

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Sanja T. Stojanović

**MORFOLOŠKA I MOLEKULARNA  
KARAKTERIZACIJA HUMANOG  
MASNOG TKIVA I LIPOMA RAZLIČITIH  
ANATOMSKIH LOKALIZACIJA I  
ISPITIVANJE IZOLOVANIH  
MEZENHIMSKIH ĆELIJA *IN VITRO***

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Sanja T. Stojanović

**MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR  
CHARACTERIZATION OF HUMAN  
ADIPOSE TISSUE AND LIPOMAS OF  
DIFFERENT ANATOMICAL  
LOCALIZATIONS AND EXAMINATION  
OF ISOLATED MESENCHYMAL CELLS  
*IN VITRO***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

## KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

### MENTORI:

**dr Stevo Najman**, redovni profesor  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

---

**dr Aleksandra Korać**, redovni profesor  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

### ČLAN KOMISIJE:

**dr Bato Korać**, vanredni profesor  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu  
naučni savetnik  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,  
Univerzitet u Beogradu

---

DATUM ODBRANE: \_\_\_\_\_ 2019. godina

## ZAHVALNICA

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je najvećim delom urađen u Naučnoistraživačkom Centru za biomedicinu, i to u Odeljenju za ćelijsko i tkivno inženjerstvo i Laboratoriji za funkcionalnu genomiku i proteomiku, kao i u Laboratorijama Instituta za biologiju i humanu genetiku **Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu**. Deo imunohistohemijskih analiza kao i ultrastrukturna analiza tkiva na elektronskom mikroskopu, urađeni su u Centru za elektronsku mikroskopiju **Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu**. Ispitanici sa kojih su uzimana tkiva lipoma i masno tkivo su bili pacijenti hirurških klinika **Kliničkog Centra Niš**.

Ova doktorska disertacija je urađena u okviru projekta „*Virtuelni koštano zglojni sistem čoveka i njegova primena u pretkliničkoj i kliničkoj praksi*“ (Ev. br. III 41017), kojim rukovodi prof. dr Miroslav Trajanović, u okviru podprojekta „Modeli osteoreparacije“ kojim rukovodi prof. dr Stevo Najman, finansiranog od strane **Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja R. Srbije**. Deo eksperimenata je urađen i u okviru internog projekta **Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu** (Ev. br. 11-14629-4/16) kojim rukovodi prof. dr Žarko Mitić.

Ovom prilikom želim da se zahvalim svima koji su na bilo koji način učestvovali u izradi ove disertacije i doprineli da dobije oblik u kojem je.

Posebno bih želela da se zahvalim sledećim osobama:

Neizmernu zahvalnost osećam prema svom dugogodišnjem mentoru **prof. dr Stevi Najmanu**, koji ne samo da je rukovodio ovom doktorskom disertacijom već je bio moj mentor od ranih studentskih dana. Hvala na velikodušno pruženom znanju i nesebičnoj podršci tokom svih ovih godina, što me je uveo u svoju laboratoriju i „zarazio“ istraživačkim duhom, što me je naučio svemu što znam pa i kako pristupati problemima u nauci i poslu, što mi je ukazao veliku čast i zadovoljstvo da se bavim poslom koji sam oduvek želela i u kojem uživam, a naročito što mi je pružio ogromnu slobodu i poverenje. Hvala na prenetom znanju iz biologije i hvala na podršci koju mi svakodnevno pruža. Svoje znanje i uspehe u profesionalnoj karijeri dugujem njemu.

Veliko hvala mentoru **prof. dr Aleksandri Korać**, za ogromnu podršku od početka doktorskih studija, za sve dobronamerne sugestije i savete koji su doprineli da ova disertacija dobije ovakav obim i okvir. Hvala za ogromnu pomoć u svim fazama izrade ove disertacije. Hvala što me je uvela u zagonetni i privlačan svet masnog tkiva i što je imala poverenje i učinila da se osećam delom njenog izuzetnog istraživačkog tima.

Hvala **prof. dr Bati Koraću** što je deo komisije za ocenu teme i komisije za ocenu i odbranu ove disertacije. Hvala za izuzetno zanimljiva i slikovita predavanja koja daju inspiraciju i hvala za podršku od početka izrade ove disertacije.

Hvala svim direktorima, lekarima i medicinskom osoblju hirurških klinika **Kliničkog Centra Niš**, na ogromnoj pomoći u prikupljanju uzoraka tkiva.

Stručnim saradnicama Centra za elektronsku mikroskopiju Biološkog fakulteta u Beogradu, dipl. biol. **Maji Bogdanović** i dipl. biol. **Aniti Lazarević**, hvala za ogromnu pomoć u pripremi i snjimanju uzoraka na elektronskom mikroskopu.

Istraživaču saradniku **Mariji Aleksić** i naučnom saradniku **dr Igoru Goliću**, na Katedri za biologiju ćelija i tkiva na Biološkom fakultetu u Beogradu, hvala za veliku pomoć u pripremi uzoraka i imunohistohemijskoj analizi, kao i podršci i spremnosti da pomognu u svakom trenutku.

**Prof. dr Miroslavu Trajanoviću**, rukovodiocu projekta na kojem sam istraživač, na ukazanoj šansi da ostvarim svoje profesionalne ciljeve zaposlenjem na projektu i konstantnoj podršci koju mi pruža u profesionalnoj karijeri.

Veliko hvala magistru bioloških nauka **Dejanu Laziću** na podršci i pomoći u realizaciji dela analize ekspresije gena i što je omogućio da ova disertacija ima fizičko-hemijsku karakterizaciju tkiva primenom Ramanske spektroskopije.

**Doc. dr Vladimiru Cvetkoviću**, hvala za pomoć u savladavanju nekih metodoloških nedoumica, korisnim razgovorima i izuzetnoj kolegijalnosti.

**Prof. dr Žarku Mitiću**, hvala za izuzetnu kolegijalnost i podršku od mojih studentskih dana i dugogodišnju uspešnu saradnju koja je rezultirala velikim brojem izuzetnih publikacija.

Profesorkama sa UNO Biologija sa humanom genetikom, **prof. dr Jeleni Živanov Čurlis** i **prof. dr Snežani Pajović**, hvala na podršci još od mojih studentskih dana.

Koleginicama **doc. dr Mariji Vukelić-Nikolić**, **doc. dr Jeleni Živković** i **asist. dr Jeleni Najdanović**, na prijateljstvu i podršci tokom mog rada.

**Tanji Prokić**, laborantu na Institutu za biologiju i humanu genetiku, hvala na pomoći u određenim fazama eksperimentalnog rada i spremnosti da pomogne u svemu i u svakom trenutku.

Dekanu Medicinskog fakulteta u Nišu, **prof. dr Dobrili Stanković Đorđević**, što je imala razumevanja i poverenja i što mi je pružila ogromnu podršku i doprinela da moja profesionalna karijera ide putem kojim sam želela.

**Prof. dr Dušici Pavlović** i **prof. dr Gordani Kocić**, veliko hvala na ogromnoj podršci koju su mi pružale u različitim fazama moje profesionalne fakultetske karijere.

Hvala mojoj baki i mom deki, koji više nisu sa nama, a koji su brinuli o meni od rođenja, bodrili me i podržavali u svemu i koji su u velikoj meri zaslužni za ono što sam postigla u životu.

Hvala i mojim kumovima koji su mi bili veliki uzori u životu i velika podrška.

*Sanja Stojanović*

# MORFOLOŠKA I MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA HUMANOG MASNOG TKIVA I LIPOMA RAZLIČITIH ANATOMSKIH LOKALIZACIJA I ISPITIVANJE IZOLOVANIH MEZENHIMSKIH ĆELIJA *IN VITRO*

## SAŽETAK

Lipomi su benigni tumori masnog tkiva sa još uvek nedovoljno razjašnjenom etiologijom i patogeneom. Lipomi su uglavnom lokalizovani potkožno ali se mogu naći i intramuskularno, u telesnim šupljinama i organima, mogu biti solitarni ili multipli, mogu varirati u veličini i histološkoj građi, ali podaci o njihovom molekularnom profilu i mehanizmima nastanka su vrlo oskudni. Mezenhimske matične ćelije iz lipoma (eng. *lipoma-derived stem cells* - LDSCs) su predložene za primenu u tkivnom inženjerstvu i regenerativnoj medicini od strane autora nekoliko studija zato što je pokazano da imaju karakteristike slične mezenhimskim matičnim ćelijama iz masnog tkiva (eng. *adipose-derived stem cells* - ADSCs). Osim podataka o potencijalu izolovanih LDSCs da proliferišu i da se diferencijuju u adipocite, osteoblaste i hondrocite, nema podataka o ostalim karakteristikama ovih ćelija a ni detaljnog poređenja sa ADSCs na ćelijskom i molekularnom nivou.

Cilj jednog dela ovog istraživanja je bio ispitivanje molekularnog profila izolovanih LDSCs i poređenje sa ADSCs u kulturi *in vitro*, ispitivanje kapaciteta LDSCs da se diferencijuju u adipocite i osteoblaste, na ćelijskom, proteinskom i genskom nivou, ispitivanje uticaja kondicioniranih medijuma LDSCs na odgovor makrofaga, kao i ispitivanje imunomodulacijske aktivnosti i efekta na zarastanje rana u sistemu indirektno ko-kulture *in vitro*, u poređenju sa ADSCs. Cilj drugog dela ovog istraživanja je bio morfološka i molekularna karakterizacija tkiva lipoma i potkožnog belog masnog tkiva (eng. *subcutaneous white adipose tissue* – scWAT) različitih anatomskih lokalizacija.

Rezultati su pokazali da LDSCs i ADSCs poseduju karakteristike mezenhimskih matičnih ćelija i da imaju sličan fenotip ali različitu molekularnu osnovu za diferencijaciju. Obrazac ekspresije gena markera adipogeneze i prisustvo manjeg broja zrelih adipocita u kulturi LDSCs u odnosu na ADSCs nakon 21 dan adipogene diferencijacije ukazuju na slabiji kapacitet LDSCs za diferencijaciju u adipocite u poređenju sa ADSCs. Analiza osteogenih markera nakon 16 dana osteogene diferencijacije je pokazala da i LDSCs i ADSCs imaju fenotip karakterističan za osteoblaste, ali su bile u različitim fazama osteogeneze. Kondicionirani medijumi LDSCs (LDSC-CM) i ADSCs (ADSC-CM) dovode do funkcijske aktivacije nestimuliranih makrofaga i ispoljavaju anti-inflamacijsku aktivnost, sa izraženijim efektom LDSC-CM. LDSC-CM i ADSC-CM deluju povoljno na zarastanje

rana u sistemu indirektne ko-kulture *in vitro*, bez značajnih razlika, i u nivou su pozitivne kontrole.

Viša ekspresija gena *PPARG* i *DLK1* u lipomima u odnosu na scWAT ukazuje na intenzivniju adipogenezu u lipomima što je u skladu sa hemijskom analizom tkiva gde je pokazano da se više ukupnih lipida i proteina nalazi u lipomima u odnosu na scWAT. Uočena je viša ekspresija *ADIPOQ* i niža ekspresija *LEP*, kao i viša ekspresija gena markera osteogeneze u lipomima u odnosu na scWAT. Viša ekspresija *UCP1* i viša imunoekspresija PRDM16 u lipomima u odnosu na scWAT ukazuje na to da lipomi ispoljavaju neke karakteristike mrkog masnog tkiva. Ultrastrukturalna analiza tkiva je pokazala prisustvo većeg broja mitohondrija i sitnih lipidnih tela u adipocitima lipoma u odnosu na scWAT. Histološka i histomorfometrijska analiza tkiva su pokazale da postoje razlike u građi tkiva lipoma i scWAT, a analiza imunoekspresije markera makrofaga da je više CD163 pozitivnih M2 makrofaga u odnosu na CD40 pozitivne M1 makrofage prisutno u lipomima u odnosu na scWAT. Uporedna analiza navedenih parametara i markera u tkivima različitih anatomskih lokalizacija je pokazala da postoje razlike između različitih lokalizacija i u grupi lipoma i u grupi scWAT.

Na osnovu rezultata *in vitro* karakterizacije izolovanih LDSCs i ADSCs može se zaključiti da su uočene razlike u kapacitetu za diferencijaciju i njihovoj aktivnosti posledica različitog molekularnog potpisa ovih ćelija i opredeljenja u tkivu. Razlike između lipoma i scWAT u histološkoj građi tkiva, ultrastrukturi, hemijskom sastavu, genskoj i proteinskoj ekspresiji karakterističnih markera adipogeneze, osteogeneze i inflamacije, ukazuju na promene koje su se desile u masnom tkivu, a koje su mogle dovesti do benigne transformacije i nastanka lipoma. Rezultati ove studije značajno doprinose rasvetljavanju potencijalnih mehanizama nastanka lipoma i ukazuju na mogućnosti i ograničenja potencijalnih primena matičnih ćelija iz lipoma.

**Ključne reči:** lipomi, potkožno belo masno tkivo, mezenhimske matične ćelije, adipogeneza, osteogeneza, *in vitro*, makrofagi, genska ekspresija, građa tkiva, imunohistohemija

**Naučna oblast:** BIOLOGIJA

**Uža naučna oblast:** BIOLOGIJA ĆELIJA I TKIVA



# **MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF HUMAN ADIPOSE TISSUE AND LIPOMAS OF DIFFERENT ANATOMICAL LOCALIZATIONS AND EXAMINATION OF ISOLATED MESENCHYMAL CELLS *IN VITRO***

## **ABSTRACT**

Lipomas are benign adipose tissue tumors with still insufficiently clarified etiology and pathogenesis. Lipomas are mainly localized subcutaneously but can also be found intramuscularly, in the body cavities and organs, may be solitary or multiple, may vary in size and histological structure, but data on their molecular profile and mechanisms of formation are still scarce. Lipoma-derived stem cells (LDSCs) have been proposed for use in tissue engineering and regenerative medicine by the authors of several studies since it has been shown that these cells have characteristics similar to adipose-derived stem cells (ADSCs). In addition to data on the potential of isolated LDSCs to proliferate and differentiate into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes, there is no data on other characteristics of these cells, nor a detailed comparison with ADSCs at the cellular and molecular levels.

The aim of one part of this study was to examine the molecular profile of isolated LDSCs and comparison with ADSCs in culture *in vitro*, to examine the capacity of LDSCs to differentiate into adipocytes and osteoblasts on cellular, protein and gene level, to examine the influence of conditioned media of LDSCs on macrophages' response, as well as to examine immunomodulatory activity and effect of wound healing in indirect co-culture system *in vitro*, in comparison with ADSCs. The aim of the second part of this study was the morphological and molecular characterization of lipoma tissue and subcutaneous white adipose tissue (scWAT) of various anatomical localizations.

The results showed that LDSCs and ADSCs possess the characteristics of mesenchymal stem cells and have similar phenotype but different molecular basis for differentiation. The pattern of expression of genes that are markers of adipogenesis and the presence of less number of mature adipocytes in LDSCs compared to ADSCs culture after 21 day of adipogenic differentiation, indicate lower capacity of LDSCs for differentiation into adipocytes compared to ADSCs. Analysis of osteogenic markers after 16 days of osteogenic differentiation showed that both LDSCs and ADSCs have a characteristic osteoblast-like phenotype, but they were at different stages of osteogenesis. Conditioned media of LDSCs (LDSC-CM) and ADSCs (ADSC-CM) led to the functional activation of

unstimulated macrophages and exhibited anti-inflammatory activity, with pronounced effect of LDSC-CM. LDSC-CM and ADSC-CM acted favorably on wound healing in indirect co-culture system *in vitro*, without significant differences and at the level of positive control.

Higher expression of *PPARG* and *DLK1* gene in lipomas compared to scWAT indicates more intense adipogenesis in lipomas, which is consistent with chemical tissue analysis where it has been shown that more total lipids and proteins were found in lipomas compared to scWAT. Higher expression of *ADIPOQ* and lower expression of *LEP*, as well as higher expression of genes that are markers of osteogenesis, was noticed in lipomas compared to scWAT. Higher expression of *UCP1* and higher immunoexpression of PRDM16 in lipomas compared to scWAT suggests that lipomas exhibit some characteristics of brown adipose tissue. Ultrastructural tissue analysis revealed the presence of greater number of mitochondria and small lipid bodies in adipocytes within lipoma tissue compared to scWAT. Histological and histomorphometrical analysis showed that there are differences in the structure of lipoma tissue and scWAT, while the analysis of macrophages' markers expression revealed that there were more CD163 positive M2 macrophages than CD40 positive M1 macrophages presented in lipoma compared to scWAT. Comparative analysis of examined parameters and markers in tissues of different anatomical localizations has shown that there are differences between different localizations in the group of lipomas as well as scWAT group.

Based on the results of *in vitro* characterization of isolated LDSCs and ADSCs, it can be concluded that differences observed in the differentiation capacity and activity are due to different molecular signature of these cells and their commitment in the tissue. Differences between lipomas and scWAT in the histological tissue structure, ultrastructure, chemical composition, expression of genes and proteins that are characteristic markers of adipogenesis, osteogenesis and inflammation, pointed out the changes that occurred in the adipose tissue and that could led to the benign transformation of adipose tissue and lipoma formation. The results of this study significantly contribute to the clarification of the potential mechanisms of lipoma formation and indicate the possibilities and limitations of potential application of stem cells derived from lipoma.

**Key words:** lipomas, subcutaneous white adipose tissue, mesenchymal stem cells, adipogenesis, osteogenesis, *in vitro*, macrophages, gene expression, tissue structure, immunohistochemistry

**Scientific field:** BIOLOGY

**Scientific subfield:** CELL AND TISSUE BIOLOGY

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. BIOLOGIJA MASNOG TKIVA</b> .....	<b>2</b>
1.1.1. Belo masno tkivo .....	3
1.1.2. Makrofagi u masnom tkivu .....	7
<b>1.2. TUMORI MASNOG TKIVA</b> .....	<b>10</b>
1.2.1. Lipomi.....	10
1.2.2. Liposarkomi.....	14
<b>1.3. MEZENHIMSKE MATIČNE ĆELIJE IZ MASNOG TKIVA</b> .....	<b>15</b>
<b>1.4. MEZENHIMSKE MATIČNE ĆELIJE IZ LIPOMA</b> .....	<b>17</b>
<b>2. CILJEVI</b> .....	<b>19</b>
<b>3. MATERIJAL I METODI</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1. MATERIJAL</b> .....	<b>25</b>
3.1.1. Uzorci tkiva.....	25
3.1.2. Ćelijske linije .....	25
<b>3.2. METODI I ANALIZE U ISPITIVANJIMA ĆELIJSKIH KULTURA <i>IN VITRO</i></b> .....	<b>26</b>
3.2.1. Izolacija i kultivacija mezenhimskih matičnih ćelija iz masnog tkiva i lipoma .....	26
3.2.2. Analiza ćelija na svetlosnom mikroskopu .....	27
3.2.3. Protočna citometrija.....	27
3.2.4. Diferencijacija mezenhimskih matičnih ćelija u kulturi .....	27
3.2.4.1. <i>Adipogena diferencijacija</i> .....	27
3.2.4.2. <i>Osteogena diferencijacija</i> .....	28
3.2.5. Citohemijska analiza .....	28
3.2.5.1. <i>Oil red O bojenje</i> .....	28
3.2.5.2. <i>Alizarin red S bojenje</i> .....	28
3.2.5.3. <i>Von Kossa bojenje</i> .....	29
3.2.6. Analiza ekspresije proteina.....	29
3.2.6.1. Imunocitohemijska analiza.....	29
3.2.6.2. <i>ELISA test</i> .....	29
3.2.7. Analiza ekspresije gena .....	30
3.2.7.1. <i>Izolacija RNK</i> .....	30

3.2.7.2. <i>Reverzna transkripcija (RT)</i> .....	30
3.2.7.3. <i>Reakcija lančane polimerizacije u realnom vremenu (Real-Time PCR)</i> .....	30
3.2.8. Ispitivanje funkcijskog odgovora makrofaga na kondicionirane medijume LDSCs i ADSCs u sistemu indirektno ko-kulture in vitro .....	32
3.2.8.1. <i>MTT test</i> .....	32
3.2.8.2. <i>NBT test</i> .....	33
3.2.8.3. <i>Neutral red uptake (NRU) test</i> .....	33
3.2.8.4. <i>Crystal violet test</i> .....	33
3.2.9. Ispitivanje imunomodulacijske aktivnosti kondicioniranih medijuma LDSCs i ADSCs .....	33
3.2.9.1. <i>Analiza ekspresije gena u makrofagima</i> .....	34
3.2.9.2. <i>Analiza sekretornih produkata makrofaga</i> .....	35
ELISA test .....	35
Određivanje koncentracije azot oksida.....	35
L929 bioesej.....	36
3.2.10. Ispitivanje efekta kondicioniranih medijuma LDSCs i ADSCs na zarastanje rana na modelu indirektno ko-kulture in vitro .....	36
<b>3.3. METODI ANALIZE TKIVA</b> .....	37
3.3.1. Analiza ekspresije gena u tkivu.....	37
3.3.1.1. <i>Izolacija ukupne RNK</i> .....	37
3.3.1.2. <i>Reverzna transkripcija</i> .....	37
3.3.1.3. <i>Real-Time PCR</i> .....	37
3.3.2. Mikroskopska analiza tkiva .....	38
3.3.2.1. <i>Svetlosna mikroskopija</i> .....	38
Priprema tkiva .....	38
Histološki metodi bojenja.....	38
Imunohistohemija.....	39
Histomorfometrijska analiza .....	39
3.3.2.2. <i>Elektronska mikroskopija</i> .....	40
Priprema tkiva .....	40
Ultrastrukturalna analiza tkiva .....	40
3.3.3. Fizičko-hemijska analiza tkiva.....	40
3.3.3.1. <i>Određivanje ukupnih proteina, RNK i DNK u tkivima</i> .....	40
3.3.3.2. <i>Određivanje ukupnih lipida u tkivu</i> .....	41

3.3.3.3. <i>Ramanska spektroskopija</i> .....	41
<b>3.4. STATISTIČKA OBRADA DOBIJENIH REZULTATA</b> .....	41
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1. KARAKTERISTIKE PACIJENATA I LOKALIZACIJA TKIVA</b> .....	43
<b>4.2. MORFOLOŠKE I MOLEKULARNE KARAKTERISTIKE IZOLOVANIH MEZENHIMSKIH MATIČNIH ĆELIJA U KULTURI</b> .....	45
<b>4.3. DIFERENCIJACIJA ĆELIJA U KULTURI</b> .....	50
4.3.1. Adipogena diferencijacija.....	50
4.3.2. Osteogena diferencijacija.....	55
<b>4.4. UTICAJ KONDICIONIRANIH MEDIJUMA MATIČNIH ĆELIJA NA FUNKCIJE MAKROFAGA, IMUNOMODULACIJSKA AKTIVNOST I EFEKAT NA ZARASTANJE RANA U SISTEMU INDIRECTNE KO-KULTURE <i>IN VITRO</i></b> .....	60
4.4.1. Aktivnost makrofaga u kondicioniranim medijumima LDSCs i ADSCs .....	60
4.4.2. Imunomodulacijska aktivnost kondicioniranih medijuma LDSCs i ADSCs .....	61
4.4.3. Efekat kondicioniranih medijuma LDSCs i ADSCs na zarastanje rana u sistemu indirektno ko-kulture <i>in vitro</i> .....	67
<b>4.5. ANALIZA EKSPRESIJE GENA U UZORCIMA LIPOMA I MASNOG TKIVA</b> .....	69
4.5.1. Analiza ekspresije gena markera mezenhimskih matičnih ćelija u tkivima .....	69
4.5.2. Analiza ekspresije gena markera adipogeneze u tkivima .....	70
4.5.3. Analiza ekspresije gena markera osteogeneze u tkivima .....	73
4.5.4. Analiza ekspresije gena za citokine u tkivima .....	75
<b>4.6. HISTOLOŠKA ANALIZA LIPOMA I MASNOG TKIVA</b> .....	77
<b>4.7. HISTOMORFOMETRIJSKA ANALIZA TKIVA</b> .....	85
<b>4.8. IMUNOHISTOHEMIJSKA ANALIZA TKIVA</b> .....	89
<b>4.9. ULTRASTRUKTURNA ANALIZA TKIVA</b> .....	108
<b>4.10. ANALIZA HEMIJSKOG SASTAVA I FIZIČKOHEMIJSKA KARAKTERIZACIJA TKIVA</b> .....	113
4.10.1. Hemijski sastav tkiva analiziran merenjem ukupnih proteina, lipida, RNK i DNK .....	113
4.10.2. <i>Ramanska spektroskopija</i> .....	114
<b>5. DISKUSIJA</b> .....	<b>117</b>
<b>5.1. KARAKTERISTIKE ISPITIVANIH PACIJENATA I LIPOMA</b> .....	118
<b>5.2. <i>IN VITRO</i> ANALIZA IZOLOVANIH ĆELIJA IZ LIPOMA I MASNOG TKIVA</b> .....	119

<b>5.3. MORFOLOŠKA I MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA TKIVA LIPOMA I MASNOG TKIVA .....</b>	<b>134</b>
<b>5.4. ZNAČAJ DOBIJENIH REZULTATA .....</b>	<b>150</b>
<b>6. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>152</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>157</b>
<b>Prilog - Lista skraćenica .....</b>	<b>177</b>
<b>Biografija autora .....</b>	<b>179</b>
<b>Izjava o autorstvu .....</b>	<b>180</b>
<b>Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada .....</b>	<b>181</b>
<b>Izjava o korišćenju .....</b>	<b>182</b>

# 1. UVOD

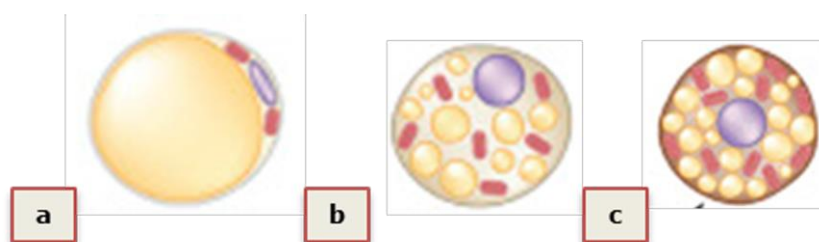


## 1.1. BIOLOGIJA MASNOG TKIVA

Masno (adipozno) tkivo je dugo opisivano samo kao depo masti u organizmu. Danas se međutim zna da je masno tkivo metabolički i sekretorno vrlo aktivno tkivo i da zapravo predstavlja veoma važan endokrini i parakrini organ koji reguliše funkcionisanje mnogih drugih tkiva i organa.

Prema strukturi i funkciji, razlikuju se dva tipa masnog tkiva, belo (eng. *white adipose tissue* – WAT) i mrko masno tkivo (eng. *brown adipose tissue* – BAT). Ova dva tipa masnog tkiva se razlikuju po strukturi i organizaciji tkiva, tipu i građi adipocita, anatomskoj lokalizaciji i ulozi koju imaju u funkcionisanju organizma, a postoje podaci da se WAT i BAT razlikuju i po poreklu. Uloga WAT je deponovanje energije u formi lipida, a predstavlja i važan endokrini i parakrini organ jer se u WAT proizvode i sekretuju razni molekuli kao što su adipokini, citokini i neki hormoni. Uloga BAT je u proizvodnji toplote (termogenezi) i najprisutnije je kod novorođenčadi, dok se kasnije tokom života smanjuje količina BAT a povećava se količina WAT. Adipociti koji izgrađuju WAT su unilokulusni, odnosno sadrže jedno veliko lipidno telo koje zauzima najveći deo citoplazme (Jankovic i sar., 2017). Adipociti koji izgrađuju BAT su multilokulusni, manji su od adipocita koji izgrađuju WAT, sadrže veći broj sitnijih lipidnih tela, kao i veliki broj mitohondrija koje omogućavaju proces intenzivne termogeneze (Jankovic i sar., 2017). BAT je izrazito vaskularizovano tkivo što omogućava mrkim adipocitima dotok kiseonika, lipida i ugljenih hidrata, kao i odvođenje toplote koja se u njemu stvara putem cirkulacije. Dugo se smatralo da su WAT i BAT istog porekla i da nastaju iz mezoderma kao i ostala vezivna tkiva poput mišićnog, kostnog i hrskavičavog, međutim, novija istraživanja pokazuju da beli i mrki adipociti vode poreklo od različitih prekursorskih ćelija (Park i sar., 2014; Hepler i sar., 2017). Rasvetljavanje mehanizama nastanka mrkih i belih adipocita dodatno je zakomplikovano otkrićem adipocita u WAT koji poseduju karakteristike i mrkih adipocita (npr. povećana ekspresija PRDM16 i UCP-1 u odnosu na bele adipocite) i belih adipocita i koji su nazvani bež adipociti (eng. *beige* ili *'brite'* od „*brown in white*“) (Sanchez-Gurmaches i Guertin, 2014; Bargut i sar., 2017; Jankovic i sar., 2017). Ovi adipociti nastaju u WAT pod uticajem različitih faktora kao što su hladnoća, stres, ishrana, hormoni, neki lekovi i mnogi drugi, u procesu koji se označava kao „*browning*“ belog masnog tkiva (Giralt i

Villarroya, 2013; Nedergaard i Cannon, 2014; Jankovic i sar., 2015a; Bargut i sar., 2017; Jankovic i sar., 2017). Bež adipociti poseduju karakteristike i mrkih i belih adipocita, pa postoje različiti podaci u literaturi o poreklu ovih adipocita (Ikeda i sar., 2018). Neki autori smatraju da bež adipociti nastaju iz belih adipocita transdiferencijacijom (Cinti, 2009; Barbatelli i sar., 2010; Park i sar., 2014) dok drugi smatraju da bež adipociti nastaju *de novo*, diferencijacijom iz prekursorskih ćelija prisutnih u WAT (Berry i sar., 2016; Wang i Seale, 2016). Izgled belog, bež i mrkog adipocita je prikazan na Slici 1.

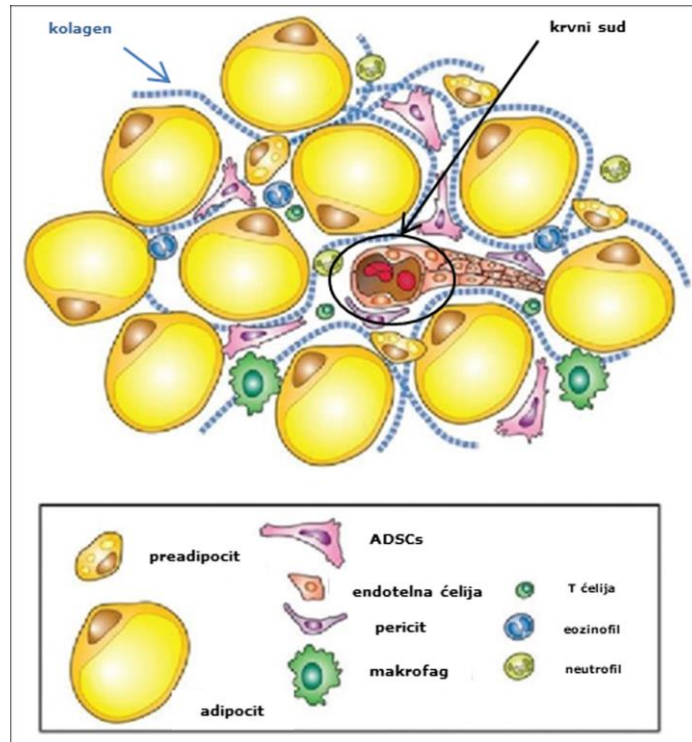


Slika 1. Beli adipocit (a), bež adipocit (b) i mrki adipocit (c). Adaptirano iz: Stine i sar. 2015.

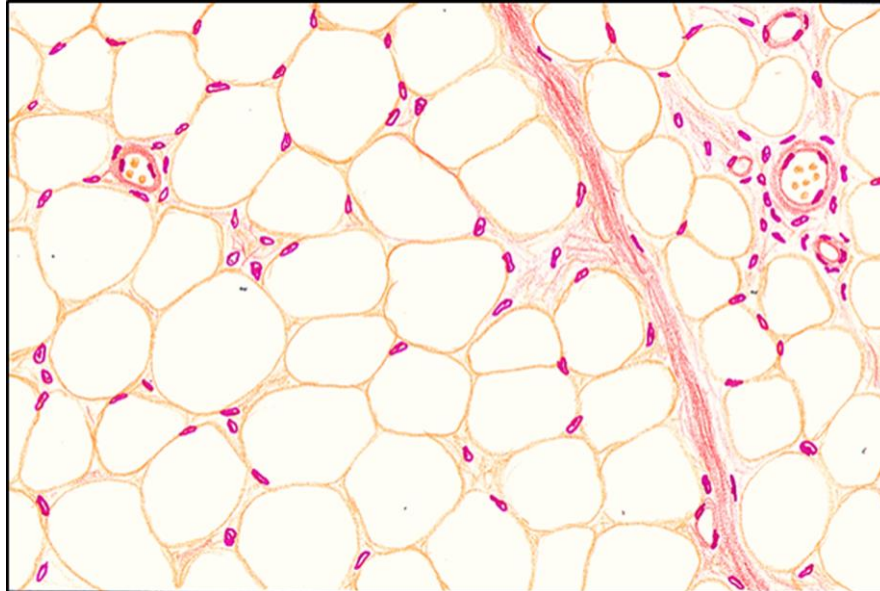
Postoje indicacije da je nastanak bež adipocita u tumorima masnog tkiva jedan od mogućih događaja u razvoju tumora, ali ne postoji dovoljno eksperimentalnih rezultata koji bi potvrdili ovakve tvrdnje.

### 1.1.1. Belo masno tkivo

Belo masno tkivo se sastoji uglavnom od adipocita i preadipocita, ali i velikog broja drugih tipova ćelija kao što su endotelne ćelije, periciti, fibroblasti, matične ćelije, mastociti, limfociti, makrofagi i drugi (Slika 2).



**Slika 2.** Šematski prikaz ćelija koje organizuju WAT, pratećih ćelija i ćelija privremeno prisutnih u WAT. Adaptirano iz: **Alabdulkarim i sar. 2017.**



**Slika 3.** Belo masno tkivo – histološka građa. Originalan crtež H&E preparata masnog tkiva dobijen ljubaznošću prof. dr Zlatibora Anđelkovića.

Adipociti u WAT su unilokulusni, okrugli ili poligonalni, sa jednim velikim lipidnim telom smeštenim u citoplazmi koja je tanka i periferno postavljena u vidu prstena. Krvni

sudovi i arterijskog i venskog tipa, različitih promera, prožimaju masno tkivo, a uočavaju se i snopovi kolagenih vlakana (Slika 3).

Glavna podela belog masnog tkiva je na potkožno (eng. *subcutaneous white adipose tissue* – scWAT) i visceralno (eng. *visceral white adipose tissue* – vWAT). Pokazano je da postoje razlike u građi, funkciji i metaboličkom statusu između ova dva depoa WAT (**Baglioni i sar., 2012; Jankovic i sar., 2014**), kao i u potencijalu izolovanih mezenhimskih matičnih ćelija (**Baglioni i sar., 2012**).

Distribucija i količina WAT, i potkožnog i visceralnog, varira u skladu sa metaboličkim i hormonskim statusom i razlikuje se kod muškaraca i žena (**Viguerie i sar., 2012; Frank i sar., 2018**). Smatra se da žene imaju više potkožnog masnog tkiva od muškaraca i da se ono deponuje na više anatomskih lokalizacija kod žena nego kod muškaraca. Količina vWAT varira u skladu sa metaboličkim statusom osobe i nagomilavanje masnog tkiva oko unutrašnjih organa u slučaju gojaznosti predstavlja veliki rizik za razvoj raznih hroničnih bolesti i disfunkcije organa oko kojih se nalazi.

Belo masno tkivo sekretuje mnoštvo različitih molekula koji se jednim imenom mogu nazvati adipokini kao što su adiponektin, leptin, rezistin, visfatin i drugi (**Kershaw i Flier, 2004**). Pored adipokina WAT proizvodi i sekretuje brojne proinflamacijske i anti-inflamacijske citokine, hemokine i mnoge druge molekule (**Kershaw i Flier, 2004; Coelho i sar. 2013**). Stvaranje sekretornih produkata masnog tkiva varira u zavisnosti od životne dobi, pola, metaboličkog statusa i ishrane. Takođe, visceralno masno tkivo se po nekim svojim karakteristikama i uticaju na funkcionisanje ostalih organa razlikuje od potkožnog masnog tkiva (**Iglesias i sar., 2006; Viguerie i sar., 2012; Jankovic i sar., 2014**). Dominantni sekretorni produkti adipocita su adipokini leptin i adiponektin, koji su u ravnoteži i omogućavaju normalno funkcionisanje masnog tkiva. Usled disbalansa u produkciji leptina i adiponektina, dolazi do disfunkcije masnog tkiva koje vodi razvoju metaboličkih poremećaja i nastanku raznih oboljenja. Postoje podaci o razlikama u ekspresiji ova dva adipokina između muškaraca i žena (**Iglesias i sar., 2006**).

Leptin je adipokin koji se stvara u masnom tkivu, ali se manje količine mogu detektovati i u nekim drugim tkivima. Nivo leptina u cirkulaciji je povećan kod gojaznih osoba i njegova proizvodnja raste sa unosom hrane. Koncentracija leptina je veća kod žena nego kod muškaraca i regulisana je hormonima, ali i zavisna od depoa masnog tkiva. Produkcija leptina je veća u potkožnom nego u visceralnom masnom tkivu i pokazano je da

ima proinflamacijski karakter (**Ahima i Flier, 2000; Coelho i sar., 2013**). Leptin cirkuliše u krvi kao slobodni i vezani hormon i njegova koncentracija u masnom tkivu i plazmi je zavisna od energije uskladištene u vidu lipida u masnom tkivu, što znači da je veća koncentracija leptina prisutna kod gojaznih osoba. Na ekspresiju i sekreciju leptina utiču hormoni insulin i glukokortikosteroidi ali i akutne infekcije i proinflamacijski citokini. Leptin ispoljava sistemski metabolički efekat i reguliše rad ostalih endokrinih žlezdi (**Ahima i Flier, 2000**). Pokazano je i da leptin podstiče proliferaciju i diferencijaciju hematopoetskih ćelija, da stimuliše angiogenezu i ubrzava zarastanje rana, kao i da reguliše lučenje citokina od strane imunskih ćelija (**Kershaw i Flier, 2004**).

Adiponektin je adipokin koji se luči isključivo u zrelih adipocitima i u velikim koncentracijama je prisutan u cirkulaciji. Postoji negativna korelacija koncentracije adiponektina i količine masnog tkiva u organizmu. Snižena koncentracija adiponektina se povezuje sa nastankom insulinske rezistencije i dijabetesom. Pokazano je da adiponektin ima i anti-inflamacijski karakter (**Kershaw i Flier, 2004; Coelho i sar., 2013**). Ekspresija adiponektina je viša u scWAT u odnosu na vWAT. U stanjima gojaznosti i lipodistrofije usled insulinske rezistencije, smanjen je nivo adiponektina. Adiponektin ispoljava svoje metaboličke efekte i na nivou mišića i jetre, tako što u mišićima stimuliše korišćenje glukoze i oksidaciju masnih kiselina, dok u jetri stimuliše oksidaciju masnih kiselina, povećava osetljivost na insulin i smanjuje izlazak glukoze iz jetre (**Kershaw i Flier, 2004**). Adiponektin deluje i na nivou krvnih sudova tako što inhibira adheziju monocita na zidove krvnih sudova smanjujući ekspresiju adhezionih molekula i sprečava transformaciju makrofaga u penaste ćelije. Adiponektin stimuliše i angiogenezu tako što povećava produkciju azot oksida (eng. *nitric oxide* – NO) u endotelnim ćelijama (**Kershaw i Flier, 2004**).

Postoje podaci koji ukazuju na povezanost koncentracije leptina i adiponektina sa razvojem i progresijom različitih tumora. Pokazano je da povišena koncentracija leptina u cirkulaciji stimuliše proliferaciju i migraciju ćelija tumora, kao i rast tumora (**Kato i sar., 2015; Hosney i sar., 2017**). Sa druge strane, hipoadiponektinemija je povezana sa povećanim rizikom za razvoj maligniteta i lošom prognozom kod gojaznih pacijenata kod kojih je zabeležena snižena ekspresija i produkcija adiponektina (**Katira i Tan, 2016; Cui i sar., 2018**), iako postoje i drugačiji podaci o ulozi adiponektina u razvoju tumora (**Hebbard i Ranscht, 2014**).

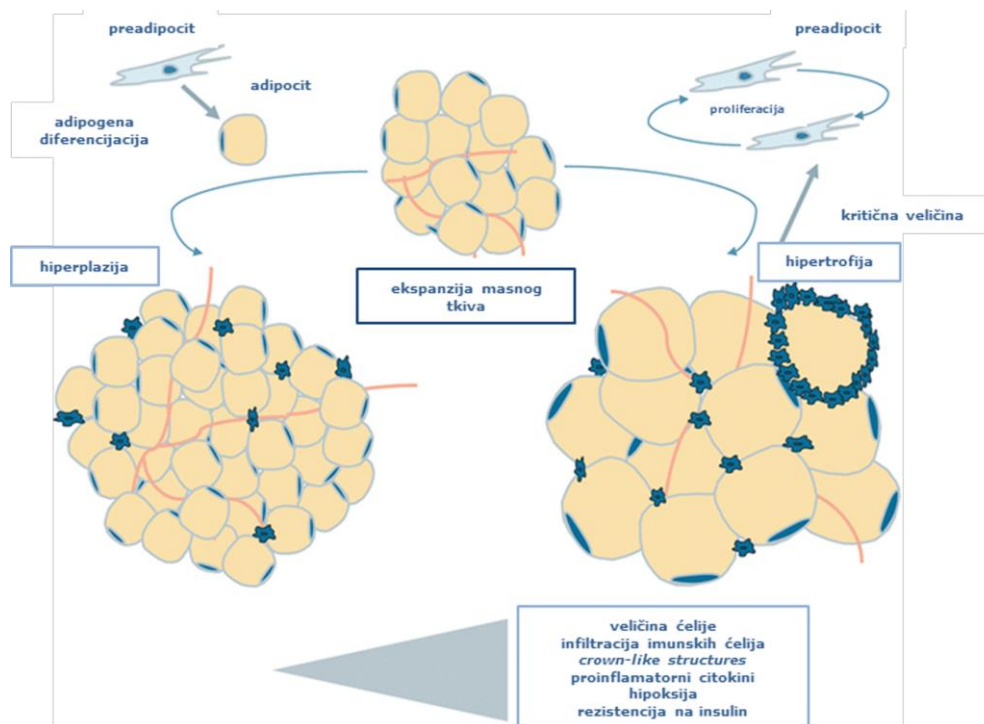
Da li i na koji način leptin i adiponektin doprinose razvoju tumora masnog tkiva, još uvek nije poznato, ali se iz svega navedenog može zaključiti da je njihova ekspresija i produkcija u masnom tkivu ključna kao medijatora u komunikaciji između adipocita i drugih ćelija prisutnih u masnom tkivu.

### 1.1.2. Makrofagi u masnom tkivu

Pored adipocita, u masnom tkivu najvažniju ulogu u očuvanju homeostaze masnog tkiva i remodelovanja imaju makrofagi (**Sun i sar., 2011**). Adipociti i makrofagi komuniciraju međusobno putem adipokina i drugih citokina koje sekretuju i njihov balans u masnom tkivu je neophodan za normalno funkcionisanje masnog tkiva. Novija istraživanja pokazuju da su makrofagi glavni akteri u remodelovanju masnog tkiva, ali i njegovoj disfunkciji i danas se njihova uloga u ovim procesima ispituje u sve većoj meri (**Suganami i Ogawa, 2010; Stojanović i Najman, 2016**). Tačan mehanizam njihovog delovanja i njihova interakcija sa adipocitima i ostalim ćelijama u masnom tkivu se intenzivno izučavaju i postoje brojne publikacije o njihovoj ulozi u nastanku gojaznosti, insulinske rezistencije, dijabetesa, kardiovaskularnih oboljenja, ali i razvoju tumora.

Makrofagi su heterogena populacija ćelija koje odlikuje izuzetna plastičnost, što im omogućava odličnu adaptaciju na okolnu sredinu i adekvatno delovanje. Postoje dva tipa makrofaga, M1 (klasično aktivirani) ili proinflamacijski makrofagi, i M2 (alternativno aktivirani), anti-inflamacijski ili reparacijski makrofagi (**Mantovani i sar., 2004; Gordon i Taylor, 2005; Stojanović i Najman, 2016**). Ravnoteža između M1 i M2 makrofaga u masnom tkivu je bitna za očuvanje normalne funkcije adipocita i homeostazu tkiva i svaka promena u toj ravnoteži i neadekvatnom funkcionisanju makrofaga se povezuje sa nastankom mnogih bolesti (**Suganami i Ogawa, 2010; Sun i sar., 2011; Stojanović i Najman, 2016**). M1 makrofagi proizvode proinflamacijske citokine i druge molekule koji imaju ulogu u odbrani, ali pri tome mogu dovesti do destrukcije ćelija i tkiva budući da proizvode različite enzime koji vrše digestiju tkiva. Klasično aktivirani ili M1 makrofagi se odlikuju ekspresijom molekula kao što su CD11c, CD40, CD80, CD86, CCR7 i druge, kao i sekrecijom proinflamacijskih citokina TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-23 i drugih (**Vogel i sar., 2014; Stojanović i Najman, 2016**). Alternativno aktivirani ili M2 makrofagi su reparacijski makrofagi koji produkcijom anti-inflamacijskih citokina stimulišu procese

zarastanja rana, reparacije i regeneracije tkiva. Alternativno aktivirani makrofagi se odlikuju ekspresijom molekula kao što su CD163 i CD206, kao i sekrecijom anti-inflamacijskih citokina kao što su IL-4 i IL-10 (Vogel i sar., 2014; Stojanović i Najman, 2016). M2 makrofagi se mogu podeliti na minimalno tri podtipa prema fenotipu i funkciji koju imaju, i to su M2a, M2b i M2c, koji su prisutni u različitim fazama procesa regeneracije i reparacije tkiva.

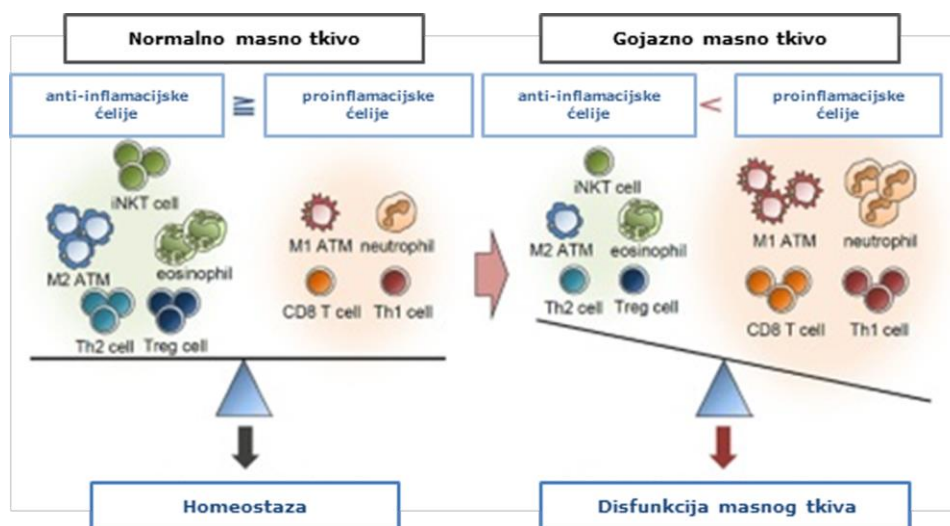


**Slika 4.** Šematski prikaz ekspanzije masnog tkiva hiperplazijom i hipertrofijom. Adaptirano iz: Fischer-Posovszky i sar. 2018.

Gojaznost se opisuje kao hronična inflamacija masnog tkiva u kojoj dolazi ekspanzije masnog tkiva i predstavlja vrlo ozbiljan i težak zdravstveni problem današnjeg vremena koji za posledicu ima negativan uticaj na rad ostalih organa u telu. Ekspanzija masnog tkiva se odigrava na račun hiperplazije (uvećanja broja adipocita iz prekursorskih ćelija) i hipertrofije (uvećanja volumena postojećih adipocita) (Fischer-Posovszky i sar., 2018) (Slika 4).

U slučaju gojaznosti ekspanzija masnog tkiva se vrši na račun hipertrofije tkiva, što dovodi do nekroze adipocita i njihove smrti sa posledičnim oslobađanjem slobodnih

masnih kiselina za koje se zna da su jedan od mogućih induktora M1 polarizacionog stanja makrofaga (Nguyen i sar., 2007; Sun i sar., 2011; Stojanović i Najman, 2016). Hipertrofični adipociti pojačano luče proinflamacijske citokine kao i MCP-1 (eng. *monocyte chemoattractant protein-1*) koji privlače monocite iz cirkulacije u masno tkivo u kojem se nagomilavaju i diferenciraju u M1 makrofage (Weisberg i sar., 2003; Choe i sar., 2016; Fischer-Posovszky i sar., 2018). Ovi makrofagi se zatim okupljaju oko hipertrofičnih i nekrotičnih adipocita i formiraju strukture nalik krunama (eng. *crown-like structures* – CLS) (Cinti i sar., 2005). Pored infiltracije makrofaga, koji u masnom tkivu gojaznih osoba dobijaju M1 polarizaciono stanje, pokazano je i da u slučaju gojaznosti dolazi do promene u fenotipu rezidentnih makrofaga u masnom tkivu pri čemu oni prelaze iz M2 anti-inflamacijskog stanja u proinflamacijsko M1 polarizaciono stanje (Lumeng i sar., 2007). U masnom tkivu tada postoji disbalans između M1 i M2 makrofaga pri čemu dominiraju M1 makrofagi i druge inflamacijske ćelije (Choe i sar., 2016) (Slika 5) što vodi razvoju insulinske rezistencije i drugih metaboličkih poremećaja kako lokalno u masnom tkivu tako i sistemski. Postoje indikacije da su u komunikaciju makrofaga i adipocita, kao i promene u njihovom fenotipu u masnom tkivu, uključeni redoks mehanizmi pa bi se modulacijom redoks metabolizma u masnom tkivu mogla prevenirati ili čak lečiti insulinska rezistencija i metabolički sindrom (Jankovic i sar., 2015b).



Slika 5. Ravnoteža između imunskih ćelija u homeostazi i disfunkciji masnog tkiva. Adaptirano iz: Choe i sar. 2016.



Imajući u vidu da je jedan od potencijalnih uzroka i mehanizama nastanka tumora upravo inflamacija koja nastaje u tkivu, poremećena ravnoteža između M1 i M2 makrofaga može imati ključnu ulogu u nastanku tumora masnog tkiva. Uloga makrofaga u razvoju benignih i malignih tumora masnog tkiva još uvek nije dovoljno poznata, ali se zna da su oni ključni akteri mnogih procesa u masnom tkivu usled njihove prisne komunikacije sa adipocitima pa je stoga njihova uloga u razvoju ovih tumora vrlo izvesna.

## 1.2. TUMORI MASNOG TKIVA

Tumori masnog tkiva predstavljaju najčešće tumore mekih tkiva i mogu biti benigni (lipomi) i maligni (liposarkomi).

### 1.2.1. Lipomi

Lipomi su benigni tumori masnog tkiva koji predstavljaju jednu od najčešćih neoplazmi mekih tkiva mezenhimskog porekla (**Mohammed i sar., 2014; Omonte i sar., 2016**), sa još uvek nedovoljno razjašnjenom etiologijom i patogeneom. Smatra se da jedan procenat svih ljudi u populaciji ima ovaj oblik tumora mekog tkiva (**Enzinger i Weiss, 1995**). Lipomi se mogu javiti u bilo kom periodu života i nezavisno od pola. Najčešće se, međutim, lipomi javljaju kod ljudi srednjih godina, između 40. i 60. godine života sa pikom incidence u petoj deceniji života (**Ingari i Faillace, 2004; Dei Tos, 2010; Mohammed i sar., 2014; Johnson i sar., 2018**), ali se mogu javiti i u ranijem periodu života. Lipomi se mogu javiti i kod dece i takvi lipomi se nazivaju lipoblastomi.

Lipomi se javljaju i kod muškaraca i kod žena. Neki autori smatraju da je veća učestalost lipoma kod žena (**Mohammed i sar., 2014; Engin i sar., 2015**) dok drugi navode da su lipomi učestaliji kod muškaraca (**Sandberg, 2004; Dei Tos, 2010; Derin i Yaprak, 2017; Johnson i sar., 2018**). Autori koji ukazuju na veću učestalost potkožnih lipoma kod žena, objašnjavaju to većom količinom potkožnog masnog tkiva kod žena u odnosu na muškarce (**Engin i sar., 2015**).

Lipomi se mogu javiti na gotovo svim anatomskim lokalizacijama, na glavi, vratu, ekstremitetima i trupnom delu tela (**Mentzel i Fletcher, 1995**). Najčešće se mogu naći lokalizovani u potkožnom masnom tkivu, ali i intramuskularno, u telesnim šupljinama i

unutrašnjim organima (**Ingari i Faillace, 2004; Mohammed i sar., 2014**). Lipomi koji su lokalizovani na ekstremitetima se češće javljaju na gornjim nego na donjim ekstremitetima. Lipomi mogu biti pojedinačni (solitarni), što je najčešće slučaj, ili se mogu naći u većem broju kao multiple generalizovane lipomatoze ili multiple simetrične lipomatoze. Smatra se da otprilike 5% svih pacijenata sa lipomima ima multiple lipome (**Sandberg, 2004; Dei Tos, 2010**). Postoje podaci da se u oko 20% slučajeva lipomi javljaju u predelu glave i vrata, 1-4% u usnoj duplji, a u ostalim slučajevima mogu se javiti na različitim lokalizacijama i mogu dosta varirati u veličini (**Zavan i sar., 2015**). Lipomi su najčešće malih dimenzija, do 5 cm ili od 5 do 10 cm, ali mogu narasti i dostići više od 10 cm kada se nazivaju džinovskim lipomima (**Derin i Yaprak, 2017**).

Lipomi mogu biti, iako retko, udruženi sa drugim poremećajima ili su jedan od njihovih simptoma, kao što je u slučajevima multiple nasledne lipomatoze, Gardnerovog sindroma, Derkumove bolesti (adiposis dolorosa) i Madelungove bolesti.

Lipomi uglavnom sporo rastu, mogu biti difuzni ili inkapsulirani, mogu dosta varirati u veličini i pokazuju veliku heterogenost u ćelijskim populacijama koje su prisutne u tkivu (**Mentzel i Fletcher, 1995; Marques i Garcia, 1997**). Lipomi su uglavnom dobro ograničene lobulirane mase koje imaju tanku fibroznu kapsulu koja ih jasno odvaja od okolnog tkiva (**Johnson i sar., 2018**). Lipomi se klinički opisuju kao asimptomatske, bezbolne nakupine masnog tkiva koje mogu biti površinske i dubinske, pri čemu površinske pri palpaciji imaju čvrstu konzistenciju i često su pokretne (**Johnson i sar., 2018**). Smatra se da je učestalost lipoma mnogo veća od onog što se može naći u literaturi, jer su asimptomatski i ne obraća se pažnja na njih zbog benignog karaktera i uglavnom se uklanjaju iz estetskih razloga ili ukoliko se nalaze na mestu na kojem izazivaju bol pritiskajući neke druge tkivne strukture. Iz hirurške perspektive lipomi se mogu podeliti na dva tipa, inkapsulirani i ne-inkapsulirani (difuzni) u odnosu na prisustvo ili odsustvo fibrozne kapsule koja odvaja tkivo lipoma od okolnog tkiva (**Chang i sar., 2018**).

U literaturi je opisano nekoliko tipova lipoma koji se međusobno razlikuju po stepenu diferentovanosti ćelija i njihovom broju, kao i po prisustvu različitih tipova ćelija i tkivnih struktura. Lipomi se sastoje od zrelih adipocita pri čemu postoje vrlo različiti nalazi o stepenu variranja ovih adipocita u veličini i obliku u odnosu na adipocite normalnog (netransformisanog) masnog tkiva. Neki autori opisuju da su adipociti u lipomima sa minimalnim ili bez varijacija u obliku i veličini u odnosu na normalno masno tkivo, i da se

ne uočavaju atipični nukleusi u adipocitima (Araújo-Vilar i sar., 2012), što je slučaj kod malignih tumora masnog tkiva.

Postoje mnoge benigne histološke varijante lipoma koje se opisuju na osnovu vrste tkiva koja je prisutna u lipomu, pored komponenata klasičnog belog masnog tkiva, i to su: klasičan lipom (koji je najsličniji normalnom masnom tkivu i najučestaliji), fibrolipom, angiolipom, miolipom, miksolipom, vretenastoćelijski lipom, pleomorfni lipom, osteolipom, hondrolipom, hibernom i lipoblastom (Mentzel i Fletcher, 1995; Nielsen i Mandahl, 2002; Dei Tos, 2010). Poslednji objavljeni podaci ukazuju na postojanje novih tipova lipoma kao što su anizometrijski/displastični lipom (eng. *anisometric cell/dysplastic lipoma* – ACDL) i atipični vretenastoćelijski lipomatozni tumor (eng. *atypical spindle cell lipomatous tumor* - ASLT) (Chrisinger, 2019).

Multipla simetrična lipomatoza (eng. *multiple symmetric lipomatosis* - MSL) je sindrom koji se karakteriše difuznim prekomernim uvećanjem depoa masnog tkiva (lipomatoze) oko vrata, ramena ili drugih delova tela. Često ukazuje na Madelungovu bolest i uglavnom je udružena sa perifernom neuropatijom (Araújo-Vilar i sar., 2012). Postoje podaci da su u osnovi MSL mutacije u mitohondrijskoj DNK (mtDNK) i često je naslednog karaktera (Araújo-Vilar i sar., 2012). Fenotip masnog koji se razvija u MSL nije dovoljno istražen ali postoje nalazi da se sastoji od unilokulusnih i multilokulusnih adipocita, dok je morfologija mitohondrija sličnija slabo aktivnom BAT nego klasičnom WAT (Araújo-Vilar i sar., 2012).

Još uvek se ne zna tačan uzrok i mehanizam nastanka ovih tumora i nema dovoljno podataka o njihovim karakteristikama. Jedan od potencijalnih uzroka nastanka lipoma može biti povreda ili trauma određenog dela tela pri čemu dolazi do stvaranja lipomatozne mase na mestu povrede. Navodi se da to može biti jedan od uzroka samo kada trauma izazove nekrozu adipocita i posledičnu lokalnu inflamaciju, što konačno dovodi do formiranja lipoma (Aust i sar., 2007).

Postoje podaci o udruženosti nekih germinativnih mutacija u *RB1* genu kao i tRNA(Lys) u mtDNK sa pojavom multiplih lipomatoza (Araújo-Vilar i sar., 2012). Smatra se takođe da *HMG A2* gen (eng. *high-mobility group AT-hook 2*- HMG A2), koji se nalazi na kraćem kraku 12. hromozoma, igra značajnu ulogu u nastanku lipoma, i u mnogim tipovima lipoma je opisana njegova amplifikacija (Johnson i sar., 2018).

Prva istraživanja potencijalnih uzroka koji dovode do nastanka lipoma uključivala su citogenetsku analizu pri čemu je pokazano da u osnovi patogeneze lipoma leže razne hormozomske aberacije, pored genskih mutacija. Najčešće aberacije koje se smatraju uzrokom nastanka lipoma su translokacije sa rearanžmanom koje uključuju hromozom 12 i to region 12q13-15 (**Sandberg, 2004**). U skoro 25% lipoma koji pripadaju ovoj citogenetskoj podgrupi, najučestalija translokacija je  $t(3;12)(q27-28;q13-15)$ . Osim ovih aberacija, insercije u regionu 12q13-15 su takođe zapažene. Hromozomi koji su najčešće uključeni u ove procese su pored hromozoma 12 još i hromozom 1, 3 i 21 iako je pokazano da svi hromozomi, uključujući X i Y mogu da učestvuju u nastanku translokacija i insercija sa hromozomom 12 kada su u pitanju tumori masnog tkiva (**Sandberg, 2004**). Pored abnormalnosti 12q13-15 koje su zapažene u oko 59% - 65% lipoma, pronađene su i delecije 13q (oko 10%), ring hromozomi, rearanžmani 6p21-23 (oko 5%), 11q13 i 1p36 (**Bridge i Cushman-Vokoun, 2011; Chrisinger, 2019**). Postoji veliki broj studija koje su se bavile citogenetskom analizom klasičnih lipoma i pokazano je da su najčešći rearanžmani u hromozomu 12 koji uključuju deo 12q14-15 i koji rezultuju promenama u ekspresiji *HMG A2* gena (**Bridge i Cushman-Vokoun, 2011**). Pronađeno je da se u tumorima masnog tkiva u kojima su prisutne strukture sa vretenastoćelijskim karakteristikama, kao što su vretenastoćelijski lipom, pleomorfni lipom i atipični vretenastoćelijski lipomatozni tumor, kao genetske promene javljaju delecije u regionu 13q14 što dovodi do potpunog ili polovičnog gubitka funkcije *RB1* gena (**McCarthy i Chetty, 2018; Schaefer i Hornick, 2018**).

Lipomi mogu u određenim slučajevima da pređu u malignu formu i da daju liposarkome, maligne tumore masnog tkiva. Lipomi kao benigni tumori ne metastaziraju dok je pojava recidiva moguća i lokalna je (**Bridge i Cushman-Vokoun, 2011**), tj. recidivi se javljaju na mestu na kojem je lipom primarno bio lokalizovan. Recidivi se uglavnom javljaju u slučaju difuznih lipoma kada je teško odrediti granicu lipoma i okolnog masnog tkiva. Maligna transformacija lipoma iako je moguća, prema navodima u literaturi retko se dešava.

Iako su lipomi vrlo učestali tumori mekih tkiva, nema dovoljno podataka o njihovim molekularnim karakteristikama, kao i potencijalnim mehanizmima njihovog nastanka, najverovatnije zato što ne ugrožavaju direktno život pacijenata već više predstavljaju

estetski problem, i često se na osnovu kliničkog pregleda uklanjaju, bez slanja na patohistološku analizu dok su molekularne analize izuzetno retke.

### 1.2.2. Liposarkomi

Liposarkomi su maligne neoplazme masnog tkiva koje predstavljaju najčešće sarkome mekih tkiva kod odraslih ljudi, čineći oko 20% svih sarkoma (**Mentzel i sar., 2010**). Postoji pet podgrupa liposarkoma koje su opisane do danas i tu spadaju dobro-diferentovani liposarkom/atipični lipomatozni tumor (eng. *well-differentiated liposarcoma/atypical lipomatous tumor* – WDL/ALT), dediferentovani liposarkom (eng. *dedifferentiated liposarcoma*), miksoidni liposarkom, pleomorfni liposarkom i retki liposarkom mešovito tipa (**Mentzel i sar., 2010**), pri čemu dobro diferentovani liposarkom (WDL) čini 40% do 45% svih liposarkoma (**Nielsen i Mandahl, 2002; Dei Tos, 2010**).

Ono što karakteriše liposarkome i što ih dijagnostički razdvaja od benignih tumora (lipoma) je to da imaju tendenciju brzog rasta, znatno su većih dimenzija od lipoma, često su difuzni bez fibrozne kapsule koja ih jasno odvaja od okolnog masnog tkiva i mogu biti vrlo vaskularizovani. Odlikuju ih takođe i česti recidivi nakon uklanjanja upravo zbog toga što nisu jasno ograničeni kapsulom pa je velika verovatnoća da se ne uklone u potpunosti (**Mentzel i sar., 2010; Chrisinger, 2019**). Liposarkomi se po histološkoj građi mogu jasno razlikovati od lipoma prema prisustvu atipičnih oblika adipocita i atipičnih oblika njihovih jedara. Jedna od glavnih strukturnih karakteristika liposarkoma je prisustvo velikog broja različitih tipova stromalnih ćelija koje su često atipičnog izgleda (**Mentzel i sar., 2010; McCarthy i Chetty, 2018; Chrisinger, 2019**). Dijagnoza liposarkoma je ponekad otežana u slučajevima dobro-diferentovanog liposarkoma jer pokazuje dosta sličnosti sa atipičnim lipomima koji imaju strukture i vretenastoćelijskih i pleomorfnih lipoma, u kojima se mogu naći takođe vretenaste ćelije i različiti oblici adipocita. U tom slučaju se diferencijalna dijagnoza vrši analizom molekularnih markera i imunohistohemijom detekcijom tumorskih markera uz postojeću kliničku sliku. Genetski poremećaji koji su uočeni u WDL i ALT/WDL su amplifikacije gena *MDM2*, *CDK4*, *HMG A2* usled aberacija hromozoma 12 u regionu 12q13–15 (**McCarthy i Chetty, 2018; Schaefer i Hornick, 2018; Chrisinger, 2019**).

### 1.3. MEZENHIMSKE MATIČNE ČELIJE IZ MASNOG TKIVA

Mezenhimskim matičnim ćelijama (eng. *mesenchymal stem cells* – MSCs) izolovanim iz masnog tkiva se u današnje vreme posvećuje sve veća pažnja i vrlo je atraktivna njihova potencijalna primena u oblasti tkivnog inženjerstva i regenerativne medicine. Atraktivnost ovih ćelija se ogleda u njihovoj dostupnosti i potencijalu koji imaju, kao i mogućnosti dobijanja ovih ćelija u velikom broju iz potkožnog masnog tkiva koje je u velikoj meri prisutno kod ljudi.

Matične ćelije iz masnog tkiva (eng. *adipose-derived stem cells* – ADSCs) su adultne mezenhimske matične ćelije poreklom iz masnog tkiva koje pokazuju veliku morfološku i funkcionalnu sličnost sa MSCs iz kostne srži, ali sa dodatnim karakteristikama koje im daju prednost u primeni (**Mizuno i sar., 2012**), kao što su laka dostupnost i neinvazivne metode izolacije. ADSCs se mogu izolovati iz veoma obilnog i lako dostupnog masnog tkiva u velikom broju primenom minimalne invazivne procedure, ili iz liposukcijskih aspirata ili iz biopsija masnog tkiva (**Bunnell i sar., 2008**). Ove ćelije poseduju karakteristike koje ih čine odličnim kandidatima za primenu u tkivnom inženjerstvu i regenerativnoj medicini (**Gimble i sar., 2007**). Primena ADSCs u tkivnom inženjerstvu i regenerativnoj medicini je veoma obećavajuća zbog potencijala ovih ćelija za samoobnavljanjem, dobrog proliferativnog kapaciteta i odličnog potencijala za diferencijaciju u brojne tipove ćelija kao što su adipociti, osteoblasti, hondrociti i endotelne ćelije, što je od posebnog značaja i za tkivno inženjerstvo kosti i mekih tkiva (**Gimble, 2007; Baer i Geiger, 2012; Cvetković i sar., 2015; Najdanović i sar., 2015; Najman i sar., 2016; Najdanović i sar., 2016**). Pokazano je da se ADSCs mogu uspešno diferencirati u ćelije sva tri klicina lista (ektoderm, mezoderm i endoderm) što znači da se mogu smatrati pluripotentnim i zato su pogodni kandidati za široku primenu u raznim oblastima biomedicinskih nauka (**Baer i Geiger, 2012**).

Pored sposobnosti da se diferenciraju u različite tipove ćelija kao i njihovog regenerativnog potencijala, ono što značajno proširuje polje primene ovih ćelija jeste imunomodulacijska aktivnost ADSCs, kao i MSCs uopšte, naročito u lečenju inflamacijskih bolesti i autoimunskih poremećaja (**Bernardo i Fibbe, 2013; Leto Barone i sar., 2013; Kyurkchiev i sar., 2014; Wang i sar., 2018**). MSCs mogu da ispolje svoju imunomodulacijsku aktivnost direktnim kontaktom sa ćelijama imunskog sistema ili putem

sekretornih produkata (**English, 2013**). MSCs mogu ispoljiti i anti-inflamacijska i proinflamacijska svojstva, što zavisi od faktora mikrosredine koji deluju na MSCs. Sekretom MSCs i njihova aktivnost variraju u zavisnosti od aktivacijskog stanja ćelija, citokina i drugih molekula kojima su MSCs izložene (**Uccelli i de Rosbo, 2015**). Pokazano je da proinflamacijski stimuli pojačavaju sekreciju anti-inflamacijskih faktora od strane MSCs što predstavlja jedan od mehanizama njihovog delovanja (**Regulski, 2017**). Kada dođe do oštećenja tkiva, usled traume ili povrede, to je praćeno proizvodnjom proinflamacijskih faktora koji indukuju migraciju različitih tipova ćelija, uključujući i MSCs, do oštećenog mesta. MSCs zatim odgovaraju na ove stimulse tako što proizvode anti-inflamacijske citokine i različite faktore rasta koji pomažu oštećenom tkivu da zaraste (**Shi i sar., 2012; Ma i sar., 2014**). Suprimirajući inflamaciju nastalu usled oštećenja tkiva, MSCs stimulišu proces reparacije tkiva (**Guillén i sar., 2018**). Kada je u pitanju imunomodulacijska aktivnost MSCs, najviše objavljenih rezultata odnose se na imunosupresivnu aktivnost MSCs, koja uz slabu imunogenost, čini ove ćelije dobrim kandidatima za transplantaciju bez potrebe za podudaranjem davaoca i recipijenta (**Regulski, 2017**).

MSCs mogu biti indukovane na proizvodnju proinflamacijskih stimula i da promoviraju imunski odgovor, a ne samo da indukuju imunosupresiju, što je uglavnom orkestrirano i zavisno od mikrookruženja i inflamacijskog statusa tkiva (**Ma i sar., 2014**). Objavljeni su nalazi da ADSCs sekretuju razne solubilne faktore kao što su citokini, hemokini i faktori rasta, konstitutivno i kada su stimulisane raznim molekulima, i u uslovima *in vitro* i u uslovima *in vivo* (**Shi i sar., 2012; English, 2013; Kyurkchiev i sar., 2014, Ma i sar., 2014; Madrigal i sar., 2014**). Pored ovih faktora, MSCs, pa i ADSCs, sekretuju egzosome i mikrovezikule koje sadrže različite biološki aktivne molekule kao što su miRNK, lipidni molekuli i razni proteini (**Baglio i sar., 2012; Madrigal i sar., 2014**). Objavljeni podaci o sekretornim produktima MSCs ukazuju na mogućnost razvoja bezćelijskih terapijskih strategija koje se baziraju na sekretumu MSCs kao alternativa klasičnoj ćelijskoj terapiji (**Baglio i sar., 2012; Madrigal i sar., 2014; Vizoso i sar., 2017**). Efekti ADSCs na zarastanje rana su objavljeni u različitim modelima *in vitro* i *in vivo*. ADSCs mogu ispoljiti svoje efekte na zarastanje rana na dva načina, direktnim delovanjem preko njihove diferencijacije u fibroblaste, keratinocite, osteoblaste i druge ćelije u tkivima na koje

deluju, ili preko sekretornih produkata prisutnih u kondicioniranim medijumima ADSCs (Shingyochi i sar., 2015).

#### 1.4. MEZENHIMSKE MATIČNE ĆELIJE IZ LIPOMA

MSCs su prisutne, kako u normalnom (netransformisanom) masnom tkivu, tako i u tumorima masnog tkiva i smatra se da mogu biti odgovorne za razvoj ovih tumora. Nekoliko istraživačkih grupa je pokazalo da ove ćelije imaju slične karakteristike kao i MSCs iz netransformisanog masnog tkiva, da poseduju specifične markere za MSCs i da se mogu diferentovati u adipocite, osteoblaste i hondrocite (Lin i sar., 2007; Suga i sar., 2009). Takođe, postoje studije u kojima je pokazano da se ekspresija specifičnih markera proliferacije i diferencijacije u lipomu i normalnom masnom tkivu razlikuje (Zavan i sar., 2015), pa se nameće pitanje u kojim su sve karakteristikama i u kojoj meri ove ćelije zaista slične.

Rezultati nekoliko studija ukazuju na to da je tkivo lipoma dobar izvor matičnih ćelija koje bi se mogle koristiti u regenerativnoj medicini (Lin i sar., 2007; Suga i sar., 2009; Tremp i sar., 2016), smatrajući lipome „beskorisnim tkivom“ koji bi se mogli iskoristiti u tkivnom inženjerstvu i regenerativnoj medicini (Lin i sar., 2007). Postoje studije u kojima je rađena izolacija i karakterizacija MSCs iz lipoma, tzv. LDSCs (eng. *lipoma-derived stem cells* – LDSCs) i pokazano je da su ove ćelije vrlo slične ADSCs u nekim karakteristikama (Suga i sar., 2009). Pokazano je da je potencijal LDSCs da proliferišu sličan ADSCs, da ekspimiraju karakteristične MSCs markere, kao i da se mogu diferentovati u adipocite, osteoblaste i hondrocite isto kao i ADSCs (Lin i sar., 2007; Suga i sar., 2009; Makiguchi i sar., 2013; Tremp i sar., 2016). Skoro svi publikovani rezultati istraživanja ukazuju na to da LDSCs imaju isti potencijal za diferencijaciju u osteoblaste i adipocite kao i ADSCs, dok je u jednoj studiji pokazano da su proliferacioni potencijal i neke fenotipske karakteristike LDSCs različite u odnosu na ADSCs (Qian i sar., 2010). Postoje podaci o formiranju struktura nalik kostnom i hrskavičavom tkivu u lipomima kao i o osifikaciji lipoma u različitim delovima tela (Val-Bernal i sar., 2007), pri čemu se smatra da su za formiranje tih struktura odgovorne matične ćelije u tkivu lipoma (Sunohara i sar., 2012), što ukazuje na potencijalnu ulogu ovih ćelija u patogenezi lipoma (Makiguchi i sar., 2013).



Upotreba LDSCs može biti veoma atraktivna jer bi predstavljala tzv. „recikliranje beskorisnog tkiva“ i njegovu primenu u regenerativnoj medicini. Rezultati malog broja sprovedenih studija su pokazali da se matične ćelije izolovane iz lipoma mogu koristiti kao potencijalno sredstvo u regenerativnoj medicini zbog sličnosti sa ADSCs u pogledu kapaciteta za proliferaciju i diferencijaciju. Međutim, pored toga što se radi o malom broju sprovedenih studija koje su se bavile ispitivanjem ovih ćelija, nedostaci se ogledaju i u tome što je rađeno sa svega par uzoraka tkiva lipoma po studiji, kao i u izostanku adekvatnog poređenja karakteristika ovih ćelija sa ćelijama iz netransformisanog masnog tkiva, u istim eksperimentalnim uslovima. Stoga je detaljnija karakterizacija LDSCs na molekularnom nivou neophodna za verodostojne zaključke o njihovoj sličnosti ili razlikama sa ADSCs i njihovoj potencijalnoj primeni, kao i za razjašnjenja njihove uloge u nastanku lipoma kao benignih tumora masnog tkiva.

## 2. CILJEVI

Lipomi su benigni tumori masnog tkiva koji ne ugrožavaju život pacijenata, ali mogu predstavljati veliki estetski problem. Ukoliko krene njihova ubrzana ekspanzija i ukoliko se pojave u blizini pojedinih organa, lipomi mogu ometati njihovo normalno funkcionisanje. Etiologija i patogeneza lipoma, kao i molekularni mehanizmi koji su u osnovi nastanka ovih tumora masnog tkiva, još uvek nisu dovoljno poznati. Iako ima podataka o citogenetskim poremećajima koji dovode do razvoja lipoma, način na koji se to odražava na disfunkciju masnog tkiva i transformaciju ka benignim tumorima, još uvek nije poznat. Postoje indikacije da su povreda i trauma masnog tkiva, sa posledičnom inflamacijom, jedan od mogućih uzroka ali to nije odgovor na pitanje koji je mehanizam nastanka lipoma koji se mogu naći u telesnim šupljinama i pojedinim organima. Literaturni podaci o lipomima su kontradiktorni, jedni autori navode da se ekspresija određenih markera u lipomima razlikuje od netransformisanog (normalnog) masnog tkiva, dok drugi navode da je ekspresija tih istih markera u lipomima vrlo slična netransformisanom masnom tkivu. U većini do sada sprovedenih studija ispitivane su multiple simetrične lipomatoze koje se razlikuju u mnogim aspektima od klasičnih lipoma koji su bili predmet istraživanja malog broja studija. Takođe, u sprovedenim studijama je uglavnom ispitivan mali broj uzoraka, često nije navođena njihova lokalizacija, a u mnogima nedostaje poređenje sa netransformisanim masnim tkivom. Imajući u vidu da su lipomi najčešći benigni tumori mekih tkiva, da su još uvek nepoznati mehanizmi koji dovode do njihovog nastanka, kao i da ne postoje podaci o njihovom molekularnom profilu i morfološkim karakteristikama u zavisnosti od lokalizacije i tipa lipoma, predmet dela ove doktorske disertacije je morfološka i molekularna karakterizacija lipoma sa različitih anatomskih lokalizacija, oba pola ispitanika kao i poređenje sa potkožnim belim masnim tkivom (scWAT) sa različitih anatomskih lokalizacija, oba pola, kako bi se doprinelo sagledavanju potencijalnih mehanizama uključenih u proces nastanka lipoma.

Postoje indikacije da matične ćelije iz lipoma mogu imati primenu u regenerativnoj medicini, a pripisuje im se i uloga u nastanku osteolipoma i hondrolipoma imajući u vidu osteogeni i hondrogeni potencijal matičnih ćelija. Međutim, podaci u literaturi o karakteristikama MSCs iz lipoma (LDSCs) i razlikama sa MSCs iz masnog tkiva (ADSCs) su vrlo oskudni i kontradiktorni. Dok neki autori tvrde da nema razlika u potencijalu LDSCs za diferencijaciju u odnosu na ADSCs, drugi smatraju da postoje razlike u

proliferativnom potencijalu i ekspresiji određenih markera MSCs. Veliki nedostatak ovih studija je oskudna metodologija, jer je sposobnost ovih ćelija da se diferencijuju u osteoblaste i adipocite procenijavana samo na osnovu citohemijskih bojenja, a bez analize ekspresije gena i proteina specifičnih za proces diferencijacije. Takođe, nedostaje adekvatno poređenje LDSCs sa ADSCs, ispitivanih pod istim uslovima i detaljna molekularna karakterizacija ovih ćelija. Uz to publikovani su rezultati za vrlo mali broj ispitivanih uzoraka i od vrlo različitih tipova lipoma. Stoga je predmet dela ove doktorske disertacije sveobuhvatno ispitivanje morfoloških, molekularnih i funkcijskih karakteristika izolovanih ćelija iz lipoma (LDSCs) uzetih sa različitih anatomskih lokalizacija ispitanika oba pola, uključujući ispitivanje potencijala za diferencijaciju u adipocite i osteoblaste kao i interakcija LDSCs sa makrofagima i fibroblastima u uslovima *in vitro*. Sve karakteristike LDSCs su ispitivane i poredene sa ADSCs izolovanim iz scWAT pod istim uslovima. Ovo istraživanje je prema našim saznanjima prvo koje obuhvata detaljnu karakterizaciju ćelija izolovanih iz lipoma. Dobijeni rezultati mogu ukazati na mogućnosti i ograničenja terapijske primene ovih ćelija i ukazati na potencijalno nova polja primene, a takođe mogu dati bolji uvid u ćelijske i molekularne mehanizme nastanka lipoma koji bi uključivali LDSCs.

**U skladu sa iznetim činjenicama i predmetom istraživanja ove doktorske disertacije, postavljeni su sledeći ciljevi:**

- Ispitati karakteristike mezenhimskih matičnih ćelija izolovanih iz lipoma (LDSCs) i uporediti ih sa mezenhimskim matičnim ćelijama iz potkožnog belog masnog tkiva (ADSCs) kroz:
  - ispitivanje fenotipskih karakteristika LDSCs i poređenje sa ADSCs u istim uslovima, što podrazumeva izolaciju, kultivaciju i analizu morfologije ćelija u standardnim uslovima za kultivaciju *in vitro*, ispitivanje njihovog proliferativnog potencijala, kao i analizu ekspresije specifičnih površinskih markera matičnih ćelija;
  - ispitivanje molekularnog profila LDSCs analizom ekspresije gena markera matičnih ćelija, gena karakterističnih za proces osteogeneze i adipogeneze i gena uključenih u proces inflamacije;

- ispitivanje potencijala LDSCs da se diferentuju u adipocite i osteoblaste u kulturi *in vitro* primenom morfoloških i molekularnih metoda i analiza (analiza ekspresije gena i proteina karakterističnih za adipogenu i osteogenu diferencijaciju, ispitivanje morfoloških promena ćelija u toku diferencijacije kao i njihovih sekretornih produkata) i poređenje sa ADSCs u istim uslovima;
- ispitivanje uticaja sekretornih produkata LDSCs, prisutnih u kondicioniranom medijumu kultivisanih ćelija, na odgovor makrofaga i ispitivanje imunomodulacijske aktivnosti kondicioniranih medijuma LDSCs u sistemu indirektno ko-kulture *in vitro*, u poređenju sa ADSCs u istim uslovima;
- ispitivanje efekata kondicioniranih medijuma LDSCs na migraciju fibroblasta i zarastanje rana u sistemu indirektno ko-kulture *in vitro* primenom „*scratch*“ testa i poređenje sa efektima ADSCs u istim uslovima;
- Ispitati morfološke i molekularne karakteristike tkiva lipoma i potkožnog belog masnog tkiva (scWAT) različitih anatomskih lokalizacija primenom sledećih metoda i analiza:
  - analiza ekspresije gena markera matičnosti, gena karakterističnih za adipogenezu i osteogenezu, kao i gena markera inflamacije, u uzorcima tkiva lipoma i scWAT;
  - histološka analiza građe tkiva lipoma i scWAT standardnim tehnikama bojenja;
  - histomorfometrijska analiza veličine adipocita i strukture tkiva lipoma i scWAT;
  - imunohistohemijska analiza tkiva lipoma i scWAT (analiza ekspresije proteina karakterističnih za belo i mrko masno tkivo, određenih ćelijskih populacija i ćelijskih struktura);
  - ultrastruktorna analiza tkiva lipoma i scWAT;
  - analiza hemijskog sastava lipoma i scWAT (analiza ukupnih lipida, proteina, RNK i DNK) i fizičko-hemijska karakterizacija primenom Ramanske spektroskopije;

- Uraditi uporednu analizu morfoloških i molekularnih karakteristika uzoraka tkiva lipoma i scWAT' različitih anatomskih lokalizacija i analizu polnih i dobnih karakteristika pacijenata sa lipomima uključenih u istraživanje.

### **3. MATERIYAL I METODI**

### 3.1. MATERIJAL

#### 3.1.1. Uzorci tkiva

Uzorkovanje tkiva za potrebe istraživanja je obavljeno na hirurškim klinikama Kliničkog centra u Nišu. Deo tkiva lipoma je uzorkovan nakon uspostavljanja kliničke dijagnoze benignog tumora masnog tkiva (lipoma) i hirurškog uklanjanja, dok je biopsija potkožnog belog masnog tkiva (eng. *subcutaneous white adipose tissue* – scWAT) uzeta u toku izvođenja drugih operacija kojima su pacijenti bili podvrgnuti. Sprovođenje istraživanja je odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu (brojevi odluka 01-6481-15 i 12-6316-2/4). Svi pacijenti su pre hirurške intervencije dali pisani informisani pristanak za uzorkovanje tkiva i učešće u istraživanju. Ukupno je analizirano 90 uzoraka tkiva, od toga 50 lipoma i 40 uzoraka scWAT, pacijenata oba pola i starosne dobi od 21 do 70 godina. U grupi lipoma je bilo 26 osoba muškog i 24 osobe ženskog pola, dok je u grupi pacijenata od kojih je uzimano scWAT bilo 16 osoba muškog i 24 osobe ženskog pola. Tkiva su uzorkovana sa nekoliko lokalizacija na telu kao što su: glava, usna duplja, vrat, ruka (nadlaktica i podlaktica), noga (nadkolenica i potkolenica), stomak, leđa, kuk, koleno i prepone. Svi pacijenti su imali indeks telesne mase (BMI – *body mass index*, engl.) manji od 30 što je isključivalo patološki gojazne pacijente.

#### 3.1.2. Čelijske linije

Za potrebe dela *in vitro* istraživanja su korišćene permanentne čelijske linije RAW 264.7 i L929. RAW 264.7 je čelijska linija mišjih makrofaga, koja se najčešće koristi za ispitivanja na makrofagima. L929 je čelijska linija mišjih fibroblasta koji su najčešći model fibroblasta koji se koristi u istraživanjima *in vitro* zbog karakteristika sličnih humanim fibroblastima. Obe čelijske linije vode poreklo iz Američke banke ćelija (eng. *American Type Culture Collection* - ATCC).



## 3.2. METODI I ANALIZE U ISPITIVANJIMA ĆELIJSKIH KULTURA *IN VITRO*

### 3.2.1. Izolacija i kultivacija mezenhimskih matičnih ćelija iz masnog tkiva i lipoma

Mezenhimske matične ćelije iz lipoma (eng. *lipoma-derived stem cells* - LDSCs) i normalnog potkožnog belog masnog tkiva (eng. *adipose-derived stem cells* - ADSCs) su izolovane enzimskom digestijom tkiva. Uzorci tkiva su iseckani na sitne komade i stavljeni u 0,1% rastvor kolagenaze I (StemCell Technologies, Kanada), a zatim inkubirani u vodenom kupatilu na 37 °C u trajanju od 45 do 60 minuta. Enzimska digestija je prekinuta dodatkom medijuma za kultivaciju ćelija i tkivni homogenat je vorteksiran i filtriran. Stromalna vaskularna frakcija (eng. *stromal vascular fraction* - SVF) ćelija u vidu taloga je dobijena centrifugiranjem homogenata na 1500 rpm u trajanju od 15 minuta, resuspendovana u standardnom medijumu za kultivaciju ćelija i stavljena u posude za kultivaciju ćelija (25 cm<sup>2</sup>, Greiner Bio One, Austrija). Standardni medijum (DM) za kultivaciju ćelija se sastoji od medijuma DMEM (eng. *Dulbecco's Modified Eagle's medium*) sa dodatkom 10% fetalnog goveđeg seruma (eng. *fetal bovine serum* - FBS), 2 mM stabilnog glutamina (L-alanil-L-glutamin) i 1% antibiotik-antimikotik rastvora (penicilin-streptomycin-amfotericin B). Svi medijumi i dodaci za medijume su od proizvođača *Capricorn Scientific* (Nemačka). Ćelije su isprane 16 do 18 sati nakon izolacije i zamenjen je medijum kako bi se uklonile ne-adherentne ćelije. Nakon dostizanja 70 - 80% konfluentnosti urađena je prva pasaža ćelija (P1), što je omogućilo prečišćavanje mezenhimskih matičnih ćelija. Ćelije su kultivisane u standardnim uslovima za ćelijske kulture što je podrazumevalo kultivaciju u inkubatoru na 37 °C, u atmosferi zasićenoj vlažnošću i prisustvu 5% CO<sub>2</sub>. Zamena medijuma ćelijama je vršena na svaka tri dana. Trodnevni medijumi u kojima su ćelije kultivisane neposredno pre druge pasaže (P2) su sakupljani kao kondicionirani medijumi (eng. *conditioned medium* - CM) i korišćeni za dalje analize. Kondicionirani medijumi su do daljih analiza čuvani na -80 °C.

### 3.2.2. Analiza ćelija na svetlosnom mikroskopu

Ćelije nakon izolacije, tokom kultivacije i diferencijacije, kao i nakon bojenja su posmatrane i snimane na invertnom svetlosnom mikroskopu Observer Z1 (Carl Zeiss, Nemačka). Slike su napravljene pomoću kamere AxioCam HR (Carl Zeiss) u programu ZEN 2 (*blue edition*) (Carl Zeiss).

### 3.2.3. Protočna citometrija

Ekspresija pozitivnog (CD105) i negativnog (CD33) markera mezenhimskih matičnih ćelija je analizirana na protočnom citometru BD LSRFortessa™ u programu BD FACSDiva™ verzija 8 (BD Biosciences). LDSCs i ADSCs ćelije druge pasaže (P2) (neposredno pre diferencijacije) su odlepljene tripsinom, centrifugirane i isprane fosfatnim puferom (eng. *Dulbecco's phosphate-buffered saline* - DPBS), a zatim inkubirane sa antitelima u trajanju od 15 do 20 minuta na 4 °C. Korišćena su sledeća primarna antitela direktno obeležena fluorohromama: monoklonsko mišje anti-CD105 antitelo, koje reaguje sa humanim CD105, obeleženo PE bojom (Clone 43A4E1, Miltenyi Biotec, Nemačka) i monoklonsko mišje anti-CD33 antitelo, koje reaguje sa humanim CD33, obeleženo APC bojom (Clone P67.6, 340474, BD Biosciences, SAD). Nakon inkubacije sa antitelima, ćelije su isprane, resuspendovane u odgovarajućem puferu i analizirane.

### 3.2.4. Diferencijacija mezenhimskih matičnih ćelija u kulturi

#### 3.2.4.1. Adipogena diferencijacija

Za analizu adipogene diferencijacije su korišćene ćelije drugog pasaža (P2). Ćelije su odlepljene primenom 0,25 U/mL dispaze u medijumu DMEM/F-12 (StemCell Technologies) i 0,05% tripsin-EDTA rastvora (Capricorn Scientific), centrifugirane i broj ćelija je određen na automatskom brojaču ćelija (Countess™ automated cell counter, Thermo Scientific, SAD) korišćenjem boje tripan plavo. Posađeno je 5000 ćelija po cm<sup>2</sup> na sterilne staklene ljustice u ploče sa 24 otvora (Greiner Bio One), u standardnom medijumu za kultivaciju ćelija (DM), i ostavljene su da se zalepe preko noći u standardnim uslovima. Medijum u kojem su ćelije posađene je zatim zamenjen gotovim medijumom za adipogenu diferencijaciju (AM) (StemPro™ Adipogenesis Differentiation Kit, Gibco®, Thermo Scientific) ili standardnim medijumom (DM). Ćelije su kultivisane 21 dan u medijumima

AM ili DM, u standardnim uslovima, a zamena medijuma je vršena na svaka tri do četiri dana.

#### 3.2.4.2. Osteogena diferencijacija

Za analizu osteogene diferencijacije su korišćene ćelije P2. Nakon tripsinizacije, centrifugiranja i podešavanja gustine, 3000 ćelija po  $\text{cm}^2$  je posađeno na sterilne staklene ljuispice u ploče sa 24 otvora, u standardnom medijumu za kultivaciju ćelija (DM), i ostavljene da se zalepe preko noći u standardnim uslovima. Medijum u kojem su ćelije posađene je zatim zamenjen medijumom za osteogenu diferencijaciju (OS) ili svežim standardnim medijumom (DM). Medijum za osteogenu diferencijaciju je napravljen tako što su standardnom medijumu za gajenje ćelija (DM) dodati deksametazon (D4902, Sigma, SAD) u finalnoj koncentraciji 0,1  $\mu\text{M}$ , L-askorbinska kiselina-2-fosfat (49752, Sigma) u finalnoj koncentraciji 50  $\mu\text{M}$  i  $\beta$ -glicerofosfat (AppliChem, Nemačka) u finalnoj koncentraciji 2 mM. Ćelije su kultivisane 16 dana u OS ili DM medijumu, u standardnim uslovima, a zamena medijuma je vršena na svaka tri do četiri dana.

### 3.2.5. Citohemijska analiza

#### 3.2.5.1. Oil red O bojenje

Prisustvo citoplazmatskih lipidnih tela u LDSCs i ADSCs nakon 21 dan adipogene diferencijacije je analizirano *Oil Red O* bojenjem. Ćelije su pre bojenja fiksirane u 10% neutralno-puferisanom formalinu (eng. *neutral buffered formalin* - NBF) u trajanju od 15 minuta, ispirane u DPBS-u, inkubirane u 60% izopropanolu u trajanju od tri minuta, a zatim narednih 15 minuta u rastvoru *Oil Red O* boje. Nakon ispiranja, ćelije su kontrastirane Majerovim hematoksilinom (Bio-Optica, Italija) u trajanju od jednog minuta i fotografisane. Kvantifikacija lipidnih tela je izvršena rastvaranjem *Oil Red O* boje u 100% izopropanolu i merenjem apsorbanca na talasnoj dužini od 450 nm na višekanalnom spektrofotometru Multiskan Ascent plate reader (ThermoLab Systems, Finska).

#### 3.2.5.2. Alizarin red S bojenje

Detekcija i kvantifikacija depozita kalcijumovih soli je izvršena *Alizarin red S* (ARS) bojenjem nakon 16 dana osteogene diferencijacije LDSCs i ADSCs. Pre bojenja ćelije su fiksirane u 10% NBF, a zatim inkubirane u 2% rastvoru ARS boje (A5533, Sigma-Aldrich)

u trajanju od 45 minuta na sobnoj temperaturi (ST). Čelije su zatim isprane i analizirane na svetlosnom mikroskopu. Kvantifikacija depozita kalcijuma je izvršena rastvaranjem ARS boje u 10% rastvoru sirćetne kiseline nakon čega je apsorbancija dobijenog rastvora izmerena na talasnoj dužini od 405 nm.

### 3.2.5.3. *Von Kossa bojenje*

Stvaranje mineralnih depozita tokom 16 dana osteogene diferencijacije LDSCs i ADSCs potvrđeno je i *Von Kossa* bojenjem. Nakon fiksiranja u 10% NBF ćelije su stavljene u 2% rastvor srebrno nitrata i izložene UV svetlu u trajanju od 30 minuta na ST. Nakon ispiranja, ćelije su tretirane 5% rastvorom natrijum-tiosulfata u trajanju od 5 minuta, zatim kontrastirane *Nuclear Fast Red* bojom (N069.1, Carl Roth, Nemačka) u trajanju od 5 minuta i montirane u DPX(06522, Sigma).

## 3.2.6. Analiza ekspresije proteina

### 3.2.6.1. *Imunocitohemijska analiza*

Imunoekspresija adiponektina u LDSCs i ADSCs nakon 21 dan adipogene diferencijacije je analizirana imunocitohemijskim bojenjem ćelija. Nakon fiksiranja u 10% NBF i ispiranja, izvršeno je blokiranje endogene peroksidaze i nespecifičnog vezivanja antitela. Čelije su inkubirane sa monoklonskim mišjim anti-adiponektin antitelom ([19F1], ab22554, Abcam, UK), razblaženja 1:400 (v:v), preko noći na 4 °C. Detekcija vezivanja antitela je izvršena HRP/DAB kitom za detekciju (ab64259, Abcam, UK) prema uputstvu proizvođača. Čelije su kontrastirane Majerovim hematoksilinom i montirane u VectaMount Permanent medijum (Vector Laboratories, UK).

### 3.2.6.2. *ELISA test*

Merenje sekretornih produkata ćelija u medijumu u kojem su gajene LDSCs i ADSCs tokom diferencijacije je izvršeno ELISA (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) testovima. Koncentracija osteoprotegerina (OPG), markera osteoblasta, određivana je 16. dana osteogene diferencijacije, dok je koncentracija leptina, markera zrelih adipocita, određivana 21. dana adipogene diferencijacije. Merenje oba navedena proteina je vršeno u supernatantu trodnevnog kondicioniranog medijuma ćelija. Humani Osteoprotegerin ELISA kit (ab100617, Abcam, UK) i humani Leptin ELISA kit (DLP00, RnD systems, SAD) su

korišćeni prema uputstvima proizvođača. Vrednosti su prikazane kao pg leptina/osteoprotegerina po mililitru.

### 3.2.7. Analiza ekspresije gena

#### 3.2.7.1. Izolacija RNK

LDSCs i ADSCs drugog pasaža (dan 0 u adipogenoj i osteogenoj diferencijaciji), 21. dana adipogene diferencijacije, kao i 8. i 16. dana osteogene diferencijacije, čuvane su u RNAlater®-u (Ambion, Thermo Scientific, UK) na -80 °C do izolacije RNK. Ukupna RNK je izolovana iz ćelija korišćenjem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Nemačka) prema uputstvu proizvođača. Uklanjanje rezidualne genomske DNK je sprovedeno na kolonicama u toku izolacije RNK primenom DNase I RNase-free seta (Qiagen) prema uputstvu. Koncentracija RNK je određena neposredno nakon izolacije na aparatu Qubit® fluorimeter (Invitrogen, Thermo Scientific, SAD) korišćenjem Qubit™ RNA HS Assay Kit (Thermo Scientific) prema uputstvu proizvođača.

#### 3.2.7.2. Reverzna transkripcija (RT)

Ukupna RNK, 100 ng po reakciji, po uzorku, je reverzno transkribovana u jednolančanu cDNK korišćenjem High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®, Thermo Scientific) prema uputstvu, u termobloku aparata SureCycler8800 (Agilent Technologies, SAD). Reakcija RT se odvijala prema sledećem programu: 10 min na temperaturi 25°C, 120 min na temperaturi 37°C, 5 min na temperaturi 85°C i hlađenje na 4°C. Sintetisana cDNK je čuvana na -80 °C i kasnije korišćena kao matrica za određivanje relativne ekspresije gena.

#### 3.2.7.3. Reakcija lančane polimerizacije u realnom vremenu (Real-Time PCR)

Kvantitativna reakcija lančane polimerizacije u realnom vremenu (eng. *quantitative real time polymerase chain reaction* - Real-Time qPCR) je izvedena na qPCR aparatu Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies). Reakcije su pripremljene korišćenjem SYBR Fast Universal 2x qPCR Master Mix (Kapa Biosystems, SAD), prema uputstvu proizvođača. ROX boja je korišćena kao referentna boja. Korišćeni su gotovi (pre-dizajnirani) setovi prajmera (QuantiTect primer assay kits, Qiagen) za gene navedene u tabeli 1. Uslovi odvijanja qPCR reakcija su dati u tabeli 2. Specifičnost reakcija vezivanja prajmera je potvrđena analizom krive topljenja za svaku reakciju i vizuelizacijom produkata specifične dužine na elektroforeznom gelu.

**Tabela 1.** Prajmeri korišćeni u analizi ekspresije gena

Naziv gena (eng.)	Simbol	QuantiTect primer assay kit (eng.)	Detektovani transkripti	Dužina PCR produkta
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>GAPDH</i>	Hs_GAPDH_1_SG QuantiTect Primer Assay (QT00079247)	NM_001256799, NM_002046, NM_001289745, NM_001289746	95 bp
CD44 molecule	<i>CD44</i>	Hs_CD44_1_SG QuantiTect Primer Assay (QT00073549)	NM_000610, NM_001001389	100 bp
POU class 5 homeobox 1 (OCT4)	<i>POU5F1</i>	Hs_POU5F1_1_SG QuantiTect Primer Assay (QT00210840)	NM_001173531, NM_002701, NM_203289, NM_001285986, NM_001285987	77 bp
intercellular adhesion molecule 1	<i>ICAM1</i>	Hs_ICAM1_1_SG QuantiTect Primer Assay (QT00074900)	NM_000201	84 bp
bone gamma-carboxyglutamate protein (osteocalcin)	<i>BGLAP</i>	Hs_BGLAP_1_SG QuantiTect Primer Assay (QT00232771)	NM_199173	90 bp
runt related transcription factor 2	<i>RUNX2</i>	Hs_RUNX2_va.1_SG QuantiTect Primer Assay (QT00998102)	NM_004348	136 bp
delta like non-canonical Notch ligand 1 (Pref-1)	<i>DLK1</i>	Hs_DLK1_1_SG QuantiTect Primer Assay (QT00093128)	NM_001032997, NM_003836	136 bp
peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR-gamma)	<i>PPARG</i>	Hs_PPARG_1_SG QuantiTect Primer Assay (QT00029841)	NM_005037, NM_015869, NM_138711, NM_138712	113 bp
leptin	<i>LEP</i>	Hs_LEP_1_SG QuantiTect Primer Assay (QT00030261)	NM_000230	105 bp
adiponectin	<i>ADIPOQ</i>	Hs_ADIPOQ_1_SG QuantiTect Primer Assay (QT00014091)	NM_001177800, NM_004797	140 bp, 89 bp
uncoupling protein 1	<i>UCP1</i>	Hs_UCP1_3_SG QuantiTect Primer Assay (QT01848889)	NM_021833	101 bp
tumor necrosis factor	<i>TNF</i>	Hs_TNF_1_SG QuantiTect Primer Assay (QT00029162)	NM_000594	98 bp
interleukin 6	<i>IL6</i>	Hs_IL6_1_SG QuantiTect Primer Assay (QT00083720)	NM_000600	107 bp
interleukin 4	<i>IL4</i>	Hs_IL4_1_SG QuantiTect Primer Assay (QT00012565)	NM_000589, NM_172348	89 bp
interleukin 10	<i>IL10</i>	Hs_IL10_1_SG QuantiTect Primer Assay (QT00041685)	NM_000572	113 bp

**Tabela 2.** Program odvijanja qPCR reakcija

Faza	Temperatura	Trajanje	Broj ciklusa
Aktivacija enzima	95°C	3 minuta	1 ciklus
Denaturacija	95°C	10 sekundi	40 ciklusa
Vezivanje prajmera/elongacija*	60°C	30 sekundi*	
Disocijacija (kriva topljenja)	60 - 95°C	prema podešavanjima aparata	1 ciklus

\* sa očitavanjem rezultata

Ekspresija svakog gena od interesa je normalizovana ekspresijom *housekeeping* gena *GAPDH* u istom uzorku. Analiza relativne ekspresije gena je urađena primenom relativne metode kvantifikacije  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  opisanog od strane **Livak i Schmittgen (2001)** gde je  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(uzorak)} - \Delta Ct_{(kalibrator)}$ , a  $\Delta Ct = Ct_{(gen\ od\ interesa)} - Ct_{(housekeeping\ gen)}$  za svaki gen i uzorak kao i za referentnu RNK. Kao kalibrator za sve qPCR reakcije je korišćena humana referentna ukupna RNK (Human XpressRef Universal Total RNA, 338112, Qiagen).

### 3.2.8. Ispitivanje funkcijskog odgovora makrofaga na kondicionirane medijume LDSCs i ADSCs u sistemu indirektno ko-kulture *in vitro*

RAW 264.7 makrofagi su posađeni u sterilne ploče sa 96 otvora u gustini  $0,5 \times 10^4$  ćelija po otvoru u 100  $\mu$ l standardnog medijuma za kultivaciju ćelija DM (medijum DMEM kome je dodato 10% FBS, 2 mM glutamina i antibiotik-antimikotik rastvor). Nakon 24 h, po 100  $\mu$ l kondicioniranog medijuma LDSCs (LDSC-CM) ili ADSCs (ADSC-CM) je dodato ćelijama, tako da je konačno razblaženje kondicioniranih medijuma bilo 50%. Ćelije su kultivisane u LDSC-CM i ADSC-CM naredna dva dana, u standardnim uslovima, što je predstavljalo sistem indirektno ko-kulture *in vitro*. Kao kontrola, RAW 264.7 makrofagi su kultivisani u standardnom medijumu. Za procenu odgovora makrofaga na kondicionirane medijume urađeni su: MTT test, NBT test, *Neutral red uptake* (NRU) test i *Crystal violet* (CV) test. U svim testovima rezultati su predstavljeni kao procenat od kontrole koju su činile ćelije kultivisane u standardnom medijumu.

#### 3.2.8.1. MTT test

Nakon završene dvodnevne kultivacije makrofaga sa CM, medijumi u kojima su ćelije kultivisane su uklonjeni i stavljeno je 100  $\mu$ l rastvora MTT-a (3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Carl Roth) koncentracije 1 mg/ml u svaki otvor a ćelije

zatim inkubirane naredna 2 h na temperaturi 37 °C. Formirani kristali formazana, nastali kao proizvod aktivnosti mitohondrijalnih dehidrogenaza, rastvoreni su sa 100 µl 2-propanola (Thermo Fisher Scientific, SAD) po otvoru i apsorbanca dobijenih rastvora je očitavana na višekanalnom spektrofotometru na talasnoj dužini od 540 nm.

#### 3.2.8.2. NBT test

U NBT testu, 100 µl rastvora NBT-a (eng. *nitro blue tetrazolium chloride*, Sigma) koncentracije 1 mg/ml je stavljeno po otvoru sterilne ploče nakon vađenja medijuma i ćelije su inkubirane narednih 60 minuta na 37 °C. Formirani depoziti formazana, nastali kao rezultat prisustva superoksid anjon radikala u ćelijama, rastvoreni su sa 100 µl 10% natrijum-dodecil sulfata u 0,01 M hlorovodonične kiseline i apsorbanca dobijenih rastvora je očitavana spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 550 nm.

#### 3.2.8.3. Neutral red uptake (NRU) test

Pinocitozna aktivnost ćelija je analizirana primenom NRU testa. Nakon tretmana, ćelije su inkubirane u 100 µl rastvora *neutral red* (NR) boje (Sigma) koncentracije 0,1 mg/ml, u trajanju od 30 minuta na temperaturi 37 °C. Nakon toga, NR boja je rastvorena dodatkom 1% sirćetne kiseline u 50% etanolu i apsorbanca je očitavana na talasnoj dužini od 540 nm.

#### 3.2.8.4. Crystal violet test

Za određivanje broja ćelija, nakon fiksacije u metanolu, ćelije su bojene 0,1% rastvorom *Crystal violet* (CV) boje u trajanju od 10 min na ST. Boja je rastvorena sa 33% rastvorom sirćetne kiseline i spektrofotometrijski je izmerena apsorbanca na talasnoj dužini od 550 nm.

### 3.2.9. Ispitivanje imunomodulacijske aktivnosti kondicioniranih medijuma LDSCs i ADSCs

RAW 264.7 makrofagi su posađeni u ploče sa 24 otvora u gustini  $2,5 \times 10^4$  ćelija po otvoru. Nakon 24 h, jednak volumen LDSC-CM ili ADSC-CM je dodat ćelijama tako da je konačno razblaženje kondicioniranih medijuma bilo 50%. Makrofagi su kultivisani u kondicioniranim medijumima LDSCs i ADSCs narednih 48 h u standardnim uslovima, što je predstavljalo sistem indirektno ko-kulture. Kao pozitivna kontrola imunomodulacije, makrofagi su kultivisani u prisustvu 100 ng/ml lipopolisaharida (LPS) (LPS iz *Escherichia coli*



O111:B4, Sigma-Aldrich) (LPS-100 tretman), dok je negativnu kontrolu činila kultura makrofaga kultivisanih u standardnom medijumu. Kondicionirani medijumi makrofaga (RAW-CM) su nakon završenog perioda kultivacije čuvani na -80 °C do daljih analiza.

### 3.2.9.1. Analiza ekspresije gena u makrofagima

Za potrebe analize genske ekspresije, RAW 264.7 makrofagi kultivisani 48 h u LDSC-CM i ADSC-CM su nakon toga čuvani u RNeasy Lysis Buffer<sup>®</sup> u na -80 °C do izolacije RNK. Ukupna RNK je izolovana iz makrofaga korišćenjem RNeasy Mini Kit (Qiagen) prema uputstvu proizvođača. Tokom izolacije RNK, urađena je digestija rezidualne genomske DNK na kolonicama primenom DNase I RNase-free seta (Qiagen). Koncentracija RNK je određena odmah po izolaciji primenom Qubit<sup>™</sup> RNA HS Assay kit na aparatu Qubit<sup>®</sup> fluorimeter prema uputstvu proizvođača. Ukupna RNK (200 ng po reakciji po uzorku) je reverzno transkribovana u cDNK primenom High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Reakcija reverzne transkripcije je urađena u termobloku aparata SureCycler 8800 pri sledećim uslovima: 10 min na 25 °C, 120 min na 37 °C, 5 min na 85 °C i hlađenje na 4 °C. Sintetisana cDNK je korišćena za analizu ekspresije gena. Real-Time PCR reakcije su izvedene na aparatu Real Time thermal cycler Stratagene Mx3005P, a pripremljene su korišćenjem Luna<sup>®</sup> Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs, SAD). ROX boja je korišćena kao referentna boja. Korišćeni su gotovi (pre-dizajnirani) prajmer setovi (QuantiTect primer assay kits, Qiagen) za gene navedene u tabeli 3. Uslovi odvijanja qPCR reakcija su dati u tabeli 4. Specifičnost reakcija vezivanja prajmera je potvrđena analizom krive topljenja za svaku reakciju i vizuelizacijom produkata specifične dužine na elektroforeznom gelu. Ekspresija svakog gena od interesa je normalizovana ekspresijom *housekeeping* gena *Actb* u istom uzorku. Analiza relativne ekspresije gena je urađena primenom relativnog metoda kvantifikacije  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  opisanog od strane **Livak i Schmittgen (2001)** gde je  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(uzorak)} - \Delta Ct_{(kalibrator)}$ , a  $\Delta Ct = Ct_{(gen od interesa)} - Ct_{(housekeeping gen)}$  za svaki gen i uzorak kao i za referentnu RNK. Kao kalibrator za sve qPCR reakcije je korišćena mišja referentna ukupna RNK (Mouse XpressRef Universal Total RNA, 338114, Qiagen).

**Tabela 3.** Prajmeri korišćeni u analizi ekspresije gena u RAW 264.7 mišjim makrofagima

Naziv gena (eng.)	Simbol	QuantiTect primer assay kit	Detektovani transkripti	Dužina PCR produkta
beta-actin	<i>Actb</i>	Mm_Actb_2_SG QuantiTect Primer Assay (QT01136772)	NM_007393	77 bp
tumor necrosis factor	<i>Tnf</i>	Mm_Tnf_1_SG QuantiTect Primer Assay (QT00104006)	NM_013693, NM_001278601	112 bp
interleukin 10	<i>Il10</i>	Mm_Il10_1_SG QuantiTect Primer Assay (QT00106169)	NM_010548	103 bp

**Tabela 4.** Program odvijanja qPCR reakcija

Faza	Temperatura	Trajanje	Broj ciklusa
Aktivacija enzima	95°C	1 minut	1 ciklus
Denaturacija	95°C	15 sekundi	40 ciklusa
Vezivanje prajmera/elongacija*	60°C	30 sekundi	
Disocijacija (kriva topljenja)	60 - 95°C	prema podešavanjima aparata	1 ciklus

### 3.2.9.2. Analiza sekretornih produkata makrofaga

#### ELISA test

Produkcija citokina od strane makrofaga kultivisanih 48 h u kondicioniranim medijumima LDSCs i ADSCs, kao i kontrolama, merena je u supernatantima kondicioniranih medijuma makrofaga (RAW-CM) ELISA testovima. Koncentracija TNF- $\alpha$ , proinflamacijskog citokina, određivana je korišćenjem Mouse TNF-alpha Quantikine ELISA Kit (MTA00B, RnD systems, SAD), dok je koncentracija IL-10, anti-inflamacijskog citokina, određena korišćenjem Mouse IL-10 Quantikine ELISA Kit (M1000B, RnD systems). Oba testa su urađena prema uputstvu proizvođača kitova. Vrednosti su izražene kao pg TNF- $\alpha$  i IL-10 po mililitru.

#### Određivanje koncentracije azot oksida

Koncentracija azot oksida (eng. *nitric oxide* - NO) je određena u supernatantima kondicioniranih medijuma RAW 264.7 makrofaga kultivisanih 48 h u LDSC-CM ili ADSC-CM, kao i kontrolama, primenom *Griess*-ovog reagensa. U 100  $\mu$ L supernatanta je dodata jednaka količina *Griess*-ovog reagensa i onda inkubirano 10 minuta na ST. ApSORbanca je

očitavana na talasnoj dužini od 540 nm, a koncentracija NO je određena iz standardne krive natrijum nitrita koji je korišćen kao standard.

### L929 bioesej

Prisustvo proinflamacijskih citokina, kao što je TNF- $\alpha$ , u kondicioniranim medijumima RAW 264.7 makrofaga kultivisanih u LDSC-CM (RAW-CM-LDSC), ADSC-CM (RAW-CM-ADSC), LPS-100 (RAW-CM-L100) i standardnom medijumu (RAW-CM), određivano je i na osnovu procene citotoksičnosti kondicioniranih medijuma u L929 bioeseju. L929 ćelijska linija je najčešće korišćena linija u ove svrhe zbog velike osetljivosti na TNF- $\alpha$  koja rezultira ćelijskom smrću (Shiau i sar., 2001; Živković i sar., 2015). U L929 bioeseju je posađeno  $2 \times 10^4$  ćelija po otvoru sterilne ploče sa 96 otvora, (Greiner Bio-One) u standardnom medijumu i nakon 24 h su dodati kondicionirani medijumi makrofaga. L929 ćelije kultivisane u standardnom medijumu su korišćene kao kontrola. Nakon 24 h kultivacije, ćelije su mikroskopski analizirane i urađen je MTT test na već prethodno opisan način (poglavlje 3.2.8.1.).

### **3.2.10. Ispitivanje efekta kondicioniranih medijuma LDSCs i ADSCs na zarastanje rana na modelu indirektne ko-kulture *in vitro***

Da bi se ispitao potencijalni efekat kondicioniranih medijuma LDSCs i ADSCs na zarastanje rana u uslovima *in vitro* i sposobnost migracije fibroblasta, urađen je *Scratch* test. L929 fibroblasti su posađeni u sterilne ploče sa 48 otvora (Greiner Bio-One) i kultivisani u standardnim uslovima do dostizanja konfluentnosti nakon čega je napravljena ogrebotina (*scratch* ili „rana“) u ćelijskom monosloju. Nakon toga su dodati kondicionirani medijumi ćelija, LDSC-CM ili ADSC-CM, u razblaženju 50% i nastavljena je kultivacija naredna tri dana u standardnim uslovima. Kao pozitivna kontrola je korišćen standardni medijum za kultivaciju ćelija (DMEM kome su dodati 10% FBS, 2 mM glutamin i antibiotik-antimikotik rastvor), dok je kao negativna kontrola korišćen isti osnovni medijum, ali bez FBS. Svaki uzorak je testiran u tetraplikatu. Nakon tri dana kultivacije, migracija fibroblasta i zatvaranje ogrebotine („rane“) su analizirani na invertnom svetlosnom mikroskopu Axio Observer. Z1, a morfometrija je rađena nakon fotografisanja ćelija u programu ZEN 2 (*blue edition*). Analizirano je i mereno nekoliko parametara: 1) zona migracije ćelija – određena merenjem zone rasta i migracije ćelija od početne ivice ogrebotine prema unutrašnjosti ogrebotine; 2) širina ogrebotine nakon tri dana kultivacije u kondicioniranim medijumima i kontrolama; i 3)

procenat zatvaranja, tj. smanjenja širine ogrebotine – određen izračunavanjem odnosa između širine ogrebotine nakon tri dana kultivacije u različitim medijumima i početne širine neposredno nakon pravljenja ogrebotine u ćelijskom monosloju.

### 3.3. METODI ANALIZE TKIVA

#### 3.3.1. Analiza ekspresije gena u tkivu

##### 3.3.1.1. Izolacija ukupne RNK

Deo uzoraka tkiva lipoma i scWAT je čuvan u RNAlater® na -80 °C do izolacije RNK. Ukupna RNK je izolovana iz tkiva korišćenjem RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) prema uputstvu proizvođača, nakon homogenizacije tkiva u TRIzol reagensu (Qiagen), korišćenjem tkivnog homogenizatora (TH220, Omni international, SAD). Uklanjanje rezidualne genomske DNK je sprovedeno na kolonicama u toku izolacije RNK primenom DNase I RNase-free seta (Qiagen) prema uputstvu proizvođača. Koncentracija RNK je određena neposredno nakon izolacije na aparatu Qubit® fluorimeter (Invitrogen) korišćenjem Qubit™ RNA BR Assay Kit (Thermo Scientific) prema uputstvu proizvođača.

##### 3.3.1.2. Reverzna transkripcija

Ukupna RNK, 400 ng po reakciji, po uzorku, je reverzno transkribovana u jednolančanu cDNK korišćenjem High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) prema uputstvu, u termobloku aparata SureCycler8800 (Agilent Technologies). Reakcija reverzne transkripcije se odvijala prema sledećem programu: 10 min na temperaturi 25 °C, 120 min na temperaturi 37°C, 5 min na temperaturi 85°C i hlađenje na 4°C. Sintetisana cDNK je čuvana na -80 °C i kasnije korišćena za određivanje relativne ekspresije gena.

##### 3.3.1.3. Real-Time PCR

Analiza relativne ekspresije gena u tkivu je izvršena primenom Real-Time qPCR metode na aparatima Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies) i Mic qPCR cycler (Bio Molecular Systems, Australija). Reakcije su pripremljene korišćenjem SYBR Fast Universal 2x qPCR Master Mix (Kapa Biosystems) i Luna® Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs) prema uputstvima proizvođača. ROX boja je korišćena kao referentna

boja. Korišćeni su gotovi (pre-dizajnirani) setovi prajmera (QuantiTect primer assay kits, Qiagen) za gene navedene u tabeli 1 (sve osim *IL4*, *IL6* i *ICAM1*). Uslovi odvijanja qPCR reakcija su dati u tabelama 2 i 4. Specifičnost reakcija vezivanja prajmera je potvrđena analizom krive topljenja za svaku reakciju i vizuelizacijom produkata specifične dužine na elektroforeznom gelu. Ekspresija svakog gena od interesa je normalizovana ekspresijom *housekeeping* gena *GAPDH* u istom uzorku. Nivo ekspresije gena u tkivima je analiziran primenom relativnog metoda kvantifikacije  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  opisanog od strane **Livak i Schmittgen (2001)**, gde je  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(uzorak)} - \Delta Ct_{(kalibrator)}$ , a  $\Delta Ct = Ct_{(gen\ od\ interesa)} - Ct_{(housekeeping\ gen)}$  za svaki gen i uzorak kao i za referentnu RNK. Kao kalibrator za sve qPCR reakcije je korišćena humana referentna ukupna RNK (Human XpressRef Universal Total RNA, 338112, Qiagen).

### 3.3.2. Mikroskopska analiza tkiva

#### 3.3.2.1. Svetlosna mikroskopija

##### Priprema tkiva

Deo analiziranih tkiva lipoma i scWAT je po uzorkovanju fiksiran u 10% NBF. Nakon ispiranja u česmenskoj vodi, dehidratacije kroz seriju etanola rastućih koncentracija i prosvetljivanja u ksilolu, tkivo je ukalupljeno u paraplast sa tačkom topljenja 52 – 54 °C. Parafinski kalupi tkiva su sečeni na polu-automatskom rotacionom mikrotomu CUT 5062 (SLEE Medical, Nemačka) na preseke debljine 5 µm i montirani na pločice SuperFrost Plus (Thermo Scientific, SAD).

##### Histološki metodi bojenja

Parafinski preseki tkiva su bojeni standardnom hematoksilin-eozin (H&E) metodom bojenja i toluidin plavim (eng. *toluidine blue* - TB). U H&E metodi bojenja, parafinski preseki tkiva debljine 5 µm su nakon deparafinizacije i rehidratacije obojeni Majerovim hematoksilinom i vodenim eozinom, a zatim dehidratirani i montirani u DPX. U TB metodi bojenja, aralditski preseki tkiva debljine 1 µm su obojeni 1% rastvorom TB u 1% rastvoru natrijum tetraborata, uz zagrevanje na grejnoj ploči 2-3 minuta, nakon čega su preseki isprani u česmenskoj vodi, osušeni i montirani u DPX. Ovako dobijeni polutanki aralditski preseki su korišćeni za analizu na nivou svetlosne mikroskopije i određivanje regiona sečenja za ultrastrukturnu analizu na nivou elektronske mikroskopije.

### Imunohistohemija

Za potrebe imunohistohemijske analize su korišćeni parafinski preseći debljine 5  $\mu\text{m}$ , koji su deparafinirani i rehidratirani na već opisan način, kao i aralditski preseći debljine 2  $\mu\text{m}$  koji su za potrebe ove analize podvrgnuti proceduri uklanjanja smole u 1% rastvoru natrijum etoksida (1% natrijum hidroksid u 100% etanolu), u trajanju od 30 minuta na 40  $^{\circ}\text{C}$ , a zatim rehidratirani. U cilju toplotom indukovano otkrivanja (demaskiranja) antigena svi preseći su inkubirani u 10 mM citratnom puferu (pH = 6,1) na 600 W u mikrotalasnoj pećnici u trajanju od 5 do 10 minuta ili u vodenom kupatilu na 96  $^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 15 minuta, a zatim ohlađeni i isprani 2 puta u PBS-u. Nakon toga je urađeno blokiranje endogene peroksidaze i nespecifičnog vezivanja proteina, a zatim su preseći inkubirani sa primarnim neobebeženim antitelima preko noći na 4  $^{\circ}\text{C}$  u vlažnoj komori. Spisak korišćenih primarnih antitela je dat u tabeli 5. Detekcija specifičnog vezivanja antitela je izvršena primenom HRP/DAB kita za detekciju (ab64259 i ab64261, Abcam), koji sadrži sekundarna antitela i DAB hromogen, prema uputstvima proizvođača. Preseći tkiva su kontrastirani Majerovim hematoksilinom, dehidratirani i montirani u DPX, a zatim analizirani i snimani na svetlosnim mikroskopima Leica DMLS i Leica DMLB (Leica, Nemačka).

**Tabela 5.** Primarna neobebežena antitela korišćena za imunohistohemijsku analizu

Antigen	Kataloški broj antitela	Klonalnost	Poreklo	Proizvođač	Razblaženje
Adiponektin	ab22554	monoklonsko [19F1]	mišje	Abcam, UK	1:250 (v:v)
Leptin	ab3583	poliklonsko	zečje	Abcam, UK	1:100 (v:v)
Leptin receptor	ab5593	poliklonsko	zečje	Abcam, UK	1:500 (v:v)
PRDM16	ab106410	poliklonsko	zečje	Abcam, UK	1:50 (v:v)
Mitofuzin 1	ab57602	monoklonsko [3C9]	mišje	Abcam, UK	1:100 (v:v)
CD163	ab87099	poliklonsko	zečje	Abcam, UK	1:100 (v:v)
CD40	PAB249Hu01	poliklonsko	zečje	Cloud-Clone Corp., USA	1:100 (v:v)

### Histomorfometrijska analiza

Histomorfometrijska analiza tkiva je rađena sa parafinskim presecima bojenim H&E metodom u programu ImageJ (National Institute of Health, SAD) nakon fotografisanja na svetlosnom mikroskopu Leica DMLS sa kamerom AxioCam 105 color (Carl Zeiss). Mereni

su sledeći parametri: površina adipocita ( $\mu\text{m}^2$ ), obim adipocita ( $\mu\text{m}$ ) i dijametar adipocita ( $\mu\text{m}$ ), a računat je i broj adipocita na ukupnoj izmerenoj površini svih adipocita na preparatu i izražen po  $\text{mm}^2$ .

### 3.3.2.2. Elektronska mikroskopija

#### Priprema tkiva

Delovi tkiva lipoma i scWAT veličine oko  $1 \text{ mm}^3$  su nakon uzorkovanja podvrgnuti fiksaciji u 2,5% rastvoru glutaraldehida, u 0,2 M fosfatnom puferu (eng. *phosphate buffer* – PB), preko noći na  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nakon ispiranja u PB, izvršena je postfiksacija u 2% rastvoru osmijum-tetraoksida ( $\text{OsO}_4$ ) u istom puferu. Uzorci su zatim dehidratirani serijom etanola rastućih koncentracija, prosvetljeni u propilen-oksidu i ukalupljeni u epoksidnoj smoli Araldit (Fluka, Nemačka) na temperaturi od  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , u trajanju od 72 h.

#### Ultrastrukturalna analiza tkiva

Aralditski kalupi tkiva su za potrebe analize na transmisionom elektronskom mikroskopu (TEM) sečeni dijamantskim nožem (Diatome, Švajcarska) na tanke preseke debljine 70 nm, na ultramikrotomu UC6 (Leica Microsystems, Nemačka). Preseci su montirani na bakarne ili bakar-paladijumske mrežice, kontrastirani uranil acetatom i olovo citratom u aparatu EM Stain (Leica Microsystems, Nemačka), a zatim posmatrani i snimani na transmisionom elektronskom mikroskopu CM12 (Philips/FEI, Holandija), opremljenom digitalnom kamerom SIS MegaView III (Olympus Soft Imaging Solutions, Nemačka).

### 3.3.3. Fizičko-hemijska analiza tkiva

#### 3.3.3.1. Određivanje ukupnih proteina, RNK i DNK u tkivima

Iz zamrznutih uzoraka lipoma i masnog tkiva izolovani su ukupni proteini, ukupna RNK i DNK korišćenjem Universal DNA/RNA/Protein Purification Kit (EURx, Poljska) po uputstvu proizvođača. Koncentracije proteina, RNK i DNK su izmerene neposredno nakon izolacije na aparatu Qubit® Fluorometer primenom odgovarajućih kitova: Qubit® Protein Assay Kit (0,25–5  $\mu\text{g}$ ), Qubit® RNA BR Assay Kit (20–1,000 ng) i Qubit® dsDNA BR Assay Kit (2–1,000 ng) (svi od Thermo Scientific) prema uputstvu

proizvođača. Količina proteina, RNK i DNK je zatim izražena na 100 mg tkiva za svaki uzorak.

### 3.3.3.2. Određivanje ukupnih lipida u tkivu

Određivanje ukupnih lipida u tkivu je vršeno gravimetrijskom metodom nakon ekstrakcije lipida iz tkiva. Ukupni lipidi iz tkiva su ekstrahovani mešavinom rastvarača hloroform:metanol u odnosu 2:1 (v:v), a zatim je dodat fiziološki rastvor u konačnom zapreminskom odnosu 2:1:0,8 (hloroform:metanol:fiziološki rastvor). Nakon razdvajanja faza centrifugiranjem na 4000  $\times g$  (Eppendorf 5417R, Nemačka) na 4 °C, hloroformska faza, koja sadrži rastvorene lipide, uparena je u prisustvu azota uz zagrevanje uzoraka na 40 °C. Nakon uparavanja je izmeren uljani ostatak, a količina ukupnih lipida (masa ostatka nakon uparavanja) je izražena na 100 mg tkiva.

### 3.3.3.3. Ramanska spektroskopija

Fizičko-hemijska karakterizacija lipoma i masnog tkiva je vršena metodom Ramanske spektroskopije. Ramanski spektri zamrznutih uzoraka lipoma i masnog tkiva su snimljeni na konfokalnom Raman mikroskopu XploRA (HORIBA, Japan) sa CCD detektorom, sa vazdušno hlađenim laserom ekscitacione talasne dužine 532 nm i korišćenjem objektiva 50x LWD. Za svaki uzorak je snimljeno 6 do 8 pojedinačnih Ramanskih spektara na različitim mestima po uzorku tkiva, u spektralnom opsegu od 200 do 3400  $\text{cm}^{-1}$ . Korekcija i analiza Ramanskih spektara je izvršena u programu LabSpec 6 (HORIBA Scientific) i analizirane su karakteristične spektralne trake (pomeraji) za masno tkivo u opsegu 600 do 3200  $\text{cm}^{-1}$ .

## 3.4. STATISTIČKA OBRADA DOBIJENIH REZULTATA

Svi rezultati dobijeni kvantitativnim metodama su statistički obrađeni. Kao pokazatelji centralne tendencije računati su aritmetička sredina (AS) i medijana, a kao pokazatelj varijabilnosti je računata standardna devijacija (SD). Deo rezultata predstavljen je u vidu tačkastih XY grafikona (eng. *scatter plots*) sa medijanom za koje su šabloni preuzeti iz rada **Weissgerber i sar. (2015)**, ili su grafikoni napravljeni u programu GraphPad Prism 5, dok su ostali rezultati predstavljeni stubičastim grafikonima sa AS i SD. Statistička značajnost između različitih grupa uzoraka je analizirana primenom ANOVA (eng. *analysis of variance*) testa i Mann–Whitney U testa. Za statistički značajne smatrane su vrednosti  $p < 0,05$ .



## **4. REZULTATI**

#### 4.1. KARAKTERISTIKE PACIJENATA I LOKALIZACIJA TKIVA

U tabeli 6 su date karakteristike pacijenata uključenih u istraživanje. U obe grupe prosečna životna dob pacijenata je bila vrlo slična. Anatomske lokalizacije sa kojih su uzimana tkiva za analize su prikazane u tabeli 7 (lipomi) i u tabeli 8 (scWAT).

**Tabela 6.** Dobna i polna struktura pacijenata.

Grupa	Broj pacijenata		Životna dob pacijenata					
	mušk.	žene	AS ± SD			mediana		
			svi	mušk.	žene	svi	mušk.	žene
Lipomi	26	24	51,56 ± 14,36	52,69 ± 16,22	50,33 ± 12,26	50	53	47
scWAT	16	24	50,1 ± 15,25	51,44 ± 17,34	49,21 ± 14,01	47	47	47,5

*AS – aritmetička sredina, SD – standardna devijacija*

**Tabela 7.** Lokalizacije analiziranih lipoma.

Lokalizacija na telu	Broj uzoraka ukupno	Broj uzoraka po polu
Glava	6	muškarcima: 4 žene: 2
Usna duplja	1	muškarcima: 1 žene: 0
Vrat	10	muškarcima: 10 žene: 0
Ruka - nadlaktica	7	muškarcima: 2 žene: 5
Ruka - podlaktica	6	muškarcima: 4 žene: 2
Stomak	3	muškarcima: 2 žene: 1
Leđa	11	muškarcima: 1 žene: 10
Noga - nadkolenica	3	muškarcima: 1 žene: 2
Noga - podkolenica	1	muškarcima: 0 žene: 1
Prepone	1	muškarcima: 1 žene: 0
Medijastinum	1	muškarcima: 0 žene: 1

Kod muškaraca se lipomi češće javljaju na delovima tela kao što su glava, vrat i podlakti deo ruke dok su kod žena dominantni lipomi na leđima i nadlaktinom delu ruke (Tabela 7).

**Tabela 8.** Lokalizacije na telu sa kojih su uzeti uzorci masnog tkiva (scWAT) za analizu.

Lokalizacija na telu	Broj uzoraka ukupno	Broj uzoraka po polu
Vrat	1	muškarci: 0 žene: 1
Ruka - nadlaktica	1	muškarci: 0 žene: 1
Ruka - podlaktica	1	muškarci: 1 žene: 0
Stomak	15	muškarci: 6 žene: 9
Leđa	3	muškarci: 1 žene: 2
Kuk	11	muškarci: 4 žene: 7
Noga - nadkolenica	5	muškarci: 3 žene: 2
Prepone	1	muškarci: 1 žene: 0
Koleni	2	muškarci: 0 žene: 2

U tabeli 9 je prikazan broj analiziranih lipoma po tipu lipoma kao i polu ispitanika.

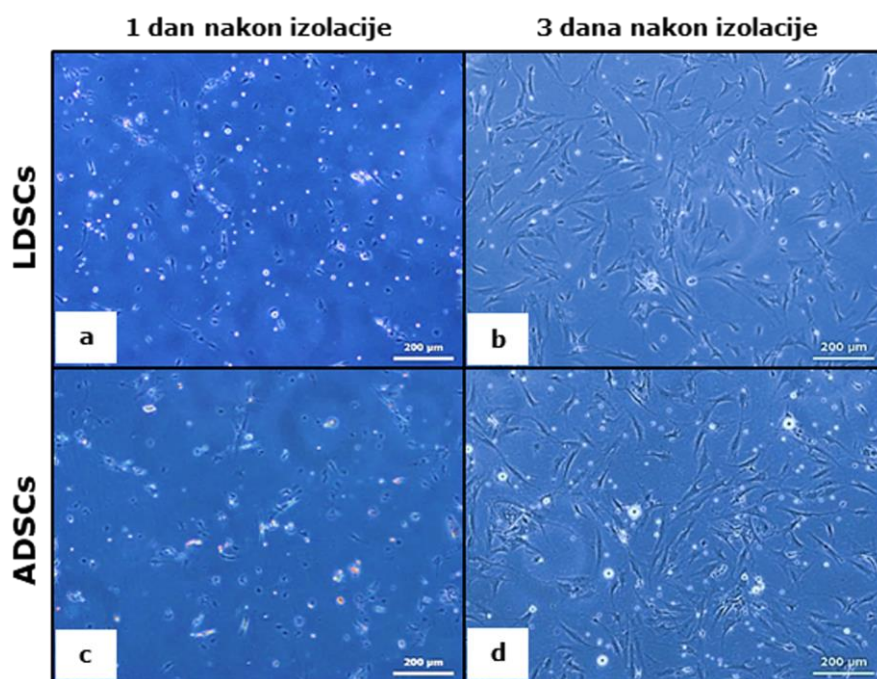
**Tabela 9.** Tip lipoma.

Tip lipoma	Broj uzoraka ukupno	Broj uzoraka po polu
Solitarni	43	muškarci: 19 žene: 24
Multipla generalizovana lipomatoza	7	muškarci: 7 žene: 0

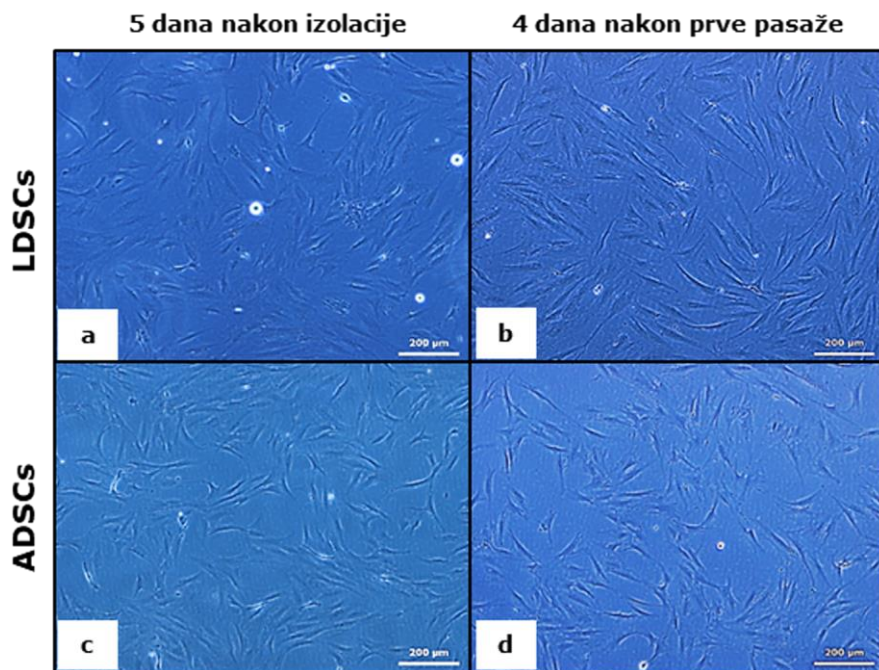
U analiziranoj grupi pacijenata sa multiplom generalizovanom lipomatozom, prikazanoj u tabeli 9, možemo uočiti da je multipla generalizovana lipomatoza prisutna samo kod osoba muškog pola, dok su solitarni lipomi zastupljeni kod osoba oba pola.

## 4.2. MORFOLOŠKE I MOLEKULARNE KARAKTERISTIKE IZOLOVANIH MEZENHIMSKIH MATIČNIH ĆELIJA U KULTURI

Na Slikama 6 i 7, prikazan je izgled LDSCs i ADSCs u kulturi jedan (Slika 6a, c), tri (Slika 6b, d) i pet (Slika 7a, c) dana nakon izolacije ćelija kao i četiri dana nakon prve pasaže ćelija (P1) (Slika 7b, d). Ćelije su vretenastog oblika i izgleda tipičnog za mezenhimske matične ćelije. Nisu uočene značajnije razlike u morfologiji LDSCs (Slika 6a, b i Slika 7a, b) i ADSCs (Slika 6c, d i Slika 7c, d) u posmatranim vremenskim periodima. Nije uočena značajna razlika u proliferativnom potencijalu između LDSCs i ADSCs tokom kultivacije u standardnim *in vitro* uslovima.

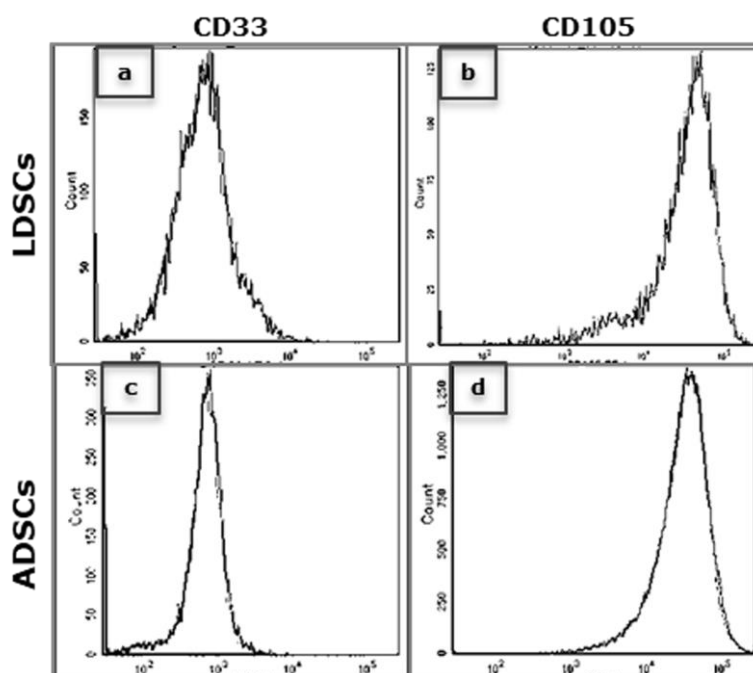


**Slika 6.** Morfologija LDSCs (a, b) i ADSCs (c, d) u kulturi jedan (a, c) i tri (b, d) dana nakon izolacije ćelija; fazni kontrast, objektiv uveličanja 10x; ćelije su tipičnog izgleda za mezenhimske matične ćelije.



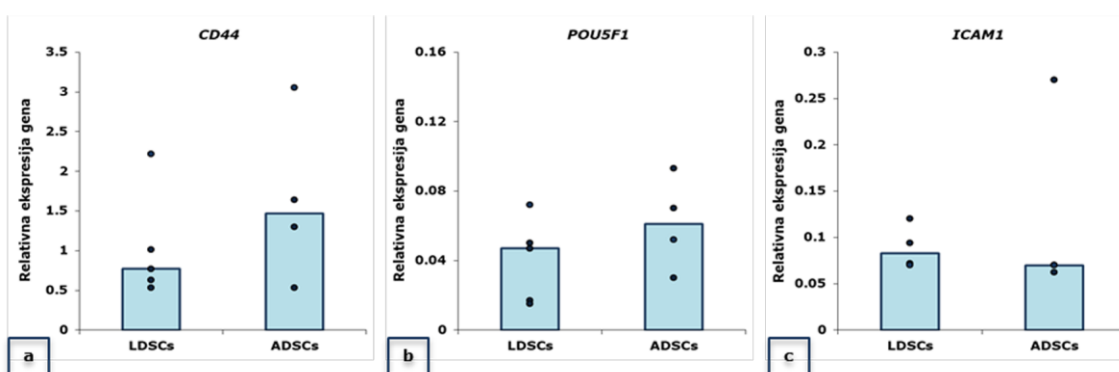
**Slika 7.** Morfologija LDSCs (a, b) i ADSCs (c, d) u kulturi pet dana nakon izolacije ćelija (a, c) kao i četiri dana nakon prve pasaže (b, d); fazni kontrast, objektiv uveličanja 10x; ćelije su tipičnog izgleda za mezenhimske matične ćelije.

Rezultati analize površinskih markera MSCs protočnom citometrijom su prikazani na Slici 8. Uočena je jaka ekspresija pozitivnog MSCs markera CD105 i u LDSCs (Slika 8b) i u ADSCs (Slika 8d) neposredno pre diferencijacije ćelija (P2). Ekspresija negativnog MSCs markera CD33 je veoma slaba (Slika 8a, c), što zajedno sa jakom ekspresijom CD105 upućuje na to da su LDSCs i ADSCs u našem istraživanju imale fenotip karakterističan za MSCs.



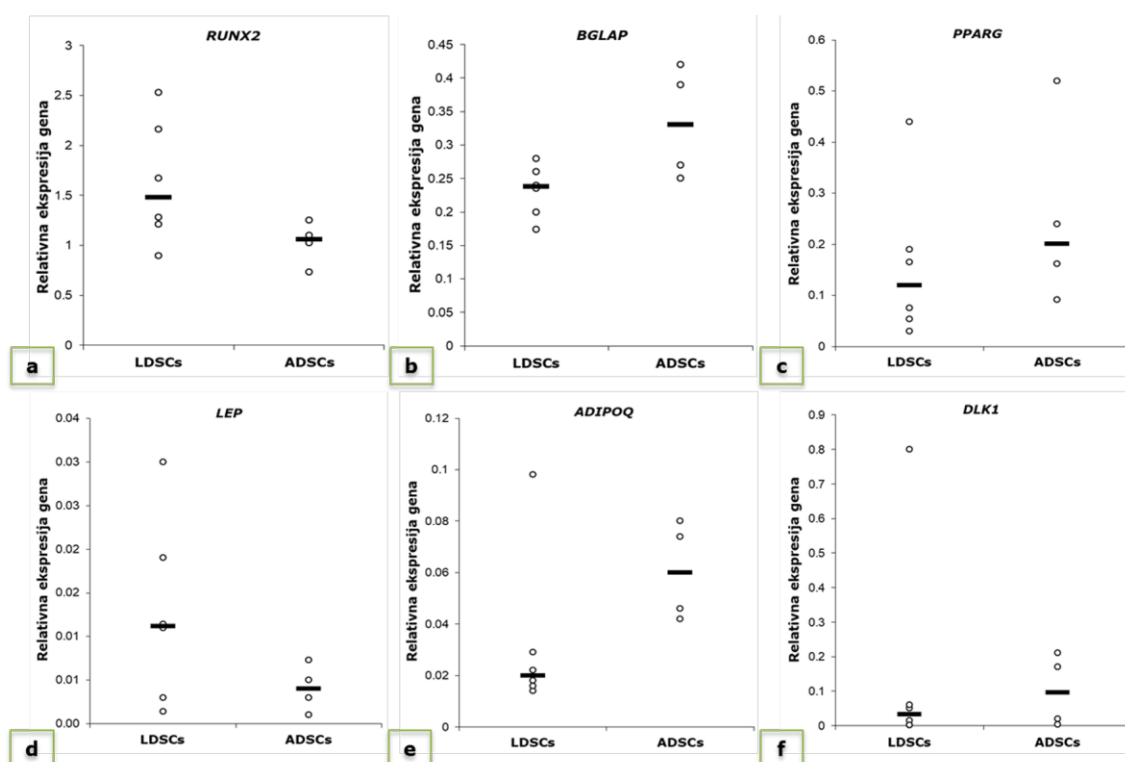
**Slika 8.** Ekspresija površinskih markera CD105 (b, d) i CD33 (a, c) u LDSCs (a, b) i ADSCs (c, d) drugog pasaža, analizirana primenom protočne citometrije; reprezentativni histogrami za oba tipa ćelija.

Analiza ekspresije *CD44* (Grafik 1a) i *POU5F1* (Grafik 1b) gena, markera matičnih ćelija pokazala je da i LDSCs i ADSCs ekspimiraju ove gene na drugoj pasaži. Nešto viša ekspresija ovih gena, ali ne statistički značajna, uočena je u ADSCs u odnosu na LDSCs. Oba tipa ćelija ekspimiraju *ICAM1* (Grafik 1c), međutim, nešto viša ekspresija, iako ne statistički značajno, uočena je u LDSCs.



**Grafik 1.** Ekspresija gena markera MSCs: *CD44* (a), *POU5F1* (b) i *ICAM1* (c) u LDSCs i ADSCs drugog pasaža (dan 0 u esejima diferencijacije); rezultati su predstavljeni u vidu tačkastih grafikona sa medijanom gde svaka tačka predstavlja jednu kulturu ćelija poreklom od jednog pacijenta; veličina uzorka za *CD44* i *POU5F1*:  $n(\text{LDSCs}) = 5$  i  $n(\text{ADSCs}) = 4$  a za *ICAM1*:  $n(\text{LDSCs}) = 4$  i  $n(\text{ADSCs}) = 4$  ( $n$  – broj pacijenata po grupi).

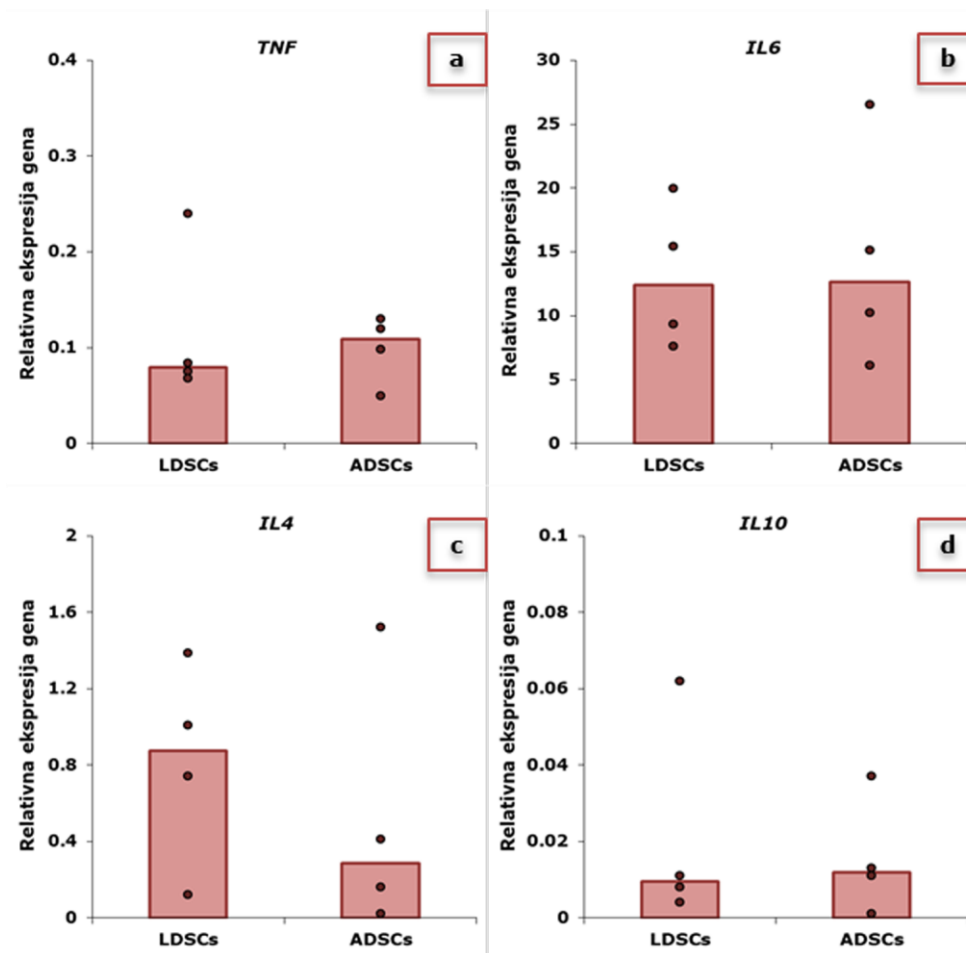
Nivo ekspresije gena markera osteogeneze (*RUNX2* i *BGLAP*) i adipogeneze (*ADIPOQ*, *LEP*, *PPARG* i *DLK1*) je analiziran u LDSCs i ADSCs drugog pasaža (Grafik 2), pre diferencijacije (dan 0 u adipogenoj i osteogenoj diferencijaciji), kako bi se odredio nivo transkripcije ovih gena koji predstavlja startni potencijal ćelija za adipogenu i osteogenu diferencijaciju. Uočene su razlike u ekspresiji ovih gena između LDSCs i ADSCs, ali su te razlike statistički značajne samo za *RUNX2* i *BGLAP*, pri čemu je ekspresija *RUNX2* viša u LDSCs u odnosu na ADSCs, dok je ekspresija *BGLAP* viša u ADSCs u odnosu na LDSCs ( $p < 0,05$  za oba gena).



**Grafik 2.** Relativna ekspresija gena *RUNX2* (a), *BGLAP* (b), *PPARG* (c), *LEP* (d), *ADIPOQ* (e) i *DLK1* (f) u LDSCs i ADSCs drugog pasaža (dan 0 u diferencijaciji); rezultati su predstavljani u vidu tačkastih grafikona sa medijanom gde svaka tačka predstavlja jednu kulturu ćelija poreklom od jednog pacijenta; veličina uzorka:  $n(\text{LDSCs}) = 6$  i  $n(\text{ADSCs}) = 4$  za sve gene ( $n$  – broj pacijenata po grupi); značajne razlike su dobijene za *RUNX2* i *BGLAP* ( $p < 0,05$ ).

Analizirana je relativna ekspresija gena za proinflamacijske (*TNF* i *IL6*) i anti-inflamacijske (*IL4* i *IL10*) citokine u LDSCs i ADSCs drugog pasaža i rezultati su prikazani na Grafiku 3. Može se uočiti sličan nivo ekspresije *TNF* (Grafik 3a), *IL6* (Grafik 3b), *IL4* (Grafik 3c) i *IL10* (Grafik 3d) u LDSCs i ADSCs, ali i velika heterogenost u okviru grupa.

Zabeležena je nešto viša ekspresija *IL4* i niža ekspresija *TNF* u LDSCs u odnosu na ADSCs, ali razlike nisu statistički značajne.



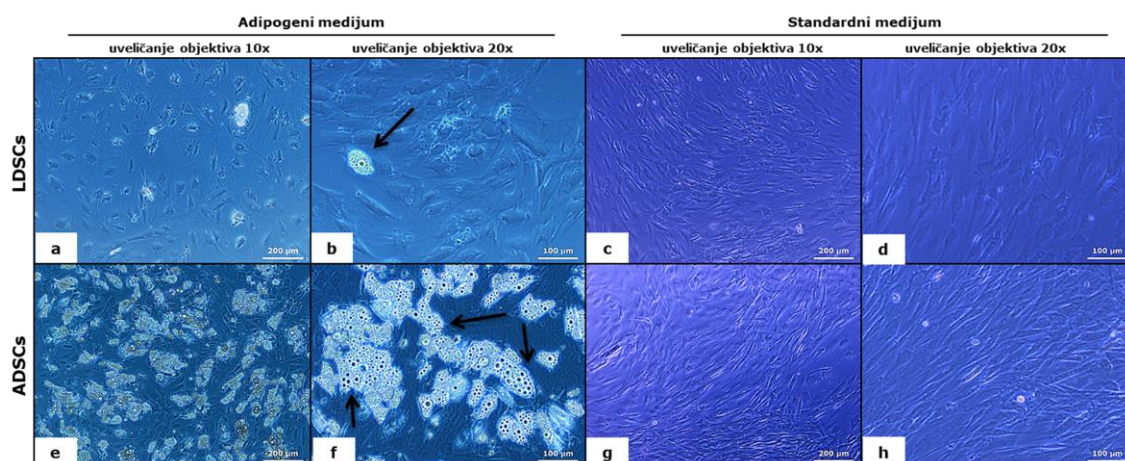
**Grafik 3.** Relativna ekspresija gena *TNF* (a), *IL6* (b), *IL4* (c) i *IL10* (d) u LDSCs i ADSCs drugog pasaža; rezultati su predstavljeni u vidu tačkastih grafikona sa medijanom gde svaka tačka predstavlja jednu kulturu ćelija poreklom od jednog pacijenta; veličina uzorka:  $n(\text{LDSCs}) = 4$  i  $n(\text{ADSCs}) = 4$  za sve gene ( $n$  – broj pacijenata u grupi).



### 4.3. DIFERENCIJACIJA ĆELIJA U KULTURI

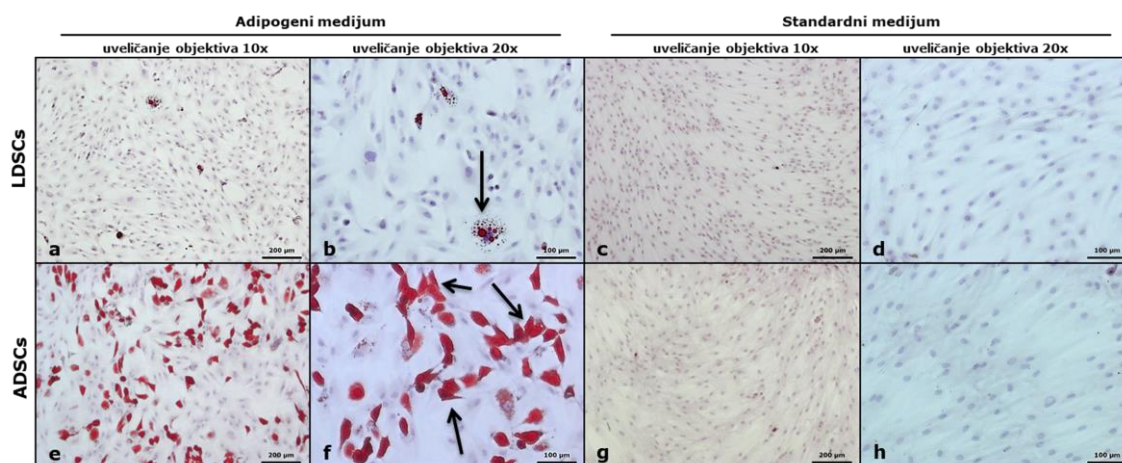
#### 4.3.1. Adipogena diferencijacija

Stepen adipogene diferencijacije LDSCs i ADSCs je analiziran nakon kultivacije ćelija u adipogenom medijumu (AM) u trajanju od 21 dan. Kao kontrola, ćelije su kultivisane u standardnom medijumu (DM) pod istim uslovima. Karakterističan fenotip nalik adipocitima i prisustvo citoplazmatskih lipidnih tela je uočeno u LDSCs (Slika 9a, b) i ADSCs (Slika 9e, f) nakon 21 dan diferencijacije. Značajno više lipidnih tela je bilo prisutno u ADSCs u odnosu na LDSCs, što ukazuje na veći adipogeni potencijal ADSCs u odnosu na LDSCs. Promene u morfologiji ćelija, od mezenhimskog do epitelnog tipa, koja je karakteristična za adipocite, primećena je i u LDSCs i u ADSCs. Ćelije kultivisane u medijumu DM su zadržale mezenhimsko-fibroblastni oblik, koji je vrlo sličan i u kulturama LDSCs (Slika 9c, d) i ADSCs (Slika 9g, h).

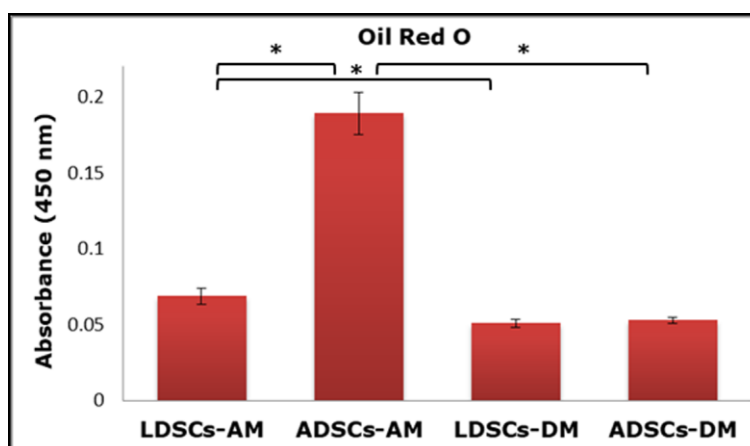


**Slika 9.** Mikroskopski izgled ćelija nakon 21 dan adipogene diferencijacije; LDSCs u adipogenom medijumu (AM) (a, b), LDSCs u standardnom medijumu (DM) (c, d), ADSCs u AM medijumu (e, f) i ADSCs u DM medijumu (g, h); fazni kontrast sa objektivom uveličanja 10x (a, c, e, g) i 20x (b, d, f, h); strelice pokazuju zrele adipocite.

Nakon 21 dan adipogene diferencijacije, akumulacija lipida u ćelijama je potvrđena *Oil red O* bojenjem (Slika 10). Značajno više lipida je bilo akumulirano u ADSCs nego u LDSCs u AM medijumu što je potvrđeno i kvantifikacijom *Oil red O* boje (Grafik 4).



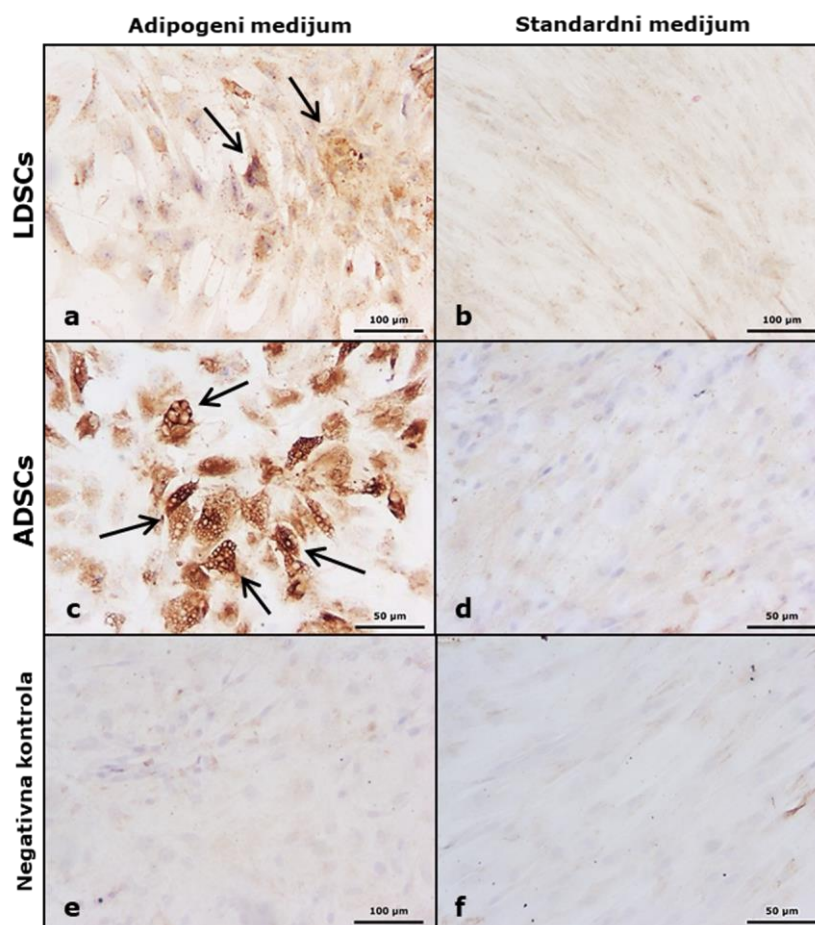
**Slika 10.** Izgled kultura ćelija bojenih *Oil red O* metodom nakon 21 dan adipogene diferencijacije; LDSCs u adipogenom medijumu (AM) (a, b), LDSCs u standardnom medijumu (DM) (c, d), ADSCs u AM medijumu (e, f) i ADSCs u DM medijumu (g, h); *bright field*, objektiv uveličanja 10x (a, c, e, g) i 20x (b, d, f, h); strelice pokazuju akumulaciju lipida u ćelijama.



**Grafik 4.** Intenzitet *Oil red O* boje u ćelijama određen spektrofotometrijski nakon 21 dan adipogene diferencijacije; rezultati predstavljeni kao aritmetička sredina (AS)  $\pm$  standardna devijacija (SD),  $n = 4$  za sve grupe; (\*)  $p < 0,05$ .

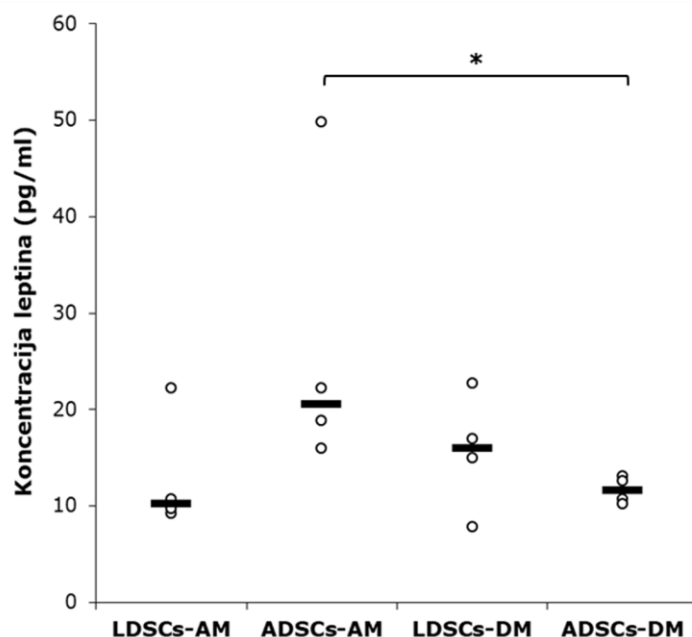
Imunocitohemijsko bojenje ćelija na adiponektin, nakon 21 dan adipogene diferencijacije LDSCs i ADSCs prikazano je na Slici 11. Iako su i LDSCs i ADSCs pozitivne na adiponektin, znatno jača imunoekspresija adiponektina je uočena u ADSCs (Slika 11c) nego u LDSCs (Slika 11a), što zajedno sa *Oil red O* bojenjem ukazuje na veći adipogeni potencijal ADSCs u odnosu na LDSCs. LDSCs i ADSCs kultivisane 21 dan u medijumu DM su bile negativne na adiponektin (Slika 11b, d), što isključuje mogućnost

spontane adipogeneze u ćelijama. Nespecifično bojenje nije bilo prisutno, što je pokazano kontrolnim bojenjem u kojem je izostavljeno primarno antitelo (Slika 11e, f).



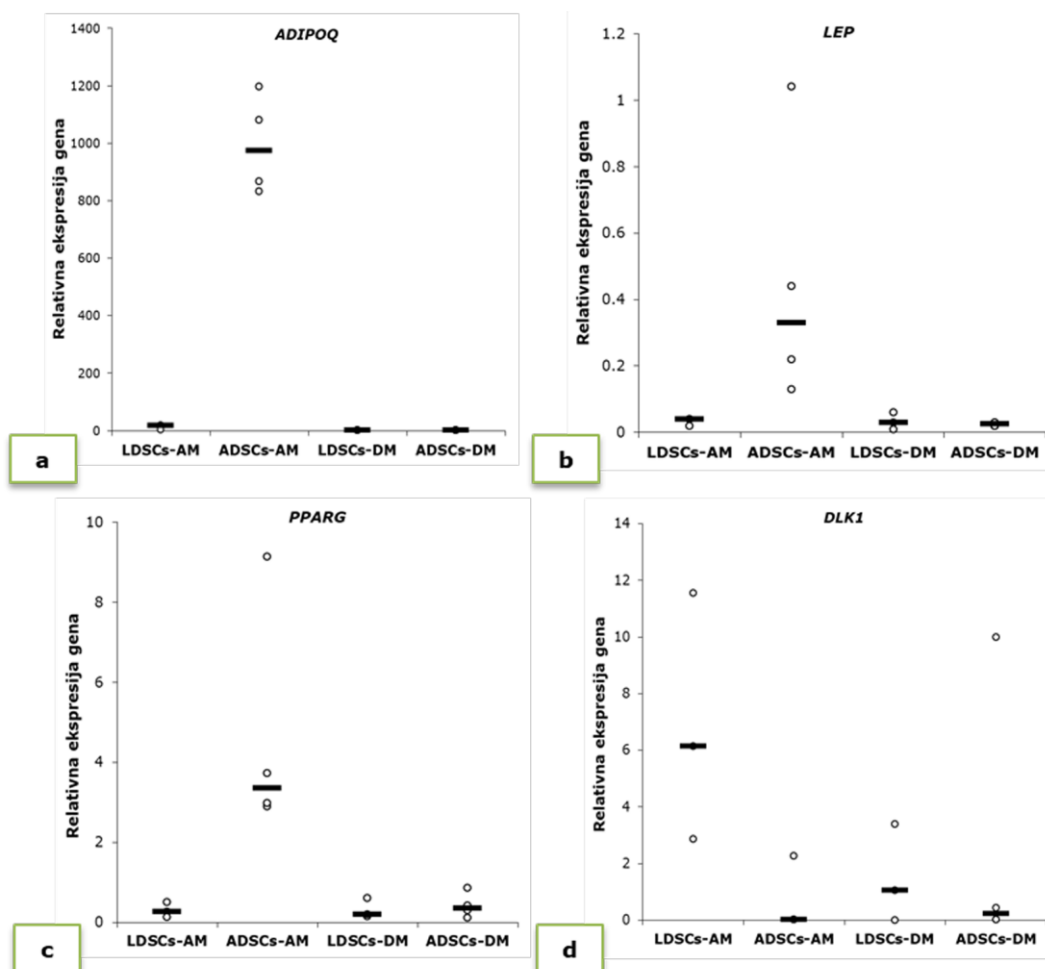
**Slika 11.** Imunoekspresija adiponektina u ćelijama nakon 21 dan adipogene diferencijacije; LDSCs u AM adipogenom medijumu (AM) (a), LDSCs u standardnom medijumu (DM) (b), ADSCs u AM medijumu (c) i ADSCs u DM medijumu (d); negativna kontrola – ćelije bojene bez primarnog antitela (kontrola nespecifičnog bojenja) u AM (e) i DM (f) medijumu; *bright field*, objektiv uveličanja 20x; strelice pokazuju pozitivno imunobojenje adiponektina (braon boja).

Koncentracija leptina je merena u supernatantima trodnevnih medijuma LDSCs i ADSCs 21. dana adipogene diferencijacije ELISA metodom (Grafik 5). Značajno viša koncentracija leptina je izmerena u ADSCs u AM medijumu nego u DM medijumu ( $p < 0,05$ ), dok nije uočena značajna razlika u sekreciji leptina tokom adipogene diferencijacije LDSCs. Koncentracija leptina je bila viša, ali ne statistički značajno, u ADSCs u odnosu na LDSCs u AM medijumu.



**Grafik 5.** Koncentracija leptina u supernatantu LDSCs i ADSCs meren ELISA metodom 21. dana adipogene diferencijacije; tačkasti grafikoni sa medijanom; n = 4 za sve grupe; (\*) p < 0,05.

Nivo ekspresije gena uključenih u proces adipogeneze: adiponektin (*ADIPOQ*), leptin (*LEP*), PPAR- $\gamma$  (*PPARG*) i Pref-1 (*DLK1*), određen je kvantitativnom Real-time PCR analizom, nakon 21 dan adipogene diferencijacije (Grafik 6, Tabele 10 i 11). Kao što je i očekivano, ekspresija markera zrelih adipocita *ADIPOQ*, *LEP* i *PPARG* je značajno povišena u diferentovanim ADSCs (Grafik 6a–c; Tabele 10 i 11) (p < 0,05), dok je ekspresija *DLK1*, karakterističnog markera pre-adipocita, snižena (Grafik 6d; Tabela 11). Ekspresija *ADIPOQ* i *LEP* je bila blago povišena u LDSCs tokom diferencijacije (p < 0,05 samo za *ADIPOQ*), ali u znatno manjoj meri nego u ADSCs. Nije bilo značajnih promena u ekspresiji *PPARG* u LDSCs (Grafik 6c; Tabela 11) dok je ekspresija *DLK1* značajno povišena u LDSCs tokom diferencijacije (Grafik 6d; Tabela 11). Ekspresija gena markera adipogeneze se nije značajnije menjala u DM medijumu, ni u LDSCs, ni u ADSCs (Grafik 6, Tabele 10 i 11).



**Grafik 6.** Relativna ekspresija gena za adiponektin (*ADIPOQ*) (a), leptin (*LEP*) (b), PPAR- $\gamma$  (*PPARG*) (c) i Pref-1 (*DLK1*) (d), analizirana u LDSCs i ADSCs nakon 21 dan adipogene diferencijacije; tačkasti grafikoni sa medijanom; n = 4 za sve grupe i sve gene.

**Tabela 10.** Relativna ekspresija gena *ADIPOQ* i *LEP* u LDSCs i ADSCs nakon 21 dan adipogene diferencijacije, u odnosu na ćelije P2 (dan 0). Rezultati su predstavljeni kao AS  $\pm$  SD. Zvezdice označavaju statističku značajnost u poređenju sa P2 (dan 0).

Tip ćelija	<i>ADIPOQ</i>			<i>LEP</i>		
	P2 (dan 0)	21 dan		P2 (dan 0)	21 dan	
		AM	DM		AM	DM
LDSCs	0,033 $\pm$ 0,033	12,530 $\pm$ 7,31 *	0,400 $\pm$ 0,35	0,0130 $\pm$ 0,011	0,03 $\pm$ 0,012 *	0,030 $\pm$ 0,025
ADSCs	0,061 $\pm$ 0,019	993,84 $\pm$ 174,09 ***	0,515 $\pm$ 0,45	0,0041 $\pm$ 0,003	0,46 $\pm$ 0,41 ***	0,025 $\pm$ 0,006 **

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

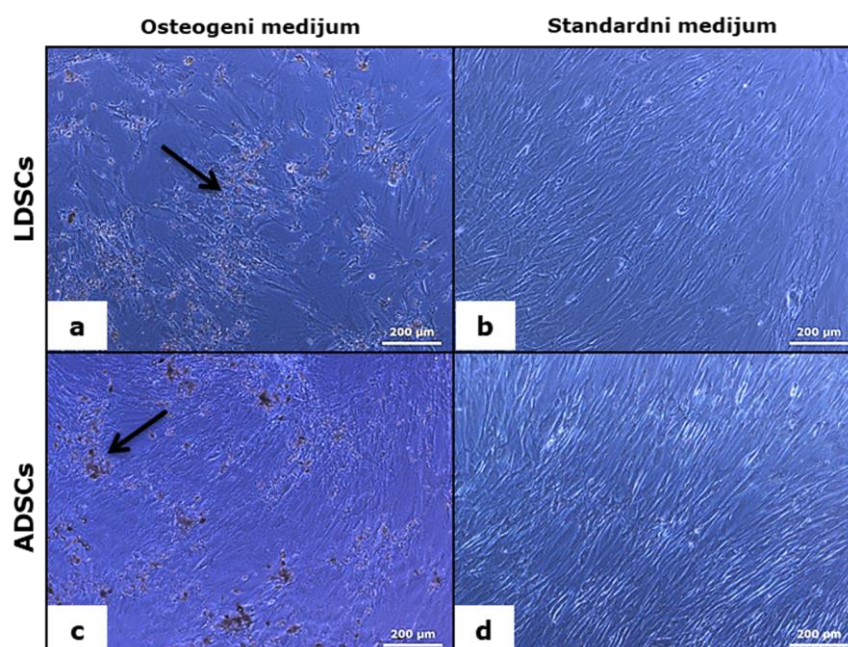
**Tabela 11.** Relativna ekspresija gena *PPARG* i *DLK1* u LDSCs i ADSCs nakon 21 dan adipogene diferencijacije, u odnosu na ćelije P2 (dan 0). Rezultati su predstavljeni kao AS  $\pm$  SD. Zvezdice označavaju statističku značajnost u poređenju sa P2 (dan 0).

Tip ćelija	<i>PPARG</i>			<i>DLK1</i>		
	P2 (dan 0)	21 dan		P2 (dan 0)	21 dan	
		AM	DM		AM	DM
LDSCs	0,159 $\pm$ 0,151	0,30 $\pm$ 0,187	0,32 $\pm$ 0,247	0,32 $\pm$ 0,725	6,86 $\pm$ 4,38 *	1,50 $\pm$ 1,73
ADSCs	0,250 $\pm$ 0,188	4,92 $\pm$ 3,50 *	0,42 $\pm$ 0,315	0,10 $\pm$ 0,105	0,57 $\pm$ 1,13	2,61 $\pm$ 4,92

\* $p < 0,05$

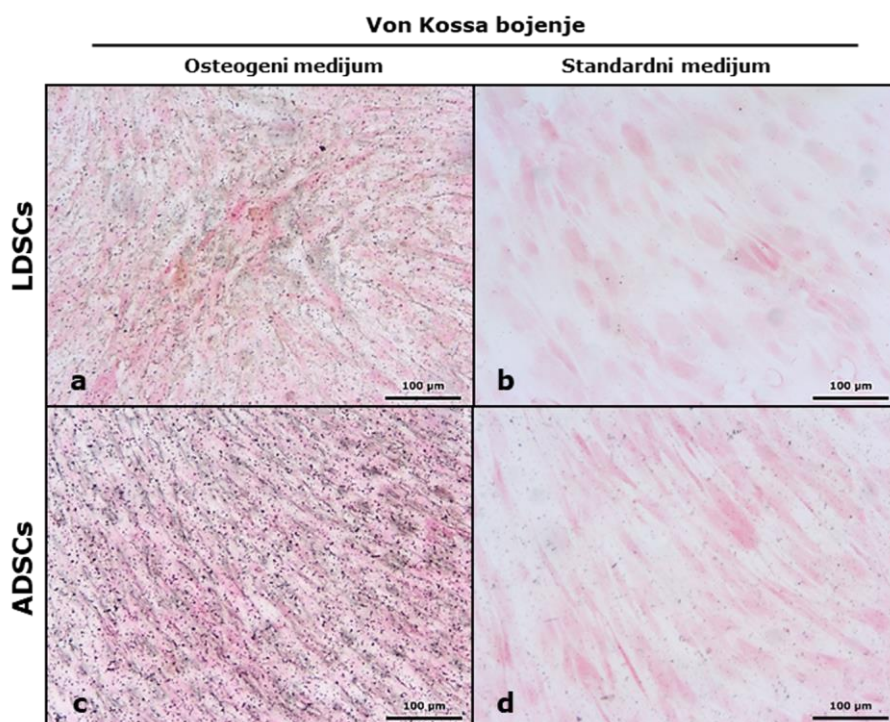
### 4.3.2. Osteogena diferencijacija

Stepen osteogene diferencijacije LDSCs i ADSCs je analiziran u dve vremenske tačke, 8. i 16. dana kultivacije u osteogenom medijumu (OS). Kao kontrola služile su ćelije koje su kultivisane u standardnom medijumu (DM) pod istim uslovima. Karakterističan fenotip nalik osteoblastima i akumulacija neorganskog materijala su primećeni posmatranjem na svetlosnom mikroskopu (Slika 12) 16. dana osteogene diferencijacije i u LDSCs (Slika 12a) i u ADSCs (Slika 12c) u OS medijumu. Ćelije u medijumu DM su zadržale svoj mezenhimsko-fibroblastni oblik, koji je vrlo sličan i u LDSCs (Slika 12b) i u ADSCs (Slika 12d).

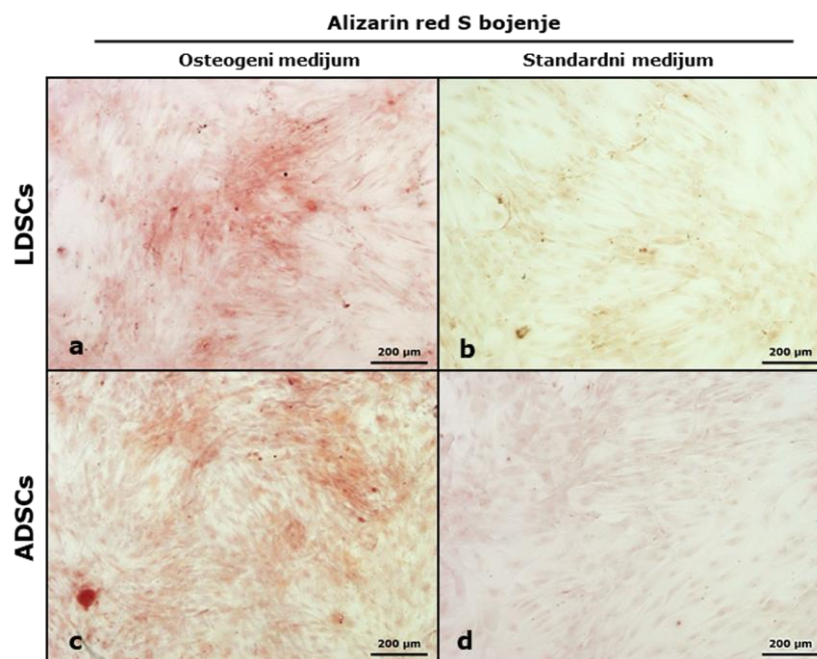


**Slika 12.** Mikroskopski izgled ćelija 16. dana osteogene diferencijacije; LDSCs u osteogenom medijumu (OS) (a), LDSCs u standardnom medijumu (DM) (b), ADSCs u OS medijumu (c) i ADSCs u DM medijumu (d); fazni kontrast sa objektivom uveličanja 10x; strelice pokazuju depozite neorganskog materijala.

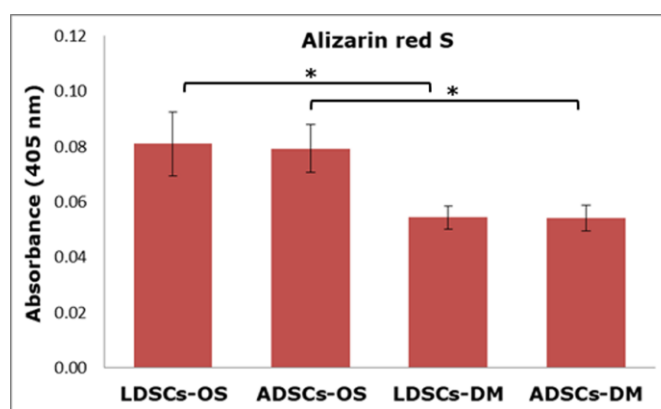
Formirani neorganski depoziti su bojeni *Von Kossa* (Slika 13) i *Alizarin red S* (ARS) (Slika 14) metodama bojenja. Tamno sivi/crni depoziti u LDSCs (Slika 13a) i ADSCs (Slika 13c), koji ukazuju na pozitivno *Von Kossa* bojenje, i crveno obojeni depoziti u LDSCs (Slika 14a) i ADSCs (Slika 14c), koji ukazuju na pozitivno ARS bojenje, primećeni su nakon 16 dana kultivacije ćelija u OS medijumu. U DM medijumu nisu uočeni takvi depoziti nakon *Von Kossa* i ARS bojenja, ni u LDSCs (Slika 13b, 14b) ni u ADSCs (Slika 13d, 14d).



**Slika 13.** Izgled kultura ćelija bojenih *Von Kossa* metodom nakon 16 dana osteogene diferencijacije; LDSCs u osteogenom medijumu (OS) (a), LDSCs u standardnom medijumu (DM) (b), ADSCs u OS medijumu (c) i ADSCs u DM medijumu (d); tamno sivo/crno obojeni depoziti na (a) i (c) ukazuju na pozitivno *Von Kossa* bojenje; *bright field*, uveličanje objektiva 10x.



**Slika 14.** Izgled ćelijskih kultura bojenih *Alizarin red S* (ARS) metodom nakon 16 dana osteogene diferencijacije; LDSCs u osteogenom medijumu (OS) (a), LDSCs u standardnom medijumu (DM) (b), ADSCs u OS medijumu (c) i ADSCs u DM medijumu (d); crveno obojeni depoziti na (a) i (c) ukazuju na pozitivno ARS bojenje; *bright field*, uveličanje objektiva 10x.

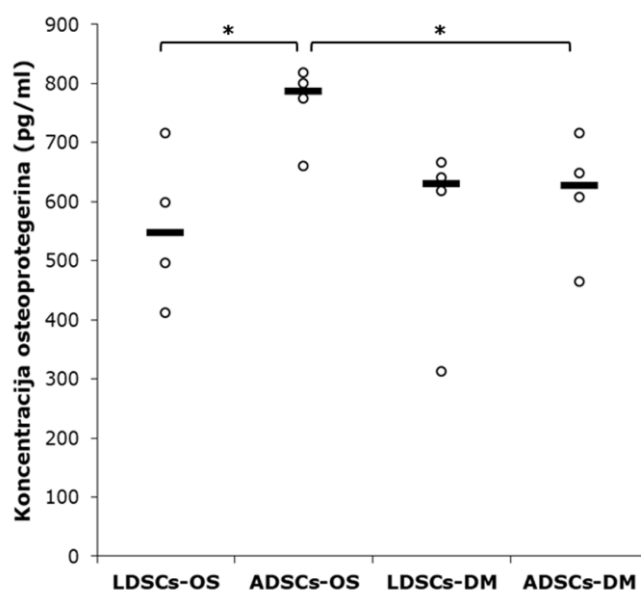


**Grafik 7.** Intenzitet *Alizarin red S* (ARS) boje u ćelijama određen spektrofotometrijski nakon 16 dana osteogene diferencijacije; rezultati su predstavljeni kao  $AS \pm SD$ ,  $n$  (LDSCs) = 5 i  $n$  (ADSCs) = 4 za sve grupe; (\*)  $p < 0,05$ .

Koncentracija osteoprotegerina (OPG), markera osteoblasta, određivana je u supernatantu ćelija nakon 16 dana osteogene diferencijacijem, u trodnevnom medijumu, ELISA metodom (Grafik 8). Značajno viša koncentracija OPG je zapažena u ADSCs kultivisanih u OS medijumu nego u DM medijumu ( $p < 0,05$ ). Nije bilo značajnih razlika u



nivou OPG između ADSCs i LDSCs u OS medijumu, kao ni između LDSCs kultivisanih u OS medijumu u poređenju sa DM medijumom.



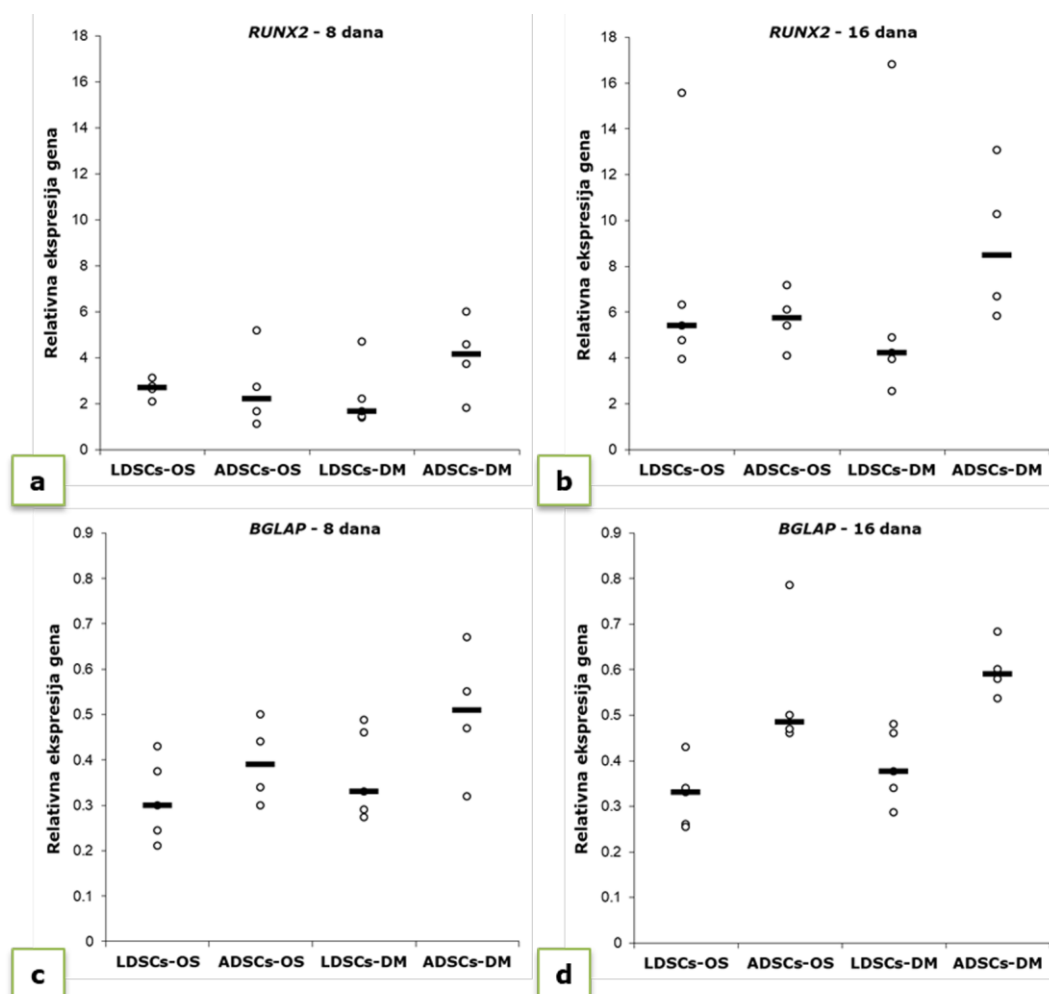
**Grafik 8.** Koncentracija osteoprotegerina (OPG) u supernatantu LDSCs i ADSCs merena ELISA metodom 16. dana osteogene diferencijacije; tačkasti grafikoni sa medijanom; n = 4 za sve grupe; (\*) p < 0,05.

Relativna ekspresija *RUNX2* i *BGLAP*, gena markera osteogeneze, merena je u dve vremenske tačke, 8. i 16. dana osteogene diferencijacije (Grafik 9). Nakon 8 dana osteogene diferencijacije, zapažena je povećana ekspresija *RUNX2* i u LDSCs i ADSCs, ali je bila izraženija u ADSCs nego u LDSCs (Tabela 12). Nakon 16 dana diferencijacije, trend ekspresije *RUNX2* se promenio pa je ekspresija *RUNX2* bila viša u LDSCs u OS medijumu nego u DM medijumu, dok je u ADSCs situacija bila obrnuta, jer je niža ekspresija *RUNX2* zapažena u ADSCs u OS nego u DM medijumu (Grafik 9a, b; Tabela 12). Ekspresija *BGLAP* se povećala tokom osteogene diferencijacije, ali ne u velikoj meri, i bila je značajno viša u ADSCs nego u LDSCc i 8. i 16. dana osteogene diferencijacije (Grafik 9c, d; Tabela 13).

**Tabela 12.** Relativna ekspresija gena *RUNX2* u LDSCs i ADSCs 8. i 16. dana osteogene diferencijacije, u odnosu na ćelije P2 (dan 0). Rezultati su predstavljeni kao AS ± SD. Zvezdice označavaju statističku značajnost u poređenju sa P2 (dan 0).

Tip ćelija	<i>RUNX2</i>				
	P2 (dan 0)	8. dan		16. dan	
		OS	DM	OS	DM
LDSCs	1,620 ± 0,622	2,156 ± 1,133	2,27 ± 1,390	7,194 ± 4,76 *	6,478 ± 5,83
ADSCs	1,013 ± 0,214	2,670 ± 1,799	4,01 ± 1,747*	5,685 ± 1,29 ***	8,960 ± 3,35 **

\*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001



**Grafik 9.** Relativna ekspresija gena *RUNX2* (a, b) i *BGLAP* (c, d), određivana u LDSCs i ADSCs 8. (a, c) i 16. dana (b, d) osteogene diferencijacije; tačkasti grafikoni sa medijanom; n (LDSCs) = 5 i (ADSCs) = 4 za sve grupe i oba gena.

**Tabela 13.** Relativna ekspresija gena *BGLAP* u LDSCs i ADSCs 8. i 16. dana osteogene diferencijacije, u odnosu na ćelije P2 (dan 0). Rezultati su predstavljani kao  $AS \pm SD$ . Zvezdice označavaju statističku značajnost u poređenju sa P2 (dan 0).

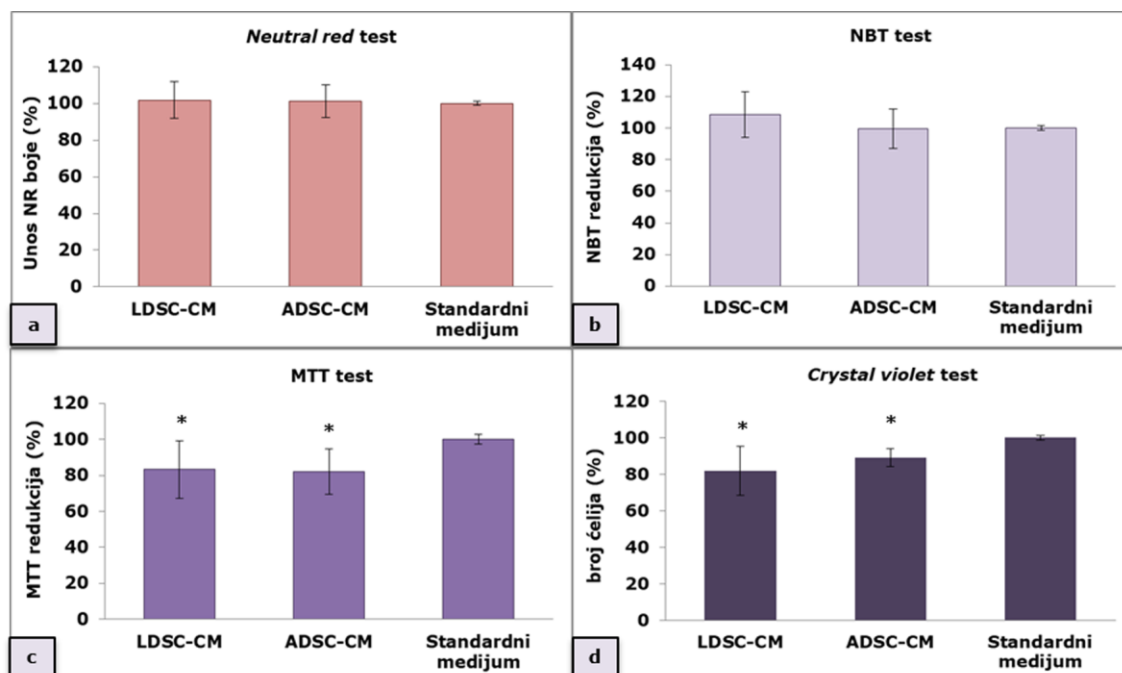
Tip ćelija	<i>BGLAP</i>				
	P2 (dan 0)	8. dan		16. dan	
		OS	DM	OS	DM
LDSCs	0,23 ± 0,039	0,312 ± 0,091 *	0,368 ± 0,099 *	0,323 ± 0,072 *	0,388 ± 0,081 **
ADSCs	0,33 ± 0,085	0,395 ± 0,091	0,503 ± 0,147	0,554 ± 0,155 *	0,600 ± 0,062 **

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

#### 4.4. UTICAJ KONDICIONIRANIH MEDIJUMA MATIČNIH ĆELIJA NA FUNKCIJE MAKROFAGA, IMUNOMODULACIJSKA AKTIVNOST I EFEKAT NA ZARASTANJE RANA U SISTEMU INDIREKTNE KO-KULTURE *IN VITRO*

##### 4.4.1. Aktivnost makrofaga u kondicioniranim medijumima LDSCs i ADSCs

Aktivnost RAW 264.7 makrofaga i njihov odgovor na kondicionirane medijume (CM) LDSCs (LDSC-CM) i ADSCs (ADSC-CM) su procenjivani nakon 48 h kultivacije u CM primenom: NBT testa (za analizu produkcije superoksid anjon radikala u fagocitnim ćelijama) (Grafik 10b), MTT testa (za analizu aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze) (Grafik 10c) i *Neutral red uptake* (NRU) testa (za analizu pinocitozne aktivnosti ćelije) (Grafik 10a). *Crystal violet* (CV) test je rađen da bi se odredio broj ćelija, jer je količina vezane CV boje direktno proporcionalna broju ćelija. Nije uočena statistički značajna razlika u vrednostima NRU i NBT testa između makrofaga kultivisanih u LDSC-CM i ADSC-CM, dok je redukcija MTT u oba CM bila manja u odnosu na kontrolu. Međutim, kada se analizira odnos između vrednosti NRU i CV testa, kao i odnos između vrednosti NBT i CV testa, što predstavlja normalizovanje vrednosti NR i NBT testa na broj ćelija u svakom uzorku, (Tabela 14), veći unos NR boje ( $NR/CV$  (LDSC-CM) = 1.25 prema  $NR/CV$  (ADSC-CM) = 1.13) i veća redukcija NBT ( $NBT/CV$  (LDSC-CM) = 1.33 prema  $NBT/CV$  (ADSC-CM) = 1.12) su uočeni u makrofagima kultivisanim u LDSC-CM nego u makrofagima kultivisanim u ADSC-CM. Ovi rezultati ukazuju na jaču aktivaciju makrofaga u prisustvu sekretornih produkata LDSCs u poređenju sa ADSCs. Nešto slabija redukcija MTT je uočena i u LDSC-CM i u ADSC-CM tretmanu, ali odnos vrednosti MTT i CV testa ne pokazuje statistički značajne razlike između delovanja različitih kondicioniranih medijuma (Tabela 14).



**Grafik 10.** Odgovor makrofaga na kondicionirane medijume (CM) LDSCs (LDSC-CM) i ADSCs (ADSC-CM) analiziran *Neutral red* (NR) testom (a), NBT testom (b), MTT testom (c) i *Crystal violet* (CV) testom (d); AS  $\pm$  SD; n(LDSCs) = 5 i n(ADSCs) = 4 (n – broj pacijenata po grupi); za svaki CM poreklom od kulture izvedene iz tkiva jednog pacijenta, kao i kontrolne kulture, 4 do 8 replikata je analizirano u svakom testu, (\*)  $p < 0,05$  (u odnosu na standardni medijum).

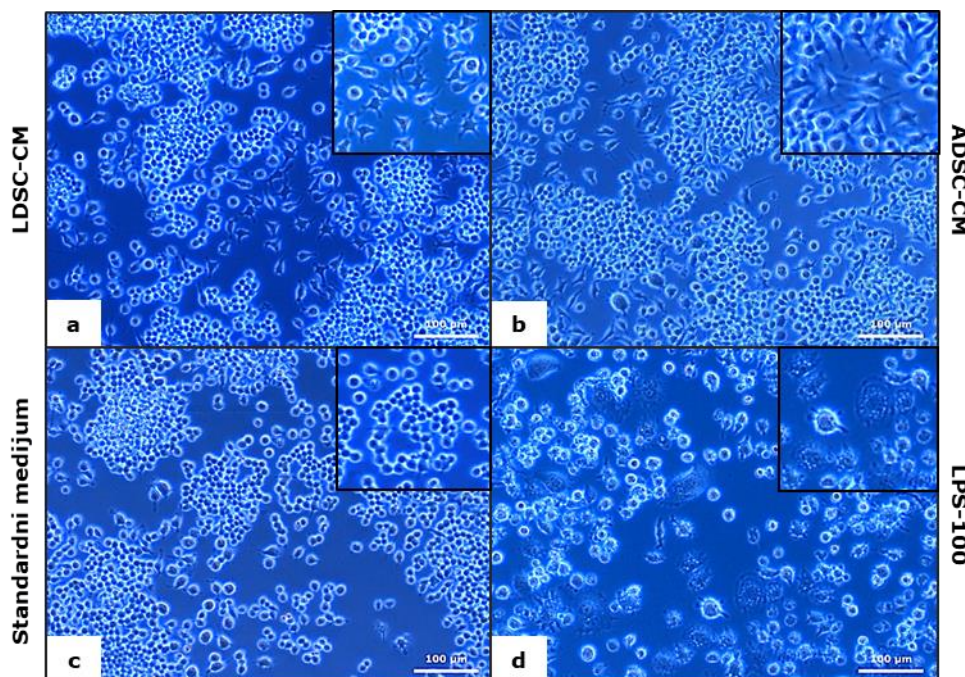
**Tabela 14.** Unos NR boje, kao i redukcija NBT i MTT, normalizovani na broj ćelija određen CV testom; rezultati su prikazani kao AS  $\pm$  SD.

Tip kondicioniranog medijuma (CM)	Odnos između vrednosti NR i CV testa	$p$	Odnos između vrednosti NBT i CV testa	$p$	Odnos između vrednosti MTT i CV testa	$p$
LDSC-CM	1,25 $\pm$ 0,11	$p = 0,1$	1,33 $\pm$ 0,18	$p = 0,06$	1,04 $\pm$ 0,16	$p = 0,23$
ADSC-CM	1,13 $\pm$ 0,10		1,12 $\pm$ 0,14		0,92 $\pm$ 0,14	

#### 4.4.2. Imunomodulacijska aktivnost kondicioniranih medijuma LDSCs i ADSCs

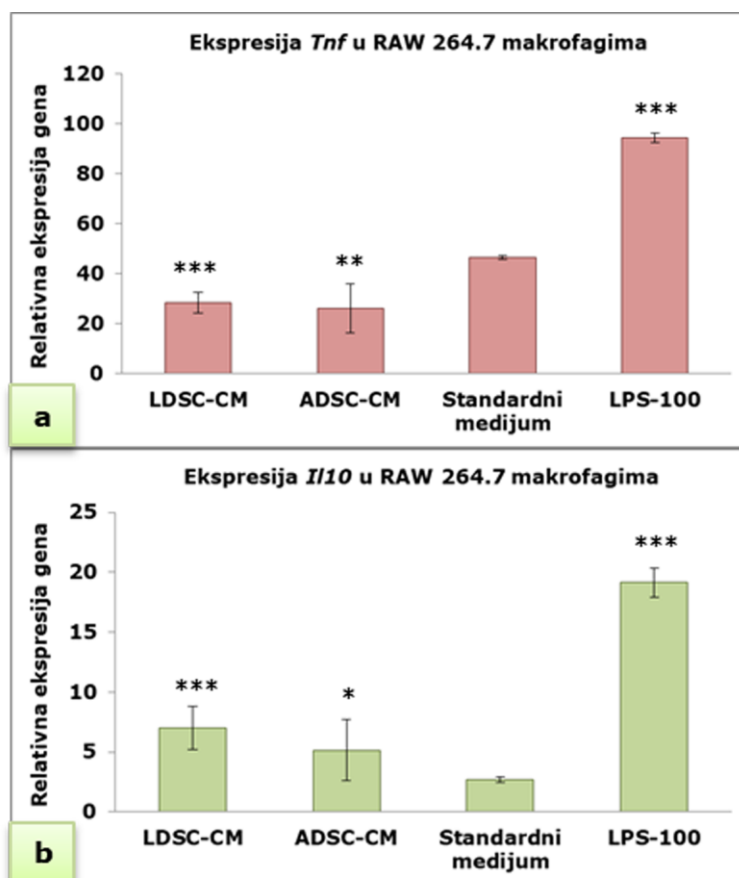
Nakon 48 h kultivacije u LDSC-CM i ADSC-CM, uočene su promene u morfologiji RAW 264.7 makrofaga (Slika 15). Za razliku od kontrolne kulture (standardni medijum) gde su ćelije bile predominantno okruglog oblika i sitne (Slika 15c), makrofagi kultivisani u LDSC-CM (Slika 15a) i ADSC-CM (Slika 15b) su bili krupniji, rašireniji i sa nastavcima što

je indikacija funkcijske promene i polarizacije makrofaga. Makrofagi aktivirani sa 100 ng/ml LPS (LPS-100 tretman) (Slika 15d) su bili epitelnog oblika i ispunjeni vezikulama.



**Slika 15.** Morfologija RAW 264.7 makrofaga kultivisanih 48 h u LDSC-CM (a), ADSC-CM (b), standardnom medijumu (c) i pri LPS-100 tretmanu (d); fazni kontrast, objektiv uveličanja 20×.

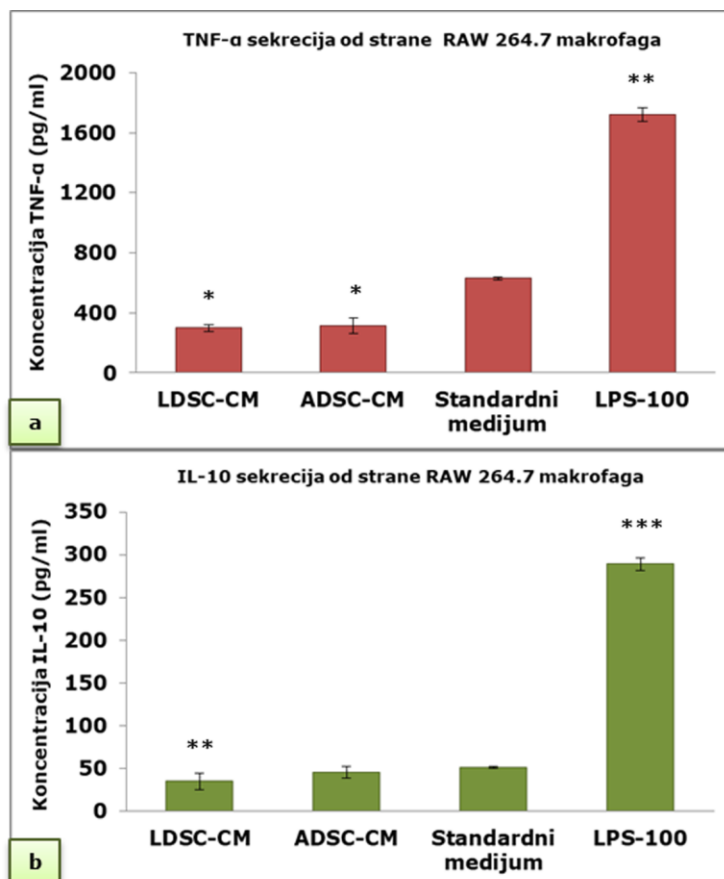
Real-time PCR analiza (Grafik 11) je pokazala da i LDSC-CM i ADSC-CM značajno smanjuju ekspresiju *Tnf* (gena za proinflamacijski citokin TNF- $\alpha$ ) u odnosu na standardni medijum i LPS-100 tretman (Grafik 11a), ali nije uočena statistička značajnost u poređenju kondicioniranih medijuma LDSCs i ADSCs. Sa druge strane, oba kondicionirana medijuma značajno povećavaju ekspresiju *I110* (gena za anti-inflamacijski citokin IL-10) u poređenju sa standardnim medijumom (Grafik 11b).



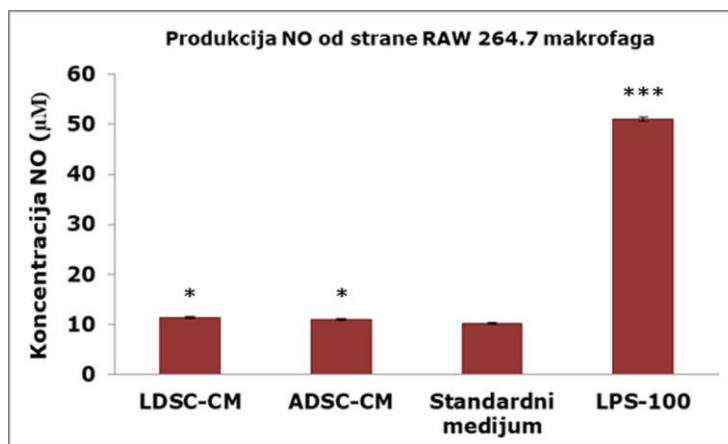
**Grafik 11.** Relativna ekspresija *Tnf* (a) i *Il10* (b) gena u RAW 264.7 makrofagima kultivisanih 48 h u LDSC-CM, ADSC-CM, standardnom medijumu i pri LPS-100 tretmanu; AS  $\pm$  SD; n(LDSCs) = 4 i n(ADSCs) = 4 (n – broj pacijenata po grupi); za svaki CM poreklom od kulture izvedene iz tkiva jednog pacijenta, kontrolnu kulturu i LPS-100, analizirano je 4 replikata; (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  (u odnosu na standardni medijum).

Sekrecija TNF- $\alpha$  od strane RAW 264.7 makrofaga je bila značajno smanjena kada su makrofagi bili kultivisani u LDSC-CM i ADSC-CM u odnosu na standardni medijum i LPS-100, iako nije uočena značajna razlika između uticaja kondicioniranih medijuma LDSCs i ADSCs (Grafik 12a). Nije bilo značajnih razlika u sekreciji IL-10 između makrofaga kultivisanih u LDSC-CM i ADSC-CM, ali u poređenju sa standardnim medijumom, sekrecija IL-10 je bila značajno smanjena u LDSC-CM (Grafik 12b). U poređenju sa tretmanom LPS-100, koncentracija IL-10 je bila značajno niža u svim ispitivanim medijumima. Malo, ali statistički značajno, povećanje produkcije azot oksida

(NO) je zapaženo u kulturama makrofaga kultivisanih u LDSC-CM i ADSC-CM u poređenju sa standardnim medijumom (Grafik 13), ali je to povećanje bilo značajno manje nego u LPS-100 tretmanu.



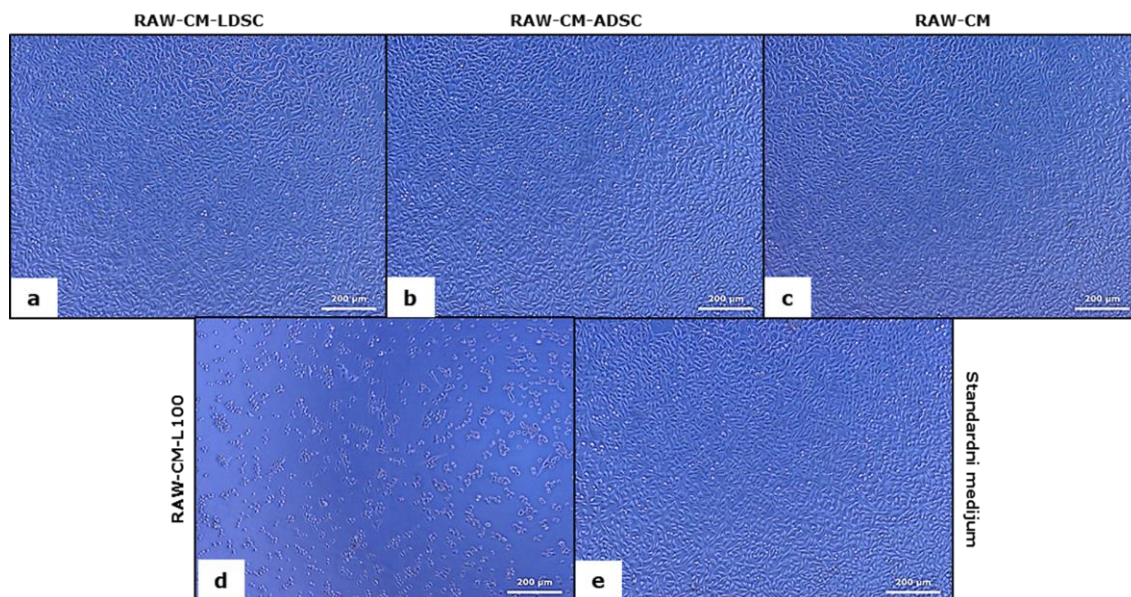
**Grafik 12.** Koncentracija TNF- $\alpha$  (a) i IL-10 (b) merena ELISA testom u supernatantu RAW 264.7 makrofaga kultivisanih 48 h u LDSC-CM, ADSC-CM, standardnom medijumu i pri LPS-100 tretmanu; AS  $\pm$  SD; veličina uzorka: n(LDSCs) = 4 i n(ADSCs) = 4 (n – broj pacijenata po grupi); za svaki CM poreklom od kulture izvedene iz tkiva jednog pacijenta, kontrolnu kulturu i LPS-100 tretman, analizirano je 4 replikata; (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  (u odnosu na standardni medijum).



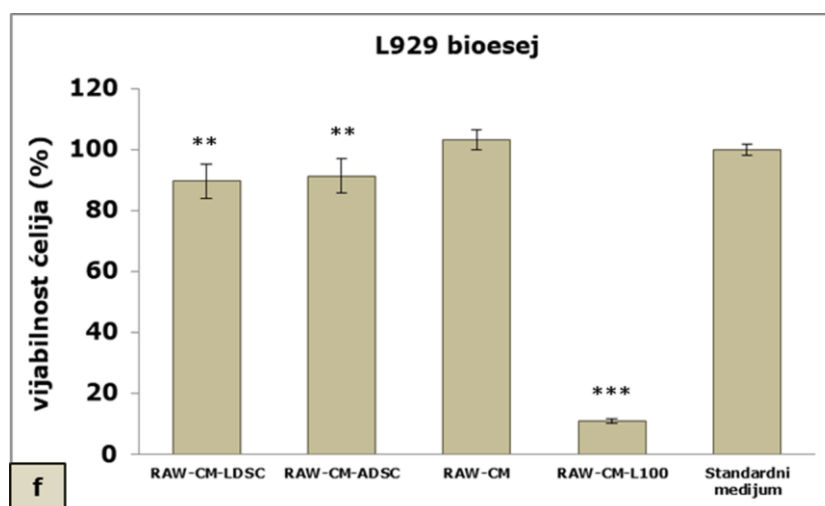
**Grafik 13.** Koncentracija azot oksida (NO) u supernatantu RAW 264.7 makrofaga kultivisanih 48 h u LDSC-CM, ADSC-CM, standardnom medijumu i pri LPS-100 tretmanu; AS  $\pm$  SD; veličina uzorka: n(LDSCs) = 4 i n(ADSCs) = 4 (n – broj pacijenata po grupi); za svaki CM poreklom od kulture izvedene iz tkiva jednog pacijenta, kontrolnu kulturu i LPS-100 tretman, analizirano je 4 replikata; (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  (u odnosu na standardni medijum).

U L929 bioeseju, koji je korišćen za procenu citotoksičnosti posredovane proinflamacijskim citokinima, nisu uočene razlike u broju i morfologiji L929 fibroblasta nakon 24 h kultivacije u kondicioniranim medijumima RAW 264.7 makrofaga koji su prethodno kultivisani u LDSC-CM (RAW-CM-LDSC) (Slika 16a) i ADSC-CM (RAW-CM-ADSC) (Slika 16b) u odnosu na CM makrofaga kultivisanih u standardnom medijumu (RAW-CM) (Slika 16c) i standardnom medijumu za L929 ćelije (kontrolna kultura) (Slika 16e). Značajno smanjenje broja ćelija i predominantno apoptotične ćelije su uočeni u tretmanu sa CM makrofaga stimulisanih sa 100 ng/mL LPS (RAW-CM-L100) (Slika 16d) što je potvrđeno i MTT testom. MTT test (Grafik 14) nije pokazao značajne razlike između RAW-CM-LDSC i RAW-CM-ADSC, kao ni između RAW-CM i standardnog medijuma, ali u poređenju sa standardnim medijumom i RAW-CM svi ostali medijumi su značajno smanjili vijabilnost L929 ćelija.





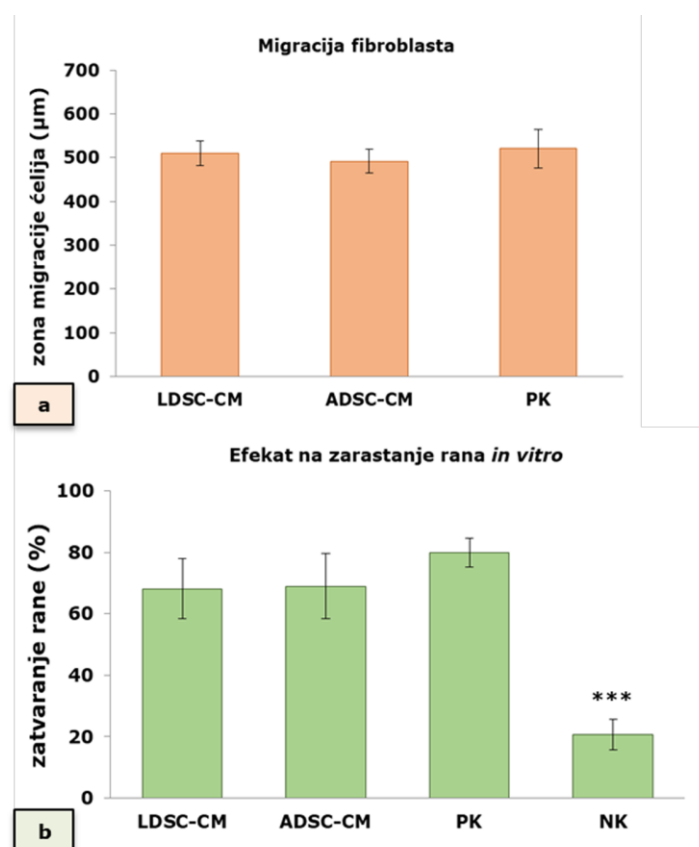
**Slika 16.** Mikroskopski izgled L929 ćelija kultivisanih 24 h u kondicioniranim medijumima RAW 264.7 makrofaga koji su prethodno kultivisani 48 h u LDSC-CM (RAW-CM-LDSC) (a), ADSC-CM (RAW-CM-ADSC) (b), standardnom medijumu za RAW 264.7 ćelije (RAW-CM) (c), pri tretmanu LPS-100 (RAW-CM-L100) (d) i standardnom medijumu za L929 ćelije (e); fazni kontrast, objektiv uvećanja 10x.



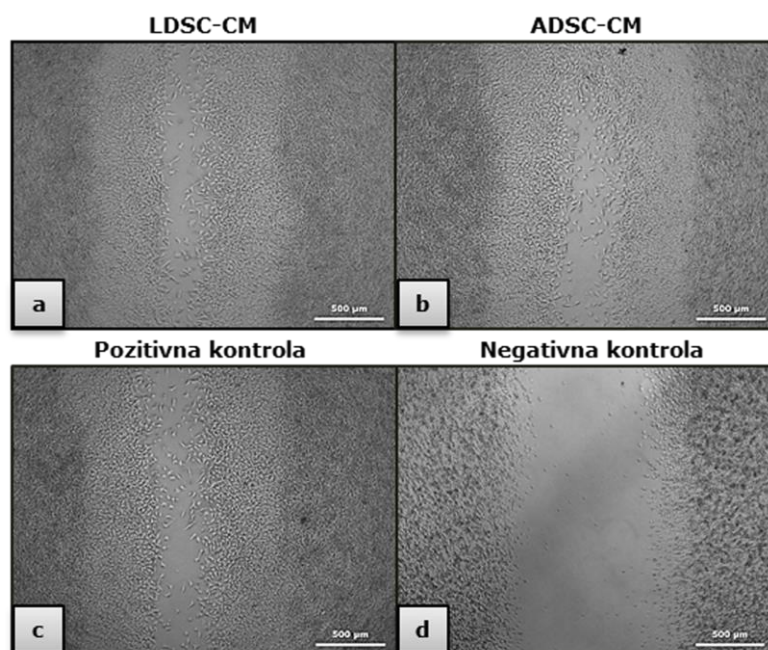
**Grafik 14.** Vijabilnost L929 ćelija u L929 bioeseju procenjena MTT testom,  $AS \pm SD$ ; veličina uzorka:  $n(\text{LDSCs}) = 4$  i  $n(\text{ADSCs}) = 4$  ( $n$  – broj pacijenata po grupi); za svaki CM poreklom od kulture izvedene iz tkiva jednog pacijenta, kao i kontrole, analizirano je 4 do 8 replikata; (\*\*\*)  $p < 0,001$ , (\*\*)  $p < 0,01$  (u odnosu na standardni medijum).

#### 4.4.3. Efekat kondicioniranih medijuma LDSCs i ADSCs na zarastanje rana u sistemu indirektno ko-kulture *in vitro*

Efekat LDSC-CM i ADSC-CM na migraciju fibroblasta i zarastanje rana je ispitivan na modelu *in vitro* primenom *Scratch* testa. Migracija fibroblasta (Grafik 15a) i zatvaranje „rane“ tj. smanjenje ogrebotine u monosloju ćelija (Grafik 15b) nakon tri dana kulture u LDSC-CM i ADSC-CM su bili u nivou pozitivne kontrole (PK) bez statistički značajne razlike među njima. Uočena je značajna razlika kultura sa kondicioniranim medijumima i negativne kontrole (NK), što ukazuje na povoljan efekat kondicioniranih medijuma LDSCs i ADSCs na zarastanje rana. Efekat CM na smanjenje ogrebotine nakon tri dana kulture je prikazan na slici 17a-d.



**Grafik 15.** Efekat kondicioniranih medijuma LDSCs i ADSCs na zarastanje rana na modelu *in vitro*; efekat LDSC-CM, ADSC-CM, pozitivne (PK) i negativne (NK) kontrole na migraciju fibroblasta (a) i zatvaranje rane (b); AS ± SD; veličina uzorka: n(LDSCs) = 4 i n(ADSCs) = 4 (n – broj pacijenata po grupi); za svaki CM poreklom od kulture izvedene iz tkiva jednog pacijenta, kao i kontrole, analizirano je 4 replikata po uzorku; (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

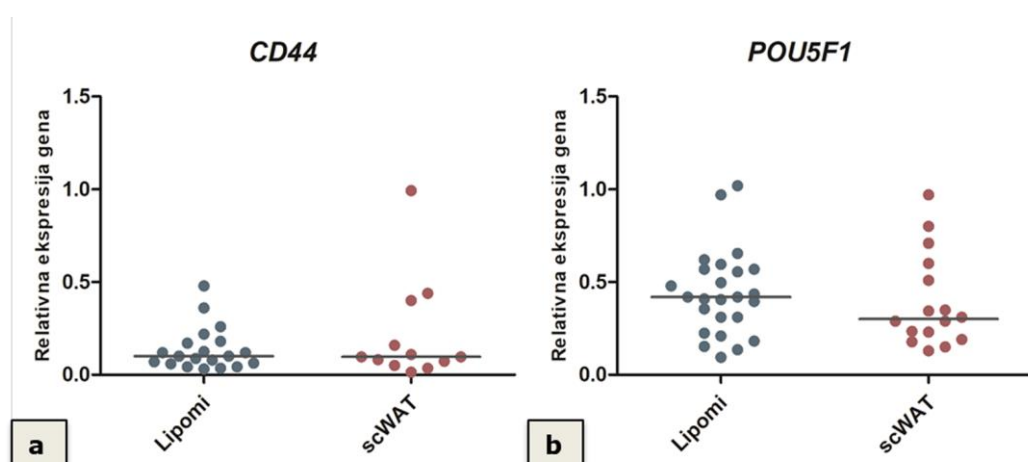


**Slika 17.** Mikroskopski izgled „rana“ tj. ogrebotina, tri dana nakon kultivacije u LDSC-CM (a), ADSC-CM (b), pozitivne (c) i negativne kontrole (d); fazni kontrast, uveličanje objektivna 5×.

## 4.5. ANALIZA EKSPRESIJE GENA U UZORCIMA LIPOMA I MASNOG TKIVA

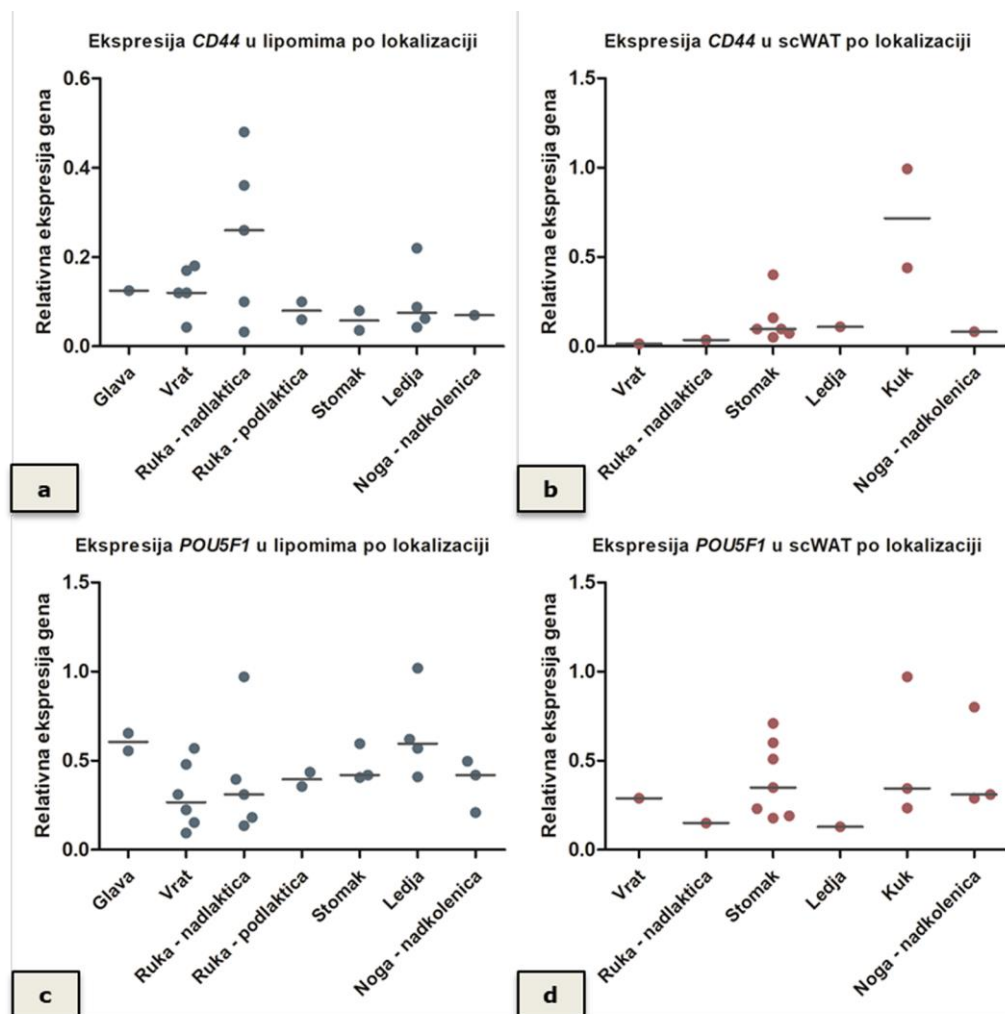
### 4.5.1. Analiza ekspresije gena markera mezenhimskih matičnih ćelija u tkivima

Ekspresija *CD44* i *POU5F1* gena, markera MSCs, analizirana je u uzorcima lipoma i potkožnog masnog tkiva (scWAT) i rezultati su prikazani na Grafiku 16. Ekspresija *CD44* je vrlo slična u lipomima i scWAT (Grafik 16a) dok je ekspresija *POU5F1* viša u uzorcima lipoma u odnosu na scWAT, ali ne statistički značajno (Grafik 16b).



**Grafik 16.** Relativna ekspresija gena za *CD44* (*CD44*) (a) i Oct-4 (*POU5F1*) (b), analizirana u uzorcima lipoma i scWAT; tačkasti grafikoni sa medijanom; broj uzoraka po grupi za *CD44*: n = 20 (lipomi) i n = 12 (scWAT) i za *POU5F1*: n = 25 (lipomi) i n = 16 (scWAT).

U poređenju ekspresije *CD44* i *POU5F1* po lokalizaciji lipoma i scWAT uočene su razlike, ali ne statistički značajne (Grafik 17), najverovatnije zbog malog broja analiziranih uzoraka za neke ispitivane lokalizacije i heterogenosti u okviru grupa.

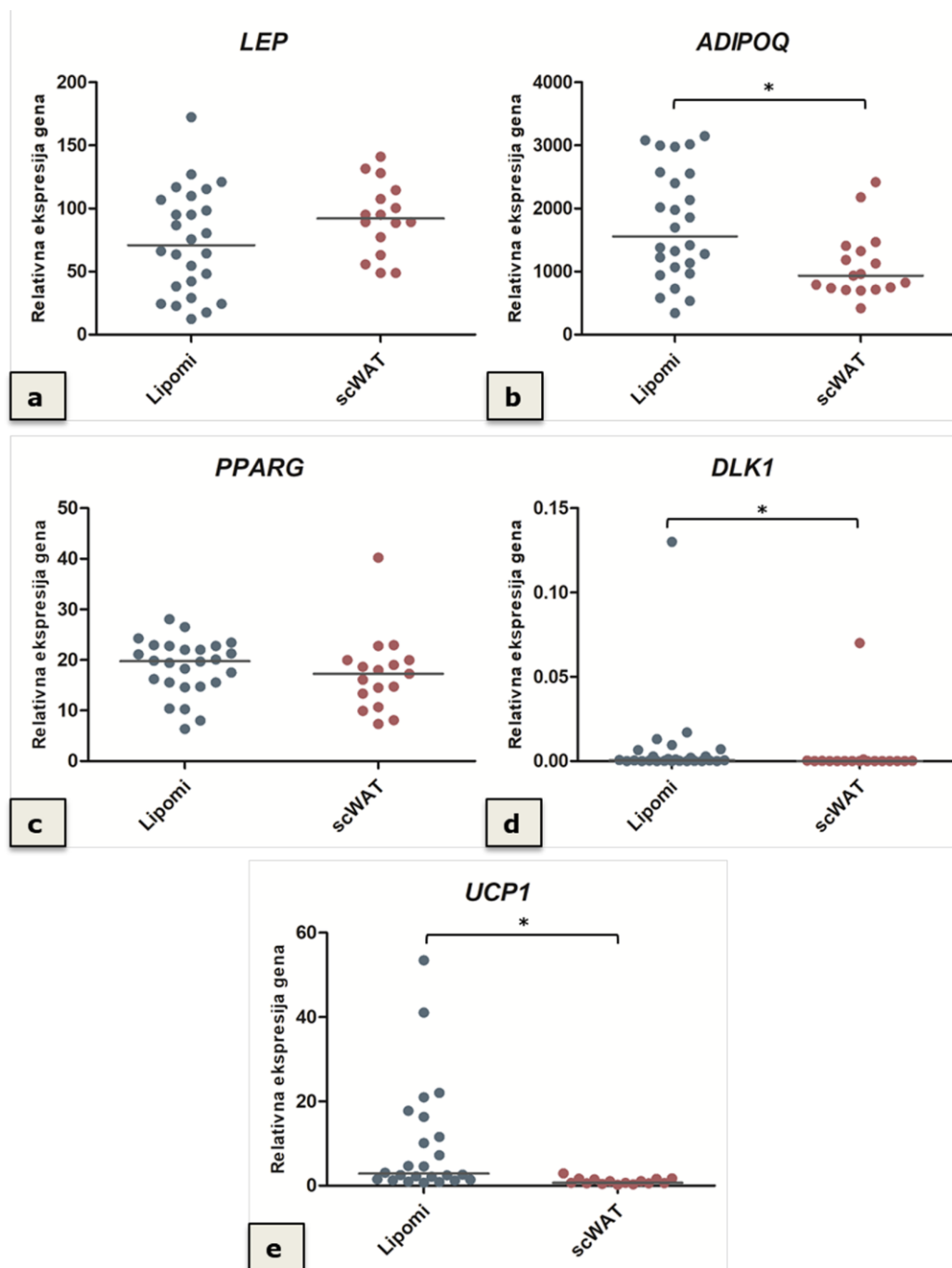


**Grafik 17.** Poređenje relativne ekspresije gena *CD44* (a, b) i *POU5F1* (c, d) u uzorcima lipoma (a, c) i scWAT (b, d) po anatomskoj lokalizaciji; tačkasti grafikoni sa medijanom.

#### 4.5.2. Analiza ekspresije gena markera adipogeneze u tkivima

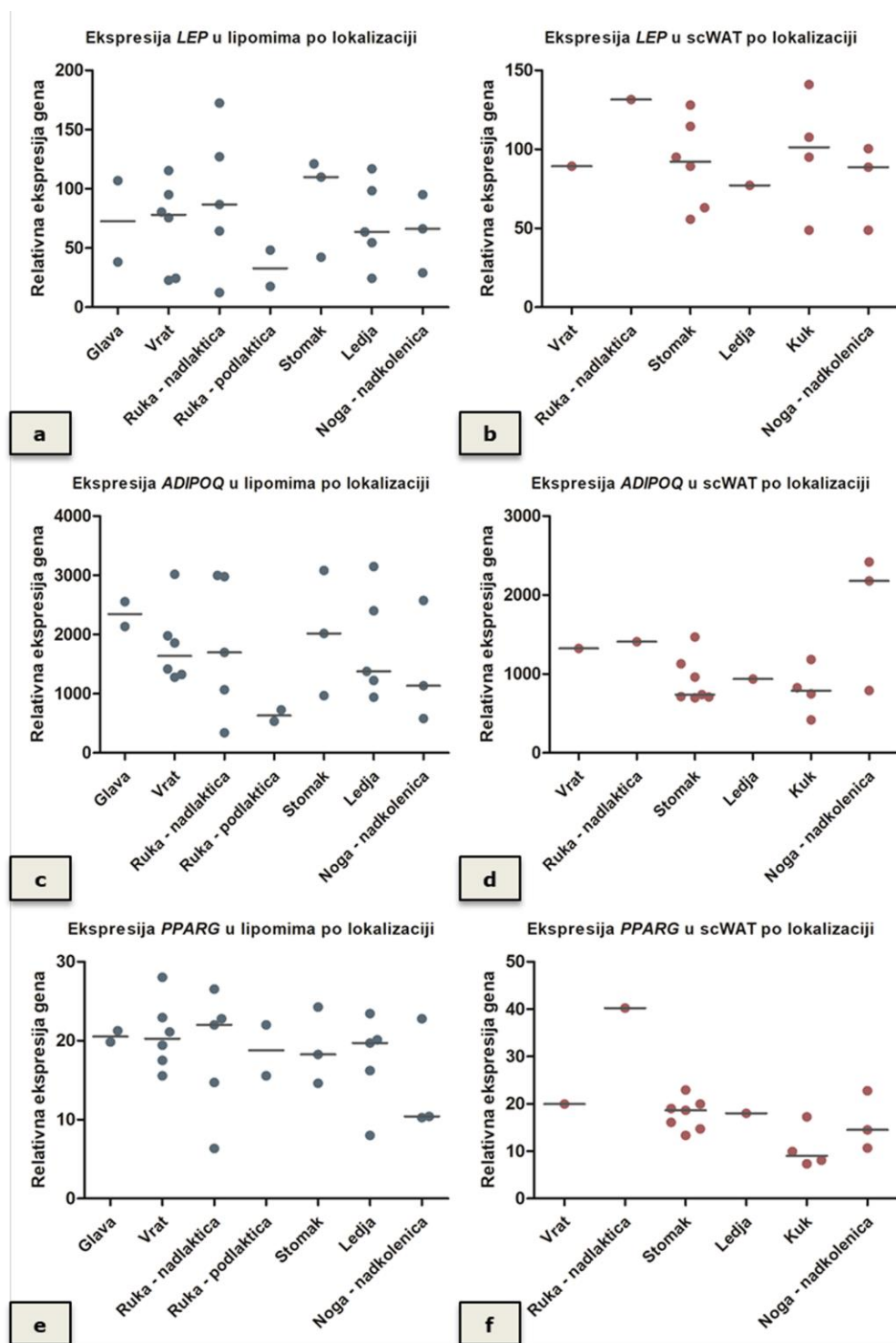
Nivo ekspresije gena karakterističnih za proces adipogeneze i belo masno tkivo (gen za adiponektin (*ADIPOQ*), leptin (*LEP*), PPAR- $\gamma$  (*PPARG*) i Pref-1 (*DLK1*)), kao i gena karakterističnog za mrko masno tkivo (*UCP1*), određen je u uzorcima lipoma i scWAT i rezultati su prikazani na Grafiku 18. Nešto viša ekspresija *LEP* je uočena u grupi scWAT u odnosu na grupu lipoma, iako razlika nije statistički značajna (Grafik 18a). Ekspresija *ADIPOQ* je značajno viša u grupi lipoma u odnosu na grupu scWAT ( $p < 0,05$ ) (Grafik 18b). Nije uočena statistički značajna razlika u ekspresiji *PPARG*, iako je nešto viša ekspresija ovog gena zabeležena u grupi lipoma u odnosu na scWAT (Grafik 18c). Velike varijacije u ekspresiji *DLK1*, markera preadipocita, uočene su u analiziranim uzorcima, iako

je značajno viša ekspresija ovog gena zabeležena u grupi lipoma u odnosu na scWAT (Grafik 18d). Značajno viša ekspresija *UCP1*, markera mrkog masnog tkiva, uočena je u grupi lipoma u odnosu na scWAT (Grafik 18e).



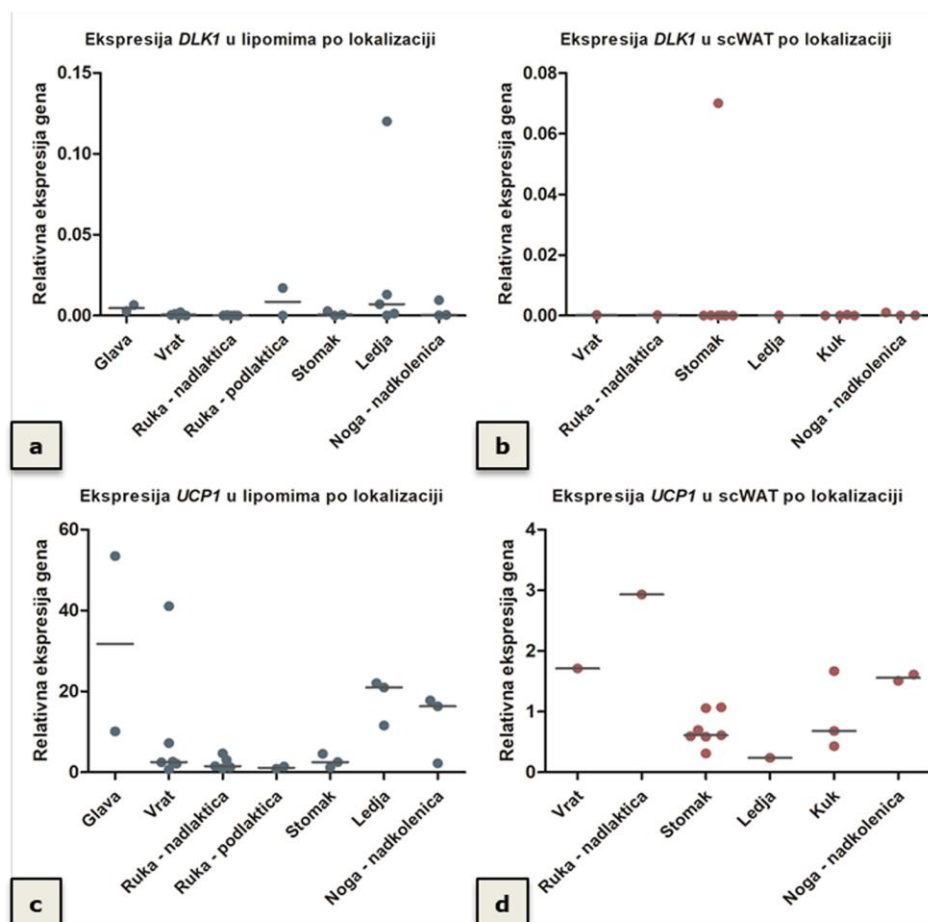
**Grafik 18.** Relativna ekspresija gena za leptin (*LEP*) (a), adiponektin (*ADIPOQ*) (b), PPAR- $\gamma$  (*PPARG*) (c), Pref-1 (*DLK1*) (d) i UCP-1 (*UCP1*) (e), analizirana u uzorcima lipoma i scWAT; tačkasti grafikoni sa medijanom; broj uzoraka po grupi za *LEP*, *ADIPOQ*, *PPARG* i *DLK1*: n = 26 (lipomi) i n = 17 (scWAT) i za *UCP1*: n = 24 (lipomi) i n = 15 (scWAT);  $p < 0,05$ .

Ekspresija gena markera adipogeneze je analizirana po anatomskim lokalizacijama sa kojih su uzeti uzorci lipoma i scWAT i rezultati su prikazani na Grafiku 19 i Grafiku 20.



**Grafik 19.** Poređenje relativne ekspresije gena *LEP* (a, b), *ADIPOQ* (c, d) i *PPARG* (e, f) u uzorcima lipoma (a, c, e) i scWAT (b, d, f) po anatomskoj lokalizaciji; tačkasti grafikoni sa medijanom.

Razlike u ekspresiji gena karakterističnih za proces adipogeneze između analiziranih anatomskih lokalizacija su uočene i u grupi lipoma i u grupi scWAT, u svim analiziranim genima, ali su statistički značajne razlike ( $p < 0,01$ ) samo u slučaju gena *PPARG* (Grafik 19f) i *UCP1* (Grafik 20d) u grupi scWAT po lokalizaciji.

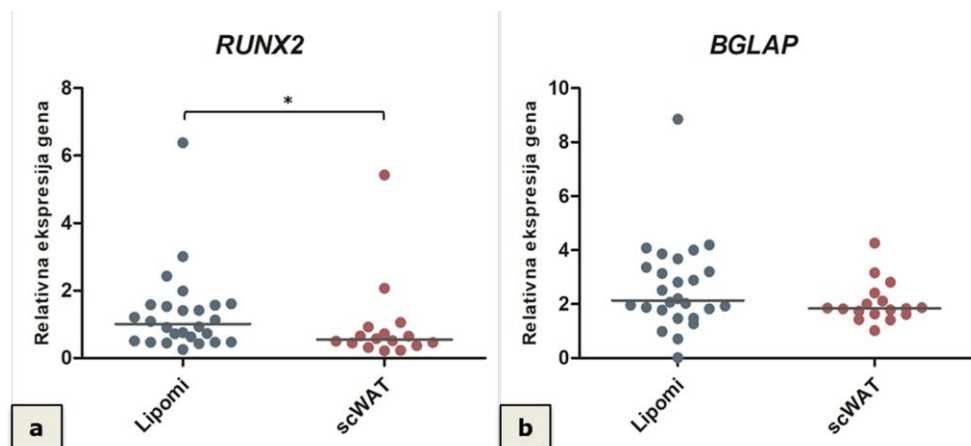


**Grafik 20.** Poređenje relativne ekspresije gena *DLK1* (a, b) i *UCP1* (c, d) u uzorcima lipoma (a, c) i scWAT (b, d) po anatomskoj lokalizaciji; tačkasti grafikoni sa medijanom.

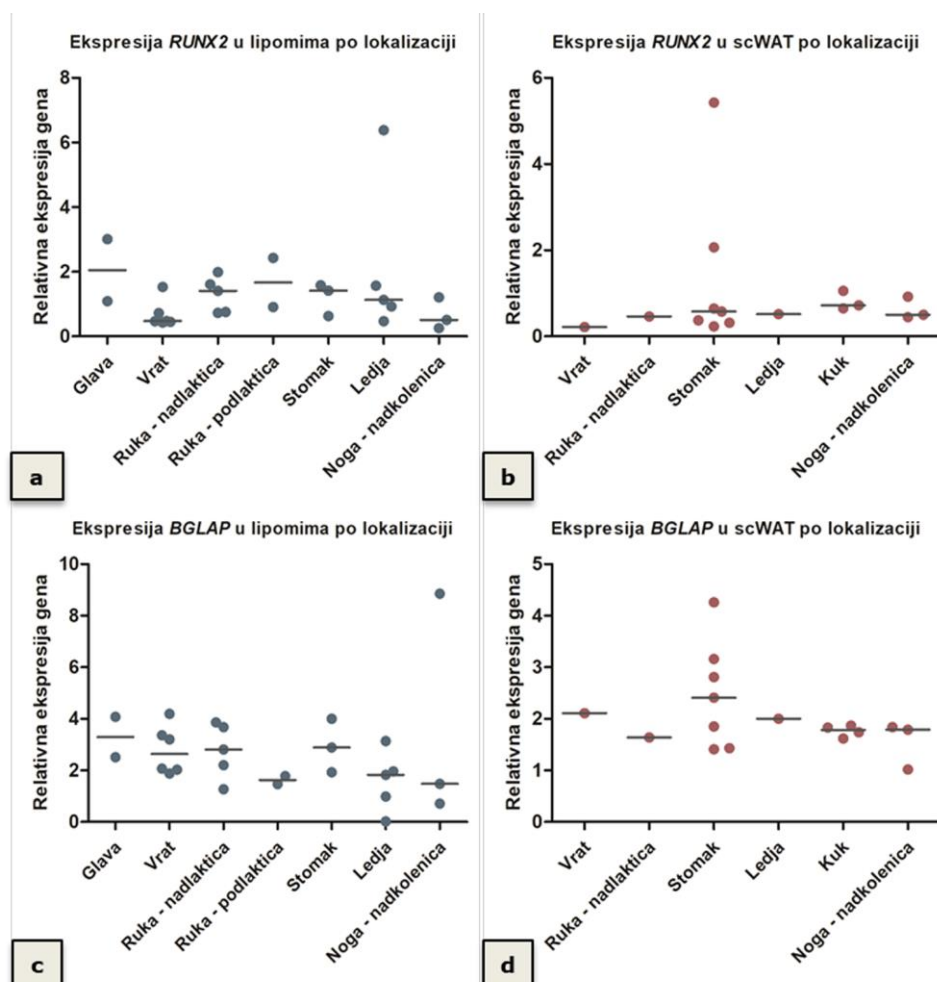
#### 4.5.3. Analiza ekspresije gena markera osteogeneze u tkivima

Ekspresija *RUNX2* i *BGLAP*, gena markera osteogeneze, analizirana je u uzorcima lipoma i scWAT i rezultati su prikazani na Grafiku 21. Viša ekspresija *RUNX2* (Grafik 21a) i *BGLAP* (Grafik 21b) je uočena u grupi lipoma u odnosu na scWAT, iako je statistički značajna razlika zapažena samo u slučaju *RUNX2*. Razlike u ekspresiji *RUNX2* i *BGLAP* u uzorcima lipoma i scWAT sa različitim anatomskih lokalizacija su uočene ali nisu statistički značajne (Grafik 22).





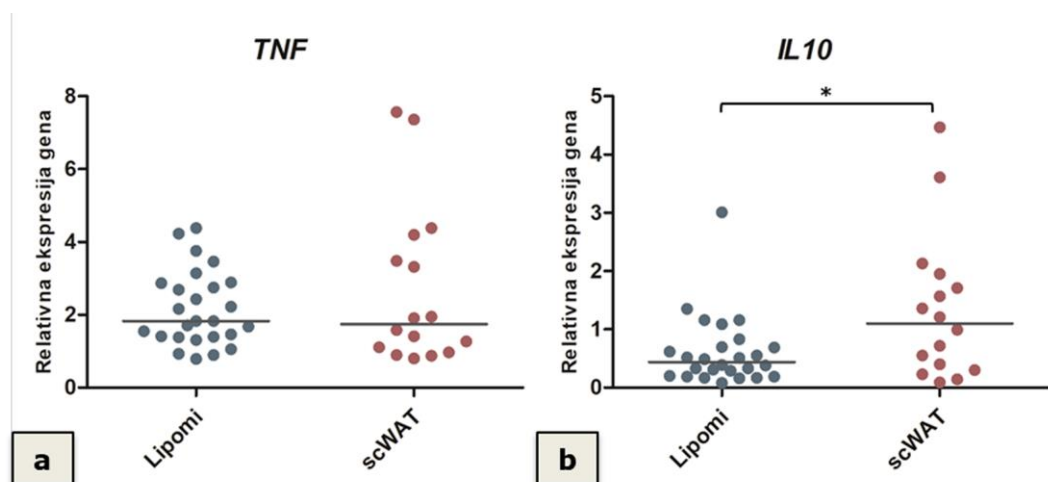
**Grafik 21.** Relativna ekspresija gena za RUNX2 (*RUNX2*) (a) i osteokalcin (*BGLAP*) (b), analizirana u uzorcima lipoma i scWAT; tačkasti grafikoni sa medijanom; broj uzoraka po grupi za oba gena: n = 26 (lipomi) i n = 17 (scWAT);  $p < 0,05$ .



**Grafik 22.** Poređenje relativne ekspresije gena *RUNX2* (a, b) i *BGLAP* (c, d) u uzorcima lipoma (a, c) i scWAT (b, d) po anatomskoj lokalizaciji; tačkasti grafikoni sa medijanom.

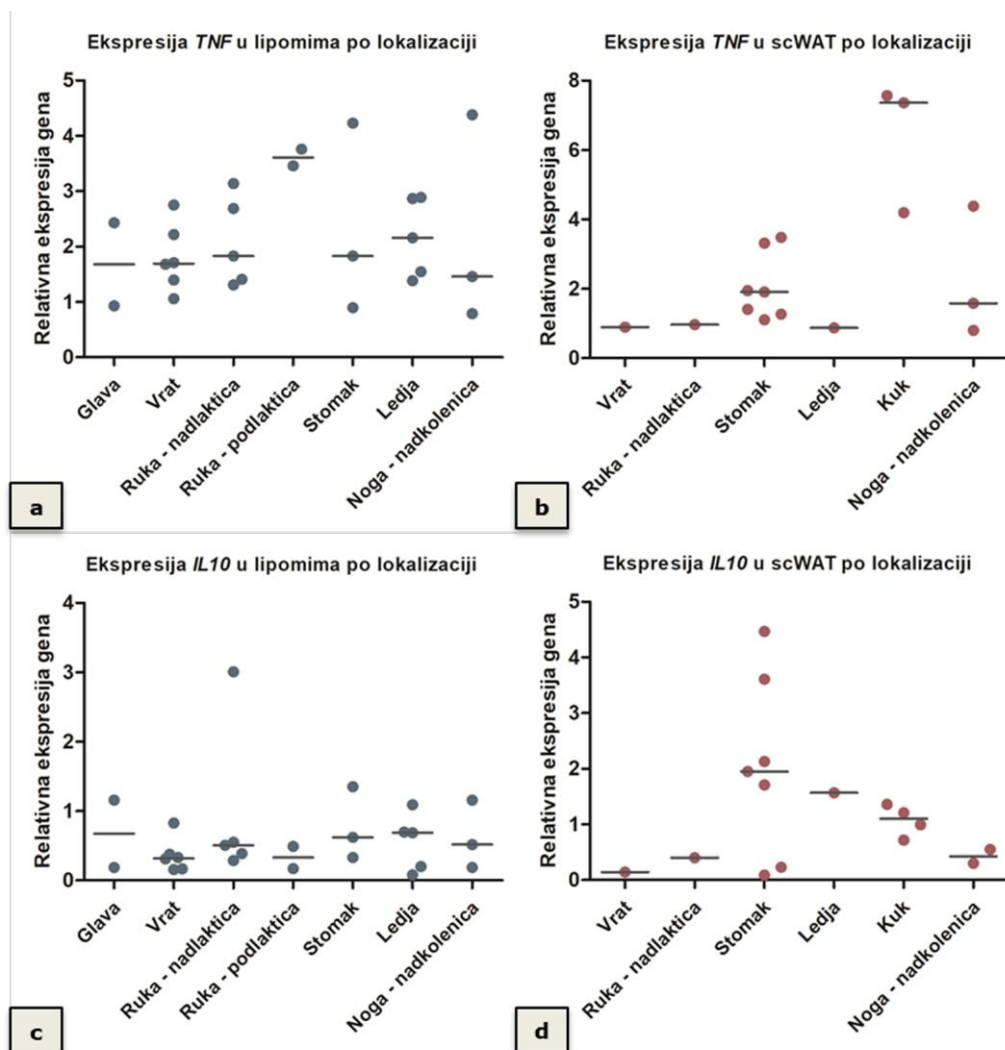
#### 4.5.4. Analiza ekspresije gena za citokine u tkivima

Ekspresija gena za proinflamacijski citokin  $TNF-\alpha$  (*TNF*) i anti-inflamacijski citokin IL-10 (*IL10*) je analizirana u uzorcima lipoma i scWAT i rezultati su prikazani na Grafiku 23. Nije uočena statistički značajna razlika u nivou ekspresije *TNF* gena između lipoma i scWAT (Grafik 23a), dok je ekspresija *IL10* značajno viša u grupi scWAT u odnosu na grupu lipoma (Grafik 23b).



**Grafik 23.** Relativna ekspresija gena za  $TNF-\alpha$  (*TNF*) (a) i IL-10 (*IL10*) (b), analizirana u uzorcima lipoma i scWAT; tačkasti grafikoni sa medijanom; broj uzoraka po grupi za oba gena:  $n = 26$  (lipomi) i  $n = 16$  (scWAT);  $p < 0,05$ .

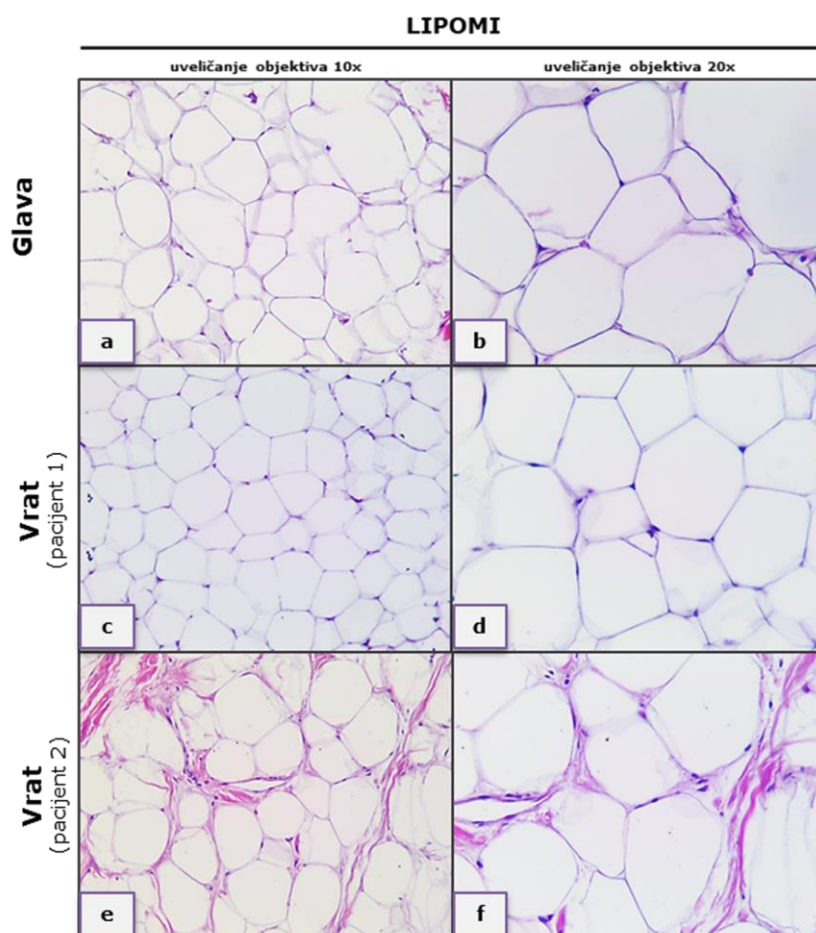
U poređenju ekspresije *TNF* i *IL10* u lipomima i scWAT po anatomskoj lokalizaciji (Grafik 24), uočene su razlike u ekspresiji, ali je statistički značajna razlika zapažena samo za ekspresiju *TNF* u uzorcima scWAT sa različitim lokalizacija (Grafik 24b).



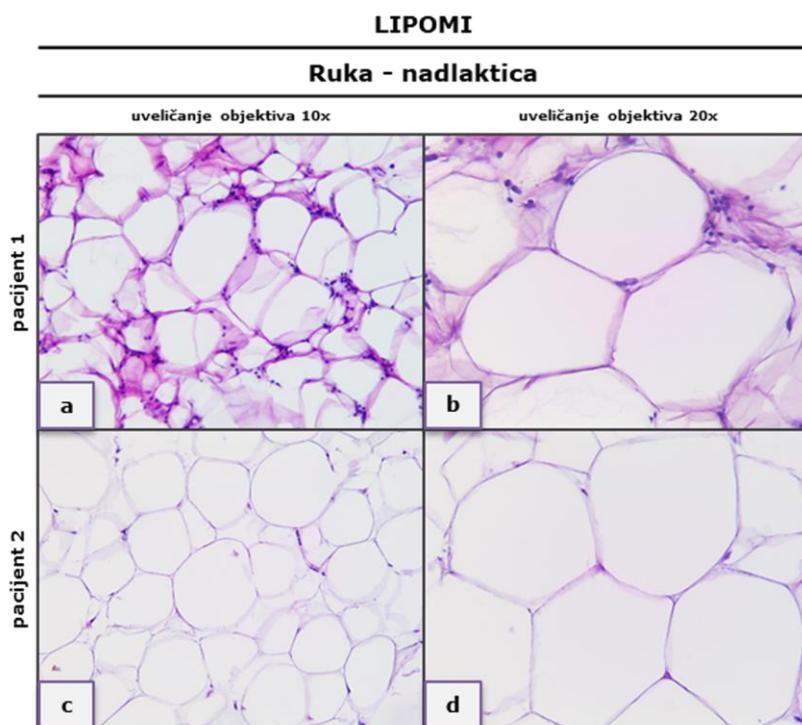
**Grafik 24.** Poređenje relativne ekspresije gena *TNF* (a, b) i *IL10* (c, d) u uzorcima lipoma (a, c) i scWAT (b, d) po anatomskoj lokalizaciji; tačkasti grafikoni sa medijanom.

#### 4.6. HISTOLOŠKA ANALIZA LIPOMA I MASNOG TKIVA

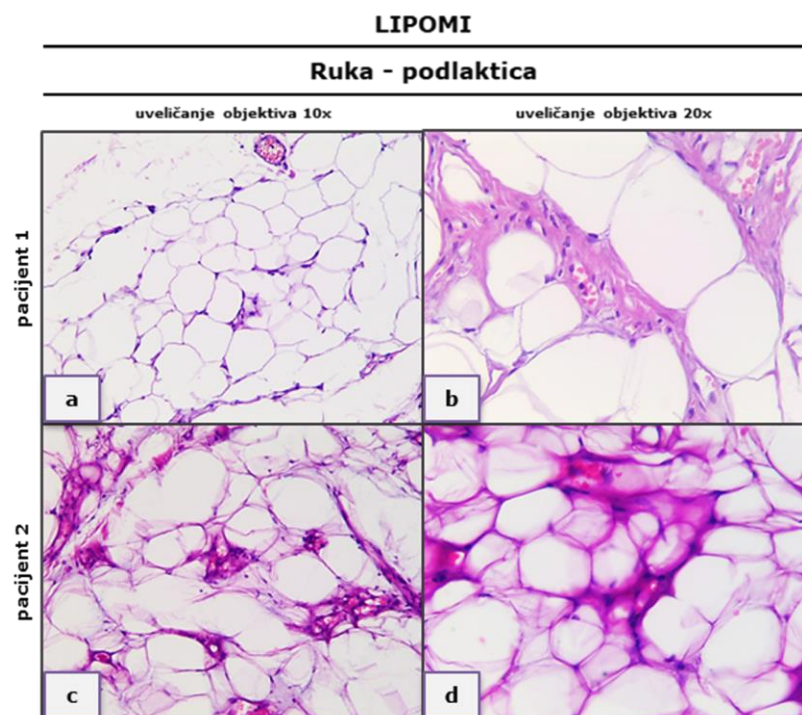
Deo uzoraka lipoma i scWAT je histološki obrađen i ukalupljen u parafinu ili aralditu, i nakon sečenja tkiva su obojena standardnom tehnikom bojenja tkiva hematoksilin-eozin (H&E) ili toluidin plavim. Svi uzorci lipoma koji su analizirani histološki, pregledani su od strane kliničkog patologa i okarakterisani su kao tipični lipomi, dok se u nekoliko slučajeva mogu uočiti tkivni elementi koji se javljaju kod ostalih tipova lipoma, pri čemu nijedan uzorak nije okarakterisan kao liposarkom. Na analiziranim presecima tkiva se uočavaju razlike u tkivnim strukturama uzoraka tkiva lipoma i scWAT. Razlike se ogledaju u obliku i veličini adipocita, prisustvu drugih tipova ćelija, broju i veličini krvnih sudova, kao i prisustvu i strukturi kolagena i organizaciji vanćelijskog prostora. Na Slikama 18 - 22 je prikazan izgled tkiva lipoma, dok je na Slikama 23 – 25 prikazan izgled scWAT sa različitim anatomskih lokalizacija u obe grupe, bojenih H&E metodom. U grupi lipoma generalno se može primetiti da postoje veće varijacije u obliku i veličini adipocita u odnosu na grupu scWAT. U lipomima se češće sreću infiltrati ćelija koje nalikuju ćelijama imunskog sistema. Prostor između adipocita u grupi lipoma je u mnogim uzorcima razvijeniji i bogatiji raznim tipovima ćelija i usnopljenim kolagenim vlaknima. Postoje razlike u izgledu tkiva sa različitim anatomskih lokalizacija i u grupi lipoma i u grupi scWAT, ali su prisutne i razlike u tkivima različitih pacijenata uzetih sa iste lokalizacije. U grupi scWAT se mogu zapaziti adipociti okruženi makrofagima koji formiraju karakteristične strukture nalik krunama (eng. – *crown-like structures* - CLS) (Slika 28i). Ovakve strukture se uočavaju i u analiziranim uzorcima lipoma ali ređe, iako se u pojedinim lipomima mogu videti krupni makrofagi pa i višejedarne džinovske ćelije (eng. *multinucleated giant cells* - MNGCs) oko adipocita.



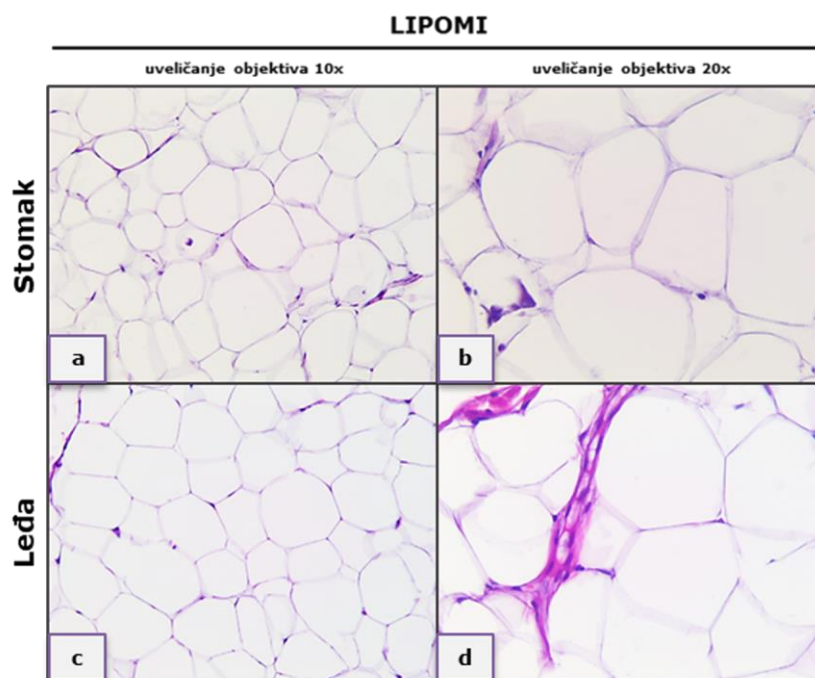
**Slika 18.** Tkivo lipoma sa glave (a, b) i vrata (c – f), bojeno hematoksilin-eozin (H&E) metodom; *bright field*, uveličanje objektivna 10x i 20x.



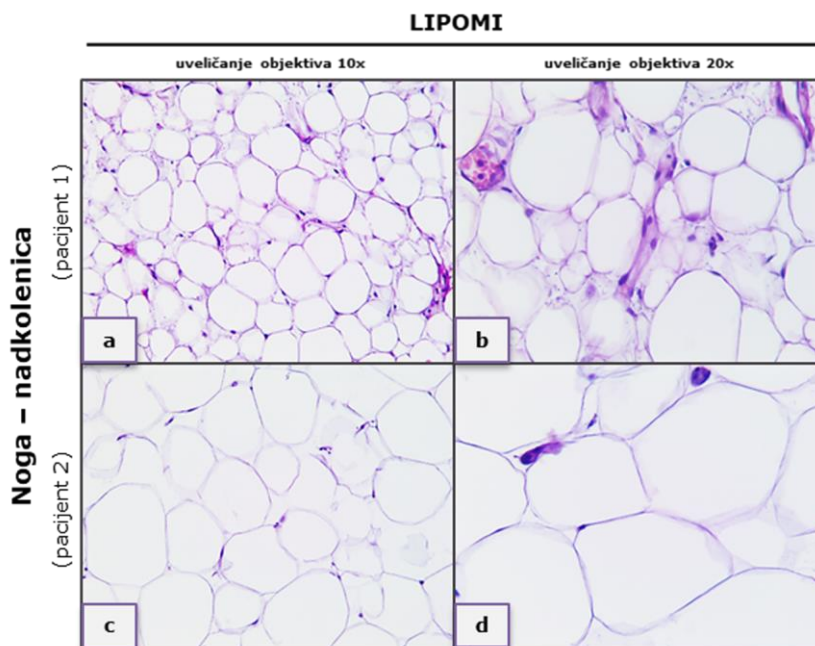
**Slika 19.** Tkivo lipoma sa nadlaktice (a - d) različitih pacijenata, bojeno H&E metodom ; *bright field*, uveličanje objektivna 10x i 20x.



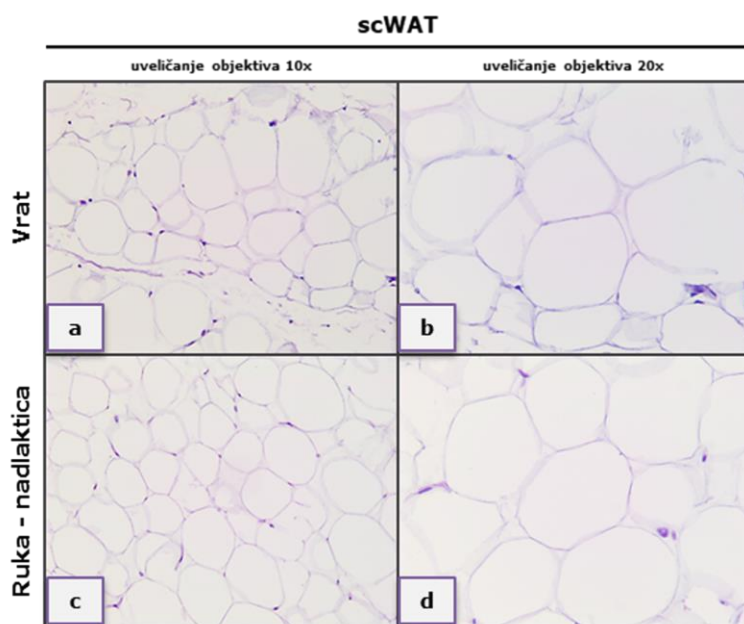
**Slika 20.** Tkivo lipoma sa podlaktice (a - d) različitih pacijenata, bojeno H&E metodom; *bright field*, uveličanje objektivna 10x i 20x.



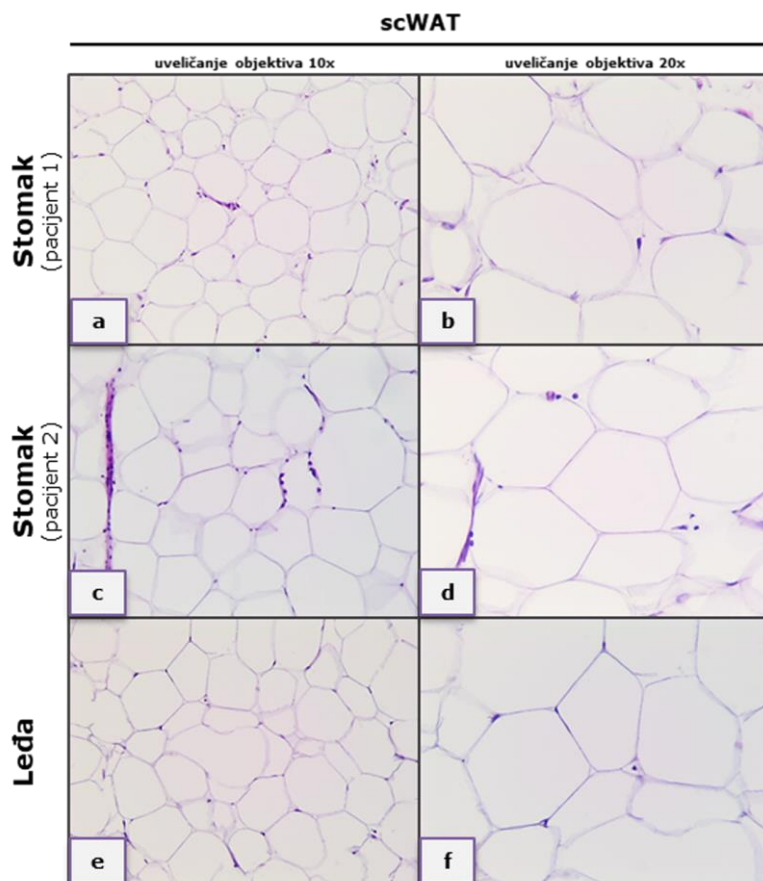
**Slika 21.** Tkivo lipoma sa stomaka (a, b) i leđa (c, d), bojeno H&E metodom; *bright field*, uveličanje objektivna 10x i 20x.



**Slika 22.** Tkivo lipoma sa nadkolenice različitih pacijenata, bojeno H&E metodom; *bright field*, uveličanje objektivna 10x i 20x.

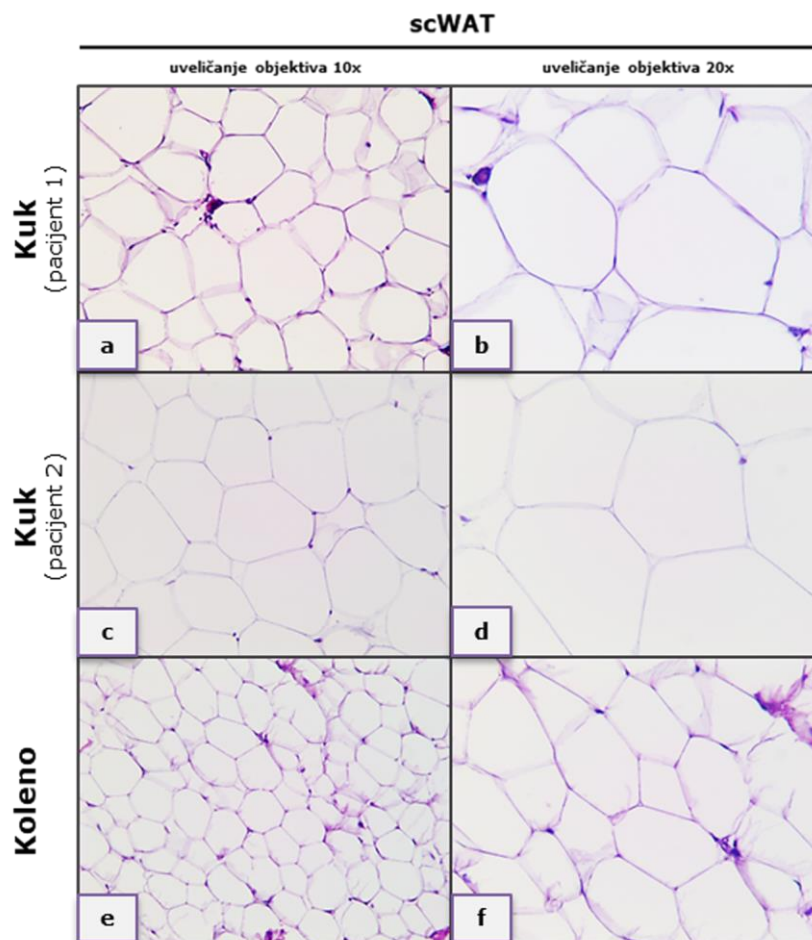


**Slika 23.** scWAT sa vrata (a, b) i nadlaktice (c, d), bojeno H&E metodom; *bright field*, uveličanje objektiva 10x i 20x.



**Slika 24.** scWAT sa stomaka različitih pacijenata (a – d) i leđa (e, f), bojeno H&E metodom; *bright field*, uveličanje objektiva 10x i 20x.



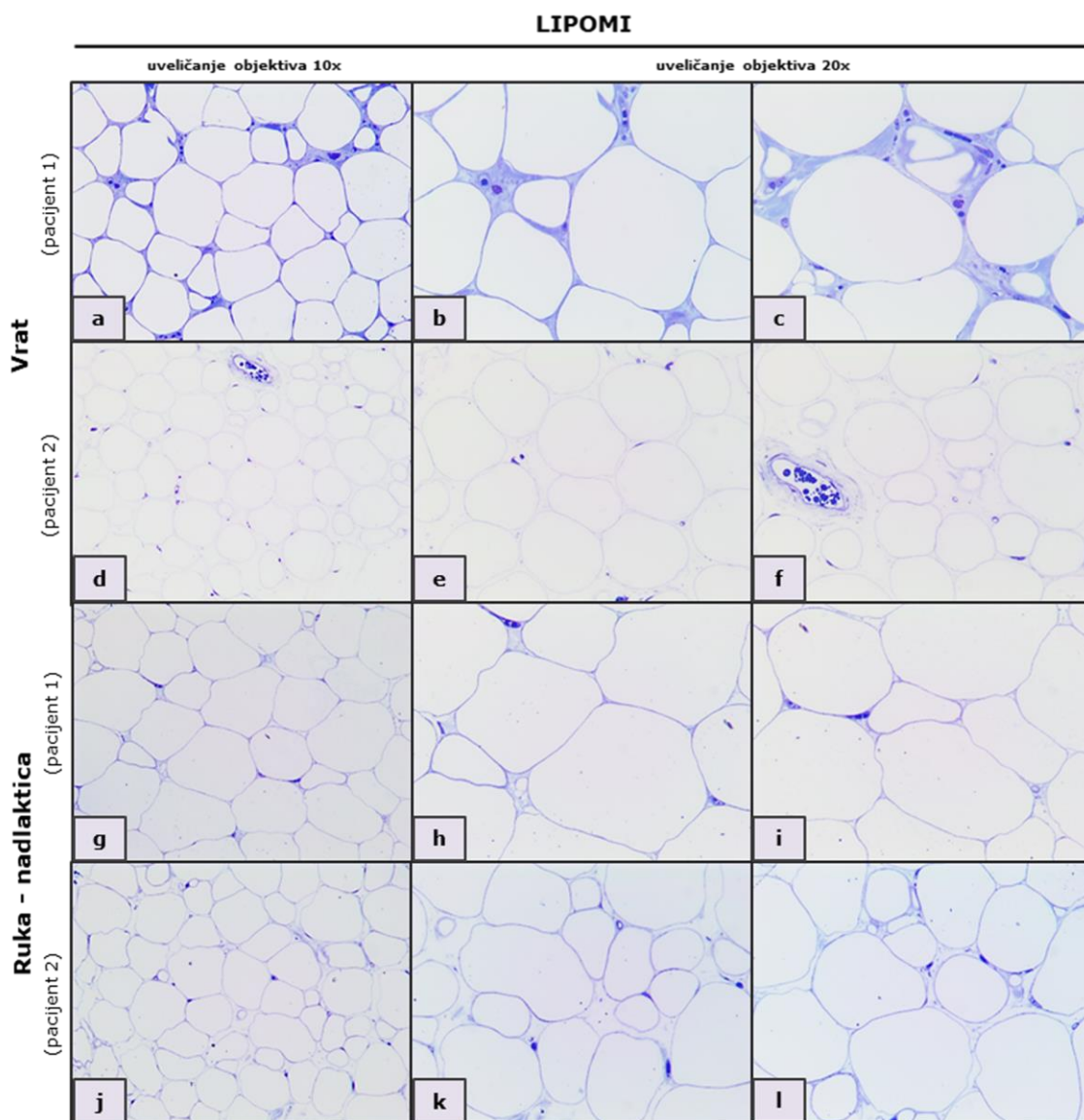


**Slika 25.** scWAT sa kuka različitih pacijenata (a – d) i kolena (e, f), bojeno H&E metodom; *bright field*, uveličanje objektiva 10x i 20x.

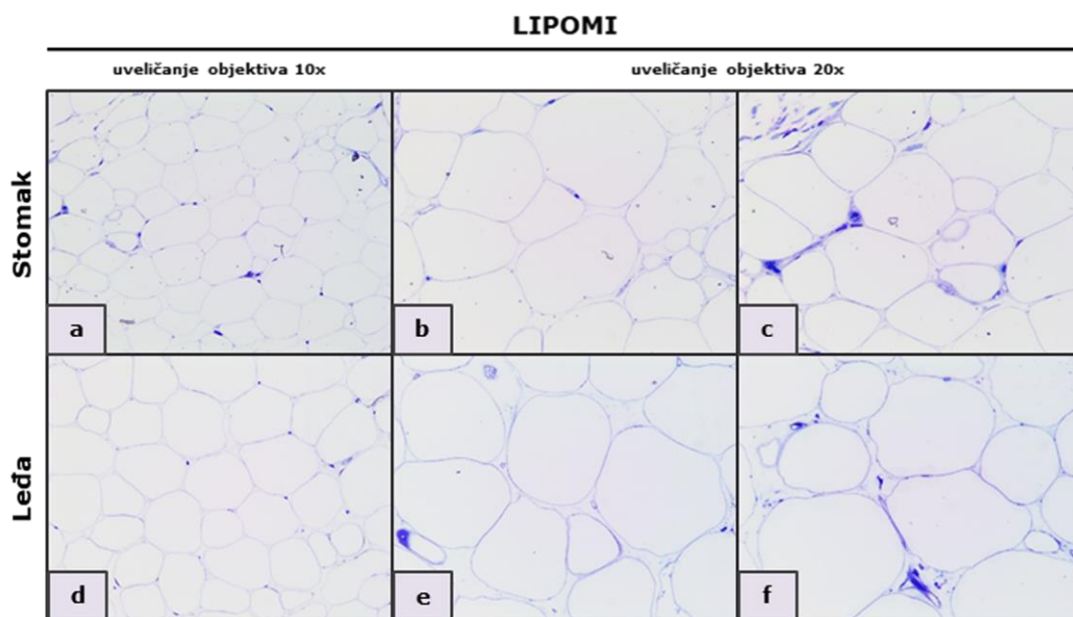
U grupi lipoma mogu se uočiti adipociti koji su veći, unilokulusni, okruglog ili višeučegaonog oblika, ali i manji unilokulusni kao i multilokulusni adipociti koji poseduju veći broj sitnih lipidnih tela i koji podsećaju na mrke adipocite. U grupi scWAT adipociti su unilokulusni i veći, okruglog ili višeučegaonog oblika.

Na Slikama 26 i 27 je prikazan izgled preseka tkiva lipoma sa nekoliko anatomskih lokalizacija, bojenih toluidin plavim, dok je na Slici 28 prikazan izgled preseka scWAT bojenih toluidin plavim. Mogu se uočiti slične strukture i tipovi ćelija koji su prisutni u tkivu kao i na presecima bojenim H&E bojenjem.. Adipociti su različitijeg oblika i veličine u uzorcima lipoma u odnosu na scWAT i kolagena vlakna su prisutna u većoj količini u uzorcima lipoma u odnosu na scWAT. U scWAT se mogu uočiti CLS sa izrazito krupnim makrofagima. Krvni sudovi različitog oblika i veličine se sreću i u grupi lipoma i u grupi

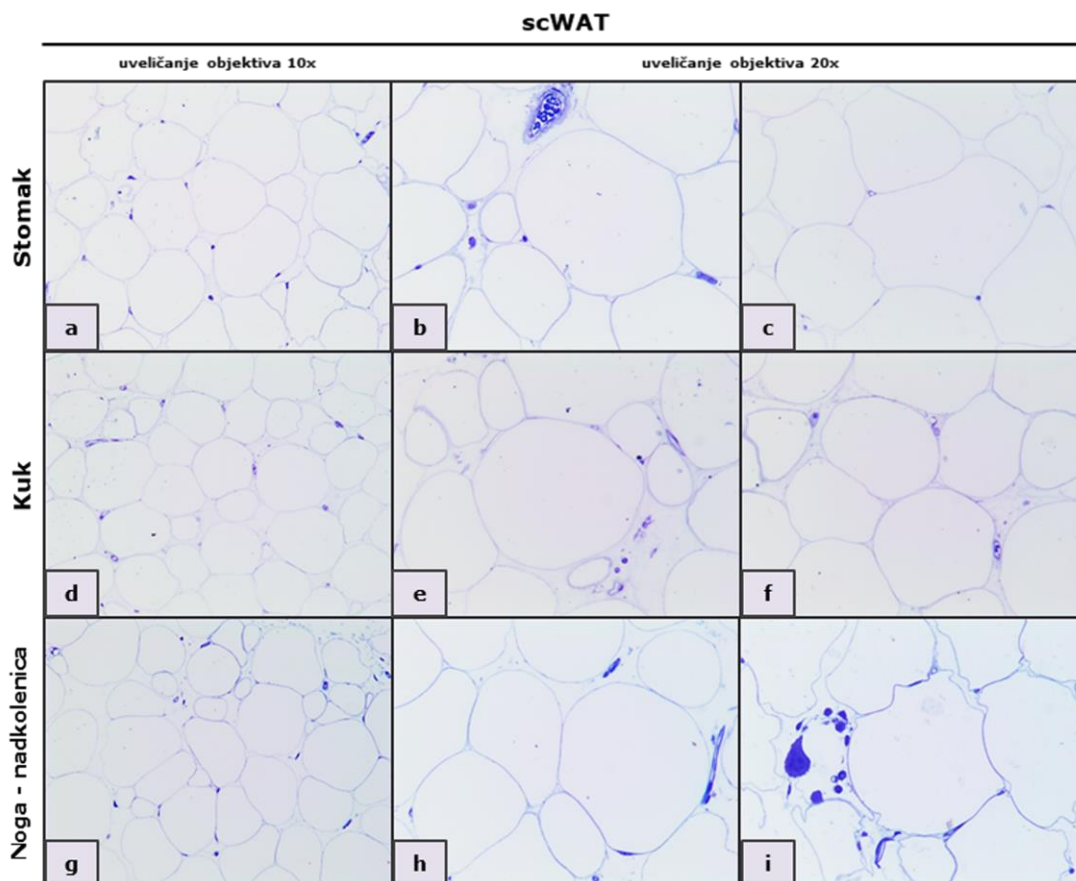
scWAT i može se uočiti da postoji razlika u obe grupe u odnosu na anatomsku lokalizaciju sa koje su uzeti uzorci tkiva.



**Slika 26.** Tkivo lipoma različitih pacijenata, sa vrata (a – f) i nadlaktice (g - l), bojeno toluidin plavim; *bright field*, uveličanje objektiva 10x (a, d, g, j) i 20x (b, c, e, f, h, i, k, l).



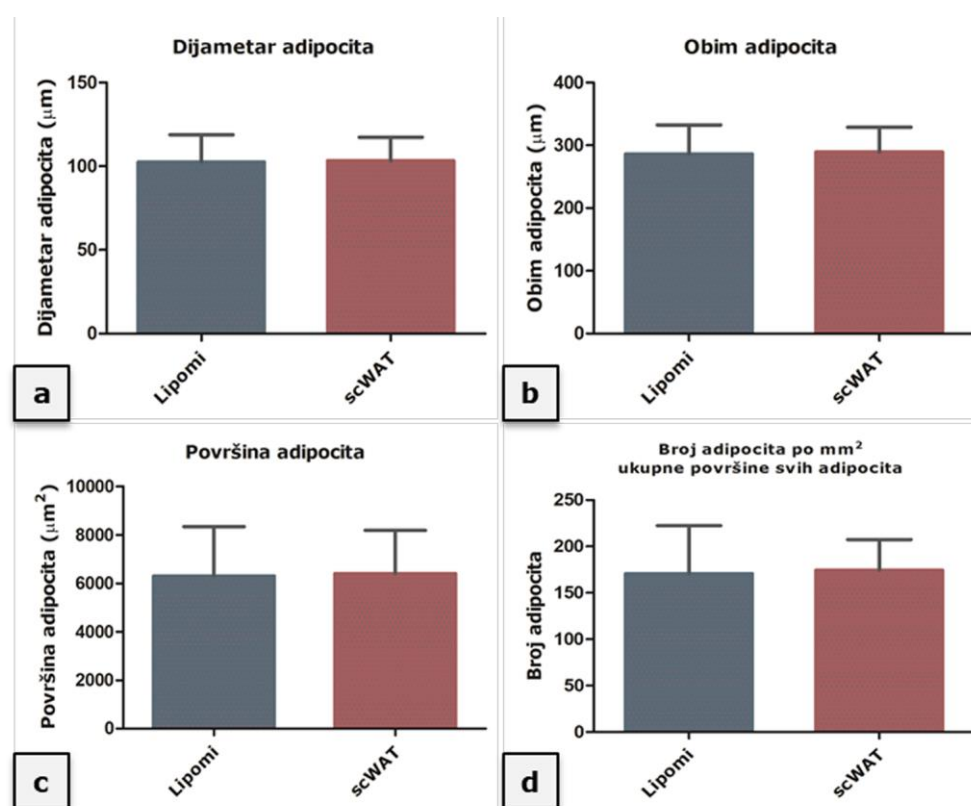
**Slika 27.** Tkivo lipoma sa stomaka (a – c) i leđa (d - f), bojeno toluidin plavim; *bright field*, uveličanje objektiva 10x (a, d) i 20x (b, c, e, f).



**Slika 28.** scWAT sa stomaka (a – c), kuka (d – f) i nadkolenice (g - i), bojeno toluidin plavim; *bright field*, uveličanje objektiva 10x (a, d, g) i 20x (b, c, e, f, h, i).

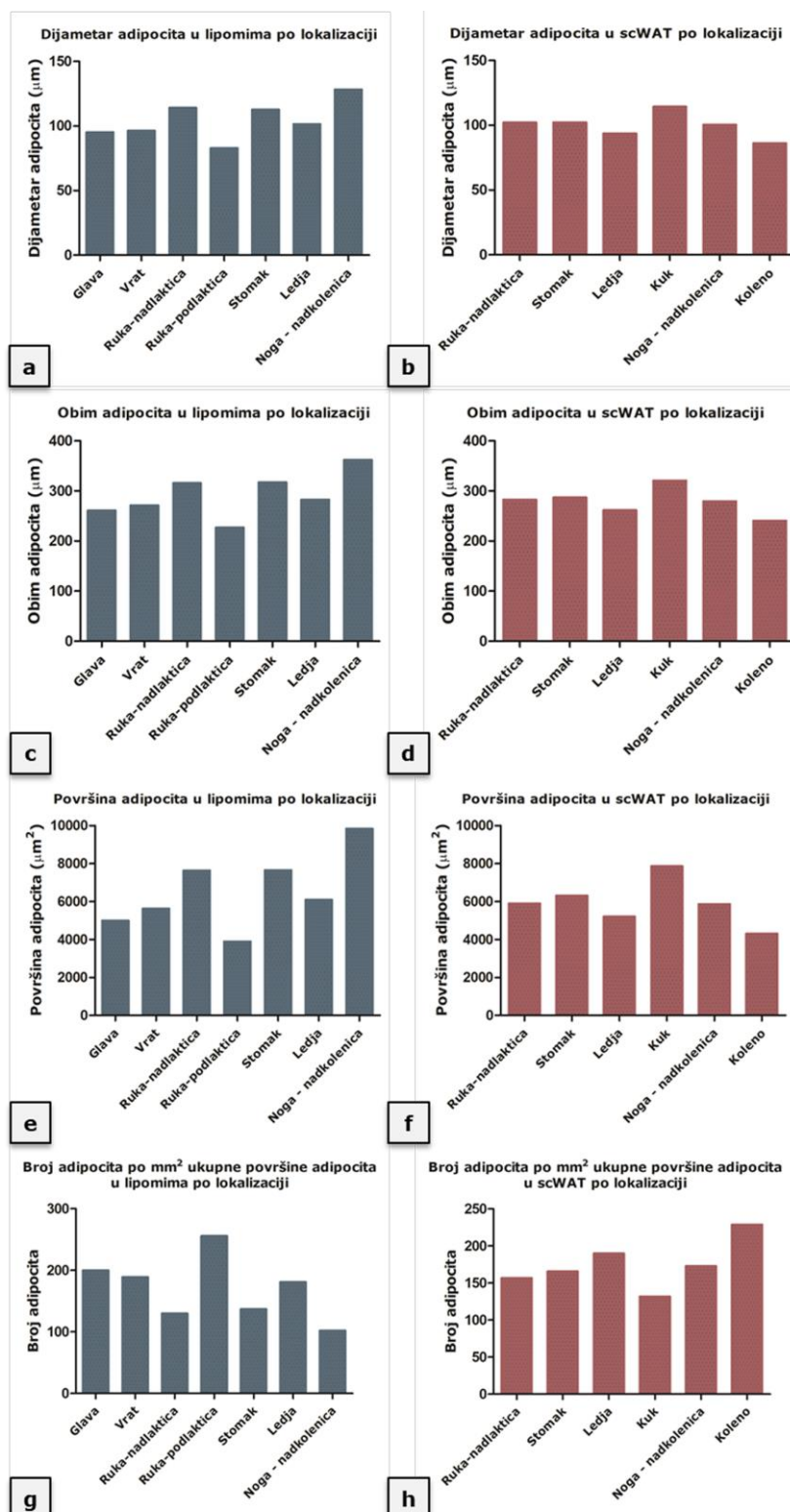
#### 4.7. HISTOMORFOMETRIJSKA ANALIZA TKIVA

Histomorfometrijska analiza tkiva lipoma i scWAT je urađena nakon H&E bojenja preseka tkiva i mereni su i analizirani sledeći parametri: dijametar adipocita ( $\mu\text{m}$ ), obim adipocita ( $\mu\text{m}$ ), površina adipocita ( $\mu\text{m}^2$ ), broj adipocita po  $\text{mm}^2$  ukupne površine svih izmerenih adipocita, kao i opseg veličine adipocita (na osnovu dijametra i površine). Rezultati histomorfometrijske analize su prikazani na Grafcima 25 - 27. Nije uočena statistički značajna razlika u analiziranim parametrima adipocita između grupe lipoma i grupe scWAT (Grafik 25).



**Grafik 25.** Histomorfometrijski parametri tkiva lipoma i scWAT; dijametar adipocita (a), obim adipocita (b), površina adipocita (c) i broj adipocita na ukupnoj površini svih izmerenih adipocita (d); rezultati su prikazani kao  $AS \pm SD$ .

Analizirani parametri su poređeni po lokalizaciji ispitivanih lipoma i scWAT i rezultati su prikazani na Grafiku 26. Uočene su razlike u izmerenim parametrima između uzoraka sa različitim anatomskih lokalizacija obe ispitivane grupe, ali su razlike bile izraženije u grupi lipoma u odnosu na scWAT, iako ni u jednom slučaju nije pronađena statistički značajna razlika.

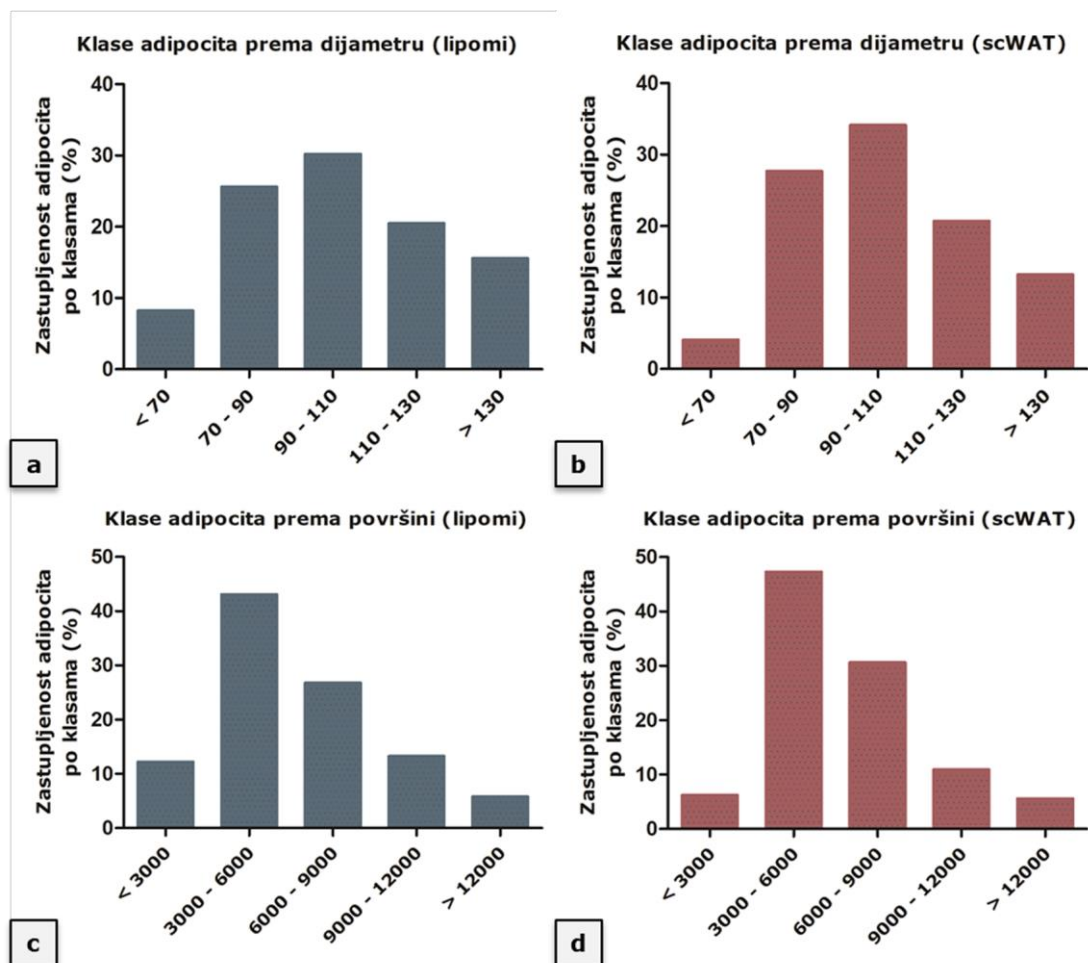


**Grafik 26.** Poređenje histomorfometrijskih parametara tkiva lipoma i scWAT različitih anatomskih lokalizacija; dijametar adipocita u lipomima (a) i scWAT (b), obim adipocita u lipomima (c) i scWAT (d), površina adipocita u lipoma (e) i scWAT (f) i broj adipocita na ukupnoj površini svih izmerenih adipocita u lipomima (g) i scWAT (h); rezultati su prikazani kao aritmetička sredina.

Na osnovu izmerenih parametara veličine adipocita (dijametra i površine), adipociti su podeljeni u klase po veličini i to u po pet klasa za oba parametra (Grafik 27). Klase adipocita po dijametru su: I) do 70  $\mu\text{m}$ , II) od 70 do 90  $\mu\text{m}$ , III) od 90 do 110  $\mu\text{m}$ , IV) od 110 do 130  $\mu\text{m}$  i V) preko 130  $\mu\text{m}$ . Klase adipocita po površini su: I) do 3000  $\mu\text{m}^2$ , II) od 3000 do 6000  $\mu\text{m}^2$ , III) od 6000 do 9000  $\mu\text{m}^2$ , IV) od 9000 do 12000  $\mu\text{m}^2$  i V) preko 12000  $\mu\text{m}^2$ . Razlike u zastupljenosti ćelija po klasama se mogu uočiti između grupe lipoma i grupe scWAT, iako one nisu statistički značajne. U grupi lipoma je veći broj adipocita prisutan u prvoj i poslednjoj klasi (najmanji i najveći adipociti) u odnosu na scWAT u istim klasama. U obe ispitivane grupe je najveći broj adipocita koji se po veličini mogu svrstati u srednje klase. U grupi lipoma je opseg varijacija (od minimuma do maksimuma) u dijametru, obimu i površini adipocita veći u odnosu na grupu scWAT, što se može videti u Tabeli 15.

**Tabela 15.** Opseg variranja veličine adipocita u grupama lipoma i scWAT.

Grupa		Dijametar ( $\mu\text{m}$ )	Obim ( $\mu\text{m}$ )	Površina ( $\mu\text{m}^2$ )
Lipomi	minimum	38,45	106,27	781,21
	maksimum	227,49	634,45	28060,63
scWAT	minimum	54,73	161,73	1909,22
	maksimum	196,34	564,09	24417,61

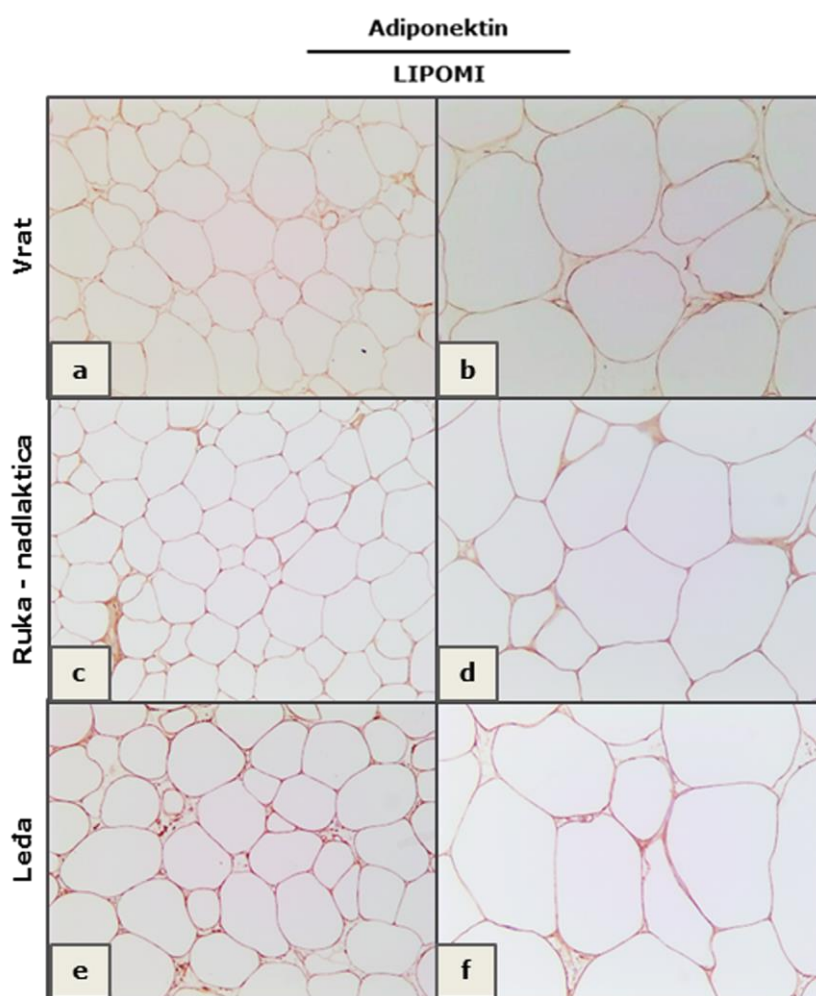


**Grafik 27.** Veličina adipocita po klasama u grupi lipoma (a, c) i scWAT (b, d); zastupljenost adipocita (%) po klasama prema dijimetru (u  $\mu\text{m}$ ) (a, b) i prema površini (u  $\mu\text{m}^2$ ) (c, d); rezultati su prikazani kao aritmetička sredina.

#### 4.8. IMUNOHISTOHEMIJSKA ANALIZA TKIVA

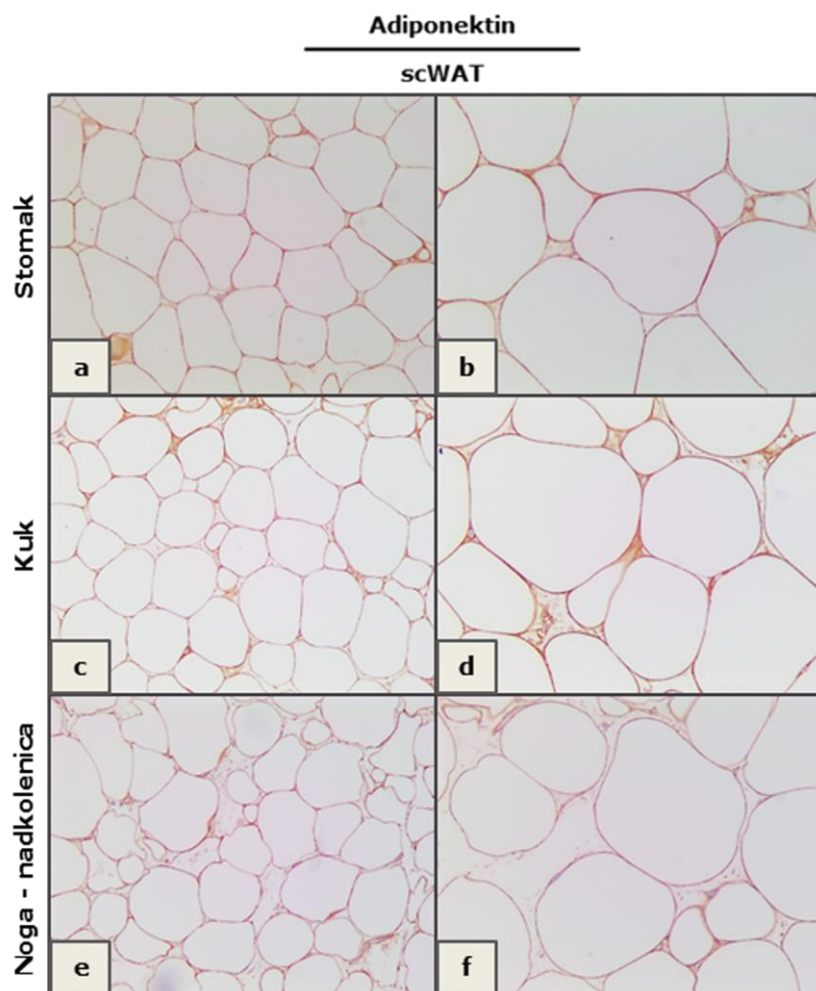
Imunoekspresija adiponektina, leptina i receptora za leptin, koji predstavljaju markere adipogeneze i belog masnog tkiva, analizirana je u uzorcima lipoma i scWAT.

Jaka imunoekspresija adiponektina, leptina i receptora za leptin je uočena u svim analiziranim uzorcima lipoma i scWAT, bez značajnijih razlika, a rezultati su prikazani na Slikama 29 - 34. Analizirana je imunoekspresija ovih markera u uzorcima tkiva lipoma i scWAT sa nekoliko različitih lokalizacija i jaka imunoekspresija je zabeležena u svim analiziranim uzorcima.

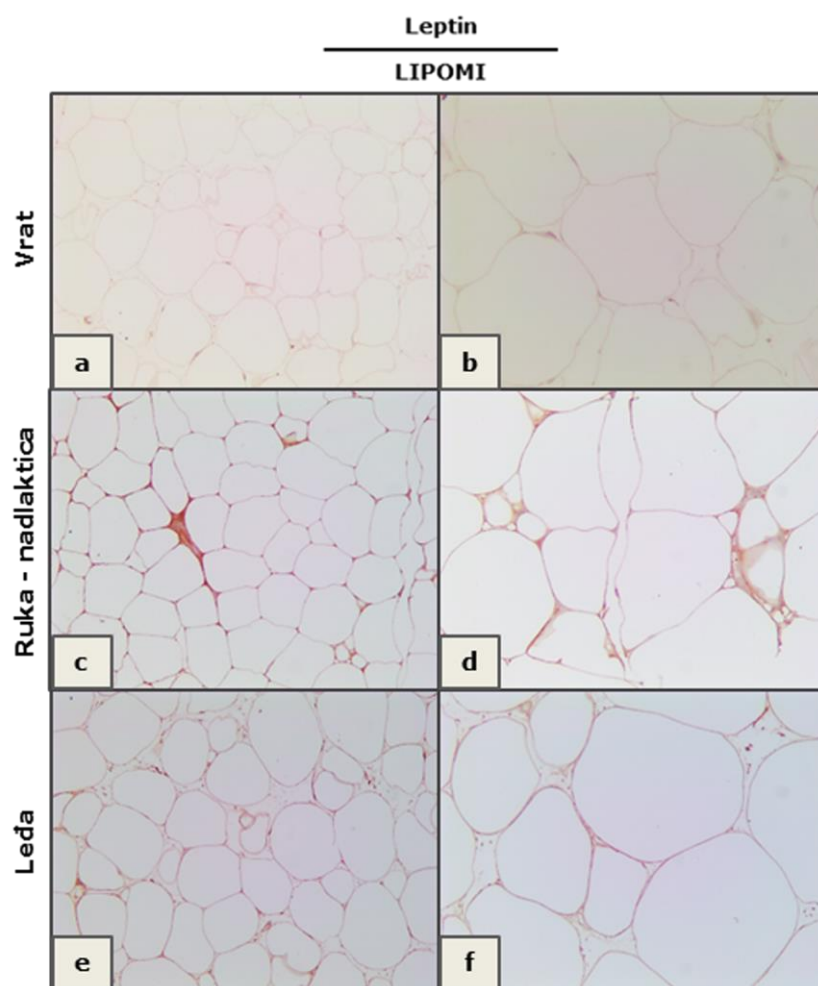


**Slika 29.** Imunoekspresija adiponektina u uzorcima lipoma (a – f) različitih anatomskih lokalizacija; braon boja ukazuje na pozitivno obojene strukture i ćelije; *bright field*, uveličanje objektiva 10x (a, c, e) i 20x (b, d, f).

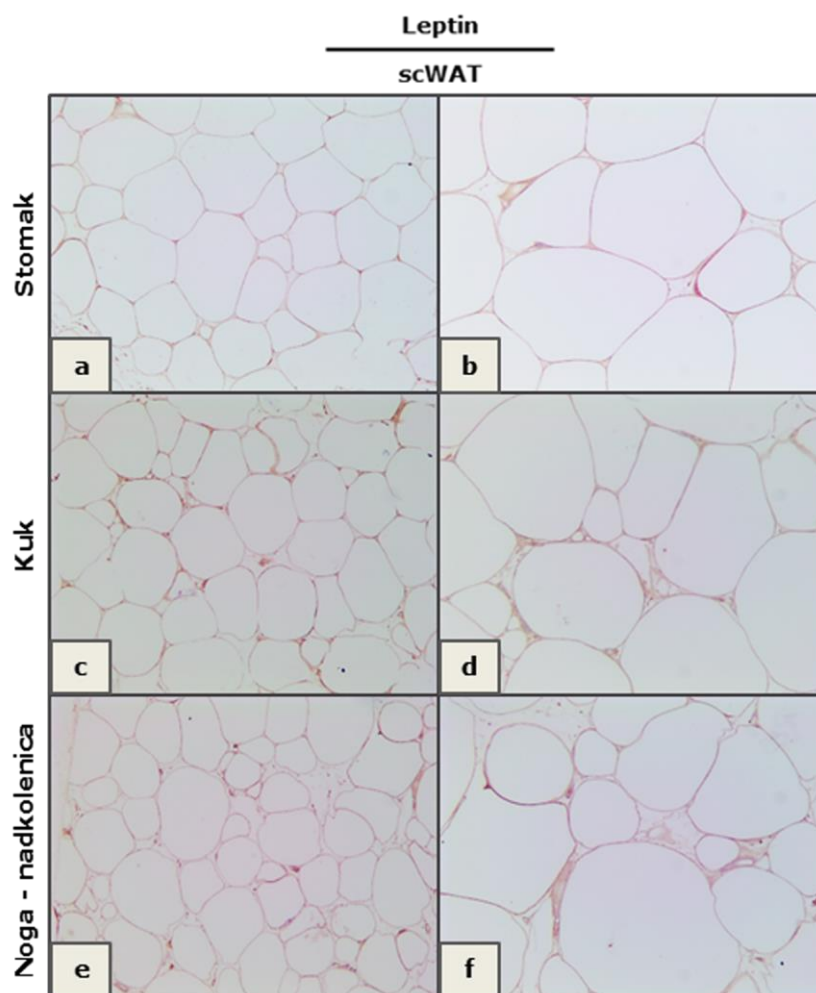




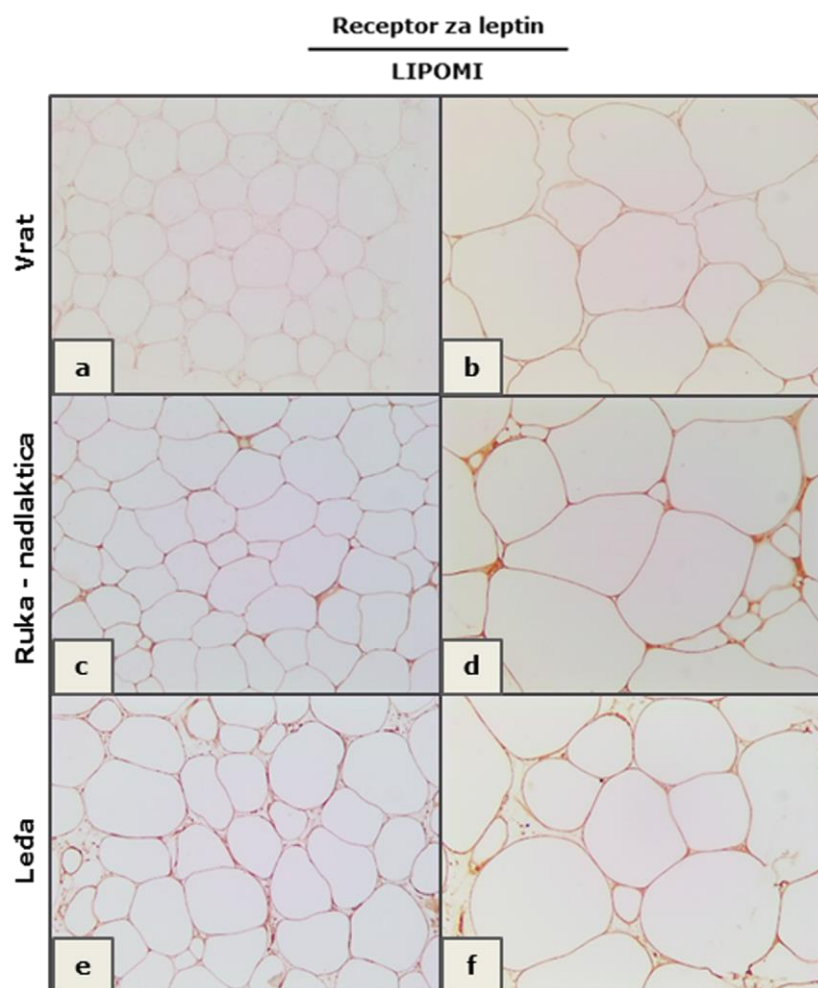
**Slika 30.** Imunoekspresija adiponektina u uzorcima scWAT (a – f) različitih anatomskih lokalizacija; braon boja ukazuje na pozitivno obojene strukture i ćelije; *bright field*, uveličanje objektiva 10x (a, c, e) i 20x (b, d, f).



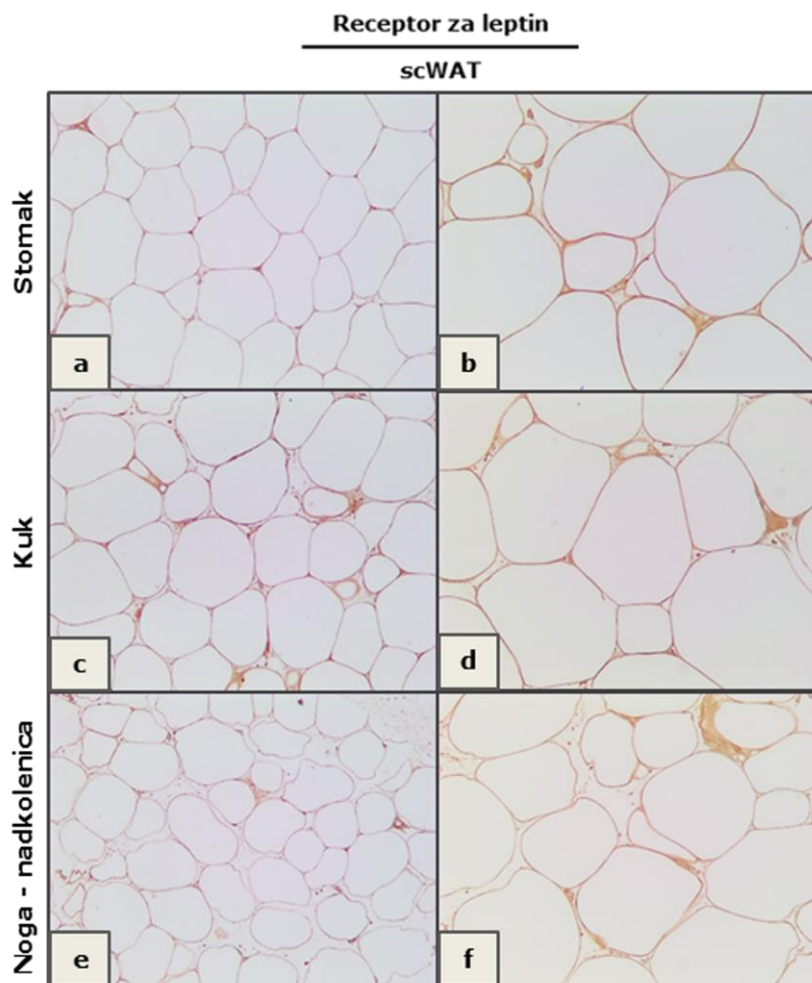
**Slika 31.** Imunoekspresija leptina u uzorcima lipoma (a – f) različitih anatomskih lokalizacija; braon boja ukazuje na pozitivno obojene strukture i ćelije; *bright field*, uveličanje objektivna 10x (a, c, e) i 20x (b, d, f).



**Slika 32.** Imunoekspresija leptina u uzorcima scWAT (a – f) različitih anatomskih lokalizacija; braon boja ukazuje na pozitivno obojene strukture i ćelije; *bright field*, uveličanje objektiva 10x (a, c, e) i 20x (b, d, f).

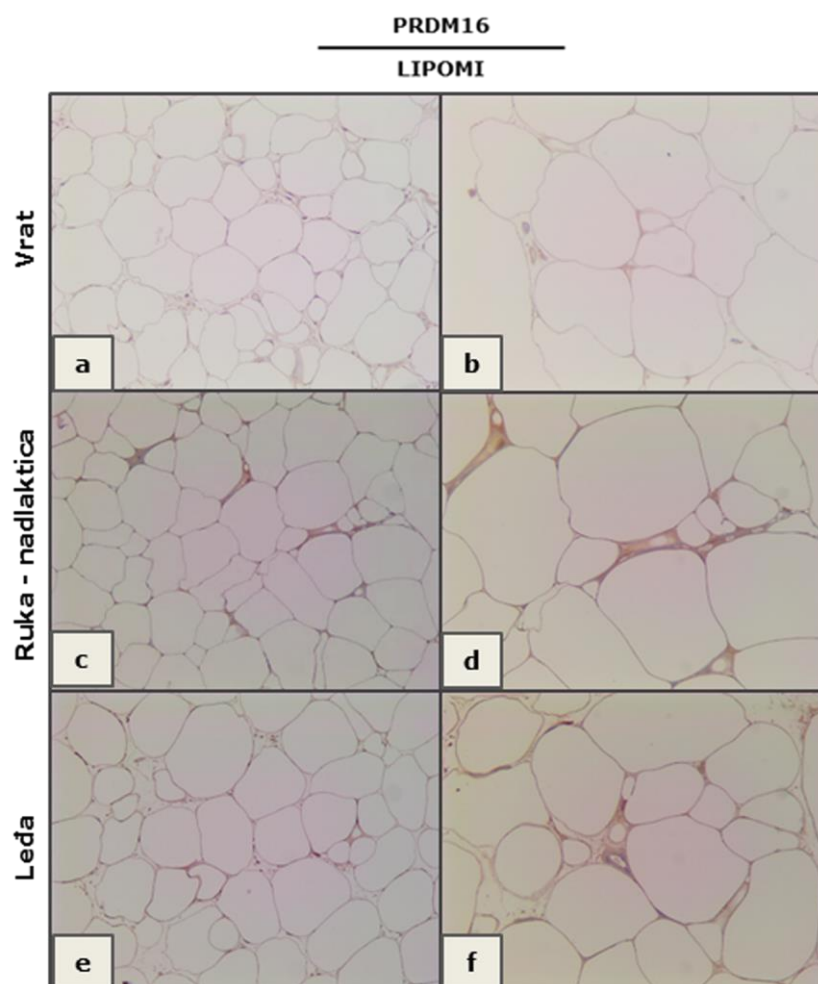


**Slika 33.** Imunoekspresija receptora za leptin u uzorcima lipoma (a – f) različitih anatomskih lokalizacija; braon boja ukazuje na pozitivno obojene strukture i ćelije; *bright field*, uveličanje objektivna 10x (a, c, e) i 20x (b, d, f).

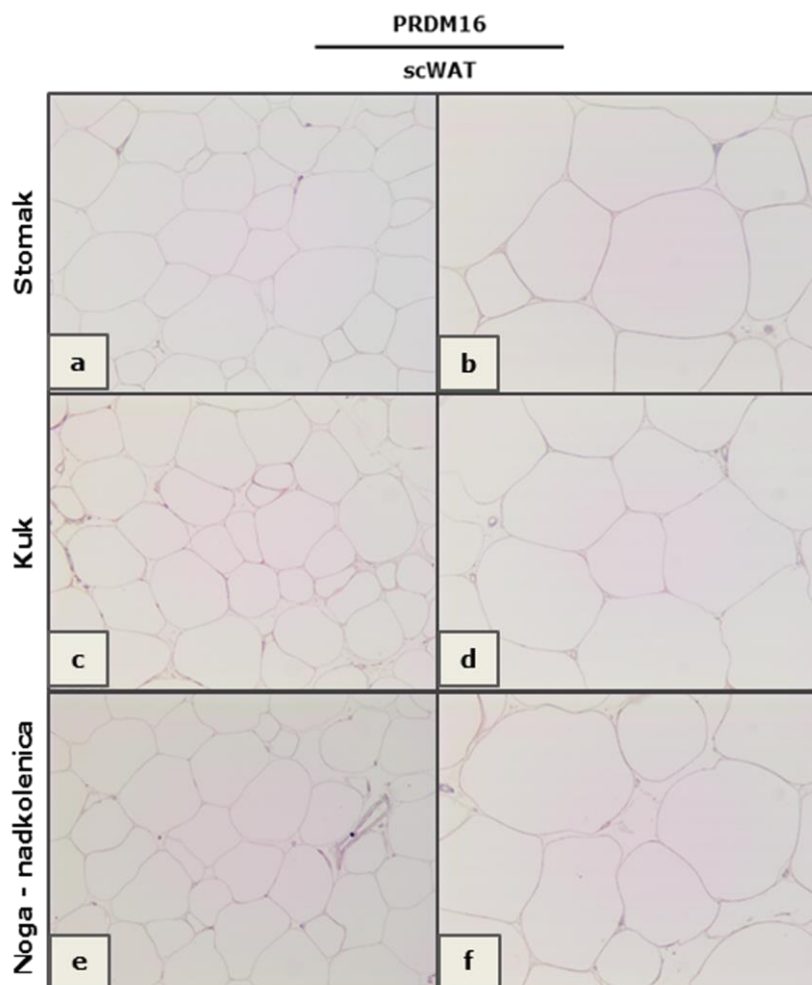


**Slika 34.** Imunoekspresija receptora za leptin u uzorcima scWAT (a – f) različitih anatomskih lokalizacija; braon boja ukazuje na pozitivno obojene strukture i ćelije; *bright field*, uveličanje objektiva 10x (a, c, e) i 20x (b, d, f).

Imunoekspresija PRDM16 (eng. *PR domain containing 16*), markera mrkih adipocita i mrkog masnog tkiva, analizirana je u uzorcima lipoma i scWAT sa nekoliko različitih lokalizacija. Jača imunoekspresija PRDM16 je uočena u uzorcima lipoma (Slika 35) u odnosu na scWAT (Slika 36). Intenzivna obojenost, tj. izrazita pozitivnost se može uočiti u multilokulusnim adipocitima i preadipocitima prisutnim u analiziranim uzorcima lipoma sa nadlaktice i leđa (Slika 35d, f).

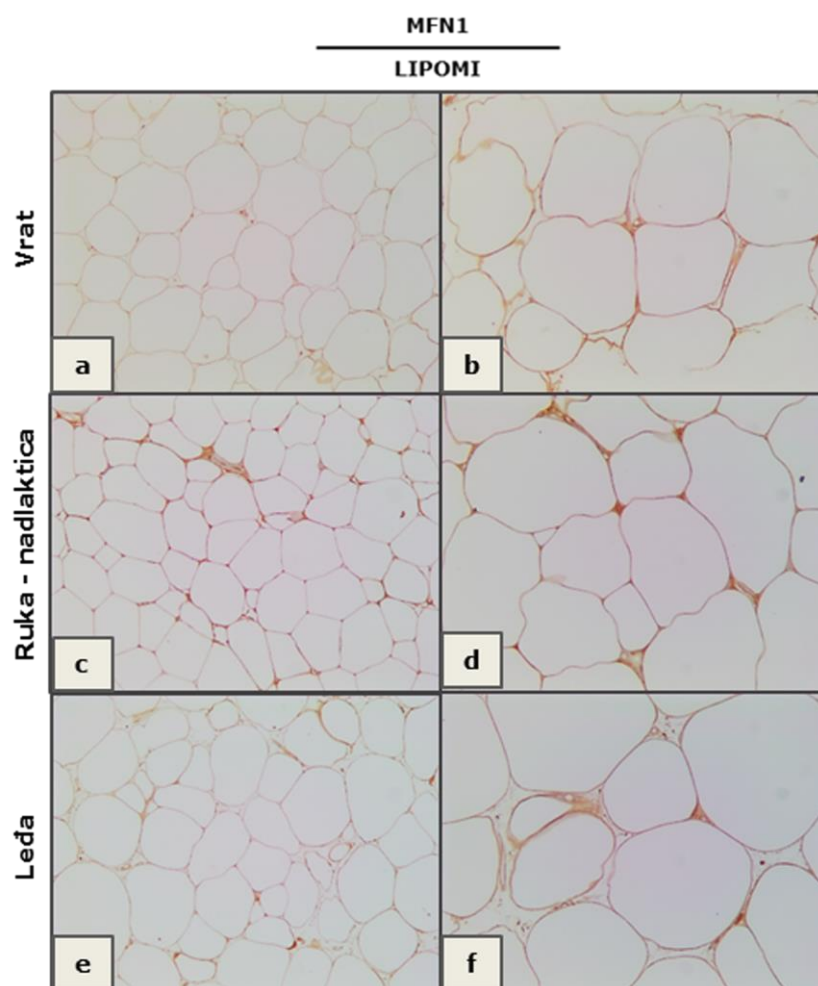


**Slika 35.** Imunoekspresija PRDM16 u uzorcima lipoma (a – f) različitih anatomskih lokalizacija; braon boja ukazuje na pozitivno obojene strukture i ćelije; *bright field*, uveličanje objektivna 10x (a, c, e) i 20x (b, d, f).



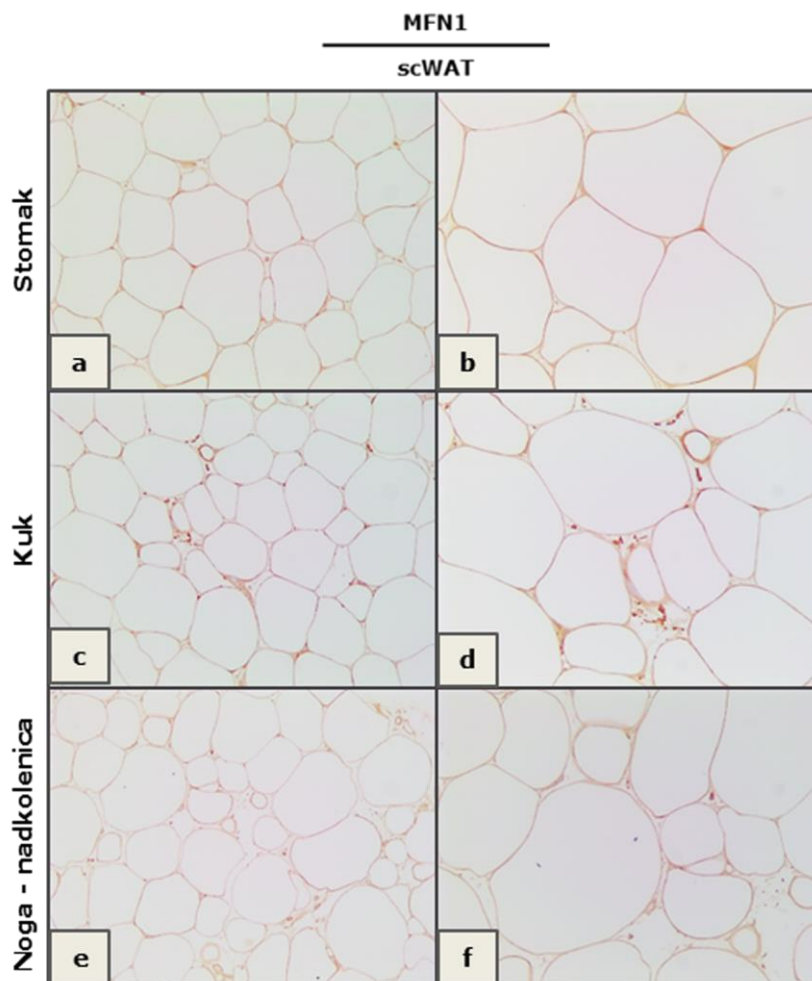
**Slika 36.** Imunoekspresija PRDM16 u uzorcima scWAT (a – f) različitih anatomskih lokalizacija; braon boja ukazuje na pozitivno obojene strukture i ćelije; *bright field*, uveličanje objektivna 10x (a, c, e) i 20x (b, d, f).

MFN1 (eng. *mitofusin 1*), protein spoljašnje membrane mitohondrija koji ima ulogu u grupisanju i fuziji mitohondrija, analiziran je u uzorcima tkiva lipoma i scWAT sa nekoliko različitih anatomskih lokalizacija. Uočena je jaka imunoekspresija MFN1 u analiziranim uzorcima i lipoma i scWAT, pri čemu je nešto više polja jake pozitivnosti uočeno u uzorcima analiziranih lipoma (Slika 37) nego u uzorcima scWAT (Slika 38).



**Slika 37.** Imunoekspresija MFN1 u uzorcima lipoma (a – f) različitih anatomskih lokalizacija; braon boja ukazuje na pozitivno obojene strukture i ćelije; *bright field*, uveličanje objektivna 10x (a, c, e) i 20x (b, d, f).

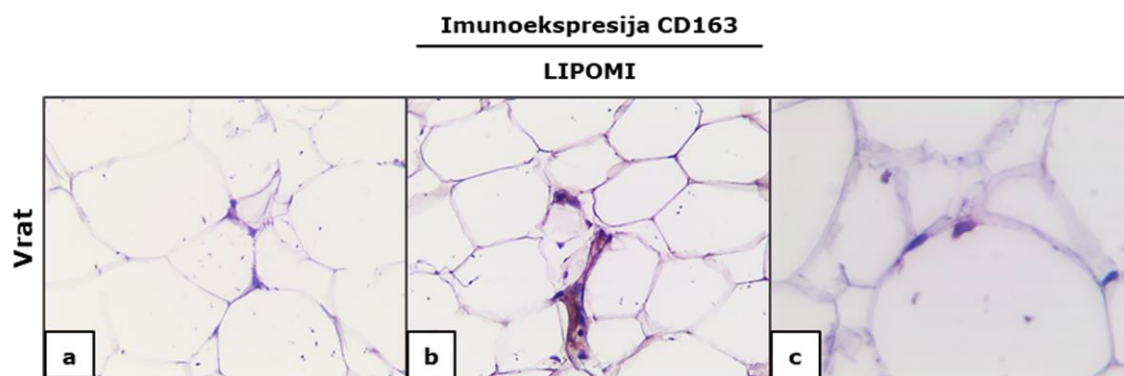




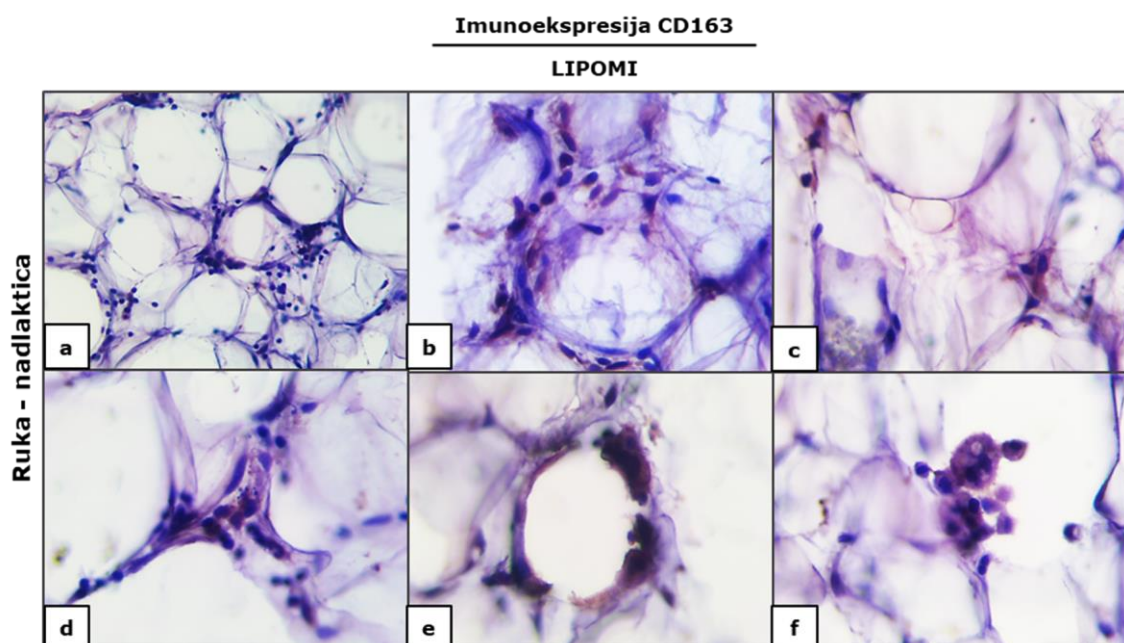
**Slika 38.** Imunoekspresija MFN1 u uzorcima scWAT (a – f) različitih anatomskih lokalizacija; braon boja ukazuje na pozitivno obojene strukture i ćelije; *bright field*, uveličanje objektiva 10x (a, c, e) i 20x (b, d, f).

U uzorcima lipoma i scWAT je analizirano prisustvo makrofaga imunohistohemijskim bojenjem. Analizirani su markeri CD40 (marker M1 makrofaga ili klasično aktiviranih makrofaga) i CD163 (marker M2 makrofaga ili alternativno aktiviranih makrofaga). Generalno, prisutno je više ćelijskih infiltrata u kojima se uočavaju makrofagi u tkivu lipoma u odnosu na scWAT.

U uzorcima lipoma su prisutni CD163 pozitivni makrofagi u većem broju u odnosu na scWAT. U lipomima se mogu uočiti CD163 pozitivne jednojedarne ćelije u poljima većih nakupina ćelija kao i CD163 pozitivne višejedarne ćelije i MNGCs koje okružuju adipocite u vidu CLS (Slike 39 – 42).

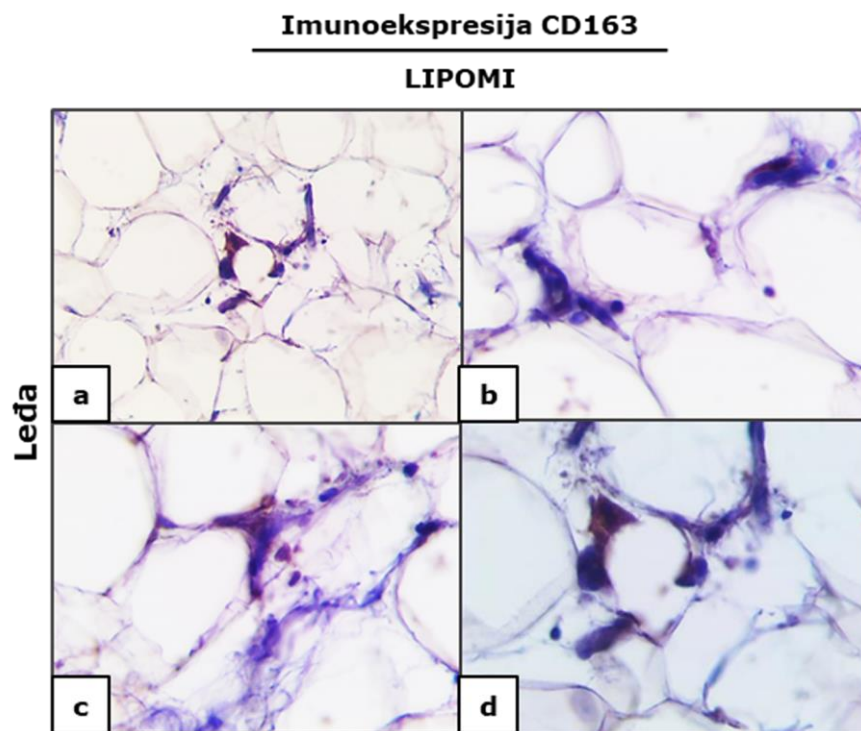


**Slika 39.** Imunoekspresija CD163 u uzorku lipoma sa vrata; braon boja ukazuje na pozitivno obojene makrofage; *bright field*, uveličanje objektiva 20x (a, b) i 40x (c).

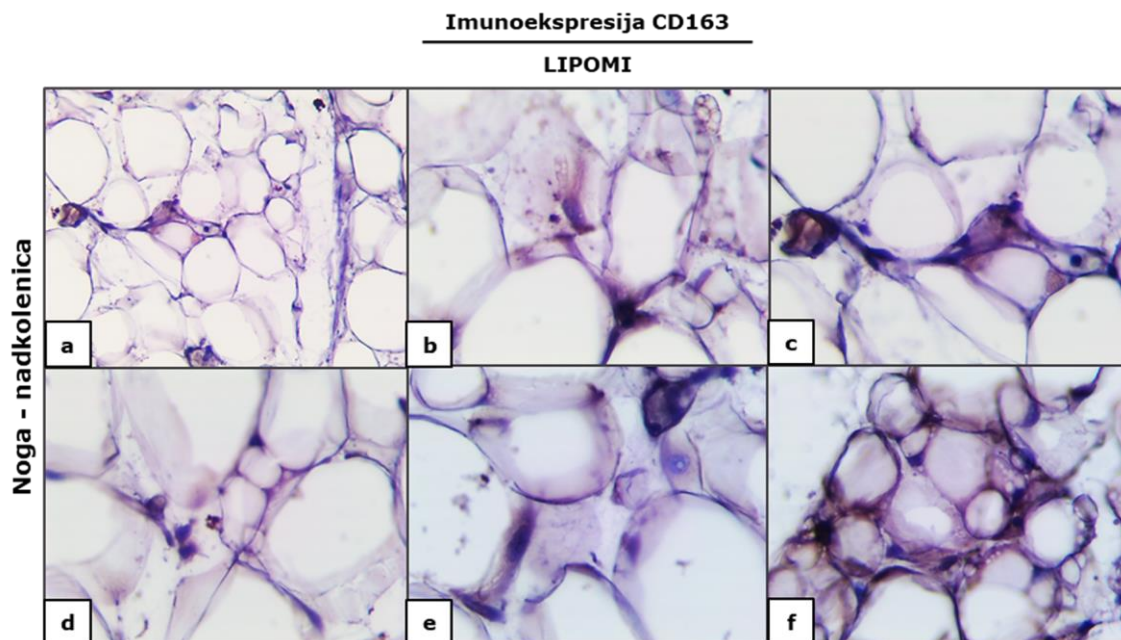


**Slika 40.** Imunoekspresija CD163 u uzorku lipoma sa nadlaktice; braon boja ukazuje na pozitivno obojene makrofage; *bright field*, uveličanje objektiva 20x (a) i 40x (b - f).

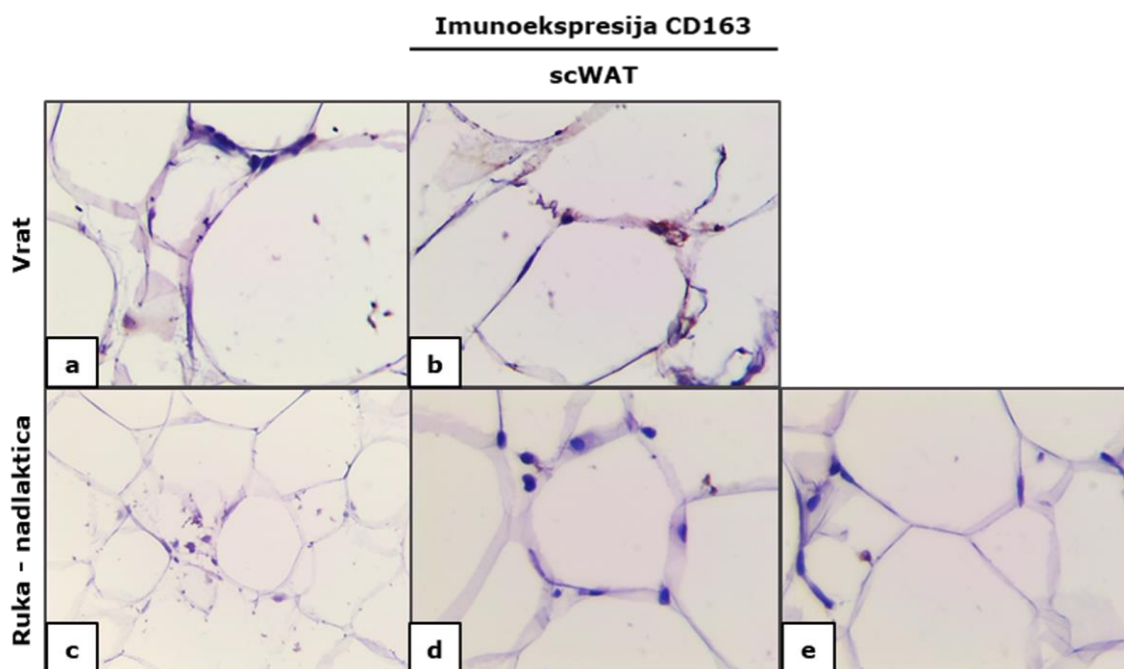
CD163 pozitivni makrofagi se mogu uočiti i u scWAT sa različitim lokalizacijama, nešto manje u analiziranim uzorcima tkiva sa vrata i nadlaktice, dok se u analiziranim uzorcima tkiva sa stomaka različitih pacijenata mogu videti CD163 pozitivni jednojedarni makrofagi, ali i višejedarni koji formiraju CLS oko adipocita (Slike 43 – 45).



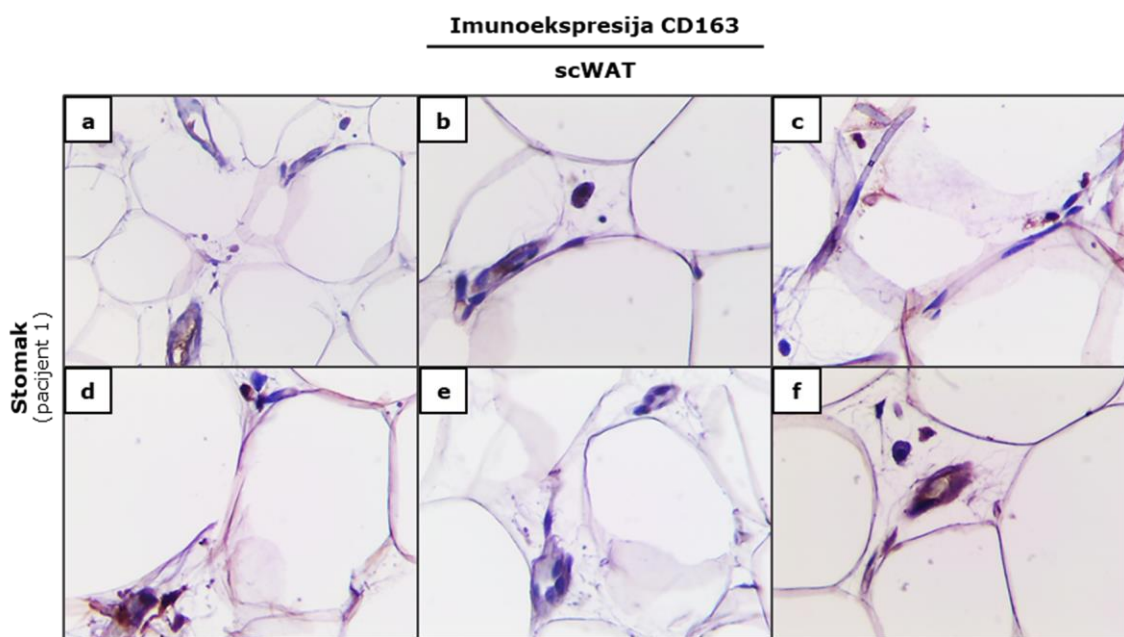
Slika 41. Imunoekspresija CD163 u uzorku lipoma sa leđa; braon boja ukazuje na pozitivno obojene makrofage; *bright field*, uveličanje objektivna 20x (a) i 40x (b - d).



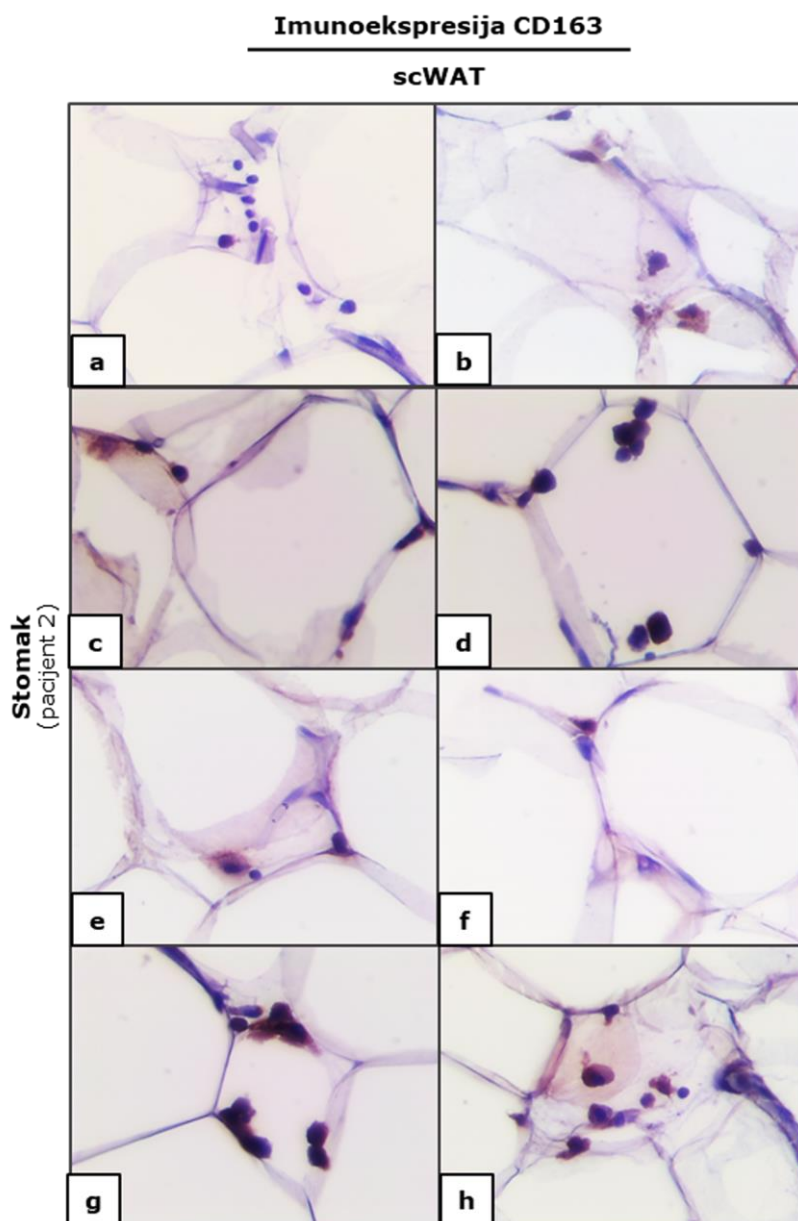
Slika 42. Imunoekspresija CD163 u uzorku lipoma sa nadkolenice; braon boja ukazuje na pozitivno obojene makrofage; *bright field*, uveličanje objektivna 20x (a) i 40x (b - f).



Slika 43. Imunoekspresija CD163 u uzorcima scWAT sa vrata (a, b) i nadlaktice (c – e); braon boja ukazuje na pozitivno obojene makrofage; *bright field*, uveličanje objektivna 20x (a, c) i 40x (b, d, e).



Slika 44. Imunoekspresija CD163 u uzorku scWAT sa stomaka - pacijent 1; braon boja ukazuje na pozitivno obojene makrofage; *bright field*, uveličanje objektivna 20x (a) i 40x (b - f).

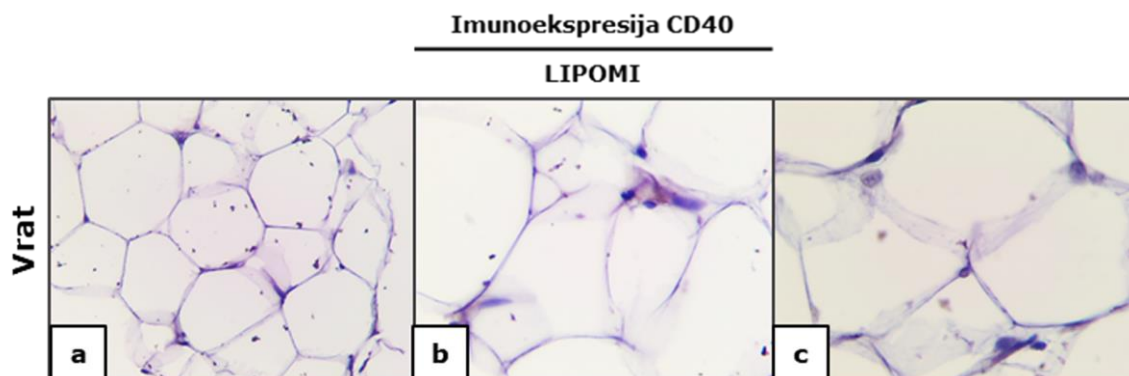


**Slika 45.** Imunoekspresija CD163 u uzorku scWAT sa stomaka - pacijent 2; braon boja ukazuje na pozitivno obojene makrofage; *bright field*, uveličanje objektiva 20x (a) i 40x (b - h).

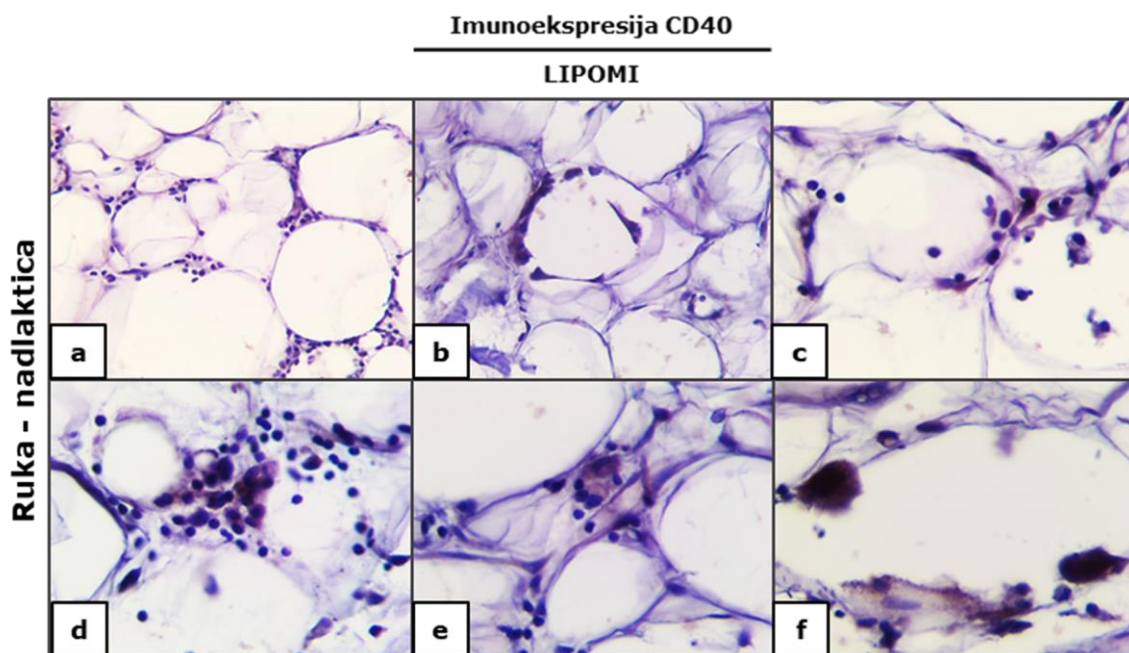
Makrofagi pozitivni na CD40 se mogu videti i u uzorcima lipoma i u uzorcima scWAT sa različitih lokalizacija, iako je generalno manje CD40 pozitivnih ćelija u obe grupe u odnosu na CD163 pozitivne ćelije.

U grupi lipoma se mogu uočiti i jednojedarne i višejedarne CD40 pozitivne ćelije koje su uglavnom krupne i okružene sitnijim CD40 negativnim ćelijama (Slike 46 – 49). MNGCs pozitivne na CD40 se uočavaju u uzorcima lipoma pojedinih analiziranih lokalizacija kao

što su nadlaktica i leđa (Slike 47 i 48), dok su u uzorcima lipoma sa ostalih analiziranih lokalizacija prisutne uglavnom sitnije CD40 pozitivne jednojedarne ćelije (Slike 46 i 49).

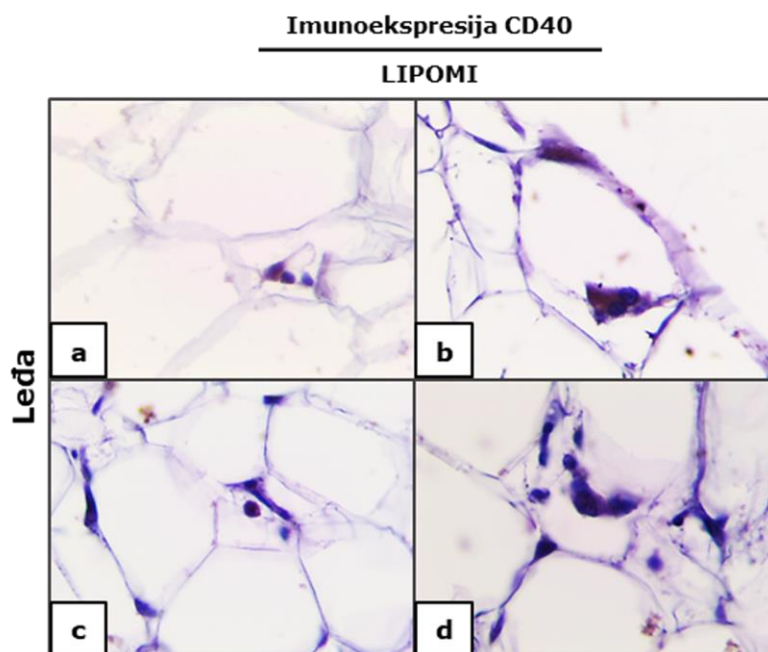


Slika 46. Imunoekspresija CD40 u uzorku lipoma sa vrata; braon boja ukazuje na pozitivno obojene makrofage; *bright field*, uveličanje objektiva 20x (a) i 40x (b, c).

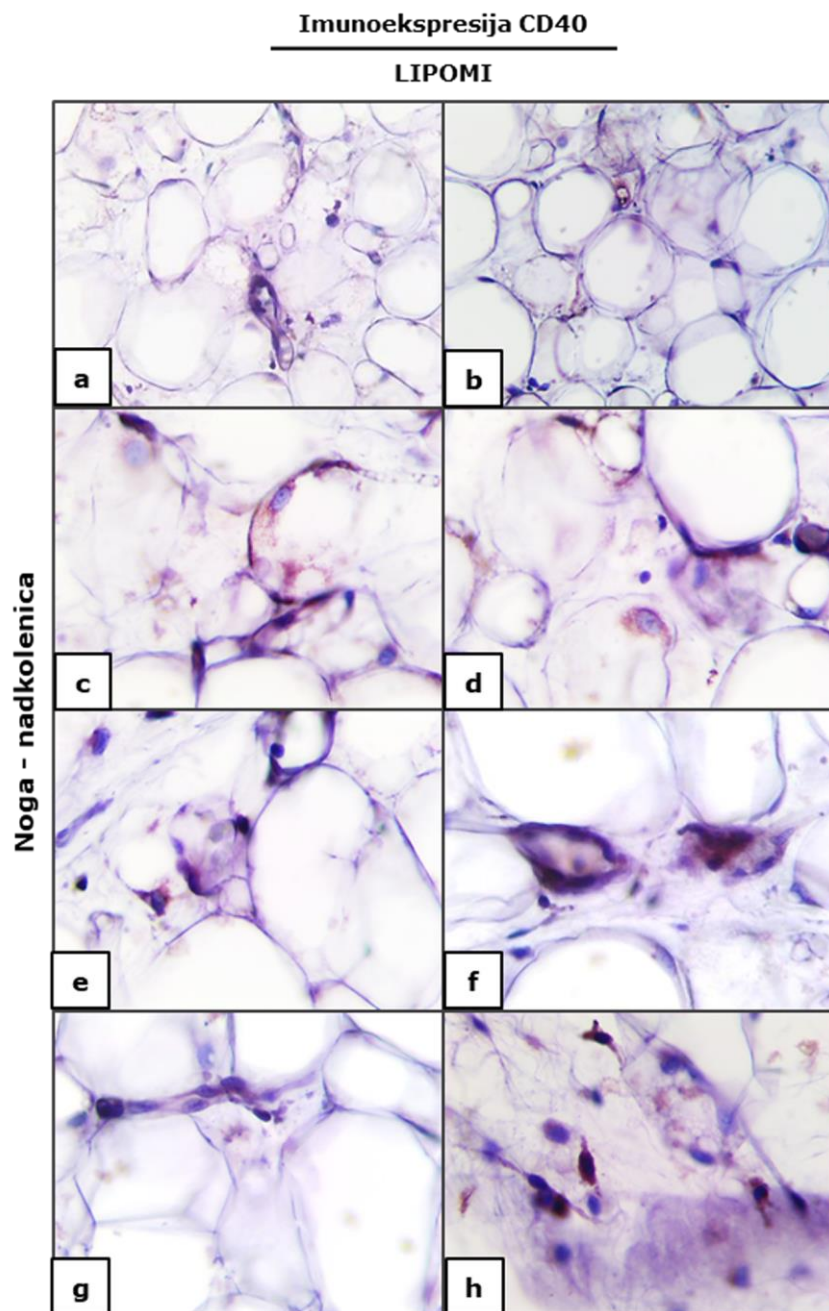


Slika 47. Imunoekspresija CD40 u uzorku lipoma sa nadlaktice; braon boja ukazuje na pozitivno obojene makrofage; *bright field*, uveličanje objektiva 20x (a, b) i 40x (c - f).

U grupi scWAT, u svim analiziranim uzorcima, mogu se videti retke jednojedarne ćelije koje su pozitivne na CD40 i u čijoj su neposrednoj blizini prisutne ćelije negativne na CD40 slične morfologije (Slike 50 i 51).

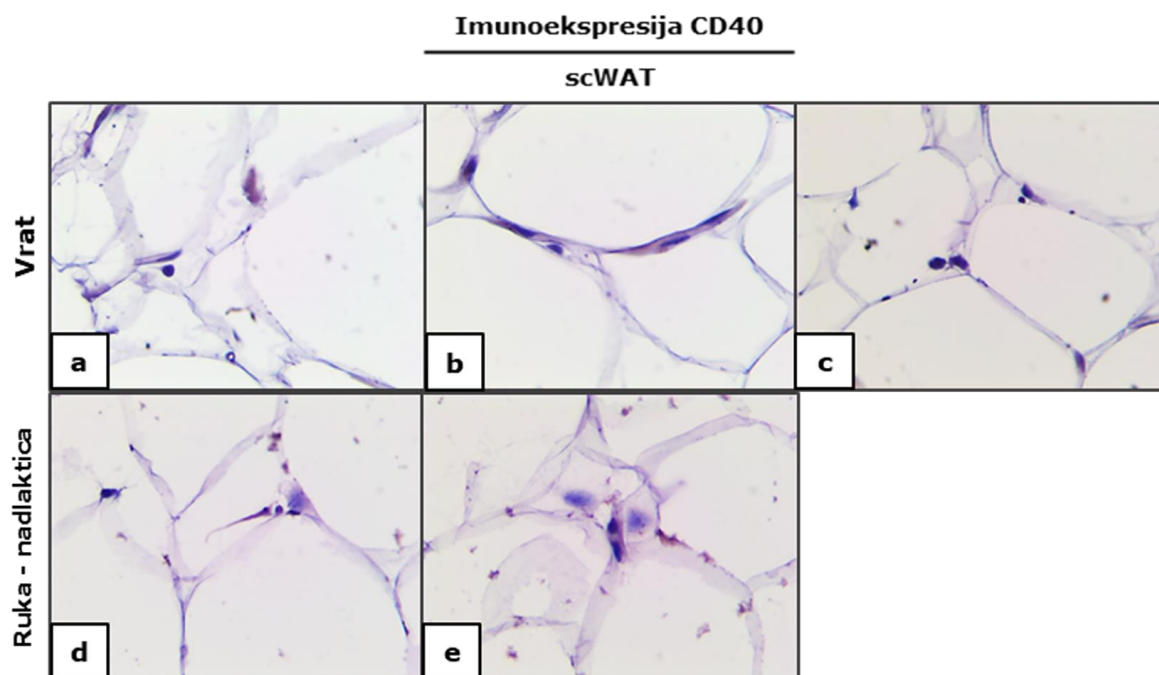


**Slika 48.** Imunoekspresija CD40 u uzorku lipoma sa leđa; braon boja ukazuje na pozitivno obojene makrofage; *bright field*, uveličanje objektiva 40x (a - d).

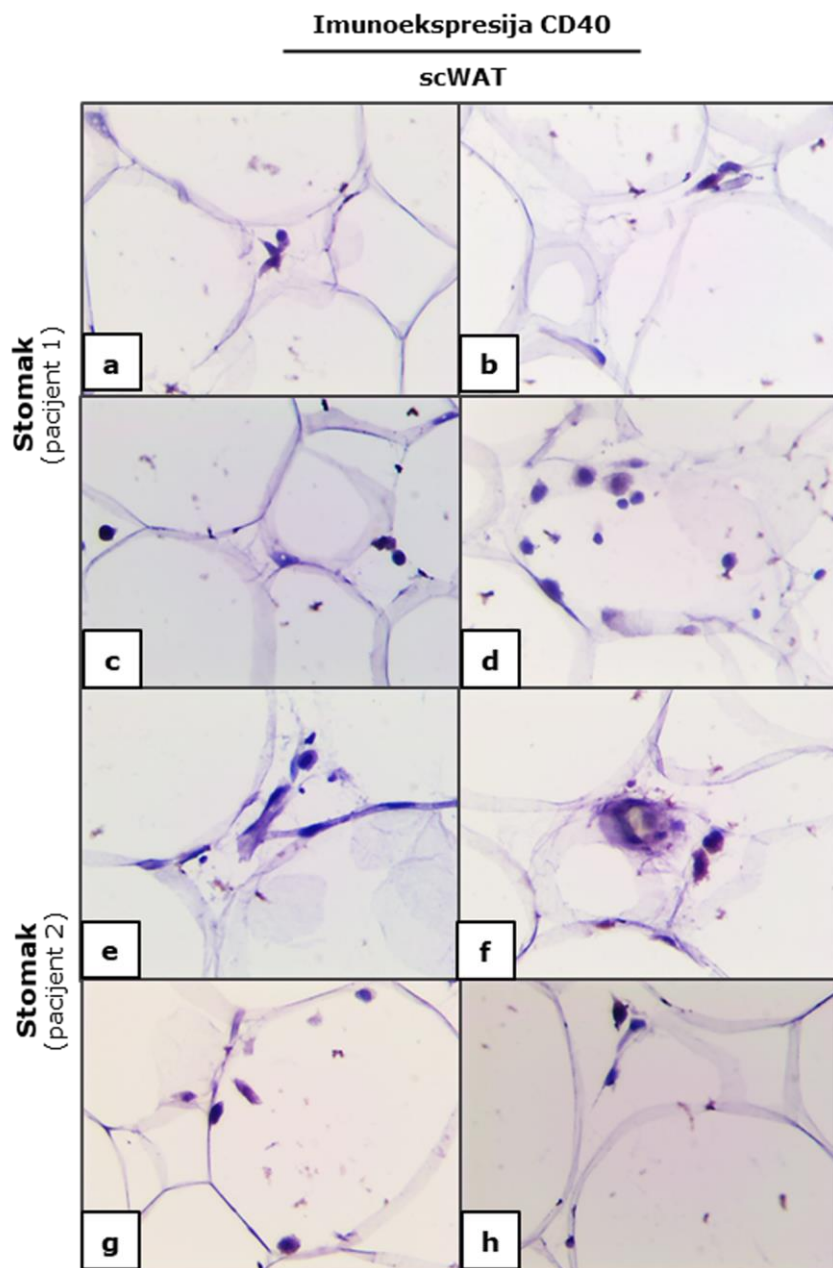


**Slika 49.** Imunoekspresija CD40 u uzorku lipoma sa nadkolenice; braon boja ukazuje na pozitivno obojene makrofage; *bright field*, uveličanje objektiva 20x (a, b) i 40x (c - h).





**Slika 50.** Imunoekspresija CD40 u uzorcima scWAT sa vrata (a – c) i nadlaktice (d, e); braon boja ukazuje na pozitivno obojene makrofage; *bright field*, uveličanje objektivna 20x (a) i 40x (b - e).

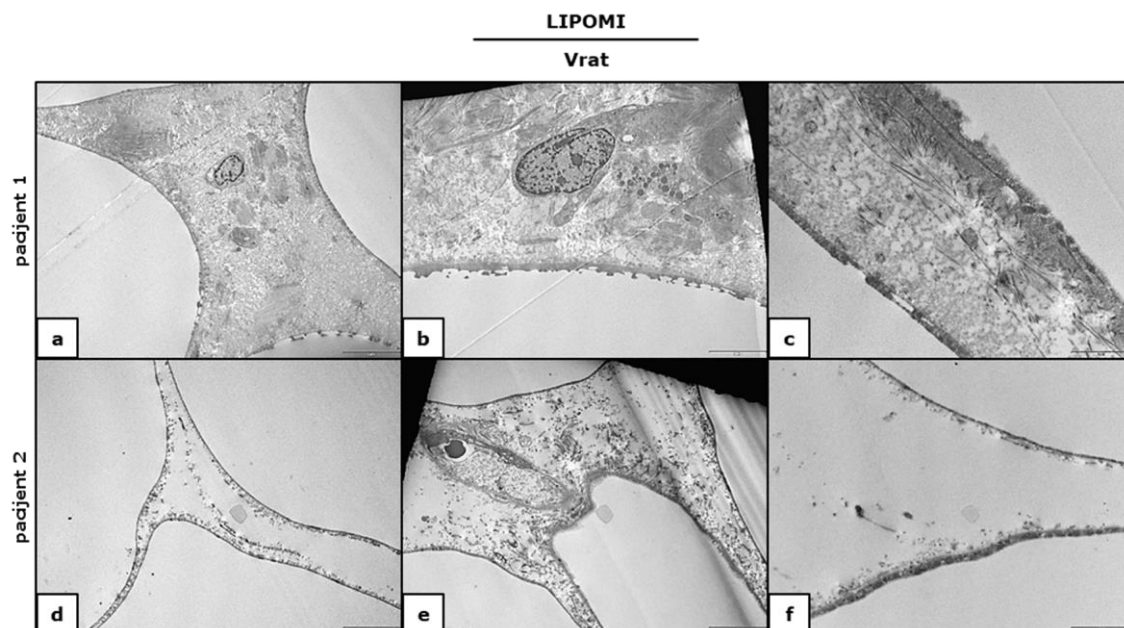


**Slika 51.** Imunoekspresija CD40 u uzorcima scWAT sa stomaka, pacijent 1 (a – d) i pacijent 2 (e - h); braon boja ukazuje na pozitivno obojene makrofage; *bright field*, uveličanje objektiva 40x (a - h).

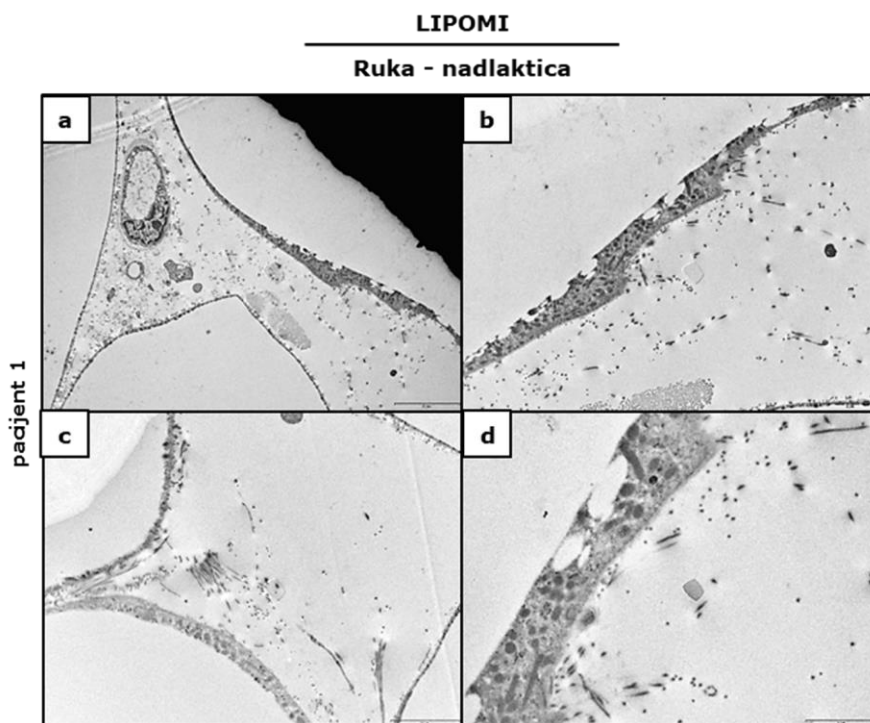
#### 4.9. ULTRASTRUKTURNA ANALIZA TKIVA

Ultrastrukturalna analiza uzoraka tkiva lipoma i scWAT je urađena na transmisionom elektronskom mikroskopu (TEM) na način opisan u metodima. Uočene su ultrastrukturne razlike u analiziranim tkivima grupe lipoma i grupe scWAT, kao i između uzoraka tkiva sa različitim anatomskih lokalizacija unutar grupe lipoma i scWAT pa i uzoraka tkiva različitih pacijenata sa iste anatomske lokalizacije.

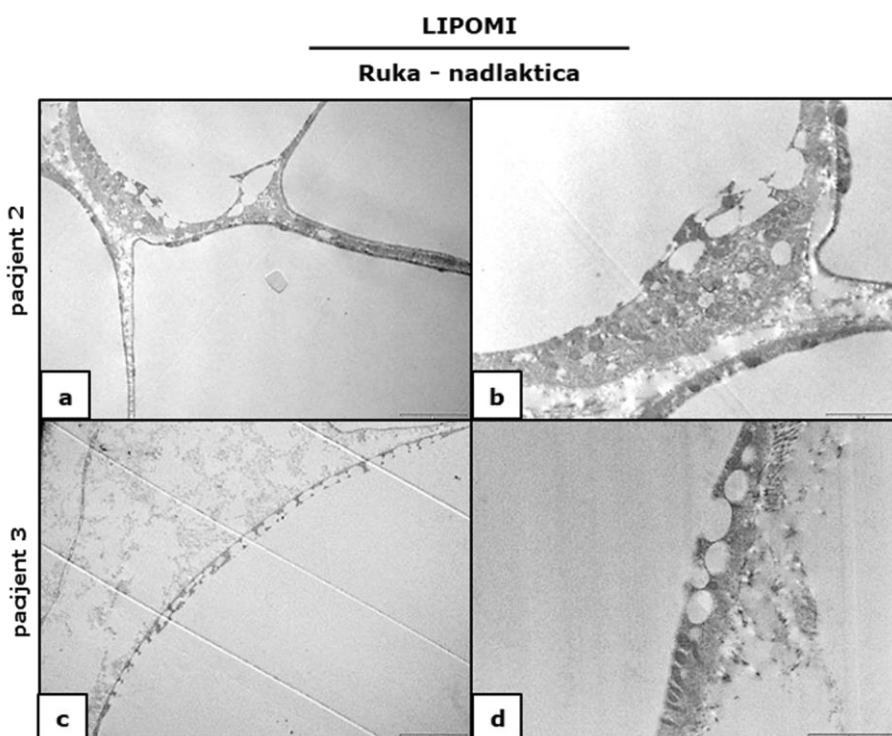
U uzorcima lipoma (Slike 52 – 56) se uočavaju pojedinačna vlakna i snopovi kolagenih vlakana u međucelijskom prostoru kao i infiltrati ćelija poput ćelija nalik fibroblastima i makrofagima. Mogu se uočiti i manji krvni sudovi između adipocita. U samim adipocitima tkiva lipoma pored jednog velikog lipidnog tela, u citoplazmi se mogu uočiti sitna lipidna tela koja su poređana u više slojeva (Slika 52b i Slika 54), dok se neka od tih lipidnih tela spajaju sa velikim lipidnim telom adipocita (Slika 54a). U citoplazmi adipocita, u tkivima lipoma, se uočava veliki broj mitohondrija koje su uglavnom grupisane (Slika 56b, e, f) a na više mesta su grupisane i oko sitnih lipidnih tela (Slika 53 i Slika 54a, b, d).



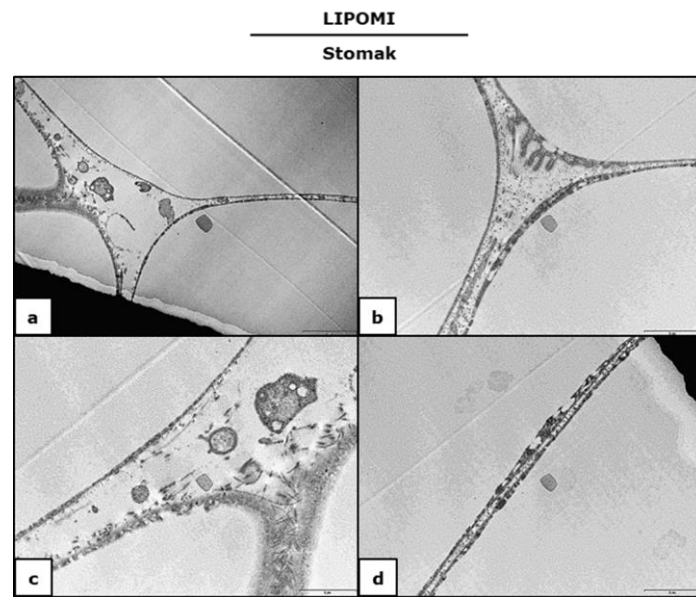
**Slika 52.** Ultrastruktura tkiva lipoma sa vrata - pacijent 1 (a – c) i pacijent 2 (d – f); uveličanje 3000x (a, b, d, e) i uveličanje 8000x (c, f).



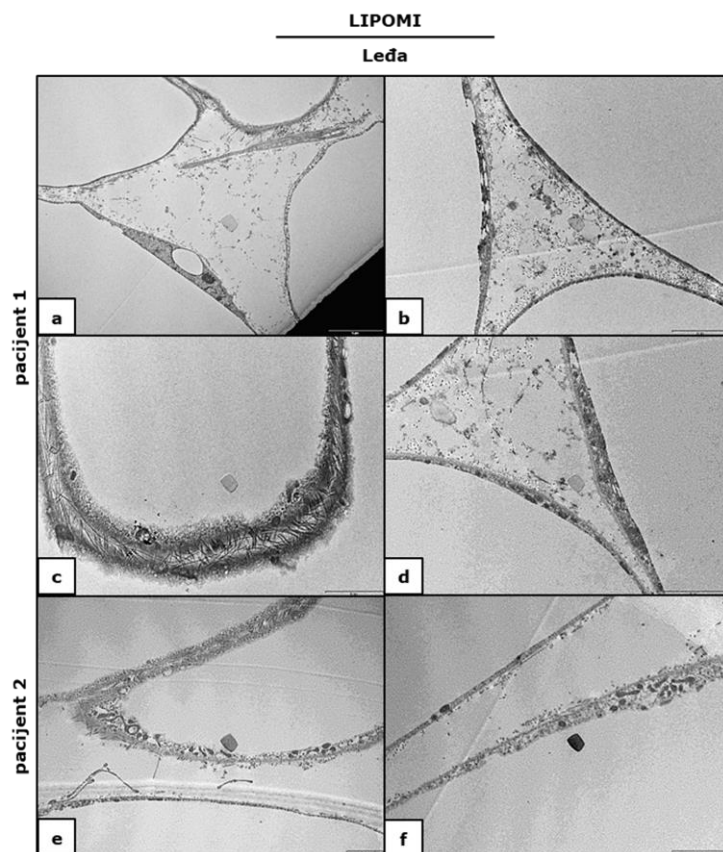
**Slika 53.** Ultrastruktura tkiva lipoma sa nadlaktice – pacijent 1; uveličanje 3000x (a), uveličanje 6300x (b), uveličanje 8000x (c) i uveličanje 17000x (d).



**Slika 54.** Ultrastruktura tkiva lipoma sa nadlaktice – pacijenti 2 i 3; uveličanje 3000x (a, c), uveličanje 8000x (b) i uveličanje 10000x (d).

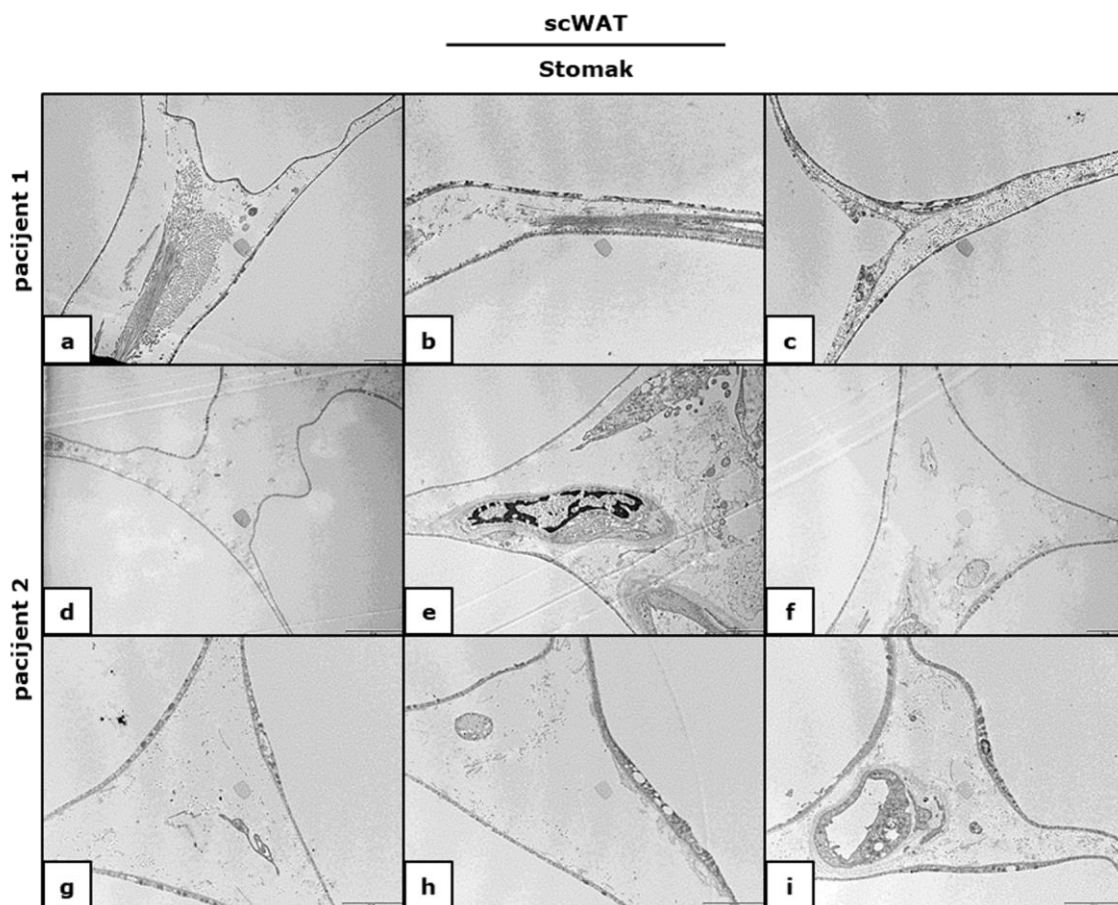


Slika 55. Ultrastruktura tkiva lipoma sa stomaka; uveličanje 3000x (a) i uveličanje 8000x (b - d).

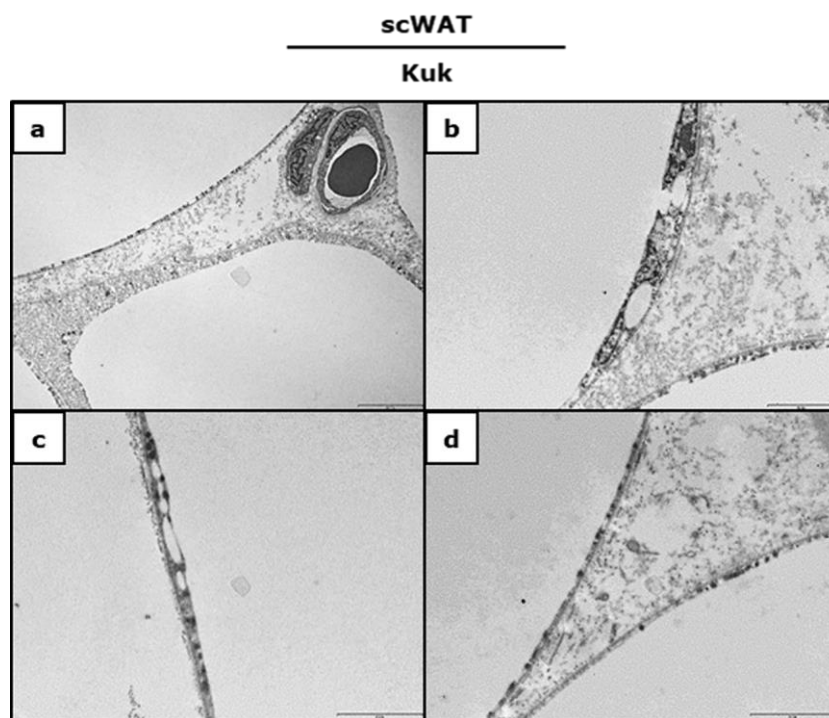


Slika 56. Ultrastruktura tkiva lipoma sa leđa različitih pacijenata; uveličanje 3000x (a), uveličanje 5000x (e), uveličanje 8000x (b, c, f), uveličanje 10000x (d).

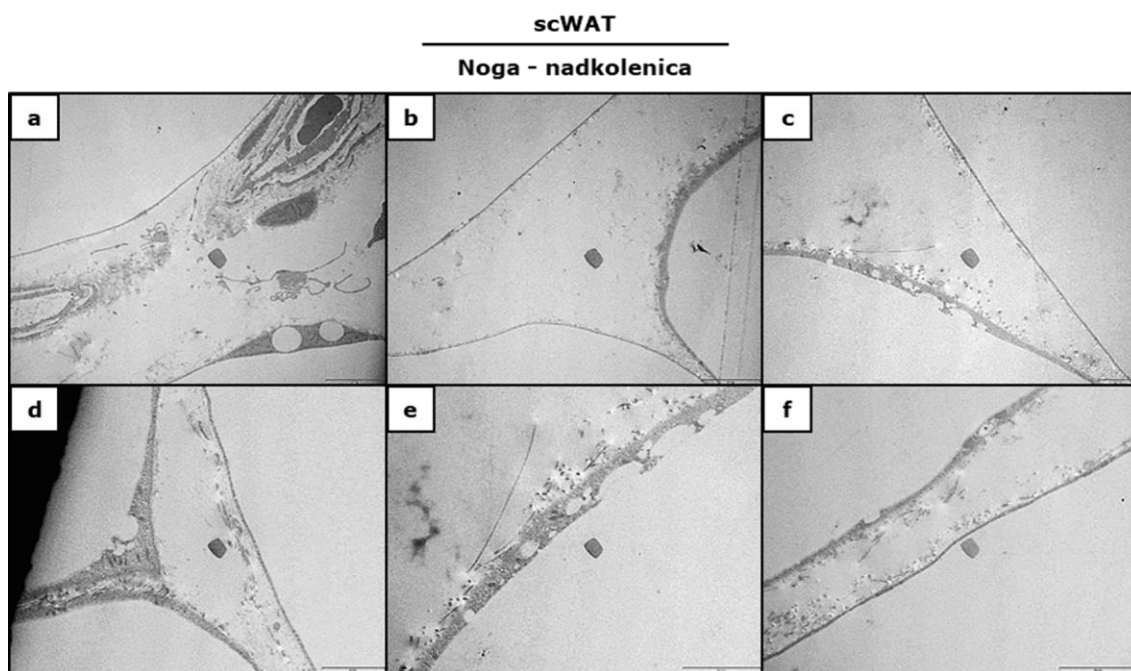
U uzorcima scWAT (Slike 57 – 59) može se uočiti više krvnih sudova u blizini adipocita i mestimično polja kolagenih vlakana. Adipociti su unilokularni sa tanjom citoplazmom u odnosu na adipocite lipoma. U nekim adipocitima se mogu uočiti sitna lipidna tela ali u manjem broju u odnosu na tkivo lipoma (Slika 57, Slika 58b, c i Slika 59c, d, e). Ova lipidna tela su uglavnom u fuziji sa centralnim lipidnim telom (Slika 59c, d, e) i uglavnom su jednoslojna. Na mestima gde je citoplazma deblja, mogu se uočiti mitohondrije (Slika 57b, h, Slika 58b-d i Slika 59d, e) kojih ima manje nego u adipocitima tkiva lipoma.



**Slika 57.** Ultrastruktura scWAT sa stomaka različitih pacijenata; uveličanje 3000x (a, d), uveličanje 5000x (e, f), uveličanje 8000x (g, h, i).



**Slika 58.** Ultrastruktura scWAT sa kuka; uveličanje 3000x (a), uveličanje 8000x (b), uveličanje 10000x (c, d).

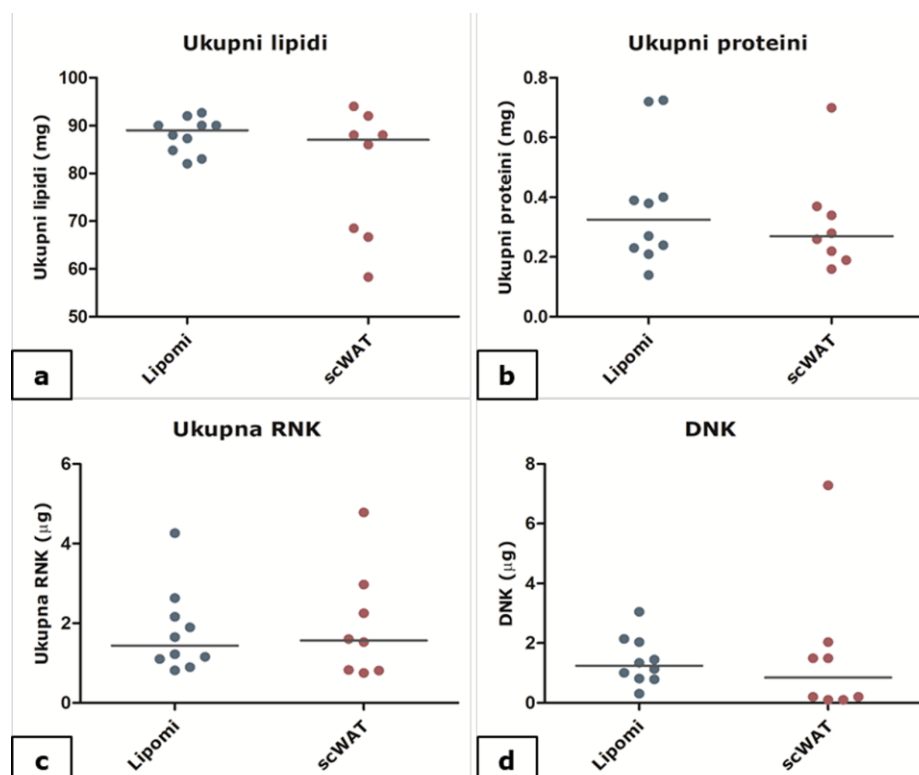


**Slika 59.** Ultrastruktura scWAT sa nadkolenice; uveličanje 3000x (a, b), uveličanje 5000x (c), uveličanje 8000x (d), uveličanje 10000x (e, f).

## 4.10. ANALIZA HEMIJSKOG SASTAVA I FIZIČKOHEMIJSKA KARAKTERIZACIJA TKIVA

### 4.10.1. Hemijski sastav tkiva analiziran merenjem ukupnih proteina, lipida, RNK i DNK

Analiziran je hemijski sastav uzoraka tkiva lipoma i scWAT merenjem ukupnih lipida, ukupnih proteina, ukupne RNK i DNK, a rezultati su prikazani na Grafiku 28. Uočene su razlike između grupe lipoma i scWAT u nađenoj količini svih analiziranih jedinjenja, ali one nisu statistički značajne (Grafik 28). Ukupni lipidi, mereni gravimetrijskom metodom nakon ekstrakcije lipida iz tkiva i uparavanja, prisutni su u nešto većoj količini u lipomima u odnosu na scWAT na 100 mg tkiva (Grafik 28a). Više ukupnih proteina je izmereno u grupi lipoma u odnosu na scWAT u 100 mg tkiva (Grafik 28b). Izmerena je veća količina DNK u 100 mg tkiva lipoma u odnosu na istu količinu scWAT (Grafik 28d) što ukazuje na veći broj ćelija prisutnih u tkivu lipoma u odnosu na scWAT u istoj količini tkiva. Nešto više ukupne RNK je izmereno u uzorcima scWAT u odnosu na uzorke lipoma, u 100 mg tkiva (Grafik 28c).



**Grafik 28.** Količina ukupnih lipida (a), ukupnih proteina (b), ukupne RNK (c) i DNK (d) u uzorcima lipoma i scWAT, izražena na 100 mg tkiva; tačkasti grafikoni sa medijanom.



#### 4.10.2. Ramanska spektroskopija

Fizičko-hemijska karakterizacija uzoraka tkiva lipoma i scWAT je izvršena primenom metode Ramanske spektroskopije. Karakteristični signali za masno tkivo se mogu uočiti u Ramanskim spektrima uzoraka lipoma (Slika 60) i uzoraka scWAT (Slika 61). Na spektrima su prikazane i mikrofografije delova uzoraka tkiva lipoma i scWAT sa kojih su snimanjem dobijeni prikazani spektri.

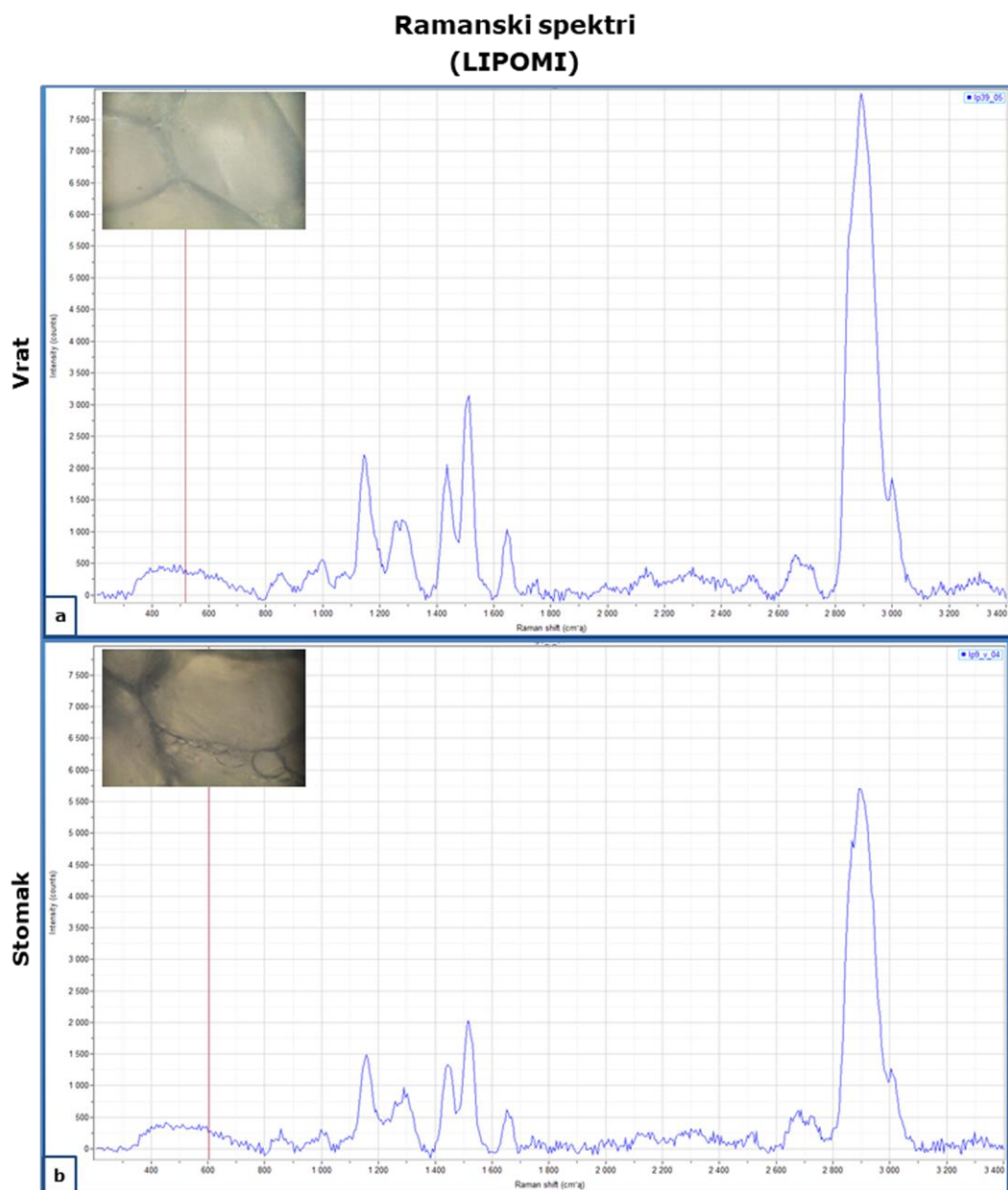
U Ramanskim spektrima analiziranih uzoraka lipoma i scWAT se mogu uočiti jaki signali u oblasti niske frekvencije i oblasti visoke frekvencije, kao i više slabih signala u oblasti niske frekvencije koji su karakteristični za masno tkivo.

U uzorcima lipoma (Slika 60) i u uzorcima scWAT (Slika 61), u oblasti visoke frekvencije, od 2500 do 3020  $\text{cm}^{-1}$ , uočava se signal jakog intenziteta na oko 2850 – 2900  $\text{cm}^{-1}$  (koji odgovara C–H istežućim vibracijama lipida) i slabiji signal na oko 3000  $\text{cm}^{-1}$ , koji su karakteristični za lipide i masno tkivo. U oblasti 2500 do 2800  $\text{cm}^{-1}$  se uočava nekoliko slabih signala i u lipomima i u scWAT koji su takođe karakteristični za lipide i masno tkivo.

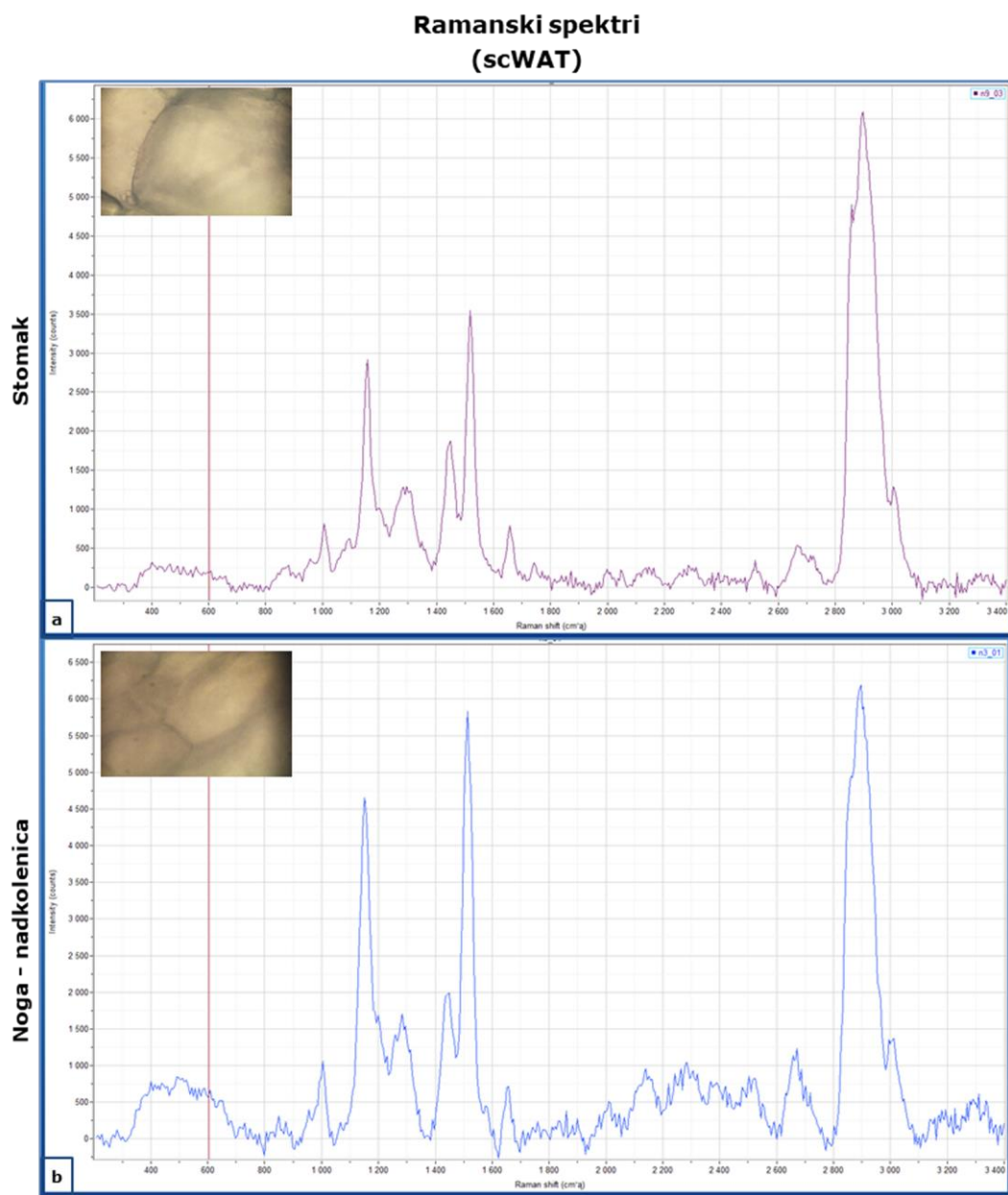
U oblasti niske frekvencije, uočava se nekoliko jakih signala i to na 1645 – 1662  $\text{cm}^{-1}$  (koji potiču od tzv. amid I trake, uzrokovane dominantno C=O istežućim vibracijama u amidnoj funkcionalnoj grupi, i karakteristični su za proteine ali i za lipide), 1500 – 1520  $\text{cm}^{-1}$  (koji potiču od karotenoida), 1437 – 1448  $\text{cm}^{-1}$  (karakterističnih za lipide u normalnom masnom tkivu i lipoproteine ćelijske membrane), 1250 – 1276  $\text{cm}^{-1}$  (lipidna traka, ali i tzv. amid III traka koja potiče od N–H savijajućih vibracija i C–N istežućih vibracija u amidnoj funkcionalnoj grupi), na 1306 – 1309  $\text{cm}^{-1}$  (potiče od lipida i u manjoj meri od proteina) i 1153 – 1182  $\text{cm}^{-1}$  (potiče od aminokiselina tirozina i fenilalanina, ali i od karotenoida).

U oblasti niske frekvencije se od slabih signala u spektrima uzoraka lipoma i scWAT mogu uočiti signali slabog intenziteta na 1737 – 1750  $\text{cm}^{-1}$  (karakterističan za frakciju lipida koji čine triacilgliceroli (TAG), a potiče od C=O istežućih vibracija estarskih grupa), 1585 – 1610  $\text{cm}^{-1}$  (koji potiču od aromatičnih aminokiselina fenilalanin, tirozin i triptofan), 1065 – 1080  $\text{cm}^{-1}$  (koji potiče od C–C istežućih vibracija u lipidima, ali takođe i manjim delom od C–N istežućih vibracija proteina), 800 – 1003  $\text{cm}^{-1}$  (koji uglavnom potiču od aminokiselina prolin, valin tirozin, fenilalanin, ali i lanaca nekih nezasićenih masnih kiselina).

Razlike između spektara uzoraka lipoma i scWAT se uočavaju uglavnom u oblasti niske frekvencije gde je intenzitet jakih i srednjih signala slabiji u uzorcima lipoma u odnosu na scWAT, dok su neki slabi signali odsutni u uzorcima lipoma u istoj oblasti.



**Slika 60.** Ramanski spektri uzoraka lipoma sa vrata (a) i stomaka (b) sa odgovarajućim mikrografijama snimljenih uzoraka tkiva.



**Slika 61.** Ramanski spektri uzoraka scWAT sa stomaka (a) i nadkolenice (b) sa odgovarajućim mikrografijama snimljenih uzoraka tkiva.

## **5. DISKUSIJA**

## 5.1. KARAKTERISTIKE ISPITIVANIH PACIJENATA I LIPOMA

Lipomi su najčešće neoplazme mekih tkiva i predstavljaju benigne tumore masnog tkiva. Iako se mogu javiti u bilo kom delu tela uglavnom su lokalizovani potkožno, međutim, sve je više objavljenih slučajeva lipoma i u organima gde masno tkivo inače nije prisutno. U našoj studiji 48 od 50 lipoma su bili potkožno lokalizovani, jedan je bio lokalizovan u usnoj duplji i jedan u medijastinumu. Lipomi se sreću i kod muškaraca i kod žena, iako neki autori smatraju da je veća učestalost lipoma kod žena (**Mohammed i sar., 2014; Engin i sar., 2015**) dok drugi navode da su lipomi učestaliji kod muškaraca (**Dei Tos, 2010; Derin i Yaprak, 2017; Johnson i sar., 2018**). Autori koji ukazuju na veću učestalost potkožnih lipoma kod žena, objašnjavaju to većom količinom potkožnog masnog tkiva kod žena u odnosu na muškarce (**Engin i sar., 2015**). U našoj studiji analiziran je približno isti broj lipoma muškaraca i žena, pa se polno-specifična učestalost pojave lipoma može tumačiti samo po lokalizaciji. Na osnovu analiziranih uzoraka u našoj studiji možemo uočiti da su kod muškaraca dominantne lokalizacije na kojima se lipomi javljaju glava, vrat i ruke (uglavnom podlaktica) dok se kod žena lipomi uglavnom javljaju na ramenom/nadlaktanom delu ruke, stomaku i leđima (Tabela 7). Lipomi su najčešće malih dimenzija, do 5 cm ili od 5 do 10 cm, ali mogu narasti i dostići veličinu veću od 10 cm kada se nazivaju džinovskim lipomima (**Derin i Yaprak, 2017**). Lipomi se mogu javiti u bilo kom životnom dobu ali se najčešće javljaju između 40. i 60. godine života (**Dei Tos, 2010; Johnson i sar., 2018**). U našoj studiji prosečna životna dob pacijenata sa lipomom je oko 50. godine što je u skladu sa podacima iz literature (**Mohammed i sar., 2014**).

Lipomi se javljaju uglavnom kao solitarni (pojedinačni), ali mogu biti i multipli (višestruki). Morfološki, lipomi mogu biti inkapsulirani i jasno ograničenog oblika ili difuzni, bez jasne granice sa okolnim masnim tkivom. Multipli lipomi se uglavnom javljaju kao generalizovane lipomatoze koje u velikom broju slučajeva imaju nasledni karakter i javljaju se uglavnom kod muškaraca. U našoj studiji je bilo sedam pacijenata sa multiplom generalizovanom lipomatozom, svi su bili muškog pola, a lipomi su bili manjih dimenzija, jasno ograničeni fibroznom kapsulom i lokalizovani uglavnom na ekstremitetima i vratu. Od ovih sedam pacijenata njih četiri je imalo u porodici muškog člana porodice sa lipomima, dok za preostala tri pacijenta nismo imali podatke iz porodične anamneze.

Većina analiziranih lipoma u našoj studiji su bili inkapsulirani lipomi sa fibroznom kapsulom koja ih odvaja od okolnog masnog tkiva i ti lipomi su uglavnom bili lokalizovani na glavi, vratu i gornjim ekstremitetima, dok su difuzni lipomi uglavnom bili lokalizovani na stomaku, leđima i nogama.

## 5.2. *IN VITRO* ANALIZA IZOLOVANIH ĆELIJA IZ LIPOMA I MASNOG TKIVA

Osim podataka o potencijalu izolovanih ćelija iz lipoma da proliferišu i da se diferentuju u ćelije mezenhinskog porekla (osteoblaste, hondroците i adipocite), u nama dostupnoj literaturi se ne mogu naći podaci o drugim njihovim karakteristikama, molekularnom profilu i funkcijama kao što su imunomodulacijska aktivnost i efekat na zarastanje rana, iako se preporučuje njihova upotreba u regenerativnoj medicini. Takođe, nedostaju studije u kojima se pod istim uslovima karakteristike LDSCs porede sa ADSCs. Zbog ovih činjenica su naši rezultati od posebnog značaja jer predstavljaju prvu detaljnu karakterizaciju ćelija izolovanih iz lipoma kao i uporednu analizu ovih ćelija sa ćelijama iz normalnog (netransformisanog) masnog tkiva u različitim modelima *in vitro* na osnovu njihovog molekularnog profila i potencijala da se diferentuju u adipocite i osteoblaste (Stojanović i sar., 2018), kao i imunomodulatorne aktivnosti i efekata na zarastanje rana *in vitro* (Stojanović i Najman, 2019).

Uzorci lipoma koji su korišćeni za izolaciju ćelija (LDSCs) i *in vitro* analize su bili potkožni i lokalizovani na nekoliko različitih delova tela. Da bismo uporedili karakteristike ovih ćelija sa ćelijama iz netransformisanog masnog tkiva, uzeti su uzorci potkožnog belog masnog tkiva (scWAT) sa različitih anatomskih lokalizacija. Pokazano je od strane drugih autora da ne postoje statistički značajni dokazi o uticaju lokalizacije tkiva na potencijal ADSCs da proliferišu i da se diferentuju, ali su razlike uočene u lipolizi i podložnosti ovih ćelija apoptozi (Schipper i sar., 2008). Druga studija je pokazala da ADSCs izolovane iz scWAT, u poređenju sa ADSCs izolovanim iz drugih depoa masnog tkiva, imaju veći potencijal za diferencijaciju i autori te studije preporučuju ADSCs iz scWAT kao optimalan izbor ćelija za angiogenu i osteogenu regeneraciju (Jung i sar., 2015).

Što se tiče uticaja starosti davaoca masnog tkiva na karakteristike ADSCs, rezultati koji se mogu naći u literaturi su različiti. Neke studije pokazuju da postoje razlike u proliferaciji

ADSCs i akumulaciji lipida tokom adipogene diferencijacije koje su povezane sa životnom dobi davaoca, a ogledaju se u smanjenju stope proliferacije ADSCs i povećanoj akumulaciji lipida tokom starenja (**Schipper i sar., 2008**). Druge studije su pokazale da su kinetika rasta, osteogeni i hondrogeni potencijal diferencijacije ADSCs narušeni sa starenjem davaoca dok je potencijal za adipogenu diferencijaciju očuvan tokom starenja (**Choudhery i sar., 2014**). Sa druge strane, objavljeno je da primena ADSCs u tkivnom inženjerstvu kosti nije ograničena starošću davaoca, što je pokazano osteogenom diferencijacijom ADSCs izolovanih iz tkiva pacijenata različite starosti, na 3D osteogenom graftu bez skafolda koji je namenjen za lečenje koštanih defekata (**Dufrane, 2017**). U našem istraživanju, obe grupe pacijenata (i grupa lipoma i grupa scWAT) su bili slične životne dobi. Prosečna životna dob pacijenata sa lipomima je bila  $51,56 \pm 14,36$  dok je prosečna životna dob pacijenata iz kojih je uzeto scWAT bila  $50,1 \pm 15,25$ . Ovaj podatak ukazuje na to da razlike koje smo uočili u karakteristikama LDSCs i ADSCs nisu posledica razlika u starosti pacijenata.

Mezenhimske matične ćelije (MSCs) izolovane iz masnog tkiva imaju vretenast, fibroblastoidni, bipolaran oblik, koji je tipičan za MSCs (**Baer, 2014; Jung i sar., 2015**). Pokazano je da su ADSCs izolovane iz scWAT znatno homogenije morfoloģije sa manje varijacija u dijametru ćelija do 12. pasaže u odnosu na ADSCs koje su izolovane iz drugih depoa (**Jung i sar., 2015**). Iako su neki autori objavili da ADSCs imaju konzistentnu morfoloģiju dok LDSCs nemaju (**Qian i sar., 2010**), autori nekoliko drugih studija su pokazali da je morfoloģija LDSCs vrlo slična ADSCs i nisu uočili razlike u morfoloģiji između ova dva tipa ćelija nakon dugotrajne kultivacije ćelija u uslovima *in vitro* (**Lin i sar., 2007; Suga i sar., 2009**). U našem istraživanju morfoloģija izolovanih LDSCs i ADSCs je bila veoma slična i tipična za mezenhimske matične ćelije, bez značajnih razlika u morfoloģiji između LDSCs i ADSCs nakon izolacije kao i tokom kultivacije u standardnim uslovima za gajenje ćelijskih kultura i kao i nakon pasaža.

Da bi se smatrale matičnim ćelijama, MSCs moraju da ispune određene kriterijume koji su predloženi od strane **Dominici i sar. (2006)**. Ovi kriterijumi „matičnosti“ ćelija podrazumevaju sledeće: 1) da su ćelije adherentne, 2) da imaju specifičnu morfoloģiju kada se kultivišu u uslovima *in vitro*, 3) da ekspimiraju specifične MSC markere ili markere „matičnosti“ ćelija i 4) da imaju sposobnost proliferacije kao i diferencijacije u nekoliko različitih tipova ćelija. Oba tipa ćelija koje su ispitivane u našem istraživanju, LDSCs i ADSCs, ispunjavaju ove kriterijume što je prikazano u rezultatima.

Markeri matičnih ćelija podrazumevaju panele unutarćelijskih i površinskih markera. Prema pregledu literature datom od strane **Mafi i sar. (2011)**, CD44 i CD105 su najčešće korišćeni pozitivni površinski markeri MSCs. Ove markere smo i mi koristili u našem istraživanju. Pokazali smo da oba tipa ćelija, i LDSCs i ADSCs, jako eksprimiraju CD105 (Slika 8b, d) čija je ekspresija određivana primenom metoda protočne citometrije, kao i da eksprimiraju *CD44* gen, čija je ekspresija određivana Real-Time PCR metodom (Grafik 1a). Pored pozitivnih markera MSC, ove ćelije bi trebalo da budu negativne, odnosno, da ne eksprimiraju tzv. negativne markere MSC. Jedan od takvih je CD33 molekul čiju smo ekspresiju u LDSCs i ADSCs određivali metodama protočne citometrije i pokazali da je ekspresija ovog molekula u oba tipa ispitivanih ćelija jako slaba (Slika 8a, c) i može se smatrati da je u nivou izotipske kontrole, što je u skladu sa ostalim istraživanjima čiji autori su objavili da je CD33 negativni marker MSCs (**De Ugarte i sar., 2003; Alipour i sar., 2010**).

Najčešće ispitivan unutarćelijski marker MSC je transkripcioni faktor Oct-4 (eng. *octamer-binding transcription factor 4*), koji je kodiran genom *POU5F1*. Eksprimiran je u embrionskim matičnim ćelijama (**Nichols i sar., 1998**) ali i u adultnim humanim matičnim ćelijama (**Tai i sar., 2005**). Oct-4 je esencijalan za pluripotentnost, samoobnavljanje, proliferaciju i preživljavanje matičnih ćelija (**Han i sar., 2014**). U literaturi se navodi da nivo ekspresije Oct-4 u ćelijama određuje ravnotežu između diferencijacije i dediferencijacije matičnih ćelija (**Niwa i sar., 2000**). U našem istraživanju, i LDSCs i ADSCs eksprimiraju *POU5F1* (Grafik 1b), što je pokazano analizom relativne ekspresije gena, bez statistički značajne razlike u ekspresiji *POU5F1* u poređenju ova dva tipa ćelija. Ne postoje podaci u literaturi o ekspresiji Oct-4 u izolovanim LDSCs, međutim postoje studije koje su se bavile analizom ekspresije *POU5F1* gena u tkivu lipoma i pokazano je da je ekspresija *POU5F1* povećana u lipomima u odnosu na normalno masno tkivo (**Zavan i sar., 2015**).

CD44 je transmembranski glikoprotein koji funkcioniše kao receptor za hijaluronsku kiselinu i veoma je važan za ćelijsku diferencijaciju jer je uključen u interakcije tipa ćelija-ćelija i ćelija-matriks. Naime, on posreduje u ćelijskoj adheziji i migraciji i interaguje sa drugim ligandima kao što su osteopontin, kolagen i matriksne metaloproteinaze (eng. *matrix-metaloproteinases* - MMPs). Brojne studije su pokazale da je CD44 eksprimiran u ADSCs i smatra se jednim od jako eksprimiranih pozitivnih MSCs markera u ADSCs (**Ranera i sar., 2011; Baer i Geiger, 2012;– Watson i sar., 2014; Jung i sar., 2015**). U



svoga nekoliko studija koje se bave LDSCs, pokazano je da je CD44 eksprimiran u LDSCs i da ne postoji razlika u ekspresiji između LDSCs i ADSCs (**Qian i sar., 2010; Zavan i sar., 2015**) su pokazali da je *CD44* pojačano eksprimiran u tkivu lipoma u odnosu na normalno masno tkivo. U našem istraživanju, i LDSCs i ADSCs eksprimiraju *CD44* (Grafik 1a). Uočena je niža ekspresija *CD44* u LDSCs u odnosu na ADSCs, ali ne statistički značajno. Niža ekspresija *CD44* u LDSCs može biti posledica hipermetilacije *CD44* gena što se dešava u procesu razvoja tumora (**Yan i sar., 2003**). Ovaj podatak se može uzeti u obzir prilikom tumačenja slabijeg potencijala LDSCs za diferencijaciju.

Endoglin (ENG) ili CD105 je membranski glikoprotein tip I koji je deo TGF beta receptor kompleksa. Ovaj molekul je jako eksprimiran u ADSCs, i MSCs uopšte, pa predstavlja jedan od najčešće korišćenih pozitivnih markera za karakterizaciju ovih ćelija (**Ranera i sar., 2011; Baer i Geiger, 2012; Lin i sar. 2013; Watson i sar. 2014; Jung i sar., 2015**). U našem istraživanju i LDSCs i ADSCs jako eksprimiraju CD105 što je pokazano analizom ovog molekula metodom protočne citometrije (Slika 8b, d). U literaturi postoje oprečni rezultati o ekspresiji CD105 u LDSCs. Neki autori su objavili da je ekspresija CD105, analizirana metodom protočne citometrije, slična u LDSCs i ADSCs (**Qian i sar., 2010**), što je u skladu sa našim rezultatima, dok su neke druge studije pokazale da je ekspresija CD105 u LDSCs slaba (**Tremp i sar., 2016**). **Tremp i sar. (2016)** su dobili drugačiji rezultat od našeg verovatno zbog toga što su ispitivali druge tipove lipoma, kao i zbog nedostatka poređenja ekspresije ovog molekula sa ADSCs iz netransformisanog masnog tkiva, ali i zbog toga što je analiza rađena u ćelijama SVF, dok su u našem istraživanju ispitivane ćelije druge pasaže. **Chang i sar. (2018)** su analizirali, metodom protočne citometrije, ekspresiju CD105 u ćelijama izolovanim iz dva različita tipa lipoma (inkapsuliranih i neinkapsuliranih) i pokazali da sve ispitivane ćelije jako eksprimiraju CD105 (više od 90% ćelija) bez statistički značajnih razlika između različitih tipova uzoraka lipoma. Pokazano je da je ekspresija CD105, kao i drugih površinskih markera matičnih ćelija, slaba u SVF ćelijama, ali da raste tokom kultivacije i pasaža ćelija, dok izolovane ćelije SVF imaju jaku ekspresiju markera pluripotentnosti (markera embrionalnih matičnih ćelija) koja slabi tokom kultivacije i pasaža (**Varma i sar., 2007; Taha i sar., 2014**). Ovo je jedan od glavnih razloga zašto smo koristili ćelije druge pasaže za analizu diferencijacionog potencijala LDSCs i ADSCs, jer ćelije tada eksprimiraju i marker pluripotentnosti (Oct-4) kao i površinske markere matičnih ćelija CD44 i CD105.

ICAM-1 (eng. *intercellular adhesion molecule 1*), poznat i kao CD54, je membranski glikoprotein, član imunoglobulinske superfamilije ćelijskih adhezionih molekula (–eng. *cell adhesion molecules* - CAMs) koji ima značajnu ulogu u međućelijskoj interakciji, adheziji ćelija, migraciji i imunskom odgovoru. Pokazano je da je ICAM-1 jako eksprimiran u ADSCs i da predstavlja jedan od pozitivnih MSCs markera (**Gronthos i sar., 2001; De Ugarte i sar., 2003; Meliga i sar., 2007**). ICAM-1 je jedan od faktora odgovornih za imunomodulacijska svojstva MSCs i pokazano je da njegova prekomerna ekspresija pojačava imunosupresivne efekte MSCs (**Tang i sar., 2018**). U prisustvu proinflamacijskih citokina, MSCs sekretuju velike koncentracije različitih hemokina i jako eksprimiraju ICAM-1 što utiče na to da MSCs ispolje svoje imunosupresivne efekte (**Ren i sar., 2011**). Objavljeno je takođe, da je ICAM-1 molekularni prekidač odgovoran za aktivaciju imunosupresivne aktivnosti ADSCs (**Rubtsov i sar., 2017**). Ne postoje podaci u nama dostupnoj literaturi o ekspresiji ICAM-1 u izolovanim LDSCs. U našoj studiji, u analizi genske ekspresije, *ICAM1* je nešto više eksprimiran u LDSCs nego u ADSCs, iako razlika u ekspresiji nije statistički značajna, što ipak može ukazati na potencijalni imunosupresivni karakter LDSCs. Naš rezultat je u skladu sa podacima koje su **Zavan i sar. (2015)** dobili analizom tkiva lipoma pokazujući da je *ICAM1* pojačano eksprimiran u tkivu lipoma u odnosu na masno tkivo.

Pokazano je da ADSCs druge ili treće pasaže uniformno eksprimiraju markere matičnih ćelija i da su morfološki homogena populacija ćelija (**Gronthos i sar., 2001; Baer, 2014**). Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatima naše studije koji pokazuju da su i LDSCs i ADSCs druge pasaže morfološki homogena populacija i da eksprimiraju karakteristične markere matičnih ćelija. Naši rezultati pokazuju da su LDSCs i ADSCs mezenhimske matične ćelije i da imaju sličan fenotip i „matičnost“ neposredno pre diferencijacije. Starenje ćelija predstavlja ireverzibilan proces tokom koga matične ćelije gube svoju „matičnost“ i potencijal za diferencijaciju i koji se uočava u toku dugotrajne kultivacije ćelija i kao na kasnijim pasažama (**Kern i sar., 2006; Legzdina i sar., 2016; Truong i sar., 2018**). Pokazano je da ADSCs počinju da stare nakon desete pasaže (**Truong i sar., 2018**) i u znatno manjoj meri u odnosu na matične ćelije drugog porekla (**Kern i sar., 2006**). Mi smo koristili ćelije rane pasaže (druga pasaža) za analizu diferencijacionog potencijala čime smo izbegli uticaj starenja ćelija na potencijal za diferencijaciju.

Rezultati ove studije su među prvima koji predstavljaju detaljnu analizu molekularnog potpisa LDSCs i ADSCs, na osnovu njihovog uporednog ispitivanja pod istim uslovima. Prema našim saznanjima, ne postoje podaci u literaturi o ekspresiji adipogenih i osteogenih markera u ćelijama izolovanim iz tkiva lipoma. Mi smo u ovoj studiji analizirali nivo ekspresije gena *ADIPOQ*, *LEP*, *PPARG*, *DLK1*, *RUNX2* i *BGLAP* u LDSCs i ADSCs druge pasaže, neposredno pre diferencijacije. Ovi rezultati su od velikog značaja za analizu kapaciteta LDSCs i ADSCs za diferencijaciju, jer nam daju uvid u bazalni nivo iRNK ispitivanih gena koje smo analizirali tokom adipogene i osteogene diferencijacije, odnosno startnu poziciju ovih ćelija kada je u pitanju aktivnost ovih gena. Pokazali smo da postoje razlike u ekspresiji analiziranih gena između LDSCs i ADSCs, međutim, statistički značajna razlika je dobijena samo za *RUNX2* i *BGLAP* (Grafik 2a, b), pri čemu je ekspresija *RUNX2* viša u LDSCs u odnosu na ADSCs (Grafik 2a), dok je ekspresija *BGLAP* niža u LDSCs u odnosu na ADSCs (Grafik 2b). Na osnovu ovog rezultata se može objasniti uočena razlika u dinamici osteogene diferencijacije između LDSCs i ADSCs. Postoji studija u kojoj je ispitivana ekspresija adiponektina i PPAR- $\gamma$  u sortiranim LDSCs (izdvojenom frakcijom CD34+ ćelija), imunocitohemijskim bojenjem, u kojoj je pokazano da je imunoekspresija adiponektina slabija u CD34+ izolovanim ćelijama iz lipoma u odnosu na CD34+ ćelije izolovane iz normalnog masnog tkiva, dok razlika u ekspresiji PPAR- $\gamma$  između ovih ćelija nije zapažena (Zavan i sar. 2015). Ovaj nalaz je delimično u skladu sa našim rezultatima analize ekspresije gena *ADIPOQ* i *PPARG*. U našoj studiji su korišćene ne-sortirane ćelije i pokazali smo da je ekspresija i *ADIPOQ* i *PPARG* niža u LDSCs u odnosu na ADSCs (Grafik 2c, e), iako ova razlika nije statistički značajna. Iako ne postoje podaci u literaturi o genskoj ekspresiji u izolovanim ćelijama, neke istraživačke grupe su ispitivale razlike u ekspresiji *ADIPOQ*, *LEP*, *PPARG*, *RUNX2* i *BGLAP* u tkivu lipoma i poredili sa normalnim masnim tkivom (Suga i sar., 2009; Zavan i sar., 2015). U tim studijama je pokazano da je ekspresija *LEP* u uzorcima tkiva lipoma veća, dok je ekspresija *ADIPOQ* manja u lipomima u odnosu na normalno masno tkivo, što je obrazac ekspresije ovih gena koji se može videti u slučaju gojaznosti (Suga i sar., 2009). Ovakav obrazac ekspresije *LEP* i *ADIPOQ* je uočen i u našoj studiji u izolovanim ćelijama (Grafik 2d, e). Suga i sar. (2009) su u istoj studiji pokazali da se ekspresija *PPARG* u lipomima ne razlikuje od ekspresije u normalnom masnom tkivu. Naši rezultati pokazuju da je *PPARG* slabije eksprimiran u LDSCs nego u ADSCs, iako nije dobijena statistička značajnost,

najverovatnije zbog heterogenosti u ekspresiji između uzoraka u grupama (Grafik 2c). U studiji **Zavan i sar. (2015)**, autori su pokazali da je ekspresija *LEP*, *ADIPOQ* i *PPARG* povišena dok je ekspresija *RUNX2* snižena u uzorcima tkiva lipoma u odnosu na normalno masno tkivo, što je uz izuzetak ekspresije *LEP* suprotno onome što je dobijeno u prethodno opisanoj studiji kao i našim rezultatima sa izolovanim ćelijama.

Dobro je poznato da MSCs sekretuju citokine kada su stimulisane različitim faktorima iz mikrookoline. U odnosu na vrstu stimulusa koji na njih deluje, MSCs mogu ispoljiti proinflamacijsku ili anti-inflamacijsku aktivnosti, ali postoje vrlo kontradiktorni nalazi u literaturi o spontanoj sekreciji citokina od strane MSCs (**Kyurkchiev i sar., 2014**). Mi smo analizirali profil genske ekspresije citokina  $TNF-\alpha$ , *IL-4*, *IL-6* i *IL-10* u LDSCs i ADSCs druge pasaže, neposredno pre prikupljanja kondicioniranih medijuma (CM) za *in vitro* metode indirektno ko-kulture (Grafik 3), da bismo odredili i uporedili nivo ekspresije gena za navedene citokine u nestimulisanim ćelijama i da bismo odredili bazalni inflamacijski potencijal ćelija. Pokazali smo da su svi analizirani geni eksprimirani na sličan način bez statistički značajnih razlika između LDSCs i ADSCs, verovatno zbog varijabilnosti između uzoraka u okviru grupa. Nešto viša ekspresija *IL4* (Grafik 3c) i niža ekspresija *TNF* (Grafik 3a) su uočene u LDSCs u odnosu na ADSCs, što ukazuje na potencijalni anti-inflamacijski karakter LDSCs. U studiji u kojoj je analiziran profil sekrecije citokina od strane humanih MSCs poreklom iz kostne srži (BM-MSCs), pokazano je da je *IL-6* najviše eksprimiran među 120 ispitivanih citokina (**Park i sar., 2009**) što se može uočiti i u našoj studiji kada je u pitanju ekspresija *IL6* u LDSCs i ADSCs. Pošto su MSCs ćelije sposobne da aktiviraju i moduliraju imunski odgovor tako što sekretuju razne citokine i hemokine, očekivano je da su geni za ove molekule već aktivni u ćelijama u izvesnoj meri što bi omogućilo brz odgovor i sekreciju citokina kao reakciju na stimulse iz okolne sredine. Osim naših rezultata, u literaturi ne postoje podaci o ekspresiji gena za citokine u izolovanim LDSCs, ali je pokazano da su *IL6* i *TNF* pojačano eksprimirani u tkivu lipoma u odnosu na masno tkivo (**Zavan i sar., 2015**), što je najverovatnije posledica prisustva različitih ćelija imunskog sistema u tkivu.

Matične ćelije izolovane iz masnog tkiva imaju veliku sposobnost diferencijacije u adipocite pa tako predstavljaju obećavajuće sredstvo za primenu u inženjerstvu mekih tkiva i regenerativnoj medicini (**Locke i sar., 2009**). Mi smo indukovali LDSCs i ADSCs u adipocite tako što smo ih kultivisali u adipogenom medijumu u trajanju od 21 dan, u

standardnim *in vitro* uslovima za gajenje ćelijskih kultura. Mikroskopska analiza ćelija (Slika 9), *Oil red O* bojenje citoplazmatskih lipidnih tela (Slika 10), imunoekspresija adiponektina (Slika 11) i koncentracija leptina (Grafik 5) u medijumu ćelija koja je merena nakon 21 dan kultivacije u adipogenom (AM) medijumu, pokazuju da je adipogeneza u LDSCs usporena ili zaustavljena u nekoj fazi i da LDSCs imaju slabiji kapacitet za diferencijaciju u adipocite u odnosu na ADSCs. Ovi nalazi na ćelijskom i nivou ekspresije proteina su potvrđeni i na nivou ekspresije gena. Adiponektin i leptin su adipokini koji se sekretuju od strane zrelih adipocita i najčešće su analizirani markeri adipocita (**Fantuzzi, 2005**). U našoj studiji, geni *ADIPOQ*, *LEP* i *PPARG* su bili značajno manje eksprimirani u LDSCs u odnosu na ADSCs u adipogenom (AM) medijumu (Grafik 6). Nije bilo značajne razlike u ekspresiji *LEP* i *PPARG* u LDSCs kultivisanim u AM u odnosu na standardni (DM) medijum, kao što je to slučaj sa ADSCs, što ukazuje na to da LDSCs nisu adekvatno odgovorile na adipogenu indukciju. Pref-1 je marker preadipocita koji je kodiran genom *DLK1* čija ekspresija se smanjuje tokom adipogeneze. Najveća ekspresija Pref-1 je u preadipocitima dok je najmanja, pa čak i odsutna u zrelih adipocitima (**Sul, 2009; Wang i sar., 2010; Mitterberger i sar., 2012; Hudak i Sul, 2013**). Da bi se formirali zreli adipociti, neophodno je da se smanji nivo Pref-1 u ćeliji. Pokazano je da je ekspresija Pref-1 visoka u ADSCs pre diferencijacije, dok je 14. dana adipogene diferencijacije gotovo nemerljiva (**Mitterberger i sar., 2012**). Naši rezultati pokazuju da je *DLK1* značajno više eksprimiran u LDSCs kultivisanim 21 dan u AM medijumu u odnosu na ADSCs u istom medijumu ( $p < 0,05$ ) (Grafik 6d). Što se tiče ADSCs, ekspresija *DLK1* je smanjena u AM medijumu u odnosu na DM medijum što je u skladu sa dinamikom Pref-1 ekspresije u procesu adipogeneze. Visok nivo *DLK1* može biti povezan sa smanjenim stepenom diferencijacije LDSCs u adipocite u našoj studiji. Postoji svega nekoliko studija u kojima je rađena adipogena diferencijacija LDSCs. **Suga i sar. (2009)** su objavili da nema razlika u kapacitetu LDSCs za adipogenu diferencijaciju u odnosu na ADSCs prve pasaže, što je procenjeno bojenjem i kvantifikacijom lipidnih tela u ćelijama. Primenom iste metode analize, autori drugih studija su uočili visok sadržaj lipida u diferentovanim LDSCs (**Tremp i sar., 2016**) kao i da su se ćelije lipoma uspešno diferentovane u adipocite, slično ADSCs (**Makiguchi i sar., 2013**), ali u ovim dvema studijama nije bilo uporednih rezultata na ADSCs kultivisanim pod istim uslovima kao i LDSCs, već su ispitivane samo LDSCs. Takođe, u istim studijama su ispitivani različiti tipovi lipoma i bio je mali broj uzoraka.

**Tremp i sar. (2016)** su analizirali ćelije izolovane iz tri lipoma koji su dijagnostikovani kao multiple simetrične lipomatoze (MSL tip 1 i 2) dok su **Makiguchi i sar. (2013)** ispitivali ćelije izolovane iz osteolipoma jednog pacijenta. Postoji još jedna studija u kojoj je pokazano da LDSCs imaju sposobnost da se diferentuju u adipocite u ranim pasažama kao i u kasnim, slično kao i ADSCs, pri čemu je diferencijacija procenjivana prisustvom i bojenjem lipidnih tela (**Lin i sar., 2007**). U našoj studiji LDSCs su izolovane iz lipoma, benignih tumora koji su histološki vrlo slični netrtransformisanom masnom tkivu, solitarni, potkožni, uzeti sa nekoliko različitih anatomskih lokalizacija i imali smo značajno više uzoraka u odnosu na prethodno pomenute studije. U jednoj studiji je pokazano da ćelije izolovane iz atipičnih lipomatoznih tumora/dobro diferentovanih liposarkoma (ATL/WDL) imaju slabiji potencijal za adipogenu diferencijaciju u odnosu na ćelije iz normalnog masnog tkiva (**Inatani i sar., 2017**). To je određeno *Oil red O* bojenjem i kvantifikacijom, i uočeno je da je manje lipidnih tela formirano u MSCs poreklom iz ALT/WDL u odnosu na MSCs iz normalnog masnog tkiva, iako kvantifikacija nije pokazala statistički značajnu razliku (**Inatani i sar., 2017**). Rezultati ove studije su slični rezultatima koje smo mi dobili, iako su se lipomi iz kojih su izolovane LDSCs koje smo mi ispitivali razlikovali od tumora korišćenih u prethodno pomenutoj studiji. Naši rezultati su mnogo kompleksniji od do sada objavljenih rezultata od strane drugih autora, jer smo mi procenjivali potencijal za adipogenu diferencijaciju i LDSCs i ADSCs na različitim nivoima i primenom različitih metoda. Naša studija je, prema našim saznanjima, prva koja se bavi ispitivanjem adipogene diferencijacije LDSCs primenom metoda analize markera adipogeneze na nekoliko nivoa – ćelijskom, molekularnom i genskom, a istovremeno poređenjem sa ADSCs izolovanim iz netrtransformisanog potkožnog masnog tkiva, pod istim uslovima. Prema analizi ekspresije gena karakterističnih za proces adipogeneze, kao i fenotipskim promenama i nivoima proteina u LDSCs i ADSCs nakon 21 dan adipogene diferencijacije, u poređenju sa ćelijama druge pasaže (nulti dan u osteogenoj i adipogenoj diferencijaciji), možemo zaključiti da adipogeneza u LDSCs nije završena i da je kapacitet LDSCs za diferencijaciju u adipocite značajno slabiji u odnosu na ADSCs.

Matične ćelije iz masnog tkiva imaju veliki potencijal za diferencijaciju u osteoblaste pa zato predstavljaju obećavajuće sredstvo za primenu u tkivnom inženjerstvu kostiju, u vidu ćelijske terapije kao i za pripremu koštanih graftova sa različitim biomaterijalima za regeneraciju i reparaciju koštanih defekata (**Jung i sar., 2015; Bhattacharya i sar., 2016;**

**Ciuffi i sar., 2017**). Pokazano je da matične ćelije iz potkožnog masnog tkiva druge pasaže imaju dobar osteogeni potencijal (**Jung i sar., 2015**). Ćelije druge pasaže su korišćene i u našoj studiji. Nakon 16 dana osteogene diferencijacije, uočene su fenotipske promene u LDSCs i ADSCs kultivisanim u osteogenom (OS) medijumu. Te promene su se ogledale u tome što su ćelije postale više nalik epitelnim i manje nalik fibroblastima, a uočena je i akumulacija komponenti neorganskog matriksa (Slika 12) i to nešto više u ADSCs kulturi. Nije uočena značajna razlika u *alizarin red S* (ARS) bojenju između LDSCs i ADSCs, dok je nešto intenzivnije *Von Kossa* bojenje uočeno u ADSCs u odnosu na LDSCs. Nije uočena statistički značajna razlika između LDSCs i ADSCs u OS medijumu kada je rađena kvantifikacija ARS boje u ćelijama (Grafik 7), dok je razlika između ćelija kultivisanih u OS i DM medijumu i u slučaju LDSCs i u slučaju ADSCs statistički značajna što ukazuje na to da su i LDSCs i ADSCs odgovorile na indukciju diferencijacije u osteoblaste.

Osteoprotegerin (OPG) je protein koga proizvode i sekretuju osteoblasti. Osteoprotegerin je marker funkcijskog stanja osteoblasta jer je značajan za regulaciju osteoblast-osteoklast homeostaze (**Udagawa i sar., 2000**), promoviše sazrevanje osteoblasta i matriksa (**Yu i sar., 2011**) i njegova sekrecija je pojačana tokom osteogene diferencijacije *in vitro* (**Zajdel i sar., 2017**). U našoj studiji su uočene značajne razlike u sekreciji OPG, izmerene ELISA metodom, između LDSCs i ADSCs kultivisanih 16 dana u OS medijumu, pri čemu je viša koncentracija OPG izmerena u ADSCs u odnosu na LDSCs u OS medijumu (Grafik 8).

Razlike između LDSCs i ADSCs u kapacitetu za osteogenu diferencijaciju su zapažene i na nivou genske ekspresije. Ekspresija *RUNX2* se tokom diferencijacije povećala u oba tipa ćelijskih kultura i bila je viša u ADSCs u odnosu na LDSCs osmog dana osteogene diferencijacije, dok je situacija bila obrnuta 16. dana, pa je ekspresija *RUNX2* u tom terminu bila viša u LDSCs nego u ADSCs (Grafik 9a, b; Tabela 12). *RUNX2* je transkripcioni faktor uključen u proces osteogeneze i esencijalan je za diferencijaciju osteoblasta (**Katagiri i Takahashi, 2002; Komori, 2002; Komori, 2005**). *RUNX2* promoviše diferencijaciju osteoblasta u ranom stadijumu tako što indukuje ekspresiju gena za proteine kostnog matriksa kao što su osteopontin, osteokalcin, kolagen tip 1 i drugi, ali takođe njegova visoka ekspresija može da inhibira diferencijaciju osteoblasta u kasnijoj fazi (**Komori, 2002; Komori, 2008**). Da bi se dostiglo sazrevanje osteoblasta, neophodno je da *RUNX2* bude inicijalno povišeno eksprimiran da bi indukovao ekspresiju gena za proteine

kostnog matriksa, ali njegova ekspresija mora kasnije da se snizi kako bi se omogućio nastavak procesa diferencijacije u zrele osteoblaste. Međutim, ukoliko je *RUNX2* konstantno pojačano aktivan, sazrevanje osteoblasta neće biti moguće. U našoj studiji, ekspresija *RUNX2* je povišena u LDSCs nakon 16 dana diferencijacije, u odnosu na ADSCs, što može biti jedan od razloga za nižu ekspresiju *BGLAP* u LDSCs u odnosu na ADSCs u ovom vremenskom terminu. Objavljeno je od strane drugih autora da je OPG bio povišeno eksprimiran u preosteoblastima u kojima je ekspresija *RUNX2* bila snižena, dok je osteogena diferencijacija bila zaustavljena u ćelijama u kojima je *RUNX2* bio povišeno eksprimiran (Yu i sar., 2011). Naši rezultati su slični ovim nalazima jer je ekspresija *RUNX2* bila viša dok je ekspresija OPG bila niža u LDSCs u odnosu na ADSCs, gde je ekspresija *RUNX2* bila snižena a OPG povišena 16. dana osteogene diferencijacije u OS medijumu.

Osteokalcin je protein koga sekretuju zreli osteoblasti i ima značajnu ulogu u kalifikaciji kostnog tkiva i mineralizaciji MSCs tokom osteogene diferencijacije (Wang i sar., 2015; Tsao i sar., 2017). Objavljeno je da ekspresija *BGLAP* počinje da raste nakon 14 dana osteogene diferencijacije MSCs (Wang i sar., 2015; Tsao i sar., 2017). Ekspresija *BGLAP* u našoj studiji je rasla tokom diferencijacije LDSCs i ADSCs i bila je viša u diferentovanim ADSCs nego u LDSCs nakon 16 dana (Grafik 9c, d; Tabela 13). LDSCs i ADSCs su imale izgled nalik osteoblastima nakon 16 dana osteogene diferencijacije ali, prema dinamici ekspresije gena, osteogeneza je očigledno bila u različitim fazama u LDSCs i ADSCs, što može biti posledica većeg startnog nivoa ekspresije *RUNX2* gena u LDSCs druge pasaže koje su korišćene za diferencijaciju. Postoji svega nekoliko publikacija sa rezultatima analize osteogene diferencijacije ćelija izolovanih iz tkiva lipoma. Makiguchi i sar. (2013) su pokazali da ADSCs izolovane iz tkiva lipoma mogu da se diferentuju u osteoblaste nakon 21 dan u OS medijumu, što je procenjeno merenjem aktivnosti alkalne fosfataze (eng. *alkaline phosphatase* – ALP) i koncentracije kalcijuma. Takođe, Lin i sar. (2007) su objavili da se LDSCs mogu uspešno diferentovati u osteoblaste, ali je u ovoj studiji diferencijacija procenjena samo na osnovu *Von Kossa* bojenja. U studiji u kojoj su ispitivane MSCs izolovane iz ALT/WDL i normalnog masnog tkiva istih pacijenata je pokazano da MSCs poreklom iz ALT/WDL imaju veći potencijal za osteogenu diferencijaciju nego MSCs iz normalnog masnog tkiva, međutim, ARS i bojenje na ALP nisu pokazali statistički značajne razlike (Inatani i sar., 2017). Osim navedenih, nisu



objavljeni rezultati nekih drugih metoda i analiza markera osteogeneze. Međutim, postoje brojni publikovani slučajevi i podaci o osifikaciji lipoma koji su pronađeni u različitim delovima tela (Val-Bernal i sar., 2007; Demiralp i sar., 2009; Sunohara i sar., 2012; Makiguchi i sar., 2013; Raghunath i Manjunatha, 2015; Omonte i sar., 2016; Firth i sar., 2017; Kwan Ip i sar., 2018) i ovaj fenomen se može objasniti upravo postojanjem matičnih ćelija u tkivu lipoma koje mogu da se diferencijuju u osteoblaste i hondrocite.

Povišena ekspresija *RUNX2* u LDSCs u našoj studiji, može se takođe smatrati razlogom nižeg stepena adipogene diferencijacije LDSCs, jer je pokazano od strane drugih autora da povišena ekspresija *RUNX2* zapravo inhibira adipogenezu (Enomoto i sar., 2004; Komori, 2005; Rosen i MacDougald, 2006). Ovaj nalaz sa prethodno razmatranom višom ekspresijom *RUNX2* u LDSCs u odnosu na ADSCs druge pasaže, odnosno neposredno pre diferencijacije, predstavlja značajnu indikaciju da je ekspresija *RUNX2*, zajedno sa obrascem ekspresije *DLK1*, značajan mehanizam koji suprimira sposobnost LDSCs za adipogenu diferencijaciju. Sa druge strane, viša ekspresija *RUNX2* u LDSCs može da ukaže na osteogeni potencijal ovih ćelija, što može biti jedan od mogućih mehanizama formiranja kostnih i hrskavičavih struktura u slučaju pomenutih osteolipoma, jer je povišena ekspresija *RUNX2* neophodna u ranoj fazi i osteogeneze i hondrogenoze.

Postoje brojni podaci o imunomodulacijskoj, pretežno anti-inflamacijskoj, aktivnosti MSCs, pa i ADSCs, koja se ostvaruje direktnom međućelijskom interakcijom između MSCs i imunskih ćelija (limfociti, monociti, makrofagi i druge) ili indirektno preko sekretornih produkata MSCs, u raznim modelima *in vitro* i *in vivo*. Pokazano je da egzozomi poreklom od mišjih ADSCs indukuju polarizaciju LPS i IFN- $\gamma$  stimulisanih mišjih peritonealnih makrofaga prema M2 polarizacionom stanju, što je pokazano povišenom ekspresijom gena za Arg-1 i IL-10 (markera M2 makrofaga) kao i sniženom ekspresijom gena za iNOS, TNF- $\alpha$ , i IL-12 (markera M1 makrofaga) (Zhao i sar., 2018). Druga studija je pokazala da su samo egzozomi poreklom od ADSCs koji su indukovani proinflamacijskim citokinima bili u stanju da značajno preokrenu fenotip makrofaga, izvedenih iz monocita, od M1 prema M2, ukazujući na to da su imunomodulacijska svojstva egzozoma poreklom od ADSCs najverovatnije indukovana inflamacijskim mikrokruženjem pre nego da su konstitutivna (Domenis i sar., 2018). Slični rezultati su dobijeni kada su LPS i IFN- $\gamma$  stimulisani mišji peritonealni makrofagi ko-kultivisani sa mišjim ADSCs ili sa kondicioniranim medijumom (CM) ADSCs, gde je pokazano da CM inhibira M1 polarizaciju makrofaga tako što

smanjuje ekspresiju gena za TNF- $\alpha$  i IL-12, ali i povećava ekspresiju gena za IL-10 (**Shang i sar., 2015**). Smanjenje produkcije TNF- $\alpha$  i azot oksida (NO) u stimulisanim i nestimulisanim makrofagima, kao i povećanje produkcije IL-10, uočeno je kada su mišji peritonealni makrofagi inkubirani sa apoptotičnim mišjim ADSCs u ko-kulturi, sa ili bez LPS u trajanju od 48 h (**Ghahremani Piraghaj i sar., 2018**). Kada su mačje ADSCs ko-kultivisane sa LPS stimulisanim RAW 264.7 makrofagima, produkcija proinflamacijskih citokina TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , kao i iNOS, je bila značajno smanjena (**Chae i sar., 2017**). Slični rezultati su objavljeni iz studije u kojoj je kondicionirani medijum ADSCs, koje su imale povišenu ekspresiju Oct4/Sox2, ispitivan na LPS stimulisanim RAW 264.7 makrofagima (**Li i sar., 2017**). Pokazano je da CM humanih ADSCs modulira odgovor RAW 264.7 makrofaga na LPS stimulaciju, tako što povećava ekspresiju IL-10 i smanjuje ekspresiju proinflamacijskih citokina (**Li i sar., 2018**). U istoj studiji je ovaj rezultat *in vitro* potvrđen i u eksperimentima *in vivo* gde je pronađeno da sistemska primena ADSC-CM značajno smanjuje LPS-indukovan gubitak kostnog tkiva tako što redukuje serumski nivo proinflamacijskih citokina (**Li i sar., 2018**). Ko-kultivacija MSCs poreklom iz kostne srži (eng. *bone marrow-derived MSCs* – BM-MSCs) sa makrofagima izvedenim iz kostne srži, koji su stimulisani sa IFN- $\gamma$ /LPS, značajno smanjuje ekspresiju gena markera M1 makrofaga dok pojačava produkciju IL-10 u makrofagima aktiviranim IL-4 citokinom, što ukazuje na to da MSCs preokreću makrofage iz M1 u M2 polarizaciono stanje (**Cho i sar., 2014**). Mišji ADSC-CM i supernatant ADSC-CM smanjuju ekspresiju M1 markera u LPS stimulisanim i nestimulisanim makrofagima izvedenim iz kostne srži, dok povećavaju ekspresiju M2 markera u nestimulisanim makrofagima (**Takafuji i sar., 2019**). Slično ovom rezultatu, u drugoj studiji su pokazali da ADSC-CM ispoljava parakrine efekte na diferentovane humane makrofage izvedene iz monocita tako što potencira proizvodnju anti-inflamacijskih citokina dok istovremeno redukuje proizvodnju proinflamacijskog citokina TNF- $\alpha$  (**Guillén i sar., 2018**).

Da bismo procenili funkcijsko stanje makrofaga nakon 48 h kultivacije nestimulisanih RAW 264.7 makrofaga u kondicioniranim medijumima LDSCs (LDSC-CM) i ADSCs (ADSC-CM) uradili smo četiri različita testa: NBT, MTT, *Neutral red uptake* (NRU) i *Crystal violet* test (Grafik 10). Uočili smo da LDSC-CM pojačava pinocitoznu aktivnost makrofaga, što je pokazano NRU testom, kao i da je redukcija NBT izraženija u makrofagima kultivisanim u LDSC-CM nego u ADSC-CM, što ukazuje na to da LDSCs proizvode

solubilne faktore koji aktiviraju i menjaju funkcijsko stanje nestimuliranih RAW 264.7 makrofaga u većoj meri nego ADSCs. Uočene su promene u morfologiji makrofaga kultiviranih u LDSC-CM i ADSC-CM u poređenju sa standardnim medijumom, makrofagi su postali rašireniji i dobili su nastavke u CM oba tipa ispitivanih matičnih ćelija (Slika 15). Ove morfološke promene takođe ukazuju na polarizaciju makrofaga prema M2 fenotipu.

Analiza genske ekspresije je pokazala da je ekspresija *Tnf* gena snižena (Grafik 11a) dok je ekspresija *Il10* gena povišena (Grafik 11b) u makrofagima kultiviranim u LDSC-CM i ADSC-CM u odnosu na makrofage kultivirane u standardnom medijumu i LPS-100 tretmanu, što ukazuje na to da LDSC-CM i ADSC-CM menjaju fenotip makrofaga prema anti-inflamacijskom. Merenje sekrecije citokina od strane makrofaga ELISA metodom (Grafik 12), pokazalo je da i LDSC-CM i ADSC-CM smanjuju sekreciju TNF- $\alpha$  u poređenju sa standardnim medijumom i LPS-100 tretmanom što je u skladu sa analizom genske ekspresije i već razmatranim nalazima drugih autora. Nisu uočene statistički značajne razlike u koncentraciji IL-10 sekretovanim od strane makrofaga koji su kultivirani u LDSC-CM, ADSC-CM i standardnom medijumu, ali povišena ekspresija *Il10* upućuje na to da period kultivacije verovatno nije bio dovoljno dug da bi se IL-10 sekretovao. Svi ovi rezultati ukazuju na to da kondicionirani medijumi LDSCs i ADSCs okreću makrofage prema anti-inflamacijskom M2 polarizacionom stanju, sa izraženijim anti-inflamacijskim svojstvima LDSCs.

Produkcija NO je bila nešto veća, ali statistički značajno, u medijumu makrofaga kultiviranih u LDSC-CM i ADSC-CM u odnosu na standardni medijum, bez razlika između samih kondicioniranih medijuma, ali još uvek značajno manja u odnosu na LPS-100 tretman (Grafik 13). Kako se NO produkuje u različitim fiziološkim stanjima, viša koncentracija NO koja je dobijena u našoj studiji u tretmanu makrofaga kondicioniranim medijuma, ne može da bude pripisana samo proinflamacijskom odgovoru makrofaga i verovatno predstavlja nespecifični odgovor makrofaga na CM. U L929 bioeseju, blago smanjenje vijabilnosti L929 ćelija koje su kultivirane 24 h u kondicioniranim medijuma makrofaga, koji su prethodno bili kultivirani 48 h u kondicioniranim medijumima LDSCs (RAW-CM-LDSC) i ADSCs (RAW-CM-ADSC), ali još uvek značajno manje smanjenje vijabilnosti u odnosu na RAW-CM-L100 (CM medijum LPS tretiranih makrofaga) (Grafik 14), može biti posledica više koncentracije NO, ali i prisustva drugih solubilnih produkata u kondicioniranim medijumima makrofaga. Mi smo ranije objavili da su makrofagi ključni

akteri u remodelovanju i disfunkciji masnog tkiva (Stojanović i Najman, 2016) što, zajedno sa rezultatima dobijenim u ovoj studiji, može da ukaže na to da interakcija između makrofaga i matičnih ćelija može biti jedan od mehanizama uključenih u proces formiranja lipoma.

U literaturi se mogu naći brojne publikacije o efektima ADSCs, i MSCs uopšte, na zarastanje rana, u raznim eksperimentalnim modelima *in vitro* i *in vivo*. Efekti ADSCs na zarastanje rana mogu biti rezultat direktnih međućelijskih interakcija ili parakrinih efekata preko sekretornih produkata ADSCs (Cherubino i sar., 2011). MSCs sekretuju razne molekule kao što su faktori rasta, citokini i hemokini, spontano ili nakon stimulacije, koji predstavljaju poznate medijatore reparacije tkiva i ključne regulatore procesa zarastanja rana (Maxson i sar., 2012; Ridiandries i sar., 2018). Stimulatorni efekat ADSC-CM na proliferaciju, migraciju i zarastanje rana u raznim *in vitro* modelima na keratinocitima i fibroblastima je objavljen od strane drugih autora (Lee i sar., 2012; Ong i sar., 2017). U četvorodnevnom tretmanu, 50% ADSC-CM je stimulisao proliferaciju HaCaT ćelija i dermalnih fibroblasta, značajno je stimulisao zarastanje rana *in vitro* u odnosu na kontrolu nakon 24 i 48 h, i značajno je pojačao ekspresiju gena za tip 1 prokolagen  $\alpha 1$  lanac u dermalnim fibroblastima u odnosu na kontrolu nosača nakon 6 h tretmana (Lee i sar., 2012). Pokazano je da ADSC-CM ispoljava svoju aktivnost na zarastanje rana tako što promovise rast i migraciju keratinocita bubne opne što je regulisano hipoksijom i udruženo sa ekspresijom brojnih sekretornih proteina (Ong i sar., 2017). *In vivo* studije, na modelu ekscizionih rana pune debljine na leđima miševa, pokazale su da ADSCs, isporučene u biomimetskom kolagenom skafoldu pospešuju zarastanje dijabetičnih rana (Guo i sar., 2018). Takođe na modelu *in vivo* je pokazano da ADSC stimulišu zarastanje rana kod zdravih i dijabetičnih pacova, njihovom diferencijacijom i povećanom neovaskularizacijom posredovanom sekrecijom angiogenih citokina i faktora rasta od strane ADSCs (Nie i sar., 2011). Kondicionirani medijum pacovskih BM-MSCs, pored toga što stimuliše osteogenezu *in vitro*, takođe stimuliše regeneraciju kostnog tkiva na modelu defekata u kalvariji pacova (Osugi i sar., 2012; Katagiri i sar., 2013). Osim toga, pokazano je da su antifibrozni efekti ADSCs, nakon presađivanja masnog tkiva u ožiljno tkivo, postignuti različitim parakrinim mehanizmima, antioksidativnom i imunomodulacijskom aktivnošću, kao i diferencijacijom ADSCs u fibroblaste i keratinocite (Borovikova i sar., 2018). U našoj studiji, u modelu zarastanja rana u indirektnoj ko-kulturi *in vitro*, uočeni su povoljni efekti LDSC-CM i

ADSC-CM na zatvaranje rana (Grafik 15b; Slika 17) i migraciju fibroblasta (Grafik 15a; Slika 17). Efekti kondicioniranih medijuma su bili uporedivi sa pozitivnom kontrolom i nisu se značajno razlikovali od nje, ukazujući na povoljan efekat kondicioniranih medijuma LDSCs i ADSCs na zarastanje rana, što ide u prilog rezultatima i zapažanjima drugih autora.

### 5.3. MORFOLOŠKA I MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA TKIVA LIPOMA I MASNOG TKIVA

Rezultati analize genske ekspresije u uzorcima tkiva i lipoma i scWAT u našoj studiji ukazuju na razlike u ekspresiji gena markera mezenhimskih matičnih ćelija, adipogeneze, osteogeneze i inflamacije.

Ekspresija *CD44* u lipomima je slična ekspresiji u scWAT (Grafik 16a) dok je ekspresija *POU5F1* viša u uzorcima lipoma u odnosu na scWAT (Grafik 16b), pri čemu nisu uočene statistički značajne razlike. Studije u kojima je analizirana ekspresija ovih markera u tkivu lipoma su retke. Postoji jedna studija u kojoj je zapažena viša ekspresija *POU5F1* u lipomima u odnosu na normalno masno tkivo **Zavan i sar. (2015)**, što je slično nalazu koji smo i mi dobili. U istoj studiji je, međutim, pokazano i da je ekspresija *CD44* povišena u lipomima u odnosu na normalno masno tkivo, što nije slučaj u našoj studiji. Obrazac ekspresije markera matičnih ćelija koji smo uočili u tkivu lipoma i scWAT se razlikuje od onog dobijenog u izolovanim ćelijama, LDSCs i ADSCs, gde je ekspresija i *CD44* i *POU5F1* bila viša u ADSCs u odnosu na LDSCs (Grafik 1a, b), bez statistički značajnih razlika. Dobijena razlika u obrascu ekspresije *CD44* između tkiva i izolovanih ćelija može biti posledica toga što je procenat matičnih ćelija u tkivu mali pa se u sveukupnoj ekspresiji u tkivu ne može videti razlika koja potiče od matičnih ćelija, a svakako je i jedan od bitnih razloga taj što je ekspresija površinskih markera MSCs u SVF niska, pa čak i odsutna dok se ekspresija ovih markera menja i raste kultivacijom ćelija u uslovima *in vitro* sa povećanjem broja pasaža, što je već prethodno razmatrano.

Analiza ekspresije gena markera adipogeneze, u našoj studiji, pokazala je da je ekspresija *ADIPOQ* i *PPARG* viša u uzorcima lipoma u odnosu na scWAT (Grafik 18b, c), iako je statistički značajna razlika pokazana samo za *ADIPOQ*. PPAR $\gamma$  je indukovan u procesu diferencijacije preadipocita u adipocite, njegova ekspresija je najviša u masnom

tkivu (**Rosen i sar., 1999**) i najpouzdaniji je pokazatelj adipogeneze i stvaranja masnog tkiva. PPAR $\gamma$  ispoljava brojne plejotropne efekte pa je tako uključen u razne procese kao što su zarastanje rana i inflamacija (**Costa i sar., 2010**). Osim u masnom tkivu, visoka ekspresija PPAR $\gamma$  je zabeležena i u makrofagima u kojima učestvuje u metabolizmu lipida. U patološkim promenama masnog tkiva, kao što je gojaznost, dolazi do infiltracije i nagomilavanja makrofaga u masnom tkivu, koji imaju značajnu ulogu u očuvanju homeostaze masnog tkiva (**Stojanović i Najman, 2016**). Iako se smatra da aktivnost PPAR $\gamma$  u makrofagima nije neophodna za njihovu diferencijaciju i fagocitnu aktivnost, nedostatak PPAR $\gamma$  u makrofagima je povezan sa nastankom inflamacije u masnom tkivu, intolerancije na glukozu i rezistencije na insulin (**Lefterova i sar., 2010**). Poznato je da PPAR $\gamma$ 2, izoforma PPAR $\gamma$ , ima ključnu ulogu u regulaciji ekspresije gena za adiponektin i pokazana je značajna pozitivna korelacija između ekspresije PPAR $\gamma$ 2 i *ADIPOQ* u potkožnom masnom tkivu (**Kursawe i sar., 2010**). Rezultati naše studije pokazuju da je ekspresija *PPARG* i *ADIPOQ* viša u uzorcima tkiva lipoma u odnosu na scWAT što je u skladu sa rezultatom dobijenim u studiji **Kursawe i sar. (2010)**. Viša ekspresija *PPARG* u našoj studiji može biti posledica kako diferencijacije adipocita tako i prisustva većeg broja infiltriranih ćelija u masnom tkivu, među kojima je veliki udeo makrofaga, što je u skladu sa nalazima iz literature o ekspresiji PPAR $\gamma$  u makrofagima. **Suga i sar. (2009)** su analizirali ekspresiju *PPARG* u lipomima i pokazali da se ekspresija *PPARG* u tkivu lipoma ne razlikuje primetno u odnosu na normalno masno tkivo. U studiji u kojoj je vršena komparacija inkapsuliranih i neinkapsuliranih lipoma, pokazano je da je ekspresija *PPARG* uporediva u ova dva tipa lipoma, iako su markeri inflamacije bili više ekspimirani u neinkapsuliranim lipomima (**Chang i sar., 2018**). Povišena ekspresija *ADIPOQ* i *PPARG* u lipomima u odnosu na normalno masno tkivo je uočena i u studiji **Zavan i sar. (2015)**. Pored rezultata drugih studija, koji su slični našim rezultatima, postoje i studije u kojima su dobijeni drugačiji obrasci ekspresije ova dva gena. U tkivu lipoma pacijenata koji su nosioci mutacije A8344G tRNA(Lys) gena u mtDNK, ekspresija *PPARG* je bila smanjena u odnosu na netransformisano potkožno masno tkivo, a objašnjeno je da to smanjenje ekspresije *PPARG* može da ukaže na dediferencijaciju adipocita (**Guallar i sar., 2006**).

Ekspresija *LEP* u našoj studiji je niža u uzorcima lipoma u odnosu na scWAT, iako nije pokazana statistička značajnost (Grafik 18a). U patološkim promenama masnog tkiva, kao što je gojaznost, ekspresija *LEP* je povišena dok je ekspresija *ADIPOQ* snižena. Ovaj

obrazac ekspresije *ADIPOQ* i *LEP* u lipomima (viša ekspresija *LEP* i niža ekspresija *ADIPOQ* u lipomima u odnosu na normalno masno tkivo) uočen je u studiji **Suga i sar. (2009)** ali su u ovoj studiji uzorci normalnog masnog tkiva uzimani od istih pacijenata koji su imali i lipome, što se razlikuje od porekla naših uzoraka, jer su u našem istraživanju lipomi i uzorci scWAT uzimani od različitih pacijenata. Povišena ekspresija *LEP* u lipomima u odnosu na normalno masno tkivo je uočena i u studiji **Zavan i sar. (2015)**, iako je u istoj studiji pokazano i da je ekspresija *ADIPOQ* viša u lipomima u odnosu na normalno masno tkivo. Značajno snižena ekspresija *ADIPOQ* ali i *LEP* je uočena kod pacijenata sa multiplim simetričnim lipomatozama koji su nosioci patogene varijante u *MFN2* genu, u odnosu na kontrolno potkožno masno tkivo (**Capel i sar., 2018**). Multiple simetrične lipomatoze prikazane u pomenutoj studiji su specifični oblici nagomilavanja masnog tkiva u raznim delovima tela i te mase nalikuju velikim lipomima, ali se u mnogim aspektima razlikuju od lipoma koje smo mi ispitivali (difuzne su, ne-inkapsulirane, sa tendencijom brzog rasta). Zato je drugačiji rezultat autora u pomenutoj studiji očekivan imajući u vidu potpuno drugačiji tip lipomatoznog tumora koje morfološki nalikuju bujanju masnog tkiva u gojaznosti. Pokazano je i na genskom i na proteinskom nivou da lipomi ekspimiraju u velikoj meri leptin i receptor za leptin kao i maligni tumori masnog tkiva (**Oliveira i sar., 2001**). Takođe, pokazano je da su geni za leptin i receptor za leptin ekspimirani na sličan način u lipoblastomu (tumor masnog tkiva kod dece) kao i u normalnom masnom tkivu (**Deutscher i sar., 1999**). U studiji u kojoj su ispitivani lipomi pacijenata sa parcijalnom familijarnom lipodistrofijom, zbog R482W mutacije u *LMNA* genu, nisu uočene promene u ekspresiji *PPARG* i *LEP* u ispitivanim uzorcima lipoma u odnosu na kontrolne uzorke tkiva (**Araújo-Vilar i sar., 2012**).

Ekspresija *DLK1* (markera preadipocita) u našoj studiji je statistički značajno viša u uzorcima lipoma u odnosu na scWAT (Grafik 18d). Ovaj nalaz je u skladu sa histološkom analizom gde se na presecima tkiva lipoma mogu uočiti strukture koje nalikuju preadipocitima i ukazuju na diferencijaciju adipocita. Takođe, ekspresija *PPARG*, markera diferencijacije adipocita, u našoj studiji pokazuje sličan obrazac sa ekspresijom *DLK1*. Podaci o ekspresiji Pref-1 u tkivu lipoma su retki pa su naši rezultati zato od posebnog značaja. Postoji jedna studija u kojoj je pokazano da je ekspresija gena za Pref-1 drastično smanjena u tkivu lipoma pacijenata koji su nosioci mutacije u A8344G tRNA(Lys) gena u mtDNK, u odnosu na netransformisano masno tkivo (**Guallar i sar., 2006**). U studiji u

kojoj su ispitivani lipomi pacijenata sa parcijalnom familijarnom lipodistrofijom, zbog R482W mutacije u *LMNA* genu, pokazano je da je ekspresija gena za Pref-1 bila zanemarljiva u svim ispitivanim uzorcima (**Araújo-Vilar i sar., 2012**).

UCP-1 (eng. *uncoupling protein-1*) se smatra markerom mrkog masnog tkiva (BAT) jer je njegova ekspresija najveća u BAT. Međutim, postoje brojni podaci o njegovoj indukciji u WAT u određenim fiziološkim i patofiziološkim stanjima. Ekspresija UCP-1 na genskom i proteinskom nivou je analizirana u različitim tipovima lipoma. U našoj studiji je uočena statistički značajno viša ekspresija *UCP1* u lipomima u odnosu na scWAT (Grafik 18e). Kod pacijenata sa multiplim simetričnim lipomatozama koji su nosioci patogene varijante u *MFN2* genu, uočena je veoma niska ekspresija *UCP1*, iako je profil genske ekspresije ukazivao na prisustvo komponenata i belog i mrkog masnog tkiva (**Capel i sar., 2018**). U studiji u kojoj su ispitivani uzorci tkiva pacijenata sa MSL koji su nosioci mutacija u tRNA(Lys) genu u mtDNK pokazano je da je *UCP1* eksprimiran u MSL pacijenta koji je nosilac A8344G mutacije u ovom genu, dok ekspresija *UCP1* nije zabeležena u uzorku scWAT istog pacijenta kao ni u lipomu drugog pacijenta sa MSL koji je nosilac drugačije mutacije u istom genu (**Vilà i sar., 2000**). U tkivu lipoma pacijenata koji su nosioci iste mutacije (A8344G tRNA(Lys) gena u mtDNK), u drugoj studiji, uočena je ekspresija *UCP1* u tkivu lipoma dok je u netransformisanom masnom tkivu ekspresija ovog gena bila nemerljiva, iako je stepen u kojem je *UCP1* eksprimiran u lipomima bio varijabilan (**Guallar i sar., 2006**). U studiji u kojoj su ispitivani lipomi pacijenata sa parcijalnom familijarnom lipodistrofijom, zbog R482W mutacije u *LMNA* genu, pokazano je da je ekspresija *UCP1* bila zanemarljiva u svim ispitivanim uzorcima (**Araújo-Vilar i sar., 2012**). Analiza ekspresije *UCP1* u jednoj studiji, u lipomima pacijanata sa MSL, potvrđuje hipotezu da lipomi u MSL potiču od mrkog masnog tkiva, a u istoj studiji autori na osnovu kliničke i histološke analize kao i analize genske ekspresije potvrđuju hipotezu da je MSL mitohondrijski poremećaj (**Plummer i sar., 2013**).

Ekspresija *RUNX2* i *BGLAP*, markera osteogeneze, analizirana je u našoj studiji u uzorcima lipoma i scWAT (Grafik 21) i pokazano je da je ekspresija oba gena viša u uzorcima tkiva lipoma u odnosu na uzorke scWAT, pri čemu je statistički značajna razlika uočena samo u nivou ekspresije *RUNX2*. Poznato je da ekspresija *RUNX2* u početnim fazama osteogeneze mora da bude povišena da bi se pokrenuo proces osteogeneze i sazrevanja osteoblasta, a da se kasnije njegova ekspresija normalno smanjuje. Međutim,



pored toga što je bitan u procesu osteogeneze, *RUNX2* igra značajnu ulogu i u procesu adipogeneze pa je pokazano da njegova povišena ekspresija inhibira proces adipogeneze (Enomoto i sar., 2004; Komori, 2005; Rosen i MacDougald, 2006). Pored adipokina, u masnom tkivu se eksprimiraju i sekretuju osteokini kao što je osteokalcin (Foresta i sar., 2010). Viša ekspresija osteogenih markera u analiziranim uzorcima lipoma u odnosu na scWAT, u našoj studiji, ukazuje na veći osteogeni potencijal lipoma u odnosu na scWAT čime se može objasniti pojava struktura nalik kostnom tkivu u brojnim objavljenim slučajevima osteolipoma, ali i drugačiji diferencijacioni potencijal LDSCs u sprovedenoj *in vitro* studiji. Malo je literaturnih podataka o ekspresiji osteogenih markera u lipomima i masnom tkivu. U jednoj studiji u kojoj su analizirani lipomi, pokazano je da je ekspresija *RUNX2* niža u lipomima u odnosu na normalno masno tkivo (Zavan i sar., 2015), što je drugačije od onoga što smo mi dobili u našem istraživanju.

Kao što je već opisano u uvodnom delu ove disertacije, u molekularnoj osnovi nastanka nekih tipova lipoma nalazi se smanjena ekspresija ili čak potpuni gubitak ekspresije *RB1* gena. Kako je pokazano da gen *RB1*, i njegov proteinski produkt pRB, imaju značajnu ulogu u određivanju sudbine ćelija u procesu opredeljenja i diferencijacije (Calo i sar., 2010), razlike u diferencijaciji LDSCs i ADSCs kao i razlike u ekspresiji osteogenih i adipogenih markera između lipoma i scWAT se možda mogu objasniti bar delom uključenosti ovih molekularnih mehanizama. O tome kako ekspresija *RB1* utiče na proces adipogeneze i osteogeneze postoje različiti podaci u literaturi. Postoje podaci o tome da se u uslovima *in vitro* pRB vezuje za *RUNX2* i na taj način stimuliše proces osteogeneze, a da zajedno sa E2F suprimira PPAR $\gamma$  koji je glavni transkripcioni aktivator u procesu adipogeneze, i na taj način odlučuje o sudbini ćelija u procesu diferencijacije tako što ih okreće ka osteogenezi (Calo i sar., 2010). U uslovima *in vivo* je pokazano da gubitak funkcije RB povoljno utiče na proces adipogeneze zaustavljajući proces osteogeneze (Calo i sar., 2010). Pokazano je i da utišavanje *RB1* gena u preadipocitima dovodi do smanjene akumulacije lipidnih tela u ćelijama, dok smanjenje ekspresije *RB1* u zrelim adipocitima dovodi do gubitka adipocitnog fenotipa i smanjenja ekspresija adipogenih gena i proteina, što zajedno ukazuje na to da je *RB1* neophodan za očuvanje adipogenih karakteristika u diferentovanim ćelijama (Moreno-Navarrete i sar., 2013). Postoje podaci i o tome da pRB određuje da li će preadipocitni prekursor da se diferentuje u beli ili u mrki adipocit, budući da pRB promoviše diferencijaciju ka belom masnom tkivu a inhibira diferencijaciju ka

mrkom masnom tkivu (**Hansen i sar., 2004**). Smanjenje ekspresije *RB1* za 50% dovodi do smanjene ekspresije gena markera adipogeneze kao što su *PPARG*, *ADIPOQ* i *FASN*, dok istovremeno povećava ekspresiju gena markera mrkih adipocita kao što su *UCP1* i *PRDM16*, pri čemu je ovaj nalaz potvrđen i na proteinskom nivou (**Moreno-Navarrete i sar., 2013**). Pomoću ovih literaturnih podataka, mogu se tumačiti i razlike koje su dobijene u našoj studiji između LDSCs i ADSCs. Međutim, rezultati koje smo dobili na nivou ekspresije gena u tkivu lipoma i scWAT su vrlo kompleksni za tumačenje ovog tipa, budući da je ekspresija i *ADIPOQ* i *PPARG*, kao i *DLK1* i *UCP1*, povišena u uzorcima lipoma u odnosu na scWAT, a sa druge strane povišena je i ekspresija *RUNX2* u uzorcima lipoma u odnosu na scWAT.

Jedan od potencijalnih okidača za rast i razvoj lipoma može biti trauma ili povreda tkiva (**Feng i sar., 2013**) koja dovodi do nekroze adipocita koja zatim stvara lokalnu inflamaciju. Određen broj pacijenata sa lipomima u našoj studiji je naveo da je nakon povrede u određenom delu dela, masno tkivo počelo da raste odnosno da je od tog trenutka krenulo stvaranje lipoma. Imajući u vidu da inflamacija može biti pokretač i da leži u osnovi razvoja mnogih tumora, kao i prisustvo većeg broja infiltriranih ćelija u velikom broju ispitivanih lipoma u našoj studiji u odnosu na ispitivane uzorke scWAT, analizirali smo ekspresiju gena uključenih u proces inflamacije. Nivo ekspresije *TNF* (gena za proinflamacijski citokin  $TNF-\alpha$ ) u našoj studiji se nije značajno razlikovao u lipomima i scWAT (Grafik 23a), najverovatnije zbog heterogenosti u ekspresiji između uzoraka različitih pacijenata u grupi scWAT. Sa druge strane, ekspresija *IL10* (gena za anti-inflamacijski citokin IL-10) je bila značajno viša u grupi scWAT u odnosu na grupu lipoma (Grafik 23b). **Suga i sar. (2009)** su pokazali da je ekspresija *TNF* u lipomima niža u odnosu na normalno masno tkivo. U drugoj studiji je uočena povišena ekspresija proinflamacijskih gena *IL6* i *TNF* u lipomima u odnosu na normalno masno tkivo (**Zavan i sar., 2015**). U navedene dve studije, obrazac ekspresije *TNF* je praćen istim obrascem ekspresije *ADIPOQ*, što je u skladu sa podacima studije u kojoj je pokazana pozitivna korelacija između ekspresije *TNF* i *ADIPOQ* (**Kursawe i sar., 2010**). Autori ove studije su taj nalaz objasnili time da povišena ekspresija *ADIPOQ* predstavlja odbrambeni mehanizam za povećanu ekspresiju *TNF* u scWAT. U našem istraživanju ekspresija *TNF* u lipomima je neznatno viša u odnosu na scWAT, ali je ekspresija *ADIPOQ* značajno viša u lipomima u odnosu na scWAT što je u skladu sa histološkom slikom u kojoj se više infiltriranih ćelija

nalik inflamacijskim može uočiti u lipomima u odnosu na scWAT. Tendencija smanjenja ekspresije *TNF* je uočena u lipodistrofičnim lipomima pacijenata sa parcijalnom familijarnom lipodistrofijom, zbog R482W mutacije u *LMNA* genu, dok je ekspresija *TNF* bila viša u lipoatrofičnom tkivu oko lipoma u poređenju sa kontrolnim tkivom (Araújo-Vilar i sar., 2012). Pokazano je i da je ekspresija *TNF* viša u neinkapsuliranim lipomima u odnosu na inkapsulirane lipome (Chang i sar., 2018). U nama dostupnoj literaturi se ne mogu naći podaci o ekspresiji ovih gena specifičnoj za anatomsku lokalizaciju lipoma pa su naši rezultati u tom pogledu jedinstveni jer nam daju uvid u to koliko se ekspresija ovih markera razlikuje u lipomima i scWAT različitih anatomskih lokalizacija. Statistički značajne razlike u ekspresiji gena po lokalizaciji su uočene samo za *PPARG* (Grafik 19f), *UCP1* (Grafik 20d) i *TNF* (Grafik 24b) i to u grupi scWAT. Statistička značajnost u razlikama koje se mogu uočiti u genskoj ekspresiji u tkivima različitih anatomskih lokalizacija se najverovatnije ne može uočiti zbog variranja u ekspresiji gena između različitih uzoraka lipoma sa istih lokalizacija ali od različitih pacijenata, a isto važi i za grupu scWAT.

Lipomi su benigni tumori masnog tkiva koji pokazuju veliku heterogenost u strukturi tkiva što otežava njihovu patohistološku analizu i dijagnostiku. Najveći broj lipoma koji se mogu sresti u kliničkoj praksi predstavljaju tzv. klasični lipomi koji po svom histološkom izgledu podsećaju na netransformisano belo masno tkivo. Međutim, zbog specifičnog, i još uvek nedovoljno razjašnjenog mehanizma nastanka i patogeneze, u lipomima se često mogu videti tkivne strukture koje nalikuju fibroznom tkivu, infiltrati imunskih ćelija, kao i ćelije nalik mrkim adipocitima, pa je napravljena klasifikacija lipoma na klasične lipome, fibrolipome, angioliipome i hibernome. Takođe, usled prisustva različitih tipova ćelija u lipomima postoje i vretenastoćelijski lipomi, u kojima se u međoadipocitnom prostoru mogu videti veća polja vretenastih ćelija sa kolagenim snopovima, i atipični lipomatozni tumori koji sadrže različite morfološke oblike adipocita i karakterišu se prisustvom infiltrata u međoadipocitnom prostoru. Postoje vrlo različiti podaci u literaturi o obliku i veličini adipocita prisutnih u lipomima. Prema nekim autorima u benignim tumorima masnog tkiva adipociti imaju izgled adipocita netransformisanog (normalnog) masnog tkiva, ali isto tako postoje podaci koji govore o većoj heterogenosti adipocita u lipomima. Ipak se smatra da su prisustvo atipičnih ćelija u međoadipocitnom prostoru kao i atipičnih oblika adipocita i atipičnih jedara u samim adipocitima, najverodostojniji dijagnostički pokazatelji maligne transformacije lipomatoznog tkiva, što u uzorcima korišćenim u našoj studiji nije uočeno ni

u jednom slučaju. U našoj studiji su, takođe, isključeni maligni tumori masnog tkiva, odnosno liposarkomi. Većina analiziranih uzoraka lipoma, u našoj studiji, može se svrstati u klasične lipome, ali se takođe u lipomima sa određenih lokalizacija mogu videti i strukture koje bi svrstale te lipome u neku od drugih podvrsta lipoma. U nekim lipomima uzetih sa vrata (Slika 18e, f) i nadlaktatnog dela ruke (Slika 19a, b) mogu se uočiti polja zrelog usnopljenog kolagena između adipocita, kao i infiltrati ćelija. Ipak, ovakva histološka slika se uočava samo kod nekih pacijenata, ali ne kod svih sa takvom lokalizacijom lipoma, pa tako neki lipomi sa vrata (Slika 18c, d) i nadlaktice (Slika 19e, f) nalikuju normalnom masnom tkivu i pripadaju klasičnim lipomima. U uzorcima lipoma sa podlaktatnog dela ruke se mogu uočiti vretenaste ćelije koje su umrežene kolagenim vlaknima (Slika 20), što podseća na vretenastoćelijski tip lipoma. U lipomima sa ostalih delova tela (stomak, leđa, noga) ovakve ćelije se ne uočavaju i ima znatno manje snopova kolagenih vlakana u odnosu na lipome sa vrata, nadlaktice i podlaktice, ali se u lipomima sa stomaka, leđa i noge mogu uočiti razučene manje nakupine ćelija, u kojima većina nalikuje makrofagima, kao i krupne višejedarne ćelije (Slike 21 i 22). Adipociti u analiziranim uzorcima lipoma su okruglog ili poligonalnog oblika, uglavnom unilokulusni, iako se u nekim uzorcima lipoma mogu videti multilokulusni adipociti. Veličina adipocita u grupi lipoma varira u većoj meri nego u uzorcima scWAT, pa se tako u lipomima mogu uočiti i jako mali ali i dosta krupni unilokulusni adipociti. U uzorcima scWAT se može uočiti tipična histološka građa belog masnog tkiva, gde su ćelije unilokulusne, uglavnom poligonalnog oblika, slične veličine u različitim uzorcima i sa različitim anatomskih lokalizacija, manje usnopljenog kolagena, sa malobrojnim infiltratima ćelija u međoadipocitnom prostoru. Krvni sudovi i kapilari različite veličine, i arterijskog i venskog tipa, se mogu uočiti i u uzorcima lipoma i scWAT, a njihova zastupljenost dosta varira od uzorka do uzorka u obe ispitivane grupe i može se uočiti da zavisi i od lokalizacije, ali su varijacije prisutne i u okviru različitih uzoraka sa iste anatomske lokalizacije. Prisustvo većeg broja kapilara i krvnih sudova i u lipomima i u normalnom masnom tkivu, bez značajne razlike u njihovoj gustini, uočena je i u drugim studijama (Suga i sar., 2009) ali na znatno manjem broju uzoraka u odnosu na našu studiju. Kod pacijenata sa multiplim simetričnim lipomatozama koji su nosioci patogene varijante u *MFN2* genu, uzorci lipomatoznog tkiva su imali izgled belog masnog tkiva u kojima su dominantno bili prisutni unilokulusni adipociti standardne veličine za belo masno tkivo (Capel i sar., 2018). U istoj studiji je uočen i određen broj (1/20 do 1/50)

multilokulusnih adipocita koji se nisu nalazili u kontrolnom tkivu. Takođe, lipomatozno tkivo je bilo dosta vaskularizovano sa većim brojem manjim krvnih sudova u čijoj blizini su uglavnom bili lokalizovani multilokulusni adipociti (**Capel i sar., 2018**). U lipodistrofičnim lipomima pacijenata sa parcijalnom familijarnom lipodistrofijom, zbog mutacije u *LMNA* genu, sva ispitivana lipomatozna tkiva bojena H&E metodom su imala izgled tipičnog belog masnog tkiva (**Araújo-Vilar i sar., 2012**).

Histomorfometrijska analiza tkiva u našoj studiji je pokazala da je prosečna veličina adipocita u grupi lipoma ista kao i grupi scWAT bez statistički značajnih razlika u svim analiziranim parametrima veličine adipocita (dijametar, obim, površina), a nije uočena razlika ni u broju adipocita po mm<sup>2</sup> ukupne izmerene površine svih adipocita (Grafik 25). Veća heterogenost u analiziranim parametrima veličine adipocita, u uzorcima tkiva sa različitim anatomskih lokalizacija, uočena je u grupi lipoma u odnosu na grupu scWAT (Grafik 26). Najveća veličina adipocita, u grupi lipoma, zabeležena je u lipomima uzetih sa nadkolenice, dok su najmanji adipociti uočeni u lipomima uzetih sa podlaktatnog dela ruke. U grupi scWAT najveći adipociti su bili prisutni u tkivu uzetog sa kuka, dok su najmanji adipociti bili prisutni u tkivu uzetog sa kolena. Kada je napravljena raspodela veličine adipocita po klasama, uočili smo da postoji razlika između grupe lipoma i grupe scWAT u zastupljenosti adipocita u prvoj i poslednjoj klasi, i u slučaju kada je analiziran parametar dijametar adipocita i kada je analizirana površina adipocita, odnosno, veća je zastupljenost najmanjih i najvećih adipocita u grupi lipoma u odnosu na scWAT (Grafik 27). Ipak, najveća zastupljenost adipocita i u grupi lipoma i u grupi scWAT je uočena u srednjim klasama. Ono što je posebno zanimljivo jeste da je raspon dijametra, obima i površine adipocita veći u grupi lipoma u odnosu na scWAT (Tabela 15), što ukazuje na heterogenost ćelija u smislu tipa i funkcije. Minimalne razlike u veličini i obliku adipocita međutim, prema nekim autorima su glavne odlike lipoma koje ih odvajaju od malignih tumora masnog tkiva (**Dei Tos, 2010**). Drugi autori pak navode da su ćelije u lipomima identične onima koje se nalaze u okolnom masnom tkivu sa razlikom u tome što u lipomima u odnosu na okolno masno tkivo, veličina i oblik ćelija variraju (**Sandberg, 2004**). Pokazano je da je veličina adipocita u inkapsuliranim i neinkapsuliranim lipomima slična i da je prosečan dijametar adipocita u oba tipa lipoma oko 100 µm (**Chang i sar., 2018**). Prosečan dijametar dobijen u ovoj studiji je u skladu sa izmerenim dijametrom adipocita i u grupi lipoma i u grupi scWAT u našoj studiji (Grafik 25a). Razlike u veličini

adipocita između tkiva lipoma i normalnog masnog tkiva su zabeležene u studiji **Zavan i sar. (2015)** i ta razlika se ogledala u tome što je udeo malih adipocita bio značajno veći u tkivu lipoma u odnosu na normalno masno tkivo. Ovakva razlika je uočena i u našem istraživanju. U još jednoj studiji su mali adipociti ( $< 50 \mu\text{m}$  u dijametri) uočeni i u grupi lipoma i u grupi normalnog masnog tkiva, ali je proporcija ovih adipocita bila značajno veća u grupi lipoma u odnosu na normalno masno tkivo (**Suga i sar., 2009**). U istoj studiji je pokazano da je modalna vrednost dijametra adipocita bila slična u lipomima i normalnom masnom tkivu (oko  $90 - 110 \mu\text{m}$ ), ali je uočena i bimodalna distribucija u tkivu lipoma sa drugim pikom na oko  $20 - 30 \mu\text{m}$ , što su autori ove studije objasnili kao pojačanu adipogenezu u tkivu lipoma. Morfometrijska analiza lipodistrofičnih lipoma pacijenata sa parcijalnom familijarnom lipodistrofijom, zbog mutacije u *LMNA* genu, je u jednoj studiji pokazala da su adipociti u lipomatoznim tkivima značajno veći nego adipociti u okolnom masnom tkivu kako kod lipodistrofičnih pacijenata tako i kod kontrolnih pacijenata (**Araújo-Vilar i sar., 2012**). U studiji u kojoj je rađena softverska morfometrija tkiva u pet različitih uzoraka (normalno masno tkivo, nekrozirajuće masno tkivo, konvencionalni lipom, vretenastoćelijski lipom i ALT/WDL), gde je analizirano variranje u veličini adipocita kao i opseg veličina adipocita, nisu uočene značajne razlike u veličini adipocita (kada se analizira medijana) između ovih različitih uzoraka tkiva (**Bean i sar., 2018**). U istoj studiji je pokazano da, isključujući uzorke atrofičnog masnog tkiva, nije uočena značajna razlika u variranju veličine adipocita između ovih 5 različitih tipova tkiva kao i da se maksimalni opseg veličine adipocita značajno razlikovao u multivarijantnom poređenju ovih pet dijagnostičkih grupa. Takođe, autori te studije su uočili i razlike u opsegu veličine adipocita između benignih i malignih tumora masnog tkiva dok je mala razlika u maksimalnom opsegu veličine adipocita uočena između lipoma i normalnog masnog tkiva (**Bean i sar., 2018**).

Imunohistohemijskom analizom smo pokazali da lipomi i scWAT jako ekspimiraju adiponektin (Slika 22), leptin (Slika 23) i receptor za leptin (Slika 24). Adiponektin i leptin su glavni sekretorni produkti zrelih adipocita u masnom tkivu pa je njihova ekspresija najveća u masnom tkivu. Ekspresija ova dva adipokina je viša u potkožnom masnom tkivu nego u visceralnom (**Feng i sar., 2013**). Adiponektin i leptin su adipokini koji imaju ulogu ne samo u homeostazi masnog tkiva već svoje efekte ispoljavaju i na ostale organe do kojih dospevaju putem cirkulacije. Adiponektin se smatra anti-inflamacijskim adipokinom dok se

leptin smatra proinflamacijskim adipokinom, pa je s toga njihov odnos kako u masnom tkivu tako i u cirkulaciji, bitan za odvijanje normalnog metabolizma i remodeliranje masnog tkiva, kao i funkcionisanje ostalih organa. Povišena ekspresija leptina, koja nadjačava efekte adiponektina, u masnom tkivu dovodi do razvoja gojaznosti i pokreće celu mašineriju koja rezultira disfunkcijom masnog tkiva koja može dovesti i do razvoja tumora (**Grossmann i Cleary, 2012**). U našoj studiji, zabeležena je jaka imunoekspresija adiponektina, leptina i receptora za leptin i u grupi lipoma i u grupi scWAT, pri čemu nije bilo moguće ovom metodom uočiti značajne razlike u njihovoj ekspresiji. U studiji u kojoj je ispitivana imunoekspresija leptina i receptora za leptin, u lipomima i malignim tumorima masnog tkiva, pokazano je da svi analizirani tumori masnog tkiva imaju jaku ekspresiju Lep i LepR bez značajnih razlika u ekspresiji između različitih uzoraka tkiva (**Oliveira i sar., 2001**).

PRDM16 pripada familiji PRDM proteina koji funkcionišu kao regulatori transkripcije bitne za razne procese kao što su proliferacija, diferencijacija ćelija i ćelijska signalizacija i predominantno je eksprimiran u BAT (**Warner i sar., 2014**). PRDM16 učestvuje u diferencijaciji prekursornih ćelija u mrke adipocyte i reguliše ekspresiju PPARGC1  $\alpha$  (eng. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma, co-activator 1a*) i PPARGC1  $\beta$ , kao i *UCP1*, u mrkom masnom tkivu (**Seale i sar., 2007; Warner i sar., 2014**). Podaci o ekspresiji PRDM16 u lipomima su vrlo oskudni. U jednoj studiji u kojoj je ispitivano lipomatozno tkivo pacijenata sa multiplim simetričnim lipomatozama koji su nosioci patogene varijante u *MFN2* genu dobijena je niska ekspresija *PRDM16*, a pokazano je da *UCP1* nije eksprimiran (**Capel i sar., 2018**). U našoj studiji, jaka imunoekspresija PRDM16 je uočena u lipomima, pri čemu je najveća imunopozitivnost uočena u multilokulusnim adipocitima i manjim unilokulusnim adipocitima (Slika 35), dok je imunoekspresija PRDM16 u scWAT bila slaba (Slika 36). Ovakav nalaz ekspresije PRDM16 u lipomima je u skladu sa povišenom ekspresijom *UCP1* koji smo uočili analizom genske ekspresije (Grafik 18e) u lipomima u odnosu na scWAT, što ukazuje na to da lipomi ispoljavaju karakteristike mrkog masnog tkiva, iako se mogu uočiti velika variranja u ekspresiji ovih molekula u lipomima koje smo ispitivali a postoje i razlike između lipoma uzetih sa različitih anatomskih lokalizacija (Grafik 20c).

MFN1 (eng. *mitofusin-1*) je protein spoljašnje membrane mitohondija koji ima GTP-aznu aktivnosti i koji posreduje u procesima grupisanja mitohondrija i njihove fuzije (**Ishihara i sar., 2004**). Pokazano je da smanjena aktivnost MFN1 dovodi do promene u

ravnoteži između fuzije i fisije mitohondrija i do fragmentacije mitohondrija (**Zorzano i Pich, 2006; Boutant i sar., 2017**). MFN1 i MFN2 su eksprimirani i u BAT i u WAT, pri čemu je najveća ekspresija MFN2 u BAT (**Golic i sar. 2014; Boutant i sar., 2017**). MFN2 je bitan za očuvanje funkcije BAT i ukoliko je MFN2 neaktivan ili je smanjena njegova aktivnost to dovodi do disfunkcije BAT pri čemu je pokazano da MFN1 ne kompenzuje gubitak funkcije MFN2 (**Boutant i sar., 2017**). U nama dostupnoj literaturi se ne mogu naći podaci o ekspresiji MFN1 u lipomima, iako su retki podaci i o ekspresiji MFN2. U jednoj studiji u kojoj je ispitivano lipomatozno tkivo pacijenata sa MSL, koji su nosioci patogene varijante u *MFN2* genu, pokazano je da je ekspresija *MFN2* slična u lipomatoznom tkivu kao i u kontrolnom tkivu (**Capel i sar., 2018**). Mi smo analizirali imunoekspresiju MFN1 u uzorcima tkiva lipoma i scWAT i rezultati su pokazali da je MFN1 eksprimiran i u lipomima i u scWAT, pri čemu se više polja intenzivne obojenosti može uočiti u lipomima (Slika 37) u odnosu na scWAT (Slika 38). Pozitivna reakcija na MFN1 se može uočiti u lipomima na mestima gde je citoplazma deblja kao i oko jedara adipocita. Nešto jača imunoekspresija MFN1 se može uočiti u manjim adipocitima i u multilokulusnim adipocitima u odnosu na veće, unilokulusne adipocite. Ovakva distribucija pozitivnosti MFN1 odgovara lokalizaciji mitohondrija čije se nakupine mogu videti u tim delovima ćelija na transmisionom elektronskom mikroskopu u uzorcima lipoma u našoj studiji.

Makrofagi imaju značajnu ulogu u očuvanju homeostaze masnog tkiva. U fiziološkim uslovima, u masnom tkivu su dominantni M2 makrofagi (alternativno aktivirani makrofagi ili reparatorni makrofagi). Ukoliko dođe do ekspanzije masnog tkiva, usled poremećene ravnoteže u sekreciji adipokina, leptina i adiponektina, ili nekih drugih faktora, adipociti sekretuju i faktore koji dovode do infiltracije makrofaga koji su dominantno M1 tipa, odnosno klasično aktivirani makrofagi. Ovi makrofagi imaju proinflamacijski karakter i nagomilavaju se oko uvećanih adipocita formirajući CLS i sekretuju veće količine proinflamacijskih citokina kao što su TNF- $\alpha$  i IL-6. U tkivu je u takvom stanju povećana proizvodnja leptina a smanjena proizvodnja adiponektina. Pored M1 makrofaga tokom ekspanzije masnog tkiva se povećava broj i drugih ćelija imunskog sistema kao što su neutrofil, CD8+ T limfociti, IFN- $\gamma$ + Th1 ćelije, B2 ćelije i mastociti (**Choe i sar., 2016**). U ovakvom inflamatornom okruženju, masno tkivo se može „odbraniti“ do određene granice, pri čemu je jedan od mehanizama pojačana ekspresija adiponektina koji ima anti-



inflamacijski karakter i predstavlja oblik reagovanja na povećanu koncentraciju  $\text{TNF-}\alpha$ . Međutim, ukoliko mehanizmi odbrane nisu dovoljni da nadjačaju inflamaciju koja je nastala u tkivu, nastupa disfunkcija masnog tkiva koja vodi ka gojaznosti, a može da dovede i do razvoja tumora masnog tkiva pa i razvoja tumora u drugim tkivima usled endokrine funkcije masnog tkiva koje u ovom stanju proizvode veće količine leptina, proinflamacijskog adipokina. Makrofagi M1 i M2 polarizacionog stanja se odlikuju ekspresijom određenih molekula koji predstavljaju njihove funkcijske markere, pored sekrecije pro- i anti-inflamacijskih citokina. M1 makrofagi ekspimiraju CD40, CD80, CD86, CCR7 i druge, a sekretuju  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-6, IL-12 i IL-1 $\beta$ , dok M2 makrofagi ekspimiraju CD163, CD206, CD200R, a sekretuju uglavnom IL-4, IL-10 i  $\text{TGF-}\beta$  (Vogel i sar., 2014; Stojanović i Najman, 2016).

CD163 je dominantno ekspimiran u makrofagima M2 polarizacionog stanja i uključen je u anti-inflamacijske funkcije ovih makrofaga. CD163+ makrofagi reaguju na inflamaciju i teže da uspostave ravnotežu između M1 i M2 makrofaga i smanje inflamaciju. CD40 je dominantno ekspimiran u M1 makrofagima koji proizvode proinflamacijske citokine. U uzorcima lipoma i scWAT koje smo analizirali mogu se uočiti makrofagi koji ekspimiraju i CD163 i CD40 u različitoj meri. U lipomima se mogu videti CD163 pozitivni jednojedarni makrofagi kao i CD163 pozitivni višejedarni makrofagi, koji se nalaze lokalizovani oko adipocita ali i u međoadipocitnom prostoru u poljima intenzivne infiltracije ćelija (Slike 39 – 42). U scWAT se mogu uočiti CD163 pozitivni makrofagi koji su uglavnom jednojedarni ali ima i višejedarnih koji formiraju CLS (Slike 43 – 45). CD40 pozitivnih makrofaga ima i u lipomima i u scWAT iako u globalu nešto manje u odnosu na CD163 pozitivne makrofage. U lipomima se mogu uočiti CD40 pozitivni jednojedarni i višejedarni makrofagi i u poljima intenzivnije infiltracije i oko adipocita (Slike 46 – 49), dok su CD40 pozitivni makrofagi u scWAT sitniji i uglavnom jednojedarni (Slike 50 – 51). Ono što se može uočiti i u lipomima i u scWAT je da postoje razlike u broju i tipu makrofaga u odnosu na anatomsku lokalizaciju tkiva, pa su tako makrofagi manje zastupljeni u lipomima uzetih sa vrata nego u lipomima sa nadlaktice, leđa i nadkolenice, dok su u scWAT makrofagi manje zastupljeni u tkivu uzetog sa vrata i nadlaktice nego u tkivu uzetog sa stomaka. Ovaj rezultat je u korelaciji sa potencijalom ekspanzije masnog tkiva kao i sa brojem infiltrata ćelija koji se mogu videti u tkivima sa ovih anatomskih lokalizacija. Veće prisustvo CD163 makrofaga u lipomima u odnosu na scWAT, zajedno sa nalazom povišene ekspresije *ADIPOQ* i *PPARG*

u lipomima u odnosu na scWAT, može da ukaže na to da su u lipomima pokrenuti regulatorni mehanizmi čiji je konačni cilj suprimiranje inflamacije, reparacija tkiva i uspostavljanje homeostaze u masnom tkivu. Takođe, ovaj nalaz navodi na pretpostavku da je u nekom trenutku razvoja lipoma postojala inflamacija koja je pokrenula te regulatorne mehanizme. Ovakvom tumačenju idu u prilog i rezultati *in vitro* analize imunomodulacijske aktivnosti LDSCs koji ukazuju na anti-inflamacijski karakter LDSCs, a MSCs su poznate kao regulatorne ćelije u tkivima jer stupaju u interakcije kako sa makrofagima, direktno ili preko sekretornih produkata, tako i sa drugim ćelijama imunskog sistema pri čemu moduliraju imunski odgovor i usmeravaju dalji tok događaja u tkivima. Veća zastupljenost kolagena u lipomima u kojima se uočava i veći broj infiltriranih ćelija, u odnosu na scWAT, mogu biti potvrda ovakvih tumačenja jer se kolagen pojačano sintetiše kao reakcija na inflamaciju i predstavlja jednu od faza u procesu remodeliranja tkiva.

Postoje studije u kojima je analizirano prisustvo i ekspresija CD68 u makrofagima u raznim tipovima lipoma. CD68 je marker monocita i makrofaga, a iako ga mnogi autori svrstavaju u marker M1 makrofaga, postoje vrlo različiti podaci o tome koji tip makrofaga eksprimira ovaj molekul. Imunohistohemijsko bojenje na CD68 je pokazalo da su CD68+ makrofagi retki i u lipomima i u normalnom masnom tkivu, dok CLS nisu uočene u ovoj studiji (**Suga i sar., 2009**). U istoj studiji je objavljeno da u lipomima nema infiltrata makrofaga što je suprotno rezultatima naše studije. U studiji u kojoj je ispitivano lipomatozno tkivo pacijenata sa MSL, koji su nosioci patogene varijante u *MFN2* genu, uočeni su infiltrati makrofaga koji su pozitivni na CD68 i CD163 markere, iako rezultati za CD163 imunoekspresiju nisu prikazani (**Capel i sar., 2018**). U istoj studiji je objavljeno da nisu uočena polja fibroze ni u lipomima ni u kontrolnim uzorcima. Analiza lipodistrofičnih lipoma pacijenata sa parcijalnom familijarnom lipodistrofijom, zbog mutacije u *LMNA* genu, pokazala je da se CD68+ makrofagi uočavaju u lipomima i okolnom masnom tkivu kod lipodistrofičnih pacijenata, dok su veoma retki u kontrolnim uzorcima (**Araújo-Vilar i sar., 2012**). CD68+ makrofagi u toj studiji su bili rasuti po tkivu ali su se mogli videti i oko adipocita kako formiraju CLS koje su bile zastupljenije u lipomima u odnosu na okolno tkivo kod lipodistrofičnih pacijenata. U istoj studiji je pokazano i prisustvo CD3 pozitivnih T ćelija različito distribuiranih ali uglavnom perivaskularno, dok su B ćelije bile odsutne u svim analiziranim uzorcima (**Araújo-Vilar i sar., 2012**). U WAT su česte pojave makrofaga koji formiraju CLS (**Cinti i sar., 2005**) i koji su fagocitno aktivni, dok se u BAT ne sreću

CLS već su makrofagi uglavnom pojedinačni. U našoj studiji u lipomima se mogu videti i pojedinačni i makrofagi koji formiraju CLS pa se na ovom nivou ne može povezati tip makrofaga koji je prisutan u lipomima sa fenotipom lipoma nalik BAT.

Ultrastruktorna analiza uzoraka tkiva lipoma (Slike 52 – 56) i scWAT (Slike 57 – 59) u našoj studiji, pokazala je da su adipociti u lipomima unilokulusni i sporadično multilokulusni dok su u scWAT uglavnom unilokulusni. U velikom broju adipocita u tkivu lipoma se mogu uočiti brojna sitna lipidna tela koja su periferno postavljena u odnosu na glavno lipidno telo adipocita, u vidu venca, i to u više naslojenih redova. Prisustvo sitnih perifernih lipidnih tela se može uočiti i u scWAT, ali mnogo ređe i uglavnom ih je manje po ćeliji, a raspoređene su samo u jednom redu. Na mestima gde je citoplazma šira, u lipomima se može uočiti veći broj grupisanih mitohondrija koje se često nalaze u blizini sitnih lipidnih tela. U scWAT se uočava manji broj mitohondrija koje se nalaze u raznim delovima ćelije i nisu grupisane u tom broju kao što je to slučaj u lipomima. Ultrastruktorna analiza tkiva različitih tipova lipoma, sa različitih lokalizacija, se u literaturi ne može naći, pa su rezultati naših istraživanja s toga od posebnog značaja. U jednoj studiji u kojoj su analizirana lipomatozna tkiva pacijenata sa MSL, koji su nosioci patogene varijante u *MFN2* genu, pokazano je prisustvo struktura koje smo mi uočili u analiziranim uzorcima lipoma, sa većim brojem mitohondrija u adipocitima lipomatoznog tkiva i periferno postavljenim sitnim lipidnim telima, u odnosu na kontrolne uzorke (Capel i sar., 2018). Osim te studije, nema drugih podataka o ultrastrukтури lipomatoznog tkiva.

Hemijski sastav tkiva kao što je količina ukupnih lipida, proteina i nukleinskih kiselina varira u zavisnosti od građe i funkcije tkiva. Iako određivanje ovih molekula u tkivima može biti vrlo informativno, malo je takvih podataka u literaturi. Promene u količini ovih jedinjenja i njihovom odnosu u ćelijama i tkivima, mogu ukazivati na eventualnu disfunkciju, ali i strukturne i funkcionalne promene koje se dešavaju u ćelijama i tkivima u procesu nastanka raznih poremećaja pa i nastanku tumora. Mi smo izolovali i analizirali količinu ovih molekula u uzorcima tkiva lipoma i scWAT, odnosno određivali smo ukupne lipide, proteine, RNK i DNK. Veća količina lipida na 100 mg tkiva je uočena u lipomima u odnosu na scWAT (Grafik 28a). Ovaj rezultat ukazuje na postojanje više adipocita ili na veće adipocite, kao i na pojačanu adipogenezu u uzorcima lipoma, što je u skladu sa histomorfometrijskim merenjem veličine i broja adipocita u tkivima kao i molekularnim markerima (povišena ekspresija *PPARG*) i ultrastrukturnom analizom (pojava više sitnih

lipidnih tela u adipocitima tkiva lipoma). Ni primenom ove metode nije dobijena statistička značajnost u razlikama između grupe lipoma i scWAT, ali se nameće očigledan obrazac, imajući u vidu i druge naše rezultate, da postoje razlike u lipidnom sastavu tkiva lipoma u odnosu na scWAT. Više ukupnih proteina u lipomima u odnosu na scWAT u 100 mg tkiva (Grafik 28b) ukazuje na to da je tkivo lipoma metabolički aktivnije i ako se ovaj rezultat objedini sa histološkom analizom u kojoj je uočeno da u tkivima lipoma ima više kolagena, moglo bi se zaključiti da je sinteza kolagena intenzivnija. Takođe, u lipomima se uočava više infiltrata raznih tipova ćelija, među kojima ima dosta makrofaga koji su sekretorno aktivni, pa ta povećana količina ukupnih proteina u lipomima može biti i zbog prisustva većeg broja ćelija u lipomima u odnosu na scWAT. Više DNK u lipomima u odnosu na scWAT, na 100 mg tkiva (Grafik 28d) je u skladu sa histološkom analizom u kojoj je nađeno da ima više infiltrata ćelija u lipomima u odnosu na scWAT čemu dodatno ide u prilog i povećana količina proteina u lipomima u odnosu na scWAT. Nešto veća količina ukupne RNK je zabeležena u uzorcima scWAT u odnosu na lipome (Grafik 28c), iako ova razlika nije statistički značajna, što može biti u korelaciji sa većom količinom proteina u lipomima u odnosu na scWAT. U literaturi su podaci o količini ovih molekula u tkivima retki, a naročito kada se radi o lipomima. Postoji studija u kojoj je analizirana količina lipida i lipidni sastav u lipomima, u kojoj je pokazano da lipidi čine između 50 i 90% ukupne mase tkiva lipoma, da su trigliceridi dominantna vrsta lipida dok fosfolipida ima manje od 2% ukupnih lipida, i uočene su manje količine slobodnog holesterola (**Knipping i Popper, 1989**). Naši rezultati analize hemijskog sastava tkiva lipoma i scWAT su jedinstveni i koreliraju sa rezultatima ostalih analiza u našoj studiji.

Fizičko-hemijska karakterizacija tkiva lipoma i scWAT, primenom Ramanske spektroskopije je pokazala prisustvo signala karakterističnih za masno tkivo, pri čemu su uočene razlike u intenzitetu signala koji ukazuju na promene u količini pojedinih komponenti i jedinjenja u uzorcima tkiva lipoma (Slike 47 i 48). Najizraženija razlika je u jakom signalu koji potiče od karotenoida ( $1500 - 1520 \text{ cm}^{-1}$ ) koji je manjeg intenziteta u uzorcima lipoma u odnosu na scWAT. Pokazano je da se ovaj signal javlja samo u netransformisanim tkivima dok ne postoji u tumorskom tkivu pa se predlaže kao dijagnostička metoda prilikom uklanjanja tumorskog tkiva koja bi ukazala na zdrave margine oko tumorskog tkiva (**Birtoiu i sar., 2016**), što bi bilo od posebnog značaja u slučaju tumora dojke koji je okružen masnim tkivom. Ovaj nalaz nam može ukazati na to

da je u našoj studiji smanjenje intenziteta ovog signala pokazatelj transformacije adipocita ka tumorskom tkivu, iako ne postoje podaci u literaturi o tome kakav je intenzitet ovog signala u benignim tumorima masnog tkiva u odnosu na normalno (netransformisano) masno tkivo. Promene u signalima u spektrima lipoma u odnosu na scWAT u našoj studiji su uglavnom u oblasti niske frekvencije dok je intenzitet signala u oblasti visoke frekvencije ( $2850 - 2900 \text{ cm}^{-1}$ ) koji su karakteristični za masno tkivo, istog intenziteta i u lipomima i u scWAT.

## 5.4. ZNAČAJ DOBIJENIH REZULTATA

Ova studija je među prvima koja pruža detaljnu analizu matičnih ćelija izolovanih iz lipoma (LDSCs) u poređenju sa matičnim ćelijama izolovanim iz potkožnog masnog tkiva (ADSCs), na ćelijskom i molekularnom nivou, kao i funkcijsku karakterizaciju LDSCs u poređenju sa ADSCs koja podrazumeva njihov kapacitet za adipogenu i osteogenu diferencijaciju, imunomodulatornu aktivnost i efekat na zarastanje rana u uslovima *in vitro*. Rezultati koje smo dobili sugerišu da bi trebalo ograničiti upotrebu LDSCs u regenerativne svrhe, ali sa druge strane, detaljna karakterizacija LDSCs nas je približila otkrivanju potencijalnih mehanizama nastanka lipoma. LDSCs nisu odgovorile na adipogenu indukciju *in vitro* što znači da su negde ukočene i nisu sposobne da daju adipocite u kulturi, dok je osteogeni proces u ovim ćelijama išao ka osteoblastima ali drugačijom dinamikom nego u ADSCs. Ovakav rezultat se može objasniti i time što su LDSCs u startu imale višu ekspresiju *RUNX2* koji je ključni transkripcioni faktor za proces osteogeneze ali i za proces adipogeneze.

Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da imunomodulacijska aktivnost LDSCs, preko međusobne interakcije matičnih ćelija i makrofaga, može biti jedan od mehanizama uključenih u proces nastanka lipoma. Anti-inflamacijski karakter LDSCs, i imunomodulacija makrofaga kultivisanih u kondicioniranom medijumu LDSCs prema M2 polarizacionom stanju, u korelaciji su sa povišenom ekspresijom *ADIPOQ* u tkivu lipoma i prisustvom većeg broja CD163 pozitivnih makrofaga u lipomima što nas navodi na pretpostavku da je u nekoj fazi formiranja lipoma postojala inflamacija a onda su pokrenuti mehanizmi supresije inflamacije.

Viša koncentracija ukupnih lipida, proteina i DNK u lipomima u odnosu na scWAT je u skladu sa histološkom i histomorfometrijskom analizom i ukazuje na to da je adipogeneza intenzivnija u lipomima, a viša ekspresija osteogenih markera u lipomima ukazuje na uopšteno veći stepen diferencijacije u lipomima i njihov veći osteogeni potencijal. Ovi rezultati su u skladu sa ultrastrukturnom analizom tkiva gde je pokazana akumulacija većeg broja sitnijih lipidnih tela u adipocitima lipoma i veći broj grupisanih mitohondrija u adipocitima lipoma, što takođe ukazuje na veću metaboličku aktivnost ovih ćelija. U prilog ovom tumačenju ide i viša ekspresija markera mitohondrija i mrkog masnog tkiva u lipomima.

Dobijeni rezultati su od velikog značaja za razumevanje procesa koji su odgovorni za benignu transformaciju masnog tkiva i nastanak lipoma jer nam daju uvid u ćelijske i molekularne mehanizme uključene u patogenezu lipoma. Dalja istraživanja mehanizama patogeneze lipoma bi trebalo usmeriti ka otkrivanju ključnih molekula koji su odgovorni za usmeravanje signalnih puteva uključenih u analizirane procese i uporediti ove rezultate sa citogenetskim i epigenetskim mehanizmima, što bi bilo od značaja za pronalaženje target molekula za eventualnu prevenciju nastanka ovih tumora masnog tkiva.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu sprovedenih istraživanja sa izolovanim ćelijama *in vitro*, kao i analizom tkiva lipoma i scWAT, možemo zaključiti da se lipomi razlikuju od scWAT kako u građi tkiva tako i na ćelijskom i molekularnom nivou, kao i da izolovane matične ćelije iz lipoma imaju drugačiji potencijal za diferencijaciju od matičnih ćelija iz masnog tkiva u uslovima *in vitro* i drugačiji molekularni profil koji određuje njihovu funkciju i kapacitete za diferencijaciju, u odnosu na matične ćelije iz normalnog (netransformisanog) masnog tkiva.

**Na osnovu sprovedenih istraživanja *in vitro*, sa izolovanim mezenhimskim matičnim ćelijama iz lipoma (LDSCs) i scWAT (ADSCs), a u skladu sa postavljenim ciljevima ovog dela istraživanja, mogu se izvesti sledeći zaključci:**

- Morfologija LDSCs nakon izolacije i tokom kultivacije u uslovima *in vitro* je tipična za mezenhimske matične ćelije i vrlo slična ADSCs, a uočava se i sličan proliferativni potencijal ovih ćelija.
- LDSCs eksprimiraju karakteristične pozitivne površinske i unutarćelijske markere mezenhimskih matičnih ćelija, pri čemu je nešto niža ekspresija pojedinih markera uočena u LDSCs u odnosu na ADSCs, ali ne statistički značajno različita.
- Ekspresija ranog osteogenog markera *RUNX2* je viša dok je ekspresija *BGLAP* niža u LDSCs u odnosu na ADSCs, što ukazuje na različite kapacitete LDSCs i ADSCs za osteogenu diferencijaciju.
- Postoji razlika u genskoj ekspresiji adipogenih markera, pri čemu je ekspresija *LEP* viša dok je ekspresija ostalih gena niža u LDSCs u odnosu na ADSCs.
- LDSCs imaju izraženiji anti-inflamacijski karakter u odnosu na ADSCs, pošto je utvrđena viša ekspresija anti-inflamacijskog gena *IL4* a niža ekspresija proinflamacijskog gena *TNF* u LDSCs u odnosu na ADSCs, dok je ekspresija *IL6* i *IL10* slična u LDSCs i ADSCs.
- Kapacitet LDSCs za diferencijaciju u adipocite je značajno manji u odnosu na ADSCs, što je pokazano analizom genske i proteinske ekspresije markera adipogeneze, mikroskopskom i citohemijskom analizom nakon 21 dan adipogene diferencijacije.



- LDSCs i ADSCs su nakon 16 dana osteogene diferencijacije imale fenotip karakterističan za osteoblaste, što je pokazano mikroskopskom i citohemijskom analizom, ali je analiza genske i proteinske ekspresije markera osteogeneze pokazala da su LDSCs i ADSCs bile u različitim stadijumima osteogeneze.
- Razlike između LDSCs i ADSCs, nakon izolacije iz tkiva, verovatno su posledica različitog molekularnog potpisa ovih ćelija kao i njihovog opredeljenja u tkivu koji određuju različit kapacitet i sudbinu ćelija tokom adipogene i osteogene indukcije *in vitro*.
- Kondicionirani medijumi LDSCs i ADSCs moduliraju odgovor nestimuliranih RAW 264.7 makrofaga *in vitro*, pri čemu LDSCs proizvode faktore koji aktiviraju i menjaju funkcijsko stanje nestimuliranih makrofaga u većoj meri nego ADSCs.
- Kondicionirani medijumi LDSCs i ADSCs okreću RAW 264.7 makrofage prema anti-inflamacijskom M2 polarizacionom stanju, sa izraženijim anti-inflamacijskim svojstvima LDSCs.
- Kondicionirani medijumi LDSCs i ADSCs ispoljavaju efekat na zarastanje rana uporediv efektu pozitivne kontrole, u sistemu indirektno ko-kulture *in vitro*.

**Na osnovu analize tkiva lipoma i scWAT, a u skladu sa postavljenim ciljevima ovog dela doktorske disertacije, možemo izvesti sledeće zaključke:**

- Postoje razlike u ekspresiji gena markera matičnih ćelija u lipomima u odnosu na scWAT, ali te razlike nisu statistički značajne.
- Postoje razlike u ekspresiji gena markera procesa adipogeneze u lipomima u odnosu na scWAT. Ekspresija *ADIPOQ* je značajno viša u lipomima u odnosu na scWAT, dok je ekspresija *LEP* niža u lipomima u odnosu na scWAT. Povišena ekspresija *PPARG* i značajno povišena ekspresija *DLK1* u lipomima u odnosu na scWAT ukazuju na intenzivniji proces adipogeneze u lipomima u odnosu na scWAT. Značajno viša ekspresija *UCP1* u grupi lipoma u odnosu na scWAT ukazuje na to da lipomi ispoljavaju karakteristike mrkog masnog tkiva.

- Postoje razlike u ekspresiji gena markera procesa osteogeneze pri čemu je viša ekspresija *RUNX2* i *BGLAP* u uzorcima lipoma u odnosu na scWAT, što ukazuje na veći osteogeni potencijal lipoma u odnosu na scWAT.
- Postoje razlike u ekspresiji gena markera inflamacije pri čemu je neznatno viša ekspresija *TNF* i značajno niža ekspresija *IL10* zabeležena u lipomima u odnosu na scWAT.
- Postoje razlike u histološkoj građi lipoma i scWAT koje se ogledaju u većoj varijabilnosti veličine adipocita u lipomima u odnosu na scWAT, većoj zastupljenosti usnopljenog kolagena i većem broju ćelijskih infiltrata u lipomima u odnosu na scWAT, kao i prisustvu multilokulusnih adipocita u lipomima.
- Nema značajnih razlika u prosečnoj veličini adipocita u uzorcima lipoma u odnosu na scWAT, ali je opseg variranja veličine adipocita veći u lipomima u odnosu na scWAT pri čemu u lipomima ima više izrazito manjih i većih adipocita u odnosu na scWAT.
- Jaka imunoekspresija adipogenih markera (adiponektina, leptina i receptora za leptin) je uočena i u grupi lipoma i u grupi scWAT.
- Imunoekspresija markera fuzije i grupisanja mitohondrija (MFN1) je nešto jača u grupi lipoma u odnosu na scWAT, a naročito u manjim i multilokulusnim adipocitima, što je u skladu sa ultrastrukturnom analizom gde je uočen veći broj grupisanih mitohondrija u lipomima.
- Imunoekspresija markera mrkih adipocita (PRDM16) je jača u uzorcima lipoma u odnosu na scWAT što ukazuje na to da lipomi ispoljavaju svojstva mrkog ili bež masnog tkiva i u skladu je sa analizom ekspresije *UCP1* i ultrastrukturnom analizom.
- Veća makrofagna infiltracija je prisutna u lipomima u odnosu na scWAT i lokalizacija makrofaga se razlikuje u lipomima u odnosu na scWAT.
- Prisutno je više CD163 pozitivnih makrofaga i u lipomima i u scWAT u odnosu na CD40 pozitivne makrofage, pri čemu je nešto više CD163 pozitivnih makrofaga prisutno u lipomima u odnosu na scWAT.

- Postoje razlike u ultrastrukтури lipoma u odnosu na scWAT. Uočeno je prisustvo većeg broja grupisanih mitohondrija i sitnih lipidnih tela koja su periferno postavljena u odnosu na glavno lipidno telo adipocita što ukazuje na veću metaboličku aktivnost lipoma i u skladu je sa višom ekspresijom markera mrkog masnog tkiva u lipomima u odnosu na scWAT. Veće količine usnopljenog kolagena u međoadipocitnom prostoru su prisutne u lipomima u odnosu na scWAT.
- Postoje razlike u hemijskom sastavu lipoma i scWAT. Više ukupnih lipida, proteina i DNK je prisutno u lipomima u odnosu na scWAT što ukazuje na veću celularnost lipoma, intenzivnu lipogenezu i veću metaboličku aktivnost lipoma u odnosu na scWAT, što je u skladu sa ostalim analizama.
- Na osnovu Ramanskih spektara se može zaključiti da i lipomi i scWAT poseduju karakteristike masnog tkiva, ali da postoje razlike u intenzitetu signala što ukazuje na kvantitativne razlike u pojedinim komponentama tkiva.
- Uporedna analiza genske ekspresije, histološka, histomorfometrijska, imunohistohemijska i ultrastrukturna analiza uzoraka lipoma i scWAT različitih anatomskih lokalizacija, ukazuje na to da se analizirani markeri i parametri razlikuju među različitim anatomskim lokalizacijama i lipoma i scWAT ali i među različitim pacijentima u okviru iste lokalizacije.

Ovi rezultati nam daju nov uvid u ćelijsku i molekularnu osnovu etiopatogeneze lipoma i ukazuju na to da bi potencijalnu upotrebu LDSCs u tkivnom inženjerstvu i regenerativnoj medicini trebalo ponovo razmotriti ili bi bar trebalo naći druge načine i polja primene ovih ćelija. Rezultati ove studije značajno doprinose rasvetljavanju potencijalnih mehanizama nastanka lipoma ukazujući na potencijalne markere i ćelije koji mogu igrati značajnu ulogu u patogenezi lipoma. Buduća istraživanja bi trebalo da budu usmerena na karakterizaciju ostalih populacija ćelija prisutnih u lipomima, analizu signalnih puteva u ćelijama i potencijalnih target mesta u signalnim putevima koji dovode do molekularnog prekopčavanja puteva i usmeravanja ka disfunkciji masnog tkiva koja vodi razvoju benignih tumora.

## **7. LITERATURA**

- Ahima RS, Flier JS. (2000) Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*, 11(8): 327-332.
- Alabdulkarim Y, Ghalimah B, Al-Otaibi M, Al-Jallad HF, Mekhael M, Willie B, Hamdy R. (2017) Recent advances in bone regeneration: The role of adipose tissue-derived stromal vascular fraction and mesenchymal stem cells. *J Limb Length Reconstr*, 3(1): 4-18.
- Alipour R, Sadeghi F, Hashemi-Beni B, Zarkesh-Esfahani SH, Heydari F, Mousavi SB, Adib M, Narimani M, Esmaceli N. (2010) Phenotypic characterizations and comparison of adult dental stem cells with adipose-derived stem cells. *Int J Prev Med*, 1(3): 164–171.
- Araújo-Vilar D, Victoria B, González-Méndez B, Barreiro F, Fernández-Rodríguez B, Cereijo R, Gallego-Escuredo JM, Villarroya F, Pañeda-Menéndez A. (2012) Histological and molecular features of lipomatous and nonlipomatous adipose tissue in familial partial lipodystrophy caused by LMNA mutations. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 76(6): 816-824.
- Aust MC, Spies M, Kall S, Gohritz A, Boorboor P, Kolokythas P, Vogt PM. (2007) Lipomas after blunt soft tissue trauma: are they real? Analysis of 31 cases. *Br J Dermatol*, 157(1): 92-99.
- Baer PC. (2014) Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro. *World J Stem Cells*, 6(3): 256–265.
- Baer PC, Geiger H. (2012) Adipose-derived mesenchymal stromal/ stem cells: Tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int*, 2012: 812693.
- Baglio SR, Pegtel DM, Baldini N. (2012) Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. *Front Physiol*, 3: 359.
- Baglioni S, Cantini G, Poli G, Francalanci M, Squecco R, Di Franco A, Borgogni E, Frontera S, Nesi G, Liotta F, Lucchese M, Perigli G, Francini F, Forti G, Serio M, Luconi M. (2012) Functional differences in visceral and subcutaneous fat pads originate from differences in the adipose stem cell. *PLoS One*, 7(5): e36569.
- Barbatelli G, Murano I, Madsen L, Hao Q, Jimenez M, Kristiansen K, Giacobino JP, De Matteis R, Cinti S. (2010) The emergence of cold-induced brown adipocytes in

- mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298: E1244–E1253.
- Bargut TCL, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. (2017) Browning of white adipose tissue: lessons from experimental models. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 31(1): 20160051.
- Bean GR, Wen KW, Horvai AE. (2018) Adipocyte size variability in benign and malignant lipomatous tumors and morphologic mimics: a quantitative definition using digital pathology. *Hum Pathol*, 72: 52-58.
- Bernardo ME, Fibbe WE. (2013) Mesenchymal stromal cells: Sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*, 13(4): 392–402.
- Berry DC, Jiang Y, Graff JM. (2016) Mouse strains to study cold-inducible beige progenitors and beige adipocyte formation and function. *Nat Commun*, 7: 10184.
- Bhattacharya I, Ghayor C, Weber FE. (2016) The use of adipose tissue-derived progenitors in bone tissue engineering—A review. *Transfus Med Hemother*, 43(5): 336–343.
- Birtoiu IA, Rizea C, Togoe D, Munteanu RM, Micsa C, Rusu MI, Tautan M, Braic L, Scoicaru LO, Parau A, Becherescu-Barbu ND, Udrea MV, Tonetto A, Notonier R, Grigorescu CE. (2016) Diagnosing clean margins through Raman spectroscopy in human and animal mammary tumour surgery: a short review. *Interface Focus*, 2016 6(6): 20160067.
- Borovikova AA, Ziegler ME, Banyard DA, Wirth GA, Paydar KZ, Evans GRD, Widgerow AD. (2018) Adipose-Derived Tissue in the Treatment of Dermal Fibrosis: Antifibrotic Effects of Adipose-Derived Stem Cells. *Ann Plast Surg*, 80(3): 297–307.
- Boutant M, Kulkarni SS, Joffraud M, Ratajczak J, Valera-Alberni M, Combe R, Zorzano A, Cantó C. (2017) Mfn2 is critical for brown adipose tissue thermogenic function. *EMBO J*, 36(11): 1543-1558.
- Bridge JA, Cushman-Vokoun AM. (2011) Molecular Diagnostics of Soft Tissue Tumors. *Arch Pathol Lab Med*, 135(5): 588-601.
- Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. (2008) Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods*, 45(2): 115–120.

- Calo E, Quintero-Estades JA, Danielian PS, Nedelcu S, Berman SD, Lees JA. (2010) Rb regulates fate choice and lineage commitment in vivo. *Nature*, 466(7310): 1110–1114.
- Capel E, Vatier C, Cervera P, Stojkovic T, Disse E, Cottureau AS, Auclair M, Verpont MC, Mosbah H, Gourdy P, Barraud S, Miquel A, Züchner S, Bonnefond A, Froguel P, Christin-Maitre S, Delemer B, Fève B, Laville M, Robert J, Tenenbaum F, Lascols O, Vigouroux C, Jéru I. (2018) MFN2-associated lipomatosis: Clinical spectrum and impact on adipose tissue. *J Clin Lipidol*, 12(6): 1420-1435.
- Chae HK, Song WJ, Ahn JO, Li Q, Lee BY, Kweon K, Park SC, Youn HY. (2017) Immunomodulatory effects of soluble factors secreted by feline adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Vet Immunol Immunopathol*, 191: 22–29.
- Chang H, Park SO, Jin US, Hong KY. (2018) Characterization of two distinct lipomas: A comparative analysis from surgical perspective. *J Plast Surg Hand Surg*, 52(3): 178–184.
- Cherubino M, Rubin JP, Miljkovic N, Kelmendi-Doko A, Marra KG. (2011). Adipose-derived stem cells for wound healing applications. *Ann Plast Surg*, 66(2): 210–215.
- Cho DI, Kim MR, Jeong HY, Jeong HC, Jeong MH, Yoon SH, Kim YS, Ahn Y. (2014) Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Exp Mol Med*, 46: e70.
- Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. (2016) Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 7: 30.
- Chrisinger JSA. (2019) Update on Lipomatous Tumors with Emphasis on Emerging Entities, Unusual Anatomic Sites, and Variant Histologic Patterns. *Surg Pathol Clin*, 12(1): 21-33.
- Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. (2014) Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med*, 12: 8.
- Cinti S. (2009). Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297(5): E977-986.
- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS. (2005) Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*, 46: 2347-55.

- Ciuffi S, Zonefrati R, Brandi ML. (2017) Adipose stem cells for bone tissue repair. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 14(2): 217–226.
- Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. (2013) Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci*, 9(2): 191-200.
- Costa V, Gallo MA, Letizia F, Aprile M, Casamassimi A, Ciccodicola A. (2010) PPAR $\gamma$ : Gene Expression Regulation and Next-Generation Sequencing for Unsolved Issues. *PPAR Res*, 2010: 409168.
- Cui E, Guo H, Shen M, Yu H, Gu D, Mao W, Wang X. (2018) Adiponectin inhibits migration and invasion by reversing epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung carcinoma. *Oncol Rep*, 40(3): 1330-1338.
- Cvetković VJ, Najdanović JG, Vukelić-Nikolić MĐ, Stojanović S, Najman SJ. (2015) Osteogenic potential of in vitro osteo-induced adipose-derived mesenchymal stem cells combined with platelet-rich plasma in an ectopic model. *Int Orthop*, 39(11): 2173–2180.
- Dei Tos AP. (2010) Adipocytic Tumors. In: Folpe AL, Inwards CY, editors. Bone and Soft Tissue Pathology. Philadelphia: *Churchill Livingstone*; pp. 97–118.
- Demiralp B, Alderete JF, Kose O, Ozcan A, Cicek I, Basbozkurt M. (2009) Osteolipoma independent of bone tissue: A case report. *Cases J*, 2: 8711.
- De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P, Benhaim P, Hedrick MH, Fraser JK. (2003) Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett*, 89(2-3): 267–270.
- Derin AT, Yaprak N. (2017) Lipomas: Review and Evaluation of the Literature. *Clin Surg*, 2: 1615.
- Deutscher J, Meyer K, Blütters-Sawatzki R, Franke FE, Kiess W. (1999) Leptin and leptin receptor expression in a lipoblastoma in an 8-year-old girl. *Horm Res*, 51(5): 253-5.
- Domenis R, Cifù A, Quaglia S, Pistis C, Moretti M, Vicario A, Parodi PC, Fabris M, Niazi KR, Soon-Shiong P, Curcio F. (2018) Pro inflammatory stimuli enhance the immunosuppressive functions of adipose mesenchymal stem cells-derived exosomes. *Sci Rep*, 8(1): 13325.



- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4): 315–317.
- Dufrane D. (2017) Impact of age on human adipose stem cells for bone tissue engineering. *Cell Transplant*, 26(9): 1496–1504.
- Engin CS, Altay BÜ, Uyar ME, Çelik T, Yilmaz M, Budak S, Engin Ö. (2015) Current Evaluations of Lipomas. *Journal of Universal Surgery*, 3(3): 15.
- English K. (2013) Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol. Cell Biol*, 91(1): 19–26.
- Enomoto H, Furuichi T, Zanma A, Yamana K, Yoshida C, Sumitani S, Yamamoto H, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Komori T. (2004) Runx2 deficiency in chondrocytes causes adipogenic changes in vitro. *J Cell Sci*, 117(Pt 3): 417–425.
- Enzinger FM, Weiss SW. (1995) Benign lipomatous tumor. In: Enzinger FM, Weiss SW, editors. *Soft Tissue Tumors*, 3rd ed. St Louis: *Mosby*; pp. 381–392.
- Fantuzzi G. (2005) Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol*, 115(5): 911–919.
- Feng B, Zhang T, Xu H. (2013) Human adipose dynamics and metabolic health. *Ann. N Y Acad Sci*, 1281: 160-77.
- Firth NA, Allsobrook O, Patel M. (2017) Osteolipoma of the buccal mucosa: A case report. *Aust Dent J*, 62(3): 378–381.
- Fischer-Posovszky P, Roos J, Zoller V, Wabitsch M. (2018) White Adipose Tissue Development and Function in Children and Adolescents: Preclinical Models. In: Freemark M, editor. *Pediatric Obesity*. Cham: *Humana Press*; pp. 81-93.
- Foresta C, Strapazzon G, De Toni L, Giancesello L, Calcagno A, Pilon C, Plebani M, Vettor R. (2010) Evidence for osteocalcin production by adipose tissue and its role in human metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*, 95(7): 3502-3506.

- Frank AP, de Souza Santos R, Palmer BF, Clegg DJ. (2018) Determinants of body fat distribution in humans may provide insight about obesity-related health risks. *J Lipid Res*, R086975.
- Ghahremani Piraghaj M, Soudi S, Ghanbarian H, Bolandi Z, Namaki S, Hashemi SM. (2018) Effect of efferocytosis of apoptotic mesenchymal stem cells (MSCs) on C57BL/6 peritoneal macrophages function. *Life Sci*, 212: 203–212.
- Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. (2007) Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*, 100(9): 1249–1260.
- Giralt M, Villarroya F. (2013) White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions?. *Endocrinology* 154(9): 2992-3000.
- Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. (2001) Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*, 189(1): 54–63.
- Grossmann ME, Cleary MP. (2012) The balance between leptin and adiponectin in the control of carcinogenesis - focus on mammary tumorigenesis. *Biochimie*, 94(10): 2164-2171.
- Golic I, Velickovic K, Markelic M, Stancic A, Jankovic A, Vucetic M, Otasevic V, Buzadzic B, Korac B, Korac A. (2014) Calcium-induced alteration of mitochondrial morphology and mitochondrial-endoplasmic reticulum contacts in rat brown adipocytes. *Eur J Histochem*, 58(3): 2377.
- Gordon S, Taylor PR. (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 5(12): 953–964.
- Guallar JP, Vilà MR, López-Gallardo E, Solano A, Domingo JC, Gámez J, Pineda M, Capablo JL, Domingo P, Andreu AL, Montoya J, Giralt M, Villarroya F. (2006) Altered expression of master regulatory genes of adipogenesis in lipomas from patients bearing tRNA(Lys) point mutations in mitochondrial DNA. *Mol Genet Metab*, 89(3): 283-285.
- Guillén MI, Platas J, Pérez Del Caz MD, Mirabet V, Alcaraz MJ. (2018) Paracrine Anti-inflammatory Effects of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Human Monocytes. *Front Physiol*, 9: 661.

- Guo J, Hu H, Gorecka J, Bai H, He H, Assi R, Isaji T, Wang T, Setia O, Lopes L, Gu Y, Dardik A. (2018) Adipose-derived mesenchymal stem cells accelerate diabetic wound healing in a similar fashion as bone marrow-derived cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 315(6): C885–C896.
- Han SM, Han SH, Coh YR, Jang G, Chan Ra J, Kang SK, Lee HW, Youn HY. (2014) Enhanced proliferation and differentiation of Oct4- and Sox2-overexpressing human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Exp Mol Med*, 46:e101.
- Hansen JB, te Riele H, Kristiansen K. (2004) Novel function of the retinoblastoma protein in fat: regulation of white versus brown adipocyte differentiation. *Cell Cycle*, 3(6): 774-778.
- Hebbard L, Ranscht B. (2014) Multifaceted roles of adiponectin in cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 28(1): 59-69.
- Hepler C, Vishvanath L, Gupta RK. (2017) Sorting out adipocyte precursors and their role in physiology and disease. *Genes Dev*, 31(2): 127-140.
- Hosney M, Sabet S, El-Shinawi M, Gaafar KM, Mohamed MM. (2017) Leptin is overexpressed in the tumor microenvironment of obese patients with estrogen receptor positive breast cancer. *Exp Ther Med*, 13(5): 2235-2246.
- Hudak CS, Sul HS. (2013) Pref-1, a gatekeeper of adipogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 4: 79.
- Iglesias MJ, Eiras S, Piñeiro R, López-Otero D, Gallego R, Fernández AL, Lago F, González-Juanatey JR. (2006) Gender differences in adiponectin and leptin expression in epicardial and subcutaneous adipose tissue. Findings in patients undergoing cardiac surgery. *Rev Esp Cardiol*, 59(12): 1252-1260.
- Ikeda K, Maretich P, Kajimura S. (2018) The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes. *Trends Endocrinol Metab*, 29(3): 191-200.
- Inatani H, Yamamoto N, Hayashi K, Kimura H, Takeuchi A, Miwa S, Higuchi T, Abe K, Taniguchi Y, Yamada S, Asai K, Otsuka T, Tsuchiya H. (2017) Do Mesenchymal Stem Cells Derived From Atypical Lipomatous Tumors Have Greater Differentiation Potency Than Cells From Normal Adipose Tissues?. *Clin Orthop Relat Res*, 475(6): 1693-1701.

- Ingari JV, Faillace JJ. (2004) Benign tumors of fibrous tissue and adipose tissue in the hand. *Hand Clin*, 20(3): 243–248.
- Ishihara N, Eura Y, Mihara K. (2004) Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci*, 117(Pt 26): 6535-6546.
- Jankovic A, Golic I, Markelic M, Stancic A, Otasevic V, Buzadzic B, Korac A, Korac B. (2015a) Two key temporally distinguishable molecular and cellular components of white adipose tissue browning during cold acclimation. *J Physiol*, 593(15): 3267-3280.
- Jankovic A, Korac A, Buzadzic B, Otasevic V, Stancic A, Daiber A, Korac B. (2015b) Redox implications in adipose tissue (dys)function--A new look at old acquaintances. *Redox Biol*, 6: 19-32.
- Jankovic A, Korac A, Srdic-Galic B, Buzadzic B, Otasevic V, Stancic A, Vucetic M, Markelic M, Velickovic K, Golic I, Korac B. (2014) Differences in the redox status of human visceral and subcutaneous adipose tissues - relationships to obesity and metabolic risk. *Metabolism*, 63(5): 661-671.
- Jankovic A, Otasevic V, Stancic A, Buzadzic B, Korac A, Korac B. (2017) Physiological regulation and metabolic role of browning in white adipose tissue. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 31(1): 20170034.
- Johnson CN, Ha AS, Chen E, Davidson D. (2018) Lipomatous Soft-tissue Tumors. *J Am Acad Orthop Surg*, 26(22): 779-788.
- Jung S, Kleineidam B, Kleinheinz J. (2015) Regenerative potential of human adipose-derived stromal cells of various origins. *J Cranio Maxillofac Surg*, 43(10): 2144–2151.
- Katagiri W, Osugi M, Kawai T, Ueda M. (2013) Novel cell-free regeneration of bone using stem cell-derived growth factors. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 28(4): 1009–1016.
- Katagiri T, Takahashi N. (2002) Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis*, 8(3): 147–159.
- Katira A, Tan PH. (2016) Evolving role of adiponectin in cancer-controversies and update. *Cancer Biol Med*, 13(1): 101-19.

- Kato S, Abarzua-Catalan L, Trigo C, Delpiano A, Sanhueza C, García K, Ibañez C2, Hormazábal K, Díaz D, Brañes J, Castellón E, Bravo E, Owen G, Cuello MA. (2015) Leptin stimulates migration and invasion and maintains cancer stem-like properties in ovarian cancer cells: an explanation for poor outcomes in obese women. *Oncotarget*, 6(25): 21100-21119.
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. (2006) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, 24(5): 1294–1301.
- Kershaw EE, Flier JS. (2004) Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(6): 2548-2556.
- Knipping G, Popper H. (1989) Composition of fat in different types of liposarcomas in comparison with lipomas. *Cancer Lett*, 46(1): 51-56.
- Komori T. (2002) Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development. *J Cell Biochem*, 87(1): 1–8.
- Komori T. (2005) Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. *J Cell Biochem*, 95(3): 445–453.
- Komori T. (2008) Regulation of bone development and maintenance by Runx2. *Front Biosci*, 13: 898–903.
- Kursawe R, Narayan D, Cali AM, Shaw M, Pierpont B, Shulman GI, Caprio S. (2010) Downregulation of ADIPOQ and PPAR $\gamma$ 2 gene expression in subcutaneous adipose tissue of obese adolescents with hepatic steatosis. *Obesity (Silver Spring)*, 18(10): 1911-1917.
- Kwan Ip NS, Lau HW, Wong WY, Yuen MK. (2018) Osteolipoma in the Forearm. *J Clin Imaging Sci*, 8: 20.
- Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, Mourdjeva M, Oreshkova T, Belezmezova K, Kyurkchiev S. (2014) Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*, 6(5): 552–570.
- Lee SH, Jin SY, Song JS, Seo KK, Cho KH. (2012) Paracrine effects of adipose-derived stem cells on keratinocytes and dermal fibroblasts. *Ann Dermatol*, 24(2): 136–143.

- Lefterova MI, Steger DJ, Zhuo D, Qatanani M, Mullican SE, Tuteja G, Manduchi E, Grant GR, Lazar MA. (2010) Cell-specific determinants of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  function in adipocytes and macrophages. *Mol Cell Biol*, 30(9): 2078–2089.
- Legzdina D, Romanauska A, Nikulshin S, Kozlovska T, Berzins U. (2016) Characterization of senescence of culture-expanded human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Int J Stem Cells*, 9(1): 124–136.
- Leto Barone AA, Khalifian S, Lee WP, Brandacher G. (2013) Immunomodulatory effects of adipose-derived stem cells: Fact or fiction? *Biomed Res Int*, 2013:383685.
- Li Y, Gao X, Wang J. (2018) Human adipose-derived mesenchymal stem cell-conditioned media suppresses inflammatory bone loss in a lipopolysaccharide-induced murine model. *Exp Ther Med*, 15(2): 1839–1846.
- Li Q, Han SM, Song WJ, Park SC, Ryu MO, Youn HY. (2017) Anti-inflammatory Effects of Oct4/Sox2-overexpressing Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells. *In Vivo*, 31(3): 349–356.
- Lin TM, Chang HW, Wang KH, Kao AP, Chang CC, Wen CH, Lai CS, Lin SD. (2007) Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human lipoma tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 361(4): 883–889.
- Lin CS, Xin ZC, Dai J, Lue TF. (2013) Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: limitations and challenges. *Histol Histopathol*, 28(9): 1109–1116.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Locke M, Windsor J, Dunbar PR. (2009) Human adipose-derived stem cells: Isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ J Surg*, 79(4): 235–244.
- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. (2007) Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*, 117: 175–184.
- Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. (2014) Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ*, 21(2): 216–225.

- Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. (2014) A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med*, 12: 260.
- Mafi P, Hindocha S, Mafi R, Griffin M, Khan WS. (2011) Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization - a systematic review of the literature. *Open Orthop J*, 5 (Suppl 2): 253–260.
- Makiguchi T, Terashi H, Hashikawa K, Yokoo S, Kusaka J. (2013) Osteolipoma in the glabella: Pathogenesis associated with mesenchymal lipoma-derived stem cells. *J Craniofac Surg*, 24(4): 1310–1313.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, 25(12): 677-686.
- Marques MC, Garcia H. (1997) Lipomatous Tumors. In: De Schepper AM, Parizel PM, Ramon F, De Beuckeleer L, Vandevenne JE, editors. *Imaging of Soft Tissue Tumors*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; pp. 191–207.
- Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, Leroux MA. (2012) Concise review: Role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Transl Med*, 1(2): 142–149.
- McCarthy AJ, Chetty R. (2018) Tumours composed of fat are no longer a simple diagnosis: an overview of fatty tumours with a spindle cell component. *J Clin Pathol*, 71(6): 483-492.
- Meliga E, Strem BM, Duckers HJ, Serruys PW. (2007) Adipose-derived cells. *Cell Transplant*, 16(9): 963–970.
- Mentzel T, Fletcher CD. (1995) Lipomatous tumours of soft tissues: An update. *Virchows Arch*, 427(4): 353–363.
- Mentzel T, Palmedo G, Kuhnen C. (2010) Well-differentiated spindle cell liposarcoma ('atypical spindle cell lipomatous tumor') does not belong to the spectrum of atypical lipomatous tumor but has a close relationship to spindle cell lipoma: clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular analysis of six cases. *Mod Pathol*, 23(5): 729-36.
- Mitterberger MC, Lechner S, Mattesich M, Kaiser A, Probst D, Wenger N, Pierer G, Zwerschke W. (2012) DLK1(PREF1) is a negative regulator of adipogenesis in

- CD105<sup>+</sup> /CD90<sup>+</sup> /CD34<sup>+</sup> /CD31<sup>-</sup> /FABP4<sup>-</sup> adipose-derived stromal cells from subcutaneous abdominal fat pads of adult women. *Stem Cell Res*, 9(1): 35–48.
- Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. (2012) Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells*, 30(5): 804–810.
- Mohammed U, Samaila MO, Abubakar M. (2014) Pattern of adipose tissue tumors in Ahmadu Bello University Teaching Hospital, Zaria, Nigeria. *Ann Niger Med*, 8(1): 8–10.
- Moreno-Navarrete JM, Petrov P, Serrano M, Ortega F, García-Ruiz E, Oliver P, Ribot J, Ricart W, Palou A, Bonet ML, Fernández-Real JM. (2013) Decreased RB1 mRNA, protein, and activity reflect obesity-induced altered adipogenic capacity in human adipose tissue. *Diabetes*, 62(6): 1923-1931.
- Najdanović JG, Cvetković VJ, Stojanović S, Vukelić-Nikolić MĐ, Čakić-Milošević MM, Živković JM, Najman SJ. (2016) Effects of bone tissue engineering triad components on vascularization process: Comparative gene expression and histological evaluation in an ectopic bone-forming model. *Biotechnol Bioeng*, 30(6): 1122–1131.
- Najdanović JG, Cvetković VJ, Stojanović S, Vukelić-Nikolić MĐ, Stanisavljević MN, Živković JM, Najman SJ. (2015) The influence of adipose-derived stem cells induced into endothelial cells on ectopic vasculogenesis and osteogenesis. *Cell Mol Bioeng*, 8(4): 577–590.
- Najman SJ, Cvetković VJ, Najdanović JG, Stojanović S, Vukelić-Nikolić MĐ, Vučković I, Petrović D. (2016) Ectopic osteogenic capacity of freshly isolated adipose-derived stromal vascular fraction cells supported with platelet-rich plasma: A simulation of intraoperative procedure. *J Cranio Maxillofac Surg*, 44(10): 1750–1760.
- Nedergaard J, Cannon B. (2014) The browning of white adipose tissue: some burning issues. *Cell Metab*, 20(3): 396-407.
- Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, Liu-Bryan R, Glass CK, Neels JG, Olefsky JM. (2007) A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem*, 282(48): 35279–35292.



- Nichols J, Zevnik B, Anastasiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H, Smith A. (1998) Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95(3): 379–391.
- Nie C, Yang D, Xu J, Si Z, Jin X, Zhang J. (2011) Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis. *Cell Transplant*, 20(2): 205–216.
- Nielsen GP, Mandahl N. (2002) Lipomas. In: Fletcher CDM, Maertens F, Unni KK, editors. Pathology and Genetics. WHO Classification of Soft Tissue Tumors. Lyon: *LARC Press*; pp 20–22.
- Niwa H, Miyazaki J-i, Smith AG. (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*, 24(4): 372–376.
- Oliveira AM, Nascimento AG, Lloyd RV. (2001) Leptin and leptin receptor mRNA are widely expressed in tumors of adipocytic differentiation. *Mod Pathol*, 14(6): 549-55.
- Omonte SV, de Andrade BA, Leal RM, Capistrano HM, Souza PE, Horta MC. (2016) Osteolipoma: A rare tumor in the oral cavity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 122(1): e8–e13.
- Ong HT, Redmond SL, Marano RJ, Atlas MD, von Unge M, Aabel P, Dilley RJ. (2017) Paracrine Activity from Adipose-Derived Stem Cells on In Vitro Wound Healing in Human Tympanic Membrane Keratinocytes. *Stem Cells Dev*, 26(6): 405–418.
- Osugi M, Katagiri W, Yoshimi R, Inukai T, Hibi H, Ueda M. (2012) Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Tissue Eng Part A*, 18(13-14): 1479–1489.
- Park A, Kim WK, Bae KH. (2014) Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*, 6(1): 33-42.
- Park CW, Kim KS, Bae S, Son HK, Myung PK, Hong HJ, Kim H (2009) Cytokine secretion profiling of human mesenchymal stem cells by antibody array. *Int J Stem Cells*, 2(1): 59–68.

- Plummer C, Spring PJ, Marotta R, Chin J, Taylor G, Sharpe D, Athanasou NA, Thyagarajan D, Berkovic SF. (2013) Multiple Symmetrical Lipomatosis--a mitochondrial disorder of brown fat. *Mitochondrion*, 13(4): 269-276.
- Qian YW, Gao JH, Lu F, Zheng XD. (2010) The differences between adipose tissue derived stem cells and lipoma mesenchymal stem cells in characteristics (In Chinese). *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*, 26(2): 125–132.
- Raghunath V, Manjunatha BS. (2015) Osteolipoma of floor of the mouth. *BMJ Case Rep*, 2015: 2015209883.
- Ranera B, Lyahyai J, Romero A, Vázquez FJ, Remacha AR, Bernal ML, Zaragoza P, Rodellar C, Martín-Burriel I. (2011) Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Vet Immunol Immunopathol*, 144(1-2): 147–154.
- Regulski MJ. (2017) Mesenchymal Stem Cells: “Guardians of Inflammation”. *Wounds*, 29(1): 20–27.
- Ren G, Roberts AI, Shi Y. (2011) Adhesion molecules: Key players in Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Cell Adh Migr*, 5(1): 20–22.
- Ridiandries A, Tan JTM, Bursill CA. (2018) The Role of Chemokines in Wound Healing. *Int J Mol Sci*, 19(10): E3217.
- Rosen ED, MacDougald OA. (2006) Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(12): 885–896.
- Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM. (1999) PPAR $\gamma$  is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Molecular Cell*, 4(4): 611–617.
- Rubtsov Y, Goryunov K, Romanov A, Suzdaltseva Y, Sharonov G, Tkachuk V. (2017) Molecular Mechanisms of Immunomodulation Properties of Mesenchymal Stromal Cells: A New Insight into the Role of ICAM-1. *Stem Cells Int*, 2017: 6516854.
- Sanchez-Gurmaches J, Guertin DA. (2014) Adipocyte lineages: tracing back the origins of fat. *Biochim Biophys Acta*, 1842(3): 340-351.

- Sandberg AA. (2004) Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: lipoma. *Cancer Genet Cytogene*, 150(2): 93–115.
- Schaefer IM, Hornick JL. (2018) Diagnostic Immunohistochemistry for Soft Tissue and Bone Tumors: An Update. *Adv Anat Pathol*, 25(6): 400-412.
- Schipper BM, Marra KG, Zhang W, Donnenberg AD, Rubin JP. (2008) Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg*, 60(5): 538–544.
- Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M, Tavernier G, Langin D, Spiegelman BM. (2007) Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab*, 6(1): 38-54.
- Shang Q, Bai Y, Wang G, Song Q, Guo C, Zhang L, Wang Q. (2015) Delivery of Adipose-Derived Stem Cells Attenuates Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance in Obese Mice Through Remodeling Macrophage Phenotypes. *Stem Cells Dev*, 24(17): 2052–2064.
- Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. (2012) How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol*, 33(3): 136–143.
- Shiau MY, Chiou HL, Lee YL, Kuo TM, Chang YH. (2001) Establishment of a consistent L929 bioassay system for TNF-alpha quantitation to evaluate the effect of lipopolysaccharide, phytoestrogens and cytodifferentiation agents on cytotoxicity of TNF-alpha secreted by adherent human mononuclear cells. *Mediators Inflamm*, 10(4): 199–208.
- Shingyochi Y, Orbay H, Mizuno H. (2015) Adipose-derived stem cells for wound repair and regeneration. *Expert Opin Biol Ther*, 15(9): 1285–1292.
- Stine RR, Shapira SN, Lim HW, Ishibashi J, Harms M, Won KJ, Seale P. (2015) EBF2 promotes the recruitment of beige adipocytes in white adipose tissue. *Mol Metab*, 5(1): 57-65.
- Stojanović S, Najman S. (2016) Macrophages – The Key Actors in Adipose Tissue Remodeling and Dysfunction. In: Najman S, editor. *Cell Biology - New Insights*. London: *IntechOpen*, pp. 187-196.
- Stojanović S, Najman S. (2019) The Effect of Conditioned Media of Stem Cells Derived from Lipoma and Adipose Tissue on Macrophages' Response and Wound Healing in Indirect Co-culture System In Vitro. *Int J Mol Sci*, 20(7): E1671.

- Stojanović S, Najman S, Korać A. (2018) Stem Cells Derived from Lipoma and Adipose Tissue-Similar Mesenchymal Phenotype but Different Differentiation Capacity Governed by Distinct Molecular Signature. *Cells*, 7: E260.
- Suga H, Eto H, Inoue K, Aoi N, Kato H, Araki J, Higashino T, Yoshimura K (2009) Cellular and molecular features of lipoma tissue: Comparison with normal adipose tissue. *Br J Dermatol*, 161(4): 819–825.
- Suganami T, Ogawa Y. (2010) Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol*, 88: 33–39.
- Sul HS. (2009) Minireview: Pref-1: Role in adipogenesis and mesenchymal cell fate. *Mol Endocrinol*, 23(11): 1717–1725.
- Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest*, 121(6): 2094–2101.
- Sunohara M, Ozawa T, Morimoto K, Tateishi C, Ishii M. (2012) Lipoma with bone and cartilage components in the left axilla of a middle-aged woman. *Aesthet Plast Surg*, 36(5): 1164–1167.
- Taha MF, Javeri A, Rohban S, Mowla SJ. (2014) Upregulation of pluripotency markers in adipose tissue-derived stem cells by miR-302 and leukemia inhibitory factor. *Biomed Res Int*, 2014: 941486.
- Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE. (2005) Oct4 expression in adult human stem cells: Evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 26(2): 495–502.
- Takafuji Y, Hori M, Mizuno T, Harada-Shiba M. (2019) Humoral factors secreted from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells ameliorate atherosclerosis in Ldlr<sup>-/-</sup> mice. *Cardiovasc Res*, 115(6): 1041-1051.
- Tang B, Li X, Liu Y, Chen X, Li X, Chu Y, Zhu H, Liu W, Xu F, Zhou F, Zhang Y. (2018) The Therapeutic Effect of ICAM-1-Overexpressing Mesenchymal Stem Cells on Acute Graft-Versus-Host Disease. *Cell Physiol Biochem*, 46(6): 2624–2635.
- Tremp M, Menzi N, Tchang L, di Summa PG, Schaefer DJ, Kalbermatten DF. (2016) Adipose-derived stromal cells from lipomas: Isolation, characterisation and review of the literature. *Pathobiology*, 83(5): 258–266.

- Truong NC, Bui KHT, Van Pham P. (2018) Characterization of senescence of human adipose-derived stem cells after long-term expansion. In: Cohen IR, Lajtha A, Lambris JD, Paoletti R, Rezaei N, editors. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York: *Springer*; pp. 1–20.
- Tsao YT, Huang YJ, Wu HH, Liu YA, Liu YS, Lee OK. (2017) Osteocalcin mediates biomineralization during osteogenic maturation in human mesenchymal stromal cells. *Int J Mol Sci*, 18(1): E159.
- Uccelli A, de Rosbo NK. (2015) The immunomodulatory function of mesenchymal stem cells: Mode of action and pathways. *Ann N Y Acad Sci*, 1351: 114–126.
- Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, Mizuno A, Itoh K, Ueno Y, Shinki T, Gillespie MT, Martin TJ, Higashio K, Suda T. (2000) Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology*, 141(9): 3478–3484.
- Val-Bernal JF, Val D, Garijo MF, Vega A, González-Vela MC. (2007) Subcutaneous ossifying lipoma: Case report and review of the literature. *J Cutan Patol*, 34(10): 788–792.
- Varma MJ, Breuls RG, Schouten TE, Jurgens WJ, Bontkes HJ, Schuurhuis GJ, van Ham SM, van Milligen FJ. (2007) Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev*, 16(1): 91–104.
- Viguerie N, Montastier E, Maoret JJ, Roussel B, Combes M, Valle C, Villa-Vialaneix N, Iacovoni JS, Martinez JA, Holst C, Astrup A, Vidal H, Clément K, Hager J, Saris WH, Langin D. (2012) Determinants of Human Adipose Tissue Gene Expression: Impact of Diet, Sex, Metabolic Status, and Cis Genetic Regulation. *PLoS Genet*, 8(9): e1002959.
- Vilà MR, Gámez J, Solano A, Playán A, Schwartz S, Santorelli FM, Cervera C, Casali C, Montoya J, Villarroya F. (2000) Uncoupling protein-1 mRNA expression in lipomas from patients bearing pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Biochem Biophys Res Commun*, 278(3): 800-802.

- Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. (2017) Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci*, 18(9): E1852.
- Vogel DY, Glim JE, Stavenuiter AW, Breur M, Heijnen P, Amor S, Dijkstra CD, Beelen RH. (2014) Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared. *Immunobiology*, 219(9): 695-703.
- Wang Y, Hudak C, Sul HS. (2010) Role of preadipocyte factor 1 in adipocyte differentiation. *Clin Lipidol*, 5(1): 109–115.
- Wang L, Li ZY, Wang YP, Wu ZH, Yu B. (2015) Dynamic expression profiles of marker genes in osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Chin Med Sci J*, 30(2): 108–113.
- Wang W, Seale P. (2016) Control of brown and beige fat development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17(11): 691-702.
- Wang M, Yuan Q, Xie L. (2018) Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and Clinical Application. *Stem Cells Int*, 2018: 3057624.
- Warner DR, Greene RM, Pisano M. (2014) PRDM16 in Development and Disease. *Human Genet Embryol*, 4(1): 121.
- Watson JE, Patel NA, Carter G, Moor A, Patel R, Ghansah T, Mathur A, Murr MM, Bickford P, Gould LJ, Cooper DR. (2014) Comparison of markers and functional attributes of human adipose-derived stem cells and dedifferentiated adipocyte cells from subcutaneous fat of an obese diabetic donor. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 3(3): 219–228.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 112(12):1796–1808.
- Weissgerber TL, Milic NM, Winham SJ, Garovic VD. (2015) Beyond bar and line graphs: Time for a new data presentation paradigm. *PLoS Biol*, 13(4): e1002128.
- Yan P, Mühlethaler A, Bourlourd KB, Beck MN, Gross N. (2003) Hypermethylation-mediated regulation of CD44 gene expression in human neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 36(2): 129–138.

- Yu H, de Vos P, Ren Y. (2011) Overexpression of osteoprotegerin promotes preosteoblast differentiation to mature osteoblasts. *Angle Orthod*, 81(1): 100–106.
- Zajdel A, Kalucka M, Kokoszka-Mikołaj E, Wilczok A. (2017) Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue and Wharton's jelly of the umbilical cord. *Acta Biochim Pol*, 64(2): 365–369.
- Zavan B, De Francesco F, D'Andrea F, Ferroni L, Gardin C, Salzillo R, Nicoletti G, Ferraro GA. (2015) Persistence of CD34 stem marker in human lipoma: Searching for cancer stem cells. *Int J Biol Sci*, 11(10): 1127–1139.
- Zhao H, Shang Q, Pan Z, Bai Y, Li Z, Zhang H, Zhang Q, Guo C, Zhang L, Wang Q. (2018) Exosomes From Adipose-Derived Stem Cells Attenuate Adipose Inflammation and Obesity Through Polarizing M2 Macrophages and Being in White Adipose Tissue. *Diabetes*, 67(2): 235–247.
- Zorzano A, Pich S. (2006) What is the biological significance of the two mitofusin proteins present in the outer mitochondrial membrane of mammalian cells? *IUBMB Life*, 58(7): 441-443.
- Živković JM, Najman SJ, Vukelić MĐ, Stojanović S, Aleksić MV, Stanisavljević MN, Najdanović JG. (2015) Osteogenic effect of inflammatory macrophages loaded onto mineral bone substitute in subcutaneous implants. *Arch Biol Sci*, 67(1): 173–186.

## PRILOG 1 – SPISAK SKRAĆENICA

- ANOVA** (eng. *analysis of variance*) – analiza varijanse, statistički test
- APC** (eng. *allophycocyanin*) – alofikocijanin, fluorohroma kojom se obeležavaju antitela
- AS** – aritmetička sredina
- ATCC** (eng. *American Type Culture Collection*) – Američka banka ćelija
- BAT** (eng. *brown adipose tissue*) – mrko masno tkivo
- BMI** (eng. *body mass index*) – indeks telesne mase
- CCD** (eng. *charge-coupled device*) – uređaj koji čini deo Ramanskog spektrometra
- cDNK** – komplementarna DNK
- CD105** (eng. *cluster of differentiation 105*) – endoglin (ENG)
- CD33** (eng. *cluster of differentiation 33*) – lektin sličan imunoglobulinu koji se spaja sa sijalinskom kiselinom
- CM** – kondicionirani medijum
- DAB** – di-amino-benzidin
- DNK** – dezoksiribonukleinska kiselina
- EDTA** (eng. *ethylenediaminetetraacetic acid*) – etilendiamintetrasirćetna kiselina
- FBS** (eng. *fetal bovine serum*) – fetalni goveđi serum
- HMGA2** (eng. *high-mobility group AT-hook 2*) – protein visoke mobilnosti grupe A2
- HRP** (eng. *horseradish peroxidase*) – peroksidaza rena
- ICAM-1** (eng. *intercellular adhesion molecule 1*) – međućelijski adhezioni molekul 1
- IFN- $\gamma$**  – interferon  $\gamma$
- IL-4** – interleukin 4
- IL-6** – interleukin 6
- IL-10** – interleukin 10
- iNOS** – inducibilna NO sintetaza
- LPS** (eng. *lipopolysaccharide*) – lipopolisaharid
- LWD** (eng. *low working distance*) – vrsta objektivna
- MCP-1** (eng. *monocyte chemoattractant protein-1*) – monocitni hemoatraktivni protein
- MFN1** (eng. *mitofusin 1*) – mitofuzin 1
- miRNK** – mikro RNK
- MSCs** (eng. *mesenchymal stem cells*) – mezenhimske matične ćelije
- mtDNK** – mitohondrijska dezoksiribonukleinska kiselina
- MTT** – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid
- NBT** (eng. *nitroblue tetrazolium chloride*) – nitro plavo tetrazolijum hlorid
- NO** (eng. *nitric oxide*) – azot oksid



**OPG** – osteoprotegerin

**PBS** (eng. *phosphate buffer saline*) – fiziološki rastvor puferisan fosfatnim puferom

**PCR** (eng. *polymerase chain reaction*) – lančana reakcija polimeraze

**PE** (eng. *phycoerythrin*) – fikoeritrin, fluorohroma kojom se obeležavaju antitela

**PRDM16** (eng. *PR domain containing 16*) – transkripcioni faktor

**PPAR- $\gamma$**  (eng. *peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$* ) – peroksizomalni proliferatorom-aktivirani receptor- $\gamma$

**Real-Time qPCR** (eng. *real time quantitative polymerase chain reaction*) – kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu

**RUNX2** (eng. *runt-related transcription factor 2*) – transkripcioni faktor uključen u regulaciju osteogene diferencijacije

**RNK** – ribonukleinska kiselina

**scWAT** (eng. *subcutaneous white adipose tissue*) – potkožno belo masno tkivo

**SD** – standardna devijacija

**SVF** (eng. *stromal vascular fraction*) – stromalna vaskularna frakcija

**TGF- $\beta$**  (eng. *transforming growth factor  $\beta$* ) – transformišući faktor rasta  $\beta$

**TEM** – transmisiona elektronska mikroskopija

**TNF- $\alpha$**  (eng. *tumor-necrosis factor- $\alpha$* ) – faktor nekroze tumora -  $\alpha$

**UCP-1** (eng. *uncoupling protein 1*) – dekuplujući protein 1

**WAT** (eng. *white adipose tissue*) – belo masno tkivo

## BIOGRAFIJA AUTORA

**Sanja Stojanović** je rođena 12.03.1988. godine u Nišu, R. Srbija. Diplomirala je 2012. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu, na odseku za farmaciju, sa prosečnom ocenom 9,33. Diplomski rad iz predmeta Biologija sa humanom genetikom je odbranila pod mentorstvom prof. dr Steve Najmana, sa ocenom 10. Tokom studija je proglašena za najboljeg studenta farmacije prve i treće godine. Bila je demonstrator na predmetima iz UNO Biologija sa humanom genetikom tokom četiri školske godine. Od druge godine studija bavila se naučnoistraživačkim radom što je rezultiralo dvocifrenim brojem radova prezentovanim na studentskim kongresima. Tokom studija je slušala i polagala dodatne predmete na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu.

Doktorske akademske studije upisuje 2012. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Biologija, modul Biologija ćelija i tkiva. Student je i specijalističkih akademskih studija na Biološkom fakultetu u Beogradu, smer Genetika, od 2016. godine. Na Medicinskom fakultetu u Nišu je bila zaposlena od 2012. godine u svojstvu istraživača pripravnika, a od 2014. godine u svojstvu istraživača saradnika, za rad na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja R. Srbije (Ev. br. III 41017). Zaposlena je od 2017. godine u zvanju asistent za UNO Biologija sa humanom genetikom na Medicinskom fakultetu u Nišu.

Dobitnik je više stipendija tokom integrisanih akademskih studija, a kao doktorand je angažovana na jednom projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja R. Srbije, dva interna projekta Medicinskog fakulteta u Nišu i jednom međunarodnom bilateralnom projektu sa Nemačkom. Dobitnik je nagrade Evropskog udruženja za veštačke organe za projekat u saradnji sa istraživačima iz Nemačke, kao i DAAD stipendije za kratke istraživačke boravke pri čemu je boravila na Univerziteskoj klinici u Hamburgu u Nemačkoj u svojstvu gostujućeg istraživača u trajanju od četiri meseca tokom 2018. godine. Takođe, boravila je i na više kratkih usavršavanja u zemlji i inostranstvu.

Autor je i koautor 25 radova kategorija M20, šest radova kategorija M50, dva poglavlja u monografijama međunarodnog značaja i velikog broja saopštenja sa međunarodnih i domaćih skupova. Član je nekoliko stručnih i naučnih udruženja i recenzent u međunarodnim časopisima iz oblasti biomedicine.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Сања Т. Стојановић

Број индекса Б3019/2012

### Изјављујем

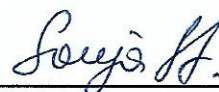
да је докторска дисертација под насловом

**Морфолошка и молекуларна карактеризација хуманог масног ткива и липома различитих анатомских локализација и испитивање изолованих мезенхимских ћелија *in vitro***

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 27.05.2019.



Сања Стојановић

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Сања Т. Стојановић

Број индекса Б3019/2012

Студијски програм Биологија, модул: Биологија ћелија и ткива

Наслов рада: Морфолошка и молекуларна карактеризација хуманог масног ткива и липома различитих анатомских локализација и испитивање изолованих мезенхимских ћелија *in vitro*

Ментори:

Др Стево Најман, редовни професор - Медицински факултет, Универзитет у Нишу

Др Александра Кораћ, редовни професор - Биолошки факултет, Универзитет у Београду

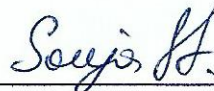
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

у Београду, 27. 05. 2019.



Сања Стојановић

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Морфолошка и молекуларна карактеризација хуманог масног ткива и липома различитих анатомских локализација и испитивање изолованих мезенхимских ћелија *in vitro***

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 27. 05. 2019.

Потпис аутора

  
Сања Стојановић

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.