

Utjecaj kroničnog stresa na strukturu masnog tkiva mladih i starih ženki Sprague Dawley štakora

Majić, Ljiljana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:152:841011>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ljiljana Majić

**UTJECAJ KRONIČNOG STRESA NA
STRUKTURU MASNOG TKIVA
MLADIH I STARIH ŽENKI SPRAGUE
DAWLEY ŠTAKORA**

Diplomski rad

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ljiljana Majić

**UTJECAJ KRONIČNOG STRESA NA
STRUKTURU MASNOG TKIVA
MLADIH I STARIH ŽENKI SPRAGUE
DAWLEY ŠTAKORA**

Diplomski rad

Osijek, 2021.

Rad je izrađen u Laboratoriju za neurobiologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentor rada: prof. dr. sc. Marija Heffer

Rad ima 43 lista, 2 tablice i 14 slika.

Studija je financirana projektima:

Hrvatska zaklada za znanost (Patofiziološke posljedice promjena sastava lipidnih splavi, IP-2014-09-2324, voditeljice Marije Heffer)

Cedars-Sinai Medical Center's International Research and Innovation in Medicine Program and the Association for Regional Cooperation in the Fields of Health, Science and Technology Young Scientists Research Grants: RECOOP # 001 BMYS RG Balog, "Impact of acute and chronic stress on cardiovascular diseases"

Institucijski projekt J. J. Strossmayer Sveučilišta u Osijeku (Lipidni profil metaboličkog stresa, IP9-2019, voditeljice Marije Heffer).

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Odgovor na stres.....	1
1.2. Os hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda	1
1.3. Glukokortikoidni receptori	2
1.4. Dugoročne posljedice kroničnog stresa.....	3
1.5. Masno tkivo i odgovor na stres	4
1.6. Dobno specifični odgovor na stres	7
1.7. Utjecaj ženskih spolnih hormona na masno tkivo.....	8
1.8. Mitohondriji u masnom tkivu.....	9
1.9. Kolagen u masnom tkivu.....	10
2. HIPOTEZA.....	12
3. CILJEVI.....	13
4. MATERIJALI I METODE	14
4.1. Ustroj studije	14
4.2. Pokusne životinje	14
4.3. Metode.....	16
4.3.1. Fiksacija, uklapanje i rezanje tkiva	16
4.3.2. Histološka bojenja.....	16
4.3.3. Računalna obrada.....	20
4.3.4. Statističke metode	26
5. REZULTATI	26
6. RASPRAVA.....	32
7. ZAKLJUČCI	35
8. SAŽETAK.....	36
9. SUMMARY.....	37
10. LITERATURA	38
11. ŽIVOTOPIS.....	42

Popis kratica

COL6A3	kolagen VI alfa 3 (engl. <i>Collagen type VI Alpha 3 chain</i>)
GR	glukokortikoidni receptor
HPA	os hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (engl. <i>hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i>)
MR	mineralokortikoidni receptor
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>Phosphate-buffered saline</i>)
PTAH	hematoksilin fosfovolframska kiselina (engl. <i>phosphotungstic acid hematoxylin</i>)
UCP1	razvezujući protein 1 (engl. <i>uncoupling protein 1</i>)

1. UVOD

1.1. Odgovor na stres

Homeostaza je pojam koji označava održavanje unutarnje ravnoteže organizma, a narušavanjem te ravnoteže vanjskim ili unutarnjim stresorima organizam se prilagođava odgovorom na stres. Iako ima negativnu konotaciju, stanje stresa povećava preživljenje pojedinca (1). Aktivira se zamršeni repertoar fizioloških i bihevioralnih odgovora kojima je cilj održavanje ravnoteže unatoč fiziološkim izazovima (2). Ti su odgovori obično prolazni i nazivamo ih akutnim stresom, a prepoznajemo ih kroz bihevioralne odgovore tzv. „borba ili bijeg“ u muškaraca i „briga za potomstvo i povezivanje“ u žena (3). Međutim, kad se kronično potiče, odgovor na stres može postati neprikladan te se manifestirati kao širok spektar bolesti (2). Stres se još naziva *općim sindromom prilagodbe* i dijeli se u tri faze: alarmirajuća faza, faza otpora te faza iscrpljenja (4).

U prvoj fazi na poticaj hipotalamusa dolazi do oslobađanja glukokortikoida iz hipofize, zatim adrenalina i kortizola iz nadbubrežne žlijezde. Puls se povećava, raste krvni tlak i podiže se razina glukoze u krvi. Fiziološke promjene kojima upravlja simpatikus pripremaju organizam na odgovor na stres. Akutni stres, prva je faza općeg sindroma prilagodbe i prelaskom u drugu fazu, fazu otpora, stres poprima kronični karakter. Tijekom faze otpora parasimpatikus nastoji vratiti fiziološke funkcije na normalne razine, odnosno spustiti puls, krvni tlak i koncentraciju glukoze u krvi na standardne vrijednosti. Međutim, ukoliko stresna situacija potraje, hormoni stresa nastavljaju se izlučivati i tijelo ostaje u stanju pripravnosti. Tada tijelo prelazi u završnu fazu općeg sindroma prilagodbe, fazu iscrpljenosti. Tada tijelo postaje iscrpljeno od stalnih stresnih podražaja i gubi mogućnost učinkovitog odupiranja stresorima (3 – 5).

Stres, osim prema trajnosti, možemo razlikovati prema izvoru, a za ovaj rad najvažniji su fizički i psihološki stres. Fizičkim stresom smatra se izloženost boli, buci, hladnoći ili vrućini, dok strah, frustraciju, brigu, preopterećenost informacijama i tjeskobu smatramo psihološkim stresom (6).

1.2. Os hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda

Os hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (engl. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*, HPA) i simpatički živčani sustav čine glavne izvršne krakove stresnog sustava. Glukokortikoidi i kateholamini glavni su hormoni HPA osi (3). Hipotalamus, na poticaj stresora, luči

kortikotropin-oslobađajući hormon. Kortikotropin-oslobađajući hormon vezanjem na svoj receptor u hipofizi potiče otpuštanje adrenokortikotropnog hormona u krvotok. Ciljno mjesto djelovanja adrenokortikotropina jest kora nadbubrežne žlijezde, a njegova je funkcija pokrenuti izlučivanje mineralokortikoida i glukokortikoida. Predstavnik glukokortikoida je kortizol u ljudi te kortikosteron u glodavaca (7, 8).

U normalnim uvjetima bez stresa, HPA os izvršava svoju primarnu funkciju slijedeći cirkadijani ritam. Kod ljudi se kortizol tijekom dana luči pulsno, a njegova je najveća koncentracija netom prije buđenja, dok se navečer očekuje najmanja koncentracija (9). Ujutro se postižu visoke razine hormona koje „bude“ organizam i pripremaju ga na cjelokupnu dnevnu aktivnost, dok se kasnije mehanizmom povratne sprege ta razina smanjuje (10). S obzirom da su štakori noćne životinje, njihov cirkadijani ritam izgleda drukčije od ljudskog. Kortikosteron u štakora, kao analog ljudskom kortizolu, postiže svoju vršnu vrijednost u sumrak, a ne ujutro. Poput reakcije na stres općenito, kortizol (ili kortikosteron) je namijenjen trenutnom poticanju kataboličke aktivnosti. Stimulira oslobađanje glukoze i glukoneogenezu, pojačava rad srca, podiže krvni tlak i ubrzava disanje. Istodobno potiskuje anaboličke procese poput imunoloških funkcija, reprodukcije, probave i rasta (8, 11).

Kortizol svoje djelovanje postiže vezanjem za unutarstanične glukokortikoidne receptore (GR) koji se nalaze u većini tkiva, pa tako i u masnom tkivu (12, 13).

1.3. Glukokortikoidni receptori

Svi steroidni receptori dijele jednaku strukturu. Sastoje se od N-terminalne regulacijske domene, DNA vežuće domene, C-terminalne ligand vežuće domene te domene koja povezuje prethodne dvije. Steroidni hormoni svoje djelovanje postižu vezanjem za glukokortikoidne i mineralokortikoidne receptore (MR) lokalizirane u citosolu (14). Vezanjem hormona za C-terminalnu domenu receptora stvara se aktivirani kompleks koji se iz citosola prenosi u jezgru stanice, zatim potiče ili inhibira izražaj gena, ovisno o veznim mjestima receptora na ciljnim genima ili interakciji s drugim jezgrenim čimbenicima (15).

MR ima vrlo visok afinitet za glukokortikoide te se njegova funkcija ističe u slučaju niskih, odnosno bazalnih razina cirkulirajućih hormona. Za razliku od njega, GR stvara aktivirani kompleks pri visokim razinama hormona što je karakteristično za stanje stresa. Ukoliko se poveća koncentracija glukokortikoida neće doći do povećanja signalizacije mineralnokortikoidnim receptorom dok se signalizacija preko glukokortikoidnog receptora

povećava s povećanjem koncentracije glukokortikoida, što bi značilo da je signalizacija mineralokortikoidnim receptorom regulirana količinom receptora, a ona glukokortikoidnim receptorom regulirana je koncentracijom hormona (16).

1.4. Dugoročne posljedice kroničnog stresa

Glukokortikoidi, s kortizolom kao predstavnikom, snažno utječu na ukupni metabolizam tijela potičući primarno kataboličke učinke u svrhu iskorištavanja svih raspoloživih energetske resursa u stresnim situacijama. Kako bi se organizam uspješno borio protiv stresa, potrebna mu je lako i brzo dostupna energija. Glukokortikoidi, povećanjem jetrene glukoneogeneze i indukcijom lipolize podižu razinu glukoze u krvi, uzrokuju razgradnju proteina na njihove osnovne jedinice, aminokiseline, koje služe kao dodatni supstrat za oksidativne puteve. Kortizol pojačava rad srca, povećava krvni tlak i ubrzava disanje. Istodobno, potiskuje anaboličke procese, poput imunoloških funkcija, reprodukcije, probave i rasta (2). Glukokortikoidi također reguliraju više koraka u procesu adipogeneze. U kombinaciji s inzulinom, glukokortikoidi povećavaju izražaj različitih gena koji sudjeluju u nakupljanju masti, ali isto tako mogu poboljšati ili oslabiti djelovanje inzulina i regulirati lipolizu. Stoga, glukokortikoidi ne djeluju isključivo u korist pohranjivanja masti nego njihov učinak ovisi o fiziološkom kontekstu (17, 18).

Unatoč tome što su početne faze reakcije na stres namijenjene preživljavanju, kronično izlaganje stresu dovodi do pretjeranog izlučivanja kortizola iz kore nadbubrežne žlijezde te kompenzacijski mehanizmi poput negativne povratne sprege kojima se ta razina hormona treba smanjiti postaju nedostatni, uzrokujući daljnje abnormalnosti HPA osi (8). Hiperaktivnost HPA osi može dovesti do smanjenja mišićne i koštane mase, povećanja visceralnog adipoziteta te inzulinske rezistencije. Ljude koji boluju od Cushingovog sindroma, endogenog hiperkortizolizma, obilježava visceralna pretilost uz mršave okrajine (19). Kortikotropin-oslobađajući hormon i kortizol utječu na oslobađanje inzulina i regulaciju glukoze. Kortizol povećava razinu inzulina, a istodobno povećanje kortizola i inzulina potiče visceralno taloženje masti. Višak masnog tkiva djeluje kao stimulans HPA osi pa se javlja stanje u kojemu kronični stres uzrokuje nakupljanje masnog tkiva, zatim adipokini iz masnog tkiva iznova stimuliraju odgovor na stres preko HPA osi i time dolazi do začaranog kruga čija je posljedica daljnje nakupljanje masti (17).

Glukokortikoidi imaju snažne učinke na adipogenezu i endokrine funkcije masnog tkiva stoga ne čudi da kronični višak glukokortikoida potiče akumulaciju masnog tkiva i doprinosi

metaboličkim poremećajima. Iako nije u potpunosti razjašnjeno zašto glukokortikoidi tako snažno djeluju na abdominalni dio tijela, pretpostavlja se da veliku ulogu igra visok izražaj glukokortikoidnog receptora u visceralnim adipocitima. Također, MR koji posreduje nekoliko djelovanja glukokortikoida izražen je u masnom tkivu (2, 7). Iz evolucijske perspektive, preživljavanju u uvjetima kroničnog stresa doprinosi aktivacija mehanizama koji pogoduju nakupljanju visceralne masnoće. Stalna aktivacija stresnog odgovora može se protumačiti kao život u stalnoj nesigurnosti zbog čega je poželjno skladištiti visceralnu masnoću koja je lako dostupna kako bi osigurala potrebnu energiju za mozak i mišiće. Kronični i akutni stresori razlikuju se u ljudi i glodavaca stoga je teško eksperimentalno dokazati tu ideju na pokusnim životinjama (17).

Sve tjelesne funkcije koje nisu nužne za trenutno preživljavanje jedinke, poput rasta i reprodukcije, bivaju inhibirane kako bi se sva energija uložila u borbu protiv stresora. Kortikotropin-oslobađajući hormon i kortizol koče oslobađanje hormona rasta, tireotropin-oslobađajućeg hormona, tireotropnog hormona i gonadotropin-oslobađajućeg hormona koji su potrebni za proizvodnju anaboličkih steroidnih hormona. Nedostatak gonadotropin-oslobađajućeg hormona uzrokuje kasni pubertet, izostanak ovulacije i spontani pobačaj kod žena te smanjenu razinu testosterona i oslabljenu spermatogenezu kod muškaraca. Za rast i reprodukciju neophodni su hormoni štitnjače trijodtironin i tiroksin čije je izlučivanje smanjeno zbog nedostatka tireotropin-oslobađajućeg hormona i tireotropnog hormona (8, 20).

1.5. Masno tkivo i odgovor na stres

Masno tkivo je vrsta vezivnog tkiva te čini najveći endokrini organ u ljudi. Hormoni koje izlučuje – adipokini – djeluju na homeostazu glukoze, imunološki sustav, hematopoezu, reproduktivnu funkciju te proizvodnju steroida. Razlikujemo bijelo, smeđe i bež masno tkivo, a adipociti su njihova osnovna komponenta (20).

Bijelo masno tkivo služi kao dugoročno energetska skladište i od velike je važnosti u doba gladovanja. Što je veća količina masti, to je veća šansa za preživljavanje pojedinca tijekom prehrambene insuficijencije. Osim što pohranjuje energiju u obliku masti, bijelo masno tkivo nudi toplinsku izolaciju i zaštitu od mehaničkih trauma (21). Neki od adipokina su leptin, adiponektin i grelin, a njihova uloga se očituje u regulaciji niza fizioloških funkcija poput metabolizma glukoze i lipida, koagulacije krvi, krvnog tlaka, modulacije steroidnih hormona te reprodukcije (22).

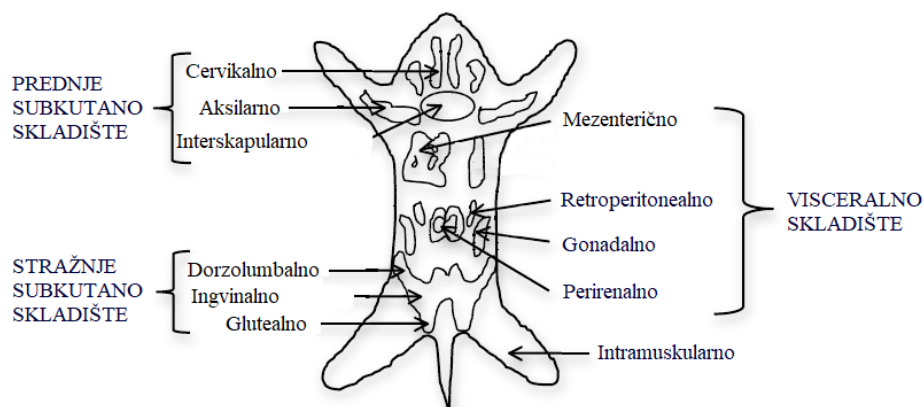
Adipociti čine oko 50 % stanica masnog tkiva. U ostalih 50 % ubrajamo vaskularne elemente, preadipocite, makrofage, mastocite, fibroblaste, živčane stanice i mezenhimske stanice nepoznatih funkcija. Adipociti bijelog masnog tkiva kuglaste su stanice promjera koji može varirati od 20 μm do 160 μm , ovisno o smještaju u tijelu i količini pohranjene masti. Veći dio citoplazme zauzima jedna velika vakuola ispunjena lipidima dok su ostali stanični organeli pogurani uz sam rub stanice što pod svjetlosnim mikroskopom daje karakterističan izgled prstena pečatnjaka (23).

Smeđe masno tkivo zastupljenije je u dojenačkoj dobi dok ga kod odraslih pronalazimo u mnogo manjoj količini. Njegova osnovna uloga je održavanje tjelesne temperature što je od iznimne važnosti kod dojenčadi jer su osjetljivija na hladnoću. Velika količina mitohondrija omogućuje sagorijevanje lipida i proizvodnju topline, istovremeno dajući karakterističnu smeđu boju smeđeg masnog tkiva (24). Oblik smeđih adipocita je poligonalni ili elipsoidni, a njihova je veličina od 15 μm do 50 μm . Za razliku od bijelih adipocita koji su unilokularni, smeđi adipociti su multilokularni i sadrže brojne male vakuole ispunjene lipidima. Smeđe masno tkivo također je endokrini organ koji proizvodi i izlučuje mnoge autokrine, parakrine i endokrine čimbenike (23).

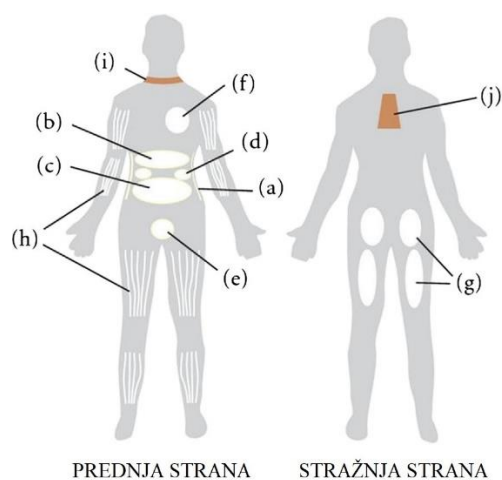
Bež adipociti imaju slična obilježja kao smeđi adipociti. Multilokularni su i bogati mitohondrijima. Za razliku od bijelog i smeđeg masnog tkiva koje je donekle pravilno smješteno, než adipociti nalaze se unutar bijelog masnog tkiva, a nastaju pod utjecajem kronične hladnoće ili vježbanja (25). Poput bijelih adipocita služe kao rezervoar energije, a poput smeđih adipocita zaduženi su za termogenezu (24).

Raspodjela masnog tkiva kod ljudi i glodavaca vrši se na dvije tjelesne razine: supkutanoj i visceralnoj. Ljudi, kao i glodavci, imaju dva glavna supkutana skladišta. Kod ljudi se oni nalaze u trbušnoj i gluteofemoralnoj regiji, dok kod glodavaca razlikujemo prednja i stražnja supkutana skladišta. Detaljnije podjele skladišta prikazane su na slikama 1 i 2 (20, 26). U ovom radu najveći je fokus na prednje supkutano interskapularno skladište, a u njemu se nalazi smeđe masno tkivo. Supkutano masno tkivo kod ljudi nastavlja se na dermalno masno tkivo, a glodavci ta dva masna sloja odjeljuju tankim mišićnim slojem. Glavna visceralna skladišta usko su povezana s unutrašnjim organima. Za ovaj rad najvažnije visceralno skladište je mezenterično, pronalazimo ga kod ljudi i glodavaca, a sastoji se od bijelog masnog tkiva. Ostala visceralna skladišta prikazana su na slikama 1 i 2 (23). Glodavci poput štakora i miševa česti su animalni modeli za istraživanja primjenjiva na ljudima zbog fiziologije slične ljudima. Unatoč tome

pojavljaju se značajne razlike povezane sa taloženjem i funkcijom masti i stoga je nužan oprez pri izravnom uspoređivanju ljudi i glodavaca u smislu masnog tkiva i pridruženih bolesti (23, 26).



Slika 1. Shematski prikaz masnih skladišta kod glodavaca (slika je preuzeta i prilagođena prema Chusyd, 2016) (26).



Slika 2. Shematski prikaz masnih skladišta kod ljudi. Bijelo masno tkivo nalazi se u supkutanom masnom tkivu abdominalno (a), gluteofemoralno (g) i intramuskularno (h). Bijelo masno tkivo također se nalazi u visceralnom masnom tkivu omentalno (b), mezenterično (c), retroperitonealno (d), gonadalno (e) i perikardijalno (f). Smeđe masno tkivo nalazi se supraklavikularno (i) i u subskapularnom području (j). Slika je preuzeta i prilagođena prema Chusyd, 2016 (26).

Treba naglasiti da jasne anatomske granice između bijelog i smeđeg masnog tkiva ne postoje, često se jedna vrsta masnog tkiva može pronaći unutar drugoga. Relativna količina dviju vrsta masnog tkiva ovisi o dobi, spolu, okolišnim i metaboličkim uvjetima. Također, raspodjela masnog tkiva je promjenjiva, a adipociti imaju sposobnost reverzibilne transdiferencijacije, odnosno prelaska iz jedne u drugu vrstu masnih stanica (23, 24). Bijeli adipociti nakupljanjem masti rastu veličinom (hipertrofija) dok ne dosegnu svoj maksimalni volumen, tzv. „kritičnu veličinu stanice“. Nakon toga se pokreće diferencijacija preadipocita čime nastaju novi adipociti (hiperplazija). Kritična veličina stanice genetski je određena i različita je za svako skladište. Volumen adipocita može se smanjivati i rasti, dok njihov broj može ostati isti do kraja života ili rasti, ali se ne može smanjiti (14, 20).

1.6. Dobno specifični odgovor na stres

Visceralna pretilost, ali i nedostatak tjelesnog masnog tkiva imaju značajan negativan utjecaj na nekoliko aspekata reprodukcije, uključujući plodnost i optimalno održavanje trudnoće stoga je važno održati količinu masnog tkiva na normalnoj razini. Tijekom evolucije većina fizioloških sustava prilagodila se da optimalno služi dva osnovna cilja, a to su preživljavanje jedinke i opstanak vrste. Može se reći da je preživljavanje jedinke moguće zahvaljujući odgovoru na stres, ali iz istog razloga opstanak vrste može biti kompromitiran. Za opstanak vrste važna je sposobnost ženke za reprodukciju i brigu o potomstvu koja mora ostati očuvana i u stanju stresa (11, 27).

Pokazalo se da ženke glodavaca različito reagiraju na stres ovisno o fazi spolnog ciklusa u kojoj se nalaze. Potrebno je uzeti u obzir fluktuacije razine estrogena i progesterona karakteristične za svaku menstrualnu fazu (1). Estrogen povećava reaktivnost HPA osi, dok progesteron djeluje kao antagonist glukokortikoida vežući se na GR (28).

Stres utječe na oba spola, ali njegove manifestacije se razlikuju kako kod glodavaca tako i u ljudi. Muškarci izloženi kroničnom stresu osjetljiviji su na negativne metaboličke posljedice izazvane glukokortikoidima, poput visceralne pretilosti i metaboličkog sindroma, ali su razvili sustav prilagodbe koji ih štiti od manifestacije depresije i tjeskobe koja bi ih mogla učiniti podložnima agresiji unutar vrste. Suprotno muškarcima, žene su podložnije poremećajima u afektivnom ponašanju poput depresije i anksioznosti. S druge strane, one su razvile imunološki i metabolički sustav otporan na promjene izazvane stresom kako bi mogle svladati energetske troškove trudnoće i odgoja (11, 28).

Odgovor na stres mijenja se ovisno o starosnoj dobi. Opažene su razlike između mladih i starih miševa izloženih kroničnom stresu. Reakcije mladih miševa bile su smanjena anksioznost i poboljšane kognitivne funkcije, dok je odgovor starih miševa bio gubitak kilograma, poremećaj kretanja i oštećenje kognitivne funkcije (29). Istraživanje na štakorima pokazalo je da starije ženke održavaju višu bazalnu razinu kortikosterona nakon izlaganja stresu nego mlade ženke, te da postoji određeno kašnjenje u prekidu izlučivanja hormona (30). Odgovor na stres je pojačan dok je mehanizam povratne sprege narušen. Kao i kod miševa, stare jedinke doživjele su gubitak tjelesne mase (31). Količina i raspodjela masnog tkiva također doživljava promjene vezane za starosnu dob. Iako se ukupna tjelesna masnoća u starosti može smanjiti, postotak tjelesne masnoće može ostati konstantan ili se čak povećati. Razlog tome je što starenjem također dolazi do gubitka tjelesne težine i mišićnog tkiva, a masno tkivo iz masnih skladišta prelazi u koštanu srž, mišiće, jetru i druga tkiva. Volumen adipocita mijenja se tijekom života, a broj adipocita može ostati stalan ili rasti. Veličina masnih skladišta svoj vrhunac doseže u srednjoj ili ranijoj starijoj dobi te opada u starijoj dobi. Gubitak masti posebno se očituje u supkutanom skladištu dok u visceralnom nije toliko naglašen (32).

1.7. Utjecaj ženskih spolnih hormona na masno tkivo

Estrogen nastaje djelovanjem aromataze, povećava proliferaciju preadipocita i uvjetuje veličinu zrelih adipocita. Glukokortikoidi kao glavni stresni hormoni povećavaju aktivnost aromataze u ženskim, a smanjuju u muškim supkutanim preadipocitima. Isto tako povećavaju aktivnost aromataze u visceralnim preadipocitima, ponajviše kod žena nakon ulaska u menopauzu i muškaraca. To objašnjava zašto žene nakupljaju supkutano, a muškarci visceralno masno tkivo (33). Postoji još jedan mehanizam koji objašnjava takvu raspodjelu masti u muškaraca i žena. Muški spolni hormoni potiču visceralnu pretilost smanjenjem izražaja hormon-osjetljive lipaze koja se nalazi u adipocitima i metabolizira pohranjenu masnoću, istovremeno pojačavajući djelovanje lipoprotein lipaze koja se nalazi izvan adipocita i zadužena je za transport i preradu triglicerida u krvotoku (13). S druge strane, estrogen u nekoj mjeri sprječava nakupljanje visceralne masti smanjenjem transkripcije gena lipoprotein lipaze ili modulacijom posttranskripcije (20, 34).

Leptin je hormon koji primarno nastaje u masnom tkivu, osobito supkutanom, te su njegove koncentracije proporcionalne količini masnog tkiva. Porast njegove koncentracije u krvi signalizira hipotalamusu sitost i dostatne energetske zalihe. U pretilosti se javlja rezistencija na leptin stoga centri za sitost u hipotalamusu unatoč velikoj količini masnog tkiva i leptina ne

reagiraju na informaciju o sitosti. Drugim riječima, središnji živčani sustav gladije dok je periferija tijela u stanju pretilosti. U slučaju kada i periferija tijela gladije, odnosno kod pothranjenosti, razine leptina u krvi su niske i hipotalamus prima informaciju o nedostatku hrane i energije (20, 35). Tada organizam nije spreman za reprodukciju. Leptin stimulira izlučivanje gonadotropina, a njegovim nedostatkom smanjuje se i izlučivanje gonadotropina koji su kod žena zaduženi za menstrualni ciklus. U uvjetima normalne tjelesne težine i reproduktivnog zdravlja, estrogen dodatno potiče proizvodnju leptina kod žena i povećava osjetljivost na leptin (20, 34). Ovariektomijom štakora smanjuje se razina leptina i povećava tjelesna masa, dok je dodatkom estrogena takav učinak poništen. Može se primijetiti da se ista stvar događa i ženama u postmenopauzi. Nedostatkom estrogena mijenja se konstitucija tijela zbog debljanja i preraspodjele masti iz supkutanog u visceralno skladište (36).

1.8. Mitochondriji u masnom tkivu

Mitochondriji su dinamični citoplazmatski organeli koji obavljaju mnogo različitih metaboličkih funkcija. Uz najvažniju ulogu, sintezu adenozin trifosfata, mitochondriji su uključeni u β -oksidaciju, razgradnju razgranatih aminokiselina, Krebsov ciklus te dekarboksilaciju piruvata (37). Građeni su od dvije membrane, vanjske i unutrašnje, intermembranskog prostora, kristi te matriksa. Osim što su izvor stanične energije, mitochondriji su zaduženi za termogenezu mehanizmom koji se naziva „curenje protona“. Protoni curenjem iz intermembranskog prostora u matriks smanjuju membranski potencijal stoga se umjesto energije stvara toplina. U tom procesu važnu ulogu igra mitochondrijski razvezujući protein 1 (engl. *uncoupling protein 1*, UCP1) koji povećava vodljivost unutrašnje mitochondrijske membrane i na taj način pospješuje generiranje topline umjesto proizvodnje adenozin trifosfata (38, 39).

Bijelo, smeđe i bež masno tkivo razlikuju se po količini i građi mitochondrija te izražaju UCP1 pa se tako razlikuju i njihove metaboličke funkcije. Bijelo masno tkivo kao primarno energetska skladište sadrži mali broj mitochondrija poguranih uz sam rub stanice dok mast zauzima većinski dio, a izražaj UCP1 je nezamjetan (39). Broj mitochondrija u smeđem masnom tkivu drastično je veći nego u bijelome, što odgovara termogenetskoj ulozi smeđeg masnog tkiva (40). Ti mitochondriji, osim brojnošću, dominiraju i veličinom te sadrže više krista što znači da su metabolički aktivniji. U bež masnom tkivu broj mitochondrija i izražaj UCP1 pozitivno koreliraju s izlaganjem hladnoći u skladu s njihovom funkcijom, adaptivnom termogenezom (38).

Izlaganje hladnoći jedan je od korištenih stresora u protokolu kroničnog stresa ovog rada. Za adekvatnu adaptaciju na takve hladne uvjete potrebni su funkcionalni mitohondriji koji će obavljati termogenezu. Utvrđeno je da isključivo sinteza novih mitohondrija nije dostatna za termogenu adaptaciju jer se kao posljedica termogeneze javljaju oštećenja i fragmentacije mitohondrija. Mitofagija (autofagija mitohondrija) je proces samorazgradnje i recikliranja vlastitih strukturnih dijelova gdje se degradiraju istrošeni i čuvaju funkcionalni dijelovi organela (41). S obzirom da je UCP1 jedini protein koji posreduje termogenezu u smeđem masnom tkivu, smatra se da indukcija mitofagije izazvane hladnoćom ovisi upravo o njemu. Aktivacija UCP1 dovodi do pojačanog zagrijavanja te iziskuje velike količine kisika što dovodi do hipoksije u smeđim adipocitima. U duljim hipoksičnim uvjetima mitofagija služi kao metabolički odgovor za sprječavanje stanične smrti. Iako je naglašena važnost mitofagije, za optimalan rad mitohondrija potrebna je ravnoteža mitofagije i sinteze (42).

Glukokortikoidi kao glavni činitelji HPA osi inhibiraju izražaj i aktivnost UCP1 u smeđim adipocitima. Primjena kortikosterona u štakora smanjuje termogenetsku aktivnost uz istovremeno povećanje lipida u smeđem masnom tkivu te tako narušava njegovu funkciju (43).

Starenje je također važan čimbenik koji utječe na mitohondrije. Aktivnost proteina koji su izraženi u mitohondrijima, UCP1, opada tijekom starenja što dovodi do smanjene termogeneze. Drugi razlog disfunkcije mitohondrija može biti nakupljanje mutacija mitohondrijske DNA i smanjenje biogeneze (44). Paralelno sa smanjenjem sadržaja i funkcije mitohondrija, javlja se „izbjeljivanje“ smeđeg masnog tkiva gdje masne kapljice zauzimaju prostor umjesto mitohondrija te boja adipocita prelazi iz karakteristične smeđe u bijelu (45).

1.9. Kolagen u masnom tkivu

Izvanstanični matriks masnog tkiva sadrži proteine koji reguliraju mehanička svojstva, adipogenezu i rast lipidnih kapljica. Najvažniji protein je kolagen, a razlikujemo više tipova od kojih je najvažniji kolagen tipa VI koji kao gradivna komponenta međustanične tvari masnog tkiva utječe na fleksibilnost i krutost adipocita. U normalnim uvjetima masno tkivo smatra se vezivom male gustoće i visoke plastičnosti (46). U stanju pretilosti te se karakteristike mogu promijeniti povećanjem sadržaja kolagena pa stanice postaju krute i nesposobne širiti se kako bi prihvale trigliceride koje je potrebno uskladištiti. Čini se kao da je to mehanizam kojim se adipociti suprotstavljaju prekomjernom širenju, ali i taj mehanizam ima svoje nesavršenosti. U situaciji gdje adipocit pokušava zaprimiti veće količine triglicerida, a rigidnost adipocita to onemogućava, stvara se pritisak na staničnu membranu što može uzrokovati nekrozu stanica

čime se pokreće upalni proces (47). No, unatoč općem mišljenju da pretilost nužno za posljedicu ima upalu masnog tkiva i inzulinsku rezistenciju, istraživanje na miševima pokazalo je da pretili miševi kojima nedostaje gen za kolagen VI alfa 3, tzv. *COL6A3*, imaju bolji metabolički fenotip i osjetljiviji su na inzulin u usporedbi s miševima divljeg tipa. C-terminalna domena odcijepljena od *COL6A3* proteina potiče fibrozu masnog tkiva i upalu. Dakle, pretilost sama po sebi nije rizičan čimbenik za metaboličke bolesti nego je to povećani izražaj kolagena (48, 49).

Smatra se da postoje najmanje tri posljedice povećanog izražaja kolagena VI u ljudskoj pretilosti, a to su: 1. pohrana masti u visceralnom skladištu zbog ograničenja skladištenja u supkutanom skladištu, 2. upala zbog hipoksije masnog tkiva, i 3. izravno povećanje upale masnog tkiva. Zanimljivo je da žene imaju manji izražaj *COL6A3* nego muškarci neovisno o indeksu tjelesne mase što dodatno objašnjava zašto su žene metabolički otpornije na bolest (49).

2. HIPOTEZA

Mlade ženske, za razliku od starih ženki, nakon izlaganja kroničnom stresu održat će stalni volumen masnih stanica.

3. CILJEVI

Ciljevi istraživanja su:

1. Usporediti volumen masnih stanica u bijelom masnom tkivu kontrolne skupine i skupine izložene stresu 6 odnosno 14,5 mjeseci starih ženki.
2. Usporediti količinu mitohondrija u smeđem masnom tkivu kontrolne skupine i skupine izložene stresu 6 odnosno 14,5 mjeseci starih ženki.
3. Usporediti količinu lipidnih kapljica u smeđem masnom tkivu kontrolne skupine i skupine izložene stresu 6 odnosno 14,5 mjeseci starih ženki.
4. Usporediti količinu kolagena u bijelom i smeđem masnom tkivu kontrolne skupine i skupine izložene stresu 6 odnosno 14,5 mjeseci starih ženki.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Studija je ustrojena kao studija parova. Životinje su podijeljene u dvije starosne skupine, a u svakoj skupini dodatno razlikujemo životinje izložene kroničnom stresu te kontrolnu skupinu životinja koja je izložena lažnom (*sham*) stresu.

4.2. Pokusne životinje

Istraživanje je provedeno na arhivi tkiva iz projekta Hrvatske zaklade za znanost (Patofiziološke posljedice promjena sastava lipidnih splavi, IP-2014-09-2324, voditeljice Marije Heffer) koje je prikupljeno u suradnji s RECOOP HST organizacijom (Cedars-Sinai Medical Center's International Research and Innovation in Medicine Program and the Association for Regional Cooperation in the Fields of Health, Science and Technology Young Scientists Research Grants: RECOOP # 001 BMYS RG Balog, "Impact of acute and chronic stress on cardiovascular diseases"). Dio studije je financiran institucijskim projektom (Lipidni profil metaboličkog stresa, IP9-2019, voditeljice Marije Heffer). Provođenje studije na mladim životinjama odobreno je od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek te nadležnog Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (klasa: 602-04/14-08/06, broj: 2158-61-07-14-118). Studija na starim životinjama, odobrena je od strane etičkog povjerenstva iz Mađarske (broj: CSI/01/3796-7/2015). Za ovaj dio istraživanja zatraženo je dodatno etičko odobrenje od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek koje je pozitivno riješeno (klasa: 602-04/20-08/07, broj: 2158-61-07-20-42).

U izvornu studiju uključeno je ukupno 80 životinja: 20 mladih i 20 starih ženki, te 20 mladih i 20 starih mužjaka. Tijekom eksperimenta uginula je jedna mlada ženka izložena kroničnom stresu (48). Ovo istraživanje obuhvaća masna tkiva 39 ženki Sprague Dawley štakora podijeljenih u 4 skupine: 1. kontrolna skupina mladih ženki (Mlade ženke K), 2. skupina mladih ženki izloženih stresu (Mlade ženke ST), 3. kontrolna skupina starih ženki (Stare ženke K), 4. skupina starih ženki izloženih stresu (Stare ženke ST). Mlade ženke u studiju su ušle s 3,5 mjeseci starosti, a stare ženke s 12 mjeseci. Eksperimentalni dio trajao je 10 tjedana. Protokol je organiziran u 3 ciklusa po 10 dana sa stankom od 2 tjedna između ciklusa kao što je prikazano na slikama 3 i 4. Stresirane skupine bile su izložene kroničnom stresu, a kontrolne skupine lažnom stresu.



Slika 3. Shematski prikaz protokola za stresirane (iznad) i kontrolne (ispod) skupine štakora.

Kontrolna skupina izložena je lažnom (*sham*) stresu koji podrazumijeva boravak u istom okolišu u kojem boravi skupina životinja izložena stresu, ali stresori su izostavljeni. Tom metodom je stresni učinak okoliša i rukovanja s životinjama jednak kod kontrolne skupine i skupine životinja izloženih stresu. Korišteni stresori nabrojani su u tablici 1 i djeluju na organizam na fizičkoj i psihološkoj razini. Mlade ženke bile su izlagane kroničnom stresu do navršenih 5,5 mjeseci starosti, a stare ženke do 14 mjeseci starosti. Cilj studije je detekcija dugotrajnih i nepovratnih posljedica na organizam pa je od zadnjeg izlaganja stresu do žrtvovanja bio predviđen period oporavka od 14 dana.

Tablica 1. Popis korištenih stresora u protokolu kroničnog stresa. Pribavljeno iz (50) uz dozvolu autora.

Br.	Stresor
1	Izlaganje svjetlu tijekom noći (12 sati)
2	Boravak kaveza sa štakorima na laboratorijskoj tresilici tijekom 40 minuta
3	Izlaganje zvukovima alarma mobilnog uređaja preko noći (12 sati)
4	Prisilno plivanje štakora u hladnoj vodi (12 do 14 °C) u trajanju od 3 minute
5	Imobilizacija štakora u metalnim tuljcima
6	Izlaganje hladnoći (4 do 8 °C) tijekom jednog sata
7	Test tolerancije na glukozu (TTG)
8	Test tolerancije na inzulin (TTI)
9	Gladovanje prije testova tolerancije na inzulin (3 do 4 sata prije testa) i glukozu (12 do 14 sati prije testa)

4.3. Metode

4.3.1. Fiksacija, uklapanje i rezanje tkiva

Životinje su žrtvovane u dobi od 6 mjeseci, odnosno 14,5 mjeseci kada su prikupljena tkiva. Žrtvovanje je izvršilo osoblje verificirano za rad s životinjama. Prikupljeno tkivo fiksirano je u 10 %-tnom puferiranom formalinu kroz 24 h na + 4 °C. Nakon toga uslijedila je priprema tkiva za uklapanje u parafin te samo uklapanje.

1. dan: tkivo je preko noći inkubirano u 1 × PBS-u (engl. *Phosphate-buffered saline*).
2. dan: tkivo je inkubirano na tresilici pri sobnoj temperaturi u sljedećim otopinama, redom:
 - a) destilirana voda – 30 min;
 - b) 25 % - tni etanol – 1 h;
 - c) 50 % - tni etanol – 1 h;
 - d) 70 % - tni etanol – 1 h;
 - e) svježi 70 % - tni etanol - preko noći.
3. dan: tkivo je inkubirano u sljedećim otopinama, redom:
 - a) 96 % - tni etanol – 1 h, na tresilici pri sobnoj temperaturi;
 - b) 100 % - tni etanol – 30 min, na tresilici pri sobnoj temperaturi;
 - c) 100 % - tni etanol – 30 min, na tresilici pri sobnoj temperaturi;
 - d) ksilen I – 30 min;
 - e) ksilen II – 30 min;
 - f) parafin I – 2 h, pri 58 °C;
 - g) parafin II – 2 h, pri 58 °C.

Zatim je uslijedilo uklapanje. Parafin je uliven u kalupe, tkivo je postavljeno na dno kalupa, a na vrh je stavljena oznaka. Parafinski blokovi ostavljeni su na sobnoj temperaturi preko noći kako bi se ohladili i očvrtnuli. Tkiva u parafinskim blokovima rezana su na Leica RM550 mikrotomu (Leica, Beč, Austrija) na debljinu od 5 µm. Uzorci su nakon rezanja navučeni na predmetna stakalca.

4.3.2. Histološka bojenja

Tri vrste masnog tkiva bojane su histološkim bojama. Bijelo masno tkivo (mezenterično i supkutano) bojano je hemalaun/eozinom u svrhu analize volumena adipocita, smeđe masno tkivo (interskapularno) bojano je hematoksilin fosfovolframskom kiselinom (engl. *phosphotungstic acid hematoxylin*, PTAH) radi vizualizacije mitohondrija i nakupina masnih kapljica, a pikrosirijus crveno bojenje primijenjeno je na sve tri vrste masnog tkiva zbog određivanje količine kolagenih vlakana.

Trima korištenim bojama prethodi deparafiniranje i rehidriranje tkivnih preparata u sljedećim otopinama, redom:

1. ksilen I – 12 min;
2. ksilen II – 12 min;
3. padajući gradijent alkohola:
 - a) 100 % - tni etanol;
 - b) 100 % - tni etanol;
 - c) 96 % - tni etanol;
 - d) 70 % - tni etanol;
4. destilirana voda – 2 min.

Hemalaun/eozin

Deparafinirani i rehidrirani tkivni preparati inkubirani su u sljedećim otopinama, redom:

1. hemalaun – 7 min;
2. destilirana voda – 5 s;
3. vodovodna voda – 10 min;
4. eozin – 3 min;
5. destilirana voda – 5 s;
6. rastući gradijent alkohola:
 - a) 70 % - tni etanol;
 - b) 96 % - tni etanol;
 - c) 100 % - tni etanol;
 - d) 100 % - tni etanol;
7. ksilen I – 5 min;
8. ksilen II – 5 min.

Vlažni preparati pokriveni su medijem za uklapanje (Histomount, National Diagnostics, Atlanta, GA, SAD; kataloški broj HS-103) i pokrovnicom te sušeni na zraku pri sobnoj temperaturi.

Hematoksin fosfovolframska kiselina

Deparafinirani i rehidrirani tkivni preparati inkubirani su u sljedećim otopinama, redom:

1. Langerova jodna otopina – 10 minuta;
2. destilirana voda – 5 s;

3. ispiranje 1 %-tnim natrijevim tiosulfatom – 5 min;
4. vodovodna voda – 5 min;
5. destilirana voda – 1 min;
6. PTAH – 2 h na 60 °C
7. rastući gradijent alkohola:
 - a) 95 % - tni etanol;
 - b) 95 % - tni etanol;
 - c) 100 % - tni etanol;
 - d) 100 % - tni etanol;
 - e) 100 % - tni etanol;
8. ksilen I – 5 min;
9. ksilen II – 5 min;

Vlažni preparati pokriveni su medijem za uklapanje (Histomount) i pokrovnicom te sušeni na zraku pri sobnoj temperaturi.

Langerova jodna otopina pripremljena je otapanjem joda (1 g) i kalijevog jodida (2 g) u 200 mL destilirane vode.

Pikrosirijus crvena boja

Deparafinirani i rehidrirani tkivni preparati inkubirani su u sljedećim otopinama, redom:

1. vodovodna voda – 10 min;
2. pikrosirijus crvena boja (30 min, pri sobnoj temperaturi);
3. dehidriranje 100 %-tnim etanolom;
4. ksilen I – 5 min;
5. ksilen II – 5 min.

Pikrosirijus crvena boja pripremljena je 48 sati prije upotrebe miješanjem pikrinske kiseline (90 mL) i 1 %-tne sirijus crvene F3BA boje (10 mL).

Histološki preparati fotografirani su pod mikroskopom (Zeiss Axio MOT 2, Jena, Germany) na ukupnom povećanju 400× s kamerom Olympus DP70 (Olympus, Tokio, Japan) i kvantificirani u programu Fiji (NIH, Bethesda, MD, SAD). Popis svih korištenih kemikalija te njihovi proizvođači i kataloški brojevi prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Popis korištenih kemikalija.

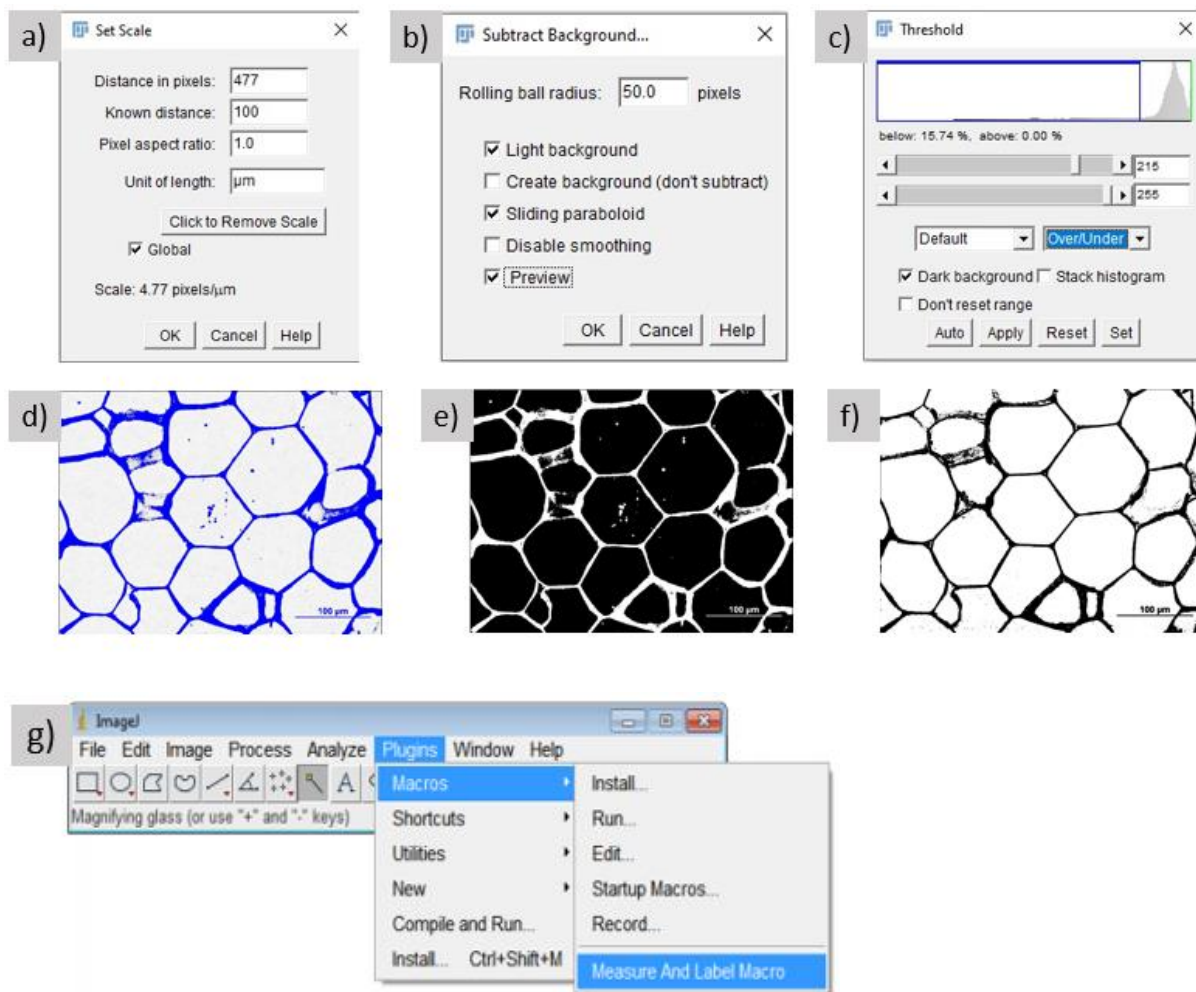
KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ (kataloški broj)
Natrijev klorid (NaCl)	Gram Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska; kat. br. P148590
Kalijev klorid (KCl)	VWR International, Radnor, PA, SAD; kat. br. 26764.260
Natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4)	Gram Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska; kat. br. P143710
Kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD; kat. br. P3786-100G
Paraformaldehid	Acros Organics, Geel, Belgium; kat. br. 416800250
Etanol, 100 % (Histanol 100)	Biognost (H100-1L, H100-116/19), Zagreb, Hrvatska
Etanol, 96 % (Histanol 96)	Biognost (H96-1L, H96-93/19), Zagreb, Hrvatska
Etanol, 70 % (Histanol 70)	Biognost (H70-1L, H70-35/19), Zagreb, Hrvatska
Ksilen (Xylene)	Carlo Erba (492301), Chaussée du Vexin, Francuska
Parafin	Merck, kat. br. 107164
Hematoksilin	Fluka, Buchs, Švicarska; kat. br. 51260
Natrijev jodat (NaIO_3)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD; kat. br. S-1147
Limunska kiselina	Acros Organics, Geel, Belgium; kat. br. 227130010
Kloral hidrat	Acros Organics, Geel, Belgium; CAS 302-17-0
Eozin Y	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD; kat. br. E4009-5G
Biomount DPX	Biognost (BM-500, BM-74/19), Zagreb, Hrvatska
Histomount	National Diagnostics (HS-103), Charlotte, Sjeverna Karolina, SAD
Jod	Kemika, Zagreb, Hrvatska;
Kalijev jodid (KI)	Gram Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska; kat. br. P130020
Fosfovolframska kiselina	Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD; kat. br. 1.00583.0100
Sirijus crvena F3BA	Magnacol Ltd.,
Pikrinska kiselina	Fluka, Buchs, Švicarska; kat. br.80452-250G

4.3.3. Računalna obrada

Kvantifikacija volumena masnih stanica bijelog masnog tkiva obojenog hemalaun eozinom napravljena je u kompjuterskom programu Fiji prema sljedećem protokolu:

1. Otvoriti sliku korištenjem alatne trake izbornika *File* → *Open* → odabrati željenu sliku.
2. Duplicirati sliku tako da se na odabranoj slici desnim klikom miša odabere naredba *Duplicate* nakon čega je potrebno imenovati dupliciranu sliku.
3. Kalibrirati sliku tako da se preko cijele dužine mjerne skale koja se nalazi na slici povuče ravna linija (*Straight line*) koja se odabire u alatnoj traci. U izborniku *Analyze* → *Set scale* potrebno je unijeti udaljenost u pikselima (*Distance in pixels*, udaljenost u pikselima koju predstavlja skala = 477), poznatu udaljenost (*Known distance*, udaljenost u mikrometrima koju predstavlja skala = 100 μm), omjer piksela (*Pixel aspect ratio* = 1), te mjernu jedinicu dužine (*Unit of length* = μm). Kako bi program primijenio opisanu kalibraciju na sve sljedeće slike potrebno je odabrati naredbu *Global* (slika 5a).
4. Sliku prevesti u 8-bitni oblik putem alatne trake izbornika *Image* → *Type* → *8-bit*.
5. Prema potrebi prilagoditi kontrast: *Image* → *Adjust* → *Brightness/Contrast*.
6. Oduzeti pozadinu putem izbornika *Process* → *Subtract Background*. Otvara se izbornik u kojemu se odaberu naredbe kao što je prikazano na slici (slika 5b).
7. Ukloniti pozadinske šumove preko izbornika *Process* → *Noise* → *Despeckle*.
8. Obilježiti membrane stanica podešavanjem praga: *Image* → *Adjust* → *Threshold*. U otvorenom izborniku prvu klizeću traku postaviti tako da su plavom bojom obojane samo stanične membrane (slika 5d). Drugu klizeću traku postaviti na 255. Ostatak naredbi postavlja se kao što je prikazano na slici (slika 5c), zatim se odabire *Apply*. Time dobivamo negativ slike u kojemu membrane stanica postaju bijele, dok je ostatak slike crne boje (slika 5e).
9. Konvertirati sliku u binarni oblik tako da se odabere izbornik *Process* → *Binary* → *Make Binary*. Time dobivamo pozitiv slike iz prethodnog koraka, tako da su membrane stanica obojane crne, a ostatak slike je bijele boje (slika 5f).
10. Kako bi se povećale granice, odabire se izbornik *Process* → *Binary* → *Dilate*. Tim postupkom podebljavaju se stanične membrane.
11. Sa stranice https://imagej.nih.gov/ij/macros/Measure_And_Label.txt kopirati makronaredbu.
12. Odabrati izbornik *Plugins* → *New* → *Macro*.
13. U prozor za unos teksta zalijepiti kopiranu makronaredbu i spremiti ju.

14. Nakon spremanja, datoteci dodati ekstenziju .txt.
15. Instalirati makronaredbu (*Plugins → Macros → Install*). Makronaredba će se pojaviti u izborniku.
16. Za određivanje površine stanice „čarobnim štapićem“ (*Wand*) označiti stanicu, zatim odabrati *Plugins → Macros → Measure And Label Macro* (slika 5g).
17. Unutar stanice će se pojaviti redni broj pod kojim se nalaze rezultati iste stanice, a rezultati će se pojaviti u prozoru s rezultatima.

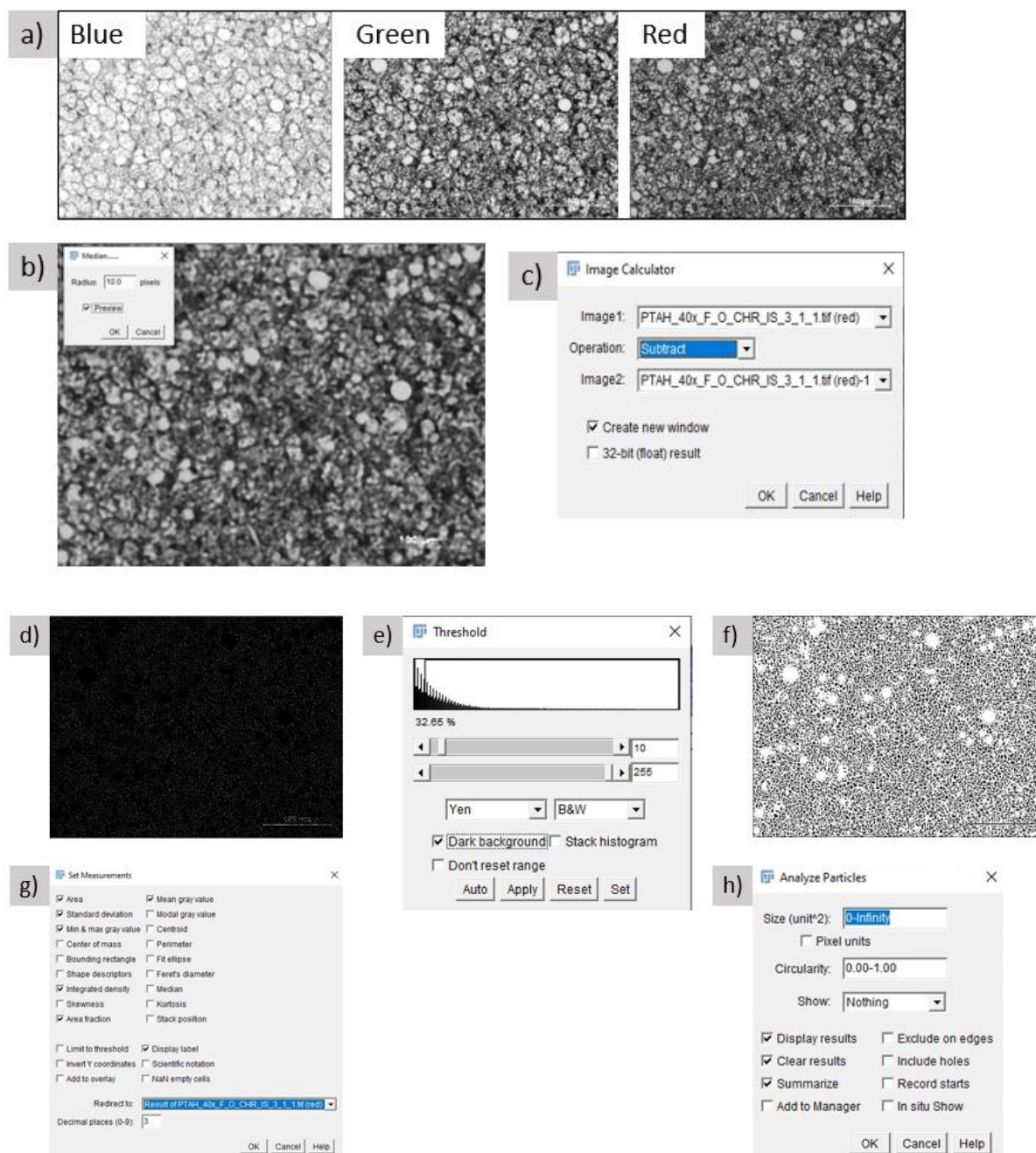


Slika 4. Koraci 1. – 16. postupka kvantifikacije volumena masnih stanica bijelog masnog tkiva. a) kalibracija slike; b) oduzimanje pozadine; c) obilježavanje membrana pomoću *Thresholda*; d) stanične membrane plave boje; e) negativ slike – membrane bijele boje; f) pozitiv slike – membrane crne boje; g) korištenje makronaredbe.

Kvantifikacija mitohondrija smeđeg masnog tkiva obojenog hematoksilin fosfovolframskom kiselinom napravljena je u kompjuterskom programu Fiji prema sljedećem protokolu:

1. Otvoriti sliku korištenjem alatne trake izbornika *File → Open →* odabrati željenu sliku.

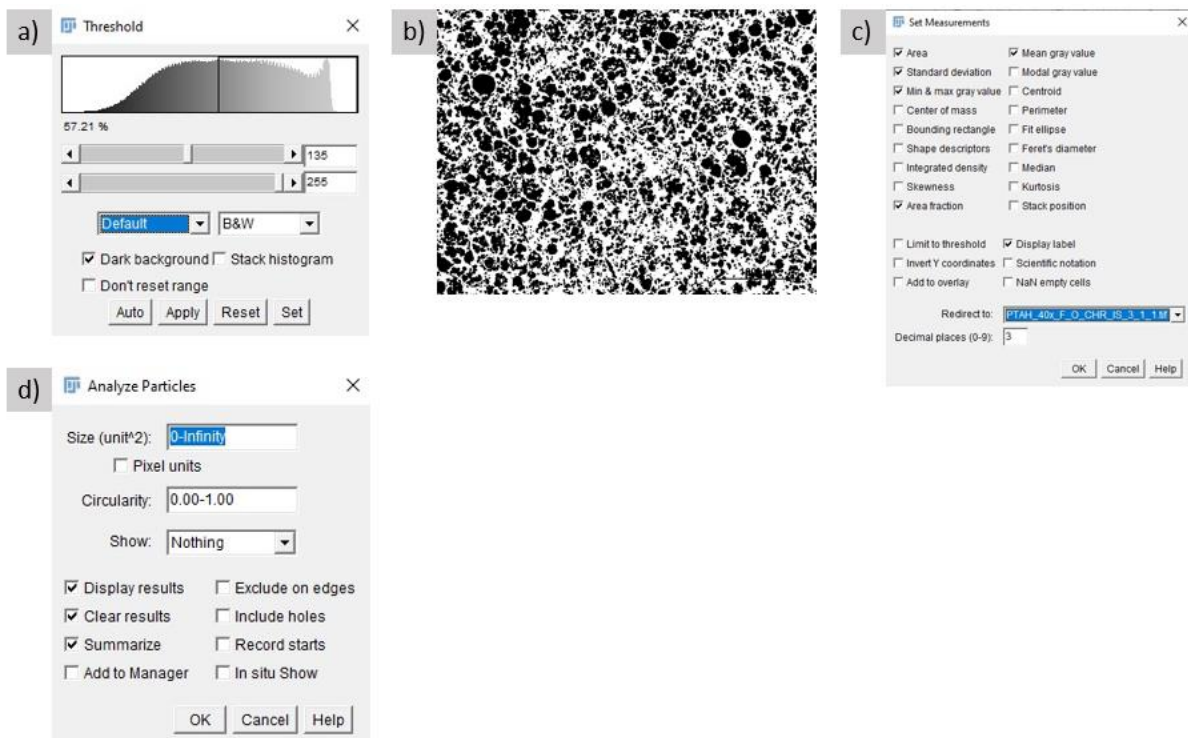
2. Kalibrirati sliku tako da se preko cijele dužine mjerne skale koja se nalazi na slici povuče ravna linija (*Straight line*) koja se odabire u alatnoj traci. U izborniku *Analyze* → *Set scale* potrebno je unijeti udaljenost u pikselima (*Distance in pixels*, udaljenost u pikselima koju predstavlja skala = 477), poznatu udaljenost (*Known distance*, udaljenost u mikrometrima koju predstavlja skala = 100 μm), omjer piksela (*Pixel aspect ratio* = 1), te mjernu jedinicu dužine (*Unit of length* = μm). Kako bi program primijenio opisanu kalibraciju na sve sljedeće slike potrebno je odabrati naredbu *Global*.
3. Sliku razdvojiti na tri kanala: crveni (eng. *red*), zeleni (eng. *green*) i plavi (eng. *blue*) (*Image* → *Color* → *Split Channels*) (slika 6a).
4. Zatvoriti sve kanale osim crvenog.
5. Duplicirati sliku crvenog kanala (desni klik miša na sliku → *Duplicate*), zatim odabrati ime pod kojim će se slika spremiti.
6. Slici oduzeti filter medijana (*Process* → *Filters* → *Median* s radijusom 10 piksela) (slika 6b).
7. Od početne slike crvenog kanala oduzeti sliku crvenog kanala sa filterom medijana (*Process* → *Image Calculator*) (slike 6c i 6d)
8. Obilježiti mitohondrije podešavanjem praga (*Image* → *Adjust* → *Threshold*). Parametre prilagoditi kao na slikama 6e i 6f .
9. Postaviti parametre za kvantifikaciju (*Analyze* → *Set Measurements* → parametre postaviti prema slici 6g).
10. Kvantificirati mitohondrije (*Analyze* → *Analyze particles* → odabrati parametre prema slici 6h).



Slika 5. Koraci 3. – 10. postupka kvantifikacije mitohondrija masnog tkiva. a) razdvajanje slike na plavi, zeleni i crveni kanal; b) oduzimanje filtera medijana; c) oduzimanje slike s filterom medijana od početne slike crvenog kanala; d) slika nakon oduzimanja; e) obilježavanje mitohondrija pomoću *Thresholda*; f) slika nakon postavljanja *Thresholda*; g) postavljanje parametara kvantifikacije; h) kvantifikacija mitohondrija.

Kvantifikacija masnih kapljica smeđeg masnog tkiva obojenog hematoksilin fosfovolframskom kiselinom napravljena je u kompjuterskom programu Fiji prema sljedećem protokolu:

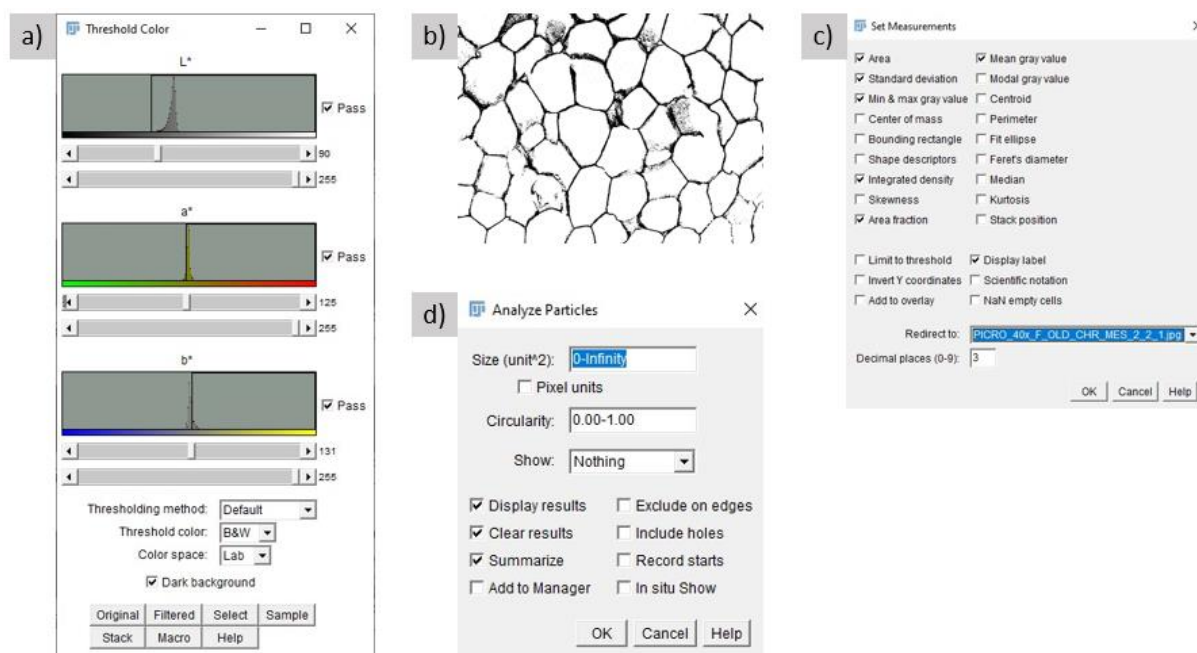
1. Otvoriti sliku korištenjem alatne trake izbornika *File* → *Open* → odabrati željenu sliku.
2. Duplicirati sliku tako da se na odabranoj slici desnim klikom miša odabere naredba *Duplicate* nakon čega je potrebno imenovati dupliciranu sliku.
3. Kalibrirati sliku tako da se preko cijele dužine mjerne skale koja se nalazi na slici povuče ravna linija (*Straight line*) koja se odabire u alatnoj traci. U izborniku *Analyze* → *Set scale* potrebno je unijeti udaljenost u pikselima (*Distance in pixels*, udaljenost u pikselima koju predstavlja skala = 477), poznatu udaljenost (*Known distance*, udaljenost u mikrometrima koju predstavlja skala = 100 μm), omjer piksela (*Pixel aspect ratio* = 1), te mjernu jedinicu dužine (*Unit of length* = μm). Kako bi program primijenio opisanu kalibraciju na sve sljedeće slike potrebno je odabrati naredbu *Global* (slika 7a).
4. Sliku prevesti u 8-bitni oblik putem alatne trake izbornika *Image* → *Type* → *8-bit*.
5. Obilježiti lipidne kapljice podešavanjem praga (*Image* → *Adjust* → *Threshold* → parametre podesiti kako je prikazano na slikama 7a i 7b).
6. Postaviti parametre za kvantifikaciju (*Analyze* → *Set Measurements* → parametre odabrati prema slici 7c).
7. Kvantificirati lipidne kapljice (*Analyze* → *Analyze Particles* → parametre prilagoditi prema slici 7d).



Slika 6. Koraci 5. – 7. postupka kvantifikacije lipidnih kapljica smeđeg masnog tkiva. a) obilježavanje lipidnih kapljica pomoću *Thresholda*; b) slika nakon postavljanja *Thresholda*; c) postavljanje parametara kvantifikacije; d) kvantifikacija lipidnih kapljica.

Kvantifikacija kolagenih vlakana bijelog i smeđeg masnog tkiva obojenog pikrosirijus crvenom bojom napravljena je u kompjuterskom programu Fiji prema sljedećem protokolu:

1. Otvoriti sliku korištenjem alatne trake izbornika *File* → *Open* → odabrati željenu sliku.
2. Duplicirati sliku tako da se na odabranoj slici desnim klikom miša odabere naredba *Duplicate* nakon čega je potrebno imenovati dupliciranu sliku.
3. Kalibrirati sliku tako da se preko cijele dužine mjerne skale koja se nalazi na slici povuče ravna linija (*Straight line*) koja se odabire u alatnoj traci. U izborniku *Analyze* → *Set scale* potrebno je unijeti udaljenost u pikselima (*Distance in pixels*, udaljenost u pikselima koju predstavlja skala = 477), poznatu udaljenost (*Known distance*, udaljenost u mikrometrima koju predstavlja skala = 100 μm), omjer piksela (*Pixel aspect ratio* = 1), te mjernu jedinicu dužine (*Unit of length* = μm). Kako bi program primijenio opisanu kalibraciju na sve sljedeće slike potrebno je odabrati naredbu *Global* (slika 8a).
4. Obilježiti kolagena vlakna podešavanjem praga (*Image* → *Adjust* → *Color Threshold* → parametre prilagoditi prema slikama 8a i 8b).
5. Ukloniti pozadinske šumove (*Process* → *Noise* → *Despeckle*).
6. Postaviti parametre za kvantifikaciju (*Analyze* → *Set Measurements* → parametre postaviti prema slici 8c).
7. Kvantificirati kolagena vlakna (*Analyze* → *Analyze particles* → odabrati parametre prema slici 8d).



Slika 7. Koraci 4. – 7. postupka kvantifikacije kolagenih vlakana bijelog i smeđeg masnog tkiva. a) obilježavanje kolagenih vlakana pomoću *Thresholda*; b) slika nakon postavljanja *Thresholda*; c) postavljanje parametara kvantifikacije; d) kvantifikacija kolagenih vlakana.

4.3.4. Statističke metode

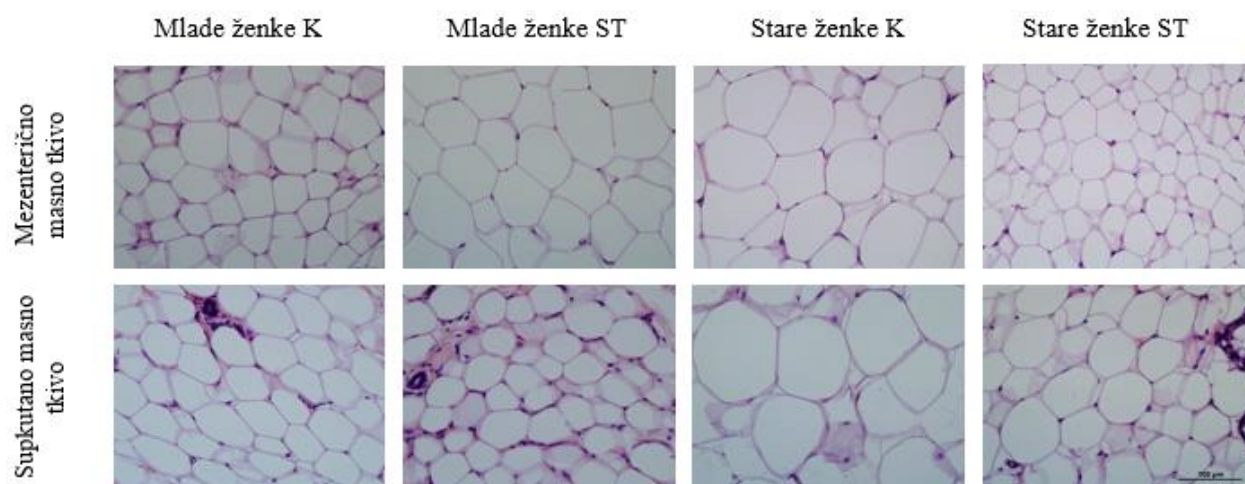
Podaci dobiveni kvantifikacijom slika obrađeni su u statističkom programu Past (inačica 4.03, Sveučilište u Oslu, Norveška) primjenom dvosmjerne analize varijance (ANOVA) kojom se ispitaio utjecaj dobi, izloženosti kroničnom stresu te interakcije ta dva čimbenika na promatrane parametre (volumen masnih stanica, udio mitohondrija, lipidnih kapljica i kolagenih vlakana). Daljnja značajnost podataka ispitana je post hoc Tukeyjevim testom. Vrijednost $p < 0,05$ uzeta je kao značajna.

5. REZULTATI

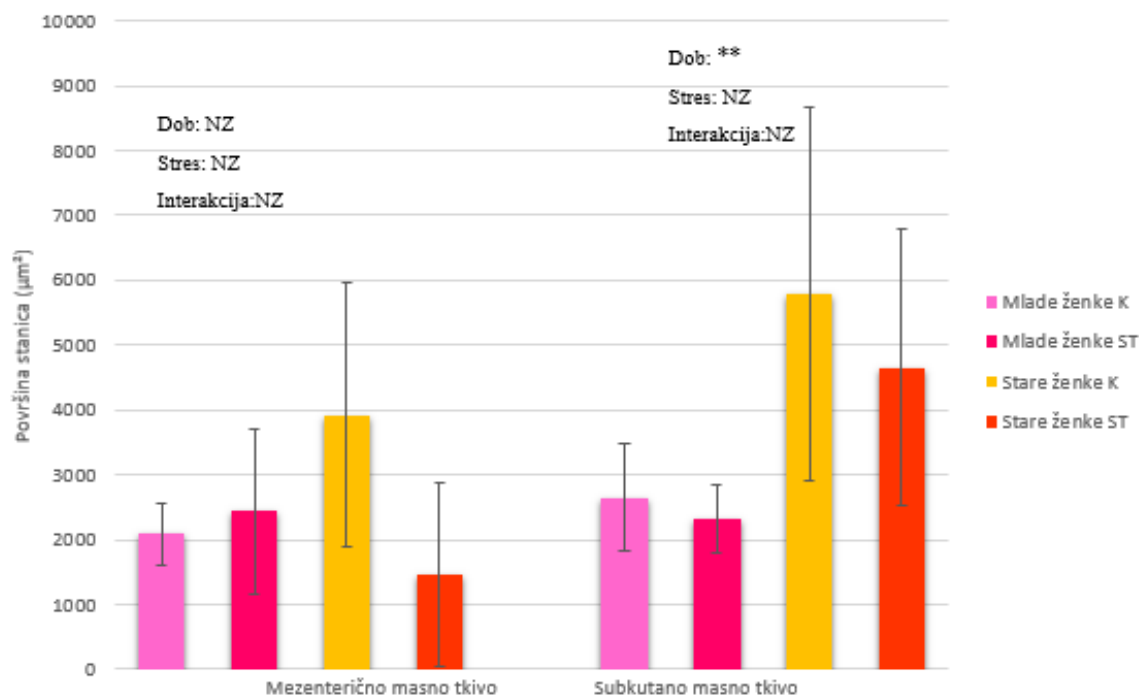
Korištenjem programa za obradu slika Fiji određena je površina adipocita, udio mitohondrija i lipidnih kapljica u adipocitima te udio kolagena u masnom tkivu.

Ovisnost volumena adipocita o dobi i utjecaju kroničnog stresa procijenjena je na mezenteričnom i supkutanom masnom tkivu. Rezultat histološkog bojenja navedenih tkiva prikazan je na slici 8. Prosječni volumeni adipocita prikazani su na slici 9.

Usporedbom površine adipocita u ispitivanim skupinama životinja, uočen je značajan utjecaj dobi na povećanje površine adipocita supkutanog masnog tkiva u starih ženki (dob, $p < 0,001$). Utjecaj kroničnog stresa nije bio značajan niti u jednoj skupini životinja, kao niti u jednoj vrsti masnog tkiva.



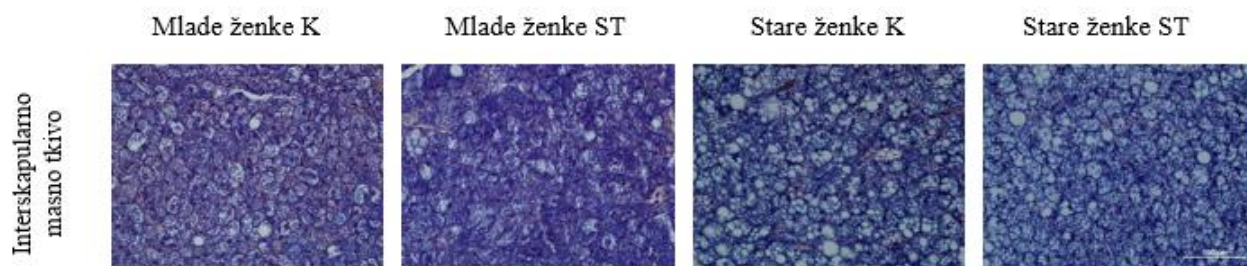
Slika 8. Prikaz rezultata bojenja hemalaun/eozinom mezenteričnog i supkutanog masnog tkiva kod mladih i starih ženki Sprague Dawley štakora izloženih kroničnom ili lažnom stresu. Ukupno povećanje 400×, veličina skale 100 μm. Opis kratica: K – kontrolna skupina; ST – kronični stres.



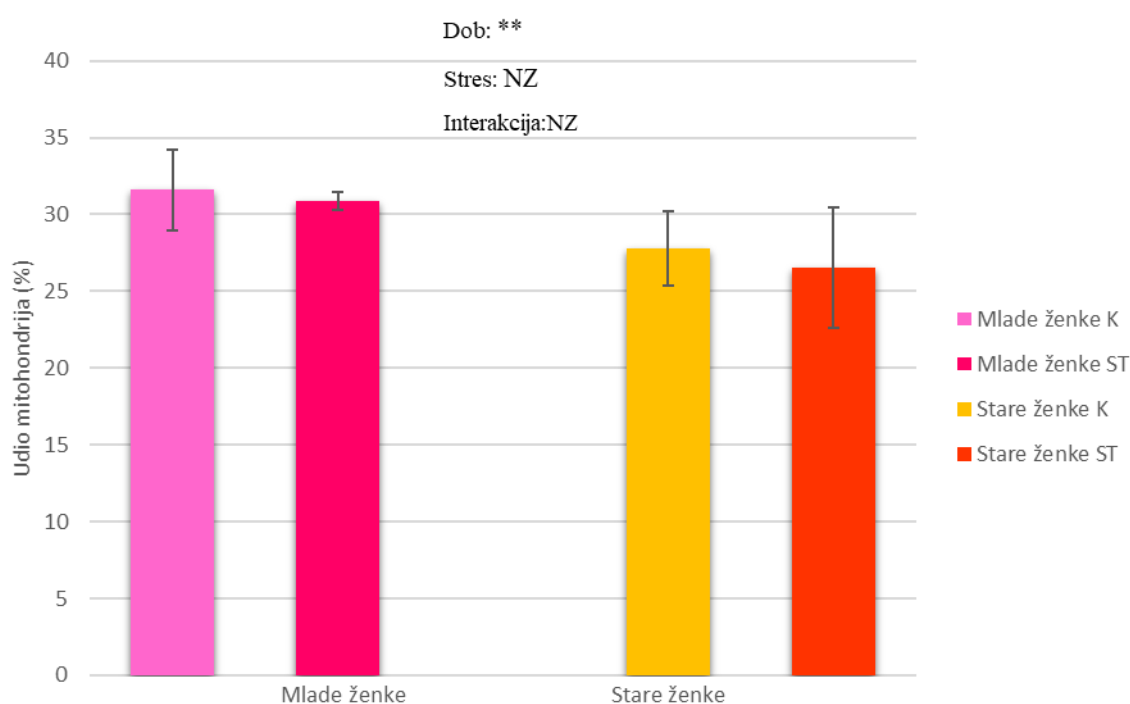
Slika 9. Kvantitativna analiza površine masnih stanica u mezenteričnom i supkutanom masnom tkivu ženskih štakora izloženih stresu i starenju. Za statističku analizu korištena je dvosmjerna analiza varijance (ANOVA), a vrijednost $p < 0,05$ smatra se značajnom. Razlika u utjecaju dobi na površinu stanica supkutanog masnog tkiva pokazala se značajnom: $F_{(1,149)} = 80,88$; $p < 0,001$. Značajni učinci dobi ili stresa i njihova interakcija obilježeni su kao * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) te kao NZ (nije značajno). Opis kratica: ST – kronični stres; K – kontrolna skupina.

Utjecaj dobi i kroničnog stresa na udio mitohondrija i masnih kapljica procijenjena je na interskapularnom masnom tkivu. Rezultat histološkog bojenja interskapularnog tkiva hematoksilin fosfovolframskom kiselinom prikazan je na slici 10. Prosječni udjeli mitohondrija prikazani su na slici 11. Prosječni udjeli masnih kapljica prikazani su na slici 12.

Kao i na volumen adipocita, značajan utjecaj na udio mitohondrija imala je samo starosna dob dok je utjecaj kroničnog stresa izostao. U starih ženki primijećen je manji udio mitohondrija u usporedbi sa mladim ženkama (dob, $p < 0,001$). Udio masnih kapljica se pod utjecajem dobi značajno povećao kod starih ženki (dob, $p = 0,035$). Kronični stres kao zaseban čimbenik nema značajan utjecaj na udio masnih kapljica. Međutim, udružen sa starenjem stres čini značajnu razliku kod mladih ženki izloženih stresu u odnosu na svoju kontrolnu skupinu te stare ženke izložene stresu. U usporedbi sa mladim ženkama pod utjecajem stresa, opaža se povećanje udjela masnih kapljica u pripadajućoj kontrolnoj skupini (interakcija, $p = 0,012$) te u skupini starih ženki pod utjecajem stresa (interakcija, $p < 0,001$).



Slika 10. Prikaz rezultata PTAH bojenja interskapularnog masnog tkiva kod mladih i starih ženki Sprague Dawley štakora izloženih kroničnom ili lažnom stresu. Ukupno povećanje 400×, veličina skale 100 μm. Opis kratica: K – kontrolna skupina; ST – kronični stres.



Slika 11. Kvantitativna analiza udjela mitohondrija u interskapularnom masnom tkivu ženskih štakora izloženih stresu i starenju. Za statističku analizu korištena je dvosmjerna analiza varijance (ANOVA), a vrijednost $p < 0,05$ smatra se značajnom. Razlika u dobi pokazala se značajnom $F_{(1,31)} = 19,05$; $p < 0,001$. Značajni učinci dobi ili stresa i njihova interakcija obilježeni su kao * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) te kao NZ (nije značajno). Opis kratica: ST – kronični stres; K – kontrolna skupina.



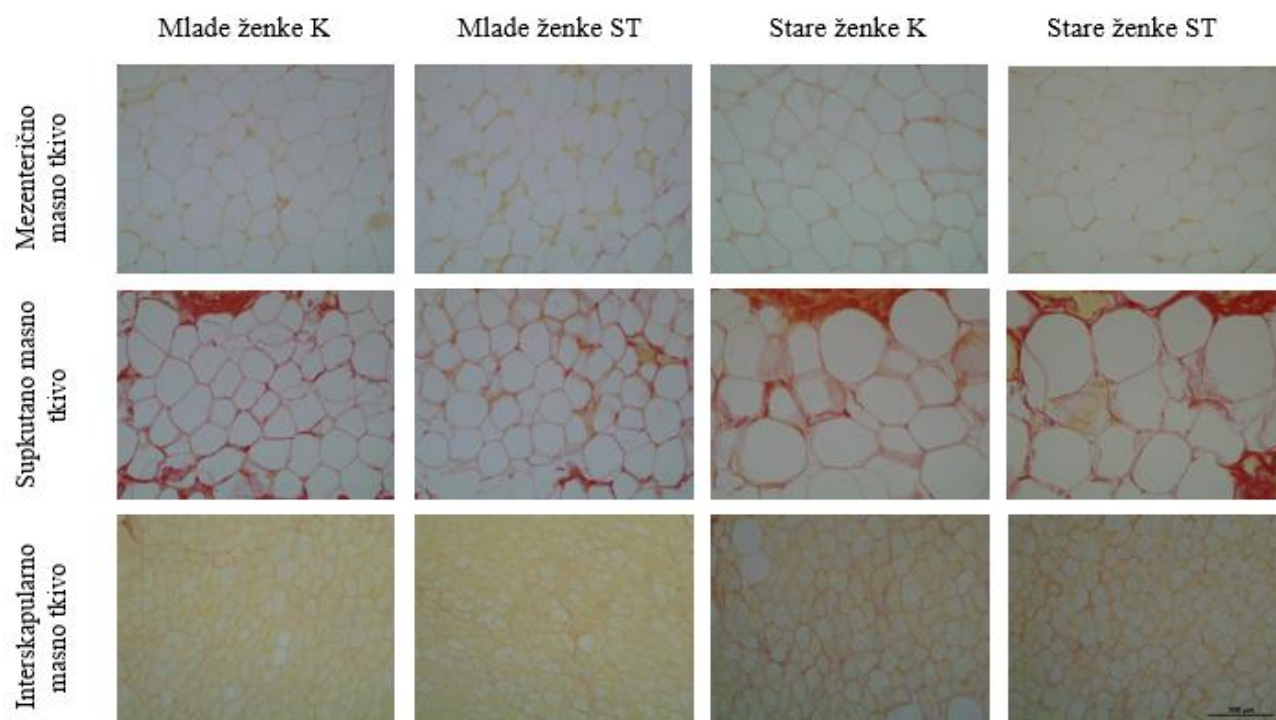
Slika 12. Kvantitativna analiza udjela masnih kapljica u interskapularnom masnom tkivu ženskih štakora izloženih stresu i starenju. Za statističku analizu korištena je dvosmjerna analiza varijance (ANOVA), a vrijednost $p < 0,05$ smatra se značajnom. U interskapularnom masnom tkivu značajan utjecaj imaju dob $F_{(1,31)} = 4,869$; $p = 0,035$, te interakcija dobi i izloženosti kroničnom stresu $F_{(1,31)} = 14,15$; $p = 0,001$. Značajni učinci dobi ili stresa i njihova interakcija obilježeni su kao * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) te kao NZ (nije značajno). Opis kratica: ST – kronični stres; K – kontrolna skupina.

Promjene udjela kolagena procijenjene se na sve tri vrste masnog tkiva. Rezultat histološkog bojenja pikrosirijus crvenom bojom prikazan je na slici 13. Prosječni udjeli kolagena prikazani su na slici 14.

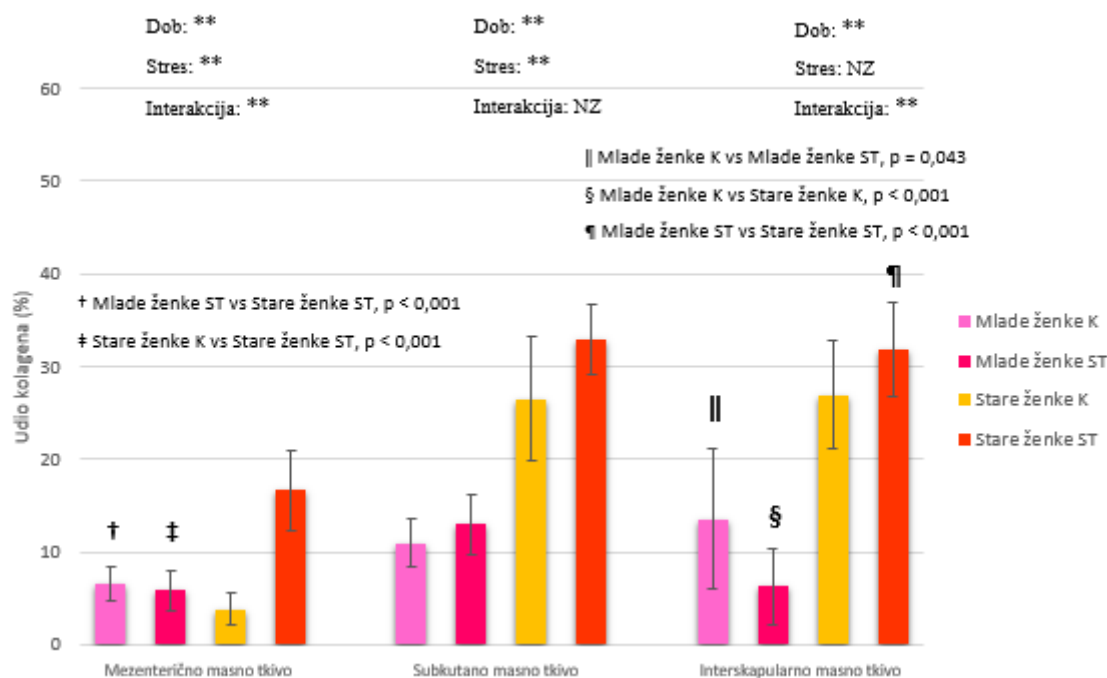
Udio kolagena mjeren je u mezenteričnom, supkutanom i interskapularnom masnom tkivu. Mezenterično masno tkivo pod utjecajem je starenja, stresa te njihove međusobne interakcije. Naime, kada se uspoređi sa mladim ženjkama pod utjecajem stresa, udio kolagena u masnom tkivu povećava se pod utjecajem dobi ($p < 0,001$) i stresa ($p < 0,001$) u skupini starih ženki izloženih stresu. Interaktivni učinak dva ispitivana čimbenika najviše povećava udio kolagena kod starih ženki izloženih stresu u odnosu na svoju kontrolnu skupinu (interakcija, $p < 0,001$) te u odnosu na mlade ženke izložene stresu (interakcija, $p < 0,001$).

Uspoređujući udio kolagena u supkutanom masnom tkivu ispitivanih skupina životinja zapaženo je povećanje sadržaja kolagena u kontrolnoj skupini i skupini starih ženki izloženih stresu u odnosu na pripadajuće skupine mladih ženki pod utjecajem dobi ($p < 0,001$) i stresa ($p = 0,001$).

U interskapularnom masnom tkivu udio kolagena također raste sa starosnom dobi, no kronični stres nema značajan utjecaj. Uočeno je povećanje udjela kolagena u obje skupine starih ženki u odnosu na mlade životinje (dob, $p < 0,001$). Međutim, stres i dob u interakciji ipak postižu značajan učinak. Uočava se smanjenje udjela kolagena kod mladih ženki izloženih stresu u odnosu na svoju kontrolnu skupinu (interakcija, $p = 0,043$) te stare ženke izložene stresu (interakcija, $p < 0,001$). Kod kontrolne skupine starih ženki primjećuje se povećanje udjela kolagena u odnosu na kontrolnu skupinu mladih ženki (interakcija, $p < 0,001$).



Slika 13. Prikaz rezultata pikrosirijus crvenog bojenja mezenteričnog, supkutanog i interskapularnog masnog tkiva kod mladih i starih ženki Sprague Dawley štakora izloženih kroničnom ili lažnom stresu. Ukupno povećanje $400\times$, veličina skale $100\ \mu\text{m}$. Opis kratica: K – kontrolna skupina; ST – kronični stres.



Slika 14. Kvantitativna analiza udjela kolagena u mezenteričnom, supkutanom i interskapularnom masnom tkivu ženskih štakora izloženih stresu i starenju. Za statističku analizu korištena je dvosmjerna analiza varijance (ANOVA), a vrijednost $p < 0,05$ smatra se značajnom. U mezenteričnom masnom tkivu značajan utjecaj imaju dob $F_{(1,34)} = 19,71$; $p < 0,001$, izloženost kroničnom stresu $F_{(1,34)} = 50,99$; $p < 0,001$ te njihova interakcija $F_{(1,34)} = 57,97$; $p < 0,001$. U supkutanom masnom tkivu značajan utjecaj imaju dob $F_{(1,34)} = 155,5$; $p < 0,001$ i izloženost kroničnom stresu $F_{(1,34)} = 13,65$; $p = 0,001$. U interskapularnom masnom tkivu značajan utjecaj imaju dob $F_{(1,33)} = 93,29$; $p < 0,001$ te interakcija dobi i izloženosti kroničnom stresu $F_{(1,33)} = 10,3$; $p = 0,003$. Značajni učinci dobi ili stresa i njihova interakcija obilježeni su kao * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) te kao NZ (nije značajno). Opis kratica: ST – kronični stres; K – kontrolna skupina.

6. RASPRAVA

U ovom diplomskom radu ispitan je dobno specifičan utjecaj kroničnog stresa i starenja na smeđe i bijelo masno tkivo ženki Sprague Dawley štakora. Utvrdili smo kako različite vrste masnog tkiva različito odgovaraju na starenje i stres što je važna spoznaja u kontekstu translacijske medicine.

U vrijeme ubrzanog načina života sve veći broj ljudi pati od kroničnog stresa, a posljedično i od bolesti koje su usko povezane uz stres. Hipertenzija, infarkt miokarda, šećerna bolest, bolesti štitnjače, gastritis, neurodermatitis i migrena samo su neke od njih. U stanju kroničnog stresa razine glukokortikoida u krvi neprimjereno dugo ostaju povišene te narušavaju tjelesnu homeostazu (2). Glukokortikoidi svoje receptore imaju u masnom tkivu, posebno visceralnom (2, 7). Poremećen metabolizam visceralnog masnog tkiva vežemo uz veći rizik za metaboličke bolesti i neplodnost stoga je za očuvanje vrste važno oduprijeti se velikim promjenama volumena i funkcije adipocita (11, 27).

Dobiveni rezultati su u skladu s očekivanjima. Naime, volumen adipocita se kod mladih ženki pod utjecajem stresa u odnosu na svoju kontrolnu skupinu nije značajno promijenio. Iako ženke na stres reagiraju različito ovisno prevladava li estrogen ili progesteron u fazi spolnog ciklusa u kojem se nalaze, ukupni rezultat djelovanja ženskih spolnih hormona je zaštita od metaboličkih bolesti kako bi mogle održati zdravu trudnoću (1, 11, 28). Pod utjecajem dobi volumen adipocita u mezenteričnom (visceralnom) masnom tkivu nije se promijenio. No, supkutani adipociti podliježu promjenama. Stare ženke kontrolne i skupine izložene stresu imaju povećane adipocite za razliku od skupina mladih životinja. Ranija istraživanja pokazala su da žene pod utjecajem estrogena radije nakupljaju supkutano nego visceralno masno tkivo, no prestankom zaštitnog djelovanja spolnih hormona očekuje se preraspodjela masnog tkiva iz supkutanog u visceralno skladište (36). Razlog zašto u starih životinja nije došlo do preraspodjele mogao bi biti nedovoljna dob te bi u budućim istraživanjima pomoglo korištenje još starije skupine životinja (iznad 14,5 mjeseci starosti).

Rezultati analize udjela mitohondrija u smeđem masnom tkivu pokazuju kako se starenjem udio mitohondrija smanjuje. Takav rezultat u skladu je s prijašnjim istraživanjima. Više je potencijalnih mehanizama za takvo smanjenje u staroj dobi. Primjerice, pad aktivnosti UCP1 i porast mutacija mitohondrijske DNA (44). No, korištenim metodama analize nije moguće utvrditi točan mehanizam stoga bi u budućim istraživanjima valjalo ispitati izražaj

UCP1 u smeđim adipocitima mladih i starih štakora. Udio mitohondrija se pod utjecajem stresa nije promijenio. Iako su štakori u stresnom protokolu bili izloženi hladnoći (4 °C) te bi se udio mitohondrija trebao povećati u svrhu adaptivne termogeneze (41), vrijeme izloženosti hladnoći možda je bilo nedovoljno za poticaj stvaranja novih mitohondrija.

Udio masnih kapljica se, u skladu s ranijim istraživanjima, povećao kod starih ženki u odnosu na mlade. Starenjem smeđe masno tkivo gubi svoju funkciju te smeđi adipociti doživljavaju tzv. „izbjeljivanje“. Njihove vakuole počinju ispunjavati lipidi, a količina mitohondrija opada pa tako gube svoju karakterističnu smeđu boju (45). Primjećeno je povećanje udjela masnih kapljica zbog sinergističkog djelovanja starenja i kroničnog stresa u skupinama starih ženki izloženih stresu i kontrolne skupine mladih ženki uspoređujući ih sa mladim ženkama izloženih stresu. Oslabljeni mehanizmi borbe protiv stresa te „izbjeljivanje“ smeđeg masnog tkiva mogli bi biti razlog povećanog udjela masnih kapljica kod starih ženki izloženih stresu. Iznenadjujuć je rezultat da mlade ženke izložene stresu u odnosu na svoju kontrolnu skupinu imaju manji udio masnih kapljica jer je očekivano upravo suprotno. S obzirom da kronični stres ili njegova interakcija sa starenjem nema utjecaj na udio mitohondrija u ovim skupinama, ne možemo tvrditi da glukokortikoidi u ovom slučaju utječu na smeđe adipocite uzevši u obzir pretpostavku da kortikosteron u štakora istovremenim smanjenjem termogenetske aktivnosti povećava sadržaj lipidnih kapljica. Kako bismo dobili točnije podatke, potrebno je prilagoditi stresni protokol tako da se produlji vrijeme izloženosti hladnoći te tako pojača adaptivni termogenetski odgovor koji će dati jasniji nedvojbjen rezultat.

Analizom udjela kolagena u bijelom masnom tkivu primijećen je isti trend kao i kod volumena adipocita. Naime, starenjem i posljedičnim povećanjem volumena adipocita udio kolagena u masnom tkivu povećava se kako bi spriječio daljnje širenje stanica (47). Nakon izlaganja stresu udio kolagena se povećao. U mezenteričnom masnom tkivu javlja se sinergistički učinak starenja i izlaganja kroničnom stresu. Učinak je sukladan prethodnom rezultatu. Stare ženke izložene stresu doživljavaju povećanje udjela kolagena u odnosu na svoju kontrolnu skupinu i mlade ženke izložene stresu. Kolagen smeđeg masnog tkiva pokazuje ovisnost u starenju, pa tako starije ženke imaju povećan udio kolagena u odnosu na mlade ženke. Rezultat interakcije starenja i kroničnog stresa povećan je sadržaj kolagena u skupinama starih ženki, a takav ishod je očekivan kada se u obzir uzme prethodni rezultat. U kontrolnoj skupini mladih ženki bilježi se porast udjela kolagena u odnosu na skupinu izloženu stresu. Možemo reći da je takav rezultat iznimka i posljedica interferencije tijekom kvantifikacije. Naime, na slikama histoloških preparata pri velikom povećanju jasno je vidljiva prisutnost

bijelog masnog tkiva koje umanjuje udio smeđeg masnog tkiva u kadru, a samim time i lažno umanjuje udio kolagena smeđeg masnog tkiva. Za precizniju kvantifikaciju potrebno je izolirati smeđe masno tkivo na slici i ponoviti analizu.

Kronični stres postaje jedan od glavnih uzroka bolesti modernog doba, a snažno utječe na masno tkivo. Masno tkivo kao najveći endokrini organ ima utjecaj na različite organske sustave i stoga mu je potrebno posvetiti posebnu pažnju (20). Istraživanje povezanosti masnog tkiva i kroničnog stresa uz prirodni proces starenja važno je za bolje razumijevanje, prevenciju i liječenje Cushingovog i metaboličkog sindroma, poremećaja štitnjače, plodnosti, kardiovaskularnog i gastrointestinalnog sustava.

Opisano istraživanje prvo je koje je ispitalo utjecaj kroničnog stresa na sadržaj kolagena u masnom tkivu ženki štakora, kao i usporedbu dvije različite dobne skupine. Između ostalog, istraživanje obuhvaća utjecaj kroničnog stresa i starenja na bijelo i smeđe masno tkivo, konkretno na volumen adipocita, udio mitohondrija i masnih kapljica te udio kolagena. Naglasak se stavlja na spol animalnih modela jer većina istraživanja ne uzima u obzir ženke i kompleksni utjecaj njihovih spolnih hormona na čitavu fiziologiju.

7. ZAKLJUČCI

1. Mlade ženke su nakon izlaganja kroničnom stresu održale stalni volumen bijelih masnih stanica dok se kod starih ženki volumen povećao.
2. Starenjem se smanjuje udio mitohondrija u smeđem masnom tkivu. Kronični stres ne utječe na udio mitohondrija.
3. Starenjem se povećava udio masnih kapljica u smeđem masnom tkivu.
4. Starenjem se povećava udio kolagena u bijelom i smeđem masnom tkivu. Dodatno, kronični stres povećava udio kolagena kod starih ženki.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Usporediti površinu masnih stanica, količinu mitohondrija, masnih kapljica i kolagena u masnom tkivu ženki Sprague Dawley štakora u dobi od 6 odnosno 14,5 mjeseci koji su bili izloženi kroničnom ili lažnom (*sham*) stresu.

Nacrt studije: Studija je ustrojena kao studija parova. Uspoređene su ženke štakora izložene kroničnom stresu sa ženkama koje su izložene lažnom (*sham*) stresu. Također, uspoređene su mlade i stare ženke.

Materijali i metode: U studiji su korištena tri masna tkiva (mezenterično, supkutano i interskapularno masno tkivo) koja su prikupljena od ukupno 39 životinja (19 mladih ženki štakora – 9 mladih ženki izloženih kroničnom stresu i 10 mladih kontrolnih životinja; 20 starih ženki štakora – 10 starih ženki izloženih kroničnom stresu i 10 starih kontrolnih životinja). Tkiva su bojena trima histološkim bojama (hemalaun/eozin, hematoksilin fosfovolframska kiselina i pikrosirijus crvena boja) te je učinjena kvantifikacija.

Rezultati: Izloženost kroničnom stresu u starih životinja značajno je utjecala na povećanje površine masnih stanica, dok je kod mladih životinja volumen stanica ostao nepromijenjen. Pod utjecajem starenja udio mitohondrija se smanjio, a udio lipidnih kapljica povećao u skupini starih ženki. Udio kolagena u smeđem i bijelom masnom tkivu povećao se kod starih ženki pod utjecajem starenja. Također, povećao se u bijelom masnom tkivu pod utjecajem stresa u obje dobne skupine.

Zaključak: Kronični stres utječe na volumen masnih stanica starih životinja. Udio mitohondrija i masnih kapljica ovisan je o dobi. Starenjem se udio mitohondrija smanjuje, a udio masnih kapljica povećava. Povećanje udjela kolagena ovisno je o kombinaciji starenja i kroničnog stresa.

Ključne riječi: kolagen; kronični stres; masne kapljice; mitohondriji; starenje; volumen masnih stanica.

9. SUMMARY

Influence of chronic stress on adipose tissue structure in young and old Sprague Dawley female rats

Objectives: The aim of the study was to compare the surface area of adipocytes, the amount of mitochondria, lipid droplets and collagen in the adipose tissues of two age groups (6 and 14.5 months) of female Sprague Dawley rats that were exposed to chronic or sham stress.

Study design: The study was organized as a study of couples. Female rats exposed to chronic stress were statistically compared to females exposed to sham stress. Also, young and old females were compared statistically.

Materials and methods: The study used three types of adipose tissues – mesenteric, subcutaneous and interscapular adipose tissue – collected from a total of 39 animals (19 young female rats - 9 young females exposed to chronic stress and 10 young control animals; 20 old female rats - 10 old females exposed to chronic stress and 10 old control animals). Tissues were stained with three histological stains (hemalaun / eosin, hematoxylin phosphotungstic acid, and Picrosirius red) and quantified in ImageJ (FIJI) software.

Results: Exposure to chronic stress in older animals significantly affected the increase in adipocytes surface area, while in young animals the cell volume remained unchanged. Aging caused the decrease of mitochondria content, and increase of lipid droplets content in the older female animal group. The content of collagen in brown and white adipose tissues increased in older females as an effect of aging. Moreover, collagen content increased in white adipose tissue as an effect of stress in both age groups.

Conclusion: Chronic stress affects the volume of adipocytes of old animals. The amount of mitochondria and lipid droplets is age dependent. With age, the content of mitochondria decreases and the content of fat droplets increases. The increase in collagen content depends on a combination of aging and chronic stress.

Keywords: collagen; chronic stress; lipid droplets; mitochondria; aging; adipocytes size.

10. LITERATURA

1. Oyola MG, Handa RJ. Hypothalamic–pituitary–adrenal and hypothalamic–pituitary–gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress*. 2017.
2. Kyrou I, Chrousos GP, Tsigos C. Stress, Visceral Obesity, and Metabolic Complications. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006;1083:77–110.
3. Kyrou I, Tsigos C. Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9:787–793.
4. Selye H. The General Adaptation Syndrome And The Diseases Of Adaptation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1946;6:117-230.
5. Bose M, Oliván B, Laferrere B. Stress and obesity: the role of the hypothalamic pituitary–adrenal axis in metabolic disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2009;16:340–346.
6. Lamb DH. On the distinction between physical and psychological stressors. *Motiv Emot.* 1979;3:51–61.
7. Kyrou I, Tsigos C. Chronic stress, visceral obesity and gonadal dysfunction. *Hormones.* 2008;7(4):287-293.
8. Williams TG, Edwards L. Chronic Stress and the HPA Axis: Clinical Assessment and Therapeutic Considerations. *The Standard.* 2010;9:1-12.
9. Garabedian MJ, Harris CA, Jeanneteau F. Glucocorticoid receptor action in metabolic and neuronal function [version 1; referees: 3 approved]. *F1000Research.* 2017;6:1208.
10. Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A, Dallman MF. Chronic Stress Promotes Palatable Feeding, which Reduces Signs of Stress: Feedforward and Feedback Effects of Chronic Stress. *Endocrinology.* 2004;145(8):3754–3762.
11. Goel N, Workman JL, Lee TT, Innala L, Viau V. Sex Differences in the HPA Axis. *Compr Physiol.* 2014;4:1121-1155.
12. van den Beukel JC, Grefhorst A, Quarta C, Steenbergen J, Mastroberardino PG, Lombes M i sur. *FASEB J.* 2014;28:4857-4867.
13. Rebuffe-Scrive M, Walsh UA, McEwen B, Rodin J. Effect of Chronic Stress and Exogenous Glucocorticoids on Regional Fat Distribution and Metabolism. *Physiol Behav.* 1992;52:583-590.
14. Desarzens F, Faresse N. Adipocyte glucocorticoid receptor has a minor contribution in adipose tissue growth. *J Endocrinol.* 2016;230:1–11.

15. de Kloet AD, Herman JP. Fat-Brain Connections: Adipocyte Glucocorticoid Control of Stress and Metabolism. *Front Endocrinol.* 2018;48:50-57.
16. Oakley RH, Cidlowski JA. The Biology of the Glucocorticoid Receptor: New Signaling Mechanisms in Health and Disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132(5):1033–1044.
17. Rabasa C, Dickson SL. Impact of stress on metabolism and energy balance. *Curr Opin Behav Sci.* 2016;9:71–77.
18. Scott KA, Melhorn SJ, Sakai RR. Effects of Chronic Social Stress on Obesity. *Curr Obes Rep.* 2012;1:16–25.
19. Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, la Fleur SE, Gomez F, Houshyar H i sur. Chronic stress and obesity: A new view of „comfort food“. *PNAS.* 2003;100(20):11696-11701.
20. Bohler H, Mokshagundam S, Winters SJ. Adipose tissue and reproduction in women. *Fertil Steril.* 2010;94(3):795-825.
21. Wronska A, Kmiec Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol.* 2012;205:194–208.
22. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc.* 2001; 60:329-339.
23. Cinti S. The Adipose Organ. *Adipose Tissue in Health and Disease.* pp.3-19. 2007.
24. Mulya A, Kirwan P. Brown and Beige Adipose Tissue: Therapy for Obesity and Its Comorbidities? *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2016;45(3):605–621.
25. Zuriaga MA, Fuster JJ, Gokce N, Walsh K. Humans and Mice Display Opposing Patterns of “Brownin“ Gene Expression in Visceral and Subcutaneous White Adipose Tissue Depots. *Front Cardiovasc Med.* 2017;4:27.
26. Chusyd DE, Wang D, Huffman DM, Nagy TR. Relationships between Rodent white Adipose Fat Pads and Human white Adipose Fat Depots. *Front Nutr.* 2016;3:10.
27. Norgan NG. The beneficial effects of body fat and adipose tissue in humans. *Int J Obes.* 1997;21:738-746.
28. Bourke CH, Harrell CS, Neigh GN. Stress-induced sex differences: Adaptations mediated by the glucocorticoid receptor. *Horm Behav.* 2012;62:210–218.
29. Lotan A, Lifschytz T, Wolf G, Keller S, Ben-Ari H, Tatarsky P i sur. Differential effects of chronic stress in young-adult and old female mice: cognitive-behavioral manifestations and neurobiological correlates. *Mol Psychiatry.* 2008; 23:1432–1445.

30. Bowman RE, Maclusky NJ, Diaz SE, Zrull MC, Luine VN. Aged rats: Sex differences and responses to chronic stress. *Brain Res.* 2006;1126:156-166.
31. Riegle GD. Chronic Stress Effects on Adrenocortical Responsiveness in Young and Aged Rats. *Neuroendocrinology.* 1973;1-10.
32. Kirkland JL, Tchkonja T, Pirtskhalava T, Han J, Karagiannides I. Adipogenesis and aging: does aging make fat go MAD? *Exp Gerontol.* 2002;37:757-767.
33. Xu X, Hoebeke J, Bjorntorp P. Progesterone Binds To The Glucocorticoid Receptor And Mediates Antigluco-corticoid Effect In Rat Adipose Precursor Cells. *J Steroid Biochem.* 1990;36(5):465-471.
34. Mattsson C, Olsson T. Estrogens and Glucocorticoid Hormones in Adipose Tissue Metabolism. *Curr Med Chem.* 2007;14:2918-2924.
35. Fuente-Martin E, Argente-Arizón P, Ros P, Argente J, Chowen JA. Sex differences in adipose tissue. *Adipocyte.* 2013;2(3):128–134.
36. Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev.* 2010;11:11-18.
37. Cedikova M, Kripnerova M, Dvorakova J, Pitule P, Grundmanova M, Babuska V i sur. Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes. *Stem Cells Int.* 2016.
38. Lee JH, Park A, Oh KJ, Lee SC, Kim WK, Bae KH. The Role of Adipose Tissue Mitochondria: Regulation of Mitochondrial Function for the Treatment of Metabolic Diseases. *Int J Mol Sci.* 2019;20:4924.
39. Sidossis LS, Porter C, Saraf MK, Hawkins HK, Toliver-Kinski T, Herndon DN. Browning of Subcutaneous White Adipose Tissue in Humans after Severe Adrenergic Stress. *Cell Metab.* 2015;22:219–227.
40. Fedorenko A, Lishko PV, Kirichok Y. Mechanism of Fatty-Acid-Dependent UCP1 Uncoupling in Brown Fat Mitochondria. *Cell.* 2012;151:400–413.
41. Ding WX, Yin XM. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol Chem.* 2012;393(7):547–564.
42. Lu Y, Fujioka H, Joshi D, Li Q, Sangwung P, Hsieh P i sur. Mitophagy is required for brown adipose tissue mitochondrial homeostasis during cold challenge. *Sci Rep.* 2018;8:8251.
43. Lee MJ, Pramyothin P, Karastergiou K, Fried SK. Deconstructing the roles of glucocorticoids in adipose tissue biology and the development of central obesity. *Biochim Biophys Acta.* 2013.

44. Zoico E, Rubele S, De Caro A, Nori N, Mazzali G, Fantin F i sur. Brown and Beige Adipose Tissue and Aging. *Front. Endocrinol.* 2019;10:368.
45. Ferreira Goncalves L, Queiroz Manchado T, Castro-Pinheiro, Guimaraes de Souza N, Jesus Oliveira K, Fernandes-Santos C. Ageing is associated with brown adipose tissue remodelling and loss of white fat browning in female C57BL/6 mice. *Int J Exp Pathol.* 2017;98(2):100–108.
46. Khan T, Muise ES, Iyengar P, Wang ZV, Chandalia M, Abate N i sur. Metabolic Dysregulation and Adipose Tissue Fibrosis: Role of Collagen VI. *Mol Cell Biol.* 2009;29(6):1575-1591.
47. Munoz A, Abate N, Chandalia M. Adipose Tissue Collagen and Inflammation in Nonobese Asian Indian Men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(8):1360-1363.
48. Buecher C, Krautbauer S, Eisinger K. Adipose tissue fibrosis. *World J Diabetes.* 2015;6(4):548-553.
49. Pasarica M, Gowronska-Kozak B, Burk D, Remedios I, Hymel D, Gimble J i sur. Adipose Tissue Collagen VI in Obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(12):5155–5162.
50. Balog M. Utjecaj kroničnoga stresa i starenja na lipidne splavi moždanih stanica u štakora. 2019.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Ljiljana Majić

Datum i mjesto rođenja: 28. siječnja 1997., Vinkovci

Adresa stanovanja: Matije Gupca 59, 32284 Stari Mikanovci

Kontakt: 095/918-1879

E-mail: majic.ljilja79@gmail.com

Obrazovanje:

2018. – 2021. Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Osijek

2015. – 2018. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Osijek

2011. – 2015. Opća gimnazija, Gimnazija Matije Antuna Reljkovića Vinkovci

2003. – 2011. Osnovna škola Stjepana Cvrkovića u Starim Mikanovcima

Sudjelovanje na projektima, kongresima i volontiranje:

2020. – 2. Osječki studentski kongres – OSCON, 13. – 14. 2. 2020.

2019. – kongresno izlaganje, 14. „Bridges in life“ internacionalna konferencija RECOOP HST udruženja (poster) i 2. Internacionalna studentska konferencija u Bratislavi, Slovačka: „2nd RECPOOP-KFSD International Student Conference“ (predavanje), 10. – 14. 4. 2019.

2019. – volonter na 18. Tjednu mozga održanim pod temom „Inteligencija životinja“, Osijek, Hrvatska, 11. – 17. 3. 2019.

Sažeci u zbornicima i časopisima:

1. **Majić, Ljiljana;** Balog, Marta; Mikulec, Katarina; Lulić, Doris; Ivić, Vedrana; Heffer, Marija. Chronic stress alters expression of insulin and leptin receptors in the brain of aged male rats. RECOOP 14th Bridges in Life Sciences and 2nd RECOOP-KFSD

- International Student Conference 2019 Abstract Book. Vari, Sandor G. (ur.). Bratislava, Slovačka, 2019. str. 39-39 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni);
2. Mikulec, Katarina; **Majić, Ljiljana**; Zjalić, Milorad; Heffer, Marija. Changes in iron metabolism in the brain and liver of Sprague-Dawley rats exposed to fatty and sweet food. 2nd RECPOOP-KFSD International Student Conference Book of Abstracts. Bratislava, Slovačka, 2019. str. 15-15 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).