Ekspresija markera upale u masnom tkivu mužjaka Sprague Dawley štakora nakon kroničnog stresa

Kovač, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:340002

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Ivana Kovač

EKSPRESIJA MARKERA UPALE U MASNOM TKIVU ŽENKI SPRAGUE DAWLEY ŠTAKORA NAKON KRONIČNOG STRESA

Završni rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Ivana Kovač

EKSPRESIJA MARKERA UPALE U MASNOM TKIVU ŽENKI SPRAGUE DAWLEY ŠTAKORA NAKON KRONIČNOG STRESA

Završni rad

Osijek, 2017.

Rad je izrađen u Laboratoriju za neurobiologiju na Medicinskom fakultetu u Osijeku.

Mentorica rada: prof. dr. sc. Marija Heffer

Rad ima 34 radna lista i 8 slika.

***ZAHVALE**:*

Zahvaljujem prof. dr. sc. Mariji Heffer na prihvaćanju mentorstva, strpljenju, vremenu, dostupnosti, novim spoznajama te pomoći i savjetima u izradi ovoga rada.

Zahvaljujem i Miloradu Zjaliću na strpljenju i vremenu te upoznavanju s radom u laboratoriju.

Zahvaljujem također svojoj obitelji i dečku Mateju na beskrajnoj podršci i ljubavi u vrijeme studiranja.

Velika hvala i mojim prijateljima na pomoći i savjetima.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA III

1. UVOD 1

1.1. Stres 1

1.1.1. Razlikovanje eustresa i distresa 1

1.1.2. Stresni odgovor 2

1.1.3. Kronični stres 5

1.1.4. "Hrana za utjehu" 6

1.2. Masno tkivo 6

1.2.1. Visceralno masno tkivo 7

1.2.1.1. Mezenteričko masno tkivo 8

1.2.2. Upala u masnom tkivu 8

1.2.2.1. Uloga makrofaga u razvoju upale masnog tkiva 9

1.2.2.2. Nastanak fibroze masnog tkiva 10

2. HIPOTEZA 11

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 12

4. MATERIJALI I METODE 13

4.1. Ustroj studije 13

4.2. Materijali 13

4.3. Metode 13

4.3.1. Određivanje površine pojedinih adipocita 14

4.3.2. Određivanje stupnja upale 14

4.4. Statističke metode 16

5. REZULTATI 17

5.1. Rezultati analize površine pojedinih adipocita 17

5.2. Rezultati analize stupnja upale 18

6. RASPRAVA 23

7. ZAKLJUČAK 27

8. SAŽETAK 28

9. SUMMARY 29

10. LITERATURA 30

11. ŽIVOTOPIS 34

POPIS KRATICA

ACTH – adrenokortikotropni hormon

ANGPTL – protein sličan angiopoietinu (engl. *angiopoietin-like*)

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

CD – biljeg stanične diferencijacije (engl. *cluster of differentiation*)

CSF – čimbenik stimulacije kolonije (engl. *colony stimulating factor*)

GAS – opći adaptacijski sindrom (engl. *general adaptational syndrome*)

GLUT – transporter glukoze

HPA os – os hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda

HRZZ – Hrvatska zaklada za znanost

IFN - interferon

IL – interleukin

MCP – monocitni kemoprivlačni protein (engl. *monocyte chemoattractant protein*)

MCSF – čimbenik stimulacije kolonije makrofaga (engl. *macrophage colony stimulating factor*)

MIF – čimbenik inhibicije migracije makrofaga (engl. *macrophage inhibitory factor*)

MAPK – mitogenom aktivirana protein-kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase*)

NO – dušikov monoksid (engl. *nitric oxide*)

PAI – inhibitor aktivatora plazminogena (engl. *plasminogen activator inhibitor*)

PBS – fosfatni pufer (engl. *phosphate buffered saline*)

ROS – reaktivni kisikovi spojevi (engl. *reactive oxygen species*)

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

TGF – čimbenik rasta tumora (engl. *tumor growth factor*)

Th1 – stanična imunost

Th2 – humoralna imunost

TNF – čimbenik nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*)

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

VEGF – čimbenik rasta vaskularnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor)*

1. UVOD

1.1. Stres

Stres je sastavni dio života i fiziološki poticaj za adaptaciju. Potpuno oslobađanje od stresa značilo bi uklanjanje interakcije s okolinom pa je, zapravo, nespojivo sa životom (1). Doživljaj stresa je subjektivan i ovisi samo o procjeni i prethodnom iskustvu (2).

1.1.1. Razlikovanje eustresa i distresa

Termin stres upotrebljavao se i prije pojave znanosti. U 14. stoljeću njime se označuju teškoće, tegobe ili nesretne okolnosti. U znanstvenu upotrebu prvi put ulazi u kontekstu fizikalnih znanosti u 17. stoljeću, dok se u 19. stoljeću pojavljuje i u medicini, gdje se identificira kao uzrok bolesti. Danas se stres definira kao tjelesna ili mentalna napetost koju izazivaju čimbenici koji mijenjaju postojeću ravnotežu organizma (3).

Današnje shvaćanje stresa počinje eksperimentima Waltera B. Cannona. Proces koji održava unutarnju stabilnost usprkos promjenama vanjske okoline Cannon naziva homeostazom (ravnotežom). Organizam na stanje unutarnje neravnoteže odgovara ili promjenom ponašanja – kojim se mijenja okolina – ili promjenom metaboličkih i drugih tjelesnih procesa s pomoću autonomno živčanih i endokrinih mehanizama. Cannon jasno navodi da neispravljanje tjelesne neravnoteže, odnosno nedostatak prikladnog odgovora koji unutarnji okoliš vraća u stanje ravnoteže, može uzrokovati ozljedu tkiva ili čak smrt (3). Iz toga proizlazi jedna od današnjih definicija stresa prema kojoj je on stvarna ili percipirana prijetnja homeostazi ili dobrobiti organizma (4).

Nezaobilazni istraživač u povijesti konceptualizacije stresa jest i Hans Selye. Selye se prvi sustavno koristi konceptom stresa u svrhu razumijevanja fizioloških regulatornih odgovora na prijetnje organizmu. Za njega je stres tjelesni odgovor na bilo koji podražaj koji ozbiljno prijeti ravnoteži organizma, za što se danas uporabljuje termin stresni odgovor. Podražaje koji uzrokuju stresni odgovor naziva stresorima (3). Učinkoviti stresni odgovor – eustres – brz je i samoograničavajući te potpuno reverzibilan. Neprimjereni stresni odgovor, preslab ili prejak, može ostaviti posljedice pa se naziva distresom.

U novijim konceptualizacijama stresa ističe se da se prilagodba organizma može pojaviti na nekoliko razina: staničnoj, organskoj, sustavnoj ili na višim razinama integracije. Kada npr. niža razina sustava više nije u mogućnosti kompenzirati okolišne promjene, aktivira se kontrola na višoj razini. Ona može uključivati svjesnost o postojanju problema, procjenu težine problema, razmišljanje o načinima suočavanja s problemom i promjene u ponašanju kojima se kompenzira postojeća neravnoteža (3).

1.1.2. Stresni odgovor

Od početka vremena, organizmi su podvrgnuti evolucijskom pritisku. Sposobnost da odgovore na prijetnje iz okoliša ili stresore, poput napada grabežljivaca ili prirodne katastrofe, poboljšava preživljenje. Suvremeni se ljudi malokad susreću s mnogim stresorima koji su zahtijevali fiziološki odgovor njihovim predcima, no ljudski fiziološki odgovori nastavljaju odražavati zahtjeve prijašnjeg okoliša. Tako prijetnje koje ne zahtijevaju fiziološki odgovor (poput ispita) mogu imati fiziološke posljedice (5).

Selye je pretpostavio da organizam na prijetnju, ozljedu ili samo na fiziološki izazov odgovara istim sklopom općih nespecifičnih reakcija koje je nazvao „općim adaptacijskim sindromom“ ili GAS-om (engl. *general adaptational syndrome*). On je „opći“ jer je odgovor na različite stresne podražaje i ima opći učinak na mnoge tjelesne sustave, a „adaptivan“ jer aktivira obranu, prilagođuje fiziologiju danim okolnostima te započinje obnavljanje organizma. Opisuje se u tri faze:

1) Reakcija alarma – može trajati od nekoliko sati do nekoliko dana. Na samom početku te faze tjelesna je obrana na nižoj razini učinkovitosti od potrebne (slika 1.). Ovo osjete sustavi koji održavaju homeostazu i nastupa mobilizacija tjelesnih resursa, odnosno povećava se aktivnost nadbubrežne žlijezde, kardiovaskularna i respiratorna funkcija.
2) Faza otpora – nastupa pri kontinuiranom izlaganju bilo kojemu stresnom podražaju. Već u fazi alarma povećana je razina glukokortikoida u krvotoku i organizam se prilagođuje na stres te se koristi svim rezervama za prilagodbu. Tijekom faze otpora otpornost na podražaj koji je izazvao stres relativno je konstantan, ali se smanjuje otpornost na druge podražaje.
3) Faza iscrpljenja – nastupa pri dugoročnom izlaganju stresnim podražajima i u njoj se postupno snizuje postignuta adaptacija i konačno nastupa iscrpljenje. U toj fazi neuroendokrini sustav ima smanjeni kapacitet za izlučivanje obrambenih hormona pa

imunosni sustav funkcionira smanjenom učinkovitošću. Organizam tada postaje ranjiviji na bolesti, a u nekim slučajevima može nastupiti i smrt. Treba napomenuti da faza iscrpljenja nije nužna i neizbježna. Naime, stresni podražaj najčešće prestaje djelovati prije nego što organizam dođe do te faze ili organizam, koristeći se učinkovitim strategijama suočavanja, smanjuje ili eliminira stresne podražaje. Pojava tjelesnih poremećaja nakon faze iscrpljenja ovisi o biološkim predispozicijama organizma (3).

Limbički sustav mozga tumači iskustva kao prijeteća ili neprijeteća određujući ponašanje i fiziološke odgovore na svaku situaciju. Osim hipotalamusa i moždanog debla koji su nužni za autonomne i neuroendokrine reakcije na stresore, veća kognitivna područja mozga imaju ključnu ulogu u pamćenju, anksioznosti i odlučivanju. Ta područja mozga ciljevi su stresa i hormona stresa, a akutni i kronični učinci stresnih iskustava utječu na to kako reagiraju (6).

Dakle, organizam reagira na stres stvaranjem fiziološkog odgovora, ili stresnim reakcijama, kako bi povratio ravnotežu izgubljenu utjecajem stresora (7). Organizmu je potrebna normalna reakcija na stres, jer su nedovoljna ili prekomjerna aktivacija hormonskog i autonomnoga živčanog sustava štetne za zdravlje (6).

Selye je stresnu reakciju pripisao aktivaciji sustava koji se sastoji od hipotalamusa, prednjeg režnja hipofize i kore nadbubrežnih žlijezda, danas poznat kao os hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (HPA os). Stresori koji djeluju na neuralne krugove potiču izlučivanje adrenokortikotropnog hormona (ACTH) iz prednjeg režnja hipofize, ACTH potom potiče lučenje glukokortikoida iz kore nadbubrežne žlijezde, a glukokortikoidi izazivaju mnoge učinke stresne reakcije (8). Citokini proizvedeni imunološkim stanicama ili adipocitima mogu također stimulirati HPA os na razini hipotalamusa, adenohipofize ili kore nadbubrežnih žlijezda (7).

Razina glukokortikoida u krvi je najčešća fiziološka mjera jačine stresa (8). Glavni glukokortikoid u ljudi jest kortizol, dok je u životinja dominantan kortikosteron. Razine glukokortikoida reagiraju unutar minuta na različite fizičke (trauma, kirurški zahvat, vježba) i psihološke stresove (uznemirenost, depresija), a jaki stimulansi lučenja mogu biti i hipoglikemija te temperatura. U odsutnosti glukokortikoida takvi stresovi mogu prouzročiti hipotenziju, šok i smrt (9). Glukokortikoidi izravno utječu na metabolizam masnoga tkiva, razdiobu energije i djelovanje inzulina (10). Oni podižu razinu glukoze u krvi djelujući kao antagonisti inzulina, smanjujući mu lučenje. Na taj je način inhibiran ulaz glukoze u periferna tkiva i potaknuta sinteza glukoze u jetri (glukoneogeneza). Utječu na mobilizaciju masnih

kiselina aktiviranjem stanične lipaze preko hormona koji mobiliziraju lipide (npr. katekolamini i peptidi hipofize) (9). Osim toga, glukokortikoidi potiskuju termogenezu i induciraju otpornost na leptin (10). Djelovanje kortizola na masno tkivo varira u različitim dijelovima tijela. Na primjer, količina se perifernoga masnoga tkiva smanjuje, dok se abdominalna i interskapularna količina masti može povećati (9). Tako su kronično povišeni glukokortikoidi povezani s povećanom visceralnom adipoznošću koja se može pojaviti neovisno o promjenama tjelesne težine. Glukokortikoidi imaju i protuupalne učinke: prekidaju rane stadije upalnog procesa i prije nego što upala započne, a, ako je upala već počela, djeluju na njezino brzo povlačenje te ubrzavaju cijeljenje (11).

Stresori djeluju i na simpatički živčani sustav te dolazi do izlučivanja adrenalina iz srži nadbubrežne žlijezde, a noradrenalina na okrajinama simpatičkoga živčanog sustava (8). Zbog toga se povećava brzina otkucaja srca i disanja, krv se preusmjeruje u mišiće te se oslobađaju zalihe masti, što organizam priprema, kako je Cannon rekao, na borbu ili bijeg (engl. *fight or flight*) (2).

Selyejeva otkrića stresne reakcije pokazala su mehanizam kojim psihički čimbenici mogu izazivati ili utjecati na tjelesne bolesti: sve vrste uobičajenih psiholoških stresora (npr. gubitak posla, priprema za ispit, prekid intimnog odnosa) povezane su s visokom razinom glukokortikoida, adrenalina i noradrenalina u krvi, što je povezano s mnogim tjelesnim poremećajima (npr. povećani krvni tlak, srčani napadi i dijabetes) (8). U životinja stresnu reakciju češće mogu uzrokovati skučen prostor, nedostatak hrane i vode, nagla promjena svjetla, postavljanje u vodu, naginjanje kaveza, kao i socijalni porazi kada se osjećaju ugroženo (33).

Stres ne mora nužno voditi u bolest. Bilo koja vrsta normalne ljudske aktivnosti, kao što je npr. igranje šaha ili zagrljaj, može izazvati znatan stres bez uzrokovanja štetnih posljedica. Stresori mogu imati i pozitivne učinke, podižu snagu, motiviraju za daljnju akciju i podižu osjećaj zdravlja (1). Tako npr. sportaši, veliki učitelji i vođe napreduju i postaju sve uspješniji kada imaju nekakav izazov. No, intenzivan i dugotrajan stres može uzrokovati mentalne i fizičke posljedice (2).

Jačina stresne reakcije ovisi ne samo o obilježjima stresora i osobinama pojedinca nego i o strategijama kojima se pojedinac koristi u suočavanju sa stresom. Primjerice, u ispitivanju žena koje čekaju operaciju zbog mogućeg raka dojke, jačina stresa bila je niža kod žena koje su sebe

natjerale da o svojoj bolesti razmišljaju na određeni način. One koje su se uvjerile da nemaju rak, da će njihove molbe Bogu biti uslišene ili da je zabrinutost štetna, imale su slabiji stres (8).

1.1.3. Kronični stres

Kronični stresni događaji uključuju životne teškoće koje traju duže vrijeme ili se učestalo ponavljaju tijekom dužeg razdoblja ili je pak posrijedi suočavanje s nekoliko stresora (3). Akutni stres aktivira adaptivne reakcije, dok prekomjerni, kronični stres rezultira „trošenjem" adaptivnih regulatornih sustava. Naime, regulatorni sustavi trebaju vrijeme za regeneraciju pa, ako ono izostane, prilagodljivost je manja, što povećava rizik od trajne homeostatske disregulacije (12, 7). Kroničnim stresom uzrokovana disfunkcija HPA osi dovodi do kronično povišenih glukokortikoida, što je povezano s visceralnom adipoznošću (4).

Stres je veliki energetski izazov za organizam, pa ne iznenađuje njegovo djelovanje na regulaciju unosa hrane i energetsku ravnotežu. Na primjer, u nekih je ljudi stres povezan s povećanim unosom hrane i razvojem pretilosti, dok u drugih ljudi stres smanjuje unos hrane i tjelesnu težinu. Čimbenici koji pridonose ovoj razlici u unosu hrane jesu učestalost i intenzitet izlaganja stresoru. Na primjer, stresori visokog intenziteta koji uključuju stvarne prijetnje homeostazi (npr. vojna vježba, nedavno žrtva nasilja) često su povezani s anoreksijom, smanjenim tekom i smanjenom tjelesnom težinom. Nasuprot tomu, hiperfagija se često pojavljuje kod stresora koji su manje intenzivni i uključuju više psiholoških prijetnji, tzv. svakodnevni životni stresori poput škole, rada i međuljudskih odnosa (7).

Kronični nepredvidljivi blagi stres postupak je koji se radi na životinjama kako bi se vidjelo kako stres utječe na njihovo ponašanje i fiziologiju. U tipičnom eksperimentu miševi ili štakori povremeno su izloženi kombinaciji od najmanje dva blaga stresora, npr. osvjetljenje preko noći, razdoblja nedostatka hrane i/ili vode, nagib kaveza, promjena partnera u kavezu, koji se mijenjaju svakih nekoliko sati tijekom nekoliko tjedana ili mjeseci (36). Tako kronično stresirane životinje pokazuju slične promjene kao i ljudi (34). Kod manje intenzivnih, ali ponavljanih stresora, uz povećanu razinu kortikosterona u cirkulaciji, pokazuje se i u manjoj mjeri povećanje tjelesne mase (35).

1.1.4. „Hrana za utjehu”

Uzimanje hrane može biti sredstvo ublaživanja psihičke napetosti (11). Pretpostavlja se da visoko ukusna hrana (slana, masna i umami) služi kao utjeha, odnosno samomedikacija koja ima za cilj ukloniti ili umanjiti tjeskobu. Pojedinci u negativnim afektivnim stanjima favoriziraju hedonističku hranu s visokom razinom šećera i/ili masti, dok tijekom sretnih stanja konzumiraju manje ukusnu hranu (7). U skladu s tom idejom, unos ukusne, visokougljikohidratne hrane povezan je s poboljšanim raspoloženjem, smanjenom percepcijom stresa i smanjenom koncentracijom kortizola u krvi (13).

Slične promjene u unosu ukusne hrane uočene su u glodavaca tijekom stresa. Kada se štakorima ponudi hrana koja je vrlo ukusna (npr. mast, saharoza) i manje ukusna hrana, odabiru veću porciju ukusne hrane. Kada su glodavci izloženi kroničnom stresu, obično konzumiraju ukusnu hranu, a smanjuje se unos manje ukusne hrane. Povišen unos ukusne hrane u glodavaca povezan je sa smanjenim indeksima stresa. Takvo olakšanje može biti prolazno ili privremeno ako se izlaganje stresu nastavi. Zato kontinuirano izlaganje stresu općenito dovodi do povećane aktivacije HPA osi, koja zauzvrat može održati unos ukusne hrane i promicati pretilost (13).

1.2. Masno tkivo

Masno ili adipozno tkivo posebna je vrsta vezivnoga tkiva u kojem prevladavaju masne stanice ili adipociti (lat. *adeps*, mast + grč. *kytos*, stanica), stanice specijalizirane za pohranu neutralnih masti ili za proizvodnju topline (14). Osim adipocita, masno tkivo sadržava i endotelne stanice, makrofage i fibroblaste (stromalna frakcija) (15). Masno tkivo je najveće spremište energije (u obliku triglicerida) u tijelu. Ono se nalazi u neprestanoj mijeni i osjetljivo je na živčane i hormonske utjecaje. Mast slabo provodi toplinu pa zato sudjeluje u toplinskoj izolaciji tijela. Masno tkivo ispunjava prostore između drugih tkiva i tako pomaže učvršćivanju organa na njihovim položajima. Bogato je vaskularizirano (14). Aktivni je endokrini organ te izvor citokina, poput TNF-α (engl. *tumor necrosis factor- α*), interleukina te adipokina adiponektina, leptina i grelina. Ovi medijatori imaju proupalnu, protuupalnu ili ulogu u kontroli teka, ovisno o stanjima tijekom njihova otpuštanja. Cirkulirajuće razine adipokina u pretilih osoba nisu regulirane, što može dovesti do patofiziologije bolesti povezanih s debljinom (16). Postoje dvije vrste masnoga tkiva, koje se razlikuju po smještaju, građi, boji i patološkim promjenama: bijelo masno tkivo i smeđe masno tkivo (14). Regionalna raspodjela tjelesne masti posebno je obilježje spolne diferencijacije. Žene općenito imaju veći postotak masti u

organizmu nego muškarci. Usto, više žena razvije perifernu adipoznost, s preferencijom nakupljanja masti u glutealnoj regiji, dok su muškarci skloniji abdominalnoj i visceralnoj pretilosti (17).

Masno tkivo je u glodavaca , kao i u ljudi, organ s više skladišta. Međutim, za razliku od ljudi, koji imaju dva glavna potkožna skladišta masti, u abdominalnoj i gluteofemoralnoj regiji, u glodavaca su ona smještena anteriorno (između lopatica, spuštaju se od vrata do aksile) i posteriorno (proteže se od dorzolumbalne do glutealne regije). Osim toga, potkožno masno tkivo glodavaca odvojeno je slojem glatkih mišića od kožnoga masnog tkiva. Nadalje, visceralno masno tkivo glodavaca nalazi se u perigonadalnoj regiji, retroperitonealno na bubrezima, a mezenterijska mast, koja je anatomski i biološki najsličnija ljudskoj, nalazi se uzduž crijevnoga trakta (37).

1.2.1. Visceralno masno tkivo

Visceralno masno tkivo (engl. *visceral adipose tissue,* VAT) nalazi se u intraabdominalnim šupljinama i oko unutarnjih organa. Između VAT-a i potkožnoga masnog tkiva (engl. *subcutaneous adipose tissue,* SAT) postoji stanična, molekularna, funkcionalna, klinička i prognostička razlika. Anatomski, VAT je najviše prisutno u mezenteriju i omentumu te je izravno kroz portalnu cirkulaciju povezano s jetrom. U usporedbi sa SAT-om, VAT je prokrvljenije, s više živčanih okrajina, sadržava veći broj upalnih i imunoloških stanica, ima manji kapacitet diferencijacije preadipocita u adipocite i veći postotak velikih adipocita. VAT ima više glukokortikoidnih i androgenih receptora. Također, adipociti VAT-a metabolički su aktivniji, osjetljiviji na lipolizu te otporniji na inzulin. VAT ima veći kapacitet za stvaranje slobodnih masnih kiselina i unos glukoze te je osjetljivije na andrenergičku stimulaciju, ali SAT lakše apsorbira cirkulirajuće slobodne masne kiseline i trigliceride (18).

U pretilosti VAT postaje mjesto nakupljanja proupalnih (neutrofila, makrofaga, Th1 CD4 T-stanica, CD8 T-stanica, limfocita B i mastocita) i protuupalnih (CD4 T-stanica, Th2 CD4 T-stanica i eozinofila) stanica imunosnog sustava. U početnoj se fazi uspostavlja ravnoteža, ali u uznapredovanom stadiju proupalni citokini, primjerice IL-6 i TNF-α, pridonose razvoju sustavne upale niskog stupnja (38). Također je povišena razina PAI-1 (engl. *plasminogen activator inhibitor-1*), što čini rizik od tromboze (19). Upali pridonose i promjene u ravnoteži hormona koje luči masno tkivo – leptina i adiponektina. Leptin ima kritičnu ulogu u regulaciji apetita, energetskog metabolizma, rasta, stresa te imunosnih funkcija (20). Adiponektin

pridonosi povećanju osjetljivosti na inzulin te kao i inzulin smanjuje glukoneogenezu, a povećava beta-oksidaciju masnih kiselina. U pretilosti raste razina leptina, a pada razina adiponektina. Prema tome, promjene VAT-a dovode do metaboličkih poremećaja sa sustavnom upalom, uključujući aterosklerozu, pretilost, dislipidemiju, kardiovaskularnu bolest, otpornost na inzulin, diabetes mellitus tipa 2 i hipertenziju (21).

1.2.1.1. Mezenteričko masno tkivo

Mezenterijska mast, kao odraz visceralne debljine, ima važnu ulogu u patogenezi metaboličkog sindroma i kardiovaskularnih bolesti (22). Mezenteričko masno tkivo, od četiriju različita skladišta masti, proizvodi najvišu razinu MCP-1 (engl. *monocyte chemoattractant protein-1*) – molekule koja inducira infiltraciju. MCP-1 je usko povezan s komplikacijama vezanim za visceralnu pretilost (23).

1.2.2. Upala u masnom tkivu

Ekspanzija masnoga tkiva, što je obilježje pretilosti, povezana je s upalom niskoga stupnja. Upala u masnom tkivu u pretilosti odgovor je na hipoksiju u povećanim adipocitima udaljenima od vaskulature. Hipoksija uzrokuje stimulaciju ekspresije i izlučivanja brojnih adipokina povezanih s upalom, uključujući ANGPTL4 (engl. *angiopoietin-like 4*), IL-6, čimbenik inhibicije migracije makrofaga (engl. *macrophage inhibitory factor*, MIF) i čimbenik rasta vaskularnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF). Hipoksija izaziva i upalne reakcije u makrofazima, inhibira diferencijaciju preadipocita u adipocite te inducira ekspresiju leptina (24). Povećani prijenos glukoze u adipocite izložene hipoksiji posljedica je povećane GLUT-1 ekspresije. Hipoksija temeljito mijenja metabolizam adipoznoga tkiva, što podupire upalni odgovor, razvoj dijabetesa tipa 2 i metaboličkog sindroma (25).

Drugi mehanizam koji može biti relevantan pri inicijaciji upale kod pretilosti jest oksidacijski stres. Zbog povećane isporuke glukoze u masno tkivo, endotelne stanice kapilara masnog tkiva imaju povećani unos glukoze, što uzrokuje prekomjernu proizvodnju ROS-a u mitohondrijima. ROS uzrokuje oksidacijsko oštećenje i aktivaciju upalne signalne kaskade. Endotelna ozljeda u masnom tkivu može privući upalne stanice poput makrofaga i dodatno pogoršati lokalnu upalu. Hiperglikemija također stimulira proizvodnju ROS-a u adipocitima, što dovodi do povećane produkcije proinflamatornih citokina (26).

1.2.2.1. Uloga makrofaga u razvoju upale masnog tkiva

Makrofazi su prva crta obrane urođene imunosti, a sudjeluju i u razvoju organa te promjeni i regeneraciji tkiva. Oni kao takvi osjete širok spektar podražaja, od virusa, mikrobnih i parazitskih antigena, imunih kompleksa, apoptotičnih ili nekrotičnih stanica pa do različitih medijatora oslobođenih iz drugih stanica (27). Makrofazi potječu od nezrelih stanica koštane srži koje se dijele i iz kojih nastaju monociti koji najprije ulaze u cirkulaciju. U sljedećem koraku monociti privučeni kemoatrakcijom prolaze kroz stijenku venula i kapilara u vezivno tkivo, u kojemu se dijele, sazrijevaju i poprimaju morfološka obilježja makrofaga. Nalaze se u većini organa te čine mononuklearni fagocitni sustav. Životni im je vijek dug i mogu preživjeti mjesecima (14). Kao odgovor na podražaj koji osjete makrofazi se aktiviraju, što im omogućuje izvršavanje uloge kao imunološkog posrednika te održavanje cjelovitosti tkiva. Razvijen je model koji opisuje složeni mehanizam aktivacije makrofaga kao polarizaciju prema dvama suprotnim stanjima, M1 ili klasičnoj te M2 ili alternativnoj aktivaciji.

M1 aktivacija inducirana je unutarstaničnim patogenima, komponentama stanične stijenke bakterije te lipoproteinima i citokinima kao što su interferon-gama (IFN-γ) i TNF-α. M1 makrofage karakterizira proupalni fenotip, potaknut Th1 upalnim odgovorom te tumoricidna akivnost. Izlučuju upalne citokine i stvaraju dušikov monoksid (NO), što rezultira učinkovitim mehanizmom uništavanja patogena.

Aktivacija M2 inducirana je gljivama, parazitima, imunim kompleksima, komplementima, apopototičnim stanicama, čimbenikom stimulacije kolonije makrofaga (engl. *macrophage colony stimulating factor*, MCSF), IL-4, IL-13, IL-10, čimbenikom rasta tumora-beta (engl. *tumor growth factor-beta*, TGF-β) te različitim drugim signalima. M2 makrofazi pokazuju regulatorne funkcije u popravku i preoblikovanju tkiva, a potaknuti su Th2 upalnim odgovorom. Imaju visok kapacitet fagocitoze, producirajući komponente izvanstaničnog matriksa, angiogene i kemotaktične čimbenike te IL-10. Uklanjaju apoptotične stanice, ublažuju upalni odgovor i potiču zacjeljivanje rana. Također, M2 makrofazi imaju složene uloge izvan konteksta upale, poput morfogeneze organa, promjene tkiva te endokrine signalizacije (28, 29).

Makrofazi masnog tkiva obično se aktiviraju nakon puknuća, odnosno apoptoze ili aponekroze adipocita, koja nastaje zbog povećanoga skladištenja triglicerida. Kapacitet skladištenja adipocita ovisi o sposobnosti širenja masnog tkiva. Što je veći adipocit, veća je mogućnost da se raspukne. Stoga se M1 makrofazi regrutiraju i skupljaju u strukturu poput krune kako bi uklonili stanični sadržaj koji je otpušten u izvanstanični prostor. U ljudi je širenje

masnog tkiva neograničeno, dok je u glodavaca povećanje masnih skladišta ograničeno. Tako se u miševa koji su 20 tjedana hranjeni visoko kaloričnom hranom povećava učestalost smrti adipocita u masnom tkivu s 0,1% na početku do 16% u 12. tjednu. Broj adipocita počinje opadati u 12. tjednu. U 16. tjednu, smrt adipocita dosegne otprilike 80% (30). Dok se adipociti u mršavih životinja mogu lako prilagoditi na akutne promjene u unosu energije, kronično povećanje unosa energije stavlja adipocite pod znatni metabolički stres. Kako makrofazi fagocitiraju mrtve adipocite i postaju natrpani lipidima, oni potiču ekspresiju upalnih citokina, poput TNF-α i IL-6, koji potiču inzulinsku rezistenciju u okolnim adipocitima. To kod povećanog unosa kalorija dovodi do patogeneze sustavne inzulinske rezistencije (31).

1.2.2.2. Nastanak fibroze masnog tkiva

Abnormalno taloženje kolagena, obilježje razvoja fibroze u masnom tkivu, čvrsto je povezano s upalom. Stvaranje komponenti izvanstaničnog matriksa dio je regenerativnog koraka zamjene mrtvih ili ozlijeđenih stanica i sastavni dio odgovora na upalu. Međutim, ako se šteta nastavi, stanični čimbenici ostaju aktivirani te fibrilarne komponente koje su inicijalno proizvedene kao zamjena za normalno parenhimno tkivo, mogu se zadržati i akumulirati u tkivu, što dovodi do karakterističnog fibroznog izgleda. Fibroza zapravo nastaje ubrzo nakon apoptoze adipocita, dok infiltracija makrofaga i povezana upala nastaju dosta kasnije u procesu. Upala je vodeći fenomen u kasnijim stanjima disfunkcije masnog tkiva, kao odgovor na sve veće okruženje fibroze. Abnormalna fibroza u masnom tkivu također je izravno ili neizravno povezana s mnogim drugim patološkim promjenama na lokalnoj razini, što eventualno može imati sustavni utjecaj. Na primjer, patološko nakupljanje izvanstaničnog matriksa pridonosi povećanoj razini signalizacije putem integrina, pridonoseći tako metabolički nepovoljnom okruženju. Povećana intersticijska fibroza u masnom tkivu također remeti komunikaciju između stanica, što je kritični posrednik proširenja masnih naslaga kao odgovor na kalorijsko preopterećenje. Kruta priroda takvih fibrotičnih jastučića masti potiče ograničenu fizikalnu i metaboličku fleksibilnost, što rezultira ektopičnim taloženjem lipida u perifernim tkivima, kao što su jetra i mišić (32).

Ne postoji istraživanje koje uspoređuje mlade i stare životinje s obzirom na pojavu upale i fibroze masnog tkiva nakon izlaganja kroničnom stresu.

2. HIPOTEZA

Za razliku od mladih ženki štakora, stare ženke štakora izložene kroničnom stresu imat će veći opseg upale niskog stupnja u masnom tkivu, što se može procijeniti pojavom fibroze i upalnih markera.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

I. Primjenom histološkog bojenja hemalaun/eozin izmjeriti gustoću i površinu adipocita.

II. Procijeniti pojavu fibroze bojenjem retikulina po Gomoriju u masnom tkivu životinja izloženih kroničnom stresu i kontrolnih grupa.

III. Uporabom markera makrofaga ocijeniti stupanj upale u masnom tkivu.

IV. Usporediti mlađe životinje u odnosu prema starijim životinjama te one kronično stresirane prema kontrolama.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Studija je ustrojena kao istraživanje parova (životinje u dobi od 3,5 mjeseci prema životinjama u dobi od 14,5 mjeseci izloženima lažnom stresu; životinje u dobi od 3,5 mjeseci prema životinjama u dobi od 14,5 mjeseci izloženima pravom stresu; životinje izložene lažnom stresu prema životinjama izloženima kroničnom stresu).

4.2. Materijali

U studiju je uključeno 40 ženki *Sprague Dawley* štakora (10 po skupini) koje su u dobi od 3,5 mjeseci ili 14,5 mjeseci izložene lažnom ili pravom stresu u trajanju od 3 ciklusa po 10 dana. Izlaganje životinja lažnom stresu služi kao prava negativna kontrola eksperimenta, čime se uklanjaju eventualne pogrješke eksperimenta nastale rukovanjem. Životinje su žrtvovane 15 dana nakon posljednjeg ciklusa stresa, a svježi su uzorci prikupljeni i pohranjeni na -80°C. Fiksirano tkivo je krioprotektirano ili uklopljeno u parafin te je tako napravljena arhiva uzoraka na kojoj je napravljen ovaj završni rad. Za studiju je dobiveno odobrenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Osijeku u sklopu HRZZ projekta "Patofiziološke posljedice promjene sastava lipidnih splavi" pod brojem IP-2014-09-2324 čija je voditeljica prof. Heffer.

4.3. Metode

Parafinski blokovi masnog tkiva izrezani su na debljinu od 6 μm, stavljeni na stakla, deparafinizirani, obojeni hemalaun/eozinom, dehidrirani i pokriveni. Preparati su slikani, a kvantifikacija je napravljena u programu *ImageJ*. Imunohistokemija je odrađena na Zavodu za patologiju medicinskog fakulteta u KBC-u Osijek, a potom su preparati pokriveni pokrivalom i pokrovnim staklom te mikroskopirani, fotografirani i u konačnici kvantificirani u *ImageJ*.

4.3.1. Određivanje površine pojedinih adipocita

Za određivanje površine pojedinih adipocita primijenjeno je histološko bojenje hemalaun/eozin. Nakon rezanja mikrotomom, preparati su prebačeni na stakalca obložena želatinom i osušeni. Uslijedila je deparafinizacija tako da su preparati 2 puta po 5 minuta uronjeni u ksilen. Rehidracija je napravljena uranjanjem preparata u seriju etanola: 5 minuta u 100 %-tni etanol, 5 minuta u 96 %-tni etanol te 5 minuta u 70 %-tni etanol, a potom su se preparati dobro isprali u destiliranoj vodi. Nakon toga preparati su bojeni u Myerovu hematoksilinu (AppliChem) 5 minuta pa su isprani vodom iz slavine i destiliranom vodom kako bi se boja stabilizirala. Napravljeno je kontrastno bojenje eozinom u vremenu od 1,5 minute i obavljeno ispiranje u destiliranoj vodi, a potom su se preparati dehidrirali: minutu u 70 %-tnom etanolu, 5 minuta u 96 %-tnom etanolu i 5 minuta u 100 %-tnom etanolu. Potpuno uklanjanje etanola napravljeno je uranjanjem preparata 2 puta po 5 minuta u ksilen i na kraju su preparati pokriveni Histamount smolom za histološke preparate (National Diagnostics). Nakon slikanja na povećanju od 100 puta slike su analizirane u programu *ImageJ*. Kvantifikacija je napravljena tako da smo na svakom preparatu nasumično izabrali 10 područja koja su više od 50 % kružnog oblika, nijanse boje (engl. *hue*) 240 – 255 te svjetline (engl. *brightness*) 0 – 170. Nijansa i svjetlina boje dio su određivanja praga boje, a time se slika dijeli na dvije ili više skupina piksela. U ovom slučaju crveni su pikseli predočivali adipocite, a bijeli pikseli ostale komponente masnog tkiva. Dobivene veličine pojedinih adipocita statistički su analizirane te u konačnici uspoređene između svih četriju skupine ženki štakora.

4.3.2. Određivanje stupnja upale

Stupanj upale određen je histološkim bojenjem na retikulin po Gomoriju te imunohistokemijskim bojenjem. Za bojenje retikulina po Gomoriju uporabljene su sljedeće otopine: srebrov nitrat ($AgNO_3$, Gram-mol, Zagreb, 10 %), amonijev hidroksid (NH_4OH, Gram-mol, Zagreb, 25 %), natrijev hidroksid (NaOH, 10 %), kalijev permanganat ($KMnO_4$, TTT, Sveta Nedjelja, 1%), oksalna kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 1 %), željezna stipsa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 2,5 %), formalin (Gram-mol, Zagreb, 5 %), zlatni klorid (Kemika, Zagreb, 0,1 %) te natrijev tiosulfat ($Na_2S_2O_3$, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 5 %). Amonijakalno srebro pripremljeno je na sljedeći način: u 10 mL 10 %-tnoga srebrova nitrata dodano je 2,5 mL 10 %-tnog natrijeva hidroksida. Nakon što se talog slegnuo, pipetom je uklonjen supernatant, talog je ispran u destiliranoj vodi, a ovaj postupak

ispiranja ponovljen je još dva puta. Tijekom vrtnje polako su se dodavale kapi amonijeva hidroksida dok se talog nije ponovno otopio, a nakon toga dodane su jedna do dvije kapi 10 %-tnog srebrova nitrata dok otopina nije postala vrlo slabo opalescentna; na kraju, do ukupnog volumena od 20 mL dodana je destilirana voda. Preparati su se oksidirali 2 minute u 1 %-tnom kalijevu permanganatu, a potom su se isprali. Izbjeljivali su se 2 minute u oksalnoj kiselini, a nakon toga su isprani. Minuta u 2,5 %-tnoj željeznoj stipsi učinila ih je osjetljivima te su isprani vodom iz slavine. Dobro su isprani u destiliranoj vodi, nakon čega ih se 30 sekundi tretiralo amonijakalnim srebrom, pa je slijedilo ponovno ispiranje destiliranom vodom. Reducirali su se u 5 %-tnom formalinu dok nisu potamnjeli te su se dobro isprani u destiliranoj vodi. Nakon toga su u 0,1 %-tnoj otopini zlatnog klorida tonirani, pa ponovno isprani u destiliranoj vodi i fiksirani u 5 %-tnom natrijevu tiosulfatu na 3 minute. Preparati su dobro isprani pod mlazom vode iz slavine te stavljeni u 1 x PBS. Potom su navučeni na želatinozna stakla i osušeni. Dehidrirani su 2 puta po 10 minuta u 20 %-tnom, pa 10 minuta u 50 i 70 %-tnom, 5 minuta u 96 i 100 %-tnom, 2 minute u 100 %-tnom etanolu, te 2 puta po dvije minute u ksilenu i u konačnici pokriveni Histamount smolom za histološke preparate (National Diagnostics). Preparati su slikani na ukupnom povećanju od 400 puta na Zeiss Axioskop Mot 2 mikroskopu s kamerom Olympus DP-70, a slike su analizirane u *ImageJ* programu s Fiji dodatkom (engl. *plugin*) Weka (Waikato Environment for Knowledge Analysis) Segmentational analysis, na kojemu je program naučen prepoznavati stukture na slici, a zatim obrađuje slike kroz dodatak s pomoću dobivenoga skripnog jezika (engl. *macro language*). Postotci površine koje zauzimaju retikulinska vlakna statistički su analizirani usporedbom između svake od 4 skupine životinja.

Imunohistokemijsko bojenje odrađeno je na Ventana stroju za imunohistokemiju (Ventana, Benchmark ultra) na Zavodu za patologiju i sudsku medicinu pri Kliničkom bolničkom centru u Osijeku. Uporabljena protutijela su mišji anti CD68 klon KP1 (Ventana 790-2931) i mišji anti CD163 klon MRQ – 26 (Ventana 760-4437). Preparati su obojeni prema protokolu zavoda. Nakon bojenja obavljeno je pozadinsko obojenje Mayerovim hematoksilinom (AppliChem) u trajanju od 5 minuta. Boja je razvijena u tekućoj vodi, nakon čega su preparati dehidrirani u alkoholnom nizu, izbistreni u ksilenu i pokriveni Histamount smolom za histološke preparate (National diagnostics). Preparati su slikani na ukupnom povećanju od 100 puta na Zeiss Axioskop Mot 2 mikroskopu s kamerom Olympus DP-70, svaki uzorak u triplikatu. Imunopozitivne stanice ručno su izbrojene, rezultati predočuju broj imunopozitivnih stanica u vidnom polju i obrađeni su Statistica 12 programom za statističku obradu.

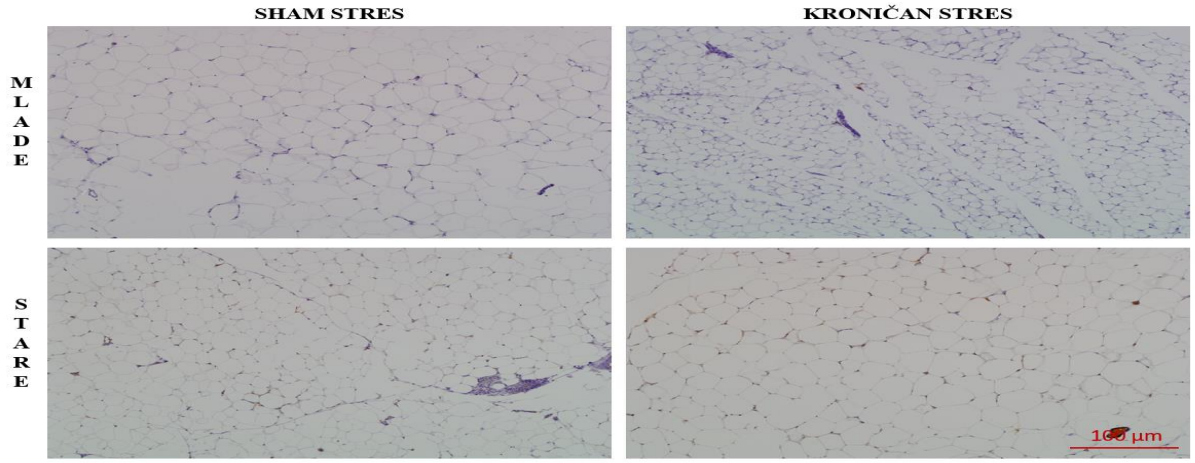
4.4. Statističke metode

Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirano je Lilieforsovom inačicom Kolmogorov-Smirnovljenovog testa. Numerički podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju raspodjela koje slijede normalnu, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane su Studentovim t testom, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyevim U-testom. Sve su P-vrijednosti dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na $\alpha = 0,05$. Za statističku analizu uporabljen je statistički program Statistica 12 (www.statsoft.com/Products/STATISTICAŘFeatures/VersionŘ12).

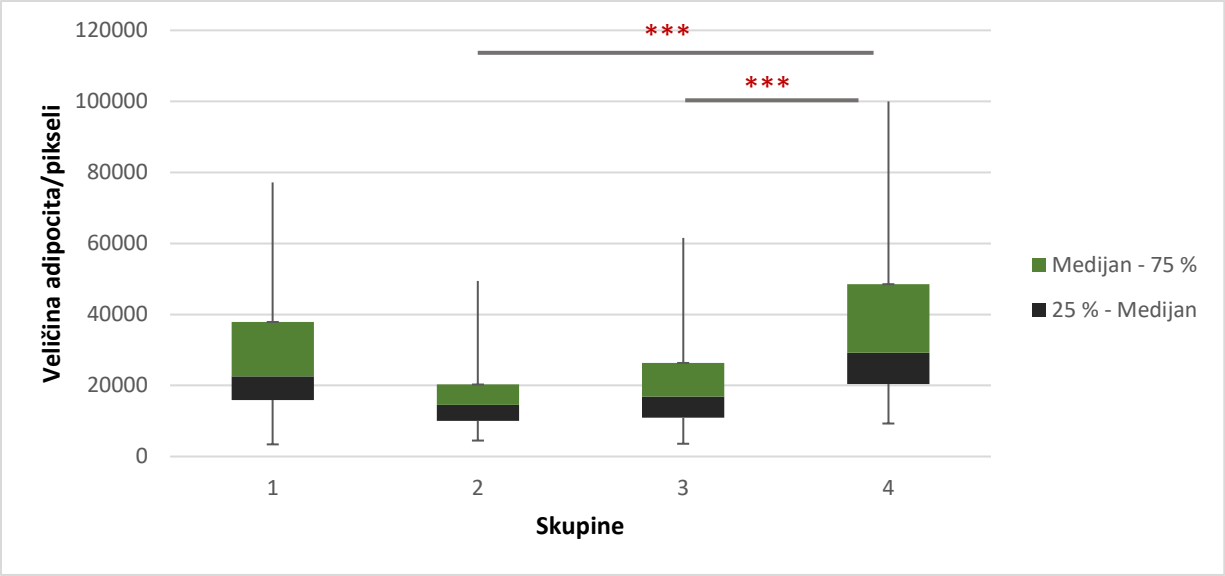
5. REZULTATI

5.1. Rezultati analize površine pojedinih adipocita

U svakom je preparatu nasumično odabrano 10 područja u kojima je izračunata veličina svakog adipocita u pikselima. Dobiveni su rezultati uspoređivani između svih četiriju skupina životinja (slika 1.). Adipociti starijih kronično stresiranih ženki imaju statistički značajno veću površinu, za razliku od ostalih skupina životinja ($p < 0,001$). Iz ovoga jasno možemo vidjeti kako se u starijih ženki trigliceridi skladište unutar postojećih adipocita, za razliku od mladih ženki kod kojih se višak triglicerida skladišti u obliku novih adipocita. Također, ovdje vidimo kako kronični stres djeluje različito na mlade i stare životinje (slika 2.). Dok se u starijih životinja nakupljaju trigliceridi, u mladih se životinja se ovo ne događa. Razina značajnosti postavljena je na $\alpha = 0,05$. Vrijednosti značajnosti testa (P) ispod zadane α-granice označuju statistički značajnu razliku između dviju uspoređivanih skupina.



Slika 1. Preparati mezenteričkoga masnog tkiva obojeni hemalaun/eozinom. U prvom su redu prikazani uzorci ženki štakora u dobi od 3,5 mjeseci, a u drugom redu uzorci ženki štakora u dobi od 14,5 mjeseci. Slike lijevo prikazuju lažno stresirane životinje, dok su desno prikazani uzorci životinja izloženih kroničnom stresu. Fotografirala autorica Olympus D70 fotoaparatom (Olympus, Hamburg, Germany) montiranim na mikroskop Zeiss Axioskop 2 MOT.



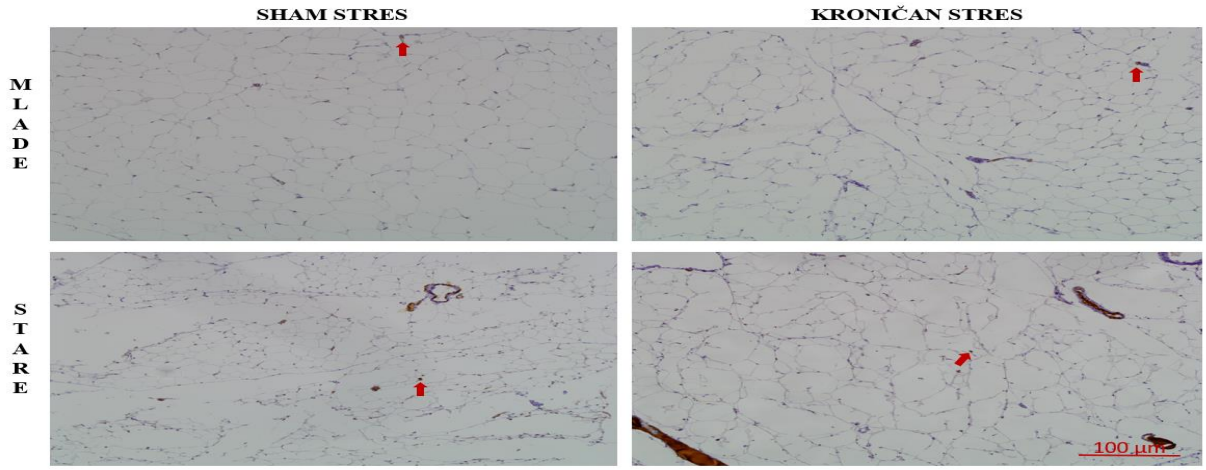
Slika 2. Veličina adipocita u pikselima u mezenteričkome masnom tkivu četiriju skupina ženki štakora: mlade izložene lažnom stresu (1), mlade izložene kroničnom stresu (2), stare izložene lažnom stresu (3) i stare izložene kroničnom stresu (4).

5.2. Rezultati analize stupnja upale

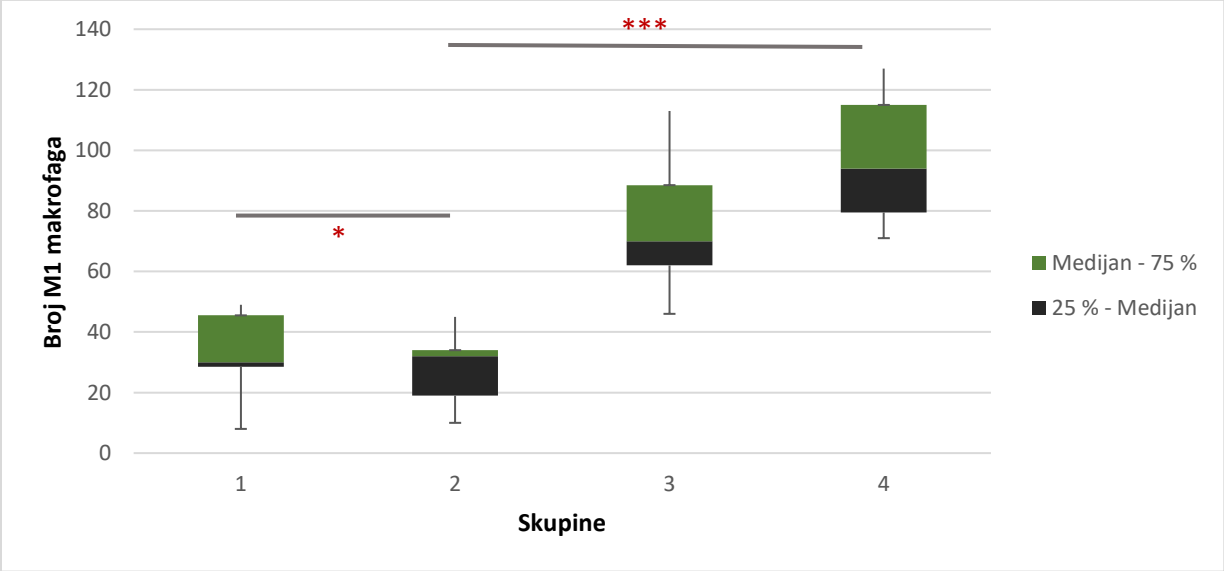
U svakom uzorku mezenteričkoga masnog tkiva izbrojeni su M1 i M2 makrofazi. Broj koji je uzet pri statističkoj obradi predočuje broj imunopozitivnih stanica po vidnom polju na ukupnom povećanju od 100 puta i smatra se standardnim patohistološkim dijagnostičkim postupkom. Negativnih kontrola nema jer su preparati napravljeni strojno, protutijela su izravno obilježena, a negativna kontrola je automatski zadana. Dobiveni su rezultati uspoređivani između svih četiriju skupina životinja (slike 3. i 5.). Razina značajnosti postavljena je na $\alpha = 0,05$. Vrijednosti značajnosti testa (P) ispod zadane α-granice označuju statistički značajnu razliku između dviju uspoređivanih skupina (slike 4. i 6.).

Broj M1 i M2 makrofaga veći je u starijih nego u mlađih kontrolnih životinja te postoji statistički značajna razlika u broju M1 makrofaga ($p = 0,00058$). Iz ovoga smo zaključili kako već i samo starenje uzrokuje povećanje obiju klasa makrofaga u masnom tkivu ženki štakora. Kronični stres smanjuje broj M1 makrofaga u mladih životinja, dok u starih životinja dolazi do značajnog povećanja M1 makrofaga ($p = 0,012709$). Zaključujemo kako kronični stres u mladih i starih životinja nema isto djelovanje te da je u starih životinja popraćen rastom M1 makrofaga. Najveća razlika u broju M1 makrofaga uočena je između mladih i starih kronično stresiranih

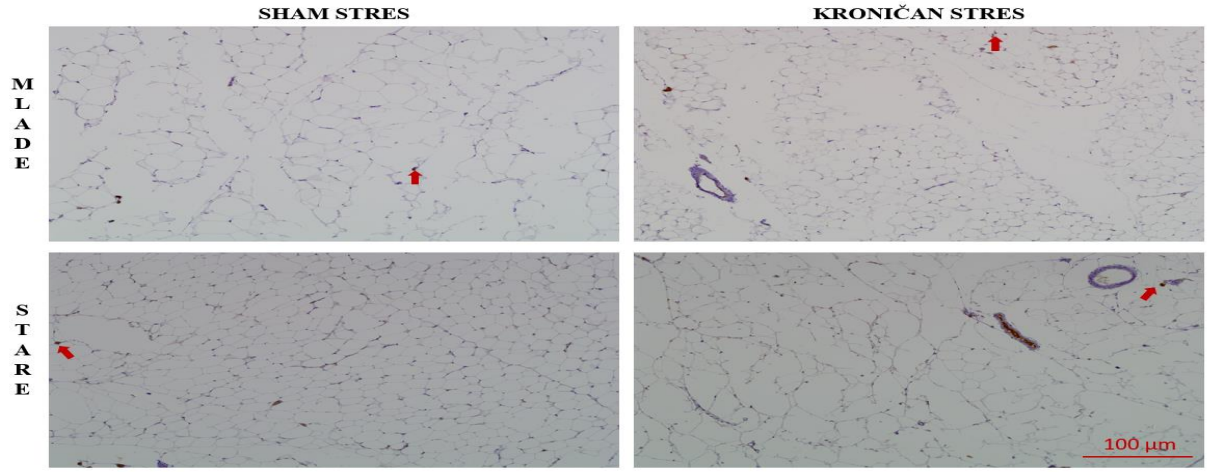
životinja. M2 makrofazi opadaju nakon kroničnoga stresa, ali pad nije statistički značajan ni u mladih ni u starih životinja.



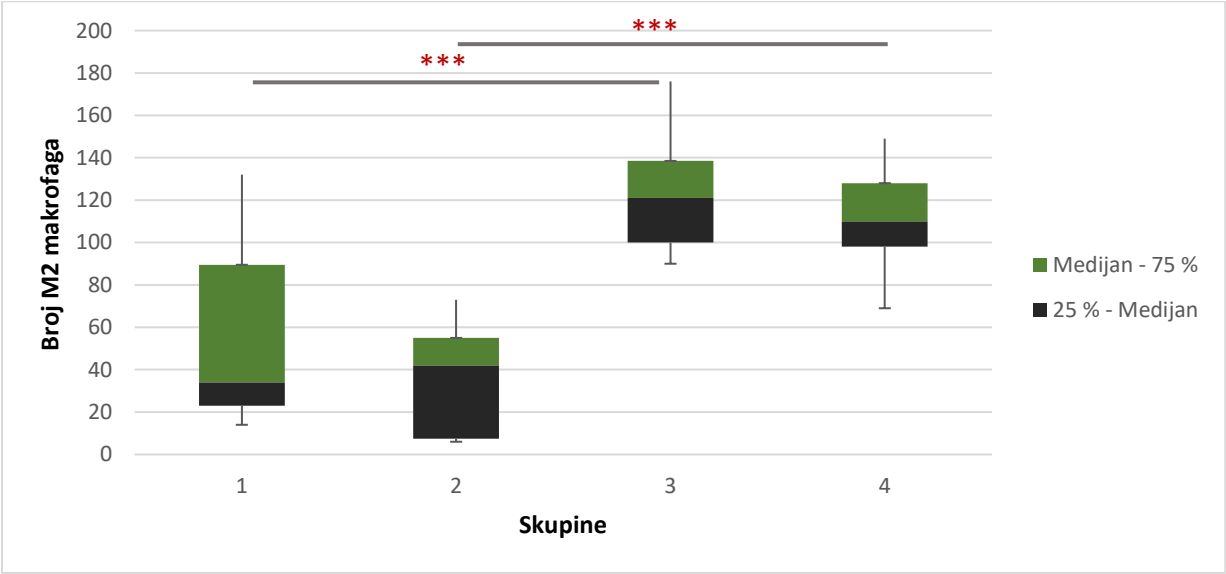
Slika 3. Preparati mezenteričkoga masnog tkiva s učinjenom imunohistokemijom na M1 makrofage (CD 68 pozitivne stanice označene su strelicama). U prvom su redu prikazani uzorci ženki štakora u dobi od 3,5 mjeseci, a u drugom redu uzorci ženki štakora u dobi od 14,5 mjeseci. Slike lijevo prikazuju lažno stresirane životinje, dok su desno prikazani uzorci životinja izloženih kroničnom stresu. Fotografirala autorica Olympus D70 fotoaparatom (Olympus, Hamburg, Germany) montiranim na mikroskop Zeiss Axioskop 2 MOT.



Slika 4. M1 makrofazi. Broj M1 makrofaga u mezenteričkome masnom tkivu četiriju skupina ženki štakora: mlade izložene lažnom stresu (1), mlade izložene kroničnom stresu (2), stare izložene lažnom stresu (3) i stare izložene kroničnom stresu (4). Mann-Whitneyev U-test; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

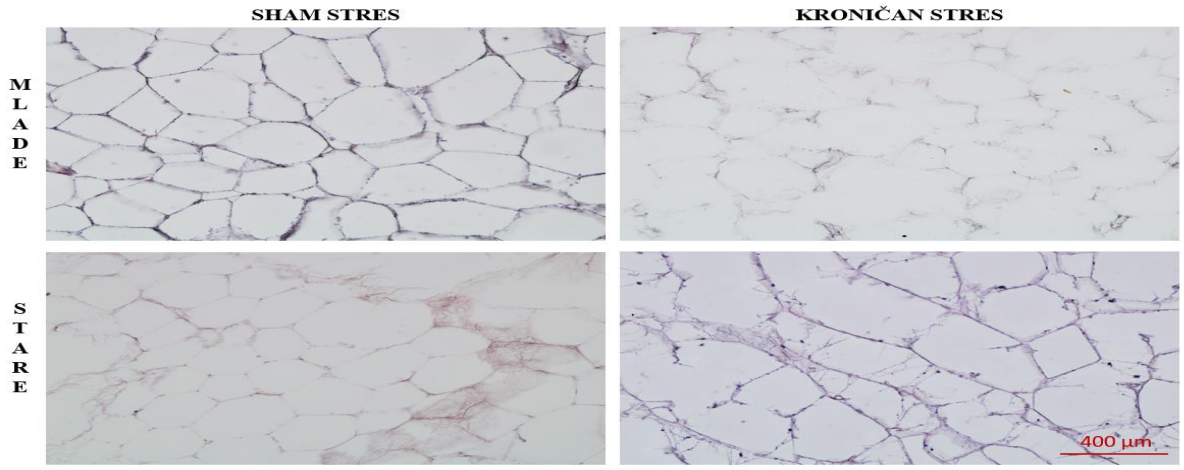


Slika 5. Preparati mezenteričkoga masnog tkiva s učinjenom imunohistokemijom na M2 makrofage (CD 163 pozitivne stanice označene su strelicama). U prvom su redu prikazani uzorci ženki štakora u dobi od 3,5 mjeseci, a u drugom redu uzorci ženki štakora u dobi od 14,5 mjeseci. Slike lijevo prikazuju lažno stresirane životinje, dok su desno prikazani uzorci životinja izloženih kroničnom stresu. Fotografirala autorica Olympus D70 fotoaparatom (Olympus, Hamburg, Germany) montiranim na mikroskop Zeiss Axioskop 2 MOT.

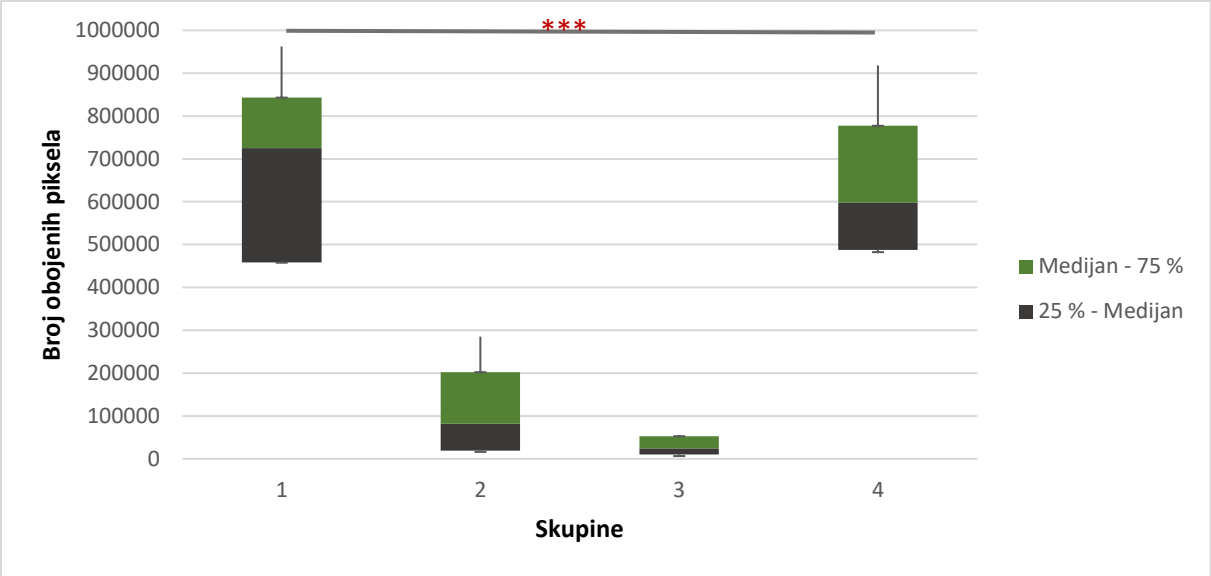


Slika 6. M2 makrofazi. Broj M2 makrofaga u mezenteričkome masnom tkivu četiriju skupina ženki štakora: mlade izložene lažnom stresu (1), mlade izložene kroničnom stresu (2), stare izložene lažnom stresu (3) i stare izložene kroničnom stresu (4). Mann-Whitneyev U-test; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

U svakom uzorku mezenteričkoga masnog tkiva površina koju zauzimaju retikulinska vlakna izražena je kao broj obojenih piksela u vidnom polju na povećanju od 400 puta. Statistički značajna razlika postoji između svih četiriju skupina životinja (slika 8.). Zanimljivo je što mlade lažno stresirane ženke pokazuju veću površinu zahvaćenu fibrozom od onih starih. Stres djeluje obrnuto na mlade i stare životinje – u mladih se smanjuje fibroza ($p = 0{,}003948$), a u starih se povećava u usporedbi sa životinjama iste dobi izloženima lažnom stresu.



Slika 7. Preparati mezenteričkoga masnog tkiva obojeni po Gomoriju. U prvom su redu prikazani uzorci ženki štakora u dobi od 3,5 mjeseci, a u drugom redu uzorci ženki štakora u dobi od 14,5 mjeseci. Slike lijevo prikazuju lažno stresirane životinje, dok su desno prikazani uzorci životinja izloženih kroničnom stresu. Fotografirala autorica Olympus D70 fotoaparatom (Olympus, Hamburg, Germany) montiranim na mikroskop Zeiss Axioskop 2 MOT.



Slika 8. Površina koju zauzimaju retikulinska vlakna u mezenteričkome masnom tkivu u četrima skupinama ženki štakora: mlade izložene lažnom stresu (1), mlade izložene kroničnom stresu (2), stare izložene lažnom stresu (3) i stare izložene kroničnom stresu (4). Mann-Whitneyev U-test; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

6. RASPRAVA

Svrha je ovog istraživanja bila usporediti veličinu adipocita i stupanj upale u mezenteričkome masnom tkivu u mlađih u usporedbi sa starijim ženkama te onih kronično stresiranih s obzirom na lažno stresirane.

Uspoređivanjem mezenteričkoga masnog tkiva mladih i starih ženki štakora vidjeli smo kako kronični stres različito utječe na ove dvije skupine životinja. U starih ženki kronični se stres očituje u obliku nakupljanja triglicerida u postojećim adipocitima, što uzrokuje hipertrofiju adipocita. Adipociti preopterećeni trigliceridima nakon nekoga vremena pucaju, a to uzrokuje upalu na mjestima nekroze. U mlađih smo životinja uočili suprotan učinak stresa. Naime, ekspanzija masnog tkiva u mlađih životinja očituje se u obliku hiperplazije, pa smo u njih uočili manji stupanj upale. Obje skupine starijih ženki imale su veći broj M1 i M2 makrofaga zbog samoga procesa starenja, a zanimljivo je da se broj M1 makrofaga smanjio u skupini mlađih ženki nakon kroničnoga stresa. Broj M2 makrofaga smanjio se nakon kroničnoga stresa, što se događa zbog pretvorbe M2 u M1 makrofage. Suprotan učinak stresa vidimo i na fibrozi. Mlađe stresirane ženke imale su manju površinu fibroze, za razliku od starijih ženki kojima se fibroza nakon kroničnoga stresa povećala. Prema tome, možemo zaključiti da mlađe životinje u odnosu prema starijima imaju bolji sustav regulacije homeostaze te u njih kronični stres ne rezultira razvojem posljedičnih bolesti, prije svega upale niskoga stupnja.

Stres se često jednostavno definira kao učinak uzrokovan vanjskim (tj. fizikalnim ili okolišnim) događajima ili unutarnjim (tj. fiziološkim ili psihološkim) čimbenicima, koji se nazivaju stresorima, koji uzrokuju promjene u biološkoj ravnoteži. Sam po sebi stres nije prijetnja sve dok se životinja može prilagođavati i održavati stanje homeostaze. Zato stres ne bi trebao ugroziti dobrobit životinje. Bitno je razlikovati eustres od distresa, odbojnoga stanja u kojem se živo biće ne može potpuno prilagoditi na stresore i opseg odgovora na stres te pokazuje neprikladno ponašanje (39). Kronični stres mijenja uzorak unosa hrane, prehrambene preferencije te narušava sustav nagrađivanja uzimanjem hrane i tako potiče dobitak ili gubitak na težini (41). Usto, kronična aktivacija nekih centara središnjega živčanog sustava i HPA osi te posredno autonomnoga živčanog sustava dovodi do anaboličkoga stanja koje potiče taloženje masti unutar visceralnoga skladišta, što povećava rizik od dislipidemije, dijabetesa tipa 2, kardiovaskularnih bolesti te drugih aspekata metaboličkog sindroma (41). Visceralno masno

tkivo je ključni endokrini organ uključen u regulaciju aktivnosti inzulina i važna komponenta u razvoju inzulinske rezistencije (40). Masno tkivo može pretrpjeti brzu ekspanziju u vrijeme povećanog unosa kalorija. Poput brze ekspanzije tumorske mase, tako i pretilo masno tkivo postaje hipoksično zbog nemogućnosti krvožilnog sustava da održi korak s rastom tkiva (43). Makrofazi su mononuklearni tkivni fagociti. Nalaze se unutar gotovo svakoga tkiva, a identificiraju se kao različite populacije s tkivnospecifičnom morfologijom, lokalizacijom i funkcijama. Oni su primarni posrednici urođena imunosnog odgovora i važni su sudionici stečene imunosti. Prepoznaju i fagocitiraju strane organizme, oslobađaju antimikrobne peptide, izlučuju molekule koje privlače druge imunološke stanice na mjesta infekcije te prezentiraju antigen limfocitima (42). Makrofazi se mogu klasificirati kao klasično (M1) ili alternativno aktivirani (M2) makrofazi (44). Aktivirani makrofazi otpuštaju stereotipne profile citokina i biološki aktivnih molekula poput NO, TNF-α, IL-6 i IL-1 (42). Makrofazi mogu infiltrirati masno tkivo kao rezultat adipocitnih kemokina (44). Tako povećanjem pretilosti masno tkivo može otpuštati signale poput MCP-1, uzrokujući povećan priljev monocita. Adipocitna produkcija čimbenika stimulacije kolonije (engl. *colony stimulating facor*, CSF)-1 može stvoriti mikrookoliš koji potiče diferencijaciju i preživljavanje monocita u obliku zrelih makrofaga masnog tkiva (42). Alternativno, makrofazi mogu infiltrirati masno tkivo u svojstvu svoje čistačke uloge te kao odgovor na hipoksiju i aponekrozu. Makrofazi masnog tkiva u mršavih miševa fenotipski su slični alternativno aktiviranim, protuupalnim M2 makrofazima, dok su u pretilih miševa makrofazi promijenjeni i potiču proupalno stanje. Alternativno aktivirani makrofazi (M2) tipično izražavaju niže razine upalnih citokina i više razine TGF-β, što služi poticanju ekspresije kolagena i fibrozi. M2 makrofazi uzrokuju stvaranje ožiljka i produkciju izvanstaničnog matriksa kroz visoku ekspresiju TGF-β (44). U našem se radu moglo očekivati da će one skupine životinja koje pokazuju najviše razine M2 makrofaga imati i najviše razine kolagenoze. Doista, stupanj kolagenoze pratio je broj M2 makrofaga, osim kod skupine starih lažno stresiranih ženki koje su usprkos relativno visokoj razini M2 makrofaga imale nisku razinu fibroze.

Karagiannides, Golovatscka i suradnici među prvima su pregledali promjene u fiziologiji visceralnoga masnog tkiva, inzulinsku osjetljivost povezanu s adipocitima te njihovu funkciju nakon kroničnoga nepredvidljivog stresa u štakora. Mužjaci štakora bili su podvrgnuti kroničnomu nepredvidljivom stresu tijekom 35 dana. Mjerile su se ukupna tjelesna i visceralna masnoća, razine citokina i aktivirane unutarstanične kinaze te funkcija adipocita. Stresirani štakori nisu se debljali pa se omjer mase debelih / mršavih životinja dramatično povećao u

usporedbi s kontrolnim životinjama. Stresirani štakori imali su znatno povećanje sadržaja mezenterijske masti i težine epididimalnih masnih naslaga te su pokazali smanjenu sposobnost uklanjanja glukoze u serumu nakon povećanja glikemije. Razlike u veličini masnih skladišta uglavnom su nastale zbog promjene u broju adipocita, a ne u veličini. Analizom ekspresije svih proteina na adipocitima izoliranima iz stresiranih štakora otkrivena je aktivacija unutarstanične upale, povećani metabolizam glukoze i povećana aktivnost mreže mitogenom aktivirane protein-kinaze (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) u usporedbi s kontrolama, kao i znatno smanjen kapacitet unosa glukoze kao odgovor na stimulaciju inzulinom. Karagiannides i suradnici identificirali su adipocite kao ključne regulatore učinaka kroničnoga stresa na inzulinsku rezistenciju i metabolizam glukoze s važnim posljedicama u patofiziologiji nekoliko stanja povezanih sa stresom (40).

Vrijedi napomenuti i da neke rutinske procedure, poput ulaska osobe u sobu s životinjama, pomicanje i čišćenje kaveza, mjerenje tjelesne težine, fizikalni pregled, injekcije te uzimanje krvi ili drugih uzoraka mogu uzrokovati znatan stres u životinja. Naime, ljudi glodavcima izazivaju spontani strah pa zato glodavci izbjegavaju dodir s čovjekom, osim ako se u juvenilnoj dobi nisu naviknuli na ljudsku ruku. Balcombe, Barnard i Sandusky dokazali su da se u glodavaca puls i krvni tlak povećavaju kao odgovor na razne postupke rukovanja, uključujući podizanje životinje, mijenjanje kaveza, davanje potkožnih injekcija, transport u drugu sobu, injekcija u repnu venu, prisutnost u sobi u vrijeme dekapitacije drugih štakora, rukovanje i mjerenje tjelesne težine te vaginalna lavaža. Odgovori na to trajali su 45 do 90 minuta nakon postupaka. Pokazalo se da rutinsko rukovanje podiže i serumske koncentracije hormona poput kortikosterona, koji regulira metabolizam proteina i ugljikohidrata, te prolaktina, koji također posreduje u stresnom odgovoru. Stresni je odgovor ovisio o intenzitetu stresa. Mijenjanje kaveza uz premještanje u tihu sobu bilo je stresnije nego mijenjanje kaveza bez premještanja, dok je mijenjanje kaveza i premještanje u glasnu sobu pokazalo najveće povišenje hormona (39).

Istraživanje Weisberga, McCanna i suradnika pokazuje da je opseg infiltracije masnog tkiva makrofazima izravno proporcionalan porastu masne mase u miševa i ljudi. Imunohistokemijska analiza ljudskoga potkožnoga masnog tkiva pokazala je da su indeks tjelesne mase (engl. *body mass indeks*, BMI) i veličina adipocita snažni prediktori postotka CD68 eksprimirajućih makrofaga. Isti su autori procijenili da postotak makrofaga u masnom tkivu ima raspon manji od 10 % u mršavih miševa i ljudi do više od 50 % u ekstremnoj debljini i leptin deficijentnim miševima te gotovo 40 % u pretilih ljudi. Akumulacija makrofaga u

proporciji s veličinom adipocita može povećati stvaranje proupalnih molekula i molekula akutne faze u masnome tkivu i tako pridonijeti patofiziološkim posljedicama pretilosti. Među ovim molekulama sljedeće su uključene u razvoj štetnih posljedica pretilosti: TNF-α, IL-6, PAI-1, NO, čimbenik VII te MCP-1. Tako na primjer TNF-α i IL-6 povećavaju lipolizu i uključeni su u hipertrigliceridemiju te povećanu razinu slobodnih masnih kiselina u serumu. Povećano stvaranje PAI-1 i faktora VII uključeno je u razvoj koagulacije i fibrinolitičkih abnormalnosti karakterističnih za pretilost (42).

Spencer, Yao-Borengasser i suradnici u svojem su istraživanju pokazali povećani izvanstanični matriks u pretilih pojedinaca te prisutnost tragova fibroze u masnome tkivu. Fibroza u ljudskom masnom tkivu snažno korelira s BMI-jem i obrnuto korelira s osjetljivošću na inzulin. Ova veza između fibroze, broja makrofaga te inzulinske rezistencije pokazana je imunohistokemijski te mjerenjem ekspresije gena u masnom tkivu na velikom broju ispitanika. Istraživanje Spencera, Yao-Borengassera i suradnika uključivalo je samo potkožno masno tkivo. Stupanj fibroze u masnom tkivu je sam po sebi povezan s inzulinskom rezistencijom, a više M2 makrofaga pronađeno je na fibroznim dijelovima. Obilan izvanstanični matriks može ograničiti ekspanziju adipocita, uzrokujući ektopičnu lipidnu i adipocitnu nekrozu. Usto, adipociti blizu mjesta fibroze manji su nego oni udaljeniji od mjesta taloženja kolagena. Makrofazi masnog tkiva mršavih miševa imaju M2 fenotip, dok u miševa hranjenih visoko masnom hranom dolazi do pretvorbe M2 u M1 makrofage. Analiza ekspresije markera makrofaga, poput CD206, CD163 i integrina, pokazala je da ljudsko masno tkivo ima protuupalne, alternativno aktivirane M2 makrofage koji su češći u pretilih ispitanika. Nakon kvantifikacije markera makrofaga u mršavih i pretilih ispitanika, pronađeno je da masno tkivo pretilih ispitanika sadržava više makrofaga, zajedno s većim stupnjem fibroze i da je mnogo veća proporcija makrofaga koji izražavaju samo M2 marker. Udio makrofaga koji su izražavali marker M1 makrofaga nije se promijenio, ali, kako je došlo do cjelokupnog povećanja makrofaga u pretilosti, masno tkivo pretilih ispitanika sadržavalo je više M1 makrofaga (44). Naše istraživanje na mezenteričkome masnom tkivu ženki štakora pokazalo je da broj makrofaga prati opseg adipocita, a znatno povećanje pokazalo se u broju M1 makrofaga. Broj M2 makrofaga bio je najveći u lažno stresiranim skupinama životinja te je time jasna promjena iz M2 u M1 makrofage nakon povećanja opsega adipocita.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata možemo zaključiti:

- kronični stres ima suprotan učinak na veličinu adipocita te pojavu fibroze u mlađih i starijih ženki štakora. U starijih se životinja povećavaju volumen adipocita i stupanj fibroze, dok se u mlađih znatno smanjuju
- broj M1 makrofaga smanjuje se nakon kroničnog stresa u mlađih životinja, ali je znatno povećan u starijih
- broj M2 makrofaga pada nakon kroničnog stresa i u mladih i u starih životinja.

8. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: pokazati razlike u veličini adipocita i pojavi upale u masnom tkivu mladih i starih ženki štakora nakon izlaganja lažnom i pravom kroničnom stresu.

Nacrt studije: studija je provedena kao istraživanje parova.

Materijali i metode: u studiju je bilo uključeno 40 ženki *Sprague Dawley* štakora (10 po skupini) koje su u dobi od 3,5 mjeseci ili 14,5 mjeseci izložene lažnom ili pravom kroničnom stresu u trajanju od 3 ciklusa po 10 dana. Fiksirano tkivo se krioprotektiralo ili uklopilo u parafin. Parafinski blokovi masnog tkiva izrezali su se na debljinu od 6 μm, stavili na stakla, deparafinizirali te obojali hemalaun/eozinom za određivanje površine pojedinih adipocita. Stupanj upale određivali smo imunohistokemijom i bojenjem retikulina po Gomoriju. Dehidrirani i pokriveni preparati pod mikroskopom su se fotografirali, a kvantifikacija se napravila u programu *ImageJ*.

Rezultati: starije stresirane ženke štakora imale su statistički značajno veći volumen adipocita i stupanj upale nego ostale skupine. Broj M1 makrofaga smanjio se u mlađih životinja nakon kroničnoga stresa, dok je u starijih znatno narastao. Broj M2 makrofaga se smanjio nakon kroničnoga stresa i u mladih i u starih životinja.

Zaključak: kronični stres imao je suprotan učinak na mlade i stare životinje. Dok je u mlađih životinja smanjio upalu niskog stupnja u masnom tkivu, u starih se životinja upala povećala.

Ključne riječi: adipociti; kroničan stres; makrofazi; masno tkivo; štakori; upala

9. SUMMARY

The expression of inflammation markers in fatty tissue of female Sprague Dawley rats following chronic stress.

Objectives: the aim of this study is to show differences in the size of adipocytes and the appearance of inflammation in the adipose tissue of young and old female rats after the exposure to sham and real chronic stress.

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

Materials and Methods: the study included 40 female Sprague Dawley rats (10 per group) who were 3,5 months or 14,5 months exposed to sham or real stress for 3 cycles per 10 days. Fixed tissue was cryoprotected or embedded in paraffin. Paraffin blocks of adipose tissue were cut to 6 μm thick slices, placed on the slides, deparaffinized and stained hemalaun/eosin to determine the surface area of adipocytes. The degree of inflammation was determined by immunohistochemistry and staining on reticulin according to Gomori. Dehydrated and covered preparations were photographed under a microscope, and quantification was made using ImageJ.

Results: older stressed female rats had statistically significantly larger adipocytes and higher degree of inflammation than other groups. Number of M1 macrophages decreased in younger animals after chronic stress, while in the elderly it increased significantly. Number of M2 macrophages decreased after chronic stress in both young and old animals.

Conclusion: chronic stress had the opposite effect on young and old animals. While in younger animals it reduced low-grade inflammation in adipose tissue, in older animals inflammation increased.

Keywords: adipocytes; adipose tissue; chronic stress; inflammation; macrophages; inflammation

10. LITERATURA

1. Filaković P i sur. Psihijatrija. Osijek: Medicinski fakultet Osijek.
2. Myers DG. Psychology. Second edition. Worth publishers, inc; 1989.
3. Hudek-Knežević J, Kardum I. Stres i tjelesno zdravlje. Zagreb: Naklada Slap; 2006.
4. Thompson AK, Fourman S, Packard AEB, Egan AE, Ryan KK, Ulrich-Lai YM. Metabolic consequences of chronic intermittent mild stress exposure. Physiol Behav. 2015; 150: 24-30.
5. Segerstrom SC, Miller GE. Psychological Stress and the Human Immune System: A Meta-Analytic Study of 30 Years of Inquiry. Psychol Bull. 2004;130(4):601-630.
6. McEwen BS. Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain. Physiological Reviews. 2007; 87(3): 873-904.
7. Yau YHC, Potenza MN. Stress and Eating Behaviors. Minerva Endocrinol. 2013; 38(3): 255-267.
8. Pinel JPJ. Biološka psihologija. Prijevod 4. izd. Zagreb: Naklada Slap; 2002.
9. Harrison. Principi interne medicine. 1. hrvatsko izd. (prijevod 13. američkog izd.). Split: Placebo; 1997.
10. Vicennati V, Pasqui F, Cavazza C, Pagotto U, Pasquali R. Stress-related Development of Obesity and Cortisol in Women. Obesity. 2009; 17(9): 1678-1683.
11. Guyton A, Hall JE. Medicinska fiziologija. 10. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2003.
12. Sinha R, Jastreboff AM. Stress as a common risk factor for obesity and addiction. Biol Psychiatry. 2013; 73(9): 827-835.
13. Ulrich-Lai YM, Fulton S, Wilson M, Petrovich G, Rinaman L. Stress Exposure, Food Intake, and Emotional State. Stress. 2015; 18(4): 381–399.
14. Junqueira LC, Carneiro J. Osnove histologije. 10. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2005.
15. Guerre-Millo M. Adipose tissue secretory function: implication in metabolic and cardiovascular complications of obesity. J Soc Biol. 2006; 200(1): 37-43.
16. Sideri A, Stavrakis D, Bowe C, Shih DQ, Fleshner P, Arsenescu V, i sur. Effects of obesity on severity of colitis and cytokine expression in mouse mesenteric fat. Potential role of adiponectin receptor 1. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2015;308(7):G591-G604.

17. Cartier A, Côté M, Lemieux I, Pérusse L, Tremblay A i sur. Sex differences in inflammatory markers: what is the contribution of visceral adiposity? Am J Clin Nutr. 2009;89(5)1307-1314.
18. Mohsen-Ibrahim M. Subcutaneus and visceral adipose tissue: structural and functional differences. Obesity reviews. 2010;11(1):11-18.
19. Lee CG, Carr MC, Murdoch SJ, Mitchell E, Woods NF, Wener MH, i sur. Adipokines, Inflammation, and Visceral Adiposity across the Menopausal Transition: A Prospective Study. JCEM. 2009; 94(4): 1104-1110.
20. Deck CA, Honeycutt JL, Cheung E, Reynolds HM, Borski RJ. Assessing the Functional Role of Leptin in Energy Homeostasis and the Stress Response in Vertebrates. Front Endocrinol. 2017;8:63.
21. Kim SJ, Chae S, Kim H, Mun DG, Back S, Choi HY i sur. A Protein Profile of Visceral Adipose Tissues Linked to Early Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. MCP. 2014; 13: 811-822.
22. Liu KH, Chan YL, Chan WB, Chan JC, Chu CWW. Mesenteric Fat Thickness Is an Independent Determinant of Metabolic Syndrome and Identifies Subjects With Increased Carotid Intima-Medica Thickness. Diabetes Care. 2006;29(2):379-384.
23. Yu R, Kim CS, Kwon BS, Kawada T. Mesenteric adipose tissue-derived monocyte chemoattractant protein-1 plays a crucial role in adipose tissue macrophage migration and activation in obese mice. Obesity (Silver Spring). 2006;14(8):1353-62.
24. Wood IS, de Heredia FP, Wang B, Trayhurn P. Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. Proc Nutr Soc. 2009; 68(4): 370-7.
25. Trayhurn P, Wang B, Wood IS. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? Br J Nutr. 2008; 100(2): 227-35.
26. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress and diabetes. J Clin Invest. 2005; 115(5): 1111-1119.
27. Liu YC, Zou XB, Chai YF, Yao YM. Macrophage Polarisation in Inflammatory Diseases. Int J Biol Sci. 2014;10(5):520-529.
28. Rőszer T. Understanding the Mysteroius M2 Macrophage Activation Markers and Effector Mechanisms. Mediators od Inflammation. 2015;2015:816460.
29. Barros MHM, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G. Macrophage Polarisation: an Immunohistochemical Approach for Identifying M1 and M2 Macrophages. PLoS One. 2013;8(11):e80908.

30. Barbosa-da-Silva S, Fraulob-Aquino JC, Lopes JR, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Wight Cycling Enhances Adipose Tissue Inflammatory Responses in Male Mice. PLoS One. 2012;7(7):e39837.
31. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. Nature. 2013;496(7446):445-455.
32. Sun K, Tordjman J, Clément K, Scherer PE. Fibrosis and Adipose Tissue Dysfunction. Cell Metab. 2013;18(4):470-477.
33. Pryce CR, Fuchs E. Chronic psychosocial stressors in adulthood: Studies in mice, rats and tree shrews. Neurobiol Stress. 2017;6:94-103.
34. Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: Implications for a model of depression. Neurosci Biobehav Rev. 1981;5(2):247-251.
35. Retana-Márquez S, Bonilla-Jaime H, Vázquez-Palacios G, Domíniguez-Salazar E, Martínez-García R, Velázquez-Moctezuma J. Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. Psychoneuroendocrinology. 2003;28(2):207-227.
36. Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. Pychopharmacology. 1997;134(4):319-329.
37. Chusyd DE, Wang D, Huffman DM, Nagy TR. Relationship between Rodent Ehite Adipose Fat Pads and Human White Adipose Fat Depods. Front Nutr. 2016;3:10.
38. Lee BC, Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. Biochim Biophys Acta. 2014;1842(3):446-62.
39. Balcombe JP, Barnard ND, Sandusky C. Laboratory Routines Cause Animal Stress. Lab Animal Sci Prof. 2004;43(6):42-51.
40. Karagiannides I, Golovatscka V, Bakirtzi K, Sideri A, Salas M, Stavrakis D, i sur. Chronic unpredictable stress regulates visceral adipocyte-mediated glucose metabolism and inflammatory circuits in male rats. Physiol Rep. 2014;2(5):e00284.
41. Scott KA, Melhorn SJ, Sakai RR. Effects of Chronic Social Stress on Obesity. Curr Obes Rep. 2012;1(1):16-25.
42. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante Jr AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest. 2003;112(12):1796-1808.

43. Halberg N, Khan T, Trujillo ME, Wernstedt-Asterholm I, Attie AD, Sherwani S, i sur. Hypoxia-Inducible Factor 1α Induces Fibrosis and Insulin Resistance in White Adipose Tissue. Mol Cell Biol. 2009;29(16):4467-4483.
44. Spencer M, Yao-Borengasser A, Unal R, Rasouli N, Gurley CM, Zhu B, i sur. Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010;299(6):E1016-E1027.

11. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODATCI:

- Ime i prezime: Ivana Kovač
- Datum i mjesto rođenja: 19. lipnja 1995., Rijeka
- Adresa stanovanja: Kičeri 24e, 51253 Bribir
- Kontakt: 091/899 2808
- E-mail: ivana.kovac55@gmail.com

OBRAZOVANJE:

- 2002. – 2010. Osnovna škola dr. Josipa Pančića, Bribir
- 2010. – 2014. Medicinska škola u Rijeci
- 2014. – 2017. Medicinski fakultet Osijek, preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

AKTIVNOSTI:

- Aktivna sam članica triju studentskih udruga Medicinskog fakulteta: CMLDSA (Croatian Medical Laboratory Diagnostics Students' Association), CroMSIC (Croatian Medical Students' International Comittee) i EMSA (European Medical Students' Association).

  Projekti u kojima sam sudjelovala:

  1. 2016. **Lab Skills, radionica predanalitika: uzorkovanje krvi i antikoagulansi** – teoretsko i praktično učenje pravila uzorkovanja krvi
  2. 2016. – 2017. **Bolnica za medvjediće** – cilj je projekta smanjiti strah djece od odlaska liječniku
- Aktivno sudjelovanje na kongresu **Upoznaj me** 2016.