

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

ENA NAKIĆ

PROTEMSKI PRISTUP PRETILOSTI U PASA

ZAGREB, 2018.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za Kemiju i biokemiju i Proteomskom laboratoriju Klinike za unutarnje bolesti, pod vodstvom prof. dr. sc. Renate Barić Rafaj i predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2018.

Popis kratica

AGC	-(<i>automatic gain control</i>) automatska kontrolna ciljana vrijednost
AIM	-inhibitor apoptoze makrofaga
ALT	-alanin aminotransferaza
AST	-aspartat aminotransferaza
BAT	-(<i>brown adipose tissue</i>) smeđe masne stanice
BCS	-(<i>body score mass</i>) indeks tjelesne kondicije
BIL	-ukupni bilirubin
BUN	-(<i>blood urea nitrogen</i>) dušik iz uree
BW	-(<i>body weight</i>) relativna tjelesna težina
CHOL	-kolesterol
EO	-eozinofili
FT	-(<i>fourier transform</i>) Fouriereva transformacija
GH	-(<i>growth hormon</i>) hormon rasta
GLUK	-glukoza
HCD	-(<i>high collision dissociation</i>)
HDS	-(<i>hock-to.-stifle</i>) udaljenost između koljenog i tarzalnog zgloba
HP	-haptoglobin
HTC	-hematokrit
IGF	-(<i>insulin-like growth factor</i>) inzulinu sličan faktor rasta
IGFBP-3	-(<i>insulin-like growth factor-binding protein 3</i>) protein koji veže IGF
IL-6	- interleukin 6
ITGB2	-(<i>integrin subunit beta2</i>) integrinski lanci
ITIH	-(<i>inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain</i>) teški lanac inhibitora tripsina
IWD	-(<i>ilium wing distance</i>) udaljenost ilijačnih krila
LUM	-lumikan
LY	-limfociti
MBMI	-(<i>modified body mass index</i>) modificirani indeks tjelesne mase
MCH	-(<i>mean corpuscular hemoglobin</i>) prosječni sadržaj hemoglobina u eritrocitu
MCHC	-(<i>mean corpuscular hemoglobin concentration</i>) prosječna koncentracija hemoglobina
MCV	- (<i>mean corpuscular volume</i>) prosječni volumen eritrocita
MGAM	- maltaza-glukoamilaza
MO	-monociti

MS2 MS/MS-(*mass spectometry*) masena spektometrija
NCE -(*normalized collision energy*) normalizirana kolizijska energija
PMT -postranslacijska modifikacija
RBC -(*red blood cell count*) broj eritrocita
RBP4 -(*retinol binding protein 4*) retinol-vezajući protein 4
RDW -(*red blood cell distribution width*) distribucija eritrocita po volumenu
REF -referentne vrijednosti laboratorija
SEG -segmentirani leukociti
SLRP -(*small leucine-rich proteoglycans*) skupina proteoglikana bogata leucinom
T2D -dijabetes tipa 2
TEAB -triethyl amonijev bikarbonat
TL -(*truncal lenght*) dužina trupa
TNF- α -(*tumor necrosis factor alpha*) tumorski čimbenik nekroze alfa
TRIG -trigliceridi
TSH -tiroidni stimulirajući hormon
TTR -transtiretin
WAT -(*white adipose tissue*) bijelo masno tkivo
WBC -(*white blood cells*) broj leukocita
WC -(*weist circumference*) opseg struka

SADRŽAJ RADA	stranica
1. UVOD	1
1.1. ETIOLOGIJA	1
1.2. INDEKS TJELESNE TEŽINE	2
1.3. ULOGA MASNOG TKIVA	3
1.4. UTJECAJ DEBLJINE NA ZDRAVLJE	4
1.5. TERAPIJA	5
1.6. PROTEOMIKA	6
2. HIPOTEZA	7
3. ISPITANICI I METODE	7
3.1. ŽIVOTINJE	7
3.2. METODE	8
3.2.1. PRIPREMA UZORKA	8
3.2.2. OBILJEŽAVANJE PEPTIDA	8
3.2.3. ANALIZA MASENOM SPEKTROMETRIJOM LC-MS	9
3.3. STATISTIČKA ANALIZA	9
4. REZULTATI	10
5. RASPRAVA	18
6. ZAKLJUČCI	25
7. ZAHVALA	26
8. LITERATURA	26
9. SAŽETAK	33
10. SUMMARY	33
11. ŽIVOTOPIS	34

1.UVOD

Debljina je postala globalni problem 21.stoljeća, prisutna je u ogromnim razmjerima, smanjujući kvalitetu i duljinu života ljudi i životinja povećanjem morbiditeta i mortaliteta. Pretilost se definira kao nakupljanje prekomjerne količine masnog tkiva u organizmu (BURKHOLDER i sur., 2000). Prekomjerna tjelesna težina se može definirati kao stanje u kojem količina masti u organizmu prelazi onu granicu koja se smatra optimalnom za dobro zdravlje. Do pretilosti dolazi kada tjelesna težina postane toliko velika da može uzrokovati ozbiljne zdravstvene probleme. Dugo se smatralo da je masno tkivo inertno spremište energije, međutim, danas je poznato da bijele masne stanice proizvode biološki aktivne supstance „adipokine“ (ATHYROS i sur., 2010). Većina adipokina se ponaša poput proupalnih citokina, te na taj način uzrokuju perzistentno postojanje blage upale (SCHÄFFLER i SCHÖLMERICH, 2010; CHMELAR i sur., 2013). Istraživanja koja su se provodila zadnjih 10 godina potvrđuju da dvije trećine ljudi imaju prekomjernu tjelesnu težinu ili da su pretili, te da je prevalencija pretilosti kod ljudi u razdoblju od 2004. do 2006. godine iznosila preko 33% (OGDEN i sur., 2007). Kada govorimo o kućnim ljubimcima, procjenjuje se da je otprilike 22.4 do 44 % pasa pretilo (HILL, 2009; McGREEVY i sur., 2005; LUND i sur., 2006), dok se kod mačaka taj broj kreće između 19 i 52 % (LUND i sur., 2006; GERMAN, 2006). U SAD-u primjerice, za 55% pasa i 53% mačaka se smatra da imaju preveliku tjelesnu težinu ili da su pretili (DE GODOY i SWANSON, 2013) Također , utvrđeno je da broj pretilih pasa proporcionalno raste sa povećanjem broja pretilih ljudi (GERMAN, 2006). Ovi brojevi od iznimne su važnosti, s obzirom da se zna da debljina ne predstavlja samo nakupljanje prevelikih količina masnog tkiva, već da masno tkivo ima važnu ulogu u metaboličkim i hormonskim promjenama u organizmu (HILL, 2009).

1.1. ETIOLOGIJA

Postoje mnogi genetski i okolišni čimbenici (dob, spol, hormonski status) koji se navode kao mogući uzroci pretilosti, no glavni uzrok nastanka je energetska disbalans tj. prekomjerna unos i/ili premala potrošnja kalorija. Određene pasmine pasa su predisponirane za debljinu, kao što su: labrador retriever, bokser, škotski terijer, škotski ovčar, baset, koker španijel, jazavčar, bigl te neke gigantske pasmine (GOSSELIN i sur., 2007; EDNEY i SMITH, 1986; DIEZ i NGUYEN, 2006). Međutim, postoje i određene pasmine koje su otporne na razvoj pretilosti, kao što je hrt. Nadalje, starenjem dolazi do smanjenja metaboličkih aktivnosti u organizmu, pa samim time dolazi do povećanog rizika razvitka

pretilosti (KRONFELD i sur., 1991). Pretilost je češća kod mladih kuja, ali nakon 12. godine starosti 40% pasa oba spola smatra se pretilim (McGREEVY i sur., 2005; ARMSTRONG i LUND, 1996). Bitan rizik nastanka pretilosti kod oba spola je kastracija. Poznato je da spolni hormoni (naročito estrogen) imaju bitnu ulogu u metabolizmu. Nedavna istraživanja su pokazala da estrogen inhibira lipogenezu te određuje broj adipocita (COOKE i NAAZ, 2004). Nakon kastracije dolazi do hormonskih promjena u organizmu te smanjenja metabolizma kao posljedice gubitka spolnih hormona (EDNEY i SMITH, 1986; McGREEVY i sur., 2005; JEUSETTE i sur., 2004).

Etiologija nastanka pretilosti kućnih ljubimaca u uskoj je vezi sa pretilosti kod ljudi. Domestifikacija pasa i mačaka te antropomorfizam drastično su utjecali na promjenu okoliša u kojem te životinje žive kao i na njihovo socijalno ponašanje. Životinje su prešle sa lovačkog načina života na kućni, individualni način življenja (62% kućanstava u SAD-u ima samo jednog ljubimca), sa obiljem hrane na raspolaganju. Edney i Smith u istraživanju (1986) navode da je povećan postotak pretilih pasa kod starijih vlasnika, na što vjerojatno utječu smanjena aktivnost te način hranjenja. Nadalje, istraživanja su utvrdila da ljudi čiji su ljubimci pretili koriste hranu kao zamjenu za pažnju i ljubav, dok vlasnici ljubimaca normalne tjelesne težine puno češće koriste razne igre i aktivnosti (SHEARER, 2010).

1.2. INDEKS TJELESNE TEŽINE

Za razliku od kućnih ljubimaca, dijagnostika povećane tjelesne težine i pretilosti kod ljudi je relativno laka. Zahtjeva samo mjerenje visine i težine. Kod životinja ona ovisi o vrsti, pasmini te dobi određene životinje. Razvijene su mnoge tehnologije za mjerenje, međutim samo neke od njih se mogu koristiti kao rutinski testovi, dok kod nekih nedostaje točnosti, preciznosti, ili oboje (GERMAN, 2006).

Mjerenja težine uključuju relativnu tjelesnu težinu (eng. BW=body weight) (LAFLAMME, 2005), indeks tjelesne kondicije (eng. BCS=body condition score) (GERMAN, 2006, LUND i sur., 2006, KOBAYASHI i sur., 2002), morfometrične analize te dimenzionalnu procjenu pomoću vrpce (GERMAN, 2006). Sva ta mjerenja daju prikladnu procjenu količine masnog tkiva kod pasa, međutim, njima se ne može izmjeriti količina visceralne masti. Indeks tjelesne težine je okvirni pokazatelj uhranjenosti kod ljudi, te predstavlja omjer tjelesne težine i visine. (kg/m^2). S obzirom da psi hodaju na četiri noge, za mjerenje se koristi dužina trupa (TL). Tako je nastao modificirani indeks tjelesne mase

(MBMI) koji se definira kao omjer tjelesne težine psa i dužine trupa u m^2 ($BW(kg)/TL(m^2)$). Opseg struka (WC,cm) se mjeri preko trnastih izdanaka četvrtog lumbalnog kralješka pomoću trake omotane oko trbuha između zadnjih rebara i ilijačnog grebena, dok životinja stoji. Udaljenost ilijačnih krila (IWD,cm) je širina između dorzalnih ilijačnih grebena, dok se udaljenost između koljenog i tarzalnog zgloba označava kao HDS (eng.Hock-to-stifle) i mjeri se u centimetrima (GERMAN, 2006b).

1.3. ULOGA MASNOG TKIVA

Masno tkivo se dugo smatralo difuznim, nedefiniranim tkivom čija je glavna uloga pohrana energije u obliku triglicerida i toplinska izolacija organizma (DE GODOY i SWANSON, 2013). Međutim, nedavna istraživanja su dokazala da masno tkivo ima značajnu sekretornu ulogu te se danas smatra važnom endokrinom žlijezdom. Otkriće leptina 1994. imalo je znatnu ulogu u endokrinologiji, te samim time i daljnjem istraživanju uloge masnog tkiva (ZHANG i sur., 1994). Masno tkivo sadrži veliki broj raznovrsnih stanica. Adipociti (masne stanice) su dispergirane u vezivnom tkivu čitavog organizma (ROSS i PAWLINA, 2006). Međutim, adipociti su dominantne stanice te čine jednu do dvije trećine ukupnog broja stanica masnog tkiva (AILHAUD i sur., 1992). Dokazana je i prisutnost matičnih stanica i preadipocita, stanica važnih za ekspanziju masnog tkiva koja se javlja kod pretilosti. Ove stanice dovode do hiperplazije masnog tkiva, nakon što postojeće masno tkivo dosegne kritičnu razinu hipertrofije (FISCHER-POSOVASZKY i sur., 2007). Monociti i makrofagi u masnom tkivu imaju iznimno važnu ulogu kod bolesti povezanih sa debljinom. Naime, oni su izvor proupalnih, prokoagulatornih faktora i akutno faznih citokina (citokine također proizvode adipociti i endotelne stanice), a taj broj raste sa porastom adipocitne hipertrofije (TVARIONAVICIUTE i sur., 2012).

U masnom tkivu postoje dvije vrste adipocita: bijelo masne stanice (WAT) te smeđe masne stanice (BAT). Bijele masne stanice čini većinu adipocita u odraslom tkivu i čini tipični izgled masnog tkiva: mnogo velikih stanica ispunjenih trigliceridima te okruženih mnoštvom manjih stanica i struktura. Glavna razlika između WAT i BAT je prisutnost lipidnih kapljica u smeđem masnom tkivu koji su aktivno uključeni u termogenezu kao rezultat ekspresije različitih gena koji utječu na mitohondrijsku funkciju, uključujući termogenin, protein prisutan u visokom postotku kod novorođenčadi (TVARIONAVICIUTE i sur., 2012; ROUSSET i sur., 2004).

Adipogeneza je u uskoj vezi sa angiogenezom. Prilikom rasta i sazrijevanja masnog tkivo, krvne žile pridonose adipogenezi na razne načine. Krvne žile su za adipocite važan izvor nutrijenata, kisika, faktora rasta i citokina. Produkti endotelnih stanica, kao što su različiti faktori rasta i citokini komuniciraju sa adipocitima pomažući im u ekspanziji i odvodnji suvišnih produkata masnog tkiva (CAO, 2010). Međutim, nagli rast masnog tkiva ne mora nužno pratiti i proliferacija krvnih žila, što može dovesti do hipoksije i posljedično sinteze i otpuštanja upalnih medijatora (citokina) i angiogenih faktora (TRAYHURN i WOOD, 2004).

Prije 25 godina se otkrilo da WAT izlučuje hormon leptin. Od tada, WAT se smatra važnim endokrinim organom koji izlučuje veliki broj supstanci, uključujući steroidne hormone, faktore rasta i citokine, komplementne proteine, vežuće proteine, eikozanoide, vazoaktivne tvari, regulatore metabolizama lipida i glukoze te druge tvari koji aktivno sudjeluju u energetsom metabolizmu i modulaciji apetita (RADIN i sur., 2009; BADMAN i sur., 2007; JUGE-AUBRY i sur., 2005). Mnogi hormoni i faktori koji se izlučuju iz masnog tkiva se zajedničkim nazivom nazivaju „adipokini“ ili „adipocitokini“. Ovi termini se odnose na proteine koji sudjeluju u staničnoj signalizaciji, otpuštaju se iz stanica masnog tkiva, te specifično djeluju na staničnu diferencijaciju, energetske metabolizam, diferencijaciju tkiva, imunosni odgovor te imaju funkciju u endokrinom, parakrinom te autokrinom lučenju (WANG i sur., 2008). Do danas je otkriveno više od 50 različitih adipokina.

1.4. UTJECAJ DEBLJINE NA ZDRAVLJE

Kad su psi u pitanju, očigledno je da debljina ne uzrokuje probleme kao što su manjak samopouzdanja i stigmatizacija. Međutim, postoji čitav niz bolesti koje se dovode u vezu sa pretilosti, kao što su: osteoartritis, ortopedske bolesti, kardiorespiratorne bolesti, urinarne i reproduktivske poremetnje, dermatološki problemi, povećani rizik za određene tumore, te također moguće komplikacije kod anestezije (GERMAN, 2006). Uz to, veliki je broj endokrinopatija povezanih sa pretilosti, kao što su diabetes mellitus, hipotiroidizam, hiperadrenokorticism te inzulinom (BURKHOLDER i TOLL, 2000).

Inzulin je hormon koji izlučuju β -stanice gušterače i koji ima ulogu u unosu i iskorištavanju glukoze u perifernom tkivu. Masno tkivo, a naročito abdominalno, predstavlja glavni uzrok rezistencije na inzulin i razvoja hiperinzulinemije, što dovodi do razvoja dijabetesa tipa 2 (T2D), od kojeg znatno češće oboljevaju mačke i ljudi nego psi, te je samim time kod njih debljina bitan rizični faktor za T2D. Suprotno tome, psi češće oboljevaju od

dijabetesa tipa 1, kod kojeg ne dolazi do proizvodnje inzulina. Kod pretilih pasa su izmjerene povećane koncentracije hormona tiroksina i trijodtironina (T_3 i T_4), u odnosu na pse normalne tjelesne težine (povećanje u okviru referentnih vrijednosti) dok ostali parametri (slobodni T_4 , tiroidni stimulirajući hormon (TSH), stimulacijski testovi) nisu bili znatno promijenjeni. Istraživanja pokazuju da kod pretilih pasa može doći do promjena koncentracija lipida, uključujući povećanje koncentracija kolesterola, triglicerida i fosfolipida, iako često ne prelaze gornju granicu referentnih vrijednosti (BAILHACHE i sur., 2003; ZORAN, 2010). Debljina je važan rizični faktor za razvoj ortopedskih poremećaja kod kućnih ljubimaca, osobito pasa, kod kojih pogoduje razvoju degenerativnih i traumatskih oboljenja. Utvrđeno je da kod koker španijela debljina ima bitnu ulogu u frakturi kondila humerusa, rupturi prednjeg križnog ligamenta te promjenama intervertebralnog diska (WHITE i WILLIAMS, 1994). Također, debljina predstavlja rizični faktor za razvoj kolapsa traheje kod malih pasa (GREGORY, 1994), a može dovesti do srčanog udara, te pogoršati sliku laringealne paralize i brahiocefaličnog respiratornog sindroma. Nadalje, utječe na funkciju srca, uzrokujući aritmije, povećanje volumena lijeve klijetke, krvnog tlaka i volumena plazme. Uz sve to, povezana je sa trombozom portalne vene te hipoksijom miokarda (LEKCHAROENSUK i sur., 2000). Uvrđena je povezanost između debljine i nekih slučajeva poremećaja funkcije uretralnog sfinktera (GLICKMAN i sur., 1989) i poznato je da neki psi sa debljinom razvijaju inkontinenciju. Smanjenje težine kod tih pasa često može dovesti do rješavanja problema inkontinencije, bez popratne terapije. Pretili psi su također predisponirani nastanku oksalatnih kamenaca (ROUDEBUSH i sur., 2008). Pretile životinje imaju povećan rizik od distocije vjerovatno zbog prisutnosti velike količine masnog tkiva u i oko porođajnog kanala (EDNEY i SMITH, 1986).

1.5. TERAPIJA

Jasno je da je nekim vlasnicima teško spriječiti debljanje njihovih kućnih ljubimaca osobito ako su iznimno vezani za njih, imaju snažno suosjećanje te koriste hranu kao primarni način komunikacije. Jedan od razloga je taj što svim vlasnicima ne smeta u istoj količini činjenica da njihov ljubimac ima preveliku tjelesnu težinu ili je pretio. Glavni način kontrole debljine i gubitka tjelesne težine su uravnotežena prehrana i tjelovježba. Pri razmatranju mogućnosti smanjenja tjelesne težine za svoje kućne ljubimce, glavni razlozi zbog kojih vlasnici uključuju kućne ljubimce u programe mršavljenja sastoje se u preporuci veterinara ili veterinarskog osoblja, te vjerovanje da će gubitak težine poboljšati zdravlje njihovih pasa.

(HEO i sur., 2000). Danas na tržištu postoji čitav niz komercijalnih hrana u svrhu redukcije tjelesne težine. Većina dijeta uključuje hranu bogatu proteinima i mikronutrijentima a siromašnu ugljikohidratima (HEO i sur., 2000). Suplementi koji sadrže L-karnitin pokazali su se izvrsnim u redukciji masnog tkiva i očuvanju ostalih tkiva (ALAYASH, 2004). Preparat *Dirlotapid* je proizveden isključivo za smanjenje tjelesne težine kod pasa te se pokazao iznimno uspješnim. Ostali pripravci koji se koriste kod pasa i mačaka uključuju subitramin, dexfenfluramin, biljne proizvode koji sadrže guaranu i ma huang, agoniste α -adrenergičnih receptora te inhibitore pankreasne lipaze. Tjelovježba također ima bitnu ulogu u redukciji tjelesne težine: kod pasa, tjelesne aktivnosti uključuju šetnju, plivanje, hidroterapiju te upotrebu trake za trčanje.

1.6. PROTEOMIKA

S obzirom na povezanost debljine sa mnogim bolestima i njenoj iznimnoj zastupljenosti kako u ljudskoj, tako i životinjskoj populaciji, važno je istražiti molekularne mehanizme koji će nam pomoći u razumijevanju pretilosti te oblikovanju novih terapija. Budući da na razvoj pretilost utječu razni faktori, među kojima su genetska predispozicija i okolišni čimbenici, vjerojatno je da mehanizmi koji dovode do pretilosti mogu biti uvjetovani proteinskom aktivnošću, konačnim i funkcionalnim produktom gena (BARCELO-BATLORI i sur., 2009)

Proteomika je znanost koja se bavi proučavanjem proteoma organizma koji obuhvaća različite proteine koji se eksprimiraju u određenom vremenu, mjestu i specifičnim uvjetima. Kao relativno nova znanstvena tehnologija pokazala se iznimno uspješnom u različitim područjima medicine. Pojam proteomika prvi put je uveden 1997. godine, kao analog terminu genomika, znanosti koja se bavi proučavanjem genoma organizma (JAMES, 1997). Proučavanje proteoma ne uključuje samo identifikaciju proteina i njihovih razina ekspresije, već i karakterizaciju njihove strukture, postranslacijskih modifikacija (PTM), funkcije, subcelularne lokalizacije, kao i interakcije protein-protein ili protein-DNA. Proteomi stanice odrazit će neposredno okruženje u kojem se proučava. Kao odgovor na unutarnje ili vanjske znakove, proteini se mogu modificirati PTM, razmjestiti se unutar stanica, pojačano ili smanjeno sintetizirati. Proteomski pristup u proučavanju pretilosti je još uvijek u povojima, osobito u usporedbi s istraživanjima drugih patoloških stanja, poput raka ili kardiovaskularnih bolesti. Trenutni proteomski pristupi su brojni i raznoliki, uz stalnu primjenu novih strategija proučavanja, stoga se i broj publikacija koji opisuju korištenje proteomskih pristupa u

istraživanju ovog poremećaja eksponencijalno povećava uz porast novih saznanja o djelovanju masnog tkiva u organizmu (BARCELO-BATLORI i sur., 2009).

2. HIPOTEZA

Razvojem suvremenih tehnologija otkriveno je da masno tkivo, osim uloge u pohrani zaliha masti ima mnogo kompleksniju ulogu i da adipociti luče razne tvari zajedničkim imenom nazvane adipokini, čija precizna funkcija još nije razjašnjena. U istraživanju problema pretilosti kod pasa i karakterizaciji proteoma seruma klinički zdravih pasa sa povećanom tjelesnom težinom kao i utvrđivanju diferencijalno eksprimiranih proteina u usporedbi sa serumskim proteomom klinički zdravih pasa normalne tjelesne težine, očekuju se promjene u sustavima koji su poremećeni kao posljedica proliferacije masnog tkiva, prvenstveno promjene u proteinima endokrinog sustava, kao i utvrđivanje prisutnosti kronične upale niskog intenziteta.

3. ISPITANICI I METODE

3.1 Životinje

U istraživanju su sudjelovali psi privatnih vlasnika, uz potpisani informirani pristanak na sudjelovanje u provođenju sistematskog pregleda zdravlja, u sklopu kojeg je učinjena kompletna hematološka i biokemijska analiza periferne krvi istraživanih pasa. Skala od 1-5 korištena je u procjeni tjelesne mase, pri čemu indeks 1 i 2 označava premalu tjelesnu masu, 3 normalnu, 4 preveliku, dok indeks 5 označava stanje pretilosti (LAFLAMME, 1997).

Psi su bili podijeljeni u dvije skupine, D skupinu sa povećanom tjelesnom težinom, koju su sačinjavali psi sa BMI 4 i 5, te N skupinu pasa sa normalnom tjelesnom težinom, sa BMI 3. Kliničkim i laboratorijskim pregledom ustanovljeno je da su svi istraživani psi bili zdravi. Obje skupine sadržavale su pse različitih pasmina i dobi, a u svakoj istraživanoj skupini bilo je 5 mužjaka i 5 nekastriranih ženki. Krv je uzeta natašte, iz cefalične vene, u dvije epruvete, jednu sa EDTA antikoagulansom za hematološke pretrage, i druga sa gelom aktivatorom zgrušavanja, za biokemijske pretrage. Nakon procesa zgrušavanja, serumski epruveta centrifugirana je na 1200 g tijekom 10 minuta, nakon čega je dio seruma odvojen za rutinske biokemijske analize, a dio pohranjen na -80°C do izvođenja spektroskopskih mjerenja. Hematološka mjerenja provedena su upotrebom automatskog analizatora "Horiba

ABX cell counter" (Diagnostics, Montpellier, France) sa posebnim programom za pojedine vrste životinja, a biokemijska na automatskom analizatoru Olympus AU600 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan), upotrebom standardiziranih metoda i originalnih reagensa proizvođača.

Za provođenje sistematskog pregleda pasa i izradu rada izdano je odobrenje Povjerenstva za etiku Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.2. Metode

3.2.1. Priprema uzorka: određivanje i izolacija proteina

U pokusu je korišteno 10 uzoraka seruma pasa sa prevelikom tjelesnom težinom i 10 seruma pasa sa normalnom tjelesnom težinom. Nakon doleđivanja, svi dobiveni serumi centrifugirani su zatim na 16 000 x g na 4°C dodatnih 10 minuta. Supernatanti su preneseni u nove epruvete te je određena koncentracija ukupnih proteina u svakom uzorku. Koncentracija proteina određena je standardiziranom analizom (BCA Protein Assay Kit, Pierce). Prema dobivenim rezultatima, svi su uzorci normalizirani na 35 µg proteina te je uz puffer trietilamonijev bikarbonat (TEAB) ukupni volumen uzorka sveden na 50 µL. Uzorcima je dodan reducirajući reagens 1, 4 – ditiotretitol (DTT) te su inkubirani na 55°C jedan sat. Nakon redukcije slijedila je alkilacija uz jodoacetamid u mraku na sobnoj temperaturi tijekom pola sata. Taloženje proteina odvijalo se preko noći uz ledeni aceton na -20°C. Slijedilo je otapanje i centrifugiranje uzoraka na 8 000 x g, 10 minuta pri temperaturi od 4°C. Aceton se uklanja, a talog proteina na dnu epruveta se isušuje prije daljnjeg postupka. Precipitirani proteini otapali su se u 50 µL pufera TEAB te im je dodan tripsin u omjeru 1:35. Proces digestije proveden je na 37°C tijekom noći.

3.2.2. Obilježavanje peptida

Prije početka obilježavanja i uzorci i reagens za obilježavanje peptida Tandem mass tag (TMT) moraju stajati na sobnoj temperaturi. U uzorke se dodaje 19 µL TMT-a te se inkubiraju sat vremena na sobnoj temperaturi. Reakcija se zaustavlja dodatkom 5% otopine hidrosilamin-HCl uz inkubaciju od 15 minuta. Svi se uzorci zatim spajaju u jednu epruvetu koja se očitava upotrebom tekućinske kromatografije i spektroskopije masa (LC-MS).

3.2.3. Analiza masenim spektrometrom LC-MS

Obilježeni peptidi talože se, suše te rekonstituiraju u puferu A (2% acetonitrila u 0.1% mravlje kiseline). Na kolonu za tekućinsku kromatografiju (C18 PepMap100, 5 μ m, 100A, 300 μ m x 5mm) se nanosi količina od 1 μ g peptida, koristeći Dionex Ultimate 3000 RSLC nano flow sustav (Dionex). Peptidi se razdvajaju koristeći PepMap™ RSLC C18 50 cm x 75 μ m ID kolonu s linearnim gradijentom 5-35% pufera B (0.1% mravlja kiselina u 80% acetonitilu) tijekom 120 minuta s protokom brzine 300 nL/min. Eluati s kolone uvedeni su u maseni spektrometar MS Thermo Scientific Q Exactive Plus uz ionski izvor Nanospray Flex i SilicaTip emiter. Voltaža ionizacije je 1.9 kV, a temperatura prijenosne cijevi 250°C. MS je radio u pozitivnom načinu rada FT HCD MS2. Potpuni skenovi Fourier transform (FTMS) spektra dobiveni su u rasponu od m/z 350.0 do 1 900.0, s rezolucijom od 70000. Maksimum injekcijskog vremena potpunog FTMS skena postavljeno je na 110 ms, postičući tako automatsku kontrolnu (AGC) ciljanu vrijednost od 1×10^6 . Osam najintenzivnijih spektara odabrano je za daljnji fragmentacijski mod. Spektroskopski MS/MS sken namješten je na početnih m/z 100.00 s rezolucijom od 17 500 uz MS2 AGC od 5×10^4 . Energija kolizije iznosila je 35% normalizirane kolizijske energije (NCE). Prekursorski ioni izolirani su uz izolacijski prozor od ± 1.6 Da s dinamičkom ekskluzijom od 30 sekundi.

3.3. Statistička analiza

Statistička analiza hematoloških i biokemijskih rezultata provedena je upotrebom programa Statistica for Windows, a nivo značajnosti je određen kao $P < 0.05$. Distribucija dobivenih podataka analizirana je Kolmogorov-Smirnov testom, a usporedba između istraživanih skupina provedena je upotrebom Studentovog t- testa. Statistička analiza podataka dobivenim masenom spektroskopijom izvršena je upotrebom programa "Software Cytoscape" (v3.6.1) uz aplikaciju CLUEGO (v2.5.0). Također, pretražene su baze IntAct, STRING-EMBL, i Reactome radi dodatka proteina povezanih uz 8 identificiranih diferencijalno eksprimiranih proteina.

4. REZULTATI

Rezultati provedenih hematoloških pretraga pasa sa povećanom i normalnom tjelesnom težinom prikazani su u tablicama 1 i 2, dok su rezultati biokemijskih mjerenja prikazani u tablici 3. Tablica 4 prikazuje rezultate statističke obrade rezultata hematoloških i biokemijskih pretraga. U tablici 5 prikazani su rezultati dobiveni MS/MS analizom i usporedba diferencijalno eksprimiranih proteina u serumu pasa sa povećanom i normalnom tjelesnom težinom. Slika 1 prikazuje rezultate dobivene ClueGO analizom, a slika 2 prikazuje rezultate CEREBRAL analize uz prikaz proteina koji stupaju u interakcije sa diferencijalno eksprimiranim proteinima kod pretilih pasa u usporedbi sa psima normalne tjelesne težine.

Tablica 1: Rezultati hematoloških pretraga pasa sa povećanom i normalnom tjelesnom težinom: broj eritrocita i eritrocitne konstante

	RBC	HTC	MCH	RDW	MPV	HBG	MCV	MCHC
	x 10¹²/L	%	pg		fl	g/L	pg	g/L
D	7,9	56	22	14	7	175	71	314
D	7,2	51	23	13	9	165	71	323
D	7,1	52	24	13	8	172	74	330
D	7,1	52	23	14	10	166	72	321
D	6,4	44	23	15	9	144	69	327
D	7,4	50	23	12	9	174	68	347
D	7,6	54	24	14	9	183	71	338
D	6,6	45	22	13	7	149	67	322
D	6,3	46	24	14	7	150	74	323
D	7,1	53	25	14	7	178	75	334
N	8,5	57	22	13	8	189	68	328
N	6,9	47	22	12	9	152	68	323
N	7,7	54	22	14	9	171	70	315
N	7,4	54	24	14	8	177	73	328
N	6,8	50	24	14	7	165	72	333
N	8,0	58	23	13	8	186	72	323
N	6,4	49	25	13	8	160	77	326
N	7,4	52	23	13	8	171	69	331
N	6,7	47	23	14	7	154	70	328
N	7,9	57	24	13	8	188	72	331
REF.	5,5-8,5	37-55	19-23	-15	6,7-11,1	120-180	60-77	320-360

D - psi sa povećanom tjelesnom težinom, N - psi sa normalnom tjelesnom težinom, RBC – broj eritrocita, REF - referentne vrijednosti laboratorija Klinike za unutrašnje bolesti za pse, HTC – hematokrit, MCH - prosječni sadržaj hemoglobina u eritocitu, MCHC – prosječna koncentracija hemoglobina u eritocitu, MPV – prosječni volumen eritrocita, RDW – distribucija eritrocita po volumenu

Tablica 2: Rezultati hematoloških pretraga pasa sa povećanom i normalnom tjelesnom težinom: broj leukocita i diferencijalna krvna slika

	WBC	SEG	MO	LY	EO
	X 10⁹/L	%	%	%	%
D	13,5	74	1	22	3
D	9,6	74	0	23	3
D	7,7	42	0	56	1
D	14,3	69	0	30	1
D	9,1	69	0	27	4
D	7,2	79	2	16	2
D	9,3	72	0	22	6
D	5,4	57	2	38	3
D	5,7	22	2	71	5
D	8,9	53	1	36	10
N	13,2	50	0	36	14
N	12,4	70	0	23	7
N	7,7	60	0	39	1
N	13	66	0	23	11
N	12,4	59	4	37	0
N	17,4	41	3	49	7
N	11,2	46	4	47	3
N	9,4	59	5	27	9
N	7,9	39	3	55	3
N	6,4	69	8	22	1
REF.	6-17	60-70	3-10	12-33	2-10

D - psi sa povećanom tjelesnom težinom, N - psi sa normalnom tjelesnom težinom, REF- referentne vrijednosti laboratorija Klinike za unutrašnje bolesti za pse, WBC – broj leukocita, SEG – udio segmentiranih leukocita, MP – udio monocita, LY – udio limfocita, EO – udio eozinofila

Tablica 3: Rezultati biokemijskih pretraga pasa sa povećanom i normalnom tjelesnom težinom

	BUN	GLUK	BIL	AST	ALT	TRIG	CHOL
	mmol/L	mmol/L	μmol/L	IU/L,37°C	IU/L, 37°C	mmol/L	mmol/L
D	5,7	5	3,4	44	68	2	7,1
D	4,8	3,7	3,2	28	39	0,7	6,2
D	4,3	4,4	3,6	31	39	1	6,8
D	7,1	5,5	3,7	45	34	1,9	6,5
D	4,8	4,7	2,4	59	31	1,4	5,8
D	4,1	5,7	3,4	32	52	0,7	7,1
D	3,2	4,6	3,4	41	54	0,9	6,4
D	4,6	4,9	2,9	35	57	0,8	6,3
D	3,4	4,6	4,4	39	45	0,6	6,3
D	6,4	4	2,3	48	64	1,2	7,2
N	7,4	4,8	3,2	32	46	1,4	4,4
N	8,5	5,4	3,9	36	51	0,7	6,1
N	8,9	5,2	4	60	44	0,6	6,2
N	3,9	5,8	3,2	19	49	0,8	5,7
N	4,8	5,5	8,5	30	49	0,8	6,1
N	4,1	5,8	2,5	28	36	1,1	5,7
N	5,4	4,8	3,2	34	62	0,6	6,6
N	6,8	4,9	9,4	28	44	1	4,7
N	4,6	5,9	2,1	30	142	0,5	4,0
N	5,5	4,6	4	28	28	0,8	5,7
REF	3,3-8,3	3,6-6,5	1,7-8,6	-82	-88	0,2-1,3	3,5-7,1

D - psi sa povećanom tjelesnom težinom, N - psi sa normalnom tjelesnom težinom REF - referentne vrijednosti laboratorija Klinike za unutrašnje bolesti za pse, BUN – dušik iz uree, GLUK – glukoza, BIL – ukupni bilirubin, AST – aspartat aminotransferaza, ALT – alanin aminotransferaza, TRIG – trigliceridi, CHOL – kolesterol

Tablica 4: Rezultati statističke obrade podataka

	MEAN D	MEAN N	P	N-D	N-N	STD D	STD N
RBC	7,1	7,4	0,27	10	10	0,51	0,66
HTC	50,3	52,5	0,24	10	10	4,02	4,14
MCH	23,3	23,2	0,82	10	10	0,94	1,03
RDW	13,6	13,3	0,39	10	10	0,84	0,67
MPV	8,2	8,0	0,56	10	10	1,09	0,66
HB	165	171	0,36	10	10	13,5	13,6
MCV	71,2	71,1	0,93	10	10	2,65	2,72
MCHC	327	326	0,71	10	10	9,62	5,23
PLT	266	205	0,13	10	10	99,1	71,4
WBC	9,1	11,1	0,16	10	10	2,93	3,29
SEG	61,1	55,9	0,44	10	10	17,8	11,2
MO	0,80	2,7	0,05	10	10	0,91	2,71
LY	34,1	35,8	0,80	10	10	17,2	11,9
EO	3,8	5,6	0,31	10	10	2,69	4,74
BUN	4,8	5,9	0,11	10	10	1,24	1,80
GLUK	4,7	5,3	0,03*	10	10	0,61	0,47
BIL	3,3	4,4	0,18	10	10	0,62	2,4
AST	40,2	32,5	0,10	10	10	9,31	10,6
ALT	48,3	55,1	0,53	10	10	12,6	31,8
TRIG	1,1	0,83	0,12	10	10	0,50	0,27
CHOL	6,6	5,5	0,003*	10	10	0,46	0,85

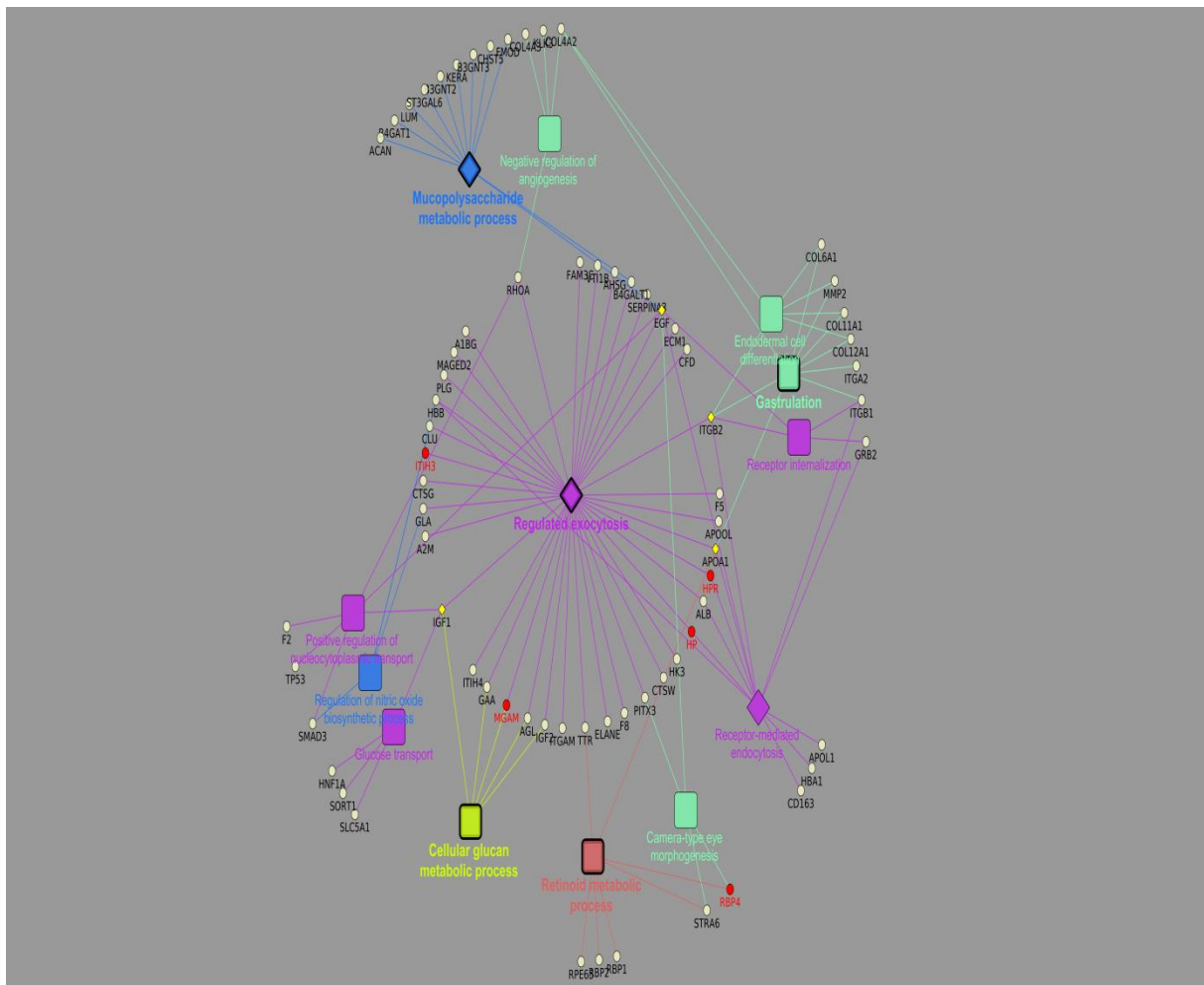
* $P < 0.05$ (Studentov t-test) u usporedbi pasa sa povećanom tjelesnom težinom sa psima sa normalnom tjelesnom težinom, MEAN – srednja vrijednost, N-D – broj pasa sa povećanom tjelesnom težinom, N-N – broj pasa sa normalnom tjelesnom težinom, STD D – standardna devijacija kod pasa sa povećanom tjelesnom težinom, STD N – standardna devijacija kod pasa sa normalnom tjelesnom težinom






Tablica 5: Rezultati dobiveni MS/MS analizom: usporedba diferencijalno eksprimiranih proteina u serumu pasa sa povećanom i normalnom tjelesnom težinom

Dunnov test signifikantnost $P < 0.05?$	Razlika N/D	Protein
Yes	-10,7	PREDICTED: maltase-glucoamylase, intestinal [Canis lupus familiaris]
Yes	-10,3	PREDICTED: haptoglobin-like [Canis lupus familiaris]
Yes	-10,3	RecName: Full=Haptoglobin; AltName: Full=Zonulin; Contains: RecName:
Yes	-10	haptoglobin heavy chain, HpH chain [dogs, Peptide, 245 aa]
Yes	9,5	apoptosis inhibitor of macrophage [Canis lupus familiaris]
Yes	9,5	PREDICTED: inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3
Yes	11,4	PREDICTED: retinol-binding protein 4 [Canis lupus familiaris]
Yes	11,4	PREDICTED: lumican [Canis lupus familiaris]
Yes	-11,1	haptoglobin light chain, HpL chain [dogs, Peptide, 83 aa]
Yes	11,1	PREDICTED: insulin-like growth factor-binding protein 3 [Canis lupus familiaris]

Spektroskopskom analizom seruma pasa sa povećanom tjelesnom težinom u usporedbi sa serumom pasa sa normalnom tjelesnom težinom ustanovljene su povećane koncentracije lakih i teških lanaca haptoglobina, proteina akutne faze, (HP), retinol-vezujućeg proteina 4 (RBP4) i enzima maltaze-glukoamilaze (MGAM), dok su snižene koncentracije imali inzulinu sličan faktor rasta – vezujući protein 3 (IGFBP-3), koji pripada porodici inzulinskih faktora rasta, inhibitor apoptoze makrofaga (AIM), teški lanac inhibitora tripsina (ITIH) te lumikan (LUM).

U cilju transformacija identificiranih proteina i provođenja biostatističke analize, pošto pregled baze podataka vezane uz pse pruža vrlo malo podataka, početna lista od 9 inicijalnih peptida, koji predstavljaju 8 diferencijalno eksprimiranih proteina, konvertirana je u njihove humane ortologe, radi uvida u kompleksniju bazu podataka i pretraživanja mogućih interakcija.

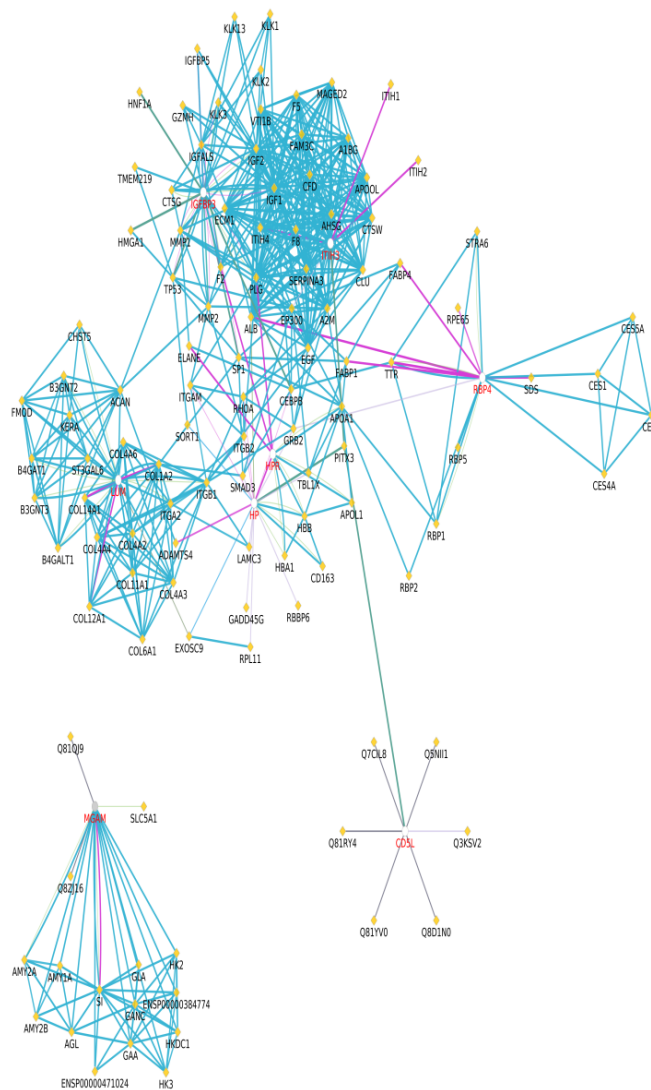


Node Fill Color	GO leader
	Cellular glucan metabolism
	Gastrulation
	Mucopolysaccharide metabolism
	Regulated exocytosis
	Retinoid metabolism process

Slika 1. Rezultati dobiveni ClueGO analizom

Pretražene su baze IntAct, STRING-EMBL, i Reactome radi dodatka proteina povezanih uz 8 identificiranih. Nakon obrade podataka, obogaćena mreža proteina sastoji se od ukupno 123 proteina (8 identificiranih i 123 dodana). Prikazani podaci nakon CEREBRAL analize, kojom se prikazuju najbolji kandidati za interakciju sa identificiranim proteinima,

prikazuju 123 proteina, uz oznaku da svi pripadaju ekstracelularnom prostoru. Nakon toga, provedena je ClueGO analiza, te definirana 3 najvažnija puta i povezanost u mreži: a. regulirana egzocitoza, b. metabolički procesi mukopolisaharida i c. receptorima potaknuta endocitoza. Na kraju, utvrđena su 4 najznačajnija proteina, pri čemu je stupanj značajnosti određen analizom povezanosti sa mrežom proteina, a to su inzulinski i epidermalni faktori rasta, apolipoprotein A1 i β integrinski lanci (ITGB2).



Slika 2. Rezultati CEREBRAL analize i prikaz proteina koji stupaju u interakcije sa diferencijalno eksprimiranim proteinima kod pretilih pasa

5. DISKUSIJA

Istraživanja potencijalnih biomarkera koji bi bili važni u ranoj dijagnostici, prognozi i praćenju tijeka bolesti, kao i odgovora na terapiju posljednjih godina postaje sve intenzivnija, kako u području humane medicine tako i u veterinarskoj medicini. Naročito važan aspekt pri tome predstavljaju rani biomarkeri koji se javljaju prije razvoja prvih simptoma poremećaja, jer se mnoga patološka stanja mogu prevenirati, a u njih se ubraja i prekomjerna tjelesna težina. Mada se proteomika zadnje desetljeće često koristi u identifikaciji proteina, pri čemu masena spektroskopija predstavlja metodu izbora, podaci o globalnoj proteinskoj ekspresiji kod životinja sa prevelikom tjelesnom težinom još uvijek su rijetki. U našem istraživanju, ustanovili smo da se grupa diferencijalno eksprimiranih proteina u skupini pasa sa prevelikom tjelesnom težinom sastoji HP, uključujući njegove teške i lake lance, RBP4, transportnog proteina, IGFBP-3, koji pripada porodici inzulinskih faktora rasta, AIM, inhibitorski protein, MGAM, enzim odgovoran za probavu ugljikohidrata, ITIH, protein iz porodice inhibitora te LUM, protein izvanstaničnog matriksa.

Spektroskopska analiza masa pokazala je da je koncentracija HP u serumu pasa sa prevelikom tjelesnom težinom povećana u usporedbi sa serumskim koncentracijama u pasa normalne tjelesne težine, pri čemu dolazi do povećanja koncentracija teških i lakih lanaca ovog proteina. Haptoglobin je akutno-fazni protein sintetiziran u jetri, čija koncentracija raste u različitim upalama. Jedna od najviše istraživanih funkcija HP je vezanje slobodnog hemoglobina u cirkulaciji (MAFFEI i sur., 2016). Haptoglobin je glikoprotein prvobitno izoliran iz jetre kao dio odgovora akutne faze na upalu, a kasnije je identificiran i u neutrofilima i monocitima (VOLP i sur, 2015). Određivanje koncentracije HG u laboratorijskoj dijagnostici se najčešće veže uz akutno fazni odgovor domaćina na upalu, pri čemu dolazi do povećane sinteze (EISELE i sur., 2005). Međutim, pored sinteze u jetri, rezultati mnogih istraživanja potvrdili su prisutnost ovog proteina i u adipoznom tkivu (EISELE i sur., 2005), pri čemu inflamatorni stres može dovesti do povećanja njegove sinteze (MAFFEI i sur., 2016).

Upotrebom komplementarnih metoda detekcije, RT-PCR metode, mRNAs koja kodira molekulu HP je uz mnoštvo ostalih adipokina detektirana i u bijelom masnom tkivu pasa (CHIELLINI i sur., 2004) što objašnjava povećanje koncentracije HP u pretilih pasa, ustanovljeno MS/MS pristupom u našem istraživanju. Također, mRNA za HP i sam HP povećani su i kod pretilih glodavaca (SCRIBA et al., 1979). FAIN i sur. (2004) stoga

sugeriraju proširivanje tradicionalnog pogleda na funkciju HP, te ovaj protein označavaju kao marker adipoziteta kod ljudi. Do istih zaključaka došli su i MAFEI i sur. (2016) utvrdivši da plazmatska koncentracija HP pozitivno korelira sa stupnjem adipoziteta kod ljudi.

Proteomskom analizom kulture adipocita sisavaca, FAIN i sur. (2004) označili su HP kao primarni proteina koji se otpušta iz masnih stanica. Molekula HP ima i prognostičko značenje, jer uz ostale biomarkere značajno korelira sa razvojem T2D kod pretilih ljudi (EISELE i sur., 2005). Haptoglobin ima sposobnost privlačenja monocita i makrofaga, te stoga ima vrlo važnu ulogu u povezanosti pretilosti i kronične sistemske upale (TRAYHURN i WOOD, 2004). U istraživanjima pretilosti kod ljudi, EL ALAMEY i sur. (2015) su ustanovili prisutnost kronične upale niskog intenziteta, a IL-6 i HP su označili ranim biomarkerima upale povezane uz razvoj kardiovaskularnih poremećaja i razvoja T2D. Također, HP je označen kao biomarker adipoziteta kod ljudi. U istraživanjima promjena koncentracija proteina u serumu pretilih ljudi, TRAYHURN i WOOD (2004) također su ustanovili povećane koncentracije HP, koji uz ostale adipocitokine uzrokuje razvoj kronične upale i povezuje pretilost sa razvojem inzulinske rezistencije i metaboličkog sindroma.

Promatran sa evolucijske perspektive, HP je neophodan za održavanje odgovarajućeg redox-statusa, a oslobođen iz oštećenih stanica, zbog sposobnosti privlačenja makrofaga, predstavlja esencijalnu komponentu obrambenog sustava u slučaju fizičke ozljede tkiva. Dok u jetri i mišićima HP ima protektivni efekt, indukcija sinteze u bijelom masnom tkivu predstavlja štetan moment zbog privlačenja makrofaga, što pridonosi razvoju kronične upale, koja dovodi do inzulinske rezistencije, stoga MAFFEI i sur. (2016) razmatraju pretilost kao neprirodno stanje i posljedicu modernog načina života koju prati pretjeran unos hrane.

Rezultati našeg istraživanja potvrdili su povećanu koncentraciju RBP4 kod pasa sa povećanom tjelesnom težinom u usporedbi sa psima normalne tjelesne težine. Retinol-vezujući protein 4 (RBP4) se najvećim dijelom sintetizira u jetri, a masno tkivo predstavlja drugi važan izvor ovog proteina, sa sintezom koja iznosi otprilike 20-40% od one u jetri (KLISIĆ i sur., 2017). Funkcija RBP4 se sastoji u a) transportu retinola (vitamina A) u cirkulaciji, od jetre prema perifernim tkivima i b) formaciji kompleksa sa proteinom transtiretinom, nosačem tiroidnih hormona (KOTNIK i sur., 2011; KLISIĆ i sur., 2017). Nakon otpuštanja retinola, RBP4 se filtrira u glomerulima bubrega, parcijalno reapsorbira i u takvoj slobodnoj formi sudjeluje u metabolizmu glukoze putem indukcije glukoneogeneze u hepatocitima i inhibicije ulaska glukoze u mišićne stanice. Povećana glukoneogeneza i

ometan ulazak u mišiće mogu rezultirati razvojem inzulinske rezistencije (KOTNIK i sur., 2011). Retinol-vezujući protein je identificiran i kao adipokin (KLISIĆ i sur., 2017) a koristi se i kao faktor prepoznavanja rizika ateroskleroze kod ljudi (NOOR i sur., 2017).

Sukladno dobivenim rezultatima, u istraživanjima pretilosti kod ljudi, Noor i sur. su također utvrdili pozitivnu korelaciju između RBP4 i indeksa tjelesne težine. GRAHAM i sur., (2006) su ustanovili povećane koncentracije RBP4 kod pretilih ljudi, bez dijabetesa, te ustvrdili pozitivnu korelaciju ovog proteina sa indeksom tjelesne mase. Studije provedene na štakorima pokazale su da RBP4 smanjuje ekspresiju glukoznog transportera GLUT4 u adipocitima i ometa djelovanje inzulina (FARJO i sur., 2012). Povećana ekspresija RBP4 potvrđena je i kod pretilih miševa te potvrđena kao glavni uzrok ometanja inzulinskih signala u mišićima i adipoznom tkivu, što može dovesti do razvoja sistemske inzulinske rezistencije, dok genetski modificirani miševi bez sposobnost sinteze RBP4 pokazuju povećanu osjetljivost na inzulin (CRAIG i sur., 2007). Nekoliko različitih varijanti gena za RBP3 povezano je uz pretilost, predispoziciju za akumulaciju visceralnog adipoznog tkiva, inzulinsku rezistenciju i razvoj T2D (KLISIĆ i sur., 2017; BROCH i sur., 2007). Također, studije provedene na kulturi stanica pokazuju da RBP4 stimulira ekspresiju proinflamatornih proteina u endotelnim stanicama (CRAIG i sur., 2007). Dodatno štetno djelovanje povećanih koncentracija RBP4 ogleda se i u vezanju za transtiretin (TTR), uslijed čega nastaju RBP4-TTR kompleksi, što onemogućava slobodni TTR u stimulaciji beta stanica pankreasa i posljedično ometa sekreciju inzulina (NUMAO i sur., 2012).

Fizička aktivnost se preporuča u terapiji pretilosti, jer ona ima povoljne efekte na poremećaje koji se javljaju u debljini, pri čemu su dugoročni efekti treninga povezani sa snižavanjem cirkulirajućeg RBP4, kao i normalizacijom koncentracije triglicerida u cirkulaciji (YANG i sur., 2005). Retinol-vezujući protein 4 je adipokin koji je uključen u ranu fazu razvoja inzulinske rezistencije, kod koje koncentracija glukoze u krvi još nije povećana, a uključen je i u razvoj ostalih komponenti koje sačinjavaju metabolički sindrom. Zbog ove prediktivne vrijednosti u dijagnostici, ovaj protein zaslužuje naročitu pažnju, osobito kod pojedinaca za koje je poznato da imaju predispozicije za razvoj pretilosti (KLISIĆ i sur., 2017). Rezultati mnogih istraživanja, uključujući i naše, ukazuje na potrebu razvoja novih terapija za dijabetes, čiji bi cilj bio snižavanje koncentracija RBP4 u cirkulaciji, zbog njegovih štetnih učinaka na metabolizam glukoze.

U serumu pasa sa povećanom tjelesnom težinom utvrđena je manja koncentracija IGFBP-3 u usporedbi sa psima normalne tjelesne težine. U literaturi postoje različiti podaci o kretanju koncentracije ovog proteina kod pretilosti, a odnose se većinom na miševe i ljude, dok za pse podaci nisu dostupni.

Inzulinski faktori rasta (IGF) obuhvaćaju sustav koji čine: 2 faktora rasta (IGF-1, IGF-2), 2 receptora (IGF-R1, IGF-R2) i 6 proteina koji imaju funkciju proteinskih nosača (IGFBP) sa vrlo visokim afinitetom vezanja IGF. Proteinski nosač IGFBP-3 je najzastupljeniji od navedenih proteina u krvi, sa glavnom funkcijom sprječavanja razgradnje IGF i olakšavanja njegovog transporta putem cirkulacije u različite organe (MOIRA i sur., 2014). Tijekom evolucije, IGF, njegovi proteinski nosači i receptori zauzeli su ključnu ulogu u procesima staničnog rasta, metaboličkim putevima i reprodukciji. Danas je poznato da IGF sustav ima vrlo važnu ulogu u širokom spektru patofizioloških promjena vezanih uz pretilost, razvoj inzulinske rezistencije i T2D, stoga predstavlja važan potencijalni terapijski cilj (HANSEN i sur., 2013). Proteini koji vežu inzulinske faktore rasta su također identificirani u masnom tkivu, međutim, njihova uloga još nije u potpunosti razjašnjena (RASMUSSEN i sur., 1995). Promatran sa funkcionalnog aspekta, IGFBP-3 ima ulogu u a) transportu IGF u plazmi, kontroli i regulaciji koncentracije u cirkulaciji, b) tkivno-specifičnom usmjeravanju IGF i c) modulaciji interakcije IGF sa receptorima (MOIRA i sur., 2014). Otprilike 90% IGF-a u plazmi vezano je za IGFBP-3 (MOIRA i sur., 2014). Funkcija IGFBP-3 sa sastoji i u zaštiti IGF-I od proteolitičke razgradnje (BLUM i sur., 1990).

Sukladno našim rezultatima, snižene koncentracije IGFBP-3 utvrđene su kod pretilih adolescenata, kod kojih su snižene koncentracije moguća posljedica povećanih aktivnosti enzima IGFBP-3 proteaza u cirkulaciji, čemu govori u prilog i povećana koncentracija fragmenata razgradnje IGFBP-3 (JONES i CLEMMONS, 1995). Studije provedene na modelima genetski modeliranih miševa, sa nemogućnošću sinteze IGFBP-3, pokazale su povećanje akumulacije masnog tkiva (MOHANRAJ i sur., 2013), stoga postoji mogućnost da snižene koncentracije IGFBP-3 predstavljaju ne samo posljedicu, već i uzrok povećane adipoznosti. Mogući uzrok padu koncentracije IGFBP-3 u cirkulaciji predstavlja i činjenica da je pretilost povezana sa padom sekrecije hormona rasta (GH), čija se koncentracija normalizira nakon gubitka viška tjelesne težine (KREITSCHMANN-ANDERMAHR i sur., 2010; YAKAR i sur., 2009). Naime, IGFBP-3 zajedno sa IGF-1 u pozitivnoj su korelaciji sa GH, a pošto imaju relativno dugo vrijeme poluživota u plazmi, predstavljaju stabilni pokazatelj koncentracija GH u dužem vremenskom razdoblju (INZAGHI i sur., 2017). Pošto IGFBP-3 ima antiinflamatorno djelovanje, kao i protektivni efekt za razvoj inzulinske

rezistencije, trebalo bi istražiti moguće posljedice pada koncentracija IGF-1 i IGF-2 u debljini pasa u razvoju kronične upale, koja je dokazana u prethodnim istraživanjima. Naime, kod pasa sa prevelikom tjelesnom težinom utvrđene su povećane koncentracije proinflammatoryh citokina i reaktanata akutne faze (TOMITA i sur., 2017). Za razliku od rezultata dobivenih našim istraživanjem, neki rezultati istraživanja debljine kod djece nisu pokazali promjene koncentracija IGF-1, IGF-2 i omjera IGF-1/IGF-2 (INZAGHI i sur., 2017). Zbog izuzetno važne uloge IGF sustava u prepoznavanju mogućih ciljeva potencijalnih terapija u spječavanju razvoja poremećaja vezanih uz debljinu, potrebna su daljnja istraživanja.

Spektroskopija masa serumskih proteina pasa sa povećanom tjelesnom težinom utvrdila je snižavanje AIM u odnosu na pse normalne tjelesne težine. Inhibitor apoptoze makrofaga, poznat i kao CD5L, je solubilni cirkulirajući protein sa visokim udjelom cisteina u strukturi, prvobitno identificiran kao čimbenik dužeg preživljavanja makrofaga (MIYAZAKI i sur., 2011). U većini slučajeva se proteini koji prenose signale vežu za stanične receptore na ciljnim stanicama, što rezultira regulacijom stanične signalizacije, ovisno o vrsti signala i receptora. Međutim, AIM signale prenosi na drugačiji način. Egzogeni AIM koji otpuštaju makrofazi ugrađuje se u adipocite i tamo djeluje direktno (ALKHOURI i sur., 2010). U masnom tkivu, AIM smanjuje sintezu masnih kiselina. Ovaj jedinstveni odgovor stimulira lipolizu, što rezultira smanjenjem veličine adipocita, koja je fiziološki relevantna za prevenciju pretilosti (ALKHOURI i sur., 2010). U našem slučaju, postoji mogućnost da je sniženi AIM uzročnik prevelike tjelesne težine, zbog izostanka lipolitičkog efekta koji je rezultirao povećanim nakupljanjem masti kod pasa sa prevelikom tjelesnom težinom.

Lipoliza se u adipocitima fiziološki pojačava u periodima gladovanja, kada se hormonskom stimulacijom G proteina i cAMP ovisnom staničnom signalizacijom aktivira hormon-senzitivna lipaza. MIYAZAKI i sur. (2011) u preglednom radu postavljaju logičko pitanje: što dovodi do lipolize u adipocitima kod pretilih jedinki, sa povećanim unosom hrane? Djelomičan odgovor na ovo pitanje je AIM. Naime, AIM inkorporiran u adipocite inducira lipolizu putem redukcije aktivnosti enzima sinteze masnih kiselina, što dovodi do smanjivanja koncentracije lipida u adipocitu i sprječava daljnju akumulaciju. U ovom slučaju AIM iskazuje povoljno djelovanje u sprječavanju razvoja pretilosti. Međutim, kada povećane koncentracije AIM-a djeluju na hipertrofirane adipocite, lipolitički proces postaje preintenzivan, što uzrokuje kronični upalni proces, povećavanje broja makrofaga u

adipoznom tkivu, te posljedično razvoj inzulinske rezistencije. Dakle, u latentnom razvoju metaboličkog sindroma, prije razvoja pretilosti i sa limitiranom količinom pohranjenih lipida u adipocitima, AIM djeluje preventivno i sprječava razvoj pretilosti putem lipolitičke indukcije. Međutim, u slučaju pretilosti, AIM potiče razvoj inzulinske rezistencije akumulacijom makrofaga i razvojem kronične upale, stoga terapija usmjerena na inhibiciju djelovanja AIM-a predstavlja obećavajući cilj u razvoju nove generacije lijekova u terapiji pretilosti (ALKHOURI i sur., 2010).

Zajedno sa enzimom izomaltazom sukraze (SI), enzim maltaza-glukoamilaza (MGAM) kod svih sisavaca ima esencijalnu ulogu u metabolizmu ugljikohidrata (REN i sur., 2011). Enzim MGAM pripada skupini hidrolaza, koje hidroliziraju linearne alfa 1,4 oligosaharidne supstrate, pri čemu imaju ključnu ulogu u regulaciji koncentracije glukoze u lumenu crijeva (REN i sur., 2011). Kod pasa sa povećanom tjelesnom težinom utvrđene su veće koncentracije ovog enzima u usporedbi sa psima normalne tjelesne težine.

Utvrđeno povećanje MGAM u serumu može biti uzrok, ali i posljedica prevelike tjelesne težine. Naime, povećana aktivnost MGAM može pojačati metabolizam ugljikohidrata i uzrokovati povećanu apsorpciju ugljikohidrata, te se stoga smatra dobrim terapijskim ciljem u razvoju novih lijekova protiv debljine (REN i sur., 2011; JONES, 2014). U usporedbi aktivnosti količine MGAMa u serumu pasa i vuka, JONES (2014) je utvrdio da vuk ima puno niže vrijednosti, jer u svojoj prehrani ne sadrži ugljikohidrate. U svakom slučaju, uloga MGAM još nije potpuno istražena i stoga predstavlja temelj za buduća istraživanja.

Lumikan, protein izvanstaničnog matriksa identificiran masenom spektrometrijom, posljednjih godina sve je zanimljiviji u kontekstu razumijevanja maligne transformacije. Ovaj protein svrstava se u skupinu proteoglikana bogatima leucinom (engl. small leucine-rich proteoglycans, SLRP) koji imaju različite biološke funkcije, od kojih je najvažnija unutarstanična fosforilacija kao važan mehanizam stanične signalizacije. U pasa sa prevelikom tjelesnom težinom u našem istraživanju je utvrđena niža koncentracija ovog proteina u usporedbi sa psima normalne tjelesne težine. Pretraživanjem dostupne literature, podaci o ekspresiji lumikana u pretilosti nisu nađeni. Protein je istraživan u kontekstu razumijevanja maligne transformacije, a da li predstavlja poveznicu između stanja pretilosti i razvoja malignih bolesti, trebaju potvrditi ili odbaciti daljnja istraživanja.

U skupini diferencijalno eksprimiranih proteina između istraživanih skupina pasa nalazi se i inhibitor teškog lanca inter alfa tripsina (ITIH), protein čije biološke funkcije još nisu u potpunosti istražene. Naime, tek je nedavno otkriven gen za ekspresiju ovog proteina u adipoznom tkivu ljudi (DAHLMAN i sur., 2012). Studija koja je uključivala 347 adipokina sekretoma humanih adipocita utvrdila je najveće razlike upravo u ekspresiji gena za ITIH (PINEIRO i sur., 2004). Uloga ITIH u razvoju poremećaja koje prate pretilost i mogućnosti korištenja diferencijalne ekspresije ovog proteina kao ranog biomarkera tek treba biti ispitana.

Biostatistička analiza diferencijalno eksprimiranih proteina

Prevelika tjelesna težina i pretilost kod istraživanih pasa primarno se odražava na promjene u sustavu kontrolirane egzocitoze, procesa koji je smješten u centar dijagrama dobivenog biostatističkom analizom povezanosti diferencijalno eksprimiranih proteina utvrđenih masenom spektroskopijom.

Egzocitoza predstavlja esencijalan biološki proces u svim eukariotskim stanicama, koji omogućuje odvijanje normalnih staničnih funkcija i intercelularnu komunikaciju pomoću otpuštanja različitih molekula, sekretornih faktora. Tvari koje sudjeluju u egzocitozi nalaze se u većini endokrinih stanica, u kojima dolazi do nakupljanja sekretornih vezikula u citoplazmi, koje se međusobno fuzioniraju sa plazmatskom membranom nakon inicijalnog signala. Istraživanja poremećaja egzocitoze koji su karakteristični za debljinu provedena su uglavnom na ljudima, te vezana uz promatranje funkcije specifičnih proteina, kao što su proteini koji sudjeluju u transdukciji signala izulina i poremećajima izlučivanja adiponektina, protektivnog proteina, čije je lučenje smanjeno (KOMAI i sur., 2016). Upotrebljavajući proteomske metode zajedno sa funkcionalnim metodama istraživanja, kao što su upotreba genetski modificiranih životinja i različitih protokola njihove prehrane, COATS i sur. (2017) je ustanovio da, uz stimulaciju inflamatornog odgovora, makrofazi u slučaju debljine potiču uklanjanje mrtvih adipocita pomoću procesa lizosomalne egzocitoze. Ovaj je proces naročito važan u trenutku kad dolazi do akumulacije adipoznog tkiva u mjeri da stupanj ekspanzije uzrokuje hipoksiju. Usprkos činjenici da tijekom razvoja pretilosti makrofazi masnog tkiva poprimaju metabolički aktivirani fenotip, sa dvostrukom funkcijom, fiziološkom, koja se ogleda u pojačanoj lizosomalnoj egzocitozi mrtvih adipocita i patološkom, u kojoj metabolička aktivacija inducira produkciju inflamatornih citokina, funkcija makrofaga u pretilosti još nije dovoljno precizno razjašnjena (COATS i sur., 2017).

Razmatrajući rezultate drugih autora zajedno sa našim rezultatima, možemo zaključiti da u fazi debljine u kojoj još nema nikakvih znakova poremećaja, dominantne promjene predstavljaju one protektivne prirode (regulirana egzocitoza). Rezultati provedene biostatističke analize predstavljaju dodatni prilog tvrdnjama da adipozno tkivo predstavlja tkivo sa endokrinom funkcijom, koja je poremećena čak i bez prisutnosti znakova bolesti, te ukazuju na potrebu održavanja normalne tjelesne težine u cilju održavanja zdravlja.

6. ZAKLJUČCI

Prevalencija pretilosti kod ljudi i životinja dostigla je epidemijske razmjere u razvijenim zemljama. Poremećaj karakterizira hipertrofija i/ili hiperplazija adipocita uzrokovana povećanom količinom triglicerida u stanicama. U veterinarskoj medicini, većina vrsta domaćih životinja i kućnih ljubimaca zahvaćena je ovim problemom, naročito psi, mačke, konji i goveda. Danas se procjenjuje da 30-50% pasa ima preveliku tjelesnu težinu.

Masno tkivo dugo se smatralo običnim depoom masti kao zaliha energije, međutim, razvojem novih tehnologija otkriveno je da masno tkivo ima kompleksniju ulogu. Adipociti luče razne tvari zajedničkim imenom nazvane adipokinima, koji se razlikuju po strukturi i funkciji. Do danas je poznato preko 30 adipokina, a upotrebom suvremenih tehnologija u istraživanju pretilosti kod ljudi i životinja lista se kontinuirano produžuje, kao i saznanja o patofiziološkim mehanizmima u koje su oni uključeni.

Mada je pretilost povezana sa mnogim poremećajima zdravlja, određeni postotak pretilih ljudi i životinja ne pokazuje patofiziološke promjene, stoga je postavljen i koncept "fat but fit" u pristupu debljini. Međutim, gotovo svi rezultati novijih istraživanja govore o faktorima rizika koji su prisutni i uz zdrave jedinke sa povećanom tjelesnom težinom, stoga je ovaj koncept odbačen. U prilog ovakvim zaključcima govore i rezultati našeg istraživanja, u kojemu su se pratili diferencijalno eksprimirani serumski proteini kod 10 klinički zdravih pasa sa povećanom tjelesnom težinom, a rezultati su uspoređeni sa psima normalne tjelesne težine. Mada kliničkim pregledom, te rutinskim laboratorijskim pretragama nisu ustanovljene promjene parametara koje se često mijenjaju kao posljedica debljine i čine metabolički sindrom, mjerenje serumskih proteina kod 10 pasa sa povećanom tjelesnom težinom upotrebom spektroskopije masa pokazalo je diferencijalno eksprimirane proteine. Laki i teški lanci HP, RBP4, i enzim MGAM bili su povećani u odnosu na kontrolnu skupinu, dok su IGFBP-3, ITIH, AIM i LUM bili sniženi. Navedeni proteini sudjeluju u reguliranju

egzocitozi, metabolički putevima mukopolisaharida te u receptorima potaknutoj endocitozi, pri čemu u povezanosti sa ostalim sistemima dominira regulirana egzocitoza.

Daljnja istraživanja produkcije i funkcije adipokina pružiti će uvid u mehanizme uključene u patološke promjene vezane uz debljinu, u kojima i psi mogu služiti kao model za istraživanja kod ljudi, pri čemu će upotreba suvremenih tehnologija kao što su proteomika i bioinformatika pridonijeti širenju spoznaja o kompleksnim biološkim procesima koji prate debljinu, te ukazati na nove, dosad neistražene biomarkere u dijagnostici i terapiji. Na kraju je potrebno spomenuti da, uz kompleksan utjecaj na zdravlje, debljina ima i jedan povoljan aspekt, a taj se sastoji u tome da je preventivnim mjerama i održavanjem normalne tjelesne težine moguće u potpunosti izbjeći sve negativne utjecaje debljine na zdravlje.

7. ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Renati Barić Rafaj i asistentici Andrei Tumpa za pomoć u izradi ovog rada.

8. LITERATURA

AILHAUD, G., P. GRIMALDI, R. NEGREL (1992): Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu. Rev. Nutr.* 12, 207–233.

ALAYASH, A. I. (2004): Redox biology of blood. *Antioxid. Redox Signal.* 6, 941-943.

ALKHOURI, N., A. GORNICKA, M. P. BERK, S. THAPALYA, L.J. DIXON, S. KASHYAP, P. R. SCHAUER, A. E. FELDMAN (2010): Adipocyte apoptosis, a link between obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis. *J Biol Chem*, 285, 3428–3438.

ARMSTRONG, P. J., E. M. LUND (1996): Changes in body composition and energy balance with aging. *Vet Clin Nutr* 3, 83–7.

ATHYROS, V. G., K. TZIOMALOS, A. KARAGIANNIS, P. ANAGNOSTIS, D. P. MIKHAILIDIS (2010): Should adipokines be considered in the choice of the treatment of obesity-related health problems? *Curr. Drug Targets* 11, 122-135.

BAILHACHE, E., K. OUGUERRAM, C. GAYET, M. KREMPF, B. SILIART, T. MAGOT, P. NGUYEN (2003): An insulin-resistant hypertriglyceridaemic normotensive obese dog model: assessment of insulin resistance by the euglycaemic hyperinsulinaemic clamp in combination with the stable isotope technique. *J Anim Physiol Anim Nutr* 87, 86-95.

BADMAN, M. K., J. S. FLIER (2007): The adipocytes as an active participant in energy balance and metabolism. *Gastroenterologist* 132, 2103–2115.

BARCELO-BATLLOERI, S., R. RAMON GOMIS (2009): Proteomics in obesity research *Proteomics Clin. Appl.* 3, 263–278.

BLUM, W. F., M. B. RANKE, K. KIETZMANN, E. GAUGGEL, H. J. ZEISEL, J. R. BIERICH (1990): A specific radioimmunoassay for growth hormone (GH)-dependent somatomedin binding protein: its use for diagnosis of GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 70, 1292-1298.

BROCH, M, J. VEDRELL, W RICART (2007): Circulating Retinol-Binding Protein-4, insulin sensitivity, insulin secretion, and insulin disposition index in obese and non-obese subjects. *Diabetes Care*. 30, 180-206.

BURKHOLDER, W. J., P. W. TOLL (2000): Obesity. In: Hand MS, Thatcher CD, Reimillard RL, Roudebsh P, Morris ML, Novotny BJ (eds). *Small Animal Clinical Nutrition*. 4th ed. Topeka, Kan. Mark Morris Institute; pp. 401-430.

CAO, Y. (2010): Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. *Nature* 9, 107–115.

CHIELLINI, C., F. SANTINI, A. MARSILI, P. BERTI, A. BERTACCA, C. PELOSINI, G. SCARTABELLI, E. PARDINI, J. LOPEZ-SORIANO, R. CENTONI, A. M. CICCARONE, L. BENZI, P. VITTI, S. DEL PRATO, A. PINCHERA, M. MAFFEI (2004): Serum Haptoglobin: A Novel Marker of Adiposity in Humans; *Endocrinol Metab* 89, 2678-2683.

CHMELAR, J., K. J. CHUNG, T. CHAVAKIS (2013): The role of innate immune cells in obese adipose tissue inflammation and development of insulin resistance. *Thromb. Haemost.* 109, 399-406.

COATS, B. R., K. Q. SCHOENFELT, V. C. BARBOSA-LORENZI, E. PERIS, C. CUI, A. HOFFMAN, G. ZHOU, S. FERNANDEZ, L. ZHAI, B. A. HALL, A. S. HAKA, A. M. SHAH, C. A. REARDON, M. J. BRADY, C. J. RHODES, F. R. MAXFIELD, L. BECKER (2017): Metabolically Activated Adipose Tissue Macrophages Perform Detrimental and Beneficial Functions during Diet-Induced Obesity. *Cell Rep.* 20, 3149-3161.

COOKE, P. S., A. NAAZ (2004): Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp Biol Med* 229: 1127–35.

CRAIG, R. L., W. S. CHU, S. C. ELBEIN (2007): Retinol binding protein 4 as a candidate gene for type 2 diabetes and prediabetic intermediate traits. *Mole Genet Metab* 90, 338–344.

DAHLMAN, I., M. ELSEN, N. TENNAGELS, M. KORN, B. BROCKMANN, H. SELL, J. ECKEL, P. ARNER (2012): Functional annotation of the human fat cell secretome. *Arch Physiol. Biochem.* 118, 84–91.

DE GODOY, M. R. C., K.S. SWANSON (2013): Companion Animals Symposium: nutrigenomics: using gene expression and molecular biology data to understand pet obesity. *J. Anim. Sci.* 91, 2949–2964.

- DIEZ, M., P. NGUYEN (2006): The epidemiology of canine and feline obesity. *Waltham Focus* 16, 2–8.
- EDNEY, A. T., P. M. SMITH (1986): Study of obesity in dogs visiting veterinary practices in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 118, 391–396.
- EISELE, I., I. S. WOOD, A. J. GERMAN, L. HUNTER, P. TRAYHURN (2005): Adipokine gene expression in dog adipose tissues and dog white adipocytes differentiated in primary culture. *Horm Metab Res* 37, 474–481.
- EL-ALAMEEY, I. R., N. N. Fadl, E. R. Abdel Hameed, L. S. Sherif, H. H. Ahmed (2015): Clinical Relevance of Transforming Growth Factor- β 1, Interleukin-6 and Haptoglobin for Prediction of Obesity Complications in Prepubertal Egyptian Children, *OA Maced J Med Sci.* 3, 105–110.
- FAIN, J. N. S. W. H. BAHOUTH, A. K. MADAN (2004): Haptoglobin release by human adipose tissue in primary culture. *J. Lipid Res.* 45, 536–542.
- FARJO, K. M., R. A. FARJO, S. HALSEY, G. MOISEYEV, J. MA (2012): Retinol-Binding Protein 4 Induces Inflammation in Human Endothelial Cells by an NADPH Oxidase- and Nuclear Factor Kappa B-Dependent and Retinol-Independent Mechanism. *Mol Cell Biol*, 32,5103–5115.
- FISCHER-POSOVASZKY, P., M WABISTSCH, Z. HOCHBERG (2007): Endocrinology of adipose tissue—an update. *Horm Metab Res* 39, 314–21.
- GERMAN, A. (2006): Clinical risks associated with obesity in companion animals. *Waltham Focus*, 16, 21–28.
- GERMAN, A. J. (2006): The growing problem of obesity in dogs and cats. *J Nutr.* 136, 1940–1946.
- GLICKMAN L. T., F. S. SCHOFER, L. J. MCKEE (1989): Epidemiologic study of insecticide exposure, obesity, risk of bladder cancer in household dogs. *J Toxicol Environ Health* 28, 407–414.
- GOSSELLIN, J., J. A. WREN, S. L. SUNDERLAND (2007): Canine obesity: an overview. *J Vet Pharmacol Ther.* 30, 1–10.
- GRAHAM, T. E., Q. YANG, M. BLUHER, A. HAMMARSTEDT, T. P. CIARALDIC, R. R. HENRY, B. KAHN (2006): Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *The New England Journal of Med.*, 354, 2552–2563.
- GREGORY, S. P. (1994): Developments in the understanding of the pathophysiology of urethral sphincter mechanism incompetence in the bitch. *Br Vet J* 150, 135–50.
- HANSEN, M., T. FLATT, H. AGUILANIU (2013): Reproduction, fat metabolism, and life span: What is the connection? *Cell Metab.* 17, 10–19.

HEO, K., J. ODLE, I. K HAN, W. CHO, S. SEO, E. VAN HEUGTEN, D. H. PILKINGTON (2000): Dietary l-carnitine improves nitrogen utilization in growing pigs fed low energy, fatcontaining diets. *J Nutr.*;130, 1809-1814.

HILL, R. C. (2009): Multidisciplinary Approaches to Nutritional Problems. Symposium on "Nutrition and Health." Nutritional therapies to improve health: lessons from companion animals. *Proceed Nutr Soc.* 68, 98-102.

INZAGHI, E., B. BALDINI FERROLI, D. FINTINI, A. GROSSI, V. NOBILI, S. CIANFARANI (2017): Insulin-Like Growth Factors and Metabolic Syndrome in Obese Children. *Hormone Res Paediatrics* 87, 400–404.

JAMES, P. (1997): Protein identification in the postgenome era: the rapid rise of proteomics. *Q Rev Biophys.* 30, 279–331.

JEUSETTE, I., J. DETILLEAUX, C. CUVELIER, L. ISTASSE, M. DIEZ (2004): Ad libitum feeding following ovariectomy in female Beagle dogs: effect on maintenance energy requirement and on blood metabolites. *J Anim Physiol Anim Nutr* 88, 117–21

JONES, J. I., D. R. CLEMMONS (1995): Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.* 16, 3–34.

JONES, K. J. (2014): Digestion by Family 31 Glycoside Hydrolases: Structural Characterization and Inhibition Studies of C-terminal Maltase Glucoamylase

JUGE-AUBRY, C. E., E. HENRICHOT, C. A. MEIER (2005): Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19, 547–66.

KLISIĆ, A. N. KAVARIĆ, B. BJELAKOVIĆ, I. SOLDATOVIĆ, M. MARTINHOVIĆ, J. KOTUR-STERULJEVIĆ (2017): The Association Between Retinol-Binding Protein 4 and Cardiovascular Risk Score is Mediated by Waist Circumference in Overweight/Obese Adolescent Girls; *Acta Clin Croat* 56, 92-98.

KOBAYASHI, J., N. TADOKORO, M. WATANABE, M. SHINOMIYA (2002): A novel method of measuring intra-abdominal fat volume using helical computed tomography. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26, 398-402

KOMAI, A. M., S. MUSOVIC, E. PERIS, A. ALRIFAIY, M. F. EL HACHMANE, M. JOHANSSON, I. WERNSTEDT ASTERHOLM, C. S. OLOFSSON (2016): White Adipocyte Adiponectin Exocytosis Is Stimulated via β 3-Adrenergic Signaling and Activation of Epac1: Catecholamine Resistance in Obesity and Type 2 Diabetes. 65, 3301-3313.

KOTNIK, P., P. FISCHER-POSOVZKY, M. WABITSCH (2011): RBP4: a controversial adipokine; *European Journal of Endocrinology* 165, 703–711.

- KREITSCHMANN-ANDERMAHR, I., P. SUAREZ, R. JENNINGS, N. EVERS, G. BRABANT (2010): GH/IGF-I regulation in obesity—mechanisms and practical consequences in children and adults. *Horm. Res. Paediatr.* 73, 153–160
- KRONFELD, D. S., S. DONOGHUE, L. T. GLICKMAN (1991): Body condition and energy intakes of dogs in a referral teaching hospital. *J Nutr* 121, 157–8.
- LAFLAMME, D. P. (1997): Development and validation of a body condition score system for dogs: a clinical tool. *Can Pract* 22, 10–15.
- LAFLAMME, D. P. (2012): Companion animals symposium: obesity in dogs and cats: what is wrong with being fat? *J Anim Sci* 90, 1653-1662.
- LECKCHAROENSUK, C., J.P. LULICH, C. A. OSBORNE, R. PUSOONTHORNTHUM, T. A. ALLEN, L. A. KOEHLER, L. K. URLICH, K. A. CARPENTER, L.L. SWANSON (2000): Patient and environmental factors associated with calcium oxalate urolithiasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc*; 217, 515-519.
- LEWITT, M. S., K. H. DENT (2014): The Insulin-Like Growth Factor System in Obesity, Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Mellitus. *The Insulin-Like Growth Factor System in Obesity, Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Mellitus V.3*, 1561–1574.
- LUND, E., P. J. ARMSTRONG, C. A. KIRK, J. S. KLAUSNER (2006): Prevalence and risk factors for obesity in adult dogs from private US veterinary practices. *Int J Appl Res Vet Med.* 4, 177-186.
- MAFFEI, M., I. BARONE, G. SCABIA, F. SANTINI (2016) The Multifaceted Haptoglobin in the Context of Adipose Tissue and Metabolism *Endocrine Reviews*, 37, 403–416.
- MCGREEVY, P. D., P. C. THOMSON, C. PRIDE, A. FAWCET, T. GRASSI, B. JONES (2005): Prevalence of obesity in dogs examined by Australian veterinary practices and the risk factors involved *Vet Rec* 156, 696–707.
- MIYAZAKI, T., J. KUROKAWA, S. ARAI (2011). AIMing at metabolic syndrome. - Towards the development of novel therapies for metabolic diseases via apoptosis inhibitor of macrophage (AIM).- *Circulation Journal : Official Journal of the Japanese Circulation Society* 75, 2522–2531.
- MOHANRAJ, L., H. S. KIM, W. LI, Q. CAI, K. E. KIM, H. J. SHIN, Y. L. LEE, J. H. KIM, Y. OH (2013): IGFBP-3 inhibits cytokine-induced insulin resistance and early manifestations of atherosclerosis. *PloS One*, 8, e55084.
- NOOR, R., E. A., RINI, E. YERIZEL (2017): Retinol binding protein 4, obesity, and insulin resistance in adolescents. *Paediatrica Indonesiana*, 57, 1-10.
- NUMAO, S., H. SASAI, Y. NOMATA, T. MATSUO, M. ETO, T. TSUJIMOTO, K. TANAKA (2012): Effects of exercise training on circulating retinol-binding protein 4 and cardiovascular disease risk factors in obese men. *Obesity Facts* 5, 845–855.

OGDEN, C. L., M. D. CAROLL, M. A. McDOWELL, K. M. FLEGAL (2007): Obesity among adults in the United States—no statistically significant change since 2003-2004. NCHS Data Brief. 11, 1-8.

PINEIRO, M., M. ANDREIS, M. ITTURALDE, S. CARMONA, J. HIRVONEN, S. PYORALA, P. M. HEEGAARD, K. TJORNEHOJ, F. LAMPREAVE, A. PINEIRO, M. A. ALAVA (2004): ITIH4 (inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4) is a new acute-phase protein isolated from cattle during experimental infection. *Infection and Immunity* 72, 3777–3782

RADIN, M. J., L. C. SHARKEY, B. J. HOLYCROSS (2009): Adipokines: a review of biological and analytical principles and an update in dogs, cats, and horses. *Vet Clin Pathol* 38, 136–56.

RASMUSSEN, M.H.; A. HVIDBERG, A. JUUL, K. M. MAIN, A. GOTFREDSEN, N. E. SKAKKEBAE, J. HILSTED (1995): Massive weight loss restores 24-h growth hormone release profiles and serum insulin-like growth factor-I levels in obese subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 1407–1415.

REN, L. X. QIN, X. CAO, L. WANG, F. BAI, G. BAI, Y. SHEN (2011): Structural insight into substrate specificity of human intestinal maltase-glucoamylase. *Protein & Cell* 2, 827–836.

ROSS, M. H., W. PAWLINA (2006): Adipose tissue. In: C. Taylor, K. H. Scogna, and J. P. Ajello, editors, *Histology: A text and atlas*. 5th ed. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. pp. 238–246.

ROUDEBUSH, P., W. D. SCHOENHERR, S. J. DELANEY (2008): An evidencebased review of the use of therapeutic foods, owner education, exercise, and drugs for the management of obese and overweight pets. *JAVMA* 233, 717-725.

ROUSSET, S., M. C. ALVES-GUERRA, J. MOZO, B. MIROUX, A. M. CASSARD-DOULCIER, F. BOUILLAUD, D. RICQUIER (2004): The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes* 53, 130–135.

SCHÄFFLER, A., J. SCHÖLMERICH (2010): Innate immunity and adipose tissue biology. *Trends Immunol.* 31, 228-235.

SCRIBA, P. C., M. BAUER, D. EMMERT, A. FATEH-MOGHADAM, G. HOFMANN, K. HORN, C. R. PICKARDT (1979): Effects of obesity, total fasting and re-alimentation on L-thyroxine (T4), 3,5,3-L-triiodothyronine (T3), 3,3,5-L-triiodothyronine (rTC), thyroxine binding globulin (TBG), cortisol, thyrotrophin, cortisol binding globulin (CBG), transferrin, alpha 2-haptoglobin and complement C3 in serum. *Acta Endocrinol.* 91, 629–643.

SHEARER, P. (2010): Literature review: canine, feline and human overweight and obesity. *Banfield Applied Research and Knowledge Team..BARK*, 10, 1-8.

SNELL-BERGEON J. K., J. E. HOKANSON, G. L. KINNEY, D. DABELEA, J. EHRLICH, R. H. ECKEL, L. OGDEN, M. REWERS (2004): Measurement of abdominal fat by CT compared to waist circumference and BMI in explaining the presence of coronary calcium. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 28, 1594–1599.

TOMITA, T., S. ARAI, K. KITADA, M. MIZURE, Y. SUZUKI, F. SAKATA, D. NAKANO, E. HIRAMOTO, Y. TAKEI, S. MARUYAMA, A. NISHIYAMA, S. MATSUO, T. MYAZAKI, Y. ITO (2017): Apoptosis inhibitor of macrophage ameliorates fungus-induced peritoneal injury model in mice. *Scientific Reports* 7-17.

TRAYHURN, P., I. S. WOOD (2004): Adipokines: Inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br. J. Nutr.* 92, 347–355.

TVARIJONAVICIUTE, A., A. M. GUTIEREZ, I. MILLER (2012): Proteomic analysis of serum from dogs before and after a controlled weight-loss program. *Domest Anim Endocrinol.* 43, 271–277.

VOLP, A. C. P., F. C. S. SILVA, J. BRESSAN (2015): Hepatic inflammatory biomarkers and its link with obesity and chronic diseases. *Nutr Hosp* 31, 1947-1956.

WANG, P., E. MARIMAN, J. RENES, J. KEIJER (2008): The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. *J. Cell. Physiol.* 216, 3–13.

WHITE, R. A. S., J. M. WILLIAMS (1994): Tracheal collapse in the dog – is there really a role for surgery? A survey of 100 cases. *J Small Anim Pract* 35, 191-196.

YAKAR, S., C. J. ROSEN, M. L. BOUXEIN, H. SUN, W. MEJLA; Y. KAWASHIMA, Y. WU, K. EMERTON, V. WILLIAMS, K. JEPSEN, M. B. SCHAFFLER, R. J. MAJESKA, O. GAVRILOVNA, M. GUTIEREZ, D. HWANG, P. PENNISI, J. FRYSTYK, Y. BOISCLAR, J. PINTAR, H. JASPER, H. DOMENE, P. COHEN, D. CLEMMONS, D. LE ROITH (2009): Serum complexes of insulin-like growth factor-1 modulate skeletal integrity and carbohydrate metabolism. *FASEB J.* 23, 709–719.

YANG, Q., T. E. GRAHAM, N. MODY, F. PREITNER, O. D. PERONI, J. M. ZABOLOTNY, K. KOTANI, L. QUADRO, B. B. KAHN (2005): Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436, 356–362.

ZHANG, Y., R. PROENCA, M. MAFFEI, M. BARONE, L. LEOPOLD, J. M. FRIEDMAN. (1994): Positional cloning of the mouse obese gene and its human homolog *Nature* 372, 425–432.

ZORAN, D. L. (2010): Obesity in Dogs and Cats: A Metabolic and Endocrine Disorder *Vet Clin Small Anim* 40, 221–239.

9. SAŽETAK

Ena Nakić: Proteomski pristup pretilosti u pasa

Pretilost danas predstavlja veliki problem kod ljudi i životinja. Stanice bijelog masnog tkiva sintetiziraju adipokine i citokine, biološki aktivne tvari čija funkcija još nije u potpunosti razjašnjena, međutim, za veliku većinu ovih aktivnih tvari poznato je da imaju negativan utjecaj na zdravlje. U istraživanju je sudjelovalo 10 zdravih pasa pa prevelikom tjelesnom težinom i 10 zdravih pasa sa normalnom tjelesnom težinom. Uz rutinske hematološke i biokemijske metode, u analitičkom dijelu rada korištene su najsuvremenije metode masene spektroskopije upotrebom masenog spektrometra MS Thermo Scientific Q Exactive Plus. Spektroskopskom analizom seruma pasa sa povećanom tjelesnom težinom u usporedbi sa serumom pasa sa normalnom tjelesnom težinom ustanovljene su povećane koncentracije lakih i teških lanaca haptoglobina, proteina akutne faze, retinol-vezujućeg proteina 4 i enzima maltaze-glukoamilaze, dok su snižene koncentracije imali inzulinu sličan faktor rasta – vezujući protein 3, koji pripada porodici inzulinskih faktora rasta, inhibitor apoptoze makrofaga, teški lanac inhibitora tripsina te protein lumikan. ClueGO analizom su definirani najvažniji putevi u interakcijsko mreži diferencijalno eksprimiranih proteina, kao što su regulirana egzocitoza, metabolički procesi mukopolisaharida i receptorima potaknuta endocitoza. Daljnja istraživanja produkcije i funkcije adipokina pružiti će uvid u mehanizme uključene u patološke promjene vezane uz debljinu, u kojima i psi mogu služiti kao model za istraživanja kod ljudi, pri čemu će upotreba suvremenih tehnologija kao što su proteomika i bioinformatika pridonijeti širenju spoznaja o kompleksnim biološkim procesima koji prate debljinu, te ukazati na nove, dosad neistražene biomarkere u dijagnostici i terapiji.

Ključne riječi: pretilost, proteomika, pas

10. SUMMARY

Ena Nakić: Proteomic approach to canine obesity

Obesity is a major problem today for both humans and animals. White fat tissues cells synthesize adipokines and cytokines, biologically active substances whose function is not yet in fully explained. However, most of these active substances are known to have a negative

impact on health. 10 healthy obese dogs and 10 healthy dogs with normal body weight participated in the study. Along with routine hematological and biochemical methods, in the analytical part, the latest modern mass spectroscopy methods were used. Mass spectrometer of MS Thermo Scientific Q Exactive Plus. Spectroscopic analysis of serum of obese dogs in comparison with serum of dogs with normal body weight has established increased concentrations of light and heavy chains of haptoglobin, acute phase proteins, retinol-binding protein 4 and the maltose-glucoamylase enzyme. While concentrations of insulin-like growth factor-binding protein 3, belonging to the family of insulin growth factors, inhibitors of macrophage apoptosis, heavy chain of trypsin inhibitors, and lumican protein were reduced. ClueGO analysis defined the most important pathways in the interaction network of differentially expressed proteins, such as regulated exocytosis, metabolic processes of mucopolysaccharide and receptors stimulated endocytosis. Further research on adipokine production and function will provide insight into mechanisms involved in pathological changes related to obesity, in which dogs can serve as a model for human research. Use of modern technologies such as proteomics and bioinformatics should contribute to dissemination of knowledge about complex biological processes that follow obesity, and point out new, unexplored biomarkers in diagnostics and therapy.

Key words: obesity, proteomics, dog

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 6.10.1993. godine u Šibeniku. U razdoblju od 2000-2008. godine pohađala sam Osnovnu školu Jurja Dalmatinca, a od 2008-2012. godine srednju Medicinsku i kemijsku školu u Šibeniku, smjer farmaceutski tehničar. Za to vrijeme aktivno sam se bavila odbojkom igrajući za ŽOK „Šibenik“. Godine 2013. upisala sam Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, a trenutno pohađam petu godinu navedenog studija. Od početka visokoškolskog obrazovanja volontiram u Veterinarskoj ambulanti Vodice, te se aktivno koristim engleskim i njemačkim jezikom.

