Uspostava modela adipogeneze na mišjim 3T3-L1 preadipocitima

Đumlija, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:152:799323

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ivona Đumlija

USPOSTAVA MODELA ADIPOGENEZE NA MIŠJIM 3T3-L1 PREADIPOCITIMA

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ivona Đumlija

USPOSTAVA MODELA ADIPOGENEZE NA MIŠJIM 3T3-L1 PREADIPOCITIMA

Diplomski rad

Osijek, 2019

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek
Mentor rada: Izv. prof. dr. sc. Martina Smolić
Rad ima 37 listova, 4 tablice i 11 slika.

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Martini Smolić na stručnoj pomoći i savjetima tijekom izrade diplomskog rada.

Posebno zahvaljujem asistentici Jeleni Jakab, dr. med., na izuzetnoj strpljivosti, podršci i pomoći tijekom istraživanja, jer bez nje ovaj rad ne bi bio ostvaren. Hvala i ostalim djelatnicima laboratorija za farmakologiju, koji su bili tu za svaku složeniju situaciju i svojim sugestijama pripomogli rješavanju problema.

Ovaj rad posvećujem svojoj obitelji i dečku koji su čitavo vrijeme bili uz mene. Zahvaljujem na podršci i potpori i vjeri u mene kada ja sama za to nisam bila sposobna.

Sadržaj

1. UVOD 1

1.1. MASNO TKIVO I ADIPOCITI 2

1.2. ADIPOKINI 2

1.3. ADIPOGENEZA 4

1.4. EPIDEMIOLOGIJA PRETILOSTI 5

1.5. DIJAGNOSTIKA PRETILOSTI 7

1.6. KOMORBITETI POVEZANI S PRETILOŠĆU 8

1.6.1. Inzulinska rezistencija 8

1.6.2. Šećerna bolest 9

1.6.3. Metabolički sindrom 9

1.6.4. Kardiovaskularne bolesti i hipertenzija 10

1.7. LIJEČENJE PRETILOSTI I BUDUĆNOST PREVENCIJE 11

2. CILJEVI 13

3. MATERIJALI I METODE 14

3.1. Ustroj studije 14

3.2. Materijali 14

3.3. Metode 14

3.3.1. Protokol za diferencijaciju preadipocita 15

3.4. Određivanje staničnog preživljenja 15

3.5. Histokemijsko određivanje lokalizacije lipida i triglicerida 16

3.6. Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa (tGSH) 16

3.7. Statistička analiza 17

4. REZULTATI 18

4.1. Stanično preživljenje 18

4.2. Trypan blue bojanje 21
4.3. Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa (tGSH) 21
4.4. Oil-Red-O bojanje 23
5. RASPRAVA 29
6. ZAKLJUČAK 32
7. SAŽETAK 33
8. SUMMARY 34
9. LITERATURA 34
10. ŽIVOTOPIS 40

POPIS KRATICA:

AMPK	Proteinska kinaza aktivirana AMP-om (eng. AMP-Activated Protein Kinase)
BMI	Indeks tjelesne mase (eng. body mass index)
cAMP	Ciklički adenozin monofosfat (eng. Cyclic Adenosine Monophosphate)
CEBP	CCAAT-vezujući protein (eng. CCAAT-Enhancer-Binding Protein)
DEX	Dexametazon (eng. Dexamethasone)
DMEM	Dulbeccov modificirani Eagle medij (engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DTNB	Ellmanov reagens - 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzojeva kiselina (engl. Dithionitrobenzoate)
FBS	Fetalni goveđi serum (engl. Fetal Bovine Serum)
FDA	Uprava za hranu i lijekove (eng. Food and Drug Administration)
FFA	Slobodne masne kiseline (eng. Free Fatty Acids)
GR	Glutation reduktaza
GSH	Reducirani glutation (engl. Glutathione)
GSSG	Oksidirani glutation (engl. Glutathione Disulfide)
IBMX	3-izobutil-1-metilksantin (eng. 3-isobutyl-1-methylxanthine)
IDF	International Diabetes Federation
IL-6	Interleukin 6
IR	Inzulinska rezistencija
KVB	Kardiovaskularne bolesti
MCE	Mitotička klonalna ekspanzija
MDI	Medij za indukciju adipogeneze
MS	Metabolički sindrom
MSC	Mezenhimalne matične stanice
MTT	3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NCEP-ATP III	National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III
ORO	Oil-Red-O
PAI-1	Inhibitor aktivacije plazminogena 1 (eng. Plasminogen Activator Inhibitor-1)
PBS	Fosfatom puferirana otopina soli (engl. Phosphate Buffered Saline)

PPAR	Peroksisom proliferator aktivirani receptor (eng. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor)
ROS	Reaktivna vrsta kisika (eng. Reactive Oxygen Species)
SREBP-1	Sterolni regulacijski element vezujući protein 1 (eng. Sterol Regulatory Element-Binding Transcription Factor 1)
STAT-3	Signalni transduktor i aktivator transkripcije 3 (eng. Signal Transducer and Activator of Transcription 3)
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
SŽS	Središnji živčani sustav
T2DM	Diabetes mellitus tip 2 (eng. Type 2 Diabetes Mellitus)
TG	Trigliceridi
tGSH	Ukupni glutation (engl. Total Glutathione)
TNB	5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina (engl. 5-thio-2-nitrobenzoic acid)
TNF	Faktor tumorske nekroze (eng. Tumor Necrosis Factor)

1. UVOD

Pretilost je kronična endokrinološka bolest karakterizirana prekomjernim nakupljanjem nepotrošene energije u masnim stanicama, što za posljedicu ima poremećaj njihove funkcije, povećanje tjelesne težine i razvoj patofizioloških procesa s nastankom brojnih komplikacija. Pretilost je rizični faktor za nastanak kroničnih nezaraznih bolesti, poput dijabetesa tipa 2, hipertenzije, kardiovaskularnih bolesti (KVB), inzulinske rezistencije (IR), metaboličkog sindroma (MS), pa čak i nekih vrsta malignih bolesti. Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) definirala je pretilost kao bolest u kojoj se višak masnog tkiva nakuplja u tolikoj mjeri da ugrožava zdravlje (1). Iz pretilosti proizlaze višestruke posljedice za osobu; estetske, metaboličke, kardiorespiratorne, psihičke i druge, a sve dovodi do konačne i najbitnije posljedice pretilosti, narušavanja kvalitete života. Na nastanak pretilosti mogu utjecati hormonalni i genetički faktori, ali važan je i utjecaj okoline, odnosno stil života s lošom prehranom, nedovoljnom tjelesnom aktivnošću i stresom. S obzirom da se tijekom zadnjih stotinjak godina genetska osnova nije značajnije mijenjala, nedvojbeno je da su ogromne ekonomske, socijalne i kulturalne promjene uzrokovale i promjene stila života, što pretilost čini bolešću modernog doba.

Zbog kronične energetske neravnoteže između potrošenih i nepotrošenih kalorija višak energije se pohranjuje u adipocitima u obliku triglicerida (TG), što je glavno obilježje pretilosti. Osim što su rezervoari energije, adipociti su identificirani kao aktivne endokrine stanice koje proizvode i izlučuju širok raspon proteina, nazvanih adipokini, od kojih su najvažniji leptin, adiponektin, resistin, interleukin 6 (IL-6) i faktor tumorske nekroze alfa (TNF-α) (2). Oni su uključeni u višestruke stanične procese vezane uz energetsku homeostazu, upalu i signalizacijski put inzulina. Stoga je važno razumjeti molekularne mehanizme nastanka i promjene masnog tkiva tijekom progresije pretilosti kako bi se ona mogla što uspješnije liječiti. Ključna značajka pretilosti, tj. povećana masa adipocitnog tkiva, ovisi o hipertrofiji već postojećih pojedinačnih masnih stanica (adipocita), odnosno hiperplaziji zbog stvaranja novih adipocita iz prekursorskih stanica (3). Hiperplazija, odnosno povećanje broja masnih stanica događa se u doba razvoja, intrauterinoj i novorođenačkoj dobi, tijekom prve tri godine života te u pubertetu. U ostalim razdobljima povećava se samo veličina stanica, odnosno dolazi do hipertrofije – povećanja veličine zrelih adipocita kao rezultat punjenja lipida u već postojeće masne stanice. Već stvoreni broj masnih stanica ne može smanjivati, pa je to jedan od razloga zašto pretile osobe teže dolaze do svoje normalne tjelesne težine (4).

1.1. MASNO TKIVO I ADIPOCITI

Potkožne naslage masnog tkiva nalaze se u dermisu kože i sudjeluju u oblikovanju površine tijela, a visceralno masno tkivo nalazi se u mezenteriju, oko bubrega i srca, gdje ima ulogu ublažavanja udaraca i potresanja organa. Dugo vremena se mislilo da je ono isključivo spremište TG koji služe kao izvor energije, no danas znamo da je ono vrlo aktivan metabolički organ te osim svojih energetskih zadaća, ima i endokrinu funkciju. Masno tkivo je aktivno uključeno u metaboličke procese poput angiogeneze, adipogeneze, imuniteta i hemostaze (2). Među staničnim komponentama u masnom tkivu možemo pronaći adipocite, preadipocite, fibroblaste, endotelne stanice i matične stanice koje se mogu diferencirati u različite tipove stanica. Sveukupno, masno tkivo se sastoji od otprilike jedne trećine zrelih adipocita. Preostale dvije trećine su kombinacija malih mezenhimalnih matičnih stanica (MSC), T regulatornih stanica, endotelnih prekursorskih stanica, makrofaga i preadipocita u različitim fazama razvoja. Preadipociti imaju sposobnost proliferacije i diferencijacije u zrele adipocite, dajući adipoznom tkivu stalnu funkcionalnu plastičnost, koja određuje njegovu sposobnost širenja kroz cijeli životni vijek (5, 6).

U strukturi adipocita 90% volumena zauzima lipidna kapljica, dok vrlo mali dio čine stanične organele. Okružen je trolaminarnim plazmatskim slojem, sadrži jezgru i obavijen je staničnom membranom. U citoplazmi su mitohondriji i ribosomi. Adipociti su grupirani u otočiće rastavljene vezivnim pregradama koje sadrže krvne i limfne žile te živčana vlakna. U adipocitima se TG kontinuirano sintetiziraju i istodobno mobiliziraju. Prilikom stvaranja viška energije, slobodne masne kiseline (FFA) se asimiliraju u lipidne kapljice bogate TG što rezultira povećanjem veličine masnih stanica. Broj masnih stanica je kontroliran ravnotežom između procesa apopotoze i nekroze te proliferacijom ovisnom o adipocitnoj diferencijaciji (7, 8).

1.2. ADIPOKINI

Masno tkivo je najveći endokrini organ u tijelu i generira višestruke signale koji reguliraju metabolizam u drugim tkivima. Ima izvrsnu komunikaciju sa središnjim živčanim sustavom i ostalim perifernim tkivima te luči hormone adipokine koji imaju važnu ulogu u održavanju homeostaze energije. Postoji više od 600 adipokina koji imaju širok raspon učinaka na organizam, što je posljedica komunikacije s ostalim organima uključujući mozak, srce i

krvne žile, gušteraču, jetru, skeletne mišiće, imunosni sustav, pa i samo masno tkivo. Adipokini sudjeluju u regulaciji metabolizma glukoze i lipida, energetske homeostaze, prehrambenog ponašanja, osjetljivosti na inzulin, upale, imunosti, adipogeneze, žilne funkcije i koagulacije. Disregulacija adipokina prisutna je u pretilosti, šećernoj bolesti tipa 2 te kardiovaskularnim bolestima. Adipokini se klasificiraju kao proupalni i protuulapni, s obzirom na njihov utjecaj na upalne procese u masnom tkivu, stoga je adipocit ključni metabolički regulator odgovoran za proizvodnju citokina, metaboličkih supstrata i adipokina s endokrinim, parakrinim i autokrinim učincima na metabolizam kako na lokalnoj tako i na sustavnoj razini (9). Iako su stanice masnog tkiva razbacane po cijelome tijelu, ono djeluje skladno kao jedan organ. Osim zrelih adipocita, adipokine luče i preadipociti, fibroblasti te makrofazi masnog tkiva. Lučenje adipokina pod utjecajem je hranjenja i stupnja uhranjenosti. Debljina dovodi do pojačanog lučenja proinflamatornih adipokina: TNF-α, IL-6, ASP, rezistina, leptina, angiotenzina, te do smanjenog lučenja adiponektina. Smanjenje tjelesne težine potiče lučenje adiponektina i leptina. Leptin i adiponektin poboljšavaju osjetljivost na učinke inzulina (10).

Leptin održava energetsku homeostazu organizma. Regulatornim mehanizmima dovodi do pojačane potrošnje energije i smanjenog unosa energije te se smatra metaboličkim signalom pohranjene energije. Lučenje inzulina nakon obroka glavni je poticaj lučenju leptina. U stanju gladovanja snižava se razina leptina u krvi i raste apetit, ali se i potrošnja energije smanjuje. Oštećenja leptinskog receptora u ljudi izazivaju neutaživu glad i krajnju pretilost. Nedostatak leptina odnosno njegova učinka tijelo tumači kao energetski minus i pokušava ga popraviti, ali bez obzira na količinu pojedene hrane i porast tjelesne težine izostaje povratno pojačano djelovanje leptina, a time i njegovi učinci u SŽS-u koji bi smanjili apetit i unos hrane te povećali potrošnju energije. Leptin također pospješuje oksidaciju masnih kiselina u tkivima smanjujući ektopično nakupljanje masti čime olakšava djelovanje inzulina. U mišićima leptin izravno aktivacijom adenozin monofosfat (AMP) kinaze pospješuje oksidaciju masnih kiselina, snižava sadržaj triglicerida u mišićnim stanicama te time povećava osjetljivost na inzulin (9, 10).

Adiponektin je glavni je hormon masnog tkiva s pozitivnim učincima na metabolizam. Poboljšava osjetljivost na inzulin u jetri i mišićima, snižava glikemiju, smanjuje količinu slobodnih masnih kiselina i inhibira lučenje TNF-α (9 – 11). Ublažava endotelni upalni odgovor inhibicijom ekspresije adhezijskih molekula na aortalnim endotelnim stanicama te supresijom proliferacije aortalnih glatkih mišićnih stanica, inhibira preadipocitnu diferencijaciju i time upravlja rastom masnog tkiva. Adiponektin poboljšava inzulinsku osjetljivost kroz oksidaciju masnih kiselina u jetri, smanjenje sinteze lipida, smanjenje preuzimanje FFA i suzbijanje glukoneogeneze. U masnim stanicama adiponektin pospješuje unos glukoze. Razina

adiponektina raste sa smanjenjem tjelesne težine, dok su snižene razine povezane s inzulinskom rezistencijom i hiperinzulinemijom, te kod osoba s dijagnozom diabetes mellitusa tipa 2 (T2DM).

1.3. ADIPOGENEZA

Masno tkivo obiluje prekursorima zrelih adipocita kao potencijanim rezervoarom za ponovno počinjanje procesa diferencijacije. Proliferacija preadipocita predstavlja početne korake prema adipogenezi i određivanju broja zrelih adipocita tijekom odrasle dobi. Iz preadipocita koji morfološki nalikuje fibroblastu, razvija se zreli adipocit, koji se prepoznaje po okruglom obliku i maloj masnoj kapljici. Taj proces naziva se adipogenezom i igra ključnu ulogu u širenju mase masnog tkiva (12 – 15). Diferencijacija adipocita karakterizirana je sekvencijalnim promjenama u ekspresiji specifičnih gena koji određuju specifični adipocitni fenotip stanica. Regulacija gena adipocita javlja se prvenstveno na transkripcijskoj razini i odražava se pojavom različitih ranih, intermedijarnih i kasnih mRNA / proteinskih markera i akumulacije triglicerida. Primarnim faktorima transkripcije koji posreduju u adipogenezi smatraju se peroksisomskim proliferatorom aktivirani receptor gama (PPAR-γ), CCAAT / pojačivač vezujući protein alfa (C / EBP-α) i sterolni regulacijski element vezujući protein 1 (SREBP-1) (16 – 18). Prva faza adipogeneze uključuje nakupljanje C/EBP-β i c/EBP-δ u prvih 24 sata, kada stanice ponovo ulaze u stanični ciklus i završavaju mitotičnu klonalnu fazu simultano. Nadalje, C/EBP-β i c/EBP-δ potiču ekspresiju PPAR-γ i C/EBP-α, transkripcijskih faktora, koji su ključni za diferencijaciju adipocita te oni mehanizmom povratne sprege induciraju vlastitu ekspresiju (19 – 21).

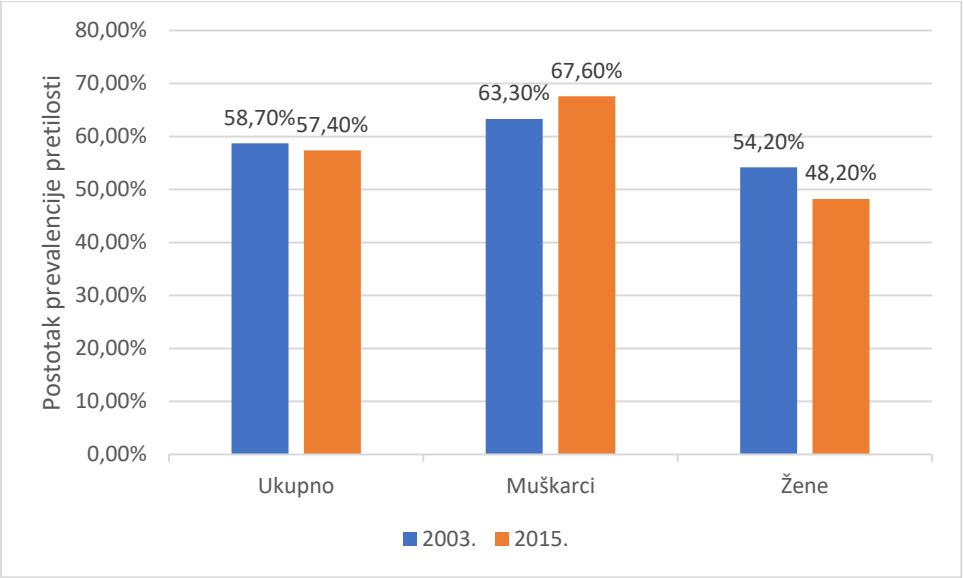
PPAR-γ receptor se nalazi u jezgrama masnih stanica i preko njega djeluju lijekovi koji pojačavaju osjetljivost na inzulin. Uglavnom je prisutan u masnom tkivu, debelom crijevu i makrofagima. PPAR-γ regulira skladištenje masnih kiselina i metabolizam glukoze. Geni koje aktivira PPAR-γ stimuliraju unos lipida i adipogenezu u masnim stanicama (22). PPAR-γ je sposoban promicati adipogenezu u stanicama s nedostatkom C / EBP-α. Međutim, C / EBP-α nije u stanju promicati adipogenezu u stanicama s nedostatkom PPAR-γ, pokazujući da je PPAR-γ glavni regulator adipogeneze (19). Iako su stanice koje imaju nedostatak C / EBP-α sposobne diferencirati se u adipocite, ova diferencijacija je neispravna po tome što akumuliraju manje lipida i ne induciraju ekspresiju PPAR-γ, pokazujući važnost unakrsne regulacije između C / EBP-α i PPAR-γ za održavanje stanja diferencijacije (23). C / EBP je obitelj transkipcijskih

faktora uključena u proliferaciju i diferencijaciju nekoliko tipova stanica, a ključnu ulogu ima u terminalnoj fazi diferencijaciji adipocita (19, 20). SREBP-1 kontrolira ekspresiju enzima i na taj način regulira lipogenezu i lipidnu homeostazu (19, 24).

Adipogeneza je opsežno proučavana pomoću in vitro modelnih sustava koji se sastoje od utvrđenih adipogenih staničnih linija (klonske linije 3T3-L1 i 3T3-F442A) ili primarne kulture prekursora adipocita i preadipocita (25, 26). Kontaktna inhibicija zaustavlja proliferaciju preadipocita u stanju pune konfluentnosti. U literaturi je opisano kako je zaustavljanje rasta preadipocita u G1 / S fazi staničnog ciklusa potrebno za indukciju diferencijacije adipocita, što je praćeno pojavom ranih markera adipogeneze (27). Preadipociti tretirani kombinacijom deksametazona (DEX), izobutilmetilksantina (IBMX) i inzulina počinju usvajati zaobljeni fenotip i unutar 5 – 8 dana počinju nakupljati lipide unutar stanice u obliku lipidnih kapljica (28). Unutar tri dana nakon izlaganja induktorima, stanice prolaze kroz dva kruga mitoze, nazvana mitotička klonska ekspanzija (MCE), koja su potrebna za diferencijaciju (29, 30). MCE je važan uvjet za terminalnu diferencijaciju, jer se tijekom te faze izražavaju različiti transkripcijski faktori i regulatori koji vode do ekspresije PPAR-γ i C / EBP-α. Inzulin povećava postotak stanica koje se diferenciraju, povećava količinu nakupljanja lipida u svakoj masnoj stanici, ima snažnu anti-apoptotičku aktivnost i stimulira stanice na pohranu glukoze u obliku TG-a. DEX aktivira transkripcijski faktor C / EBP-β. IBMX povisuje intracelularne koncentracije cAMP, što rezultira aktivacijom transkripcijskog faktora C / EBP-δ. DEX djeluje putem glukokortikoidnog signalnog puta, u konačnici aktivirajući C / EBP-β i C / EBP-γ.

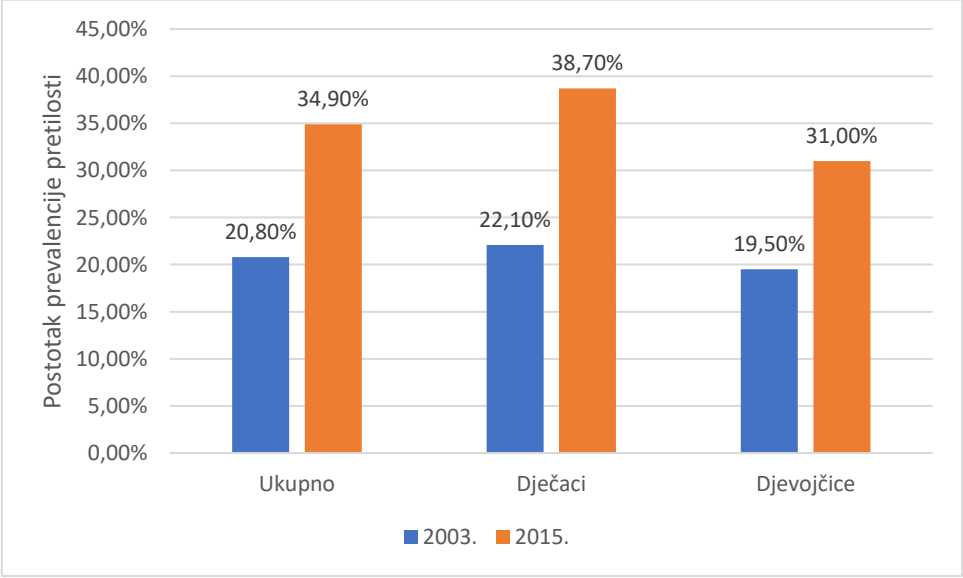
1.4. EPIDEMIOLOGIJA PRETILOSTI

Prema podatcima SZO, prevalencija debljine u svijetu gotovo se utrostručila od 1975. do 2016. godine. Više od 1,9 milijardi odraslih osoba ima prekomjernu tjelesnu masu, a prevalencija je gotovo jednaka kod muškaraca i žena, oko 40% (31). U Hrvatskoj 57,4% osoba starijih od 18 godina ima prekomjernu tjelesnu masu. Podjelom prema spolu, prekomjernu tjelesnu masu ima 67,6% muškaraca i 48,2% žena. Usporedbom podataka iz 2003. godine i onih iz 2015. godine vidljiv je zamjetan porast udjela muškaraca s prekomjernom tjelesnom masom, sa 63,3% u 2003. godini na 67,6% u 2015. godini te smanjen udio prekomjerne tjelesne mase i debljine u žena s 54,2% u 2003. godini na 48,2% u 2015. godini (31) (Slika 1).



Slika 1. Prevalencija pretilosti odrasle populacije u Republici Hrvatskoj, usporedba 2003. i 2015. god. (31)

Debljina ne predstavlja problem samo odraslom stanovništvu, već se javlja u sve ranijoj životnoj dobi. Zabrinjavajuće je da se u posljednjih 12 godina udio djece s prekomjernom tjelesnom masom povećao za 15%. Prema podatacima iz 2016. godine, 41 milijun djece mlađe od 5 godina ima prekomjernu tjelesnu masu (31). U Hrvatskoj prema posljednjim podacima u 2015. godini, 34,9% djece ima prekomjernu tjelesnu masu, što predstavlja veliki porast s obzirom na podatke iz 2003. godine, kada je taj postotak bio 20,8% (31) (Slika 2).



Slika 2. Prevalencija debljine u djece u dobi između 8 i 9 godina u RH, usporedba 2003. i 2015. god. (31)

1.5. DIJAGNOSTIKA PRETILOSTI

Pretilost je lako dijagnosticirati već pri prvom posjetu liječniku, kada se uz krojački metar i vagu mogu odrediti odstupanja od idealne tjelesne težine. Postoji nekoliko parametara koji se određuju za dijagnozu pretilosti. Najčešće korišteni je indeks tjelesne mase (eng. body mass indeks, BMI), kojim se procjenjuje uhranjenost, dok za procjenu nakupljanja abdominalne masti mjerimo opseg struka i omjer opsega struka i kukova.

BMI je samo okvirni pokazatelj debljine, jer je normalna tjelesna težina individualna te ovisi o brojnim faktorima kao što su dob, spol i konstitucija. Vrijednosti BMI-a dobijemo dijeljenjem tjelesne mase u kilogramima s kvadratom visine u metrima (BMI = tjelesna masa u kg / (visina u m)^2). Normalne vrijednosti BMI-a su od 18,5 do 24,9. Vrijednost između 25 i 30 po definiciji predstavlja prekomjernu tjelesnu težinu, a iznad 30 pretilost (Tablica 1) (1).

Tablica 1. Vrijednosti BMI-a po stupnju uhranjenosti

STUPANJ UHRANJENOSTI		**ITM**
Mršavost		‹ 18.5 kg/m²
Normalna tjelesna težina		18.5 – 24.9 kg/m²
Prekomjerna tjelesna težina		25 – 29.9 kg/m²
Debljina	1. stupanj	30 - 34.9 kg/m²
	2. stupanj	35,0 - 39,9 kg/m²
	3. stupanj	> 40,00 kg/m²

Opseg struka mjeri se u razini vrha zdjelične kosti. Rizičnim se smatra opseg struka veći od 94 cm kod muškaraca i 80 cm kod žena. Sukladno tome, opseg struka veći od 100 cm u muškaraca i 88 cm u žena znači abdominalnu debljinu i postaje rizik za pojavu kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa (1).

Omjer opsega struka s opsegom kukova pokazuje raspodjelu masnog tkiva te postaje rizikom srčanog oboljenja kada je odnos iznad 1 kod muškaraca i 0,8 kod žena. Prema ovom parametru možemo razlikovati muški ili abdominalni tip, gdje se masno tkivo nakuplja oko struka, odnosno ženski ili ginoidni tip, gdje je nakupljanje masnog tkiva u donjem dijelu trbuha, stražnjici i bedrima (1).

Debljinom kožnog nabora mjerimo postotak tjelesne masti, to jest udio ukupne masti koju sadrži ljudsko tijelo u odnosu na tjelesnu težinu. Odrasla osoba muškog spola prosječno sadrži 18%, a ženskog 22% masti te ovisi o prehrani, tjelesnoj aktivnosti, ali i životnoj dobi osobe. Postotak tjelesne masti važan je za kontrolu tjelesne težine jer je masno tkivo metabolički slabije aktivno od mišićnog tkiva pa troši puno manje kalorija, te s povećanjem postotka masnog tkiva dolazi do povećanog rizika za nastanak pretilosti. Na pretilost upućuje postotak tjelesne masti veći od 25% kod muškaraca i 30% kod žena (1).

1.6. KOMORBITETI POVEZANI S PRETILOŠĆU

Pretilost je strogo povezana s dubokim promjenama fizioloških funkcija, što dovodi do izmijenjene distribucije masnog tkiva. To može ozbiljno ugroziti srčane i dišne funkcije, zbog nakupljanja masnoće oko srca i prsnog koša. Štoviše, povećanje odlaganja intraabdominalne visceralne masti korelira s rezistencijom na inzulin, T2DM, dislipidemijom i hipertenzijom (1).

1.6.1. Inzulinska rezistencija

Inzulinska rezistencija je stanje u kojem je očekivani odgovor tkiva na inzulin manji i za posljedicu ima hiperglikemiju i sekundarno povišeno lučenje inzulina. Očituje se smanjenim inzulinom stimuliranim transportom i metabolizmom glukoze u adipocitima i skeletnim mišićima te smanjenom supresijom otpuštanja glukoze iz jetre. IR se smatra “kompenziranim predstadijem” T2DM i postane klinički vidljiva kada gušterača više ne može djelovati zbog smanjene sposobnosti lučenja inzulina (10, 11). Uglavnom se razvija kod visceralno pretilih osoba, onih sa slabom tolerancijom glukoze, hipertenzijom i dislipidemijom, a najviše je izražena u skeletnim mišićima, visceralnom masnom tkivu i jetri. Kad se inzulin normalno stvara, ali ne djeluje zbog rezistencije, podražaj za njegovo izlučivanje je stalan jer se ne zbiva ništa što bi po mehanizmu negativne povratne veze smanjilo njegovo izlučivanje te se on nagomilava u krvi. Osnovni molekularni poremećaj u inzulinskoj reistenciji i lučenju inzulina rezultat je kombinacije genetičkih čimbenika i čimbenika okoline, od kojih su najvažniji smanjena tjelesna aktivnost i povećanje tjelesne mase (10, 32). Debljina izaziva inzulinsku rezistenciju preko pojačane simpatikotonije koja potiče lipolizu u masnome tkivu (33). Posljedica je porast koncentracije FFA u cirkulaciji i nakupljanje masnih kiselina i TG u tkivima osjetljivim na inzulin - jetri i mišićima. Istodobno se iz masnog tkiva pretilih osoba pojačano

luče proupalni adipokini, što izravno ili neizravno koči djelovanje inzulina. FFA djelovanjem na β-stanice gušterače uzrokuju promjene u signalnom putu za lučenje inzulina što povećava koncentraciju glukoze u krvi. Istodobno, propadanjem β-stanica smanjeno je lučenje inzulina, što za posljedicu ima hiperglikemiju i dovodi do razvoja T2DM.

1.6.2. Šećerna bolest

Šećerna bolest je metabolička bolest nastala zbog apsolutnog ili relativnog manjka inzulina, koju karakterizira poremećaj metabolizma ugljikohidrata, masti i bjelančevina. Spada u jedan od 10 vodećih uzroka smrti i važan rizični čimbenik u nastanku KVB te oštećenja mnogih drugih vitalnih organa i jedan je glavnih uzroka oneosposobljenosti i invaliditeta zbog posljedica i komplikacija koje izaziva. Zabilježen je ogroman porast prevalencije šećerne bolesti u cijelom svijetu. Registrirano je oko 190 milijuna osoba sa šećernom bolešću, i procjene SZO-a i International Diabetes Foundation (IDF) kažu kako će se taj broj povećati i do 300 milijuna do 2025. godine (34). Procjenjuje se da je u Hrvatskoj broj oboljelih od šećerne bolesti oko 170 tisuća (34). Višak visceralnog masnog tkiva otpušta povećane količine TNF-α i time pokreće lučenje slobodnih masnih kiselina iz masnog tkiva u krvotok i dovodi do smanjenog preuzimanja glukoze u mišićima, povećane sinteze TG te povećane glukoneogeneze u jetri. Važna osobina šećerne bolesti je oštećenje vitalnih organa, uključujući retinu, bubreg, velike krvne žile te periferne živce.

1.6.3. Metabolički sindrom

Najčešće se uz debljinu povezuje pojam metaboličkog sindrom (MS), skupine metaboličkih poremećaja kao što su IR, abdominalna pretilost, visoka razina kolesterola te povišen krvni tlak. Ono što možemo izdvojiti kao dva glavna faktora rizika za razvoj MS-a su povećana količina masnog tkiva u području abdomena i rezistencija stanica perifernih tkiva na djelovanje inzulina (35, 36). Komplikacije koje nastaju kao posljedica MS-a uvelike smanjuju kvalitetu života i životni vijek bolesnika. Prema trećem izvješću Panela za liječenje odraslih Nacionalnog programa edukacije o kolesterolu (engl. National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III , NCEP-ATP III), šest je faktora rizika koji su i sami sastavni dijelovi ovog sindroma: 1. abdominalna pretilost, 2. aterogena dislipidemija, 3.

povišeni arterijski tlak, 4. IR s ili bez intolerancije glukoze, 5. protuupalno stanje i 6. protrombotsko stanje (Tablica 2) (35).

Tablica 2. Kriteriji za definiranje metaboličkog sindroma (35)

	WHO	**ATP-III**	**IDF**
Visceralna pretilost	Omjer struk/bokovi > 0,9 (M) 0.85 (Ž) i ITM > 30 kg/m^2	Opseg struka >102 cm (M) > 88 cm (Ž)	Ovisi o etnicitetu Europljani: opseg struka > 94 cm (M) >80 cm (Ž)
Krvni tlak (mmHg)	>140/90	>130/85 *prisutna terapija za hipertenziju	>130/85 *prisutna terapija za hipertenziju
Dislipidemija (mmol/L)	TG > 1,7 HDL <0,9 (M) <1,0 (Ž)	TG > 1,7 HDL < 1,0 (M) <1,3 (Ž)	TG > 1,7 HDL < 1,03 (M) < 1,29 (Ž) *prisutna terapija za dislipidemiju
Disglikemija (mmol/L)	Glukoza natašte > 6,1 i/ili >7,8 nakon OGTT	Glukoza natašte > 6,1	Glukoza natašte > 5,6 *dijagnosticiran dijabetes
Inzulinska rezistencija	Unos glukoze u najnižem kvartilu populacije prilikom HIEGC		
Drugi faktori	Mikroalbuminurija		

1.6.4. Kardiovaskularne bolesti i hipertenzija

Prema podacima iz literature, dvije trećine pacijenata s KVB je pretilo (1). Kronično opterećenje organizma povećanom masom tijela može dovesti do dilatacije i hipertrofije lijeve

klijetke i kongestivnog zatajenja srca. Pretilost uzrokuje KVB procesima upale, disfunkcije endotela i ateroskleroze, koji mogu dovesti do slabljenja srčane funkcije.

Zabilježen je podatak kako je hipertenzija 6 puta češća u pretilih osoba (1). Budući da inzulin potiče vazodilataciju, povećava apsorpciju natrija u bubregu, kao i aktivnost simpatičkog živčanog sustava, razvitak IR izaziva poremećaje tih učinaka. Povećana napetost krvnih žila i volumen krvi u krvnim žilama uzrok su arterijske hipertenzije. Hiperinzulinemija dovodi do pojačane aktivacije simpatičkog živčanog sustava i to pridonosi porastu arterijskog tlaka. Isto tako, povećana koncentracija slobodnih masnih kiselina u krvi djeluje vazokonstrikcijski na krvne žile i time dodatno povećava arterijski krvni tlak.

1.6.5. Karcinomi

Karcinomi ovisni o hormonima, kao što su karcinom dojke i jajnika u postmenopauzi, češći su kod pojedinaca s visokim indeksom tjelesne mase i masti, budući da se razine adipokina s proupalnim djelovanjem povećavaju u pretilosti (1, 11). Povezanost pretilosti i raka također je pokazana *in vitro* činjenicom da su glukoza i masne kiseline modulirale faktor rasta i sekreciju citokina adipocita, što je zauzvrat izazvalo proliferaciju stanica raka (1, 11).

1.7. LIJEČENJE PRETILOSTI I BUDUĆNOST PREVENCIJE

Osnovni cilj liječenja pretilosti je sniženje i trajno očuvanje niže tjelesna težina. Uz promjene životnog stila i prehrambenih navika, ponekad se koristi i farmakoterapija. U Hrvatskoj je odobren samo jedan lijek za liječenje debljine, orlistat. Lijek djeluje lokalno u tankom crijevu, gdje blokira djelovanje enzima crijevne lipaze koja sudjeluju u procesu apsorpcije masti iz crijeva u krv. Međutim, lijekovi nemaju fiziološke specifičnosti i imaju nuspojave, kao što su oštećenja srčanih zalistaka, srčani i moždani udar, psihijatrijski štetni učinci te oštećenje jetre (37 – 39).

Nedavna su istraživanja usredotočena na otkrivanje prirodnih proizvoda za liječenje pretilosti. Spojevi izolirani iz životinja, biljaka, odnosno, gljiva i morskih plodova pokazali su obećavajuća svojstva. Prirodni spojevi predstavljaju bogat izvor novih korisnih spojeva s velikim utjecajem na razvoj lijekova za infektivne, neurološke, kardiovaskularne, imunološke, upalne i onkološke bolesti ljudi (37). Trenutno se intenzivno istražuju cijanobakterije, poznate

kao plavo-zelene alge i proizvođači cijanotoksina zbog njihove sposobnosti proizvodnje sekundarnih metabolita s neobičnim strukturama i snažnim aktivnostima protiv raka i drugih bolesti; cijanobakterije su stoga izvor za otkrivanje potencijalnih lijekova i protiv pretilosti.

Bolesnici kod kojih navedene metode ne daju željene rezultate, odnosno nije se postigao ITM < 40 kg/m2 ugroženi su komplikacijama debljine, te se razmatra kirurško liječenje, tj. barijatrijske operacije želuca kojima se postiže učinkovito smanjenje tjelesne težine.

Unatoč sve većoj potrebi, još uvijek nema sigurnog i učinkovitog lijeka protiv pretilosti, što naglašava potrebu za njenim ranim prepoznavanjem, razumijevanjem metaboličkih i patofizioloških procesa u podlozi, te uspješnom prevencijom (38, 40).

2. CILJEVI

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. odrediti koncentraciju stanica pri kojoj je diferencijacija preadipocita najučinkovitija
2. odrediti učinak različitih koncentracija lijekova za indukciju adipogeneze na učinkovitost diferencijacije preadipocita
3. odrediti vremenski period potreban za maksimalnu diferencijaciju preadipocita u zrele adipocite

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ustroj studije

Studija je napravljena u obliku randomiziranog kontroliranog pokusa.

3.2. Materijali

Korištena je 3T3-L1 stanična linija (dobavljena iz Elabscience), izvorno razvijena pomoću klonske ekspanzije iz mišjih embrionalnih stanica. 3T3-L1 stanice imaju morfologiju sličnu fibroblastima, i pod odgovarajućim uvjetima stanice se diferenciraju u adipocitni fenotip (25,26,40). Od kemikalija se koristio 3-izobutil-1-metilksantin (IBMX) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD); deksametazon (DEX) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD); inzulin iz goveđe gušterače (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD), boja *Trypan Blue* (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD), i Oil red O boja (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD).

3.3. Metode

Uzgoj je započeo odmrzavanjem stanica koje su se čuvale zamrznute na –80 °C u tekućem dušiku. Stanice su bile uzgajane u DMEM-u uz dodatak 10 %-tnog fetalnog goveđeg seruma (engl. Fetal bovine serum, FBS) (Gibco, SAD), 1 %-tne otopine antibiotika/antimikotika (penicilin i streptomicin) (Thermo Fisher Scientific INC, Waltham, MA) te 2 mM L-glutamina (Gibco, SAD); u inkubatoru na 37 °C, 5 % CO2. Sav rad sa stanicama odvijao se u digestoru klase II za rad sa staničnim kulturama, u sterilnim uvjetima. Stanice su bile podijeljene u dvije skupine s obzirom na početak izvođenja eksperimenata – jedna skupina stanica uzgajana je do subkonfluentnosti (70%), dok je druga uzgajana do pune konfluentnosti. Obje skupine stanica inducirane su na diferencijaciju s tri različite kombinacije koncentracija lijekova 3-izobutil-1-metilksantina (IBMX), deksametazona (DEX) i inzulina te se učinkovitost diferencijacije pratila nakon 3, 6, 9 i 12 dana od indukcije adipogeneze. Randomizacija je bila učinjena blok dizajnom te su svi eksperimenti bili ponovljeni tri puta.

3.3.1. Protokol za diferencijaciju preadipocita

Nakon što su stanice dosegle potrebnu konfluentnost, izložene su različitim koncentracijama IBMX, DEX i inzulina u mediju za indukciju adipogeneze 1 (MDI 1), prikazano u tablici 3, prema ranije opisanom protokolu (28).

Tablica 3. Koncentracije lijekova za indukciju adipogeneze

	Koncentracija 1	Koncentracija 2	Koncentracija 3
Inzulin	1 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml
DEX	0,25 µM	0,25 µM	1 µM
IBMX	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM

Nakon trećeg dana, stanicama je dodan medij za indukciju adipogeneze II (MDI II), koji je sadržavao samo inzulin u koncentracijama prema tablici 3. Nakon šestog dana, stanicama je ponovno dodan medij bez dodatka lijekova za indukciju adipogeneze. Medij se mijenjao svaka dva dana, do 12-og dana kada su se izvršili zadnji eksperimenti.

3.4. Određivanje staničnog preživljenja

Preživljenje stanica odredilo se ekskluzijskim testom Trypan Blue bojom u suspenziji pomoću hemocitometra. Stanice su uzgajane u pločicama s 24 jažice te je 3., 6., 9. i 12. dan sadržaj svake jažice tripsiniziran i prebačen s medijem u Eppendorf tubice. Po 20 µL sadržaja svake tubice pomiješao se s 20 µL Trypan blue boje. Sadržaj svake tubice smo prenijeli u Neubauerov hemocitometar i prebrojili žive stanice pod svjetlosnim mikroskopom pod srednjim povećanjem. Žive stanice imaju netaknutu staničnu membranu kroz koju Trypan blue boja ne može proći, dok kod mrtvih stanica boja može prodrijeti. Svi rezultati izraženi su u odnosu na kontrolnu skupinu koja je bila uzgajana isključivo u DMEM-u (41,42).

Za MTT analizu stanice su uzgajane u pločicama s 96 jažica, te je očitanje učinjeno 3., 6., 9. i 12. dan. Metabolički su aktivne stanice reducirale žuti tetrazolium MTT, što je rezultiralo nastankom intracelularnog ljubičastog formazana koji se otopio i čija je apsorbancija evaluirana mjerenjem valne duljine spektrofotometrom na čitaču mikrotitarskih pločica pri valnoj duljini

od 595 nm. Analiza je učinjena u mračnoj prostoriji s obzirom na to da je MTT reagens osjetljiv na svjetlo. Svi rezultati izraženi su u odnosu na kontrolnu skupinu koja je bila uzgajana isključivo u DMEM-u.

3.5. Histokemijsko određivanje lokalizacije lipida i triglicerida

Diferencijacija se vizualno pratila histokemijskim Oil-Red-O (ORO) bojanjem stanica uzgajanim u pločicama sa 6 jažica svjetlosnom mikroskopijom (28). ORO boja jest liposolubilna diazo boja koja je u modelu mišjih preadipocita iskorištena za vizualizaciju nakupljenih masnih kapljica unutar adipocita nakon indukcije adipogeneze. Dobivene promjene zabilježene su EVOSTM FL Color, potpunim integriranim, digitalnim, invertnim mikroskopom koji kombinira preciznu optiku, LCD zaslon visoke razlučivosti od 15 inča i visoku osjetljivu Sony ICX285AQ CCC kameru (rezolucija od 1360 x 1024 piksela), s uvećanjem 4x i 20x.

3.6. Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa (tGSH)

Koncentracija ukupnog glutationa (tGSH) mjerila se spektrofotometrijski pomoću komercijalno dostupnog kita prema protokolu proizvođača. Vezujući na sebe štetne spojeve, glutation (GSH, γ-glutamil-cistenil-glicin), tiolni tripeptid kao jedan od najpoznatijih te ujedno i najvažnijih neenzimskih antioksidansa, smanjuje njihovu biološku aktivnost. Ulogu ima u nizu fizioloških procesa kao što su transport aminokiselina, proliferacija stanica, aktivacija enzima. Glutation je prisutan u dvama oblicima: reduciranom (GSH) i oksidiranom (GSSG). Iz njihovog omjera moguće je dobiti podatke o oksidacijskom stanju stanice (43). Reducirani glutation (GSH) glavni je slobodni tiol u većini stanica živih bića i uključen je u mnoge biološke procese (detoksikacija ksenobiotika i uklanjanje hidroperoksida). Glutation je prisutan unutar stanica uglavnom u reduciranom obliku (90 – 95 % ukupnog glutationa). Oksidacija glutationa dovodi do stvaranja glutation disulfida (GSSG). U većini je stanica omjer GSH-a prema GSSG-u veći od 500. Princip metode zasnovan je na kinetičkoj metodi, tj. mjerenju kontinuirane redukcije 5, 5'-ditiobis (2-nitrobenzojeva kiselina) (DTNB) katalitičkim količinama GSH-a, pri čemu nastaje žuto obojeni produkt 5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina (TNB) i GSSG (glutation disulfida). Mjerenje je odrađeno prema Sigma Aldrich protokolu (Glutathione Assay Kit, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, SAD). Porast apsorbancije mjerio se pri valnoj duljini od 412 nm pomoću čitača miktotitarskih pločica (iMarkTM Microplate Apsorbance Reader), a događa

se zbog nastajanja TNB-a. Nastali TNB i GSSG recikliraju se u enzimskoj reakciji kataliziranoj glutation-reduktazom (GR) uz NADPH kao donora elektrona.

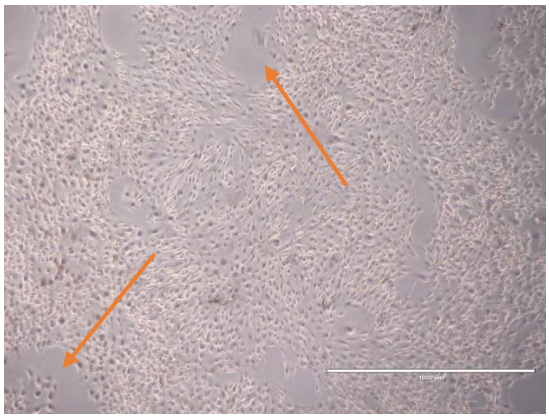
Unutarstanični GSH status osjetljiv je pokazatelj ukupnog zdravlja stanice i njegove sposobnosti da se odupre toksičnom izazovu (43, 44). Adipogeneza je proces koji predstavlja određeni stres kod stanica (45, 46). Za ovaj eksperiment stanice su nasađene u pločicama sa šest jažica u te su mjerenja izvršeni 3., 6., 9., i 12. dan. Svi rezultati su izraženi u odnosu na kontrolnu skupinu koja je uzgajana isključivo u DMEM-u.

3.7. Statistička analiza

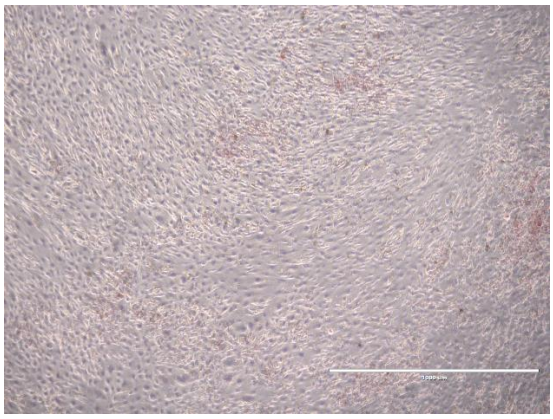
Numerički podaci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom. Razlike između dvije nezavisne skupine normalno raspodijeljenih numeričkih podataka testirane su T-testom. Statistička analiza obavljena je programom Statistica 10.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA), uz odabranu razinu značajnosti od $\alpha = 0.05$.

4. REZULTATI

Stanice su uzgajane do subkonfluentnosti (70%) kao što je opisano u odjeljku Materijali i metode te je inducirana diferencijacija s tri različite kombinacije koncentracija lijekova 3-izobutil-1-metilksantina (IBMX), deksametazona (DEX) i inzulina te se učinkovitost diferencijacije pratila nakon 3, 6, 9 i 12 dana od indukcije adipogeneze kao što je opisano u Materijalima i metodama. U skupini stanica kojima je indukcija započeta u subkonfluentoj fazi, primjećeno je kako se stvaraju „praznine“ uslijed uvijanja stanica (eng. curl up), dok u skupini stanica kojima je indukcija započeta u konfluentnoj fazi stanice rastu jednoliko bez uvijanja (Slika 3).



Mikrofotografija 3a

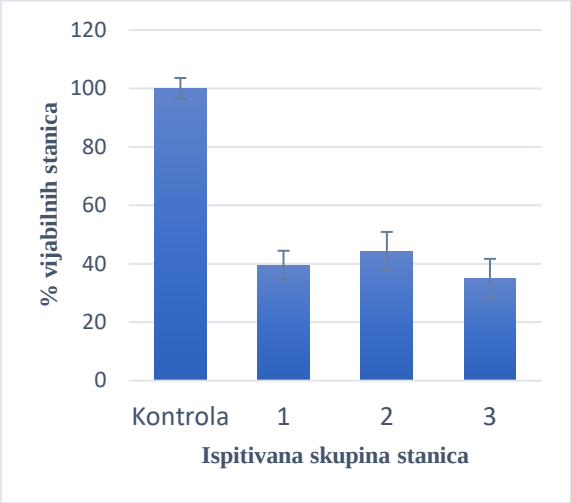


Mikrofotografija 3b

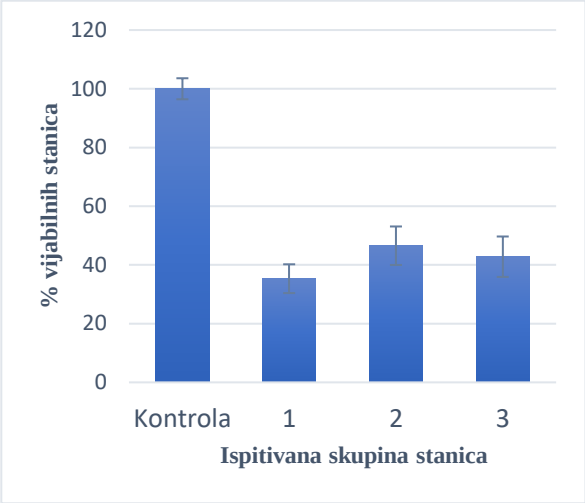
Slika 3. Mikrofotografski prikaz stanica nakon indukcije adipogeneze: subkonfluente stanice, indukcijom adipogeneze stvaraju „praznine“ uslijed uvijanja stanica, označene strelicom (Mikrofotografija 3a), konfluentne stanice (Mikrofotografija 3b); zabilježeno invertnim mikroskopom EVOS^{TM} FL Color pri uvećanju 4x

4.1. Stanično preživljenje izmjereno MTT analizom

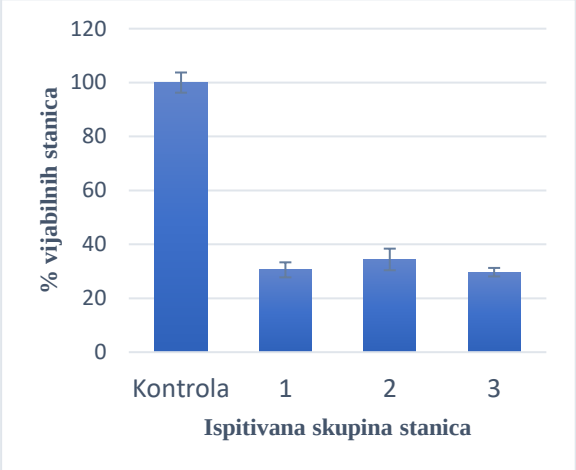
Određivanje staničnog preživljenja brojanjem stanica i MTT analizom rađeno je 3., 6., 9. i 12. dana na obje skupine stanica, konfluentnim i subkonfluentnim, te su rezultati izraženi kao postotak obzirom na kontrolnu skupinu netretiranih stanica, prikazano na slikama 4. i 5.



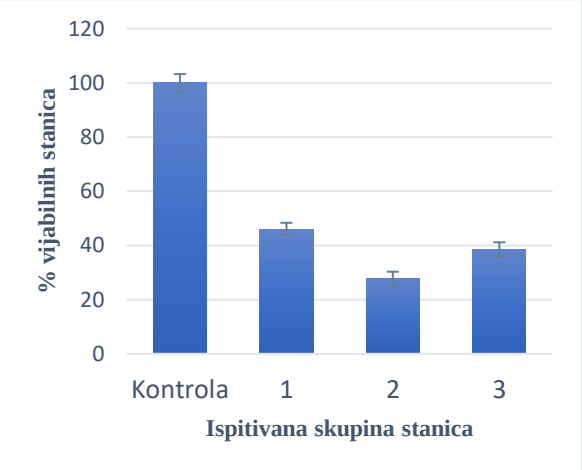
Slika 4a



Slika 4b



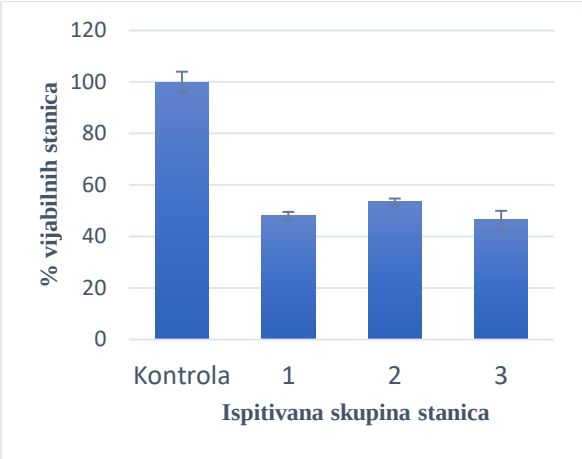
Slika 4c



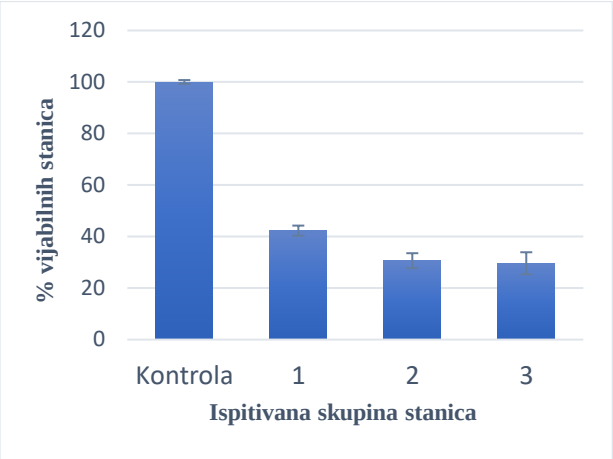
Slika 4d

Slika 4. Stupčasti prikaz rezultata MTT analize na skupini konfluentnih stanica treći dan (Slika 4a), šesti dan (slika 4b), deveti dan (Slika 4c) i dvanaesti dan (Slika 4d) nakon indukcije adipogeneze, prikazano postotkom u odnosu na kontrolnu skupinu.

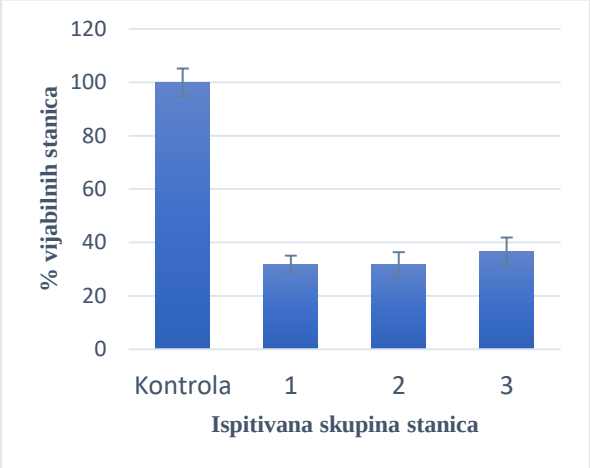
Kontrola – nediferencirane stanice; 1 - Inz 1 µg/ml +DEX 0,25 µM+ IBMX 0,5 mM; 2 - Inz 5 µg/ml + DEX 0,25 µM + IBMX 0,5 mM; 3 - Inz 10 µg/ml + DEX 1 µM + IBMX 0,5 mM



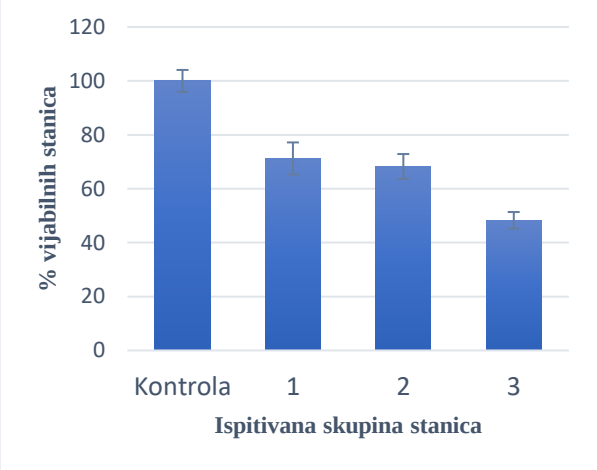
Slika 5a



Slika 5b



Slika 5c



Slika 5d

Slika 5. Stupčasti prikaz rezultata MTT analize na skupini subkonfluentnih stanica treći dan (Slika 5a), šesti dan (slika 5b), deveti dan (Slika 5c) i dvanaesti dan (Slika 5d) nakon indukcije adipogeneze, prikazano postotkom u odnosu na kontrolnu skupinu.

Kontrola – nediferencirane stanice; 1 - Inz 1 µg/ml +DEX 0,25 µM+ IBMX 0,5 mM; 2 - Inz 5 µg/ml + DEX 0,25 µM + IBMX 0,5 mM; 3 - Inz 10 µg/ml + DEX 1 µM + IBMX 0,5 mM

4.2. Stanično preživjenje određeno Trypan blue bojanjem

Stanice iz obje skupine ispitivanih staničnih kultura izbrojane su hemocitometrom uz Trypan Blue bojanje 3., 6., 9. i 12. dan te prikazane kao postotak u odnosu broj nediferenciranih stanica, prikazano u tablici 4.

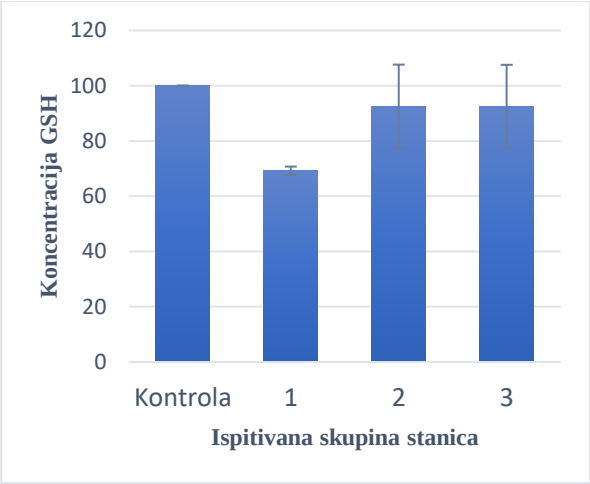
Tablica 4. Postotak stanica izbrojanih hemocitometrom u odnosu na kontrolu

	KONFLUENTNE				**SUBKONFLUENTNE**			
	Kontrola	**1**	**2**	**3**	**Kontrola**	**1**	**2**	**3**
3. dan	100%	60,07%	64,84%	46,15 %	100%	61,35%	71,50 %	61,35 %
6. dan	100%	36,76%	60,54%	45,41 %	100%	41,88%	37,70 %	42,93 %
9. dan	100%	27,39%	25,65%	30,00 %	100%	19,76%	33,87 %	25,81 %
12. dan	100%	31,89%	26,38%	29,13 %	100%	41,44%	26,62 %	30,80 %

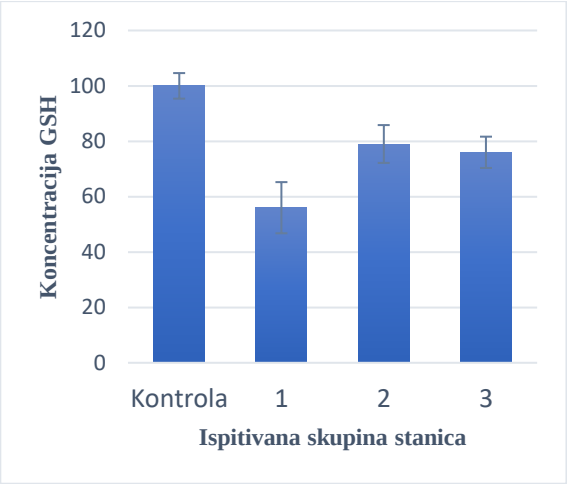
Kontrola – nediferencirane stanice; 1 - Inz 1 µg/ml +DEX 0,25 µM+ IBMX 0,5 mM; 2 - Inz 5 µg/ml + DEX 0,25 µM + IBMX 0,5 mM; 3 - Inz 10 µg/ml + DEX 1 µM + IBMX 0,5 mM

4.3. Koncentracije ukupnog glutationa (tGSH)

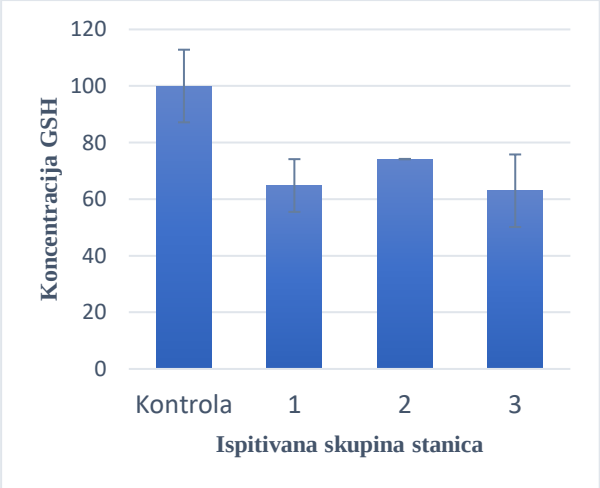
Koncentracije ukupnog glutationa izmjerene su u obje skupine stanica 3., 6., 9. i 12. dan te je koncentracija izražena kao postotak u odnosu na kontrolu, prikazano na slikama 6 i 7.



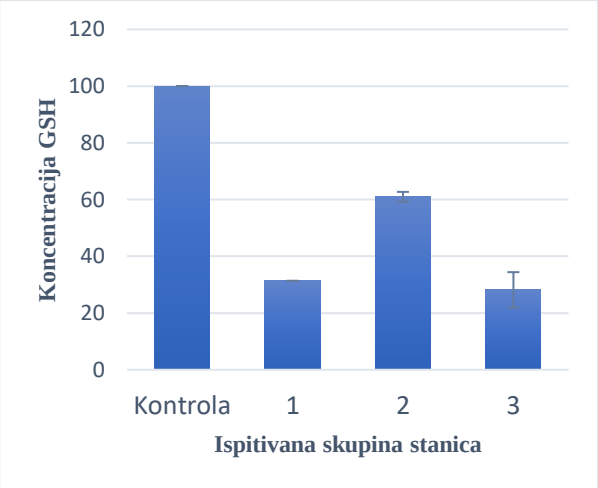
Slika 6a



Slika 6b



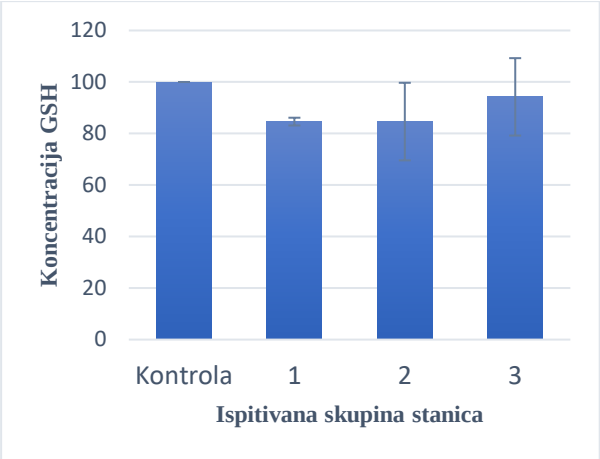
Slika 6c



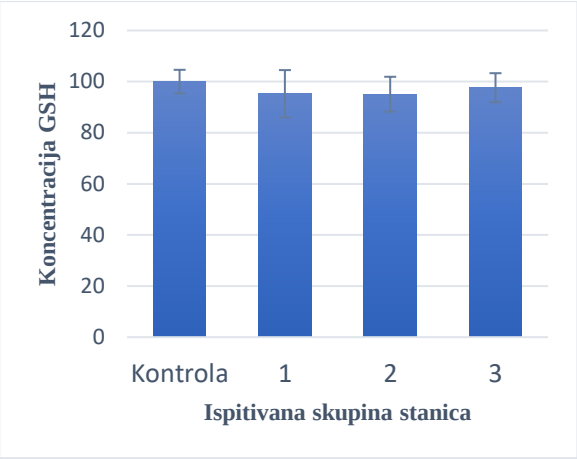
Slika 6d

Slika 6. Stupčasti prikaz koncentracija ukupnog glutationa u skupini konfluentnih stanica treći dan (Slika 6a), šesti dan (slika 6b), deveti dan (Slika 6c) i dvanaesti dan (Slika 6d) nakon indukcije adipogeneze, prikazano postotkom u odnosu na kontrolnu skupinu.

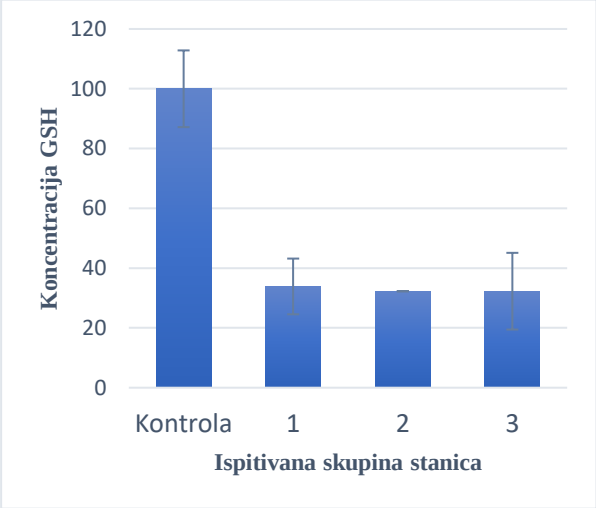
Kontrola – nediferencirane stanice; 1 - Inz 1 µg/ml +DEX 0,25 µM+ IBMX 0,5 mM; 2 - Inz 5 µg/ml + DEX 0,25 µM + IBMX 0,5 mM; 3 - Inz 10 µg/ml + DEX 1 µM + IBMX 0,5 mM



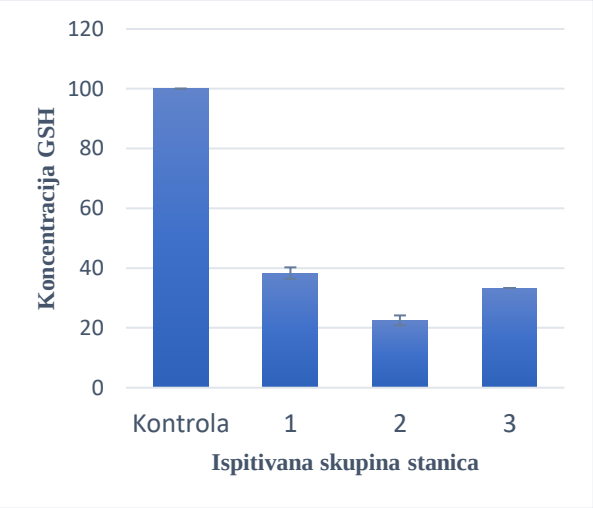
Slika 7a



Slika 7b



Slika 7c



Slika 7d

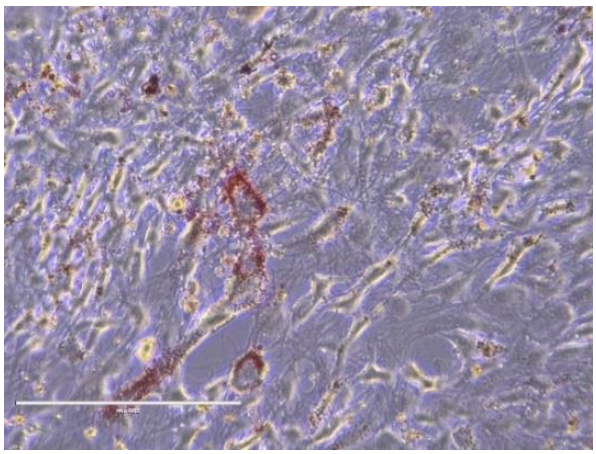
Slika 7. Stupčasti prikaz koncentracija ukupnog glutationa u skupini subkonfluentnih stanica treći dan (Slika 7a), šesti dan (slika 7b), deveti dan (Slika 7c) i dvanaesti dan (Slika 7d) nakon indukcije adipogeneze, prikazano postotkom u odnosu na kontrolnu skupinu.
Kontrola – nediferencirane stanice; 1 - Inz 1 µg/ml +DEX 0,25 µM+ IBMX 0,5 mM; 2 - Inz 5 µg/ml + DEX 0,25 µM + IBMX 0,5 mM; 3 - Inz 10 µg/ml + DEX 1 µM + IBMX 0,5 mM

4.4. Lokalizacija nakupljenih lipida histokemijskim Oil-Red-O bojanjem

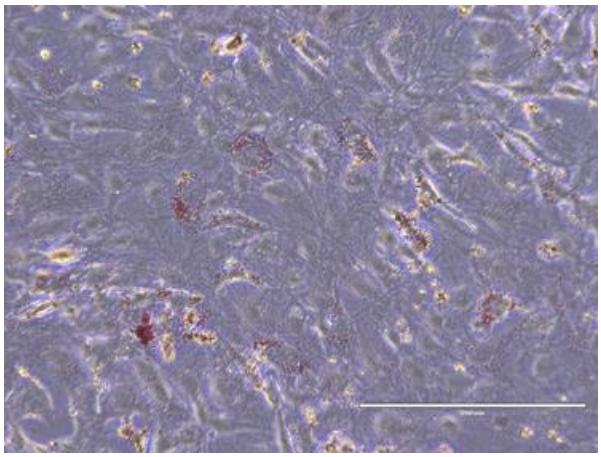
Tijekom procesa adipogeneze došlo je do značajne promjene u morfologiji stanica: diferencirane stanice su veće i izgledaju više zaokruženo od onih u kontrolnoj skupini, osobito

u dužim periodima nakon indukcije diferencijacije. Osim promjene u obliku, uočeno je da su diferencirane stanice, za razliku od kontrolne skupine, akumulirale lipidne kapljice u njihovoj citoplazmi, što je bilo vizualizirano bojanjem s Oil-Red-O bojom, koja je obojila lipide akumulirane crvenom bojom. Bojenje je bilo vrlo slabo u tri dana diferencijacije, ali broj obojenih kapi i njihova veličina povećali su se na kasnija vremena diferencijacije (6., 9. i 12. dan adipogeneze). Tijekom diferencijacije preadipociti su stekli karakteristike zrelih adipocita. Tri dana nakon indukcije, nediferencirane stanice pokazale su tipičnu morfologiju fibroblasta, dok su na kraju procesa diferencijacije stanice imale obilnu intracitoplazmatsku akumulaciju lipida, pokazujući tipičnu morfologiju adipocita. Također, iz slika možemo vidjeti da različite koncentracije ispitivanih lijekova nisu pokazale različite rezultate, uspoređujući tri tretirane skupine stanica.

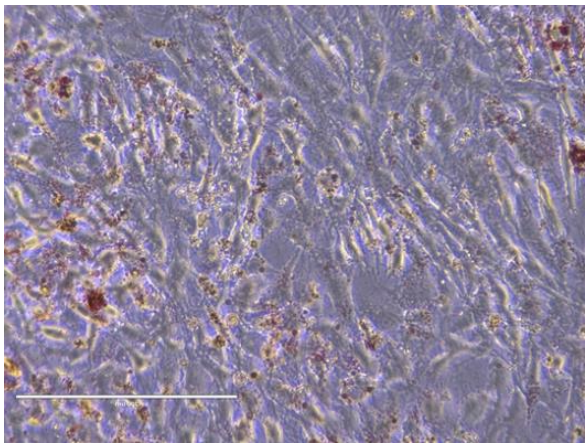
Treći dan diferencijacije stanice su počele nakupljati lipidne kapljice (Slika 8).



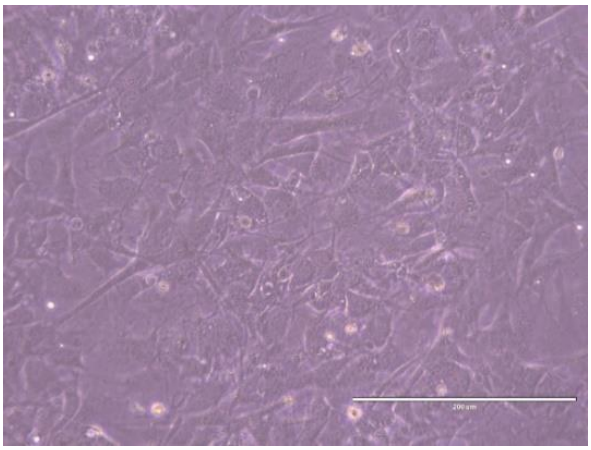
Mikrofotografija 8a



Mikrofotografija 8b



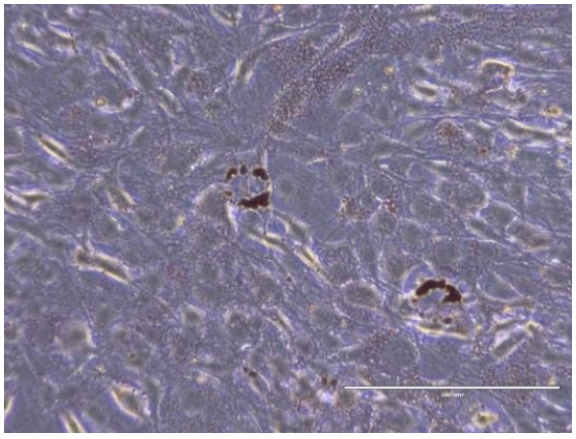
Mikrofotografija 8c



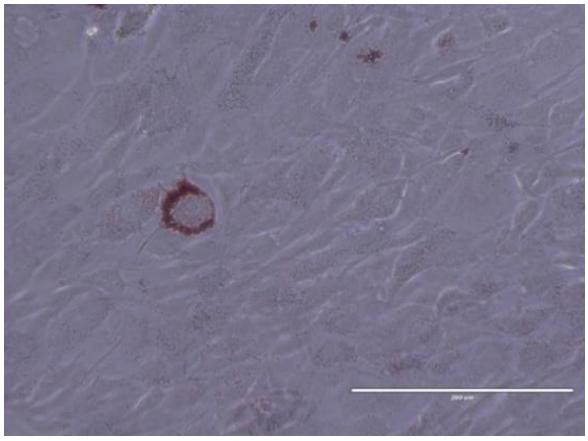
Mikrofotografija 8d

Slika 8. Mikrofotografski prikaz rezultata histokemijskog Oil-Red-O bojanja stanica treći dan nakon indukcije adipogeneze: Inz 1 µg/ml +DEX 0,25 µM+ IBMX 0,5 mM (Mikrofotografija 8a), Inz 5 µg/ml + DEX 0,25 µM + IBMX 0,5 mM (Mikrofotografija 8b), Inz 10 µg/ml + DEX 1 µM + IBMX 0,5 mM (Mikrofotografija 8c); kontrola – nediferencirane stanice (Mikrofotografija 8d); zabilježeno invertnim mikroskopom EVOS^{TM} FL Color pri uvećanju 20x

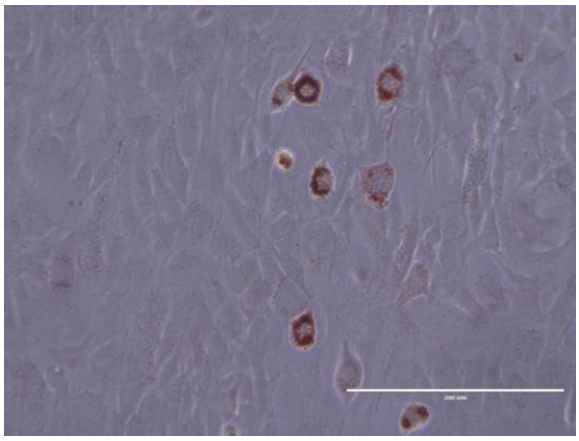
Do šestog dana stanice postaju sferične, a vezanje stanica s pločom postaje labavo. Stanice poprimaju okruli oblik i pokazuju prisutnost unutarstaničnih lipidnih vakuola (Slika 9).



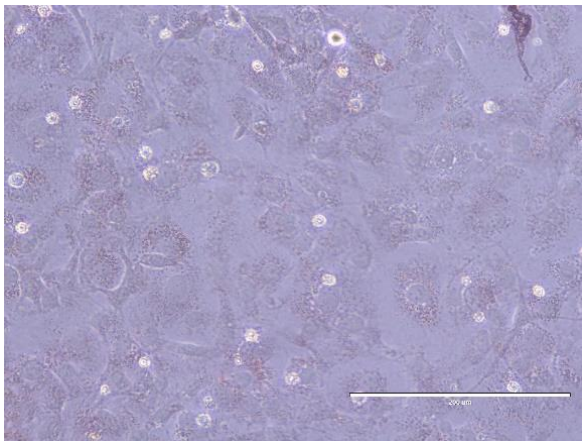
Mikrofotografija 9a



Mikrofotografija 9b



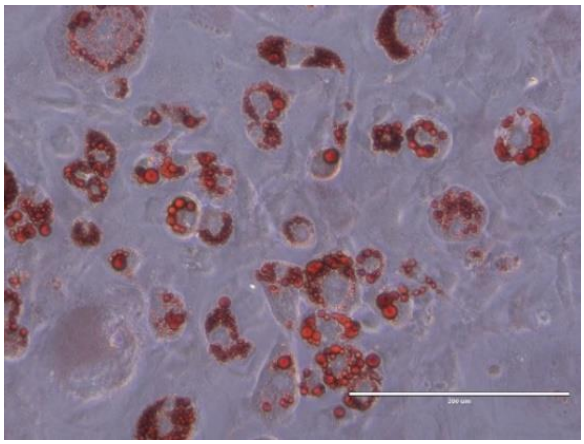
Mikrofotografija 9c



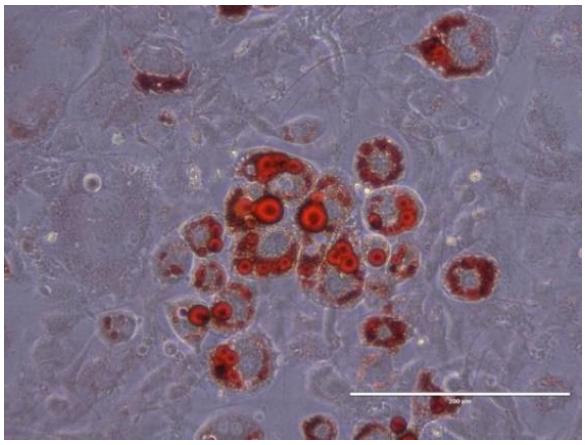
Mikrofotografija 9d

Slika 9. Mikrofotografski prikaz histokemijskog Oil-Red-O bojanja šesti dan nakon indukcije adipogeneze: Inz 1 µg/ml +DEX 0,25 µM+ IBMX 0,5 mM (Mikrofotografija 9a), Inz 5 µg/ml + DEX 0,25 µM + IBMX 0,5 mM (Mikrofotografija 9b), Inz 10 µg/ml + DEX 1 µM + IBMX 0,5 mM (Mikrofotografija 9c); kontrola – nediferencirane stanice (Mikrofotografija 9d); zabilježeno invertnim mikroskopom EVOS^{TM} FL Color pri uvećanju 20x

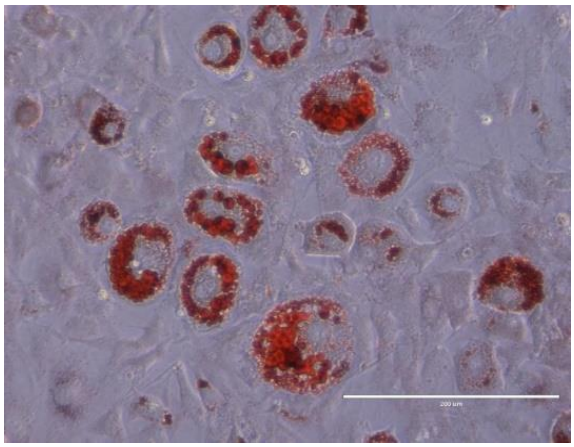
Nakon 9 dana indukcije, lipidne vakuole postale su veće, a stanična citoplazma je gotovo potpuno ispunjena lipidima (Slika 10).



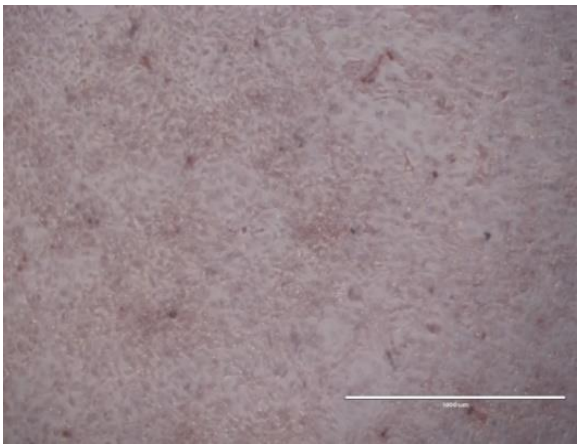
Mikrofotografija 10a



Mikrofotografija 10b



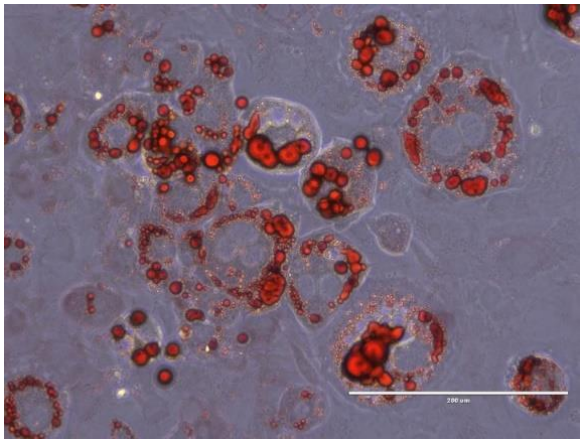
Mikrofotografija 10c



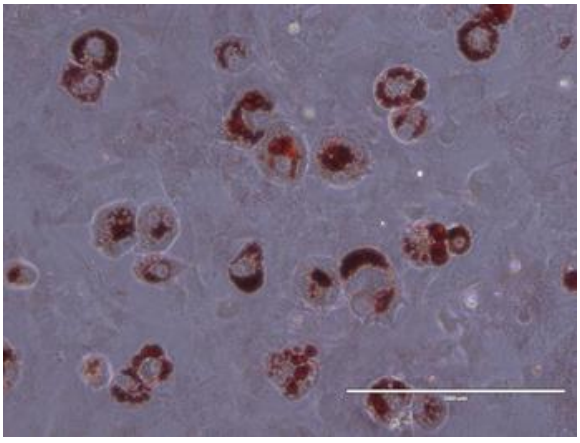
Mikrofotografija 10d

Slika 10. Mikrofotografski prikaz Oil-Red-O bojanja deveti dan nakon indukcije adipogeneze: Inz 1 µg/ml +DEX 0,25 µM+ IBMX 0,5 mM (Mikrofotografija 10a), Inz 5 µg/ml + DEX 0,25 µM + IBMX 0,5 mM (Mikrofotografija 10b), Inz 10 µg/ml + DEX 1 µM + IBMX 0,5 mM (Mikrofotografija 10c); kontrola – nediferencirane stanice (Mikrofotografija 10d); zabilježeno invertnim mikroskopom EVOS^{TM} FL Color pri uvećanju 20x (10a, 10 b i 10c) te 4x (10 d)

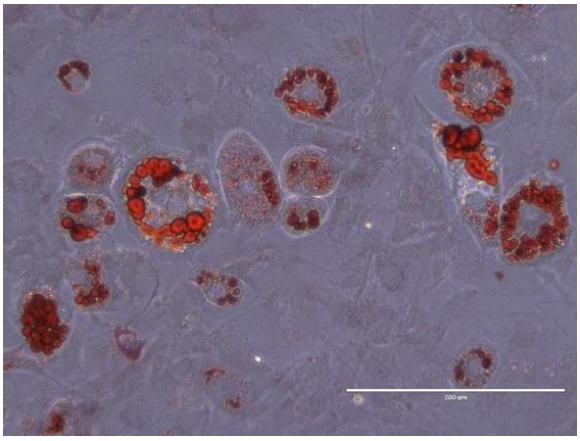
Dvanaestog dana diferencijacije, više od polovice stanica pokazalo je adipogenu pretvorbu koja je karakterizirana vidljivim kapljicama masti unutar stanica (Slika 11).



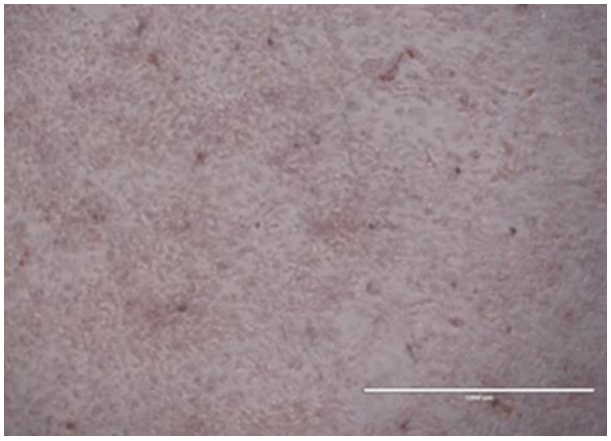
Mikrofotografija 11a



Mikrofotografija 11b



Mikrofotografija 11c



Mikrofotografija 11d

Slika 11. Mikrofotografski prikaz Oil-Red-O bojanja dvanaesti dan nakon indukcije adipogeneze: Inz 1 µg/ml +DEX 0,25 µM+ IBMX 0,5 mM (Mikrofotografija 11a), Inz 5 µg/ml + DEX 0,25 µM + IBMX 0,5 mM (Mikrofotografija 11b), Inz 10 µg/ml + DEX 1 µM + IBMX 0,5 mM (Mikrofotografija 11c); kontrola – nediferencirane stanice (Mikrofotografija 11d); zabilježeno invertnim mikroskopom EVOS^{TM} FL Color pri uvećanju 20x (11a, 11 b i 11c) te 4x (11 d)

5. RASPRAVA

Debljina je bolest sadašnjosti i kao takvoj joj treba i pristupiti. Pretilost pogađa između 25% i 30% stanovništva u industrijaliziranim zemljama i predstavlja veliki zdravstveni problem. Pretilost predstavlja rizični faktor za nekoliko po život opasnih bolesti, uključujući rezistenciju na inzulin, dijabetes mellitus neovisan o inzulinu, hipertenziju, hiperlipidemiju i koronarnu arterijsku bolest (1).

Adipogeneza uključuje diferencijaciju preadipocita u zrele adipocite i igra ključnu ulogu u širenju mase masnog tkiva i kasnije pretilosti. Pretilost je složeni metabolički poremećaj, karakteriziran nakupljanjem masti u različitim dijelovima tijela, što je uzrokovano pozitivnom energetskom ravnotežom (14, 42, 47). Detaljniji pogled na masno tkivo značajno se promijenio od jednostavnih stanica za pohranjivanje masnoća do stanica koje izlučuju hormone s utjecajem na metabolizam cijelog tijela, energetski metabolizam u udaljenim tkivima i regulaciju osjetljivosti prema signalizaciji inzulina (9). Normalan razvoj masnog tkiva, ali i povećanje njegove mase u pretilosti, uključuje pretvorbu nezrelih preadipocita u zrele masne stanice procesom adipogeneze (42). Budući da diferencijacija preadipocita u zrele adipocite može dovesti do patoloških procesa u organizmu, važno je uspostaviti modele adipogeneze čijim bi se proučavanjem otkrili mehanizmi i čimbenici uključeni u adipogenezu (28). Tako je svrha našeg istraživanja bila uspostaviti model adipogeneze in vitro.

Pregledom dostupne literature utvrdili smo kako su za uspostavu procesa adipogeneze i u biološkim istaraživanjima masnog tkiva najčešće korištene 3T3-L1 stanice (26, 41, 46). Zbog njihovog potencijala da se diferenciraju od fibroblasta do adipocita, stanice 3T3-L1 su široko korištene za proučavanje adipogeneze i biokemije adipocita. Imaju morfologiju sličnu fibroblastima, ali pod odgovarajućim uvjetima stanice se diferenciraju u adipocitni fenotip (48,49). Napredak postignut u razumijevanju biologije masnog tkiva, odnosno adipogeneze proizašao je iz izolacije te karakterizacije 3T3-L1 preadipocitne stanične linije koju su prvi izolirali Green i njegovi suradnici (28). Stanice izložene adpogenom koktelu inducirajućih spojeva, koji uključuju DEX, IBMX i inzulin, transformiraju se u sferični oblik i nakupljaju lipidne kapljice te preuzimaju morfološka i biokemijska svojstva zrelog adipocita (28).

U ovom istraživanju primijenili smo jedan od najkorištenijih protokola za uspostavljanje procesa adipogeneze, koji su detaljno, u svom radu, predstavili Zebisch i suradnici (28). Oni su upotrebom konvencionalnih protokola nailazili na problem opadanja učinkovitosti diferencijacije te su na temelju detaljne usporedbe podrijetla stanične linije i broja njihovih

pasaža, protokola i dostupnih materijala za uzgoj i diferencijaciju 3T3-L1 i i ostalih preadipocitnih staničnih linija pronašli protokol za najučinkovitiju i reproducibilnu diferencijaciju 3T3-L1 stanica.

Nakon indukcije adipogeneze stanice ulaze u postkonfluentnu mitozu, kada nastupa još jedan krug replikacije DNA i diobe stanica. Do drugog dana diferencijacije stanice završe fazu postkonfluentne mitoze i ulaze u fazu zaustavljanja rasta GD, neophodnu za razmatanje DNA i pristup transkripcijskih faktora regulatornim elementima u genima koji moduliraju fenotip zrelog adipocita (50). Ovakav slijed događaja razlog je manjem broju stanica induciranih na diferencijaciju s obzirom na nediferencirane stanice, što je i rezultat našeg istraživanja koji korelira i s rezultatima sličnog istraživanja (29). Također to može biti i razlog pojave „curl-up“ subkonfluentnih stanica na početku istraživanja, jer stanice u ovu fazu ulaze postkonfluentno.

GSH je ključni antioksidans koji modulira različite stanične procese. Sukladno tome, dokazano je da je unutarstanični GSH status osjetljiv pokazatelj ukupnog zdravlja stanice i njegove sposobnosti da se odupre toksičnom oštećenju (51, 44). U ovoj studiji, radili smo također i GSH test, kako bi utvrdili oštećuje li proces adipogeneze na bilo koji način stanicu. Utvrdili smo kako proces adipogeneze uzrokuje oksidacijski stres te kako se GSH smanjuje s napretkom stanične diferencijacije. Redoks neravnoteža je u velikoj mjeri povezana s pretilošću pa tako i bolestima povezane s njom te taj zaključak možemo potvrditi i samo nekim od brojnih studija, koje su pokazale blisku povezanost između ROS-a i adipogeneze, odnosno pretilosti. Peris i suradnici pokazali su kako kronično povišene razine reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u masnom tkivu pridonose otpornosti na inzulin, te da prolazno podizanje ROS-a stimulira fiziološke procese kao što je adipogeneza (52). Prekomjerna proizvodnja ROS-a dovodi do oksidativnog stresa i oštećenja stanične funkcije. Nedavne studije su izvijestile da je nakupljanje masnog tkiva popraćeno sustavnim oksidativnim stresom na životinjskim modelima. U ovoj studiji detaljno su istraživana antioksidantna svojstva spoja Esculetina (ECT). Dobiveni rezultati pokazuju da ECT inhibira adipogenezu 3T3-L1 stanica te se pretpostavlja kako ECT inhibira ROS generaciju tijekom adipogene diferencijacije 3T3-L1 stanica te bi mogao bit potencijali lijek za sprečavanje adipogeneze, a time i pretilosti (53). Vigilanza i suradnici u svojoj studiji objašnjavaju kako se tijekom adipogeneze 3T3-L1 stanica smanjuje omjer GSH / GSSG, pomičući redoks status prema oksidacijskim uvjetima (45, 54). Oštećenje redoks homeostaze je u velikoj mjeri povezano s pretilošću, kao posljedicom kroničnog upalnog stanja prisutna u ispitanika s prekomjernom težinom. Pokazali su kako inhibicija sinteze GSH izaziva veću akumulaciju triglicerida u diferenciranim adipocitima u odnosu na kontrolu te time ukazuju da u preadipocitima smanjenje GSH ubrzava adipogenezu.

Kod diferencijacije stanica, odnos GSH / GSSG smanjuje se nakon dodavanja MDI i održava se na nižoj razini razini u odnosu na nediferencirane stanice, što ukazuje na prisutnost intracelularnog prooksidacijskog statusa tijekom diferencijacije adipocita i povećanje proizvodnje ROS-a, zbog odsutnosti GSH (55).

Nadalje, napredak diferencijacije adipocita vizualizirali smo ORO bojanjem. Do dvanaestoga dana diferencijacije više od polovice stanica pokazalo je adipogenu pretvorbu koja je karakterizirana vidljivim kapljicama masti unutar stanica. Slične rezultate pokazali su Zebisch i sur. u svojoj studiji „Protocol for effective differentiation of 3T3-L1cells to adipocytes“ te Xu i sur. u studiji „Mature adipocytes observed to undergo reproliferation and polyploidy“ (28, 29).

Daljnja istraživanja mogu otvoriti nove mogućnosti razvitka specifičnih preventivnih mjera u borbi protiv pretilosti i njenih posljedica poput sprječavanja procesa adipogeneze, odnosno modulacije metabolizma u masnom tkivu.

6. ZAKLJUČAK

Različite koncentracije ispitivanih lijekova nisu pokazale različite rezultate, uspoređujući tri tretirane skupine stanica. Sve tri kombinacije lijekova su preuzete iz protokola za korištenu staničnu kulturu ili objavljenih radova rađenih na istoj staničnoj kulturi, te je adipogeneza inducirana s podjednakom učinkovitošću .Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti:

1. Kod uspostavljanja modela adipogeneze in vitro, potrebno je preadipocitne mišje 3T3-L1 stanice izložiti adipocitnim spojevima, koji induciraju diferencijaciju adipocita, konkretno IBMX, DEX i inzulin. Različite koncentracije ovih lijekova nisu pokazale različite rezultate, uspoređujući tri tretirane skupine stanica.
2. Kao posljedica indukcije adipogeneze MDI-om, bojenjem stanica Oil-Red-O bojom, vidi se svakodnevno povećanje veličine i broja lipidnih kapljica s unutrašnje strane stanične membrane.
3. Za potpunu diferencijaciju stanica potrebno je sveukupno 12 dana, tada se vidi najveći broj i volumenom najveće masne kapljice.
4. Za najučinkovitiju diferencijaciju preadipocita potrebno je pričekati njihovu punu konfluentnost, odnosno nasaditi stanice u koncentraciji $5x10^5$ i započeti diferencijaciju nakon 2 dana.
5. Adipogeneza predstavlja oksidacijski stres za stanice koji smanjuje omjer reduciranog i oksidiranog glutationa.

7. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Odrediti koncentraciju stanica pri kojoj je diferencijacija preadipocita najučinkovitija, odrediti učinak različitih koncentracija lijekova za indukciju adipogeneze na učinkovitost diferencijacije preadipocita, te odrediti vremenski period potreban za maksimalnu diferencijaciju preadipocita u zrele adipocite.

Nacrt studije: Istraživanje je provedeno kao randomizirani kontrolirani proces.

Materijali i metode: 3T3 L1 stanična linija mišjih preadipocita uzgajana je u DMEM-u uz dodatak 10 % FBS i 1%-tne otopine antibiotika/antimikotika, na temperaturi od 37 °C, u vlažnom atmosferskom zraku s 5 % CO2. Nakon što su stanice uzgojene do potrebne konfluentnosti, izložene su različitim koncentracijama MDI, koktela za indukciju procesa adipogeneze. Rast stanica svakodnevno je praćen te su dobivene promjene zabilježene invertnim mikroskopom EVOS^{TM} FL Color. U svrhu utvrđivanja napretka diferencijacije adipocita, korišteni su Trypan Blue bojanje, Oil Red O bojanje, MTT analiza i GSH test.

Rezultati: Bojanjem Oil-Red-O utvrđeno je nakupljanje lipidnih kapljica unutar stanice, kojima se povećavao broj i volumen s napredovanjem adipogeneze. Broj diferenciranih stanica bio je manji u odnosu na broj nediferenciranih stanica, što je utvrđeno Trypan blue bojanjem koje je koreliralo s rezultatima MTT testa. Nadalje, rađen je GSH test, kojim smo dokazali kako se GSH smanjuje tijekom procesa adipogeneze, što je rezultat oksidacijskog stresa.

Zaključak: Utvrđeno je kako nema razlike u učinkovitosi između različitih koncentracija agensa za indukciju diferencijacije preadipocita. Ispitivanjem adipogeneze na subkonfluentim i konfluentnim stanicama zaključeno je kako je diferencijacija učinkovitija na konfluentnim stanicama. Za najučinkovitiju diferencijaciju potrebno je stanice uzgajati prema protokolu kroz 12 dana.

Ključne riječi: pretilost, adipogeneza, 3T3-L1 stanice, adipociti

8. SUMMARY

Objectives: To determine the cell concentration where the differentiation of preadipocytes is most effective, to determine the outcome of various concentrations of adipogenesis induction treatment on the effectiveness of preadipocyte differentiation and determine the time period necessary for maximum differentiation of preadipocytes into mature adipocytes.

Study Design: The research is carried out as a randomized control process.

Material and Methods: 3T3 L1 cell line derived from mouse preadipocytes were grown in DMEM with added 10% FBS and 1% solution of antibiotics/antimycotics, at a temperature of 37 °C, in a humid atmosphere with 5% CO2. After the cells had grown to the necessary confluency, they were exposed to various concentrations of MDI, a cocktail for induction of the adipogenesis process. Cell grown was monitored on a daily basis and the obtained changes were recorded using the EVOS^{TM} FL Color inverted microscope. For the purpose of determining the differentiation progress of the adipocytes, Trypan Blue staining, Oil Red O staining, MTT analysis and the GSH test were used.

Results: The Oil-Red-O staining determined the accumulation of lipid droplets within the cell, which increased in the number and volume with the progress of adipogenesis. The number of differentiated cells decreased in relation to the number of non-differentiated cells, determined using Trypan blue staining which also correlated with the MTT test results. Furthermore, the GSH test was performed to prove that GSH was reduced during the adipogenesis process, which is the result of oxidation stress.

Conclusion: The results showed that there was no difference in the effectiveness between various concentrations of agents for induction of the preadipocyte differentiation. When testing adipogenesis on subconfluent and confluent cells, the conclusion is that differentiation is more effective on confluent cells. The most effective differentiation requires following the protocol for differentiation over 12 days.

Keywords: obesity, adipogenesis, 3T3-L1 cells, adipocytes

9. LITERATURA

1. Medanić D, Pucarin-Cvetković J. Pretilost – javnozdravstveni problem i izazov. Acta medica Croatica. 2012;66(5):347-54.
2. Vegiopoulos A, Rohm M, Herzig S. Adipose tissue: between the extremes. The EMBO Journal. 2017;36(14):1999-2017.
3. Jankovic A, Korac A, Buzadzic B, Otasevic V, Stancic A, Daiber A, Korac B. Redox implications in adipose tissue (dys)function - A newlook at old acquaintances. RedoxBiology. 2015;6:19-32.
4. Son YH, Ka S, Kim Y, Kim JB. Regulation of Adipocyte Differentiation via MicroRNAs. Endocrinol Metab. 2014;29:122-35.
5. Luo L, Liu M. Adipose tissue in control of metabolism. Journal of Endocrinology. 2016;231:77-99.
6. Berry DC, Stenesen D, Zeve D, Graff JM. The developmental origins of adipose tissue. Development. 2013;140:3939-49.
7. Zeyda M, Stulnig TM. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance – A Mini-Review. Gerontology. 2009;55:379-86.
8. Spiegelman BM. Regulation of Adipogenesis: Toward New Therapeutics for Metabolic Disease. Diabetes. 2013;62(6):1774-82.
9. Fruhbeck G, Mez-Ambrosi JG, Muruza Bal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. AJP Endocrinology and Metabolism. 2001;280(6):E827-47.
10. Žmire J. Obesity and Metabolic Insulin Resistance. Medicus. 2004;13(2):27-35.
11. Nigro E, Scudiero O, Monaco ML, Palmieri A, Mazzarella G, Costagliola C, Bianco A, Daniele A. New Insight into Adiponectin Role in Obesity and Obesity-Related Diseases. BioMed Research International. 2014; 658913.
12. Moreno-Navarrete JM, Fernández-Real JM. Adipocyte Differentiation. U: Symonds ME, urednik. Adipose Tissue Biology. Berlin: Springer; 2012.
13. Sarjeant K, Stephens JM. Adipogenesis. Cold Spring Harb Perspect Biol 2012; 4:a008417.
14. Gregoire FM, Smas CM, Sul, HS. Understanding adipocyte differentiation. Physiol Rev. 1998;78:783-809.

15. Roberts LD, Virtue S, Vidal-Puig A, Nicholls AW, Griffin JL. Metabolic phenotyping of a model of adipocyte differentiation. Physiol Genomics. 2009;39:109-19.
16. Lee MJ. Hormonal Regulation of Adipogenesis. Compr Physiol. 2017;7:1151-95.
17. Moseti D, Regassa A, Kim WK. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. Int J Mol Sci. 2016;17(1):E124.
18. Mota P, Richard AJ, Hang H, Stephens JM. Transcriptional Regulation of Adipogenesis. Comprehensive Physiology. 2017;7(2):635-74.
19. Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol. 2000;16:145-71.
20. Rosen ED, Hsu CH, Wang X, i Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. C/EBP induces adipogenesis through PPAR : a unified pathway. Genes & development. 2002;16:22-6.
21. Cao Z, Umek RM, McKnight SL. Regulated expression of three C/EBP lsoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells; Genes Dev. 1991;5(9):1538-52.
22. Spiegelman BM, Puigserver P, Wu Z. Regulation of adipogenesis and energy balance by PPARg and PGC-1. Int J Obes Relat Metab Disord. 2000;24(4):S8-10.
23. Hamm JK, Park BH, Farmer SR. A Role for C/EBPb in Regulating Peroxisome Proliferator-activated Receptor g Activity during Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes. 2001;276(21):18464-71.
24. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. Genes Dev. 2000;14(11):1293-307.
25. Smyth MJ, Sparks RL, Wharton W. Proadipocyte cell lines: models of cellular proliferation and differentiation. Journal of Cell Science. 1993;106:1-9.
26. Cave E, Crowther NJ. The Use of 3T3-L1 Murine Preadipocytes as a Model of Adipogenesis; Pre-Clinical Models: Techniques and Protocols. Methods in Molecular Biology. 2019;1916:263-72.
27. Reichert M, Eick D. Analysis of cell cycle arrest in adipocyte differentiation. Oncogene. 1999;18:459-66.
28. Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, Brandsch M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1cells to adipocytes. Anal Biochem. 2012;425:88-90.

29. Xu P, Li J, Liu J, Wang J, Wu Z, Zhang, Zhai XY. Mature adipocytes observed to undergo reproliferation and polyploidy. FEBS Open Bio 7;2017;652-8.
30. Tang QQ, Otto TC, Lane MD. Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100:44-9.
31. Musić Milanović S., Bukal D. Epidemiologija debljine - javnozdravstveni problem. Medicus. 2018;27(1):7-13.
32. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. J Clin Invest. 2000;106(4):473-81.
33. Smith U, Kahn BB. Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids. J Intern Med. 2016;280(5):465-75.
34. Čvoriščec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. 3. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2000.
35. Božina T. Utjecaj interakcija gena i okolišnih čimbenika na pojavnost metaboličkoga sindroma [Doktorska disertacija]. Zagreb: Medicinski fakultet Zagreb, Sveučilište u Zagrebu; 2014.
36. Mlinar B, Marc J, Pfeifer M. Molecular Mechanisms of Insulin Resistance, Obesity and Metabolic Syndrome. Biochemia Medica. 2006;16(1):8-24.
37. Santos Castro AM. In vitro screening assay using the murine pre-adipocyte cell line 3T3-L1 to study anti-obesogenic activities of cyanobacterial compounds [doktorski rad]. Porto: Faculty of Sciences: University of Porto; 2015.
38. Dias S, Paredes S, Ribeiro L. Drugs Involved in Dyslipidemia and Obesity Treatment: Focus on Adipose Tissue. Int J Endocrinol. 2018;2018:2637418.
39. Jakab J, Smolić R, Včev A, Smolić M. Drug treatment of obesity: From bench to bedside. U: Bobbarala V, urednik. Drug Discovery - Concepts to Market. UK: IntechOpen; 2018. Str. 53-76.
40. Spiegelman BM. Regulation of Adipogenesis: Toward New Therapeutics for Metabolic Disease. Diabetes. 2013;62(6):1774-82.
41. Morrison S, McGee SL. 3T3-L1 adipocytes display phenotypic characteristics of multiple adipocyte lineages. Adipocyte. 2015;4(4):295-302.
42. Van Tonder A, Joubert AM, Duncan Cromarty A. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. BMC Research Notes. 2015;8:47.

43. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paul KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. Cancer Research 1988;48(17):4827-33.
44. Jankovic A, Korac A, Buzadzic B, Otasevic V, Stancic A, Daiber A, Korac B. Redox implications in adipose tissue (dys)function - A newlook at old acquaintances. RedoxBiology. 2015;6:19-32.
45. Vigilanza P, Aquilano K, Baldelli S, Rotilio G, Ciriolo MR. Modulation of Intracellular Glutathione Affects Adipogenesis in 3T3-L1 Cells. J. Cell. Physiol. 2011;226:2016-24.
46. Yang RJCVW, Ntambi JM, Geiman DE, Landschulz WH, Friedman AD, Nakabeppu Y, Kelly TJ, LaneMD. Differentiation-induced gene expressionin 3T3-L1 preadipocytes: CCAAT enhancer binding protein interacts with and activates the promoters of tw adipocyte-specific genes. Genes & Development; 1989;3:1323-35.
47. Smas CM, Sul HS. Control of adipocyte differentiation. Biochem. J. 1995;309:697-710.
48. J. Novakofski. Adipogenesis: Usefulness of in vitro and in vivo experimental models. J. Anim. Sci. 2004;82:905-15.
49. Qian SW, Li X, Zhang YY, Huang HY, LiuY, SunX, Tang QQ, Qian et al. Characterization of adipocyte differentiation from human mesenchymal stem cells in bone marrow. BMC Developmental Biology. 2010;10:47.
50. Ntambi JM, Young-Cheul K. Adipocyte Differentiation and Gene Expression. J Nutr. 2000;130(12):3122S-3126S.
51. Dludla PV, Jacka B, Viraragavana A, Pheiffera C, Johnsona R, Louwa J, Mullera CJF. A dose-dependent effect of dimethyl sulfoxide on lipid content, cell viability and oxidative stress in 3T3-L1 adipocytes. Toxicology Reports 2018;5:1014-20.
52. Townsenda DM, Tewa KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. Biomed Pharmacother. 2003;57(3-4):145-55.
53. Kim Y, Lee J. Esculetin Inhibits Adipogenesis and Increases Antioxidant Activity during Adipocyte Differentiation in 3T3-L1 Cells. Prev. Nutr. Food Sci. 2017;22(2):118-23.

54. Lettieri Barbato D, Tatulli G, Cannata SM, Bernardini S, Aquilano K, Ciriolo MR. Glutathione Decrement Drives Thermogenic Program In Adipose Cells. Scientific Reports. 2015;5:E13091.

55. Peris E, Micallef P, Paul A, Palsdottir V, Enejder A, Bauzá-Thorbrügge M, Olofsson CS, Wernstedt Asterholm I. Antioxidant treatment induces reductive stress associated with mitochondrial dysfunction in adipocytes. J. Biol. Chem; 2019; 294(7):2340-52.

10. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODACI

Ime i prezime: Ivona Đumlija

Adresa: Podravska ulica 5, 10410 Velika Gorica, Hrvatska

Mobitel: (+385) 99 341 9901

E-mail: ivona.dumlija1@gmail.com

OBRAZOVANJE

II. gimnazija Zagreb, opće usmjerenje (2008. - 2012.)

Zdravstveno veleučilište Zagreb – preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika (2012. - 2015.)

Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek – diplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika (2016. - 2019.)