

Stabilni izotopi ^2H i ^{18}O u dijagnostici i istraživanju pretilosti

Stable isotopes ^2H and ^{18}O in the diagnosis and study of obesity

Diana Mance^{1*}, Sergej Nadalin², Amalija Lekić³, Antonija Ružić Baršić⁴

¹Zavod za fiziku,
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci,
Rijeka

²Zavod za biologiju i medicinsku genetiku,
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci,
Rijeka

³Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci,
Rijeka

⁴Klinički zavod za radiologiju, KBC Rijeka,
Rijeka

Primljeno: 28. 1. 2015.

Prihvaćeno: 23. 2. 2015.

*Dopisni autor:

Dr. sc. Diana Mance, prof. mat. i fiz.
Zavod za fiziku,
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci,
Braće Branchetta 20, 51 000 Rijeka
e-mail: diana.mance@uniri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

Sažetak. Pretilost je bolest u kojoj dolazi do prekomjernog nakupljanja masnog tkiva, što rezultira negativnim utjecajem na zdravlje pojedinca i skraćenim životnim vijekom. Jedan od najvažnijih problema u dijagnostici i istraživanju pretilosti je odabir najboljih metoda za njeno određivanje. Upotrebom vode obilježene stabilnim izotopima vodika i kisika (^2H i ^{18}O) moguće je precizno determinirati količinu masne mase u ukupnoj tjelesnoj masi i pouzdano odrediti ukupnu potrošnju energije organizma u višednevnom kontinuiranom periodu. U razjašnjavanju patofiziologije i etiopatogeneze pretilosti od posebnog je značaja i korištenje ^2H i/ili ^{18}O u praćenju metabolizma lipida, osobito masnih kiselina i triglicerida. Primjena metoda u kojima se koristi voda obilježena izotopima ^2H i ^{18}O ne zahtijeva hospitalizaciju ispitanika, pogodna je za terenska istraživanja na velikom broju ispitanika i primjenjiva je u svim dobnim skupinama. Unatoč mnogobrojnim prednostima, metode koje koriste vodu obilježenu ^2H i ^{18}O u istraživanju pretilosti u nas još uvijek nisu dovoljno poznate. Cilj ovog rada je pojasniti i približiti ih hrvatskoj liječničkoj struci, ali i ostalim zainteresiranim znanstvenicima i stručnjacima, kako bi se što uspješnije mogli pratiti svjetski trendovi pristupa problemu prekomjerne tjelesne mase i pretilosti. Osim toga, u radu su kritički razmotrene i druge metode koje se najčešće koriste u dijagnostici i istraživanju pretilosti.

Ključne riječi: kisik; obilježavanje izotopima; potrošnja energije; pretilost; sastav tijela; vodik

Abstract. Obesity is a disease characterized by excessive accumulation of body fat, resulting in negative impact on an individual's health and shortened life span. One of the most important problems in the diagnosis and study of obesity is the selection of the best methods for its determination. Using water labeled with stable isotopes of hydrogen and oxygen (^2H and ^{18}O) it is possible to accurately determine the share of adipose tissue in body mass and reliably determine total energy expenditure of the organism in a continuous period of several days. The use of ^2H and/or ^{18}O is of special importance in clarifying the pathophysiology and etiopathogenesis of obesity as well as in monitoring the metabolism of lipids, particularly fatty acids and triglycerides. Application of the method in which water labeled with isotopes ^2H and ^{18}O is used does not require the hospitalization of participants, is suitable for field research on a large number of subjects, and is applicable to all age groups. Despite many advantages, the methods in which ^2H and ^{18}O labeled water is used for the study of obesity are still not common in Croatia. The aim of this paper is to familiarize the Croatian medical profession, as well as other interested scientists and experts with the methods, in order to successfully follow global trends in the approach to the problem of excessive body weight and obesity. In addition, the paper critically discusses some other methods that are commonly used in the diagnosis and study of obesity.

Key words: body composition; energy expenditure; hydrogen; isotope labeling; obesity; oxygen

UVOD

Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije pretilost je bolest u kojoj dolazi do prekomjernog nakupljanja masnog tkiva, što rezultira negativnim utjecajem na zdravlje pojedinca i posljedično skraćenim očekivanim životnim vijekom^{1,2}. Do prekomjernog nakupljanja masnog tkiva dolazi kada količina energije koja je unesena u organizam nadmaši količinu energije koju organizam troši u svakodnevnoj tjelesnoj aktivnosti i procesima proizvodnje topline^{2,3}. Istraživanja ukazuju na važnu ulogu genetičkih čimbenika u nastanku energetske neravnoteže u organizmu i etiopatogenezi pretilosti te na više od 500 potencijalnih gena kandidata^{2,4,5}. Poznato je i da dugotrajno uzimanje nekih lijekova, poput atipičnih antipsihotika, antidepresiva, steroida i antikonvulzivnih lijekova može također pogodovati razvoju pretilosti⁶⁻⁸. Naposljetku, pretilost je značajka kliničke slike i nekih drugih bolesti, poput hipotireoidizma, Cushingove bolesti, sindroma policističnih jajnika i Prader-Willi sindroma⁹⁻¹². Pretilost je povezana s porastom morbiditeta i mortaliteta od kardiovaskularnih bolesti, posebice hipertenzije i koronarne bolesti srca, metaboličkih bolesti, poput dijabetesa i dislipidemija, a značajno pridonosi i nastanku bolesti respiratornog i lokomotornog sustava te psihijatrijskih bolesti^{2,4,13}. Osim toga, povisuje rizik obolijevanja od nekih malignih bolesti, poput karcinoma debelog crijeva, jednjaka, želuca, dojke i endometrija^{2,4,14}.

Zbog velikog kliničkog i socioekonomskog utjecaja, kao i kontinuirane progresije prevalencije te terapijske tvrdokornosti, pretilost se smatra jednim od vodećih javnozdravstvenih problema današnjice u razvijenim zemljama, ali i u zemljama u razvoju^{3,15}. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije za 2014. godinu 1,9 milijardi odraslih osoba ima prekomjernu tjelesnu masu, dok se 600 milijuna smatra pretilima¹⁶. Podaci za države Europske unije upućuju na to da čak 30 – 70 % odraslih osoba ima prekomjernu tjelesnu masu te da je 10 – 30 % odrasle populacije pretilo^{2,16}. Niti Republika Hrvatska ne zaostaje za negativnim svjetskim trendovima. Istraživanje provedeno 2008. godine na velikom uzorku odraslih osoba u hrvatskoj populaciji ($N = 3.229$) upućuje na prevalenciju pretilosti od približno 20 % u oba spola, kao

i značajan porast prevalencije pretilih osoba u petogodišnjem razdoblju od 2003. do 2008. godine, posebice među ženama (> 60 %)¹⁷. Ispitivanje provedeno u populaciji školske djece ($N = 487$), približne dobi od 11 godina, utvrdilo je prevalenciju pretilosti od 26 % u djevojčica i 21 % u dječaka, što je usporedivo s ostalim mediteranskim državama, ali znatno više nego u središnjoj ili sjevernoj Europi¹⁸. Nadalje, uočena je i pozitivna korelacija između pretilosti roditelja i djece, odnosno adolescenata

Visok stupanj pretilosti može skratiti očekivano trajanje životnog vijeka za čak 20 godina. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije za 2014. godinu 1,9 milijardi odraslih osoba ima prekomjernu tjelesnu masu, a 600 milijuna je pretilo. Nakon ovisnosti o duhanskom dimu, pretilost predstavlja drugi najčešći uzrok bolesti koji je moguće prevenirati.

ta¹⁸, a istraživanja u svijetu pokazala su da pretilost u školskoj dobi predstavlja 50 %-tni rizik za razvoj pretilosti u odrasloj dobi¹⁹.

Za evaluaciju problema pretilosti, kako na individualnoj tako i na populacijskoj razini, važna je upotreba adekvatnih metoda u njenoj dijagnostici i istraživanju²⁰. Najjednostavniji postupci uključuju standardna antropometrijska mjerenja, kao što su određivanje indeksa tjelesne mase (engl. *body mass index*; BMI) i mjerenje opsega struka, koji se ubrajaju u rutinske dijagnostičke postupke, te mjerenje opsega trbuha i omjera opsega struka i bokova^{2,21,22}. Preciznijim, "dvokomponentnim" metodama analize tjelesnog sastava moguće je odrediti zastupljenost masne mase (engl. *fat mass*; FM) i nemasne mase (engl. *fat free mass*; FFM) u ukupnoj tjelesnoj masi, a još sofisticiranijim, "višekomponentnim" metodama, moguće je razlikovati tjelesne komponente kao što su mast, proteini, minerali i voda. "Višekomponentne" metode često koriste kombinaciju različitih "dvokomponentnih" metoda kojima se određuje volumen tijela, ukupna količina vode u organizmu (engl. *total body water*; TBW), koštani mineralni sadržaj i sl.²³ Metoda kompjutorizirane tomografije (engl. *computerised tomography*; CT) najviše je zastupljena "višekomponentna" meto-

da u istraživanju, a njome je moguće precizno odrediti količinu masnog tkiva unutar abdomena i diferencirati ga od kože, kosti, mišića i unutrašnjih organa^{21,22,24}. Ipak, danas se još uvijek najviše koriste "dvokomponentne" metode među kojima treba spomenuti mjerenje debljine kožnih nabora, bioelektričnu impedancijsku analizu (engl. *bioelectrical impedance analysis*; BIA), dvoenergij-sku rendgensku apsorpciometriju (engl. *dual-energy X-ray absorptiometry*; DXA) i denzitometriju, koja se temelji na mjerenju gustoće tijela pod vodom (hidrodenzitometrija) ili pak u komori sa zrakom (zračna pletizmografija)^{21,25}. Nadalje, zastupljenost FM-a i FFM-a u ukupnoj tjelesnoj masi moguće je odrediti i mjerenjem TBW-a obilježavanjem vode pomoću stabilnih izotopa vodika (^2H) ili kisika (^{18}O), a pod pretpostavkom da TBW čini 73 % FFM-a^{21,26}.

S obzirom na to da nastanak pretilosti implicira postojanje energetske neravnoteže, u njenom se istraživanju poseban značaj pripisuje metodama kojima je moguće odrediti potrošnju energije (engl. *energy expenditure*; EE) i u skladu s time optimalizirati unos energije (engl. *energy intake*; EI) u organizam, ali i tjelesnu aktivnost^{14,27,28}. Pri tome se od objektivnih metoda najčešće koristi indirektna kalorimetrija, koja procjenjuje utrošak energije mjerenjem potrošnje kisika i stvaranjem ugljičnog dioksida (CO_2), dok subjektivne metode uključuju upitnike o unosu hrane i/ili fizičkoj aktivnosti^{27,29}. Na raspolaganju su i metoda direktne kalorimetrije koja kvantificira količinu oslobođene topline tijela u izoliranim uvjetima, BIA, a u novije vrijeme i metoda dvostruko obilježene vode (engl. *double labeled water* – DLW) kao nekonvencionalna metoda indirektna kalorimetrije^{3,26,27}. Kod metode DLW-a se kao obilježivači istovremeno koriste oba prethodno spomenuta stabilna izotopa (^2H i ^{18}O), a njome je, za razliku od ostalih metoda mjerenja potrošnje energije, moguće odrediti ukupnu potrošnju energije (engl. *total energy expenditure*; TEE) u višednevnom kontinuiranom periodu²⁶⁻²⁸. Čimbenici koji određuju TEE su potrošnja energije u stanju mirovanja (engl. *resting energy expenditure*; REE) na koju otpada oko 60 – 75 % TEE-a, termički učinak hrane (engl. *thermic effect of food*; TEF) koji čini približno 10 % TEE-a te aktivna potrošnja energije koja pridonosi s 15 – 30 %^{27,30}.

Jedan od najvažnijih problema u dijagnostici i istraživanju pretilosti upravo je odabir najbolje metode za njeno određivanje jer svaka od metoda koje se koriste u medicinskoj praksi ima svoje prednosti i nedostatke^{21,31}. Metode koje koriste vodu obilježenu stabilnim izotopima ^2H i ^{18}O omogućuju najcjelovitiji pristup pretilosti^{3,26,32}. Kao što je već spomenuto, upotreba ^2H i/ili ^{18}O daje preciznu "dvokomponentnu" analizu tjelesnog sastava određivanjem TBW-a i jedina omogućuje pouzdano dugoročno određivanje TEE-a metodom DLW-a^{3,26}. Osim toga, istraživanja su pokazala da je obilježavanjem organskih molekula pomoću vode obogaćene ^2H ili ^{18}O kao i korištenjem metode DLW-a moguće istražiti različite metaboličke puteve u organizmu^{3,33-35}. U razjašnjavanju etiopatogeneze pretilosti od posebnog značaja pokazala se i primjena ^2H i ^{18}O u praćenju metabolizma lipida, osobito masnih kiselina i triglicerida^{3,34}.

Iako je voda obilježena ^2H i ^{18}O u istraživanju pretilosti u humanoj populaciji u upotrebi već tridesetak godina²⁶, njeno korištenje je u nas još uvijek relativno nepoznato. Stoga je cilj ovoga rada hrvatskoj liječničkoj struci, ali i drugim zainteresiranim znanstvenicima i stručnjacima, pojasniti i približiti metode istraživanja pretilosti koje koriste vodu obilježenu ^2H i ^{18}O , kako bi se omogućilo uspješnije praćenje svjetskih trendova u pristupu problemu pretilosti. S obzirom na to da se najveći broj istraživanja pretilosti u humanoj populaciji, u kojima se koriste ^2H i ^{18}O , temelji na određivanju sastava tijela i mjerenju potrošnje energije²⁶, u radu su detaljnije opisani principi određivanja sastava tijela i mjerenja potrošnje energije pomoću vode obilježene ^2H i ^{18}O . Osim toga, kritički su razmotrene i neke od ostalih često korištenih metoda za određivanje pretilosti.

STABILNI IZOTOPI ^2H I ^{18}O U ISTRAŽIVANJU PRETILOSTI

Osnovne značajke stabilnih izotopa ^2H i ^{18}O

Izotopi su atomi određenog elementa koji se razlikuju prema broju neutrona u jezgri, odnosno imaju jednak atomski broj (broj protona u jezgri, Z), a različit maseni broj (ukupan broj protona i neutrona u jezgri, A). Za razliku od radioaktivnih izotopa, jezgra stabilnih izotopa se ne raspada te stabilni izotopi nisu izvor ionizirajućeg zračenja.

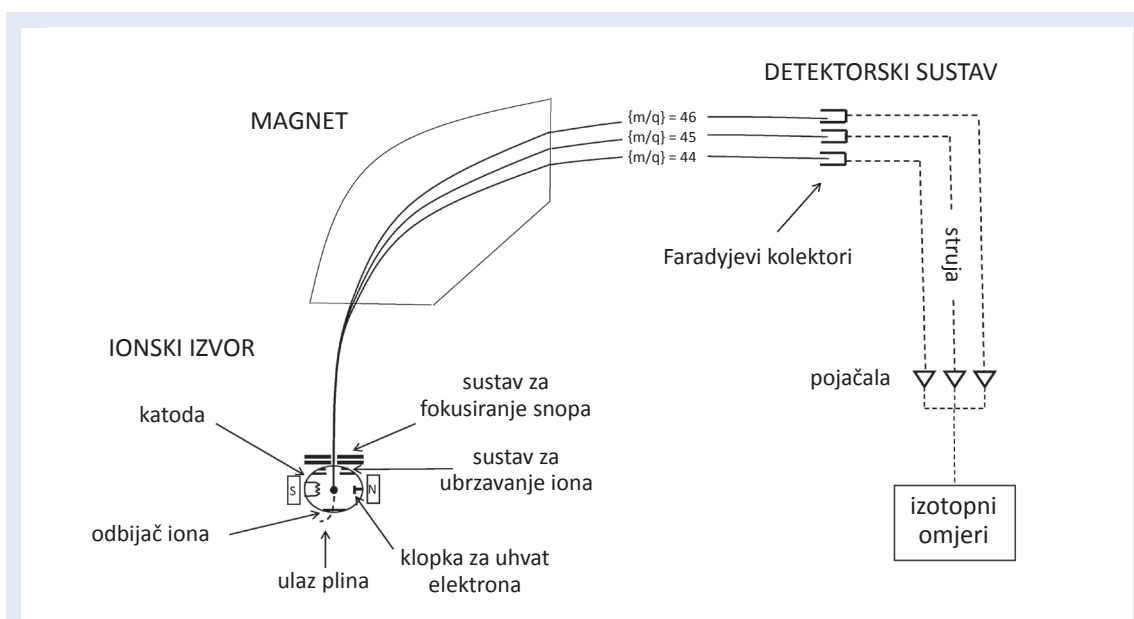
Stabilne izotope vodika čine lakši stabilni izotop vodika (^1H), koji je u ukupnom stabilnom vodik u prirodi zastupljen s 99,985 % i teži stabilni izotop vodika (^2H) na koji otpada preostalih 0,015 %³⁶. U ukupnom stabilnom kisiku u prirodi najveći udio posjeduje najlakši stabilni kisik ^{16}O (99,761 %), a puno manje udjele imaju teži stabilni izotopi ^{17}O (0,035 %) i ^{18}O (0,204 %)³⁶. Rezultati mjerenja zastupljenosti stabilnih izotopa izražavaju se pomoću δ vrijednosti koja predstavlja relativnu razliku omjera zastupljenosti težeg i lakšeg izotopa u uzorku (R_{uzorak}) i standardu (R_{standard}), a računa se prema formuli: δ (‰) = $(R_{\text{uzorak}}/R_{\text{standard}}) - 1$ ^{26,36}. U slučaju vodika i kisika, δ vrijednosti označavaju se $\delta^2\text{H}$ i $\delta^{18}\text{O}$, a odgovarajući izotopni omjeri (R) su $^2\text{H}/^1\text{H}$ i $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$. Pozitivnu δ vrijednost imaju uzorci s većom zastupljenosti težeg izotopa u usporedbi sa standardom pa za uzorak obogaćen težim izotopom kažemo da je "teži" u odnosu na standard. Negativnu δ vrijednost ima uzorak kod kojeg je zastupljenost težeg izotopa manja u odnosu na standard, stoga se za takav uzorak kaže da je "lakši" u odnosu na standard. Međunarodni standard prema kojem se izražavaju $\delta^2\text{H}$ i $\delta^{18}\text{O}$ vrijednosti u vodi je VSMOW2 (engl. *Vienna Standard Mean Ocean Water*) koji predstavlja δ vrijednosti oceanske vode (najvećeg vodnog tijela na Zemlji), a njegove vrijednosti iznose 0‰ za vodik, kao i za kisik³⁷.

Stabilni izotopi vodika i kisika, ^2H i ^{18}O , mogu se koristiti kao prirodni i kao umjetni obilježivači. Primjerice, u hidrologiji stabilni izotopi vodika i kisika predstavljaju idealne prirodne obilježivače jer kao sastavni dio molekula vode omogućuju njihovo praćenje kroz različite dijelove hidrološkog ciklusa³⁶. Kao umjetni obilježivači, ^2H i ^{18}O najčešće se koriste u istraživanju pretilosti i različitih metaboličkih putova koji su povezani s njenom etiopatogenezom^{3,14,26,38}, međutim, svakako treba spomenuti i njihovu ulogu u kliničkoj farmakologiji, gdje omogućuju praćenje kinetike različitih lijekova, mehanizma njihova djelovanja, moguću toksičnost i sl.³⁹

Određivanje zastupljenosti stabilnih izotopa ^2H i ^{18}O

Određivanje zastupljenosti stabilnih izotopa ^2H i ^{18}O , odnosno određivanje $\delta^2\text{H}$ i $\delta^{18}\text{O}$, temelji se na poznavanju izotopnih omjera $^2\text{H}/^1\text{H}$ i $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$. Principi mjerenja izotopnih omjera u tjelesnim tekućinama odgovaraju onima koji se primjenjuju kod mjerenja izotopnih omjera u uzorcima vode, s tom razlikom da se prije mjerenja uzorci određenih tjelesnih tekućina trebaju predtretirati, primjerice mikro/kriodestilirati^{40,41}.

Izotopni omjeri najčešće se određuju masenim spektrometrom izotopnih omjera (engl. *isotope ratio mass spectrometer*; IRMS) čiji su osnovni di-



Slika 1. Shematski prikaz IRMS-a, modificirano prema Brand⁴².

jelovi ionski izvor, magnetski analizator i detektorski sustav (slika 1). IRMS uređajima mjere se omjeri zastupljenosti izotopa u plinovima pa se tako $^2\text{H}/^1\text{H}$ mjeri u vodik, a $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ u CO_2 . Zbog toga je prije mjerenja tekući uzorak potrebno prevesti u odgovarajući plin. Pomoću odgovarajućih metoda i perifernih jedinica u sprezi s IRMS-om dobivaju se plinovi čiji izotopni sastav odgovara izotopnom sastavu tekućine čije se δ -vrijednosti žele odrediti. Tako dobiveni plinovi uvode se u ionski izvor IRMS-a u kojem se neutralne molekule plina sudaraju s termionskim elektronima. Na taj način nastali ioni se ubrzavaju te se sustavom elektrostatskih leća usmjeravaju u magnetski analizator. U ovisnosti o omjeru mase i naboja, ioni se u magnetskom analizatoru razdvajaju u putanje različitih polumjera. Istovremenim mjerenjem razdvojenih ionskih struja određuje se omjer izotopa (npr. $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$), a iz njega i odgovarajuća δ vrijednost (npr. $\delta^{18}\text{O}$).

IRMS uređaje odlikuje visoka preciznost mjerenja, ali se zato pojedinom konfiguracijom IRMS-a mogu odrediti svega 2 do 3 δ vrijednosti⁴². Preciznost mjerenja, između ostalog, osigurava se i time što se izotopni omjer plina za analizu mjeri u odnosu na izotopni omjer u referentnom plinu. Na taj način se moguće promjene jakosti magnetnog polja, utjecaj eventualnih promjena temperature na elektroničke komponente i ostale nestabilnosti uređaja koje se mogu javiti tijekom mjerenja svode na najmanju moguću mjeru⁴². Jednu od mogućih kombinacija perifernih jedinica u sprezi s IRMS-om za određivanje $\delta^2\text{H}$ i $\delta^{18}\text{O}$ u vodi čine ekvibratorska jedinica i jedinica dvostrukog ulaza (engl. *dual inlet unit*; DI). Tipična preciznost takve konfiguracije je manja od 1 ‰ za $\delta^2\text{H}$, odnosno bolja od 0,1 ‰ za $\delta^{18}\text{O}$ ⁴². U medicinskim istraživanjima IRMS se koristi za određivanje izotopnih omjera u uzorcima različitih tjelesnih tekućina, poput urina, krvi, sline i sl.⁴³⁻⁴⁶

Za određivanje $\delta^2\text{H}$ i $\delta^{18}\text{O}$ u tekućinama također se koriste i laserski apsorpcijski spektrometri^{47,48}. Iako još nisu postigli preciznost IRMS-a, manje zahtjevno i vremenski kraće mjerenje, mogućnost korištenja na terenu, kao i niža cijena uređaja, važne su prednosti laserskih apsorpcijskih spektrometara u odnosu na IRMS^{49,50}. Kod laserskih spektrometara izotopni sastav uzorka određuje

se na osnovi poznavanja promjene intenziteta laserske svjetlosti do koje dolazi zbog njenog prolaska kroz plinoviti uzorak⁵⁰. Mjerenja izotopnih omjera apsorpcijskim spektrometrom su direktna pa nema mjerenja izotopnog sastava u odnosu na referentni plin kao kod IRMS-a. Osim toga, tekući uzorak nije potrebno prevoditi u odgovarajući plin za mjerenje, već je dovoljno da se prije uvođenja u uređaj uzorak zagrijavanjem ispari, tj. prevede u plinovito stanje. Laserskim apsorpcijskim spektrometrima također je moguće odrediti izotopne omjere u različitim tjelesnim tekućinama⁵¹⁻⁵³.

Određivanje sastava tijela pomoću stabilnih izotopa ^2H i ^{18}O

Određivanje sastava tijela pomoću stabilnih izotopa ^2H i ^{18}O temelji se na primjeni metode izotopnog razrjeđenja koja za cilj ima određivanje TBW-a. Metoda se provodi tako da se u organizam unese doza vode određene δ -vrijednosti te se nakon uspostave izotopne ravnoteže, odnosno nakon što se obilježivač (^2H ili ^{18}O) jednoliko rasporedio u svim odjeljcima tjelesnih tekućina, određuje promjena δ -vrijednosti tjelesne tekućine u odnosu na stanje prije unosa doze vode. Korištenje metode izotopnog razrjeđenja u svrhu određivanja sastava tijela pretpostavlja konstantnu hidrataciju (H) FFM-a i zanemariv udio vode u FM-u³⁸. FFM se računa prema relaciji: $\text{FFM (kg)} = \text{TBW/H}$, gdje se za vrijednost H odraslih ispitanika uobičajeno uzima 0,73³⁸. Oba izotopa se mogu koristiti kao obilježivači, no potrebno je uzeti u obzir činjenicu da odjeljci u organizmu u kojima se ^2H i ^{18}O razrjeđuju nisu jednaki. Naime, dok se ^{18}O prvenstveno raspoređuje u tjelesnim tekućinama, dozom vode uneseni ^2H se, osim s vodikom u tekućinama, između ostalog, izmjenjuje i s vodikom u proteinima, pa je prostor njegova razrjeđenja približno 3 ‰ veći u odnosu na prostor razrjeđenja kisika^{3,38,54}.

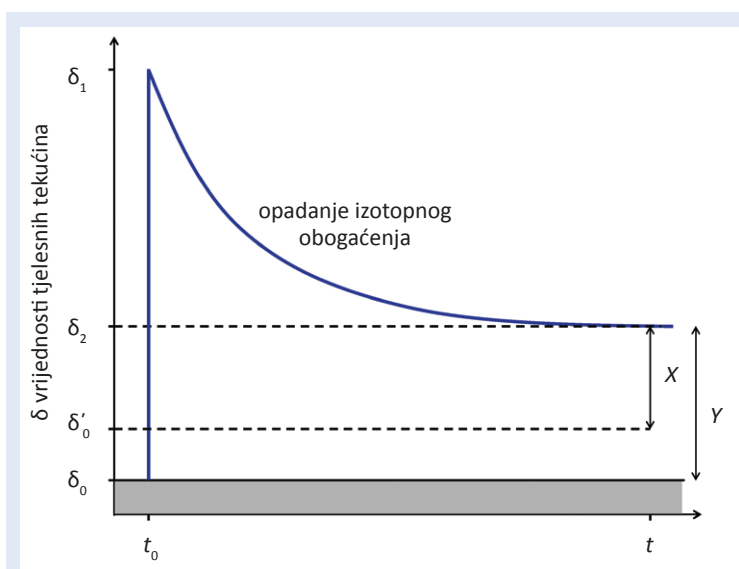
Pomoću stabilnih izotopa ^2H i ^{18}O može se odrediti TBW na uzorku raznih tjelesnih tekućina. Zbog jednostavnog i neinvazivnog uzorkovanja urin je najčešće analizirana tekućina za određivanje TBW-a metodom izotopnog razrjeđenja. Pri tome se uzimaju najmanje dva uzorka urina, i to jedan prije, a jedan nakon unosa doze vode u organizam. Prvi uzorak urina, tzv. uzorak preddoze, ispitanici daju na samom početku provođenja meto-

de. Slijedi određivanje tjelesne mase ispitanika, nakon čega ispitanici popiju dozu vode koja je dobivena miješanjem lokalne vode za piće s vodom obogaćenom izotopom ^2H ($^2\text{H}_2\text{O}$) ili ^{18}O (H_2^{18}O). Drugi uzorak urina uzima se 4 do 6 sati nakon unosa doze vode. Uzorci urina prikupljeni prije isteka 4 sata nisu pogodni za izračun TBW-a jer se pokazalo da je za postizanje izotopne ravnoteže potrebno upravo 4 do 6 sati³⁸. Od unosa doze vode do uzimanja uzorka urina nakon postizanja izotopne ravnoteže bilježi se ukupni volumen izmokrenog urina i točno vrijeme mokrenja kako bi se u konačnom izračunu TBW mogao korigirati za kumulativne gubitke tekućine. Za izotopnu analizu, osim uzorka urina predoze i uzorka urina nakon postignute ravnoteže, potrebno je dostaviti i uzorak lokalne vode za piće te uzorak korištene doze vode. Detaljnije informacije o pripremi doze vode, protokolu uzimanja uzoraka urina i numeričkom izračunu TBW-a mogu se pronaći u literaturi²⁶.

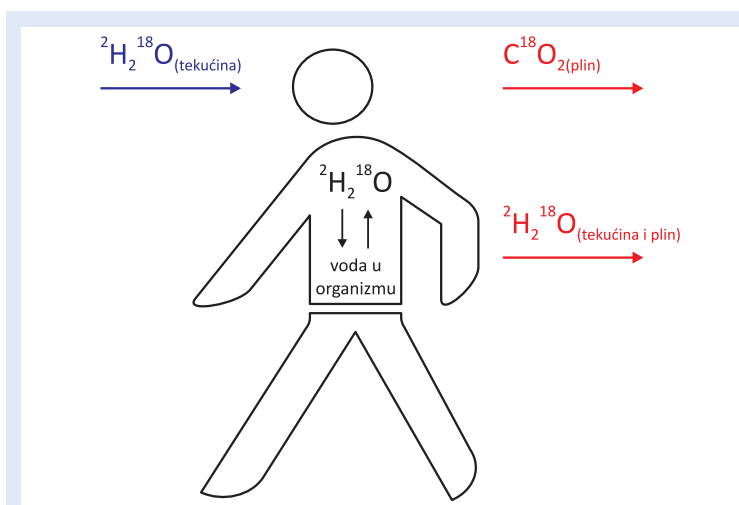
Određivanje TEE-a metodom DLW-a

Metoda DLW-a prvi puta je korištena u pokusima na glodavcima četrdesetih godina prošlog stoljeća, a primjena u humanoj populaciji započela je prije tridesetak godina^{55,56}. Od tada se metoda DLW-a nametnula kao *zlatni standard* za određivanje TEE-a, pri čemu je njena najvažnija primjena upravo u istraživanju pretilosti⁵⁶⁻⁶¹.

Kod ove metode prvi uzorak urina (ili druge tjelesne tekućine) uzima se kako bi se odredila bazna razina izotopa u organizmu (δ_0) nakon čega ispitanici popiju dozu vode obilježene izotopima ^2H i ^{18}O . Sljedeći uzorak urina uzima se nakon što su se obilježivači ravnomjerno rasporedili u tijelu. U sljedeća dva tjedna uzorci se mogu prikupljati na dnevnoj bazi ili periodično, a u najjednostavnijem slučaju (tzv. metoda dvije točke) dovoljno je uzeti samo jedan uzorak, i to 14. dan nakon uzimanja doze vode. U tom periodu, zbog eliminacije obilježivača iz organizma, dolazi do eksponencijalnog opadanja δ vrijednosti (slika 2). Do eliminacije obilježivača iz organizma najvećim dijelom dolazi disanjem i mokrenjem, pri čemu se ^{18}O gubi brže iz tijela od ^2H . Razlog je u tome što se ^2H u najvećoj mjeri iz organizma izbacuje vodom, a ^{18}O , osim vodom, i izdahnutim CO_2 (slika 3). Razlika u brzini eliminacije ^2H i ^{18}O , koji su istovremeno unijeti u organizam, daje podatak o proizvod-



Slika 2. Promjena razine izotopnog obogaćenja u organizmu tijekom primjene metode DLW-a. δ_0 – bazna razina izotopa u organizmu, δ_1 – δ vrijednost uzorka tjelesne tekućine uzorkovanog nakon uspostavljanja izotopne ravnoteže (4 do 6 sati nakon uzimanja doze vode), δ_2 – δ vrijednost uzorka tjelesne tekućine uzorkovanog na kraju primjene metode DLW-a i t – vrijeme od trenutka unošenja doze (t_0) vode do posljednjeg uzimanja uzorka, Y – izotopno obogaćenje na kraju primjene metode DLW-a ako nije došlo do promjene bazne razine izotopa δ_0 , X – izotopno obogaćenje na kraju primjene metode DLW-a ako je došlo do promjene bazne razine izotopa s δ_0 na δ'_0 .



Slika 3. Shematski prikaz principa unosa doze vode u organizam i eliminacije ^2H i ^{18}O kroz gubitke vode i disanjem.

nji CO_2 , a time i indirektan podatak o TEE-u^{55,60}. Brzina eliminacije pojedinog izotopa (k_x) kod metode dviju točaka računa se prema relaciji⁵⁵: $k_x = [\ln(\delta_1 - \delta_0) - \ln(\delta_2 - \delta_0)] \cdot t^{-1}$, gdje je δ_0 – bazna razina izotopa u organizmu, δ_1 – vrijednost uzorka prikupljenog 4 do 6 sati nakon uzimanja doze vode, δ_2 – razina obogaćenja na kraju pri-

mjene metode DLW-a (14. dan od uzimanja doze) i t – vrijeme od trenutka unošenja doze vode do posljednjeg uzimanja uzorka (14 dana) (slika 2). Neke od pretpostavki na kojima se temelji metoda DLW-a jesu: volumen ukupne vode u tijelu se ne mijenja tijekom mjerenja; prirodna razina ^2H i ^{18}O u organizmu je stalna tijekom mjerenja; ^2H i ^{18}O se gube iz tijela samo tekućinom i disanjem²⁶. Budući da su ove pretpostavke samo djelomično zadovoljene, u izračun TEE-a moraju se uključiti odgovarajuće korekcije. Načini izračuna TEE-a pomoću podataka dobivenih metodom DLW-a, kao i informacije vezane uz pripremu doze vode, odgovarajuće korekcije i razmatranja o primjeni metode kod specifičnih populacija detaljno su opisani u literaturi²⁶.

RASPRAVA

Istraživanja ukazuju na to da visok stupanj pretilosti može skratiti očekivano trajanje životnog vijeka za čak 20 godina⁶². Globalizacija, urbanizacija, stres, nepravilna prehrana te manjak fizičke aktivnosti pridonijeli su porastu prevalencije pretilosti koja je u 21. stoljeću poprimila razmjere svjetske epidemije^{2,14}. S obzirom na to da masno tkivo predstavlja važan izvor slobodnih masnih kiselina i proupalnih citokina, njegova pojačana akumulacija, posebice unutar abdomena, dovodi do razvoja intolerancije glukoze, dislipidemije, nastanka sistemske upale i značajno povisuje rizik za obolijevanje od brojnih kardiovaskularnih, malignih, ali i drugih bolesti^{2,63}. Precizno određivanje tjelesnog sastava i mjerenje potrošnje energije važni su za procjenu nutritivnog statusa pretilih osoba, procjenu kardiometaboličkog rizika i drugih komorbiditeta, izbor odgovarajuće terapije protiv pretilosti, kao i za praćenje odgovora na terapijski postupak, primjerice, redukcijsku dijetu ili kirurški zahvat^{2,64,65}. Najvažnije prednosti i ograničenja često korištenih metoda za određivanje sastava tijela i metoda za procjenu potrošnje energije prikazane su u tablici 1, odnosno u tablici 2. Nažalost, niti jedna od metoda koje se koriste u analizi tjelesnog sastava nije bez nedostataka^{21,27,28}. Širu primjenu sofisticiranijih metoda, kao što su CT, DXA, denzitometrija i metoda određivanja TBW-a pomoću stabilnih izotopa ^2H i ^{18}O ograničava njihova visoka cijena, potreba za posebno

opremljenim laboratorijima, a u slučaju CT-a i DXA-e, i primjena ionizirajućeg zračenja^{21,66}. Određivanje debljine kožnih nabora i BIA-a jeftine su, relativno jednostavne i praktične metode, ali nedovoljno precizne, posebice kod jako pretilih osoba^{66,67}. Upotreba BIA-a dodatno je ograničena u stanjima varijabilne hidratacije organizma, poput edema, dehidracije, trudnoće, disbalansa elektrolita i sl.^{24,67} Nedovoljno precizne su i ostale antropometrijske metode, jer samo indirektno determiniraju raspodjelu abdominalnog masnog tkiva u tijelu (mjere opsega struka, opsega trbuha, i omjera opsega struka i bokova), odnosno, mjere samo status uhranjenosti (BMI). Ipak, spomenute antropometrijske mjere opsega i omjera pokazale su se boljim pokazateljima kardiometaboličkog rizika od BMI-a, naročito u osoba koje su jako pretile^{63,68,69}. Unatoč tome što ne daje podatke o tjelesnom sastavu, niti je dovoljno pouzdan za praćenje promjena koje se zbivaju tijekom redukcijskih dijeta i programa vježbanja, BMI se još uvijek koristi kao najčešći, a nerijetko i jedini pokazatelj prekomjerne tjelesne mase i pretilosti te rizika za razvoj bolesti koje su s njima povezane^{66,70}.

Korištenjem vode obilježene stabilnim izotopima ^2H ili ^{18}O moguće je precizno odrediti sastav tijela^{23,71-75}. Zbog visoke preciznosti, navedena je metoda često korištena kao referentna metoda u odnosu na ostale "dvokomponentne" metode, poput mjerenja debljine kožnih nabora, BIA-a i sl.^{76,77}. Istraživanja na pretilim osobama, ali i ispitanicima normalne tjelesne mase, ukazuju na njenu visoku podudarnost s "višekomponentnim" modelima^{71,74}. Nedavno istraživanje provedeno u populaciji pretile čileanske školske djece u dobi od 8 do 13 godina pokazalo je da je u određivanju FM-a upravo metoda TBW-a, korištenjem vode obilježene ^2H , najpreciznija od svih "dvokomponentnih" metoda upotrijebljenih u istraživanju (mjerenje debljine kožnih nabora, BIA, zračna pletizmografija i DXA)²³. Ipak, korištenje vode obilježene stabilnim izotopima ^2H i ^{18}O u određivanju tjelesnog sastava ograničavaju stanja varijabilne hidratacije u organizmu, poput dijabetesa, bubrežnog zatajenja i sl., jer, kao što je prethodno spomenuto, metoda determinacije FFM-a iz TBW-a podrazumijeva konstantnost hidratacije organizma^{21,76}.

Tablica 1. Prednosti i ograničenja najčešće korištenih metoda za određivanje sastava tijela

Metoda	Prednosti	Ograničenja
Indeks tjelesne mase	jednostavnost, brzina, dostupnost velikog broja referentnih podataka	nepouzdan pokazatelj pretilosti, posebice kod djece i adolescenata, ne daje informacije o sastavu tijela, već samo o uhranjenosti
Mjerenje opsega struka i omjera opsega struka i bokova	jednostavnost, brzina	nedovoljna preciznost, indirektna determinacija abdominalnog masnog tkiva u tijelu
Mjerenje debljine kožnih nabora	jednostavnost, brzina	nedovoljna preciznost, posebice kod jako pretilih osoba, neprikladna za malu djecu
Bioelektrična impedancijska analiza	jednostavnost, brzina	nepouzdanost u stanjima varijabilne hidratacije u organizmu i kod jako pretilih osoba
Dvoenergijska rendgenska apsorpciometrija	preciznost	izlaganje ionizirajućem zračenju, visoka cijena
Određivanje ukupne količine vode u organizmu pomoću stabilnih izotopa ^2H i ^{18}O	preciznost, omogućuje i istraživanje različitih metaboličkih putova povezanih s etiopatogenezom pretilosti, pogodna za terenska istraživanja, primjenjiva u svim dobnim skupinama, ne izlaže ispitanike ionizirajućem zračenju	ograničena upotreba u stanjima varijabilne hidratacije u organizmu, visoka cijena
Kompjutorizirana tomografija	preciznost u određivanju količine masnog tkiva u abdomenu i njegovoj diferencijaciji od kože, kosti, mišića i unutarnjih organa	izlaganje ionizirajućem zračenju, visoka cijena
Zračna pletizmografija	preciznost, primjenjiva u svim dobnim skupinama	visoka cijena
Hidrogenzimetometrija	jedna od preciznijih "dvokomponentnih" metoda	nepraktičnost, nije primjenjiva kod male djece

Tablica 2. Prednosti i ograničenja najčešće korištenih metoda za određivanje potrošnje energije

Metoda	Prednosti	Ograničenja
Upitnici o unosu hrane i/ili fizičkoj aktivnosti	jednostavnost, brzina	subjektivnost
Direktna kalorimetrija	preciznost	izolacija ispitanika u strogo kontroliranim laboratorijskim uvjetima neprikladnim za većinu oblika fizičke aktivnosti, visoka cijena
Indirektna kalorimetrija	preciznost	nemogućnost mjerenja svih komponenti potrošnje energije (precizno određuje samo REE)
Metoda dvostruko obilježene vode	jedina metoda kojom je moguće odrediti TEE u višednevnom periodu u kojem ispitanik obavlja svakodnevne životne aktivnosti, omogućuje i istraživanje različitih metaboličkih putova povezanih s etiopatogenezom pretilosti, primjenjiva je u svim dobnim skupinama, ne izlaže ispitanike ionizirajućem zračenju	nemogućnost razlikovanja pojedinih komponenti ukupne potrošnje energije (određuje samo TEE), visoka cijena
Bioelektrična impedancijska analiza	jednostavnost, brzina	određuje samo REE na temelju prediktorskih jednadžbi, nedovoljna preciznost

TEE – ukupna potrošnja energije, REE – potrošnja energije u stanju mirovanja

Pored još uvijek visoke cijene, nedostaci sofisticiranih metoda za određivanje potrošnje energije su potreba izolacije ispitanika u strogim laboratorijskim uvjetima koji su neprikladni za većinu oblika fizičke aktivnosti (direktna kalorimetrija) te nemogućnost razlikovanja pojedinih komponenti potrošnje energije^{27,78}. Tako je metodom DLW-a moguće odrediti samo vrijednosti

TEE-a, dok se konvencionalnom indirektnom kalorimetrijom pouzdano može determinirati samo REE^{14,78}. Glavni nedostaci jednostavnijih i jeftinijih metoda su njihova nedovoljna preciznost (BIA) i subjektivnost (upitnici o prehrani i/ili fizičkoj aktivnosti)²⁷. Izračun REE kod bioelektrične impedancije provodi se pomoću prediktorskih jednadžbi kojima prethodi određivanje

FM-a i FFM-a na temelju razlike otpora za izmjeničnu struju slabe jakosti²⁷.

Metoda DLW-a zasada je jedina metoda kojom je moguće mjeriti TEE u višednevnom kontinuiranom periodu dok ispitanik obavlja svakodnevne životne aktivnosti^{14,28}. Usprkos visokoj cijeni i složenoj tehnologiji na kojoj se temelji, kao i činjenici da se u humanoj populaciji primjenjuje svega tridesetak godina, istraživanja potrošnje energije koja su koristila metodu DLW-a su brojna^{14,27-29,79}. Primjena metode DLW-a omogućila je uvid u bo-

Korištenje vode obilježene izotopima ^2H i ^{18}O omogućuje pouzdano određivanje količine masne mase u ukupnoj tjelesnoj masi i ukupne potrošnje energije organizma. Metode koje koriste ^2H i ^{18}O ne izlažu ispitanike ionizirajućem zračenju, ne zahtijevaju hospitalizaciju ispitanika, pogodne su za terenska istraživanja te su primjenjive u svim dobnim skupinama.

lje razumijevanje mehanizama potrošnje energije u humanoj populaciji, što je od posebne važnosti za rasvjetljavanje etiopatogeneze pretilosti^{3,29}. Istraživanja koja su koristila metodu DLW-a za mjerenje potrošnje energije ukazala su na važnu činjenicu da pretile osobe, suprotno očekivanju, nemaju smanjen TEE u odnosu na osobe normalne tjelesne mase⁸⁰⁻⁸². Pokazalo se da su vrijednosti TEE-a pozitivno korelirane s veličinom tijela, ukupnom tjelesnom masom, kao i FFM vrijednostima, tj. da se potrošnja energije povećava s veličinom tijela^{83,84}. Odstupanja od prethodno spomenute činjenice da debljanje nije povezano s niskom razinom TEE-a javila su se samo u istraživanjima koja su provedena na osobama u kojih je, nakon normalizacije tjelesne mase uslijed redukcijskih dijeta zbog pretilosti, nakon višemjesečnog perioda ponovno došlo do porasta tjelesne mase⁸⁵. Naime, pokazalo se da su niže TEE vrijednosti određene metodom DLW-a, za tu skupinu ispitanika, bile značajan prediktor bržeg ponovnog porasta tjelesne mase i/ili ponovnog razvoja pretilosti⁸⁵.

Nadalje, korištenje ^2H i/ili ^{18}O u humanoj populaciji i na animalnim modelima omogućilo je i bolji uvid u različite metaboličke procese u pretilosti poput *de novo* lipogeneze, gliceroneogeneze i

sl.^{3,86}. Pokazalo se da u humanoj populaciji pojačan unos ugljikohidrata prehranom ima neznatan učinak na njihovu pretvorbu u trigliceride procesom *de novo* lipogeneze u jetri, a posebice u masnom tkivu, za razliku od mnogih animalnih vrsta gdje je *de novo* lipogeneza izrazito aktivna^{86,87}. Tako u glodavaca, primjerice, oko 50 % masnih kiselina u masnom tkivu nastaje *de novo* lipogenezom, a u svinja, kod kojih je pojačana lipogeneza prilikom uzgoja poželjna, i do 80 %⁸⁶. Zanimljiva istraživanja na animalnim modelima pokazala su da gliceroneogeneza (sinteza alfa-glicerol fosfata iz glukoneogenetskih prekursora koji nisu glukoza i glicerol) u puno većoj mjeri pridonosi sintezi triglicerida u jetri (65 %), negoli u masnom tkivu (17 %), gdje glavina triglicerida nastaje iz glukoze^{86,88}.

Kod istraživanja koja koriste metodu DLW-a također je važno poznavati i prirodnu zastupljenost ^2H i ^{18}O u pitkoj vodi koju konzumiraju ispitanici. Naime, budući da su ^2H i ^{18}O prisutni u organizmu i prije konzumacije doze vode, promjene izotopnog obogaćenja do kojeg je došlo zbog unošenja obilježivača mogu se detektirati samo u odnosu na baznu razinu izotopa (δ_0).

Zbog pretpostavke da je prirodna razina ^2H i ^{18}O u organizmu stalna u tijeku mjerenja, uobičajeno je da se za baznu razinu izotopa na kraju provođenja metode uzima ista δ -vrijednost koja je određena kao bazna razina izotopa u organizmu prije konzumacije doze vode (δ_0). No ako bi tijekom provođenja metode došlo do promjene bazne razine izotopa, spomenuta pretpostavka dovela bi do pogreške u određivanju TEE-a. Na slici 2 prikazano je kako bi povišenje bazne razine δ_0 na razinu δ'_0 za posljedicu imalo to da bi se u izračun uvrstila pogrešna razina izotopnog obogaćenja Y , a ne stvarna razina obogaćenja X . Poznavanje promjena izotopnog sastava pitke vode može ukazati na moguće promjene u baznoj razini izotopa u organizmu ispitanika⁸⁹. Primjerice, pokazalo se da izvorske vode riječkog područja pokazuju sezonalne promjene $\delta^2\text{H}$ i $\delta^{18}\text{O}$ ⁹⁰. Do tih zaključaka došlo se na osnovi tjednih uzorkovanja, a još bolji uvid u moguće promjene izotopnog sastava dali bi uzorci pitke vode uzorkovani dnevno. Osim toga, uzorkovanje nekoliko pitkih voda u kontinentalnom dijelu Hrvatske potvrdilo je da su ti uzorci negativniji od onih u sjevernom hrvatskom

primorju⁹¹. To ukazuje na činjenicu da ispitanici ne bi trebali putovati za vrijeme provođenja metode DLW-a ili bi na izračun brzine eliminacije izotopa valjalo primijeniti odgovarajuće korekcije.

Jedna od izrazitih prednosti metode koja koristi vodu obilježenu stabilnim izotopima ^2H i/ili ^{18}O , neovisno koristi li se u svrhu određivanja sastava tijela ili determinacije potrošnje energije u organizmu, jest mogućnost njene primjene u svim dobnim skupinama^{21,29,75}. BMI se kod djece i adolescenata pokazao izrazito nepouzdanim, jer su kod njih granične vrijednosti za definiciju prekomjerne tjelesne težine i pretilosti različite u odnosu na odrasle i pokazuju značajne varijacije s obzirom na spol i dob^{70,92,93}. Nadalje, korištenje hidrodenzitometrije koje zahtijeva potapanje pod vodom te mjerenje debljine kožnih nabora nije prikladno za malu djecu^{21,94}.

ZAKLJUČAK

Ne postoji idealna metoda za istraživanje pretilosti. Metode kod kojih se koristi voda obilježena stabilnim izotopima ^2H i ^{18}O ne zahtijevaju hospitalizaciju ispitanika i ne ograničavaju njihove svakodnevne životne aktivnosti, pogodne su za terenska istraživanja i primjenjive su u svim dobnim skupinama. Upotrebom ^2H i ^{18}O moguće je provesti preciznu "dvokomponentnu" analizu tjelesnog sastava i pouzdano dugoročno određivanje TEE-a, a obilježavanjem organskih molekula pomoću vode obogaćene ^2H i/ili ^{18}O i istražiti različite metaboličke putove u organizmu i njihovu povezanost s etiopatogenezom pretilosti. Ipak, te metode imaju ograničenu upotrebu u stanjima varijabilne hidratacije u organizmu (edemi, dehidracija i sl.). Širu uporabu metoda koje koriste vodu obilježenu ^2H i ^{18}O zasigurno onemogućuje zahtjevno i skupo mjerenje IRMS-om, no za očekivati je da će se taj ograničavajući čimbenik eliminirati daljnjim razvojem laserskih apsorpcijskih spektrometara za određivanje $\delta^2\text{H}$ i $\delta^{18}\text{O}$. U svakom slučaju, pravodobna i precizna dijagnostika pretilosti upotrebom ^2H i ^{18}O predstavlja važan korak u njenoj pravovremenoj terapiji, kao i prevenciji kardiovaskularnih, metaboličkih, respiratornih, lokomotornih i psiholoških komplikacija.

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

1. Who.int [Internet]. World Health Organization. Obesity [cited 2015 Jan 23]. Available from: <http://www.who.int/topics/obesity/en/>.
2. Medanić D, Pucarin-Cvetković J. Pretilost – javnozdravstveni problem i izazov. *Acta Med Croatica* 2012;66:347-55.
3. Dolnikowski GG, Marsh JB, Das SK, Welty FK. Stable isotopes in obesity research. *Mass Spectrom Rev* 2005;24:311-27.
4. Walley AJ, Blakemore AI, Froguel P. Genetics of obesity and the prediction of risk for health. *Hum Mol Genet* 2006;15:124-30.
5. Vimalawaran KS, Tachmazidou I, Zhao JH, Hirschhorn JN, Dudbridge F, Loos RJ. Candidate genes for obesity-susceptibility show enriched association within a large genome-wide association study for BMI. *Hum Mol Genet* 2012;21:4537-42.
6. Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet* 2005;366:1197-209.
7. Arulmozhi DK, Dwyer DS, Bodhankar SL. Antipsychotic induced metabolic abnormalities: an interaction study with various PPAR modulators in mice. *Life Sci* 2006;79:1865-72.
8. Enger C, Jones ME, Kryzhanovskaya L, Doherty M, Mc Afee AT. Risk of developing diabetes and dyslipidemia among adolescents with bipolar disorder or schizophrenia. *Int J Adolesc Med Health* 2013;22:1-9.
9. Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U, Pasquali R. Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:883-96.
10. Walley A, Asher JE, Froguel P. The genetic contribution to non-syndromic human obesity. *Nat Rev Genet* 2009;10:431-42.
11. Tiryakioğlu O, Ugurlu S, Yalin S, Yirmibesic S, Caglar E, Yetkin DO, Kadioglu P. Screening for Cushing's syndrome in obese patients. *Clinics (Sao Paulo)* 2010;65:9-13.
12. Longhi S, Radetti G. Thyroid function and obesity. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2013;5:40-4.
13. Fišter K, Kolčić I, Milanović SM, Kern J. The prevalence of overweight, obesity and central obesity in six regions of Croatia: results from the Croatian Adult Health Survey. *Coll Antropol* 2009;33:25-9.
14. Hills AP, Mokhtar N, Brownie S, Byrne NM. Childhood obesity in Asia: the value of accurate body composition methodology. *Asia Pac J Clin Nutr* 2014;23:339-43.
15. Who.int [Internet]. World Health Organization. Obesity: Situation and trends [cited 2015 Jan 23]. Available from: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/obesity_text/en/.
16. Who.int [Internet]. World Health Organization. Obesity and overweight fact sheet N°311. [cited 2015 Jan 23]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
17. Musić Milanović S, Uhernik AI, Fišter K, Mihel S, Kovač A, Ivanković D. Five-year cumulative incidence of obesity in adults in Croatia: the CroHort study. *Coll Antropol* 2012;36:71-6.
18. Bralić I, Vrdoljak J, Kovacic V. Associations between parental and child overweight and obesity. *Coll Antropol* 2005;29:481-6.

19. Serdula MK, Ivery D, Coates RJ, Freedman DS, Williamson DF, Byers T. Do obese children become obese adults? A review of the literature. *Prev Med* 1993;22:167-77.
20. Battelino T, Shalitin S. Obesity, metabolic syndrome and nutrition. *World Rev Nutr Diet* 2014;109:1-22.
21. Wells JC, Fewtrell MS. Measuring body composition. *Arch Dis Child* 2006;91:612-7.
22. Duren DL, Sherwood RJ, Czerwinski SA, Lee M, Choh AC, Siervogel RM et al. Body composition methods: comparisons and interpretation. *J Diabetes Sci Technol* 2008;2: 1139-46.
23. Vázquez F, Diaz E, Lera L, Vázquez L, Anziani A, Burrows R. Methods of body composition and four compartments model in obese school children. *Nutr Hosp* 2012;27:1079-85.
24. Lee SY, Gallagher D. Assessment methods in human body composition. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008;11:566-72.
25. Baščevan S, Vučetić V, Rodić S. Comparison of different method for assessment of body composition. *Proceedings* 2010;2:ISSN 1986-8154.
26. Iaea.org [Internet]. Vienna: International Atomic Energy Agency. Assessment of body composition and total energy expenditure in humans using stable isotope techniques. IAEA Human Health Series No.3. [cited 2015 Jan 23]. Available from: http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/Pub1370_web.pdf.
27. Pinheiro Volp AC, Esteves de Oliveira FC, Duarte Moreira Alves R, Esteves EA, Bressan J. Energy expenditure: components and evaluation methods. *Nutr Hosp* 2011;26:430-40.
28. Park J, Kazuko IT, Kim E, Kim J, Yoon J. Estimating free-living human energy expenditure: Practical aspects of the doubly labeled water method and its applications. *Nutr Res Pract* 2014;8:241-8.
29. Bellisle B. The doubly-labeled water method and food intake surveys: a confrontation. *Rev. Nutr* 2001;14: 125-33.
30. Šatalić Z, Alebić IJ. Dietary assessment methods and diet planning. *Medicus* 2008;17:27-36.
31. Štimac, D, Franjić, N. Obesity and acute pancreatitis. In: *Acute pancreatitis*, Rodrigo, L (ed). Rijeka: InTech Open, 2011;35-46.
32. Wabitsch M, Braun U, Heinze E, Muche R, Mayer H, Teller W et al. Body composition in 5-18-y-old obese children and adolescents before and after weight reduction as assessed by deuterium dilution and bioelectrical impedance analysis. *Am J Clin Nutr* 1996;64:1-6.
33. Bederman IR, Dufner DA, Alexander JC, Previs SF. Novel application of the "doubly labeled" water method: measuring CO_2 production and the tissue-specific dynamics of lipid and protein in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;290:1048-56.
34. Murphy EJ. Stable isotope methods for the in vivo measurement of lipogenesis and triglyceride metabolism. *J Anim Sci* 2006;84:94-104.
35. Previs S, McLaren D, Castro-Perez J, Shah V, Herath K, Stout S et al. Using H_2^{18}O to study protein and lipid flux: Is dyslipidemia a problem of triglyceride and/or apoB production? *The FASEB Journal* 2012;26:242-3.
36. Mook WG. Environmental isotopes in the hydrological cycle: principles and applications. Technical documents in hydrology. Pariz: UNESCO/IAEA, 2001.
37. Iaea.org [Internet]. Vienna: International Atomic Energy Agency. Reference sheet for international measurement standards [cited 2015 Jan 22]. Available from: http://nucleus.iaea.org/rpst/Documents/VSMOW2_SLAP2.pdf.
38. Abrams SA, Wong WW. Stable isotopes in human nutrition: laboratory methods and research applications. Cambridge: CABI Publishing, 2003.
39. Schellekens RC, Stellaard F, Woerdenbag HJ, Frijlink HW, Kosterink JG. Applications of stable isotopes in clinical pharmacology. *Br J Clin Pharmacol* 2011;72:879-97.
40. Berman ES, Fortson SL, Snaith SP, Gupta M, Baer DS, Chery I et al. Direct analysis of $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ in natural and enriched human urine using laser-based, off-axis integrated cavity output spectroscopy. *Anal Chem* 2012;84:9768-73.
41. Guidotti S, Jansen HG, Aerts-Bijma AT, Verstappen-Dumoulin BM, van Dijk G, Meijer HA. Doubly Labelled Water analysis: preparation, memory correction, calibration and quality assurance for $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ measurements over four orders of magnitudes. *Rapid Commun Mass Sp* 2013;27:1055-66.
42. Brand WA. Mass spectrometer hardware for analyzing stable isotope ratios. In: de Groot PA (ed). *Handbook of Stable Isotope Analytical Techniques* Vol. 1. Amsterdam: Elsevier Science, 2004:835-56.
43. Hedges R, Rush E, Aalbersberg W. Correspondence between human diet, body composition and stable isotopic composition of hair and breath in Fijian villagers. *Isot Environ Healt S* 2009;45:1-17.
44. Jankowski CM, Sonko BJ, Gozansky WS, Kohrt WM. Deuterium dilution: the time course of ^2H enrichment in saliva, urine, and serum. *Clin Chem* 2004;50:1699-701.
45. Kuo TC, Wang CH, Lin HC, Lin YH, Lin M, Lin CM et al. Assessment of renal function by the stable oxygen and hydrogen isotopes in human blood plasma. *PLoS ONE* 2012;7:1-9.
46. Wong WW, Clarke LL. A Hydrogen gas-water equilibration method produces accurate and precise stable hydrogen isotope ratio measurements in nutrition studies. *J Nutr* 2012;142:2057-62.
47. Chesson LA, Bowen GJ, Ehleringer JR. Analysis of the hydrogen and oxygen stable isotope ratios of beverage waters without prior water extraction using isotope ratio infrared spectroscopy. *Rapid Commun Mass Sp* 2010;24:3205-13.
48. Kerstel E, Gianfrani L. Advances in laser-based isotope ratio measurements: selected applications. *Appl Phys B* 2008;92:439-49.
49. Geldern van R, Barth JAC. Optimization of instrument setup and post-run corrections for oxygen and hydrogen stable isotope measurements of water by isotope ratio infrared spectroscopy (IRIS). *Limnol Oceanogr* 2012;10:1024-36.
50. Penna D, Stenni B, Šanda M, Wrede S, Bogaard TA, Gobbi A et al. On the reproducibility and repeatability of laser absorption spectroscopy measurements for $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ isotopic analysis. *Hydrol Earth Syst Sc* 2010;14:1551-66.
51. Bartlome R, Sigrist MW. Laser-based human breath analysis: D/H isotope ratio increase following heavy water intake. *Opt Lett* 2009;34:866-8.
52. O'Grady SP, Enright LE, Barnette JE, Cerling TE, Ehleringer JR. Accuracy and precision of a laser-spectroscopy

- approach to the analysis of $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ in human urine. *Isot Environ Health S* 2010;46:476-83.
53. Thorsen T, Shriver T, Racine N, Richman BA, Schoeller DA. Doubly labeled water analysis using cavity ring-down spectroscopy. *Rapid Commun Mass Sp* 2011;25:3-8.
 54. Schoeller DA, Van Santen E, Peterson DW, Dietz W, Jaspán J, Klein PD. Total body water measurement in humans with ^{18}O and ^2H labeled water. *Am J Clin Nutr* 1980;33:2686-93.
 55. Speakman JR. The history and theory of the doubly labeled water technique. *Am J Clin Nutr* 1998;68(suppl):932S-8S.
 56. Speakman JR. The role of technology in the past and future development of the doubly labelled water method. *Isot Environ Health S* 2005;41:335-43.
 57. Bradley DP, Kulstad R, Racine N, Shenker Y, Meredith M, Schoeller DA. Alterations in energy balance following exenatide administration. *App Physiol Nutr Metab* 2012;37:893-9.
 58. Butte NF, Wong WW, Treuth MS, Ellis KJ, O'Brian SE. Energy requirements during pregnancy based on total energy expenditure and energy deposition. *Am J Clin Nutr* 2004;79:1078-87.
 59. Luke A, Adeyemo A, Forrester T, Wilks R, Schoeller DA, Leman C et al. Relationship between blood pressure and physical activity assessed with stable isotopes. *J Hum Hypertens* 2005;19:127-32.
 60. Schoeller DA. Balancing energy expenditure and body weight. *Am J Clin Nutr* 1998;68:956S-61S.
 61. Toozé JA, Schoeller DA, Subar AF, Kipnis V, Schatzkin A, Troiano RP. Total daily energy expenditure among middle-aged men and women: the OPEN study. *Am J Clin Nutr* 2007;86:382-7.
 62. Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB. Years of life lost due to obesity. *JAMA* 2003;289:187-93.
 63. Goh LG, Dhaliwal SS, Welborn TA, Lee AH, Della PR. Anthropometric measurements of general and central obesity and the prediction of cardiovascular disease risk in women: a cross-sectional study. *BMJ* 2014;4:e004138.
 64. Martinoli R, Mohamed EI, Maiolo C, Cianci R, Denoth F, Salvadori S et al. Total body water estimation using bioelectrical impedance: a meta-analysis of the data available in the literature. *Acta Diabetol* 2003;40:203-6.
 65. Strain GW, Wang J, Gagner M, Pomp A, Inabnet WB, Heymsfield SB. Bioimpedance for severe obesity: comparing research methods for total body water and resting energy expenditure. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:1953-6.
 66. Mišigoj-Duraković M, Sorić M, Duraković Z. Antropometrija u procjeni kardio-metaboličkog rizika. *Arh Hig Rada Toksikol* 2014;65:19-27.
 67. Coppini LZ, Waitzberg DL, Campos AC. Limitations and validation of bioelectrical impedance analysis in morbidly obese patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005;8:329-32.
 68. Shen W, Punyanitya M, Chen J, Gallagher D, Albu J, Pi-Sunyer X et al. Waist circumference correlates with metabolic syndrome indicators better than percentage fat. *Obesity* 2006;14:727-36.
 69. Lemieux I, Poirier P, Bergeron J, Alméras N, Lamarche B, Cantin B et al. Hypertriglyceridemic waist: a useful screening phenotype in preventive cardiology? *Can J Cardiol* 2007;23:Suppl B:23B-31B.
 70. Arroyo M, Rocandio AM, Ansotegui L, Herrera H, Salces I, Rebato E. Comparison of predicted body fat percentage from anthropometric methods and from impedance in university students. *Br J Nutr* 2004;92:827-32.
 71. Fuller NJ, Jebb SA, Laskey MA, Coward WA, Elia M. Four-component model for the assessment of body composition in humans: comparison with alternative methods, and evaluation of the density and hydration of fat-free mass. *Clin Sci* 1992;82:687-93.
 72. Wells JC, Fuller NJ, Dewit O, Fewtrell MS, Elia M, Cole TJ. Four-component model of body composition in children: density and hydration of fat-free mass and comparison with simpler models. *Am J Clin Nutr* 1999;69:904-12.
 73. Bhat DS, Yajnik CS, Sayyad MG, Raut KN, Lubree HG, Rege SS et al. Body fat measurement in Indian men: comparison of three methods based on a two-compartment model. *Int J Obes* 2005;29:842-8.
 74. Ramírez E, Valencia ME, Moya-Camarena SY, Alemán-Mateo H, Méndez RO. Four-compartment model and validation of deuterium dilution technique to estimate fat-free mass in Mexican youth. *Nutrition* 2009;25:194-9.
 75. Costa Bila W, Lamounier JA, Freitas AE, Silva VR, Turani SD, Oliveira JED. Stable isotopes and body composition in children: History, fundamentals, and clinical applications. *Health* 2013;5:61-8.
 76. Bhat DS, Yajnik CS, Sayyad MG, Raut KN, Lubree HG, Rege SS et al. Body fat measurement in Indian men: comparison of three methods based on a two-compartment model. *Int J Obes* 2005;29:842-8.
 77. Resende CM, Camelo Júnior JS, Vieira MN, Ferriolli E, Pfrimer K, Perdoná GS et al. Body composition measures of obese adolescents by the deuterium oxide dilution method and by bioelectrical impedance. *Braz J Med Biol Res* 2011;44:1164-70.
 78. Vanhees L, Lefevre J, Philippaerts R, Martens M, Huygens W, Troosters T et al. How to assess physical activity? How to assess physical fitness? *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2005;12:102-14.
 79. Scagliusi FB, Lancha-Jr AH. The study of energy expenditure through doubly labeled water: principles, use and applications. *Rev Nutr* 2005;18:541-51.
 80. Prentice AM, Black AE, Coward WA, Davies HL, Goldberg GR, Murgatroyd PR et al. High levels of energy expenditure in obese women. *Br Med J* 1986;292:983-7.
 81. Bandini LG, Schoeller DA, Dietz WH. Energy expenditure in obese and nonobese adolescents. *Pediatr Res* 1990;27:198-203.
 82. Schoeller DA, Shay K, Kushner RF. How much physical activity is needed to minimize weight gain in previously obese women? *Am J Clin Nutr* 1997;66:551-6.
 83. Schulz LO, Schoeller DA. A compilation of total daily energy expenditures and body weights in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 1994;60:676-81.
 84. Das SK, Saltzman E, McCrory MA, Hsu LK, Shikora SA, Dolnikowski G et al. Energy expenditure is very high in extremely obese women. *J Nutr* 2004;134:1412-6.
 85. Schoeller DA. Insights into energy balance from doubly labeled water. *Int J Obes* 2008;32:S72-5.
 86. Murphy EJ. Stable isotope methods for the in vivo measurement of lipogenesis and triglyceride metabolism. *J Anim Sci* 2006;84(Suppl):94-104.

87. Diraison F, Yankah V, Letexier D, Dusserre E, Jones P, Beylot M. Differences in the regulation of adipose tissue and liver lipogenesis by carbohydrates in humans. *J Lipid Res* 2003;44:846-53.
88. Chen JL, Peacock E, Samady W, Turner SM, Neese RA, Hellerstein MK et al. Physiologic and pharmacologic factors influencing glyceroneogenic contribution to triacylglyceride glycerol measured by mass isotopomer distribution analysis. *J Biol Chem* 2005;280:25396-402.
89. Jones PJ, Winthrop AL, Schoeller DA, Filler RM, Swyer PR, Smith J et al. Evaluation of doubly labeled water for measuring energy expenditure during changing nutrition. *Am J Clin Nutr* 1988;47:799-804.
90. Mance D, Hunjak T, Lenac D, Rubinić J, Roller-Lutz Z. Stable isotope analysis of the karst hydrological systems in the Bay of Kvarner (Croatia). *Appl Radiat Isotopes* 2014;90:23-34.
91. Mance D. Karakterizacija krškog vodonosnika temeljena na prostornim i vremenskim promjenama stabilnih izotopa vodika i kisika. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet, 2014;124. Doktorska disertacija.
92. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* 2000;320:1240-43.
93. Cole TJ, Flegal KM, Nicholls D, Jackson AA. Body mass index cut offs to define thinness in children and adolescents: international survey. *BMJ* 2007;335:194-201.
94. Sorić M. Vrijednost infracrvene spektroskopije u određivanju sastava tijela. *Hrvatski športskomedicinski vjesnik: glasilo Hrvatskog olimpijskog odbora* 2005;20:49-53.