje, učinak na smanjenje tjelesne mase kod bolesnika na dugotrajnoj terapiji. Budući da su metformin i statini najčešće propisivani lijekovi za liječenje spomenutih komorbiditeta, od iznimne je važnosti ispitati njihov utjecaj na regulaciju adipogeneze. Ovim se istraživanjem pokazao utjecaj metformina i simvastatina na glavne transkripcijske čimbenike koji sudjeluju u procesu adipogeneze u vidu inhibicije njihove ekspresije i posljedične supresije adipogeneze, što ima

pozitivan učinak na smanjenje mase masnog tkiva. Rasvjetljavanje mogućih mehanizama putem kojih ovi lijekovi ostvaruju svoj učinak može rezultirati translacijom potencijalno učinkovitih lijekova iz laboratorija u kliničku praksu. Ovo istraživanje daje temelj za nastavak proučavanja dodatnih signalnih puteva i transkripcijskih kaskada koje bi se pokazale kao moguće mete u razvoju lijekova protiv pretilosti i udruženih komorbiditeta.

6.5. Ograničenja istraživanja

Proučavanje adipogeneze na staničnim kulturama ima nekoliko nedostataka. Prvo, stanične kulture diferenciraju se gotovo isključivo u adipocite bijelog masnog tkiva, dok u organizmu sisavaca postoji i smeđe masno tkivo odgovorno primarno za potrošnju energije. Također, aneuploidnost staničnih linija može utjecati na njihovu sposobnost adipogeneze, a sposobne su i postojati izvan uvjeta ekstracelularnog matriksa i potpornih struktura (30). Još je jedna prepreka to što stanična linija ne dozvoljava istraživanje ponašanja različitih skladišta masnog tkiva, koje u organizmu sisavaca postoje na raznim lokacijama i od kojih svaki ima različiti adipogeni potencijal (277). Razlike u metaboličkom ponašanju zrelih masnih stanica unutar različitih skladišta masnog tkiva mogu imati značajne kliničke posljedice, što je najviše vidljivo u razlici između supkutanog i visceralnog masnog tkiva, gdje je potonje veći rizični čimbenik za nastanak inzulinske rezistencije i dislipidemije (278). Masno tkivo također je ovisno i o spolu i kompleksnom učinku hormona unutar organizma, što nije moguće točno oponašati u laboratorijskim uvjetima (279). Razlike u usporedbi s primarnim adipocitima postoje i u inzulinom stimuliranom unosu glukoze u stanice. Inzulin povećava unos glukoze u stanice 20 do 30 puta u adipocitima štakora, a samo 3 do 5 puta u 3T3-L1 staničnoj liniji. Mogući razlog tome je veća ekspresija GLUT1 u 3T3-L1 preadipocitima, koji povećava bazalni unos glukoze u stanice, no ne i onaj stimuliran inzulinom (280).

7. Zaključak

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se proizvesti sljedeći zaključci:

- Primjena metformina i simvastatina na stanični model pretilosti 3T3-L1 stanica smanjuje nakupljanje unutarstaničnih lipida
- Primjena metformina i simvastatina smanjuje razine mRNA i proteina PPAR-γ, C/EBP-α, SREBP-1C i STAT3, i povećava razine proteina SMAD3
- Najveći utjecaj na smanjenje razine mRNA PPAR-γ, C/EBP-α, SREBP-1C i STAT3 ostvaruje kombinirana terapija 4 mM metformina i 2 μM simvastatina, te samostalna terapija simvastatinom u koncentraciji 1 μM i 2 μM, uz kontinuiranu primjenu tijekom cijelog procesa trajanja adipogeneze
- U vremenskom periodu primjene lijekova od 1. do 3. dana diferencijacije, značajno smanjenje razine proteina PPAR-γ, C/EBP-α, SREBP-1C i STAT3 ostvaruje se samo kombiniranom terapijom metforminom i simvastatinom
- U vremenskom periodu primjene lijekova od 4. do 6. dana diferencijacije, značajno smanjenje razine proteina PPAR-γ, C/EBP-α, SREBP-1C i STAT3 ostvaruje se kombiniranom terapijom metforminom i simvastatinom te samostalnom terapijom simvastatinom u koncentraciji od 1 μM i 2 μM
- Metformin i simvastatin ostvaruju učinak na smanjenje razine proteina PPAR-γ, C/EBP-α, SREBP-1C i STAT3 u svim ispitivanim koncentracijama lijekova uz primjenu od 7. do 9. i od 1. do 9. dana diferencijacije
- Povećanje razine proteina SMAD3 ostvareno je samostalnom primjenom metformina u koncentracijama od 200 μM, 2 mM i 4 mM i simvastatina u koncentraciji 100 nm i 2 μM tijekom 1. do 3. dana diferencijacije
- Povećanje razine proteina SMAD3 ostvareno je samostalnom primjenom metformina u koncentracijama od 200 μM, 2 mM i 4 mM i simvastatina u koncentraciji 2 μM, te njihovom kombinacijom u sve tri koncentracije tijekom 4. do 6. dana diferencijacije

8. Sažetak

Cilj istraživanja: Inhibicija adipogeneze potencijalan je mehanizam liječenja pretilosti. Inhibicija proadipogenih regulatora adipogeneze može rezultirati zaustavljanjem procesa adipogeneze, smanjenjem nakupljanja lipida i u konačnici prevencijom povećanja mase masnog tkiva. Cilj istraživanja bio je ispitati učinak metformina i simvastatina na regulaciju adipogeneze te odrediti najučinkovitije koncentracije lijekova i vremenski period djelovanja lijekova u inhibiciji proadipogenih regulatora adipogeneze.

Materijal i metode: Istraživanje se provelo na 3T3-L1 staničnoj kulturi preadipocita koji se uz adekvatnu stimulaciju mogu diferencirati u zrele masne stanice. Tijekom procesa adipogeneze stanice su tretirane različitim koncentracijama metformina i simvastatina u različitim vremenskim periodima. Unutarstanično nakupljanje lipida vizualizirano je i Oil Red O bojanjem, ekspresija mRNA ispitivanih čimbenika odredila se PCR-om, a ekspresija proteina Western blot metodom i imunocitokemijom.

Rezultati: Tretman metforminom i simvastatinom nije pokazao značajan utjecaj na unutarstanično nakupljanje lipidnih kapljica, iako je ono bilo smanjeno u skupini stanica tretiranih tijekom cjelokupnog trajanja procesa diferencijacije. Tretman je pokazao učinak na smanjenje razina mRNA PPAR-γ, C/EBP-α, SREBP-1C i STAT3 pri većim koncentracijama i primjeni tijekom cjelokupnog trajanja procesa adipogeneze. Učinak tretmana na razine proteina bio je opsežniji, sa značajnim smanjenjem razina PPAR-γ, C/EBP-α, SREBP-1C i STAT3 pri gotovo svim korištenim koncentracijama lijekova u dva vremenska perioda koji obuhvaćaju zadnja četiri dana adipogeneze, te povećanjem razine SMAD3 u dva vremenska perioda koji obuhvaćaju prvih šest dana adipogeneze.

Zaključak: Promatrajući rezultate utjecaja metformina i simvastatina na inhibiciju adipogeneze u ovisnosti o obje ispitivane varijable, koncentracije lijekova i vremenskog perioda djelovanja tretmana, možemo zaključiti da su najopsežnije i najznačajnije učinke na mRNA razine ostvarili kombinirani tretmani metforminom i simvastatinom primjenjivani kontinuirano tijekom trajanja procesa diferencijacije. Na razine proteina jednak su učinak kontinuiranoj primjeni lijekovi ostvarili i tijekom kraćeg vremenskog perioda djelovanja od 7. do 9. dana, i to jednako učinkovito u pojedinačnoj i kombiniranoj primjeni u svim ispitivanim koncentracijama.

Ključne riječi: adipogeneza; adipociti; masno tkivo; metformin; pretilost; simvastatin

9. Summary

THE EFFECT OF SIMVASTATIN AND METFORMIN ON ADIPOGENESIS REGULATION *IN VITRO*

Objectives: Inhibition of adipogenesis is a potential mechanism of obesity treatment. Inhibition of proadipogenic adipogenesis regulators can inhibit adipogenesis, reduce lipid accumulation, and ultimately prevent adipose tissue enlargement. The aim of the study was to examine the effect of metformin and simvastatin on the regulation of adipogenesis and to determine the most effective concentrations and time period for the inhibition of proadipogenic regulators of adipogenesis.

Material and Methods: 3T3-L1 cell culture of preadipocytes that can differentiate into mature adipocytes upon adequate stimulation were used in this study. During the adipogenesis, cells were treated with different concentrations of metformin and simvastatin at different time periods. Intracellular lipid accumulation was visualized by Oil Red O staining, mRNA expression of transcription factors was determined by PCR, and protein expression by Western blot and immunocytochemistry.

Results: Metformin and simvastatin treatment did not show a significant effect on intracellular accumulation of lipid droplets, although it was reduced in the group of cells treated through the entire duration of the differentiation process. An effect on reducing the mRNA levels of PPAR-γ, C/EBP-α, SREBP-1C and STAT3 was significant with combined treatment at higher concentrations applied through the entire duration of the adipogenesis process. The effect of treatment on protein levels was more extensive, with a significant reduction in protein levels of PPAR-γ, C/EBP-α, SREBP-1C i STAT3 with all drug concentrations used in the two time periods covering the last four days of adipogenesis, and by increasing SMAD3 levels in the two time periods covering the first six days of adipogenesis.

Conclusion: Observing the results of the influence of metformin and sivastatin on the inhibition of adipogenesis depending on both examined variables, drug concentrations and time period of treatment, we can conclude that the most comprehensive and significant effects on mRNA levels were achieved by combined metformin and simvastatin treatment used through the whole duration of differentiation process. On protein levels the same effect as continuous drug application was achieved during a shorter period of action from 7th to 9th day, and drugs were equally effective alone as in the combined use.

Keywords: adipocytes; adipogenesis; adipose tissue; metformin; obesity; simvastatin

10. Literatura

1. Lee MJ. Hormonal Regulation of Adipogenesis. Compr Physiol. 2017;7(4):1151-95.

2. Moseti D, Regassa A, Kim W-K. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. Int J Mol Sci. 2016;17(1):124.

3. Richard AJ, White U, Elks CM, Stephens JM. Adipose Tissue: Physiology to Metabolic Dysfunction. U: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dhatariya K, i sur., urednici. Endotext [Internet].South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.

4. Boon MR, van Marken Lichtenbelt WD. Brown Adipose Tissue: A Human Perspective. U: Herzig S, urednik. Metabolic Control [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015. str. 301-19.

5. Chen M-H, Tong Q. An update on the regulation of adipogenesis. Drug Discov Today Dis Mech. 2013;10(1-2):e15-9.

6. Takahashi Y, Shinoda A, Furuya N, Harada E, Arimura N, Ichi I, i sur. Perilipin-Mediated Lipid Droplet Formation in Adipocytes Promotes Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1 Processing and Triacylglyceride Accumulation. Waki H, editor. PLoS ONE. 2013;8(5):e64605.

7. Lass A, Zimmermann R, Oberer M, Zechner R. Lipolysis – A highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. Prog Lipid Res. 2011;50(1):14-27.

8. Vegiopoulos A, Rohm M, Herzig S. Adipose tissue: between the extremes. EMBO J. 2017;36(14):1999-2017.

9. Jeremy M Berg, John L Tymoczko, Lubert Stryer. Biochemistry. New York: W.H. Freeman; 2012.

10. Daval M, Foufelle F, Ferré P. Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue: Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. J Physiol. 2006;574(1):55-62.

11. Frayn KN, Humphreys SM. Metabolic characteristics of human subcutaneous abdominal adipose tissueafter overnight fast. Am J Physiol-Endocrinol Metab. 2012;302(4):E468-75.

12. Harris CA, Haas JT, Streeper RS, Stone SJ, Kumari M, Yang K, i sur. DGAT enzymes are required for triacylglycerol synthesis and lipid droplets in adipocytes. J Lipid Res. 2011;52(4):657-67.

13. Chapman MJ. Therapeutic elevation of HDL-cholesterol to prevent atherosclerosis and coronary heart disease. Pharmacol Ther. 2006;111(3):893-908.

14. Nagahara K, Dobashi K, Ishikawa T, Nakano Y, Abe Y, Tanaka D, i sur. AICAR Attenuates TNFα-Induced Inappropriate Secretion of Monocyte Chemoattractant

Protein-1 and Adiponectin in 3T3-L1 Adipocytes. J Atheroscler Thromb. 2016;23(12):1345-54.

15. Nigro E, Scudiero O, Monaco ML, Palmieri A, Mazzarella G, Costagliola C, i sur. New Insight into Adiponectin Role in Obesity and Obesity-Related Diseases. BioMed Res Int. 2014;2014:1-14.

16. Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin and the cardiometabolic syndrome: An epidemiological perspective. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2014;28(1):93-106.

17. De Rosa A, Monaco ML, Capasso M, Forestieri P, Pilone V, Nardelli C, i sur. Adiponectin oligomers as potential indicators of adipose tissue improvement in obese subjects. Eur J Endocrinol. 2013;169(1):37-43.

18. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N. The physiological and pathophysiological role of adiponectin and adiponectin receptors in the peripheral tissues and CNS. FEBS Lett. 2008;582(1):74-80.

19. Rutkowski JM, Stern JH, Scherer PE. The cell biology of fat expansion. J Cell Biol. 2015;208(5):501-12.

20. Toda C, Santoro A, Kim JD, Diano S. POMC Neurons: From Birth to Death. Annu Rev Physiol. 2017;79(1):209-36.

21. Sáinz N, Barrenetxe J, Moreno-Aliaga MJ, Martínez JA. Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. Metabolism. 2015;64(1):35-46.

22. Engin A. Diet-Induced Obesity and the Mechanism of Leptin Resistance. U: Engin AB, Engin A, urednici. Obesity and Lipotoxicity [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017. str. 381–97.

23. Cao H. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. J Endocrinol. 2014;220(2):T47-59.

24. Jaganathan R, Ravindran R, Dhanasekaran S. Emerging Role of Adipocytokines in Type 2 Diabetes as Mediators of Insulin Resistance and Cardiovascular Disease. Can J Diabetes. 2018;42(4):446-456.

25. Halabis M, Dziedzic M, Warchulinska J, Kaznowska-Bystryk I, Solski J. Omentin - a new adipokine with many roles to play. Curr Issues Pharm Med Sci. 2015;28(3):176-80.

26. Dave S, Kaur NJ, Nanduri R, Dkhar HK, Kumar A, Gupta P. Inhibition of Adipogenesis and Induction of Apoptosis and Lipolysis by Stem Bromelain in 3T3-L1 Adipocytes. PLoS ONE. 2012;7(1):e30831.

27. Green H, Kehinde O. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. Cell. 1974;1(3):113-6.

28. Green H, Kehinde O. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. Cell. 1976;7(1):105-13.

29. Morrison S, McGee SL. 3T3-L1 adipocytes display phenotypic characteristics of multiple adipocyte lineages. Adipocyte. 2015;4(4):295-302.

30. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding Adipocyte Differentiation. Phys Rev. 1998;78:27.

31. Rubin CS, Hirsch A, Fung C, Rosen OM. Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. J Biol Chem. 1978;253(20):7570-8.

32. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. Genes Dev. 2000;14(11):1293-307.

33. Tang Q-Q, Otto TC, Lane MD. CCAAT/enhancer-binding protein is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. Proc Natl Acad Sci. 2003;100(3):850-5.

34. Moreno-Navarrete JM, Fernández-Real JM. Adipocyte Differentiation. U: Symonds ME, urednik. Adipose Tissue Biology [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2012. str. 17-38.

35. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. Cell Metab. 2006;4(4):263-73.

36. Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, Brandsch M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. Anal Biochem. 2012;425(1):88-90.

37. Green H, Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. Cell. 1974;3(2):127-33.

38. Rosen OM, Smith CJ, Fung C, Rubin CS. Development of hormone receptors and hormone responsiveness in vitro. Effect of prolonged insulin treatment on hexose uptake in 3T3-L1 adipocytes. J Biol Chem. 1978;253(20):7579-83.

39. Wang H, Iakova P, Wilde M, Welm A, Goode T, Roesler WJ, i sur. C/EBPα Arrests Cell Proliferation through Direct Inhibition of Cdk2 and Cdk4. Mol Cell. 2001;8(4):817-28.

40. Cave E, Crowther NJ. The Use of 3T3-L1 Murine Preadipocytes as a Model of Adipogenesis. U: Guest PC, urednik. Pre-Clinical Models [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2019. str. 263–72.

41. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. Genes Dev. 1994;8(10):1224-34.

42. Astapova O, Leff T. Adiponectin and PPARγ: cooperative and interdependent actions of two key regulators of metabolism. Vitam Horm. 2012;90:143-62.

43. Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPARγ. Annu Rev Biochem. 2008;77(1):289-312.

44. Nawrocki AR, Rajala MW, Tomas E, Pajvani UB, Saha AK, Trumbauer ME, i sur. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced

responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. J Biol Chem. 2006;281(5):2654-60.

45. Christodoulides C, Vidal-Puig A. PPARs and adipocyte function. Mol Cell Endocrinol. 2010;318(1-2):61-8.

46. Eeckhoute J, Oger F, Staels B, Lefebvre P. Coordinated Regulation of PPARγ Expression and Activity through Control of Chromatin Structure in Adipogenesis and Obesity. PPAR Res. 2012;2012:164140.

47. Yu H, He K, Wang L, Hu J, Gu J, Zhou C, i sur. Stk40 represses adipogenesis through translational control of CCAAT/enhancer-binding proteins. J Cell Sci. 2015;jcs.170282.

48. Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, i sur. Cross-Regulation of C/EBPα and PPARγ Controls the Transcriptional Pathway of Adipogenesis and Insulin Sensitivity. Mol Cell. 1999;3(2):151-8.

49. Tang Q-Q, Otto TC, Lane MD. Mitotic clonal expansion: A synchronous process required for adipogenesis. Proc Natl Acad Sci. 2003;100(1):44-9.

50. Chung SS, Lee JS, Kim M, Ahn BY, Jung HS, Lee HM, i sur. Regulation of Wnt/β-Catenin Signaling by CCAAT/Enhancer Binding Protein β During Adipogenesis. Obesity. 2012;20(3):482-7.

51. Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, i sur. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. Cell. 1993;75(1):187-97.

52. Kim JB, Spotts GD, Halvorsen YD, Shih HM, Ellenberger T, Towle HC, i sur. Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain. Mol Cell Biol. 1995;15(5):2582-8.

53. Shimomura I, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. J Clin Invest. 1997;99(5):838-45.

54. Czech MP, Tencerova M, Pedersen DJ, Aouadi M. Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. Diabetologia. 2013;56(5):949-64.

55. Stark GR, Darnell JE. The JAK-STAT Pathway at Twenty. Immunity. 2012;36(4):503-14.

56. Darnell Jr. JE. STATs and Gene Regulation. Science. 1997;277(5332):1630-5.

57. Kawai M, Namba N, Mushiake S, Etani Y, Nishimura R, Makishima M, i sur. Growth hormone stimulates adipogenesis of 3T3-L1 cells through activation of the Stat5A/5B-PPARγ pathway. J Mol Endocrinol. 2007;38(1):19-34.

58. Richard AJ, Stephens JM. The role of JAK-STAT signaling in adipose tissue function. Biochim Biophys Acta. 2014;1842(3):431-9.

59. Wegrzyn J, Potla R, Chwae Y-J, Sepuri NBV, Zhang Q, Koeck T, i sur. Function of Mitochondrial Stat3 in Cellular Respiration. Science. 2009;323(5915):793-7.

60. Kramer AH, Edkins AL, Hoppe HC, Prinsloo E. Dynamic Mitochondrial Localisation of STAT3 in the Cellular Adipogenesis Model 3T3-L1. J Cell Biochem. 2015;116(7):1232-40.

61. Oishi Y, Manabe I, Tobe K, Tsushima K, Shindo T, Fujiu K, i sur. Krüppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. Cell Metab. 2005;1(1):27-39.

62. Pei H, Yao Y, Yang Y, Liao K, Wu J-R. Krüppel-like factor KLF9 regulates PPARγ transactivation at the middle stage of adipogenesis. Cell Death Differ. 2011;18(2):315-27.

63. Mori T, Sakaue H, Iguchi H, Gomi H, Okada Y, Takashima Y, i sur. Role of Krüppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis. J Biol Chem. 2005;280(13):12867-75.

64. Sue N, Jack BHA, Eaton SA, Pearson RCM, Funnell APW, Turner J, i sur. Targeted Disruption of the Basic Krüppel-Like Factor Gene (*Klf3*) Reveals a Role in Adipogenesis. Mol Cell Biol. 2008;28(12):3967-78.

65. Wu J, Srinivasan SV, Neumann JC, Lingrel JB. The KLF2 Transcription Factor Does Not Affect the Formation of Preadipocytes but Inhibits Their Differentiation into Adipocytes †. Biochemistry. 2005;44(33):11098-105.

66. Kawamura Y, Tanaka Y, Kawamori R, Maeda S. Overexpression of Kruppel-Like Factor 7 Regulates Adipocytokine Gene Expressions in Human Adipocytes and Inhibits Glucose-Induced Insulin Secretion in Pancreatic β-Cell Line. Mol Endocrinol. 2006;20(4):844-56.

67. Stephens JM, Butts MD, Pekala PH. Regulation of transcription factor mRNA accumulation during 3T3-L1 preadipocyte differentiation by tumour necrosis factor-. J Mol Endocrinol. 1992 ;9(1):61-72.

68. Knebel B, Kotzka J, Lehr S, Hartwig S, Avci H, Jacob S, i sur. A mutation in the c-Fos gene associated with congenital generalized lipodystrophy. Orphanet J Rare Dis. 2013;8(1):119.

69. Di Pietro N, Panel V, Hayes S, Bagattin A, Meruvu S, Pandolfi A, i sur. Serum- and Glucocorticoid-Inducible Kinase 1 (SGK1) Regulates Adipocyte Differentiation via Forkhead Box O1. Mol Endocrinol. 2010;24(2):370-80.

70. Meruvu S, Hugendubler L, Mueller E. Regulation of Adipocyte Differentiation by the Zinc Finger Protein ZNF638. J Biol Chem. 2011;286(30):26516-23.

71. Tong Q, Tsai J, Tan G, Dalgin G, Hotamisligil GS. Interaction between GATA and the C/EBP Family of Transcription Factors Is Critical in GATA-Mediated Suppression of Adipocyte Differentiation. Mol Cell Biol. 2005;25(2):706-15.

72. Reusch JEB, Colton LA, Klemm DJ. CREB Activation Induces Adipogenesis in 3T3-L1 Cells. Mol Cell Biol. 2000;20(3):1008-20.

73. Poulos SP, Hausman DB, Hausman GJ. The development and endocrine functions of adipose tissue. Mol Cell Endocrinol. 2010;323(1):20-34.

74. Gagnon A, Chen CS, Sorisky A. Activation of protein kinase B and induction of adipogenesis by insulin in 3T3-L1 preadipocytes: contribution of phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate versus phosphoinositide-3,4-bisphosphate. Diabetes. 1999;48(4):691-8.

75. Prusty D, Park B-H, Davis KE, Farmer SR. Activation of MEK/ERK Signaling Promotes Adipogenesis by Enhancing Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPARγ) and C/EBPα Gene Expression during the Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes. J Biol Chem. 2002;277(48):46226-32.

76. Dowell P, Otto TC, Adi S, Lane MD. Convergence of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ and Foxo1 Signaling Pathways. J Biol Chem. 2003;278(46):45485-91.

77. Kim JB, Spiegelman BM. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. Genes Dev. 1996;10(9):1096-107.

78. Jackson RM, Griesel BA, Gurley JM, Szweda LI, Olson AL. Glucose availability controls adipogenesis in mouse 3T3-L1 adipocytes via up-regulation of nicotinamide metabolism. J Biol Chem. 2017;292(45):18556-64.

79. Su X, Abumrad NA. Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction. Trends Endocrinol Metab. 2009;20(2):72-7.

80. Park Y-K, Ge K. Glucocorticoid Receptor Accelerates, but Is Dispensable for, Adipogenesis. Mol Cell Biol. 2017;37(2):e00260-16.

81. Asada M, Rauch A, Shimizu H, Maruyama H, Miyaki S, Shibamori M, i sur. DNA binding-dependent glucocorticoid receptor activity promotes adipogenesis via Krüppel-like factor 15 gene expression. Lab Invest. 2011;91(2):203-15.

82. Wu Z, Bucher NL, Farmer SR. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. Mol Cell Biol. 1996;16(8):4128-36.

83. Sanyal D, Raychaudhuri M. Hypothyroidism and obesity: An intriguing link. Indian J Endocrinol Metab. 2016;20(4):554.

84. Mishra A, Zhu X, Ge K, Cheng S-Y. Adipogenesis is differentially impaired by thyroid hormone receptor mutant isoforms. J Mol Endocrinol. 2010;44(4):247-55.

85. Katagiri T, Watabe T. Bone Morphogenetic Proteins. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016;8(6):a021899.

86. Hu L, Yin C, Zhao F, Ali A, Ma J, Qian A. Mesenchymal Stem Cells: Cell Fate Decision to Osteoblast or Adipocyte and Application in Osteoporosis Treatment. Int J Mol Sci. 2018;19(2):360.

87. Lowe CE, O'Rahilly S, Rochford JJ. Adipogenesis at a glance. J Cell Sci. 2011;124(16):2681-6.

88. Unger RH. The Hyperleptinemia of Obesity—Regulator of Caloric Surpluses. Cell. 2004;117(2):145-6.

89. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2012;13(4):251-62.

90. Habinowski SA, Witters LA. The effects of AICAR on adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. Biochem Biophys Res Commun. 2001;286(5):852-6.

91. Bijland S, Mancini SJ, Salt IP. Role of AMP-activated protein kinase in adipose tissue metabolism and inflammation. Clin Sci. 2013;124(8):491-507.

92. Zhang BB, Zhou G, Li C. AMPK: An Emerging Drug Target for Diabetes and the Metabolic Syndrome. Cell Metab. 2009;9(5):407-16.

93. Boyle JG, Salt IP, McKay GA. Metformin action on AMP-activated protein kinase: a translational research approach to understanding a potential new therapeutic target: Metformin and AMP-activated protein kinase. Diabet Med. 2010;27(10):1097-106.

94. Sun W, Lee T-S, Zhu M, Gu C, Wang Y, Zhu Y, i sur. Statins Activate AMP-Activated Protein Kinase In Vitro and In Vivo. Circulation. 2006;114(24):2655-62.

95. Mitri J, Muraru MD, Pittas AG. Vitamin D and type 2 diabetes: a systematic review. Eur J Clin Nutr. 2011;65(9):1005-15.

96. Kong J, Chen Y, Zhu G, Zhao Q, Li YC. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 upregulates leptin expression in mouse adipose tissue. J Endocrinol. 2013;216(2):265-71.

97. Blumberg JM, Tzameli I, Astapova I, Lam FS, Flier JS, Hollenberg AN. Complex Role of the Vitamin D Receptor and Its Ligand in Adipogenesis in 3T3-L1 Cells. J Biol Chem. 2006;281(16):11205-13.

98. Lovejoy JC. The menopause and obesity. Prim Care Clin Off Pract. 2003;30(2):317-25.

99. Lea-Currie YR, Monroe D, Mcintosh MK. Dehydroepiandrosterone and related steroids alter 3T3-L1 preadipocyte proliferation and differentiation. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol. 1999;123(1):17-25.

100. De Maddalena C, Vodo S, Petroni A, Aloisi AM. Impact of testosterone on body fat composition. J Cell Physiol. 2012;227(12):3744-8.

101. Singh R, Artaza JN, Taylor WE, Braga M, Yuan X, Gonzalez-Cadavid NF, i sur. Testosterone inhibits adipogenic differentiation in 3T3-L1 cells: nuclear translocation of androgen receptor complex with beta-catenin and T-cell factor 4 may bypass canonical Wnt signaling to down-regulate adipogenic transcription factors. Endocrinology. 2006;147(1):141-54.

102. Ross SE, Erickson RL, Gerin I, DeRose PM, Bajnok L, Longo KA, i sur. Microarray Analyses during Adipogenesis: Understanding the Effects of Wnt Signaling on

Adipogenesis and the Roles of Liver X Receptor α in Adipocyte Metabolism. Mol Cell Biol. 2002;22(16):5989-99.

103. Laudes M. Role of WNT pathway in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. J Mol Endocrinol. 2011;JME-10-0169.

104. Choy L, Derynck R. Transforming Growth Factor-β Inhibits Adipocyte Differentiation by Smad3 Interacting with CCAAT/Enhancer-binding Protein (C/EBP) and Repressing C/EBP Transactivation Function. J Biol Chem. 2003;278(11):9609-19.

105. Lee M-J. Transforming growth factor beta superfamily regulation of adipose tissue biology in obesity. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis. 2018;1864(4):1160-71.

106. Aykul S, Maust J, Floer M, Martinez-Hackert E. TGF-B Family Inhibitors Blunt Adipogenesis Via Non-Canonical Regulation Of SMAD Pathways. Dostupno na adresi: http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.03.12.988568. Datum pristupa: 04.10.2021.

107. Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-β. Nat Cell Biol. 2002;4(8):599-604.

108. Tan JTM, McLennan SV, Song WW, Lo LW-Y, Bonner JG, Williams PF, i sur. Connective tissue growth factor inhibits adipocyte differentiation. Am J Physiol-Cell Physiol. 2008;295(3):C740-51.

109. Song WWC, McLennan SV, Tam C, Williams PF, Baxter RC, Twigg SM. CCN2 requires TGF-β signalling to regulate CCAAT/enhancer binding proteins and inhibit fat cell differentiation. J Cell Commun Signal. 2015;9(1):27-36.

110. Vandanmagsar B, Youm Y-H, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, i sur. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. Nat Med. 2011;17(2):179-88.

111. Valli V, Heilmann K, Danesi F, Bordoni A, Gerhäuser C. Modulation of Adipocyte Differentiation and Proadipogenic Gene Expression by Sulforaphane, Genistein, and Docosahexaenoic Acid as a First Step to Counteract Obesity. Oxid Med Cell Longev. 2018;2018:1-8.

112. Chait A, den Hartigh LJ. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. Front Cardiovasc Med. 2020;7:22.

113. Zhang Y, Liu J, Yao J, Ji G, Qian L, Wang J, i sur. Obesity: Pathophysiology and Intervention. Nutrients. 2014;6(11):5153-83.

114. Finucane OM, Reynolds CM, McGillicuddy FC, Harford KA, Morrison M, Baugh J, i sur. Macrophage Migration Inhibitory Factor Deficiency Ameliorates High-Fat Diet Induced Insulin Resistance in Mice with Reduced Adipose Inflammation and Hepatic Steatosis. Nerurkar PV, editor. PLoS ONE. 2014;9(11):e113369.

115. Grundy SM. Inflammation, Hypertension, and the Metabolic Syndrome. JAMA. 2003;290(22):3000.

116. Jellinger PS, Handelsman Y, Rosenblit PD, Bloomgarden ZT, Fonseca VA, Garber AJ, i sur. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology Guidelines for Management of Dyslipidemia and Prevention of Cardiovascular Disease. Endocr Pract. 2017;23:1-87.

117. Chen SC, Brooks R, Houskeeper J, Bremner SK, Dunlop J, Viollet B, i sur. Metformin suppresses adipogenesis through both AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent and AMPK-independent mechanisms. Mol Cell Endocrinol. 2017;440:57-68.

118. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. Cell. 2012;148(5):852-71.

119. Bulcão C, Giuffrida FMA, Ribeiro-Filho FF, Ferreira SRG, Paulo S. Are the beneficial cardiovascular effects of simvastatin and metformin also associated with a hormone-dependent mechanism improving insulin sensitivity? Braz J Med Biol Res. 2007;7.

120. Khan T, Hamilton MP, Mundy DI, Chua SC, Scherer PE. Impact of Simvastatin on Adipose Tissue: Pleiotropic Effects in Vivo. Endocrinology. 2009;150(12):5262-72.

121. Davies JT, Delfino SF, Feinberg CE, Johnson MF, Nappi VL, Olinger JT, i sur. Current and Emerging Uses of Statins in Clinical Therapeutics: A Review. Lipid Insights. 2016;9:LPI.S37450.

122. Carter AA, Gomes T, Camacho X, Juurlink DN, Shah BR, Mamdani MM. Risk of incident diabetes among patients treated with statins: population based study. BMJ. 2013;346:f2610-f2610.

123. Kain V, Kapadia B, Misra P, Saxena U. Simvastatin may induce insulin resistance through a novel fatty acid mediated cholesterol independent mechanism. Sci Rep. 2015;5(1):13823.

124. Joo S-J. Anti-Inflammatory Effects of Statins Beyond Cholesterol Lowering. Korean Circ J. 2012;42(9):592.

125. Guo Y, Huo J, Wu D, Hao H, Ji X, Zhao E, i sur. Simvastatin inhibits the adipogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells through the downregulation of chemerin/CMKLR1 signaling. Int J Mol Med. 2020;46(2):751-61.

126. Qi T, Chen Y, Li H, Pei Y, Woo S-L, Guo X, i sur. A role for PFKFB3/iPFK2 in metformin suppression of adipocyte inflammatory responses. J Mol Endocrinol. 2017;59(1):49-59.

127. Zulian A, Cancello R, Girola A, Gilardini L, Alberti L, Croci M, i sur. In vitro and in vivo Effects of Metformin on Human Adipose Tissue Adiponectin. Obes Facts. 2011;4(1):27-33.

128. Chen D, Wang Y, Wu K, Wang X. Dual Effects of Metformin on Adipogenic Differentiation of 3T3-L1 Preadipocyte in AMPK-Dependent and Independent Manners. Int J Mol Sci. 2018;19(6):1547.

129. Rojas LBA, Gomes MB. Metformin: an old but still the best treatment for type 2 diabetes. Diabetol Metab Syndr. 2013;5(1):6.

130. Zjalić M, Mustapić M, Glumac Z, Prološčić I, Blažetić S, Vuković A, i sur. Construction of AC/DC magnetic syringe device for stimulated drug release, injection and ejection of nanocarriers and testing cytotoxicity in vitro. MethodsX. 2021;8:101312.

131. Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, i sur. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. BMC Bioinformatics. 2017;18(1):529.

132. Kim B-H, Han S, Lee H, Park CH, Chung YM, Shin K, i sur. Metformin enhances the anti-adipogenic effects of atorvastatin via modulation of STAT3 and TGF-β/Smad3 signaling. Biochem Biophys Res Commun. 2015;456(1):173-8.

133. Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the Autophagy–Inflammation–Cell Death Axis in Organismal Aging. Science. 2011;333(6046):1109-12.

134. Boudina S, Graham TE. Mitochondrial function/dysfunction in white adipose tissue: Mitochondrial function/dysfunction in white adipose tissue. Exp Physiol. 2014;99(9):1168-78.

135. Vernochet C, Damilano F, Mourier A, Bezy O, Mori MA, Smyth G, i sur Adipose tissue mitochondrial dysfunction triggers a lipodystrophic syndrome with insulin resistance, hepatosteatosis, and cardiovascular complications. FASEB J. 2014;28(10):4408-19.

136. Forni MF, Peloggia J, Trudeau K, Shirihai O, Kowaltowski AJ. Murine Mesenchymal Stem Cell Commitment to Differentiation Is Regulated by Mitochondrial Dynamics. Stem Cells. 2016;34(3):743-55.

137. Wilson-Fritch L, Burkart A, Bell G, Mendelson K, Leszyk J, Nicoloro S, i sur. Mitochondrial Biogenesis and Remodeling during Adipogenesis and in Response to the Insulin Sensitizer Rosiglitazone. Mol Cell Biol. 2003;23(3):1085-94.

138. Si Y, Palani S, Jayaraman A, Lee K. Effects of forced uncoupling protein 1 expression in 3T3-L1 cells on mitochondrial function and lipid metabolism. J Lipid Res. 2007;48(4):826-36.

139. Kajimoto K, Terada H, Baba Y, Shinohara Y. Essential role of citrate export from mitochondria at early differentiation stage of 3T3-L1 cells for their effective differentiation into fat cells, as revealed by studies using specific inhibitors of mitochondrial di- and tricarboxylate carriers. Mol Genet Metab. 2005;85(1):46-53.

140. Lenhard JM, Kliewer SA, Paulik MA, Plunket KD, Lehmann JM, Weiel JE. Effects of troglitazone and metformin on glucose and lipid metabolism. Biochem Pharmacol. 1997;54(7):801-8.

141. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. Biochem J. 2000;348:607-14.

142. Anedda A, Rial E, González-Barroso MM. Metformin induces oxidative stress in white adipocytes and raises uncoupling protein 2 levels. J Endocrinol. 2008;199(1):33-40.

143. El-Mir M-Y, Detaille D, R-Villanueva G, Delgado-Esteban M, Guigas B, Attia S, i sur. Neuroprotective Role of Antidiabetic Drug Metformin Against Apoptotic Cell Death in Primary Cortical Neurons. J Mol Neurosci. 2008;34(1):77-87.

144. Bridges HR, Jones AJY, Pollak MN, Hirst J. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. Biochem J. 2014;462(3):475-87.

145. Hirst J. Mitochondrial Complex I. Annu Rev Biochem. 2013;82(1):551-75.

146. Vinogradov AD. Catalytic properties of the mitochondrial NADH–ubiquinone oxidoreductase (Complex I) and the pseudo-reversible active/inactive enzyme transition. Biochim Biophys Acta - Bioenergetics. 1998;1364(2):169-85.

147. Birnbaum MJ. Activating AMP-Activated Protein Kinase without AMP. Mol Cell. 2005;19(3):289-90.

148. Xiao B, Heath R, Saiu P, Leiper FC, Leone P, Jing C, i sur. Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. Nature. 2007;449(7161):496-500.

149. Munday MR, Campbell DG, Carling D, Hardie DG. Identification by amino acid sequencing of three major regulatory phosphorylation sites on rat acetyl-CoA carboxylase. Eur J Biochem. 1988;175(2):331-8.

150. Jager S, Handschin C, St.-Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1. Proc Natl Acad Sci. 20077;104(29):12017-22.

151. Mollazadeh H, Tavana E, Fanni G, Bo S, Banach M, Pirro M, i sur. Effects of statins on mitochondrial pathways. J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2021;12(2):237-51.

152. Apostolopoulou M, Corsini A, Roden M. The role of mitochondria in statin-induced myopathy. Eur J Clin Invest. 2015;45(7):745-54.

153. Bouitbir J, Charles A-L, Echaniz-Laguna A, Kindo M, Daussin F, Auwerx J, i sur. Opposite effects of statins on mitochondria of cardiac and skeletal muscles: a 'mitohormesis' mechanism involving reactive oxygen species and PGC-1. Eur Heart J. 2012 ;33(11):1397-407.

154. Marcoff L, Thompson PD. The Role of Coenzyme Q10 in Statin-Associated Myopathy. J Am Coll Cardiol. 2007;49(23):2231–7.

155. Bonifacio A, Sanvee GM, Bouitbir J, Krähenbühl S. The AKT/mTOR signaling pathway plays a key role in statin-induced myotoxicity. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res. 2015;1853(8):1841-9.

156. Vaughan RA, Garcia-Smith R, Bisoffi M, Conn CA, Trujillo KA. Ubiquinol rescues simvastatin-suppression of mitochondrial content, function and metabolism: Implications for statin-induced rhabdomyolysis. Eur J Pharmacol. 2013;711(1-3):1-9.

157. Yesmin Simu S, Ahn S, Castro-Aceituno V, Yang D-C. Ginsenoside Rg5: Rk1 Exerts an Anti-obesity Effect on 3T3-L1 Cell Line by the Downregulation of PPARγ and CEBPα. Iran J Biotechnol. 2017;15(4):252-9.

158. Rizzatti V, Boschi F, Pedrotti M, Zoico E, Sbarbati A, Zamboni M. Lipid droplets characterization in adipocyte differentiated 3T3-L1 cells: size and optical density distribution. Eur J Histochem. 2013;57(3):24.

159. Maeda T, Horiuchi N. Simvastatin Suppresses Leptin Expression in 3T3-L1 Adipocytes via Activation of the Cyclic AMP–PKA Pathway Induced by Inhibition of Protein Prenylation. J Biochem (Tokyo). 2009;145(6):771-81.

160. Zhang J, Tang H, Zhang Y, Deng R, Shao L, Liu Y, i sur. Identification of suitable reference genes for quantitative RT-PCR during 3T3-L1 adipocyte differentiation. Int J Mol Med. 2014;33(5):1209-18.

161. Cho H-H, Lee S-J, Kim S-H, Jang S-H, Won C, Kim H-D, i sur. Acer tegmentosum Maxim Inhibits Adipogenesis in 3t3-l1 Adipocytes and Attenuates Lipid Accumulation in Obese Rats Fed a High-Fat Diet. Nutrients. 2020;12(12):E3753.

162. Lee M-S, Kim Y. Mulberry Fruit Extract Ameliorates Adipogenesis via Increasing AMPK Activity and Downregulating MicroRNA-21/143 in 3T3-L1 Adipocytes. J Med Food. 2020;23(3):266-72.

163. Cisneros-Zevallos L, Bang WY, Delgadillo-Puga C. Ellagic Acid and Urolithins A and B Differentially Regulate Fat Accumulation and Inflammation in 3T3-L1 Adipocytes While Not Affecting Adipogenesis and Insulin Sensitivity. Int J Mol Sci. 2020;21(6):E2086.

164. You L, Li F, Sun Y, Luo L, Qin J, Wang T, i sur. Extract of Acalypha australis L. inhibits lipid accumulation and ameliorates HFD-induced obesity in mice through regulating adipose differentiation by decreasing PPARγ and CEBP/α expression. Food Nutr Res. 2021;65.

165. Nakata M, Nagasaka S, Kusaka I, Matsuoka H, Ishibashi S, Yada T. Effects of statins on the adipocyte maturation and expression of glucose transporter 4 (SLC2A4): implications in glycaemic control. Diabetologia. 2006;49(8):1881-92.

166. Metformin inhibits intracellular lipid accumulation in the murine pre-adipocyte cell line, 3T3-L1. Diabetes Obes Metab. 2008;10(8):688-90.

167. Tauchi-Sato K, Ozeki S, Houjou T, Taguchi R, Fujimoto T. The Surface of Lipid Droplets Is a Phospholipid Monolayer with a Unique Fatty Acid Composition. Journal of Biological Chemistry. 2002;277(46):44507-12.

168. Onal G, Kutlu O, Gozuacik D, Dokmeci Emre S. Lipid Droplets in Health and Disease. Lipids Health Dis. 2017;16(1):128.

169. Ohsaki Y, Suzuki M, Fujimoto T. Open Questions in Lipid Droplet Biology. Chemistry & Biology. 2014;21(1):86-96.

170. Thiam AR, Beller M. The why, when and how of lipid droplet diversity. J Cell Sci. 2017;jcs.192021.

171. Moessinger C, Kuerschner L, Spandl J, Shevchenko A, Thiele C. Human Lysophosphatidylcholine Acyltransferases 1 and 2 Are Located in Lipid Droplets Where They Catalyze the Formation of Phosphatidylcholine. J Biol Chem. 2011;286(24):21330-9.

172. Montero-Villegas S, Polo M, Galle M, Rodenak-Kladniew B, Castro M, Ves-Losada A, i sur. Inhibition of Mevalonate Pathway and Synthesis of the Storage Lipids in Human Liver-Derived and Non-liver Cell Lines by Lippia alba Essential Oils. Lipids. 2017;52(1):37-49.

173. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. Nature. 1990;343(6257):425-30.

174. Casey P. Biochemistry of protein prenylation. J Lipid Res. 1992;33(12):1731-40.

175. Yeh Y-S, Jheng H-F, Iwase M, Kim M, Mohri S, Kwon J, i sur. The Mevalonate Pathway Is Indispensable for Adipocyte Survival. iScience. 2018;9:175-91.

176. Sullivan JE, Brocklehurst KJ, Marley AE, Carey F, Carling D, Beri RK. Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. FEBS Letters. 1994;353(1):33-6.

177. Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG. 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Ribonucleoside. A Specific Method for Activating AMP-Activated Protein Kinase in Intact Cells? Eur J Biochem. 1995;229(2):558-65.

178. Hong Y, Rohatagi S, Habtemariam B, Walker JR, Schwartz SL, Mager DE. Population Exposure-Response Modeling of Metformin in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. Journal Clin Pharmacol. 2008;48(6):696-707.

179. Boyle JG, Logan PJ, Jones GC, Small M, Sattar N, Connell JMC, i sur. AMP-activated protein kinase is activated in adipose tissue of individuals with type 2 diabetes treated with metformin: a randomised glycaemia-controlled crossover study. Diabetologia. 2011;54(7):1799-809.

180. Yang Z, Kahn BB, Shi H, Xue B-Z. Macrophage alpha1 AMP-activated protein kinase (alpha1AMPK) antagonizes fatty acid-induced inflammation through SIRT1. J Biol Chem. 2010;285(25):19051-9.

181. Huypens P, Quartier E, Pipeleers D, Van de Casteele M. Metformin reduces adiponectin protein expression and release in 3T3-L1 adipocytes involving activation of AMP activated protein kinase. Eur J Pharmacol. 2005;518(2-3):90-5.

182. Lee J-E, Ge K. Transcriptional and epigenetic regulation of PPARγ expression during adipogenesis. Cell Biosci. 2014;4(1):29.

183. Merrett JE, Bo T, Psaltis PJ, Proud CG. Identification of DNA response elements regulating expression of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) β and δ and MAP kinase-interacting kinases during early adipogenesis. Adipocyte. 2020;9(1):472-42.

184. Ji S, Doumit ME, Hill RA. Regulation of Adipogenesis and Key Adipogenic Gene Expression by 1, 25-Dihydroxyvitamin D in 3T3-L1 Cells. Seoane LM, editor. PLOS ONE. 2015;10(6):e0126142.

185. Ilavenil S, Arasu MV, Lee J-C, Kim DH, Roh SG, Park HS, i sur. Trigonelline attenuates the adipocyte differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 cells. Phytomedicine. 2014;21(5):758-65.

186. Harp JB, Franklin D, Vanderpuije AA, Gimble JM. Differential Expression of Signal Transducers and Activators of Transcription during Human Adipogenesis. Biochem Biophys Res Commun. 2001;281(4):907-12.

187. Benchamana A, Mori H, MacDougald OA, Soodvilai S. Regulation of adipocyte differentiation and metabolism by lansoprazole. Life Sci. 2019;239:116897.

188. González-Castejón M, García-Carrasco B, Fernández-Dacosta R, Dávalos A, Rodriguez-Casado A. Reduction of adipogenesis and lipid accumulation by Taraxacum officinale (Dandelion) extracts in 3T3L1 adipocytes: an in vitro study. Phytother Res PTR. 2014;28(5):745-52.

189. Chayaratanasin P, Caobi A, Suparpprom C, Saenset S, Pasukamonset P, Suanpairintr N, i sur. Clitoria ternatea Flower Petal Extract Inhibits Adipogenesis and Lipid Accumulation in 3T3-L1 Preadipocytes by Downregulating Adipogenic Gene Expression. Mol Basel Switz. 2019;24(10):E1894.

190. Duangjai A, Nuengchamnong N, Suphrom N, Trisat K, Limpeanchob N, Saokaew S. Potential of Coffee Fruit Extract and Quinic Acid on Adipogenesis and Lipolysis in 3T3-L1 Adipocytes. Kobe J Med Sci. 2018;64(3):E84-92.

191. Koh E-J, Kim K-J, Choi J, Jeon HJ, Seo M-J, Lee B-Y. Ginsenoside Rg1 suppresses early stage of adipocyte development via activation of C/EBP homologous protein-10 in 3T3-L1 and attenuates fat accumulation in high fat diet-induced obese zebrafish. J Ginseng Res. 2017;41(1):23-30.

192. Yang J-Y, Della-Fera MA, Rayalam S, Ambati S, Hartzell DL, Park HJ, i sur. Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. Life Sci. 20087;82(19-20):1032-9.

193. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, i sur. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. J Clin Invest. 2001;108(8):1167-74.

194. Lantier L, Fentz J, Mounier R, Leclerc J, Treebak JT, Pehmøller C, i sur. AMPK controls exercise endurance, mitochondrial oxidative capacity, and skeletal muscle integrity. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. 2014;28(7):3211-24.

195. Jang WG, Kim EJ, Bae I-H, Lee K-N, Kim YD, Kim D-K, i sur. Metformin induces osteoblast differentiation via orphan nuclear receptor SHP-mediated transactivation of Runx2. Bone. 2011;48(4):885-93.

196. Vila-Bedmar R, Lorenzo M, Fernández-Veledo S. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase-mammalian target of rapamycin cross talk regulates brown adipocyte differentiation. Endocrinology. 2010;151(3):980-92.

197. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. Diabetologia. 2017;60(9):1577-85.

198. Gao Y, Xue J, Li X, Jia Y, Hu J. Metformin regulates osteoblast and adipocyte differentiation of rat mesenchymal stem cells. J Pharm Pharmacol. 2008;60(12):1695-700.

199. Kim EK, Lee SH, Jhun JY, Byun JK, Jeong JH, Lee S-Y, i sur. Metformin Prevents Fatty Liver and Improves Balance of White/Brown Adipose in an Obesity Mouse Model by Inducing FGF21. Mediators Inflamm. 2016;2016:1-13.

200. Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Moreno M, Xifra G, Ricart W, Fernández-Real JM. PRDM16 sustains white fat gene expression profile in human adipocytes in direct relation with insulin action. Mol Cell Endocrinol. 2015;405:84-93.

201. Tebbe C, Chhina J, Dar SA, Sarigiannis K, Giri S, Munkarah AR, i sur. Metformin limits the adipocyte tumor-promoting effect on ovarian cancer. Oncotarget. 2014;5(13):4746-64.

202. Elfakhani M, Torabi S, Hussein D, Mills N, Verbeck GF, Mo H. Mevalonate deprivation mediates the impact of lovastatin on the differentiation of murine 3T3-F442A preadipocytes. Exp Biol Med. 2014;239(3):293-301.

203. Gbelcová H, Rimpelová S, Knejzlík Z, Šáchová J, Kolář M, Strnad H, i sur. Isoprenoids responsible for protein prenylation modulate the biological effects of statins on pancreatic cancer cells. Lipids Health Dis. 2017;16(1):250.

204. Singh P, Zhang Y, Sharma P, Covassin N, Soucek F, Friedman PA, i sur. Statins decrease leptin expression in human white adipocytes. Physiol Rep. 2018;6(2):e13566.

205. Koh KK, Quon MJ, Han SH, Lee Y, Kim SJ, Park JB, i sur. Differential metabolic effects of pravastatin and simvastatin in hypercholesterolemic patients. Atherosclerosis. 2009;204(2):483-90.

206. Koh KK, Quon MJ, Sakuma I, Han SH, Choi H, Lee K, i sur. Differential metabolic effects of rosuvastatin and pravastatin in hypercholesterolemic patients. Int J Cardiol. 2013;166(2):509-15.

207. Takaguri A, Satoh K, Itagaki M, Tokumitsu Y, Ichihara K. Effects of Atorvastatin and Pravastatin on Signal Transduction Related to Glucose Uptake in 3T3L1 Adipocytes. J Pharmacol Sci. 2008;107(1):80-9.

208. Ganesan S, Ito MK. Coenzyme Q10 Ameliorates the Reduction in GLUT4 Transporter Expression Induced by Simvastatin in 3T3-L1 Adipocytes. Metab Syndr Relat Disord. 2013;11(4):251-5.

209. Zhang Z, Li S, Cui M, Gao X, Sun D, Qin X, i sur. Rosuvastatin enhances the therapeutic efficacy of adipose-derived mesenchymal stem cells for myocardial infarction via PI3K/Akt and MEK/ERK pathways. Basic Res Cardiol. 2013;108(2):333.

210. Hamm JK, Park BH, Farmer SR. A Role for C/EBPβ in Regulating Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Activity during Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes. J Biol Chem. 2001;276(21):18464-71.

211. Farmer SR. Regulation of PPARγ activity during adipogenesis. Int J Obes. 2005;29(S1):S13-6.

212. Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, i sur. Inhibition of Adipogenesis by Wnt Signaling. Science. 2000;289(5481):950-3.

213. Moldes M, Zuo Y, Morrison RF, Silva D, Park B-H, Liu J, i sur. Peroxisome-proliferator-activated receptor γ suppresses Wnt/β-catenin signalling during adipogenesis. Biochem J. 2003;376(3):607-13.

214. Raghav SK, Waszak SM, Krier I, Gubelmann C, Isakova A, Mikkelsen TS, i sur. Integrative Genomics Identifies the Corepressor SMRT as a Gatekeeper of Adipogenesis through the Transcription Factors C/EBPβ and KAISO. Mol Cell. 2012;46(3):335-50.

215. Kim K-A, Kim J-H, Wang Y, Sul HS. Pref-1 (Preadipocyte Factor 1) Activates the MEK/Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway To Inhibit Adipocyte Differentiation. Mol Cell Biol. 2007;27(6):2294-308.

216. Nicholson AC, Hajjar DP, Zhou X, He W, Gotto AM, Han J. Anti-adipogenic action of pitavastatin occurs through the coordinate regulation of PPAR γ and Pref-1 expression: Regulation of adipocyte differentiation. Br J Pharmacol. 2007;151(6):807-15.

217. Tomiyama K, Nishio E, Watanabe Y. Both wortmannin and simvastatin inhibit the adipogenesis in 3T3-L1 cells during the late phase of differentiation. Jpn J Pharmacol. 1999;80(4):375-8.

218. Chamberlain LH. Inhibition of isoprenoid biosynthesis causes insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. FEBS Letters. 2001;507(3):357-61.

219. Kim JB, Wright HM, Wright M, Spiegelman BM. ADD1/SREBP1 activates PPAR through the production of endogenous ligand. Proc Ntnl Acad Sci. 1998;95(8):4333-7.

220. Mikkelsen TS, Xu Z, Zhang X, Wang L, Gimble JM, Lander ES, i sur. Comparative Epigenomic Analysis of Murine and Human Adipogenesis. Cell. 2010;143(1):156-69.

221. Siersbaek R, Nielsen R, John S, Sung M-H, Baek S, Loft A, i sur. Extensive chromatin remodelling and establishment of transcription factor 'hotspots' during early adipogenesis: Chromatin remodelling during adipogenesis. EMBO J. 2011;30(8):1459-72.

222. Katada S, Imhof A, Sassone-Corsi P. Connecting Threads: Epigenetics and Metabolism. Cell. 2012;148(1-2):24-8.

223. Kaikkonen MU, Lam MTY, Glass CK. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. Cardiovasc Res. 2011;90(3):430-40.

224. Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. Cell. 2009;136(2):215-33.

225. Hilton C, Neville MJ, Karpe F. MicroRNAs in adipose tissue: their role in adipogenesis and obesity. Int J Obes. 2013;37(3):325-32.

226. Lee EK, Lee MJ, Abdelmohsen K, Kim W, Kim MM, Srikantan S, i sur. miR-130 Suppresses Adipogenesis by Inhibiting Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Expression. Molecular and Cellular Biology. 20115;31(4):626-38.

227. Liu S, Yang Y, Wu J. TNFα-induced up-regulation of miR-155 inhibits adipogenesis by down-regulating early adipogenic transcription factors. Biochem Biophys Res Commun. 2011;414(3):618-24.

228. Fujita K, Iwama H, Oura K, Tadokoro T, Hirose K, Watanabe M, i sur. Metformin-suppressed differentiation of human visceral preadipocytes: Involvement of microRNAs. Int J Mol Med. 2016;38(4):1135-40.

229. Cruciani S, Garroni G, Balzano F, Pala R, Bellu E, Cossu ML, i sur. Tuning Adipogenic Differentiation in ADSCs by Metformin and Vitamin D: Involvement of miRNAs. IJMS. 2020;21(17):6181.

230. Wang L, Zhang S, Cheng G, Mei C, Li S, Zhang W, i sur. MiR-145 reduces the activity of PI3K/Akt and MAPK signaling pathways and inhibits adipogenesis in bovine preadipocytes. Genomics. 2020;112(4):2688-94.

231. He H, Cai M, Zhu J, Xiao W, Liu B, Shi Y, i sur. miR-148a-3p promotes rabbit preadipocyte differentiation by targeting PTEN. In Vitro CellDevBiol-Animal. 2018;54(3):241-9.

232. Payne VA, Au W-S, Lowe CE, Rahman SM, Friedman JE, O'Rahilly S, i sur. C/EBP transcription factors regulate *SREBP1c* gene expression during adipogenesis. Biochem J. 2010;425(1):215-24.

233. Lay SL, Lefrère I, Trautwein C, Dugail I, Krief S. Insulin and Sterol-regulatory Element-binding Protein-1c (SREBP-1C) Regulation of Gene Expression in 3T3-L1 Adipocytes. J Biol Chem. 2002;277(38):35625-34.

234. Sato R. Sterol metabolism and SREBP activation. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2010;501(2):177-81.

235. Sun L-P, Seemann J, Goldstein JL, Brown MS. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins. Proc Ntnl Acad Sci. 2007;104(16):6519-26.

236. Espenshade PJ, Li W-P, Yabe D. Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER. Proc Ntnl Acad Sci. 2002;99(18):11694-9.

237. Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. Protein Sensors for Membrane Sterols. Cell. 2006;124(1):35-46.

238. Motamed M, Zhang Y, Wang ML, Seemann J, Kwon HJ, Goldstein JL, i sur. Identification of Luminal Loop 1 of Scap Protein as the Sterol Sensor That Maintains Cholesterol Homeostasis. J Biol Chem. 2011;286(20):18002-12.

239. Peterson TR, Sengupta SS, Harris TE, Carmack AE, Kang SA, Balderas E, i sur. mTOR Complex 1 Regulates Lipin 1 Localization to Control the SREBP Pathway. Cell. 2011;146(3):408-20.

240. Xiao X, Song B-L. SREBP: a novel therapeutic target. Acta Biochim Biophys Sin. 2013;45(1):2-10.

241. Caron A, Richard D, Laplante M. The Roles of mTOR Complexes in Lipid Metabolism. Annu Rev Nutr. 201517;35(1):321-48.

242. Beg M, Shankar K, Varshney S, Rajan S, Singh SP, Jagdale P, et al. A clerodane diterpene inhibit adipogenesis by cell cycle arrest and ameliorate obesity in C57BL/6 mice. Mol Cell Endocrinol. 2015;399:373-85.

243. Liu X, Zhao X, Deng C, Zeng Y, Hu C. Simvastatin improves olanzapine-induced dyslipidemia in rats through inhibiting hepatic mTOR signaling pathway. Acta Pharmacol Sin. 2019;40(8):1049-57.

244. Li Y, Xu S, Mihaylova MM, Zheng B, Hou X, Jiang B, i sur. AMPK Phosphorylates and Inhibits SREBP Activity to Attenuate Hepatic Steatosis and Atherosclerosis in Diet-Induced Insulin-Resistant Mice. Cell Metab. 2011;13(4):376-88.

245. Stephens JM, Morrison RF, Wu Z, Farmer SR. PPARγ Ligand-Dependent Induction of STAT1, STAT5A, and STAT5B during Adipogenesis. Biochem Biophys Res Commun. 1999;262(1):216-22.

246. Deng J, Hua K, Lesser SS, Harp JB. Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription-3 during Proliferative Phases of 3T3-L1 Adipogenesis*. Endocrinol. 2000;141(7):2370-6.

247. Zhou Y-T, Wang Z-W, Higa M, Newgard CB, Unger RH. Reversing adipocyte differentiation: Implications for treatment of obesity. Proc Ntnl Acad Sci. 1999;96(5):2391-5.

248. Schindler C, Strehlow I. Cytokines and STAT Signaling. Dostupno na adresi: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1054358908601118. Datum pristupa: 3.12.2021.

249. Ihle JN. STATs: Signal Transducers and Activators of Transcription. Cell. 1996;84(3):331-4.

250. Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. Cell. 1990;63(6):1149-57.

251. Gearing DP, Thut CJ, VandeBos T, Gimpel SD, Delaney PB, King J, i sur. Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. EMBO J. 1991;10(10):2839-48.

252. Bjørbæk C, Uotani S, da Silva B, Flier JS. Divergent Signaling Capacities of the Long and Short Isoforms of the Leptin Receptor. J Biol Chem. 1997;272(51):32686-95.

253. Frühbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. Biochem J. 2006;393(1):7-20.

254. Glueck CJ, Fontaine RN, Wang P, Subbiah MTR, Weber K, Illig E, i sur. Metformin reduces weight, centripetal obesity, insulin, leptin, and low-density lipoprotein cholesterol in nondiabetic, morbidly obese subjects with body mass index greater than 30. Metabolism. 2001;50(7):856-61.

255. Fruehwald-Schultes B, Oltmanns KM, Toschek B, Sopke S, Kern W, Born J, i sur. Short-term treatment with metformin decreases serum leptin concentration without affecting body weight and body fat content in normal-weight healthy men. Metab. 2002;51(4):531-6.

256. Mueller WM, Stanhope KL, Gregoire F, Evans JL, Havel PJ. Effects of Metformin and Vanadium on Leptin Secretion from Cultured Rat Adipocytes. Obes Res. 2000;8(7):530-9.

257. Klein J, Westphal S, Kraus D, Meier B, Perwitz N, Ott V, i sur. Metformin inhibits leptin secretion via a mitogen-activated protein kinase signalling pathway in brown adipocytes. J Endocrinol. 2004;183(2):299-307.

258. Blake GJ, Ridker PM. C-reactive protein and other inflammatory risk markers in acute coronary syndromes. J Am Coll Cardiol. 2003;41(4):S37-42.

259. Agrawal A, Cha-Molstad H, Samols D, Kushner I. Transactivation of C-Reactive Protein by IL-6 Requires Synergistic Interaction of CCAAT/Enhancer Binding Protein β (C/EBPβ) and Rel p50. J Immunol. 2001;166(4):2378-84.

260. Arnaud C, Burger F, Steffens S, Veillard NR, Nguyen TH, Trono D, i sur. Statins Reduce Interleukin-6–Induced C-Reactive Protein in Human Hepatocytes: New Evidence for Direct Antiinflammatory Effects of Statins. ATVB. 2005;25(6):1231-6.

261. Massague J. NEW EMBO MEMBERS REVIEW: Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. EMBO J. 2000;19(8):1745-54.

262. David CJ, Massagué J. Contextual determinants of TGFβ action in development, immunity and cancer. Nat Rev Mol Cell Biol. 2018;19(7):419-35.

263. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-β family signalling. Nature. 2003;425(6958):577-84.

264. Miyazawa K, Miyazono K. Regulation of TGF-β Family Signaling by Inhibitory Smads. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2017;9(3):a022095.

265. Hill CS. Nucleocytoplasmic shuttling of Smad proteins. Cell Res. 2009;19(1):36-46.

266. Lin X, Duan X, Liang Y-Y, Su Y, Wrighton KH, Long J, i sur. PPM1A Functions as a Smad Phosphatase to Terminate TGFβ Signaling. Cell. 2006;125(5):915-28.

267. Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, i sur. Smad7 Binds to Smurf2 to Form an E3 Ubiquitin Ligase that Targets the TGFβ Receptor for Degradation. Mol Cell. 2000;6(6):1365-75.

268. Hata A, Lagna G, Massagué J, Hemmati-Brivanlou A. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. Genes Dev. 1998;12(2):186-97.

269. Ng F, Boucher S, Koh S, Sastry KSR, Chase L, Lakshmipathy U, i sur. PDGF, TGF-β, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. Blood. 2008;112(2):295-307.

270. Ahdjoudj S, Kaabeche K, Holy X, Fromigue O, Modrowski D, Zerath E, i sur. Transforming growth factor-? inhibits CCAAT/enhancer-binding protein expression and PPAR? activity in unloaded bone marrow stromal cells. Exp Cell Res. 2005;303(1):138-47.

271. Abou-Ezzi G, Supakorndej T, Zhang J, Anthony B, Krambs J, Celik H, i sur. TGF-β Signaling Plays an Essential Role in the Lineage Specification of Mesenchymal Stem/Progenitor Cells in Fetal Bone Marrow. Stem Cell Rep. 2019;13(1):48-60.

272. Shapira KE, Hirschhorn T, Barzilay L, Smorodinsky NI, Henis YI, Ehrlich M. Dab2 inhibits the cholesterol-dependent activation of JNK by TGF-β. MBoC. 2014;25(10):1620-8.

273. Xu P, Liu J, Derynck R. Post-translational regulation of TGF-β receptor and Smad signaling. FEBS Letters. 2012;586(14):1871-84.

274. Luu W, Sharpe LJ, Gelissen IC, Brown AJ. The role of signalling in cellular cholesterol homeostasis: Signalling in Cholesterol Homeostasis. IUBMB Life. 2013;65(8):675-84.

275. Gabitova L, Gorin A, Astsaturov I. Molecular Pathways: Sterols and Receptor Signaling in Cancer. Clin Cancer Res. 2014;20(1):28-34.

276. Shapira KE, Ehrlich M, Henis YI. Cholesterol depletion enhances TGF-β Smad signaling by increasing c-Jun expression through a PKR-dependent mechanism. MBoC. 2018;29(20):2494-507.

277. Todorčević M, Hilton C, McNeil C, Christodoulides C, Hodson L, Karpe F, i sur. A cellular model for the investigation of depot specific human adipocyte biology. Adipocyte. 2017;6(1):40-55.

278. Mittal B. Subcutaneous adipose tissue & visceral adipose tissue. Indian J Med Res. 2019;149(5):571.

279. Armani A, Mammi C, Marzolla V, Calanchini M, Antelmi A, Rosano GMC, i sur. Cellular models for understanding adipogenesis, adipose dysfunction, and obesity. J Cell Biochem. 2010;110(3):564-72.

280. Liu L, Zhou M, Lang H, Zhou Y, Mi M. Dihydromyricetin enhances glucose uptake by inhibition of MEK/ERK pathway and consequent down-regulation of phosphorylation of PPARγ in 3T3-L1 cells. J Cell Mol Med. 2018;22(2):1247-1256.

11. Životopis

Opći podaci

Ime i prezime: Jelena Jakab
Datum i mjesto rođenja: 15.04.1991., Vinkovci
Adresa: Vinkovačka 15, Rokovci
Mobitel: 091 224 1502
E-mail: jelena.jakab@fdmz.hr

Obrazovanje

Medicinski fakultet Osijek (2009.-2015.)
Gimnazija Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci (2005.-2009.)
Osnovna škola Ivane Brlić Mažuranić Rokovci-Andrijaševci (1997.-2005.)

Radno iskustvo

Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo – asistent na Katedri za patofiziologiju, fiziologiju i imunologiju (od 2017.)

Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo – specijalizant kardiologije (od 2017.)

Medicinski fakultet Osijek – asistent na Katedri za internu medicinu, obiteljsku medicinu i povijest medicine (od 2016.)

Publikacije

Radovi objavljeni u časopisima koji se indeksiraju u Current Contentsu

Milić Vranješ I, Školka I, Jakab J, Krajina I, Krajina V, Šantić A, Zibar L. Sexual function in hemodialysis and post-renal transplant women in a relationship: a cross-sectional study. International Urology and Nephrology. 2022.

Milić Vranješ I, Podgornjak M, Milić J, Šijan I, Jakab J, Krajina I, Zibar L, Heffer M. The Croatian version of the Body Image Scale: translation and validation. Croatian Medical Journal. 2021;62(6):598-605.

Milić J, Škrlec I, Vranješ IM, Jakab J, Plužarić V, Heffer M. Importance of the Big-Five in the Future Medical Specialty Preference. BMC Medical Education. 2020;20:234.

Kuna L, Jakab J, Smolić R, Wu GY, Smolić M. HCV Extrahepatic Manifestations. Journal of Clinical and Translational Hepatology. 2019;7(2):172-82.

Radovi objavljeni u časopisima koji se indeksiraju u SCI i SCIE

Jakab J, Zjalić M, Mikšić Š, Tušek I, Ćosić V, Volarić N, Nakić D, Včev A, Miškić B. Effect of Metformin and Simvastatin in Inhibiting Proadipogenic Transcription Factors. Current Issues in Molcular Biology. 2021;43:2082-97.

Jakab J, Miškić B, Mikšić Š, Juranić B, Ćosić V, Schwarz D, Včev A. Adipogenesis as a Potential Anti-Obesity Target: A Review of Pharmacological Treatment and Natural Products. Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy. 2021;14:67-83.

Mikšić S, Uglešić B, Jakab J, Holik D, Milostić Srb A, Degmečić D. Positive Effect of Breastfeeding on Child Development, Anxiety, and Postpartum Depression. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2020;17(8). pii: E2725.

Milić Vranješ I, Jakab J, Ivandić M, Šijanović Š, Zibar L. Female sexual function of healthy women in Eastern Croatia. Acta Clinica Croatica. 2019;58(4):647-654.

Kuna L, Jakab J, Smolić R, Lučić NR, Včev A, Smolić M. Peptic Ulcer Disease: A Brief Review of Conventional Therapy and Herbal Treatment Options. Journal of Clinical Medicine. 2019;8(2):179.

Lučić NR, Jakab J, Smolić M, Milas AM, Kolarić TO, Ninčević V, Bojanić K, Kralik K, Miškulin M, Wu GY, Smolić R. Primary Care Provider Counseling Practices about Adverse Drug Reactions and Interactions in Croatia. Journal of Clinical Medicine. 2018;7(9):231.

Juranić B, Rakošec Z, Jakab J, Mikšić S, Vuletić S, Ivandić M, Blažević I. Prevalence, Habits and Personal Attitudes towards Smoking among Health Care Professionals. Journal of Occupational Medicine and Toxicology. 2017;12(20):1-8.

Radovi objavljeni u časopisima koji se indeksiraju u drugim međunarodnim indeksnim publikacijama

Jakab J, Pezerović D, Smolić M, Smolić R, Žulj M, Volarić N, Včev A. Implementation and Evaluation of Online Learning at the Faculty of Dental Medicine and Health, Osijek, Croatia – Project Report. Collegium Antropologicum. 2021;45(2):167-70.

Pelčić G, Glavina I, Jakab J. Ispitivanje kvalitete života u pacijenata s glaukomom. Liječnički vjesnik. 2017;139:32-7.

Jakab J, Žulj M, Volarić N, Tepeš B, Včev A. Hepatitis C Treatment: A Review and Update. Southeastern European Medical Journal. 2017;1(1):11-18.

Rakošec Z, Juranić B, Mikšić Š, Jakab J, Mikšić B. Otvorena komunikacija - temelj palijativnog pristupa. Media, culture and public relations. 2014; 1:98-103.

Članstvo i funkcije u znanstvenim i stručnim društvima

Hrvatsko društvo za personaliziranu (preciznu) medicinu – Član (od 2019.)
Hrvatski liječnički zbor – Član (od 2017.)
Hrvatska liječnička komora - Član (od 2016.)
Hrvatsko katoličko liječničko društvo – Član (od 2013.)