

# UTJECAJ MEĐUGENERACIJSKE IZMJENE MASNE PREHRANE NA REPRODUKTIVNI CIKLUS U SPRAGUE DAWLEY ŠTAKORICA

---

Grgić, Anđela

Doctoral thesis / Disertacija

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:962760>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-07**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Andela Grgić

**UTJECAJ MEĐUGENERACIJSKE IZMJENE MASNE PREHRANE NA  
REPRODUKTIVNI CIKLUS U SPRAGUE DAWLEY ŠTAKORICA**

*Doktorska disertacija*

Osijek, 2016.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Andela Grgić

**UTJECAJ MEĐUGENERACIJSKE IZMJENE MASNE PREHRANE NA  
REPRODUKTIVNI CIKLUS U SPRAGUE DAWLEY ŠTAKORICA**

*Doktorska disertacija*

Osijek, 2016.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Robert Selthofer, dr. med.

Komentor rada: red. prof. dr. sc. Radivoje Radić, dr. med.

Rad ima 65 stranica.

*Ako možeš ostati miran kada na tvome putu  
svi izgube glavu i prstom pokazuju na tebe;  
Ako sačuvaš povjerenje kada svi ostali sumnjaju;  
Ako možeš čekati a da se ne umoriš čekajući;  
Ako ne lažeš kada čuješ laž,  
Ako ne mrziš kada tebe mrze,  
I ako se ne praviš suviše dobar,  
niti govoriš suviše mudro;*

*Ako snivaš, ali ti snovi nisu sve;  
Ako misliš, i misli ti ostaju uvijek čiste;  
Ako znaš prihvatiti, i pobjedu i poraz;  
Ako možeš podnijeti da tvoju istinu  
varalice iskrivljuju da bi lakše prevarili budale;  
Ako vidiš kako u djeliće razbijaju tvoj cilj,  
I miran se sagneš da pokupiš ostatke;  
Ako možeš sakupiti sva svoja dobra  
I staviti ih na kocku, sve odjednom,  
I izgubiti, i početi ponovo ispočetka;  
Ako možeš prisiliti svoje srce, živce  
i svoje mišiće da služe tvojim ciljevima,  
i kada su malaksali,  
I ako ustraješ kada sve zastane,  
Osim Volje koja ti govori: "Drži se dobro";*

*Ako možeš hodati s kraljevima i ne izgubiti ljudskost;  
Ako te ni prijatelj ni neprijatelj ne mogu povrijediti;  
Ako svaki čovjek znači nešto za tebe,  
ali ni jedan suviše;  
Ako znaš dobro ispuniti svaku minutu svog života,  
I svakog trenutka ideš pravim putem;  
Tvoja će biti zemlja i sve njeno blago,  
Jer  
Biti ćeš Čovjek, sine moj!*

*Rudyard Kipling*

Mojoj obitelji...

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Pretilost.....	1
1.1.1. Povijest pretilosti.....	1
1.1.2. Metode klasifikacije pretilosti.....	2
1.2. Masno tkivo.....	4
1.2.1. Vrste masnoga tkiva.....	4
1.2.2. Distribucija masnoga tkiva u organizmu.....	5
1.2.3. Endokrina funkcija masnoga tkiva.....	6
1.3. Adipokini.....	8
1.3.1. Adiponektin.....	9
1.3.2. TNF- $\alpha$ .....	10
1.3.3. IL-6.....	11
1.4. Utjecaj pretilosti na reproduktivni sustav.....	11
1.5. Utjecaj majčine prehrane tijekom skotnosti i laktacije na metabolizam i razvoj pretilosti u potomka.....	13
1.6. Model štakora u istraživanjima pretilosti i reprodukcije.....	13
2. HIPOTEZA.....	16
3. CILJEVI.....	17
4. MATERIJALI I METODE.....	18
4.1. Protokol uzgoja štakora.....	18
4.2. Utvrđivanje skotnosti majki i preživljavanja potomaka.....	20
4.3. Utvrđivanje reproduktivnog ciklusa u potomaka.....	21
4.4. Vaganje i računanje BMI-a.....	22
4.5. Uzimanje uzorka krvi i biokemijska analiza seruma.....	22
4.6. Statistička obrada.....	22
5. REZULTATI.....	23
5.1. Uspješnost skotnosti majki i preživljavanje potomaka.....	23
5.2. Kvaliteta reproduktivnog ciklusa potomaka.....	23
5.3. Tjelesna masa i BMI (indeks tjelesne mase) .....	28
5.1.1. Tjelesna masa i BMI u obje skupine majki.....	28
5.1.2. Tjelesna masa i BMI u svim skupinama potomaka.....	29
5.4. Razina cirkulirajućih lipida.....	30

5.4.1. Trigliceridi i kolesterol u obje skupine majki.....	30
5.4.2. Trigliceridi i kolesterol u svim skupinama potomaka.....	31
5.5. Razina cirkulirajućih adipokina.....	32
5.5.1. Adiponektin, TNF- $\alpha$ i IL-6 u obje skupine majki.....	32
5.5.2. Adiponektin, TNF- $\alpha$ i IL-6 u svim skupinama potomaka.....	33
6. RASPRAVA.....	36
7. ZAKLJUČAK.....	44
8. SAŽETAK.....	45
9. SUMMARY.....	46
10. LITERATURA.....	47
11. ŽIVOTOPIS.....	58

**KRATICE:**

CD	standardna laboratorijska hrana (engl. <i>control diet</i> )
HFD	hrana bogata zasićenim masnim kiselinama (engl. <i>high fat diet</i> )
CD-CD	standardno hranjeni potomci od standardno hranjenih majki
CD-HFD	masno hranjeni potomci od standardno hranjenih majki
HFD-CD	standardno hranjeni potomci od masno hranjenih majki
HFD-HFD	masno hranjeni potomci od masno hranjenih majki
BMI	indeks tjelesne mase (engl. <i>body mass index</i> )
TNF- $\alpha$	faktor tumorske nekroze alfa (engl. <i>tumor necrosis factor alpha</i> )
IL-6	interleukin 6 (engl. <i>interleukin 6</i> )
WHR	omjer struka i bokova (engl. <i>waist to hip ratio</i> )
ATM	makrofagi masnog tkiva (engl. <i>adipose tissue macrophages</i> )
BAT	smeđe masno tkivo (engl. <i>brown adipose tissue</i> )
WAT	bijelo masno tkivo (engl. <i>white adipose tissue</i> )
SVF	stromalna vaskularna frakcija (engl. <i>stroma-vascular fraction</i> )
LMW	adiponektin niske molekularne težine (engl. <i>low molecular weight</i> )
MMW	adiponektin srednje molekularne težine (engl. <i>medium molecular weight</i> )
HMW	adiponektin visoke molekularne težine (engl. <i>high molecular weight</i> )
PCOS	sindrom policističnih jajnika (engl. <i>polycystic ovary syndrome</i> )
MONW	metabolički pretili normalno teški pojedinci (engl. <i>metabolically obese, normal-weight subject</i> )
MHO	metabolički zdravi pretili pojedinci (engl. <i>metabolically healthy obese</i> )



**POPIS TABLICA:**

Tablica 4.1. Smjesa hrane.....20

## POPIS SLIKA:

Slika 1.1. Shematski prikaz „tihe upale“ u organizmu kao posljedica aktivacije visceralnog masnog tkiva te njen utjecaj na organizam.....	8
Slika 4.1. Protokol uzgoja štakora.....	19
Slika 4.2. Određivanje faze estrusa procjenom zastupljenosti stanica.....	21
Slika 5.1. Značajke vaginalnih citoloških briseva u CD-CD skupini potomaka.....	24
Slika 5.2. Značajke vaginalnih citoloških briseva u CD-HFD skupini potomaka.....	25
Slika 5.3. Značajke vaginalnih citoloških briseva u HFD-CD skupini potomaka.....	26
Slika 5.4. Značajke vaginalnih citoloških briseva u HFD-HFD skupini potomaka.....	27
Slika 5.5. Značajke vaginalnih citoloških brisova po skupinama potomaka.....	28
Slika 5.6. Grafički prikaz A) tjelesne mase (g) i B) BMI-a (indeksa tjelesne mase) ( $\text{g}/\text{mm}^2$ ) u obje skupine majki.....	29
Slika 5.7. Grafički prikaz A) tjelesne mase (g) i BMI-a (indeksa tjelesne mase) ( $\text{g}/\text{mm}^2$ ) u svim skupinama potomaka.....	30
Slika 5.8. Grafički prikaz razine A) triglicerida (mmol/l) i B) kolesterola (mmol/l) u obje skupine majki.....	31
Slika 5.9. Grafički prikaz razine A) triglicerida (mmol/l) i B) kolesterola (mmol/l) u svim skupinama potomaka.....	32
Slika 5.10. Grafički prikaz razine A) adiponektina (mmol/l), B) TNF- $\alpha$ (mmol/l) i C) IL-6 (mmol/l) u obje skupine majki.....	33
Slika 5.11. Grafički prikaz razine A) adiponektina (mmol/l), B) TNF- $\alpha$ (mmol/l) i C) IL-6 (mmol/l) u svim skupinama potomaka.....	35

## 1. UVOD

Posljednjih nekoliko desetljeća moderno se društvo suočava s epidemijom pretilosti čija se pojava udvostručila od 1980. godine (1). Smatra se da je suvišak tjelesne masti posljedica tzv. zapadnog životnog stila koji predstavlja unos hrane veći nego što organizam potroši energije. Navedeno predstavlja jedan od vodećih problema modernog čovjeka budući da se smatra da su promjene u metabolizmu masnoga tkiva pretkazujući čimbenik za razvoj brojnih bolesti (2).

### 1.1. Pretilost

Svjetska zdravstvena organizacija definirala pretilost kao bolest u kojoj se višak masnog tkiva nakuplja u tolikoj mjeri da ugrožava zdravlje (3). Normalan udio masnog tkiva u ženskog spola iznosi 20 do 25%, dok u muškog 15 do 20% ukupne tjelesne mase (4). Francuski profesor Jean Vague je 1947. god. uočio dva različita tipa pretilosti; jedan kojeg prate hipertenzija, cerebrovaskularna bolest i dijabetes kao komplikacija i drugi koji ide bez komplikacija (5). Pretilost je podijelio na tzv. androidni i ginoidni tip. Pod androidnim tipom se smatra masno tkivo organizirano većim dijelom u gornjem dijelu tijela. Navedeni tip pretilosti usko je povezan s dijabetesom i srčanim bolestima. Ginoidnim tipom se smatra masno tkivo nakupljeno u regiji bokova i bedara, tipično opisano kao ženski tip pretilosti koja je u mnogo manjoj poveznici sa zdravstvenim komplikacijama.

#### 1.1.1. Povijest pretilosti

U povijesti čovječanstva jedino je medicina antičke Grčke odredila pretilost kao bolest ili uzročnik drugih bolesti dok je u drugim razdobljima povijesti pretilost predstavljala pojam zdravlja, plodnosti i ženstvenosti. To dokazuje i poznata skulptura kipa Venere koji datira iz kasnog paleolitičkog razdoblja (oko 25 000 god. pr. Kr.). Predodžba traje sve do bliže povijesti te se uglavnom povezivala s dobrostojećim građanima budući da su imali pristup hrani u raskoši dok je općenito kroz povijest ljudskog roda vladala pothranjenost i malnutricija. Tek razvojem industrije hrana postaje dostupna većem broju ljudi.

O tome dovoljno govori i podatak da se riječ *obesity* – engl. *pretilost* prvi put u engleskom rječniku spominje u XVII. st., a označavalo je osobe korpulentnije građe (6). No posebna se pažnja pretilosti u zdravstvenom smislu nije pridavala. Tek se u drugoj polovici XIX. st. pretilost promatrala u negativnom smislu isključivo iz estetskih razloga dok se u XX. st. uočila njezina povezanost s povećanom smrtnošću (7). Ranije opisane teorije profesora

Vaguea o androidnoj i gionidnoj pretilosti u početku su bile ismijane u medicinskim krugovima. Inicijalni korak u evaluaciji pretilosti je računanje indeksa tjelesne mase (engl. *body mass index* - BMI). Indeks tjelesne mase izračunava se dijeljenjem tjelesne mase u kilogramima kvadratom tjelesne visine u metrima. Tek je početkom osamdesetih godina skupina znanstvenika iz Gothenburga na temelju studije iznijela jednostavnu mjeru „opseg struka i bokova“ (engl. *waist to hip ratio* – WHR) kojom se može prikazati distribucija masnoga tkiva u tijelu (8) te da povećan opseg struka može pretkazati veći rizik od razvoja srčanih bolesti i dijabetesa. Shodno navedenom, osamdesete godine prošloga stoljeća mogu se smatrati svojevrsnim renesansnim periodom u izučavanju pretilosti jer se otada pobudila znanstvena i medicinska svijest o distribuciji masnoga tkiva u organizmu kao o klinički važnom fenotipu.

O ozbiljnosti problema dovoljno govore podatci Svjetske zdravstvene organizacije koja je u svojim epidemiološkim studijama zamijetila alarmantan porast broja pretilih osoba (9). Više od 1,9 milijardi ljudi starijih od 18 godina 2014. god. mjerilo je povišenu tjelesnu masu ( $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ; 39% muškaraca i 40% žena) od čega je 600 milijuna bilo pretilo ( $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) (4). Većina te populacije živi u državama gdje prekomjerna tjelesna masa i pretilost ubija više ljudi nego pothranjenost. Statistički podatci iz 2014. god. također govore da je 42 milijuna djece mlađe od 5 godina imalo povećanu tjelesnu masu ili bilo pretilo. Nažalost, taj broj ubrzano raste te Svjetska zdravstvena organizacija predviđa da će do 2030. god. 50% stanovništva svijeta biti pretilo.

Stanovništvo Republike Hrvatske u statističkim pokazateljima pretilosti ne zaostaje za svjetskim trendom: 2015. godine oko 25,3% muškaraca i 34,1% žena se smatralo pretilima. Nažalost, i u nas se problem počeo javljati u ranijoj životnoj dobi pa je tako 13,6% dječaka i 10,4% djevojčica u petom razredu osnovne škole prekomjerno teško, u srednjoj školi 11,9 dječaka i 14,2% djevojčica (10).

### **1.1.2. Metode klasifikacije pretilosti**

Danas najzastupljenija metoda klasifikacije pretilosti je izračun indeksa tjelesne mase (BMI) koji se dobije dijeljenjem tjelesne mase u kilogramima s visinom u kvadratnim metrima (11). BMI u rasponu od 18,5 do 24,9  $\text{kg/m}^2$  odgovara normalnoj tjelesnoj masi, vrijednosti BMI između 25,0 i 29,9  $\text{kg/m}^2$  predstavljaju povećanu tjelesnu masu dok se između 30,0 i 34,9  $\text{kg/m}^2$  radi o prvom stupnju pretilosti, između 35,0 i 39,9  $\text{kg/m}^2$  drugom stupnju pretilosti, a vrijednosti iznad 40,0  $\text{kg/m}^2$  predstavljaju treći stupanj pretilosti, odnosno

ekstremnu pretilost (12). Brojne studije pokazale su pozitivnu korelaciju s indeksom tjelesne mase i morbiditetom, odnosno mortalitetom (13). Studije provedene na ljudima i životinjskim modelima jasno su ukazale na povezanost indeksa tjelesne mase s rizikom od razvoja komorbiditeta kao što su hipertenzija, dislipidemija, dijabetes tip 2, kardiovaskularne bolesti i karcinomi (2). Nasuprot tomu, izrazito niski indeks tjelesne mase povezan je s većom stopom smrtnosti, posebice ako znamo da je upravo nizak BMI često pokazatelj smrtonosnih kroničnih stanja. Zbog svega navedenog za istraživanja pretilosti najčešće se upotrebljavaju životinjski modeli, posebice štakori, u kojih se primjenjuje specifična visokokalorijska prehrana oblikovana da bi bila što sličnija prehranbenim navikama ljudi u zapadnog svijeta (14). U štakora se indeks tjelesne mase računa dijeljenjem mase tijela u gramima s dužinom tijela (od nosa do anusa) u  $\text{cm}^2$  (15) ili pojednostavljenom formulom: tjelesna masa (g) podijeljena s dužinom goljenične kosti ( $\text{mm}^2$ ) (16). Pretilost u štakora se definira ukoliko je BMI veći od  $0,68 \text{ g/cm}^2$  (17). Iako se indeks tjelesne mase smatra lako dostupnim alatom za procjenu stanja uhranjenosti, pri kasnijim istraživanjima masnoga tkiva uočene su granice njegova korištenja, budući da je pretilost vrlo heterogeno stanje. Naime, uvidjelo se da pojedine pretile osobe i životinje ne iskazuju metaboličke abnormalnosti unatoč značajnoj količini masnoga tkiva (18). Ukratko, pretilost može povećati mogućnost razvoja zdravstvenih komplikacija, no neće ih svaki pretili pojedinac razviti. Treba imati na umu da, koristeći indeks tjelesne mase, nemamo uvid u rasprostranjenost masnoga tkiva u organizmu i diferencijaciju mišićne mase od mase masnoga tkiva.

Omjer opsega struka i bokova (WHR) najrašireniji je pokazatelj regionalne rasprostranjenosti masnog tkiva, ali i kao dobar pretkazatelj zdravstvenih rizika. U ljudi se mjeri u stojećem položaju. Opseg struka određuje se kao najmanji opseg mjeren u razini pupka, a opseg bokova definira se kao najširi opseg mjeren u razini kukova i stražnjice (19). Visok WHR ( $>1.0$  u muškaraca i  $>0.85$  u žena) govori o centralnom, odnosno abdominalnom tipu pretilosti. U modelu štakora koristi se opseg trbuha kao mjera prediktora pretilosti (17). Postoji nekoliko razloga koji otežavaju svakodnevnu uporabu WHR: ne može se odrediti je li u području struka nakupina visceralnog ili subkutanog masnog tkiva. Smatra se preciznijim izmjeriti opseg struka te odrediti jednostavne krvne markere trigliceride („hipertrigliceridski struk“) čija bi povišena razina upućivala na povećanu zastupljenost visceralnog masnog tkiva (20). Nadalje, WHR nije upotrebljiv za računanje rizika jer može ostati stalan kako masa ispitanika raste ili opada (3).

Razvojem slikovnih tehnologija kao što su računalna tomografija (CT) i magnetna rezonanca (MRI) omogućen je značajan napredak u polju sastava i distribucije masnoga tkiva u organizmu. S računalnom tomografijom moguće je pregledati cijeli organizam ili samo određene dijelove tijela te stvoriti slike presjeka pomoću kojih se jasno može razlikovati masno, koštano i mišićno tkivo te izračunati njihovi odnosi unutar organizma (21).

## **1.2. Masno tkivo**

Masno tkivo dugo se smatralo pasivnim skladištem energije, mehaničkim i toplinskim izolatorom te sudionikom u regulaciji termogeneze (22). No danas je poznato da je masno tkivo značajan endokrini organ čija će detaljnija funkcija biti opisana u kasnijem odjeljku. Masno tkivo opisuje se kao vrsta vezivnog tkiva građenog većinom od masnih stanica (adipocita). Osim adipocita, masno tkivo građeno je i od drugih stanica koje uključuju preadipocite, fibroblaste, endotelne stanice i mnoštvo imunoloških stanica (primjerice makrofagi masnoga tkiva; engl. *adipose tissue macrophages* – ATM). Ravnoteža među različitim tipovima stanica usko je povezana s održavanjem energetske homeostaze.

### **1.2.1. Vrste masnoga tkiva**

Postoje dvije različite vrste masnog tkiva: smeđe masno tkivo (engl. *brown adipose tissue* – BAT) i bijelo masno tkivo (engl. *white adipose tissue* – WAT). Smeđe masno tkivo povezano je s termogenezom budući da sadržava jedinstveni UCP1 protein (23). Iako se smatralo da ono u čovjeka nestaje ubrzo nakon rođenja, u posljednje vrijeme uočeno je da smeđe masno tkivo ostaje prisutno u ljudi u supraklavikularnoj i paraspinalnoj regiji (24), dok u štakora ostaje prisutno u interskapularnoj regiji tijekom cijeloga života (25). Posljednje studije opisuju ulogu smeđeg masnog tkiva povezanu s kontrolom temperature tijela i pretilosti što je u izravnoj poveznici s metaboličkim sindromom (26). Količina i aktivnost smeđeg masnog tkiva u negativnom je odnosu s indeksom tjelesne mase ili obrnuto, smanjenje aktivnosti BAT-a moglo bi biti povezano s povećanim nakupljanjem bijelog masnog tkiva (27).

Najvažnije skladište masti povezano s pretilošću i inzulinskom rezistencijom jest bijelo masno tkivo (22). Ono djeluje kao lipidni spremnik koji nakuplja trigliceride uslijed povećanog unosa energije te pokreće te nakupine kroz razdoblja smanjenog unosa hrane u organizam. U stanjima pretilosti i inzulinske rezistencije povećana je lipoliza, a posljedično tome razvije se neodgovarajuće povećano otpuštanje slobodnih masnih kiselina proizvedenih

iz triglicerida (28). Navedene masne kiseline mogu aktivirati upalne putove u organizmu i poremetiti inzulinsku signalizaciju (28). I lipoliza i lipogeneza regulirani su zajedničkim djelovanjem endokrinih i neuralnih mehanizama koji imaju zajedničku svrhu: održavanje razmjerne građe tjelesne masti u normalnim fiziološkim stanjima.

Treća vrsta masnog tkiva koju znanstvenici navode u novije vrijeme jest tzv. „ružičasto“ masno tkivo (29). Ono je nedavno otkriveno u mišjim subkutanim masnim depoima tijekom skotnosti i laktacije. Ružičasti adipociti stanice su žljezdanog alveolarnog epitela čija je uloga stvaranje i proizvodnja mlijeka. Potvrđeno je da one također nastaju transdiferencijacijom od subkutanih adipocita (30).

### **1.2.2. Distribucija masnoga tkiva u organizmu**

Masno se tkivo u cijelom organizmu općenito može podijeliti u dvije glavne skupine: subkutano i unutrašnje masno tkivo. Subkutano masno tkivo određuje se kao sloj između kože i aponeuroze te fascije mišića. Unutrašnje masno tkivo označava intratorakalno (uključujući perikardijalno) i intraabdominalno masno tkivo (uključujući intraperitonealno i ekstraperitonealno). Intraperitonealno masno tkivo sastavljeno je od dva odjeljka: veliki omentum i mezenterij dok je ekstraperitonealno sastavljeno od preperitonealnog i retroperitonealnog masnog tkiva (31). Pojam „visceralno masno tkivo“ često je u uporabi u medicinskim i zdravstvenim krugovima, a označava omentalno, mezenterično i ekstraperitonealno masno tkivo. Samo se intraperitonealno masno tkivo drenira portalnom venom te se proupalni citokini i metaboliti ispuštaju u portalni krvotok što je, prema nekim hipotezama, poveznica između nakupljanja visceralnog masnog tkiva i razvoja metaboličke bolesti zbog izravnog utjecaja na jetreni metabolizam (32).

Visceralno i subkutano masno tkivo kao dvije glavne skupine razlikuju se morfološki i funkcionalno. Visceralno masno tkivo luči više proupalnih citokina dok subkutano luči više leptina, adiponektina i općenito protuupalnih citokina. Nadalje, visceralno masno tkivo građeno je od velikih inzulin-rezistentnih adipocita te ima dobro razvijenu vaskularizaciju, bogato je krvnom opskrbom i inervacijom. Ovo tkivo je više osjetljivo na lipolizu i ima veću sposobnost nakupljanja makrofaga, T-stanica i NK stanica. Nasuprot tomu, subkutano masno tkivo sastoji se od manjih adipocita s manje razvijenom vaskularizacijom, inervacijom i staničnom infiltracijom te služi kao skladište energije koje se drenira sistemnim krvotokom (33).

U izučavanju pretilosti i uzročnika razvoja bolesti veliku je pozornost izazvala činjenica da je u razvoju bolesti najvažnija regionalna distribucija masnoga tkiva u organizmu, a ne njegova ukupna količina. Glavna metoda kojom se može utvrditi distribucija masnoga tkiva je računalna tomografija (CT) kojom se jasno, skenirajući npr. abdomen, može razlikovati visceralnog od subutanog masnog tkiva (21). Fujioka i sur. još su 1987. god. dokazali da je povećano nakupljanje visceralnog masnoga tkiva povezano s povećanim razinama cirkulirajućih triglicerida i višim razinama glukoze u plazmi, u odnosu na osobe koje imaju isti indeks tjelesne mase, ali kod kojih prevladava masno tkivo u subkutanom području (34). Kasnije se uočila i poveznica povećane akumulacije visceralnog masnog tkiva s razvojem dijabetesa tip 2 (35), aterogenom dislipidemijom i kardiovaskularnim bolestima (36).

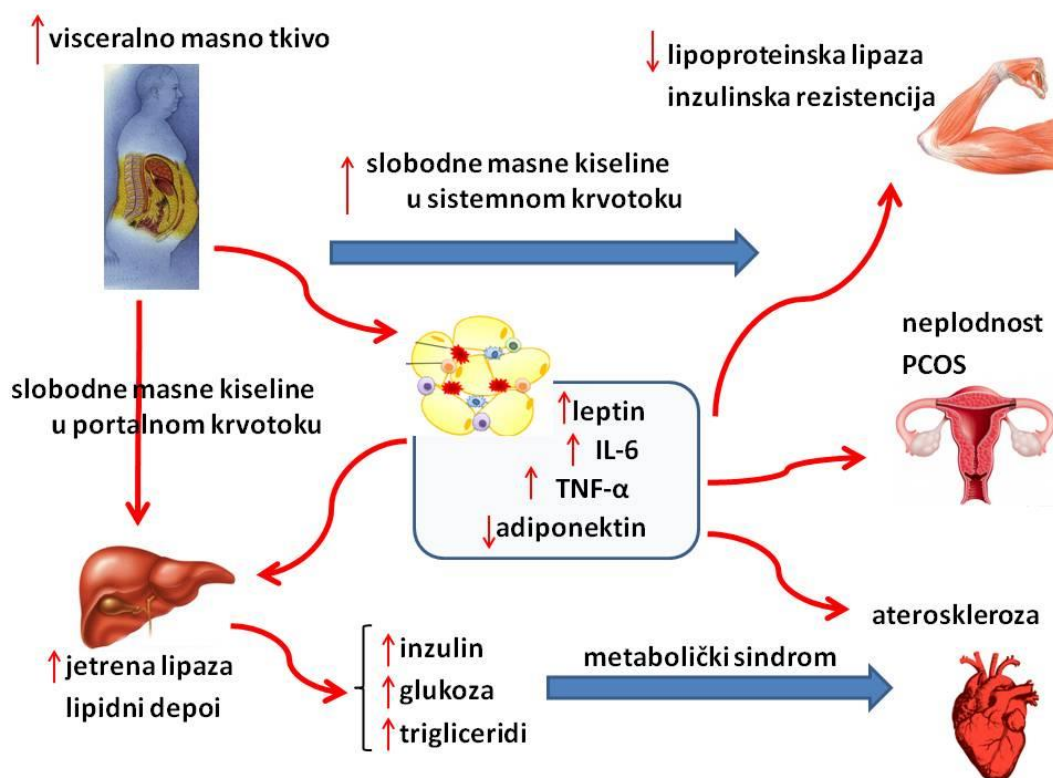
Općenito je poznato da je muški spol skloniji nakupljanju masnog tkiva u gornjem dijelu tijela (trup, abdomen) dok ženski spol ima sklonost nakupljanju masnog tkiva u donjem dijelu (bokovi). Krotkiewski i sur. predložili su da bi spolni hormoni mogli imati utjecaj u stvaranju razlika između spolova kada je riječ o raspodjeli masnog tkiva (37). Čini se da upravo navedena sklonost muškog spola da nakuplja mast u formi visceralnog masnog tkiva razlog zašto je pretilost u tog spola rizičnija. Smatra se da estrogen ima značajan utjecaj na funkciju masnog tkiva i metabolizam te bi mogao biti usko povezan s navedenim razlikama između spolova. Naime, estrogen većinom stvaraju jajnici tijekom reproduktivnog razdoblja života, no estrogen se u oba spola može također stvarati preko periferne aromatizacije androgena u više vrsta tkiva, posebice u masnom tkivu (38). Periferni izvori estrogena posebice su važni nakon završetka reproduktivnog razdoblja budući da je smanjena razina estrogena nakon menopauze povezana s povećanom pretilošću i sklonosti nakupljanju visceralnog masnoga tkiva (39). U modelu štakora uočeno je da tijekom ovarijskog ciklusa estrogeni djeluju inhibicijski na uzimanje hrane dok ovariektomija vodi ka hiperfagiji i prekomjernoj tjelesnoj masi (40). Izravan utjecaj estrogena na periferni metabolizam mišića i masnog tkiva djeluje neovisno o energetskej ravnoteži.

### **1.2.3. Endokrina funkcija masnoga tkiva**

U posljednje vrijeme sve se više govori o masnom tkivu kao o endokrinom organu budući da stvara i izlučuje mnoštvo bioaktivnih peptida, poznatih pod nazivom adipokini koji imaju utjecaj i na lokalnoj (autokrinoj/parakrinoj) i sistemskej (endokrinoj) razini (41). Iznimno aktivan metabolički i endokrini organ upravo je ranije opisano bijelo masno tkivo koje proizvodi bioaktivne supstance koje mogu utjecati na druge organske sustave. Bijelo masno



tkivo kompleksni je multistanični organ primarno sastavljen od adipocita. Stromalna vaskularna frakcija (engl. *stroma-vascular fraction* – SVF) masnog tkiva sadržava nekoliko visoko potentnih stanica, uključujući metabolički aktivne i imunološke stanice (preadipociti, fibroblasti, endotelne stanice, dendritičke stanice, T-stanice, mastocite, granulocite i makrofage) umetnute u izvanstanični matriks (42). Pretilost i povećani unos hrane bogate mastima uzrokuju povećan broj stanica u SVF čime se razvija fenotip koji ima štetne učinke za metabolizam (43). Bijelo masno tkivo jedinstveno je po svojoj plastičnosti, tj. brzo se može prilagoditi prehranbenom manjku ili suvišku. Takva fleksibilnost povezana je s hipertrofičnim i hiperplastičnim promjenama u adipocitima što ima važnu ulogu u regulaciji metabolizma. Povećanje bijelog masnog tkiva u direktnoj je vezi s povećanim lučenjem proupalnih citokina, IL-6 (engl. *interleukin 6*) i TNF- $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor alpha*), hipoksijom te disregulacijom u metabolizmu i skladištenju masnih kiselina, što ide u prilog konceptu o aterogenoj upali kao procesu koji nastaje aktiviranjem makrofaga nakupljenih oko uvećanog adipocita, a što je ponajviše izraženo u visceralnom masnom tkivu (44) (Slika 1.1). Tako nastalo stanje „tihe upale“ u krvi pretilog organizma može objasniti i povećanje razine CRP-a (C-reaktivnog proteina), proteina akutne faze upale (45). „M1“ ili „klasično aktivirani“ makrofagi karakterizirani su povećanim stvaranjem TNF- $\alpha$  i IL-6 što potiče inzulinsku rezistenciju i stanje „tihe upale“ pri hipertrofiji adipocita u pretilih jedinki. Nasuprot tome, „M2“ ili „klasično aktivirani“ makrofagi karakterizirani su povećanom proizvodnjom protuupalnih citokina (npr. IL-10) u masnom tkivu mršavih jedinki te su takvi adipociti veličinom manji (46). Pretilost uzrokuje promjenu aktivacije podgrupe makrofaga u masnom tkivu od M2 prema M1 tipu što vodi prema povećanju proupalnih adipokina koji potiču razvoj inzulinske rezistencije (47). Infiltracija makrofaga masnog tkiva štakora može se utvrditi već nakon jednog tjedna hranjenja s hranom bogatom mastima te se progresivno povećava s vremenom i proporcionalno je stupnju pretilosti (48). Nakupine makrofaga koji okružuju adipocite uočavaju se kao strukture morfološki „slične kruni“ (engl. *crown like structures*). Razvojem pretilosti makrofagi masnog tkiva poprimaju izgled pjenušavih stanica koje započnu akumulirati suvišak lipida (49). Gubitak tjelesne mase povezan je sa smanjenjem broja makrofaga (50) što još jednom potvrđuje da je masno tkivo svojim djelovanjem značajni endokrini organ s mogućnošću regulacije upalnog odgovora organizma.



**Slika 1.1. Shematski prikaz „tihe upale“ u organizmu kao posljedica aktivacije visceralnog masnog tkiva te njen utjecaj na organizam**

Unosom visokokalorijske hrane u količinama većim nego organizam može utrošiti energije, dolazi do akumulacije visceralnog masnog tkiva. Ono uzrokuje povećano otpuštanje slobodnih masnih kiselina koje u jetrenom i mišićnom tkivu aktiviraju upalne putove te poremete inzulinsku signalizaciju što vodi ka metaboličkom sindromu. Pretilost uzrokuje povećanje adipocita koji bivaju okružen makrofagima što dovodi do promjene aktivacije makrofaga od M2 prema M1 upalnom odgovoru. Navedeno dovodi do povećanog lučenja proupalnih citokina (leptina, IL-6 i TNF- $\alpha$ ), odnosno smanjenog lučenja adiponektina. Tako nastalo stanje „tihe upale“ uzrokuje razvoj metaboličkog sindroma i poremećaje reproduktivnog ciklusa..

### 1.3. Adipokini

Masno tkivo inervirano je simpatičkim završecima, te su međustanične veze između adiocita i živaca upravljane signalima što je pod nadzorom hipotalamičnog centra. Adipociti luče kemijske supstance – adipokine kao što su leptin, rezistin, adiponektin, faktor tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ), interleukin 6 (IL-6), proteine komplementa (adipsin), protrombinske faktore (plazminogen aktivator inhibitor-1), enzime (lipoproteinsku lipazu), lipidni transfer proteine plazme i alipoprotein E koji su uključeni u mehanizam masti i lipoproteina,

aromatazu kao enzim uključen u sintezu estrogena. Leptin je prvi adipokin otkriven još 1994. god., a otada je registrirano više od 600 različitih proteina povezanih s regulacijom energetske ravnoteže (51).

Adipokini imaju važnu ulogu u energetske homeostazi, metabolizmu glukoze i lipida, životu stanica, kontroli hranjenja, termogenezi, neuroendokrinnoj funkciji, imunosti, kardiovaskularnoj funkciji te najvažnije – u reprodukciji (52). Sukladno tome, mnogo novijih istraživanja dokazalo je vodeću ulogu adipokina kao molekularnih glasnika u međustaničnoj vezi između masnog tkiva s ostalim tkivima i organima, kao i njihovu značajnu ulogu u razvoju poremećaja povezanih s pretilošću.

### **1.3.1. Adiponektin**

Adiponektin je protein kojeg luče adipociti, molekularne mase 30kDa, čija struktura uključuje N-terminalnu, kolagenu sličnu domenu i C-terminalnu globularnu domenu, poput komplementskog faktora C1q (53). Radi alternativnog prekrajanja postoji više izomera, npr. trimeri niske molekularne težine (engl. *low molecular weight* – LMW), heksameri srednje molekularne težine (engl. *medium molecular weight* – MMW) i multimeri visoke molekularne težine (engl. *high molecular weight* – HMW) (54). HMW se opisuje kao najaktivnija forma adiponektina budući da je plazmatska koncentracija HMW multimera povezana s inzulinskom osjetljivošću, a poteškoće u multimerizaciji adiponektina u ljudi povezane su s dijabetes melitusom tip 2 (55). Nadalje, potvrđene su dvije izoforme adiponektinskog receptora: AdipoR1 primarno je izražen u skeletnim mišićima te AdipoR2 većinom izražen u jetri. U početku se smatralo da se adiponektin luči samo iz masnog tkiva, no kasnije je otkriveno da ga također proizvode i ljudski kardiomiociti i skeletni mišić (54). Njegova ekspresija veća je u subkutanom nego visceralnom masnom tkivu (56). Zapažena je negativna korelacija između pretilosti i cirkulirajućeg adiponektina, a koncentracije adiponektina povećavaju se gubitkom tjelesne težine. Razine cirkulirajućeg adiponektina povišene su u mršavih jedinki, a snižene u ljudi i životinjskih modela s pretilošću i razvijenim dijabetesom tip 2 (57). Potonje se objašnjava hipertrofijom adipocita, zbog unosa hrane bogate nezasićenim masnim kiselinama. To uzrokuje smanjenje proizvodnje i sekrecije inzulinske osjetljivih hormona, a povećava inzulinske rezistentne hormone, dovodeći do inzulinske rezistencije u pretilosti. Adiponektin smanjuje sintezu lipida i produkciju glukoze u jetri te dovodi do pada koncentracije glukoze i slobodnih masnih kiselina u krvi. Osim toga, smanjuje se proizvodnja triglicerida, a potiče iskorištavanje glukoze i oksidacija masnih kiselina u mišićima. Inzulin i IGF-1 (engl. *insulin-*

*like growth factor* 1) povećavaju sintezu adiponektina u bijelom masnom tkivu. Sintaza i lučenje adiponektina smanjeni su u stanju pozitivne kalorijske bilance, osobito u kombinaciji sa smanjenom razinom leptina (58). Adiponektin sprečava razvoj ateroskleroze smanjujući transformaciju pjenastih stanica i ekspresiju površinskih adhezivnih molekula na makrofagima što potiče u ranoj fazi stvaranje aterosklerotskih plakova. Značajna je njegova uloga i na reproduktivni sustav budući da je dosadašnjim istraživanjima dokazano postojanje adiponektinskih receptora na perifernim tkivima reproduktivnog sustava kao što su jajnici, maternica, posteljica, testisi (59). Sva navedena istraživanja upućuju na to da je adiponektin hormon adipocita sa svojevrsnim antidijabetičkim, protuupalnim i antiaterogenim svojstvima (57, 60, 61).

### **1.3.2. TNF- $\alpha$**

Još je 1993. god. otkriveno da se TNF- $\alpha$  stvara iz adipocita u pretilih miševa što ga čini prvim poznatim čimbenikom koji se luči iz masnog tkiva te predstavlja poveznicu pretilosti, upale i dijabetesa (62). Uočeno je također da su u pretilih jedinki povećane razine cirkulirajućeg TNF- $\alpha$  (63). Navedeni zaključci kasnije su potvrđeni znanstvenim istraživanjima koja su pokazala da povećano lučenje proupalnog citokina TNF- $\alpha$  u adipocita pozitivno korelira sa stupnjem pretilosti, razinom inzulina i inzulinskom rezistencijom (44). No utvrđeno je da adipociti nisu glavni izvor TNF- $\alpha$  u pretilosti. Makrofagi iz tzv. stromalne vaskularne frakcije primarni su izvor TNF- $\alpha$  u pretilosti. Povećane razine plazmatskog TNF- $\alpha$  povezane s povećanim lučenjem ostalih proupalnih citokina kao što su IL-1 $\beta$  i IL-6, a posljedično i povećanom infiltracijom masnog tkiva s M1 makrofagima (64). Djelovanje je TNF- $\alpha$  u masnom tkivu autokrino preko inzulinske signalne kaskade vodeći prema preveniranju interakcije inzulina s inzulinskim receptorom (65). TNF- $\alpha$  također je glavni autokrini/parakrini čimbenik koji, aktivirajući hormon osjetljivu lipazu, pokreće lučenje slobodnih masnih kiselina i citokina iz masnog tkiva u krvotok (66) pri čemu se posljedično nakupljaju u jetri i skeletnim mišićima velike količine slobodnih masnih kiselina koje su obilan supstrat za sintezu triglicerida i za glukoneogenezu. TNF- $\alpha$  ima izravnu ulogu u razvoju ateroskleroze jer potiče ekspresiju adhezivnih molekula u endotelu i krvožilnom glatkom mišićju. Osim toga, regulira mnoge gene izražene u masnom tkivu odgovorne za upalu, imuni odgovor i energetska ravnotežu (67).

### 1.3.3. IL-6

Interleukin 6 (IL-6) proupalni je citokin koji luče T-stanice i makrofagi da bi se stimulirao imunološki odgovor. Poznato je da se jedna trećina cirkulirajućeg IL-6 luči iz bijelog masnog tkiva (68) te je dva do tri puta veće u visceralnom nego u subkutanom masnom tkivu (69). Dakako, najveća količina IL-6 izlučenog iz masnog tkiva potječe iz stromalne vaskularne frakcije endotelnih stanica, monocita/makrofaga, miocita i fibroblasta. Količina bijelog masnog tkiva i razina IL-6 u pozitivnoj je vezi s indeksom tjelesne mase, a njihov se nadzor vrši preko inzulina i TNF- $\alpha$  čime se remeti inzulinska signalizacija (70). Posljedično, plazmatske koncentracije IL-6 su povišene u pretilih što je povezano s razvojem inzulinske rezistencije i dijabetesa tip 2 (71). Uočeno je da unos hrane izrazito niske kalorijske vrijednosti uzrokuje smanjenje tjelesne mase te značajno snižava razine IL-6 u masnom tkivu i serumu (72). IL-6 zajedno s TNF- $\alpha$  smanjuje lučenje adiponektina (41).

### 1.4. Utjecaj pretilosti na reproduktivni sustav

Pretilost, a posebno pretilost abdominalnog tipa, udružena je s različitim reproduktivnim poremećajima. Iako su mehanizmi kojima pretilost utječe na reproduktivne funkcije vrlo složeni i nisu do kraja razjašnjeni, čini se da važnu ulogu ima stanje funkcionalnog hiperandrogenizma i hiperinzulinemija koja je udružena sa stanjem inzulinske rezistencije (66). Točnije, abdominalna pretilost, kako je i prethodno rečeno, povezana je s inzulinskom rezistencijom. Povećana koncentracija cirkulirajućeg inzulina suprimira jetrenu sintezu globulina koji veže spolne hormone (*sex-hormone binding globulin* – SHBG). Posljedica smanjenja razine spomenutog hormona je povećanje razine funkcionalnih androgena što može otežati ovulaciju zbog atrezije prematurnog folikula (73). Nakupljanje androgena glavni je čimbenik koji vodi ka ovulatornoj disfunkciji.

Nadalje, povećanim nakupljanjem masnog tkiva u organizmu ženski spolni sustav može biti zahvaćen na različitim razinama, uključujući nadzor ovulacije, razvoj oocita, razvoj embrija, razvoj endometrija, implantaciju embrija i razvoj ploda (74). Stein i Leventhal su 1934. god. prvi prepoznali poveznicu između pretilosti i poremećaja reprodukcije. Opisali su to sindromom „O“ (engl.): *Overnourishment* (prejedanje), *Overproduction of insulin* (prekomjerno stvaranje inzulina), *Ovarian confusion* (smetnje jajnika) i *Ovulation disruption* (poremećaj ovulacije) (75). Glavni primjer poveznice pretilosti s reproduktivnim ciklusom uočava se u najučestalijem endokrinom poremećaju današnjice u ženskog spola reproduktivne dobi – sindromu policističnih jajnika (engl. *polycystic ovary syndrome* – PCOS). U osoba s

navedenom dijagnozom postoji prevalencija pretilosti, centralnog nakupljanja masnog tkiva i dislipdemije kao i veća sklonost za razvoj dijabetesa tip 2 nego zdrave žene reproduktivne dobi. Naime, PCOS usko je povezan s funkcionalnim promjenama masnoga tkiva. Adipociti hipertrofiraju na veću izloženost androgenima (što je jedna od glavnih odlika sindroma), a hipertrofija masnoga tkiva i hiperandrogenizam vode k inzulinskoj rezistenciji (76). Slijedom toga, leptin, kao prvi poznati adipokin, u fiziološkim uvjetima ometa steroidogenezu i u teka i granulosa stanicama jajnika simultano djelujući kroz antagonizam stimulacijskih faktora IGF-I, transformirajućeg faktora rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), inzulina i LH. Budući da u stanjima pretilosti postoji rezistencija na leptin, dolazi do izostanka njegovih fizioloških funkcija te se također javljaju poteškoće u odabiru dominantnog folikula i maturacije oocite (77).

Nasuprot tome, adiponektin još uvijek nema utvrđeno djelovanje u oboljelih od PCOS. Naime, jedna skupina autora utvrdila je smanjenje razine adiponektina u osoba oboljelih od PCOS-a u odnosu na zdrave kontrolne skupine, neovisno o indeksu tjelesne mase (78). Smatra se da smanjena razina adiponektina ima važnu ulogu u poticanju inzulinske rezistencije povećavajući razine triglicerida u krvi (79). S druge strane, druga skupina autora objelodanila je rezultate istraživanja u kojima su utvrđene jednake razine cirkulirajućeg adiponektina u osoba oboljelih od PCOS-a i zdravih kontrolnih skupina s istim indeksom tjelesne mase (80). Ova studija nudi doprinos istraživanjima na animalnim modelima da bi se utvrdila bolja povezanost adiponektina, reproduktivne osi i povećanog nakupljanja masnog tkiva u organizmu ženskog spola i ženskih potomaka.

Važno patofiziološko djelovanje u nastanku visceralnog masnog tkiva i posljedičnog djelovanja na hipotalamično-hipofizno-gonadalnu os čine i stresne situacije zbog kojih se u povećanim količinama luče glukokortikoidi. Naime, kronični stres i poteškoće u suočavanju sa stresnim situacijama povezani su s hiperkortizolemijom i prolongiranom aktivacijom simpatičkog živčanog sustava što može uzrokovati povećanu akumulaciju visceralne masti (81). S druge strane, kronična upala nastala posredovanjem medijatora upale lučenih iz visceralnog masnog tkiva stvara tinjajući kronični stres organizma. Sve to vodi k pretvorbi inaktivnog kortizona u aktivni kortizol pomoću katalizirajućeg enzima  $11\beta$ -hidroksiteroid dehidrogenaza ( $11\beta$ -HSD) koji stvara masno tkivo. Navedeno je izravno povezano i s povećanim nakupljanjem abdominalnog masnog tkiva u životinjskih modela hranjenih povećanim udjelom masti (82). Taj fenotip često je povezan s hipertofijom adipocita, dislipidemijom i inzulinskom rezistencijom.

Sve navedene promjene završavaju različitim patofiziološkim manifestacijama koje su povezane s poremećajima reproduktivnog ciklusa i neplodnošću. Reproductivni su ciklusi u takvih jedinki anovulatorni i neredoviti. Zbog navedenih razloga oplodnja i implantacija su otežane ili potpuno onemogućene (81).

### **1.5. Utjecaj majčine prehrane tijekom skotnosti i laktacije na metabolizam i razvoj pretilosti u potomka**

Pretpostavke da ravnoteža makronutritijenata u majčinoj prehrani može imati važan utjecaj na fiziologiju tijekom djetinjstva potomka, kao i tijekom njihova cijeloga života, temelje se na nizu istraživanja koja su provedena na skotnim štakoricama (83). Spomenuta istraživanja otkrila su postojanost razvojne plastičnosti i promjena u fenotipu kao odgovor na izmijenjene okolišne čimbenike tijekom najranijih perioda života. Burdge GC. u svojem istraživanju dokazao je da su potomci posebno osjetljivi na prehrambene, hormonalne i okolišne promjene tijekom gestacijskog i laktacijskog perioda što može imati za posljedicu izmijenjenu fiziologiju nekoliko sustava tijekom života potomaka (84). Hrana bogata kalorijama dobivenima primarno iz masti često se upotrebljava u istraživanjima da bi oponašala zapadnjački model prehrane kojemu je fetus izložen, a ubuduće i dijete, što kasnije povećava rizik od razvoja metaboličkih poremećaja (85). Ova studija istražuje utjecaj majčine masne prehrane tijekom ranog životnog razvoja ženskog potomka, u smislu povećanog rizika za razvoj pretilosti, metaboličkih i reproduktivnih poremećaja tijekom kasnijeg životnog razvoja, u ovisnosti o prehrani potomka.

### **1.6. Model štakora u istraživanjima pretilosti i reprodukcije**

Za istraživanje pretilosti najčešće se upotrebljavaju životinjski modeli, posebice Sprague Dawley štakori (Madison, Wisconsin) (86). Nesrođeni je soj životinje (engl. *outbreed*) što ga čini najbližim onome što se smatra idealnom populacijom budući da oponaša genetsku raznolikost poznatu u ljudskim populacijama. Najčešće se upotrebljavaju dva pristupa hranjenju životinja – prvi je prehrana s visokim udjelom masti, a drugi prehrana s visokim udjelom masti i šećera – oblikovani da bi bili sličniji prehrambenim navikama ljudi u zapadnim kulturama. Oba pristupa upotrebljavaju se intenzivno već godinama i omogućili su uvid u razvoj bolesti, posebno u razvoj metaboličkog sindroma (14). Katkada se upotrebljavaju modeli s mutiranim genima za leptinski receptor. Te životinje nekontrolirano unose hranu, a ženke tijekom trudnoće imaju povećanu tjelesnu masu. Njihovi potomci imaju veću tjelesnu masu nego kontrolna skupina zbog promjena genotipa (87). Druga velika

prednost tog modela štakora je uspješnost reprodukcije. I mužjaci i ženke postaju spolno zreli sa 65 dana starosti te su plodni tijekom cijele godine. Gestacijsko razdoblje Sprague Dawley štakora iznosi od 21 do 22 dana te mogu okotiti do 12 mladunčadi (88). Razdoblje laktacije traje tri tjedna, a potom mladunci prelaze na standardnu ishranu. Tri do četiri dana od navedenog perioda ženke ponovo započinju s reproduktivnim ciklusom. Funkcionalna morfologija štakorskog jajnika značajna je pri proučavanju folikulogeneze te su tako i ključno sredstvo kojim se prate mnogobrojni utjecaji na rast i sazrijevanje jajnika, a time i njegovu funkciju (89).

Reproduktivni ciklus ženke štakora naziva se estrusom i sastoji se od četiri faze: estrusa, metestrusa, diestrusa i proestrusa. Ovulacija se događa od početka proestrusa do kraja estrusa. Od početka spolne zrelosti do dobi od dvanaest mjeseci, srednja duljina trajanja ciklusa je četiri dana i tako kratak ciklus čini štakora idealnim životinjskim modelom za istraživanje poremećaja reproduktivnog ciklusa (90). Tijekom estrusa, prolaktin, LH i FSH su niski i rastu tijekom poslijepodneva u proestrus fazi. Razine estradiola počinju rasti u metestrusu, dostižu vrhunac tijekom proestrusa i vraćaju se na bazalne razine u estrusu. Izlučivanje progesterona također raste tijekom metestrusa i diestrusa te nakon toga opada. Vrijednosti progesterona ponovno dostižu svoj vrhunac krajem proestrusa (91). Za određivanje etape reproduktivnog ciklusa u štakora najčešće se upotrebljava metoda vaginalnih briseva. Određivanje etape temelji se na odnosima među tri tipa stanica koje se promatraju u vaginalnim brisevima: orožnjele stanice, epitelne stanice i leukociti. Orožnjele su stanice velike, nepravilnog oblika, većinom bez jezgre. Epitelne su stanice manje od orožnjelih i zaobljenog su oblika. U proestrusu imaju jezgru i granuliran izgled, a u metestrusu većinom nemaju jezgru i manje su granularane. Leukociti su vrlo male, okrugle stanice. Na manjim povećanjima u njima se ne može uočiti jezgra. Svaka faza reproduktivnog ciklusa štakora ima karakterističnu kombinaciju stanica u vaginalnom brisu s predominacijom jednog tipa. Tako se u estrusu vide orožnjele stanice u velikom broju u nakupinama i trakama koje se čak mogu vidjeti i golim okom. Bris u metestrusu sadrži velik broj leukocita i manji broj većinom velikih, negranuliranih epitelnih stanica bez jezgre. U ranom metestrusu moguće je vidjeti i poneku veliku orožnjelu stanicu. Vaginalni bris u diestrusu većinom sadrži leukocite s promjenjivim brojem epitelnih stanica i malih orožnjelih stanica. Proestrus je karakteriziran okruglim i ovalnim epitelnim stanicama s jezgrom. Neke od njih mogu pokazivati rane stadije orožavanja, tj. postaju veće i nepravilnog oblika (92). Procjena poremećaja reproduktivnog ciklusa također se temelji na pregledu vaginalnih briseva. Svaki ciklus kraći od četiri i dulji



od pet dana smatra se nepravilnim. Produljeni ciklusi češći su nego ciklusi kraći od četiri dana. Moguća je također i pojava produljenja samo određene etape ciklusa. Pojava takvog oblika poremećaja ciklusa raste s dobi, ali može biti i znak poremećaja u hormonskom statusu organizma (93). Ovom studijom se istražuje kakav utjecaj ima masna prehrana majke prije i tijekom skotnosti i laktacije na reproduktivni ciklus ženskog potomka, u zrelijoj dobi hranjenih postnatalnom masnom ili standardnom ishranom.

## **2. HIPOTEZA**

Masna prehrana majki Sprague Dawley štakora i izmjena tipa prehrane među generacijama ima utjecaj na promjene u tjelesnoj masi, razini cirkulirajućih lipida i adipokina te kvaliteti reproduktivnog ciklusa u ženskih potomaka.

### 3. CILJEVI

Ciljevi istraživanja su sljedeći:

- utvrditi uspješnost skotnosti i preživljavanja potomaka u obje skupine majki u ovisnosti o vrsti prehrane
- ispitati promjene u reproduktivnom ciklusu u ovisnosti o vrsti prehrane majke i potomka u svakoj skupini potomaka uzimajući bris rodnice
- prikazati razlike u tjelesnoj masi i indeksu tjelesne mase u ovisnosti o vrsti prehrane u svakoj skupini majki i potomaka
- ispitati razlike u razini cirkulirajućih razina triglicerida i kolesterola u ovisnosti o vrsti prehrane u svakoj skupini majki i potomaka
- ispitati razlike u razini cirkulirajućih razina adiponektina, TNF- $\alpha$  i IL-6 u ovisnosti o vrsti prehrane u svakoj skupini majki i potomaka.

## 4. MATERIJALI I METODE

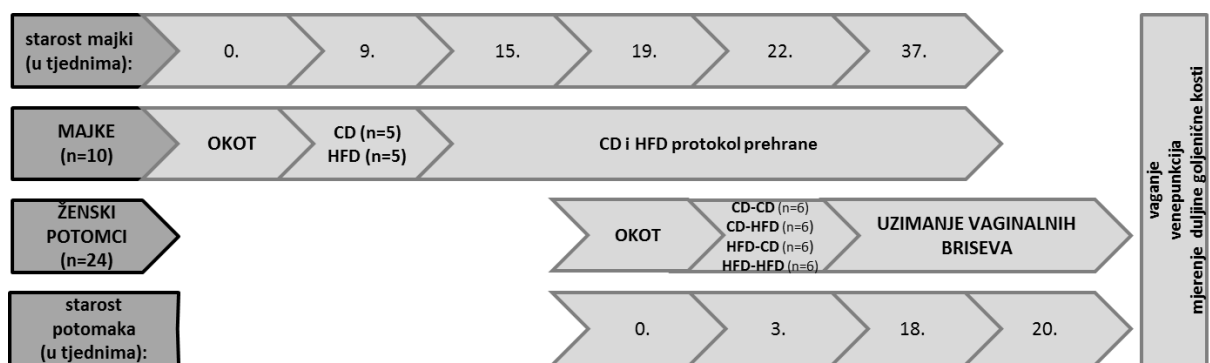
Istraživanje je oblikovano kao nasumični kontrolirani pokus. Raspodjela ispitivanih životinja temeljila se isključivo na slučajnosti uporabom generatora slučajnih brojeva ([www.randomizer.org](http://www.randomizer.org)) (94).

### 4.1. Protokol uzgoja štakora

Deset ženki Sprague Dawley štakora s navršenih devet tjedana starosti nasumično je podijeljeno u dvije skupine (Slika 4.1.). Tijekom šest tjedana jedna je skupina hranjena standardnom laboratorijskom hranom (Mucedolla, Italija) (CD skupina (engl. *control diet*); n=5), a druga skupina hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama (Žito d.o.o., Hrvatska) (HFD skupina (engl. *high fat diet*); n=5) (Tablica 4.1.). U koordinaciji s prehrambenim tehnologom osmišljena je recepturna smjesa za masnu dijetu, proizvedena u kontroliranim uvjetima slijedeći upute o laboratorijskoj hrani koja se provodi u sklopu Istraživanja na laboratorijskim životinjama.. Smjesa je osmišljena po uzoru na prehrambeni model zapadnih zemalja gdje je zabilježen alarmantni porast pretilosti, gdje 60% od ukupnih kilokalorija otpada na masti (28% ukupnih sirovih masti), gdje sojino ulje kod kontrolne skupine sadrži oko 78% nezasićenih masnih kiselina, palmino ulje sadrži minimalno 50% zasićenih masnih kiselina. Zbog pretežitog sadržaja zasićenih masnih kiselina kod HFD skupine, osobito palmitinske (zasićene masne kiseline) istraživanja su pokazala da u većim količinama povećavaju rizik razvoja metaboličkog sindroma u animalnim i humanim studijama (95-97). Zabilježene su i velike promijene i utjecaj zapadne dijetete među spolovima (98) pa je radi točnije i čišće statističke analize, provedena studija samo na ženskim jedinkama.

U dobi od navršenih 15 tjedana, štakorice obje skupine parene su s istim mužjakom. Nakon tri tjedna nošenja mladih, bilježio se broj mladih po štakorici pri okotu te broj mladih po štakorici tri dana poslije okota. Nakon perioda laktacije u trajanju od tri tjedna, ženski potomci podijeljeni su u četiri skupine (n=6 po svakoj) s različitim protokolom prehrane: a) CD-CD (standardno hranjeni potomci od standardno hranjenih majki), b) CD-HFD (standardno hranjeni potomci od masno hranjenih majki), c) HFD-CD (masno hranjeni potomci od standardno hranjenih majki) i d) HFD-HFD (masno hranjeni potomci od masno hranjenih majki). Štakori su bili smješteni u odvojenim kavezima u prostorijama Vivarija Medicinskog fakulteta Osijek u kontroliranim uvjetima (temperatura prostorije 22 °C s 12-satnim dan-noć ciklusima). Štakori hranjeni standardnom laboratorijskom hranom imali su pristup hrani i vodi *ad libidum* dok se skupinama majki i potomaka koji su bili na masnoj

ishrani kontrolirano davala hrana dvaput tijekom dana, u 9 i u 16 sati, da bi se spriječio nastanak pretilosti zbog prekomjernog unosa hrane. Potomcima u dobi od navršenih 18 tjedana uzimali su se brisevi rodnice kroz period od 15 dana. U starosti majke od 37 tjedana i potomaka od 20 tjedana sve su štakorice bile vagane, uziman je uzorak venske krvi iz repne vene te se mjerila duljina desne goljenične kosti. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/14-08/06, Ur. broj: 2158-61-07-14-13) i Ministarstava poljoprivrede (klasa: UP/I-322-01/11-01/150, Ur.broj: 525-06-1-0255/12-2) te je usklađeno po Europskim direktivama o skrbi za laboratorijske životinje. Uzgoj i provođenje istraživanja provodili su asistenti Katedre za anatomiju i neuroznanost koji posjeduju licencu za rad s laboratorijskim životinjama u znanstvene svrhe. Tijekom provođenja istraživanja poštivala su se osnovna načela zaštite dobrobiti laboratorijskih i pokusnih životinja. Uzorak životinja zbog toga se smanjio na broj dostatan da zadovolji statističku analizu. Sudionici u istraživanju obvezali su se na odgovornost tijekom provođenja pokusa, stoga su provedeni postupci bili što manje invazivni (koliko princip istraživanja to dozvoljava) da bi se životinjama olakšala bol i patnja. Primjenjivao se koncept „5 sloboda“ prema kojem je svaka životinja bila lišena gladi i žeđi, neudobnosti, ozljeda, straha i stresa. Time se omogućilo slobodno pokazivanje vrsnospecifičnog ponašanja svake životinje.



**Slika 4.1. Protokol uzgoja štakora**

Deset ženki Sprague Dawley štakora s navršenih devet tjedana starosti podijeljeno je u dvije skupine. Tijekom šest tjedana jedna je skupina hranjena standardnom laboratorijskom hranom (CD skupina; n=5), a druga skupina hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama (HFD skupina; n=5). U dobi od navršenih 15 tjedana štakorice su obje skupine parene. Nakon tri tjedna nošenja mladih bilježio se broj mladih po štakorici prilikom okota te broj mladih po štakorici tri dana poslije okota. Nakon perioda laktacije u trajanju od tri tjedna, ženski potomci

podijeljeni su u četiri skupine (n=6 po svakoj) s različitim protokolom prehrane: CD-CD (standardno hranjeni potomci od standardno hranjenih majki), CD-HFD (standardno hranjeni potomci od masno hranjenih majki), HFD-CD (masno hranjeni potomci od standardno hranjenih majki) i HFD-HFD (masno hranjeni potomci od masno hranjenih majki). Potomcima u dobi od navršenih 18 tjedana uzimali su se brisevi rodnice u periodu od 15 dana. U starosti majke od 37 tjedana i potomaka od 20 tjedana sve štakorice bile su vagane, uziman je uzorak venske krvi iz repne vene te se mjerila duljina desne goljениčne kosti.

#### Tablica 4.1. Smjesa hrane

Recepturna smjesa standardne laboratorijske hrane (CD) i hrane bogate zasićenim masnim kiselinama (HFD).

\*u formi sojinog ulja; \*\*u formi palminog ulja

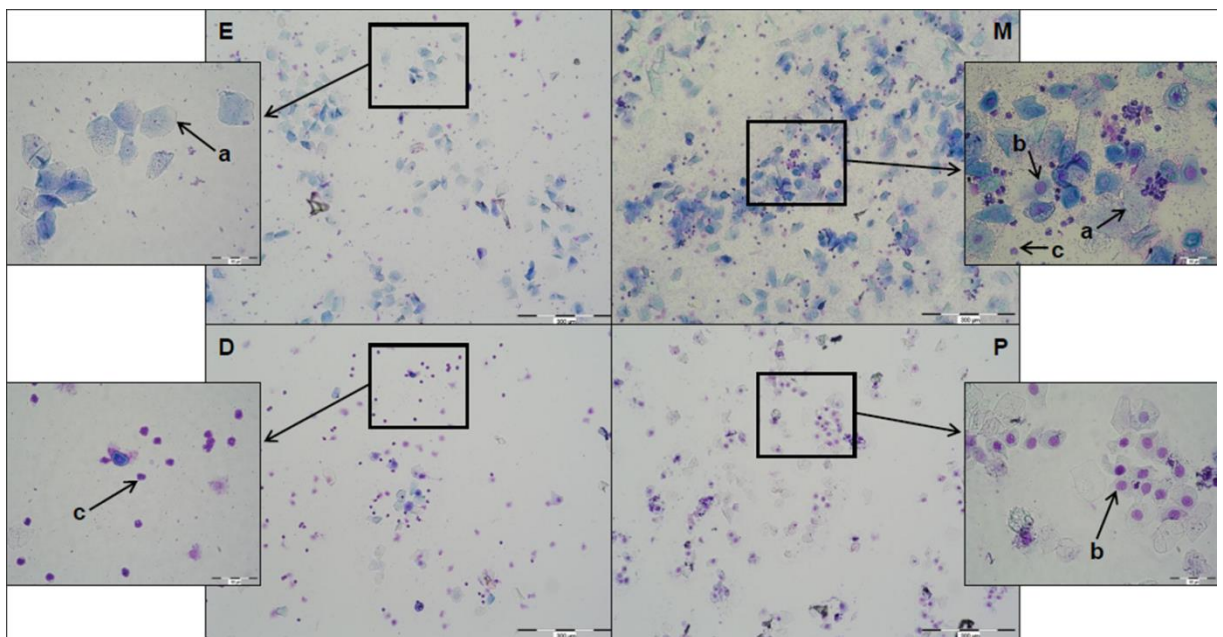
	CD hrana		HFD hrana
	Tijekom prvih 14 tjedana života	Nakon 14. tjedna života	
Ugljikohidrati	53,7%	66,5%	30%
Životinjski proteini	4,7%	3,5%	27,2%
Biljni proteini (soja i kvasci)	30,5%	18,2%	
Masti	1,4%*	0,4%*	28%**
Vitaminsko-mineralni premiksi	4,1%	3,2%	3,9%
Krmna smjesa	3,0%	7,5%	9,7%
Aminokiseline	0,1%	0,1%	0,1%

#### 4.2. Utvrđivanje skotnosti majki i preživljenja potomaka

Utvrđivanje skotnosti provodilo se svako jutro između 7 i 10 sati metodom utvrđivanja vaginalnog čepa. Brojnost potomaka utvrđivalo se za svaku majku posebno prvi dan po okotu i treći dan te se time izračunala uspješnost preživljavanja potomaka.

### 4.3. Utvrđivanje reproduktivnog ciklusa u potomaka

U dobi od 18 tjedana započelo se s uzimanjem brisa rodnice te je nastavljeno kroz 15 dana, svaki dan u 14 sati. Bris rodnice uzimao se unošenjem pamučnog štapića u rodnicu prethodno namočenog u fiziološku otopinu. Nakon nekoliko rotacija štapića unutar rodnice, stanice su se nanosile na histološko stakalce. Zatim su osušene na zraku te bojane May-Grünwald-Giemsa bojanjem (99). Morfološke karakteristike brisa promatrala su se pod svjetlosnim mikroskopom pod povećanjem od 100x i 400x (Olympus®; BX50 mikroskop), a digitalne slike napravljene su aparatom Olympus®; C-5050 *digital camera* te programom QuickPHOTO PRO *imaging software* (Promicra s.r.o., Prag, Republika Češka) da bi se mogla utvrditi faza ciklusa. Određivala se zastupljenost različitih vrsta stanica: epitelnih stanica, rožnatih stanica i leukocita. Ovisno o zastupljenosti vrste stanica, određen je proestrus, estrus, metestrus i diestrus te dužina trajanja pojedine faze i njihovo pravilno izmjenjivanje. Svi ciklusi koji su trajali produženo (>5 dana) ili je trajanje pojedine etape bilo predugo ili se etape nisu smjenjivale u normalnim obrascima, smatrali su se nepravilnima (90).



**Slika 4.2. Određivanje faze estrusa procjenom zastupljenosti stanica**

Tri su osnovne vrste stanica koje se mogu uočiti u uzorcima vaginalnih brisova: a) orožnjene pločaste stanice, b) epitelne stanice s jezgrom, c) leukociti. Udio navedenih tipova stanica u uzorku određuje etapu ciklusa u štakorice: (E) estrus, (M) metestrus, (D) diestrus, ili (P) proestrus faza. (May-Grünwald-Giemsa bojanje, 100x (E, M, D, P) and 400x (a, b, c)).

#### **4.4. Vaganje i računanje BMI-a**

Majke i potomci vagani su vagom Beurer KS 22, Peking, Kina. BMI (indeks tjelesne mase) računao se koristeći pojednostavljenu formulu: tjelesna masa (g)/ukupna duljina goljenične kosti (mm<sup>2</sup>) (16). Duljina goljenične kosti mjerena je mikrometarskim kaliperom od hrapavosti tibije do medijalnog maleola (17).

#### **4.5. Uzimanje uzorka krvi i biokemijska analiza seruma**

Uzorak venske krvi uziman je punkcijom iz repne vene, zatim je 30 minuta skladištena na sobnoj temperaturi nakon čega je centrifugirana brzinom od 3000 okretaja u minuti kroz 15 minuta. Pipetiranjem izolirani serum pohranjen je na -20°C. Učinjena je biokemijska analiza razine triglicerida i kolesterola komercijalnim kitovima na Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Osijek uređajem Olympus Diagnostic Systems group (Mellville, NY) (100). Metodom imunokemijske analize ELISA kitovima (BioVendor, Laboratory medicine, Republika Češka) odredile su se koncentracije adiponektina, TNF- $\alpha$  i IL-6 prema protokolu proizvođača (101, 102). Uzorci su se mjerili u duplikatima kako bi se dobili što precizniji rezultati i zatim očitavali uz pomoć čitača mikrotitarskih pločica (ELISA) – BioRad 93200 PR3100 TSC Microplate Reader u Laboratoriju za imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek.

#### **4.6. Statistička obrada**

Veličina uzorka određena je na temelju preliminarnih rezultata istraživanja. Za uočavanje efekta od 0,25 $\pm$ 0,1 uz  $\alpha=0,05$  i snagu testa 0,8 potrebna je veličina uzorka od najmanje pet životinja po skupini (Sigma Plot inačica 11.0, Systat Software, Inc., San Jose, CA 95110 SAD). Varijable su prikazane kao medijan s interkvartilnim rasponom (Me [Q1-Q3]) te grafički korištenjem Whiskers bar grafova. Stupčastim grafikonom prikazani su podatci dobiveni citološkim promatranjem. Budući da je uzorak štakorica po grupi ograničen (zbog zakonskih odredbi za korištenje životinja u znanstvene svrhe), analize među grupama obavljale su se neparametrijskim testovima. Mann-Whitney test upotrebljavao se za testiranje dvije nezavisne skupine koji je proširen s Kuskal-Wallis testom za poređenje tri ili više nezavisnih uzoraka. Razina statističke značajnosti određena je za vrijednosti  $P<0.05$ . Analiza podataka vršila se korištenjem IBM SPSS Statistics v21.0.



## **5. REZULTATI**

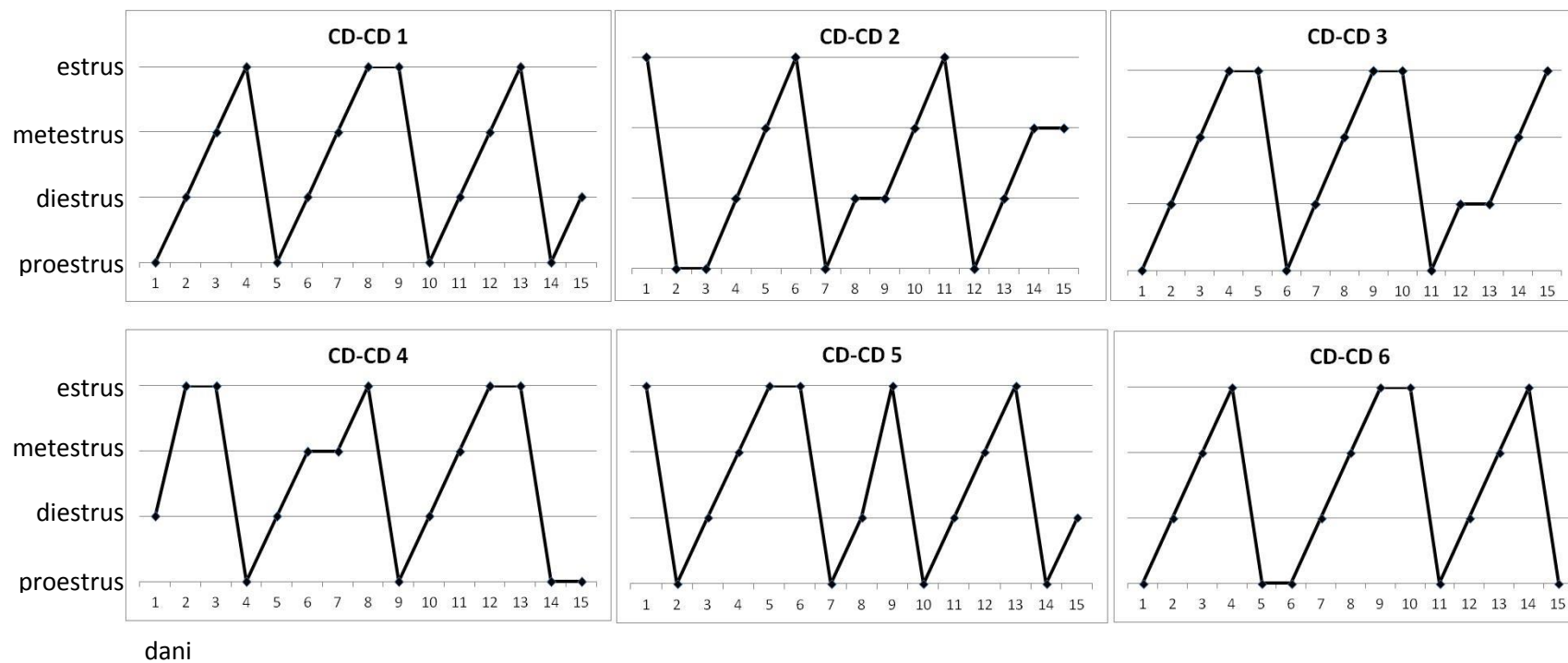
### **5.1. Uspješnost skotnosti majki i preživljavanje potomaka**

Broj dana potrebnih za uspješnost skotnosti značajno se razlikovala između CD i HFD skupina majki ( $P=0.009$ ) u korist CD skupine. Ukupni broj novorođenih po majci u CD skupini iznosio je 78, a u HFD skupini 44 potomka. Prosjek preživjelih potomaka tri dana nakon okota u CD skupini majki bio je značajno veći nego u HFD grupi (15.6 naspram 7.6).

### **5.2. Kvaliteta reproduktivnog ciklusa potomaka**

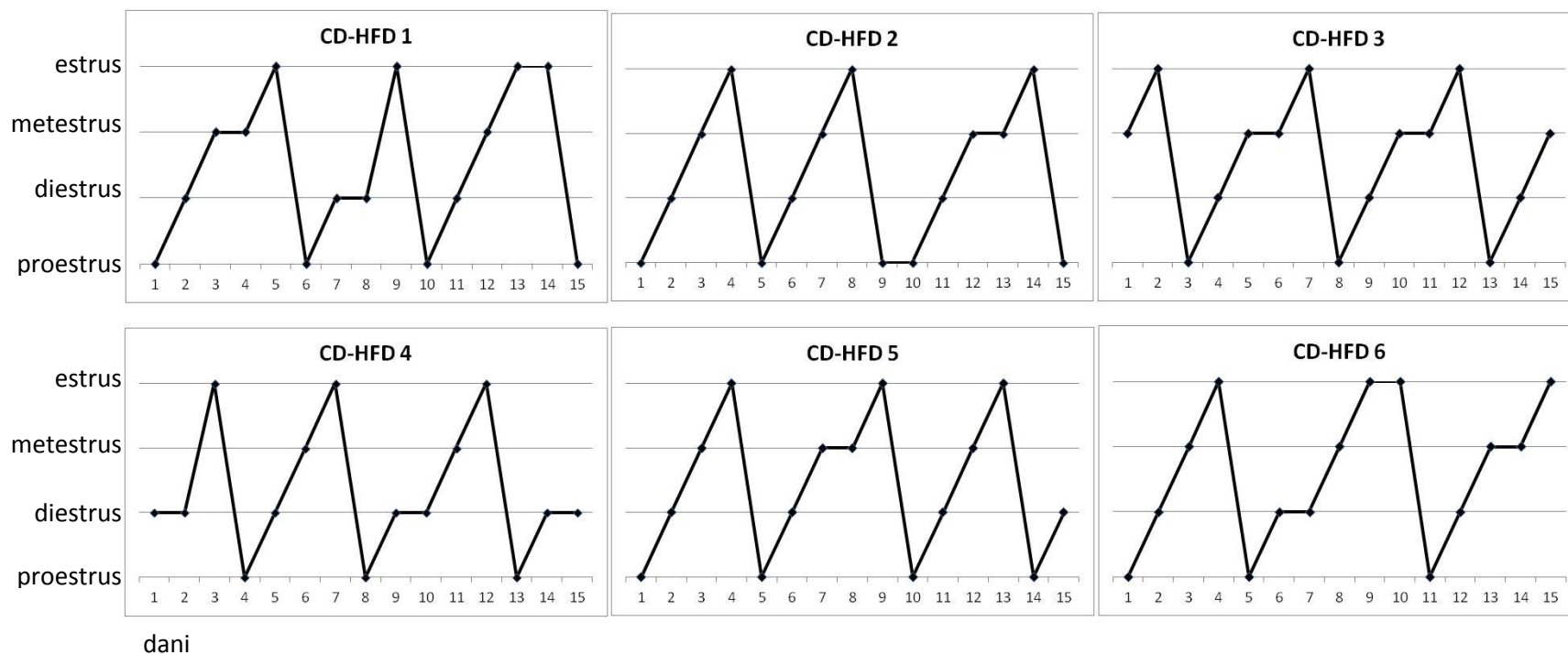
Citološka analiza vaginalnih brisova u svih potomaka majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom prikazala je normalan reproduktivni ciklus (CD-CD i CD-HFD skupina). Slike 5.1 i 5.2. prikazuju pravilnu izmjenu svih faza ciklusa na temelju analize citološkog brisa što govori u prilog urednog reproduktivnog ciklusa.

Potomci masno hranjenih majki (HFD-CD i HFD-HFD skupina) prikazali su nepravilne izmjene faza ciklusa ili produljenu diestrus fazu (slika 5.3 i slika 5.4.) što se citološkom analizom smatra nepravilnim reproduktivnim ciklusom.



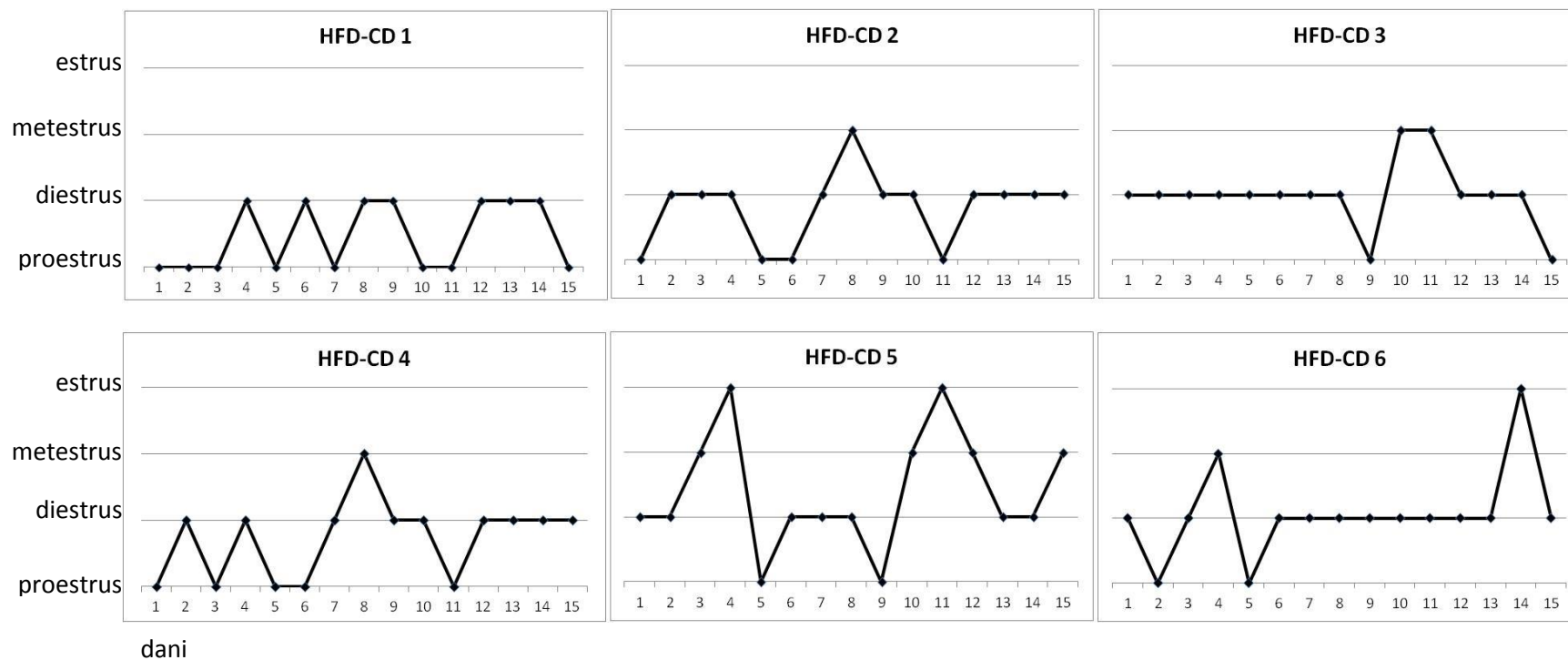
**Slika 5.1. Značajke vaginalnih citoloških briseva u CD-CD skupini potomaka**

Potomcima CD-CD (n=6) u dobi od navršenih 18 tjedana uzimali su se brisevi rodnice u periodu od 15 dana (dani prikazani na apscisi). Promatrana je izmjena faza reproduktivnog ciklusa jedinke (proestrus, diestrus, metestrus, estrus prikazani na ordinati). Citološki brisevi zdravo hranjenih potomaka majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom (CD-CD) bili su uredni.



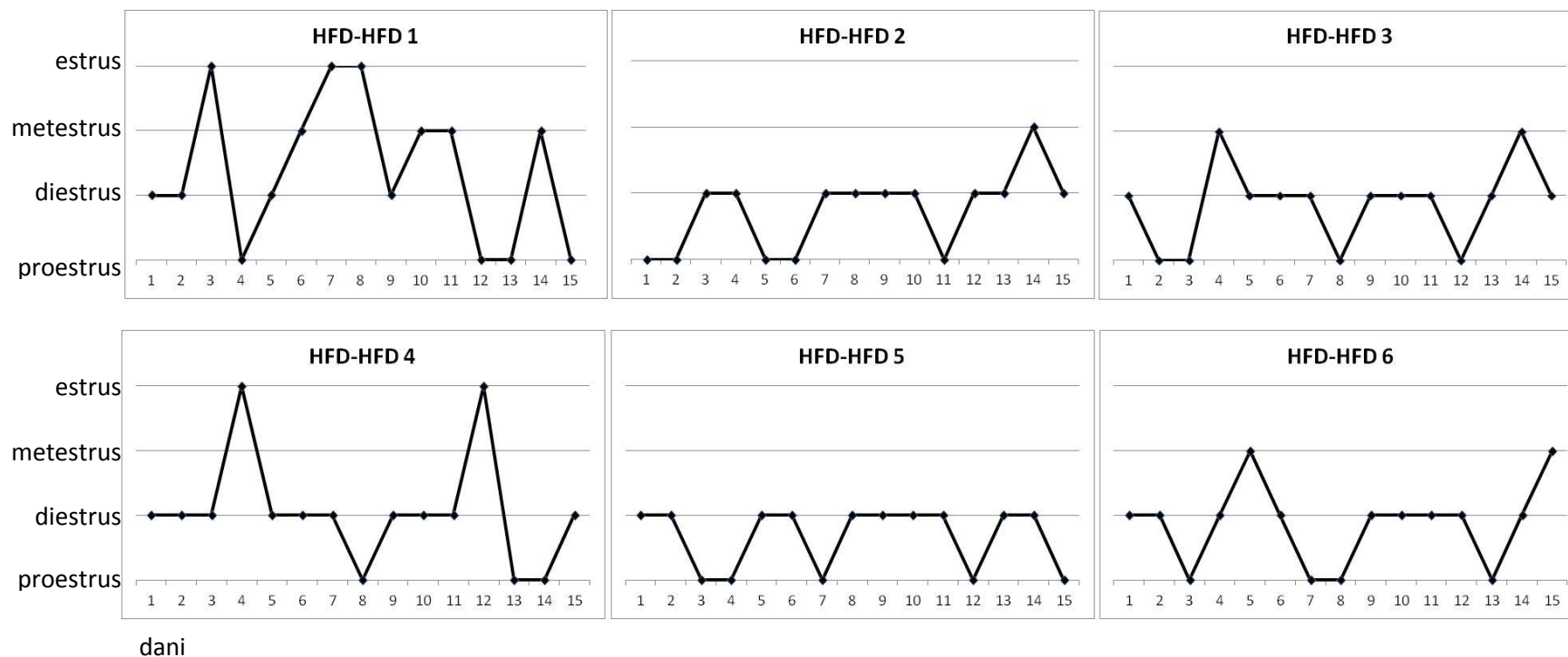
**Slika 5.2. Značajke vaginalnih citoloških briseva u CD-HFD skupini potomaka**

Potomcima CD-HFD (n=6) u dobi od navršenih 18 tjedana uzimali su se brisevi rodnice u periodu od 15 dana (dani prikazani na apscisi). Promatrana je izmjena faza reproduktivnog ciklusa jedinke (proestrus, diestrus, metestrus, estrus prikazani na ordinati). Citološki brisevi masno hranjenih potomaka majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom (CD-HFD) bili su uredni.



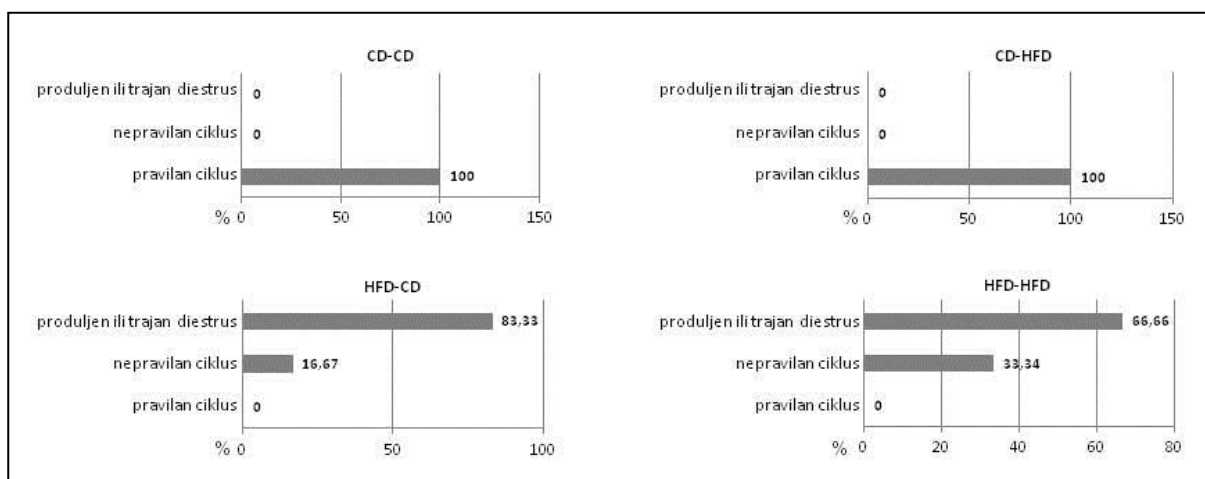
**Slika 5.3. Značajke vaginalnih citoloških briseva u HFD-CD skupini potomaka**

Potomcima HFD-CD (n=6) u dobi od navršenih 18 tjedana uzimali su se brisevi rodnice u periodu od 15 dana (dani prikazani na apscisi). Promatrana je izmjena faza reproduktivnog ciklusa jedinice (proestrus, diestrus, metestrus, estrus prikazani na ordinati). Citološki brisevi zdravo hranjenih potomaka majki hranjenih hranom s povišenim udjelom zasićenih masnih kiselina (HFD-CD) prikazali su nepravilnosti u smislu nepravilne izmjene faza ciklusa ili produžene diestrus faze.



**Slika 5.4. Značajke vaginalnih citoloških briseva u HFD-HFD skupini potomaka**

Potomcima HFD-HFD (n=6) u dobi od navršenih 18 tjedana uzimali su se brisevi rodnice u periodu od 15 dana (dani prikazani na apscisi). Promatrana je izmjena faza reproduktivnog ciklusa jedinke (proestrus, diestrus, metestrus, estrus prikazani na ordinati). Citološki brisevi masno hranjenih potomaka majki hranjenih hranom s povišenim udjelom zasićenih masnih kiselina (HFD-HFD) prikazali su nepravilnosti u smislu nepravilne izmjene faza ciklusa ili produžene diestrus faze.



**Slika 5.5. Pregled značajki vaginalnih citoloških briseva po skupinama potomaka**

Citološki brisevi svih potomaka majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom bili su uredni (CD-CD, CD-HFD) dok su svi citološki brisevi potomaka majki hranjenih hranom s povišenim udjelom zasićenih masnih kiselina (HFD-CD, HFD-HFD) prikazali nepravilnosti u smislu nepravilne izmjene faza ciklusa ili produžene diestrus faze. CD-CD (standardno hranjeni potomci od standardno hranjenih majki), CD-HFD (standardno hranjeni potomci od masno hranjenih majki), HFD-CD (masno hranjeni potomci od standardno hranjenih majki) i HFD-HFD (masno hranjeni potomci od masno hranjenih majki).

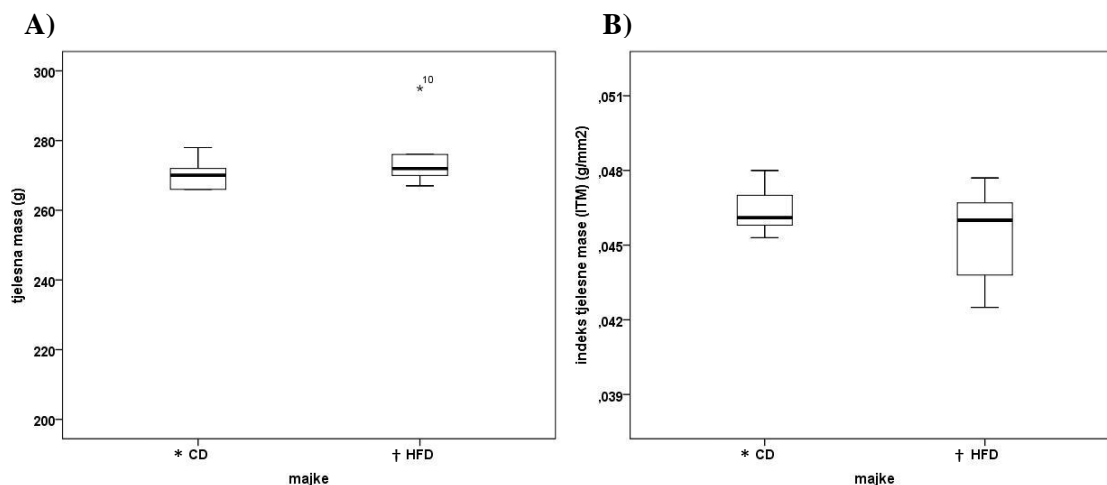
### 5.3. Tjelesna masa i BMI (indeks tjelesne mase)

Povećan unos zasićenih masti nije imao utjecaj na BMI u majki niti u potomaka (redom  $P=0.46$  i  $P=0.42$ ). Unatoč tomu CD-CD štakori imali su najveću tjelesnu masu, a *post-hoc* analizom uočeno je da je njihova tjelesna masa značajno veća uspoređujući s CD-HFD grupom ( $P=0.04$ ) (Slika 5.6.A).

#### 5.3.1. Tjelesna masa i BMI u obje skupine majki

Veća tjelesna masa mjerena je u HFD skupini majki (Me=272[268-285]) dok je medijan indeksa tjelesne mase bez osobitih razlika između obje skupine majki (0.046 g/mm<sup>2</sup>).

Nije bilo statistički značajne razlike između CD i HFD majki u tjelesnoj težini i BMI (Slika 5.6.)



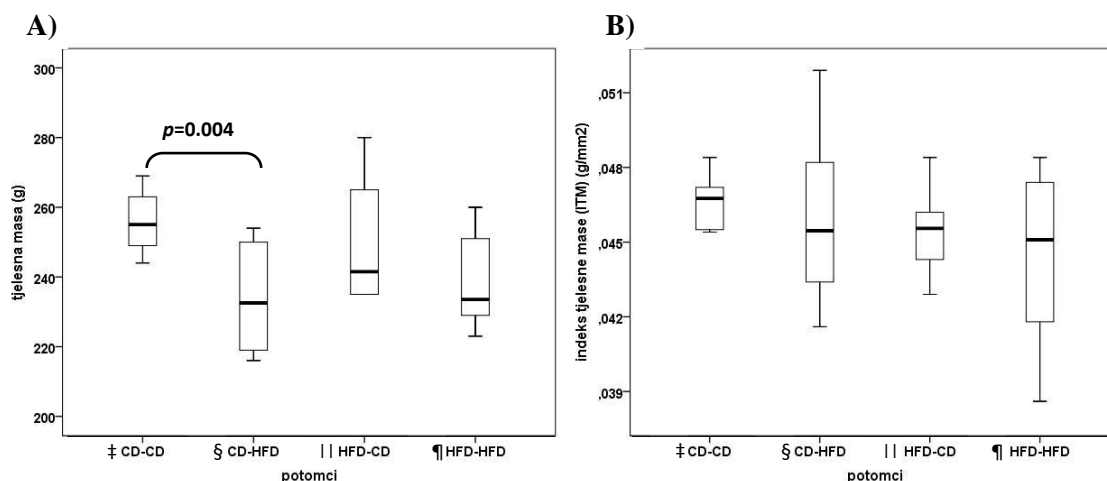
**Slika 5.6. Grafički prikaz A) tjelesne mase (g) i B) BMI-a (indeksa tjelesne mase) (g/mm<sup>2</sup>) u obje skupine majki**

Podatci su prikazani koristeći Whiskers bar grafikone. Razlike među grupama testirane su Mann-Whitney U testom, razina statističke značajnosti određena je za vrijednosti  $P < 0.05$ .

\*CD – standardna laboratorijska hrana, †HFD – hrana bogata zasićenim masnim kiselinama.

### 5.3.2. Tjelesna masa i BMI u svim skupinama potomaka

Najveća tjelesna masa izmjerena je u CD-CD skupini potomaka (Me=254[247-264]) dok je najniža u CD-HFD skupini (Me=232[218-251]). Statistički značajna razlika u tjelesnoj masi bila je između CD-CD i CD-HFD skupine ( $P=0.04$ ), što među ostalim skupinama nije uočeno (Slika 5.7.). Najveći BMI imala je CD-CD skupina potomaka (Me=0.046[0.045-0.047]), dok je u ostalim skupinama medijan iznosio 0.045. Mann-Whitney-evim testom nije uočena razlika u iznosu BMI među skupinama potomaka.



**Slika 5.7. Grafički prikaz A) tjelesne mase (g) i BMI-a (indeksa tjelesne mase (g/mm<sup>2</sup>) u svim skupinama potomaka**

Podatci su prikazani koristeći Whiskers bar grafikone. Razlike među grupama testirane su Mann-Whitney U testom, razina statističke značajnosti određena je za vrijednosti  $P < 0.05$ .

♀CD-CD (standardno hranjeni potomci od standardno hranjenih majki), §CD-HFD (standardno hranjeni potomci od masno hranjenih majki), ||HFD-CD (masno hranjeni potomci od standardno hranjenih majki) i ¶HFD-HFD (masno hranjeni potomci od masno hranjenih majki).

## 5.4. Razina cirkulirajućih lipida

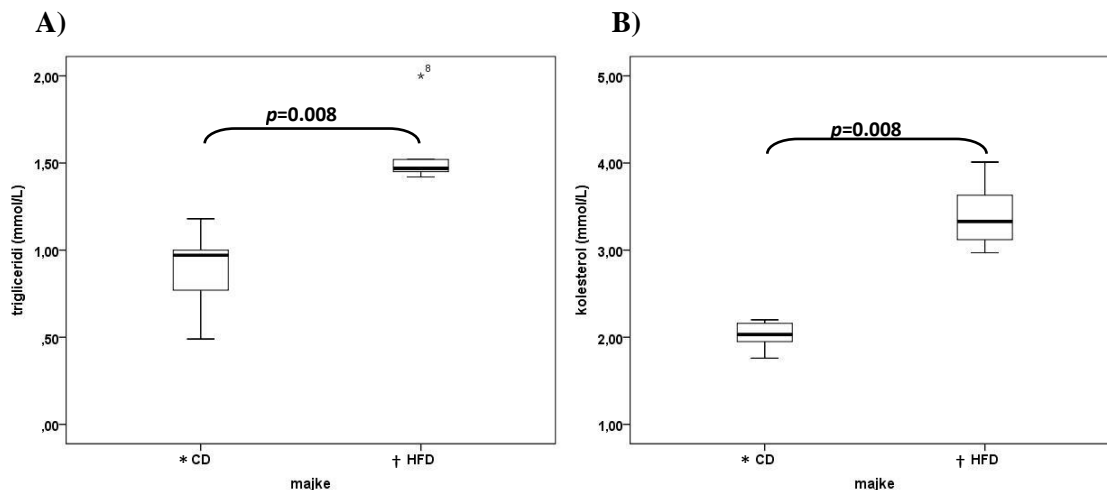
Koncentracije serumskog triglicerida i kolesterola općenito su bile više u majki i potomaka hranjenih hranom koja sadržava veći udio zasićenih masnih kiselina nego u majki i potomaka hranjenih standardnom laboratorijskom hranom.

### 5.4.1. Trigliceridi i kolesterol u obje skupine majki

Hranjenje masnom prehranom rezultiralo je značajnim povećanjem koncentracije triglicerida u HFD majki (Me=1.47[1.43-1.76]) uspoređujući s CD majkama (Me=0.97[0.63-1.09];  $P=0.008$ ) (Slika 5.8.A).

Povišene vrijednosti kolesterola mjerene su u HFD majki uspoređujući one mjerene u CD majki ( $P=0.008$ ) (Slika 5.8.B).





**Slika 5.8. Grafički prikaz razine A) triglicerida (mmol/l) i B) kolesterola (mmol/l) u obje skupine majki**

Podatci su prikazani koristeći Whiskers bar grafikone. Razlike među grupama testirane su Mann-Whitney U testom, razina statističke značajnosti određena je za vrijednosti  $P < 0.05$ .

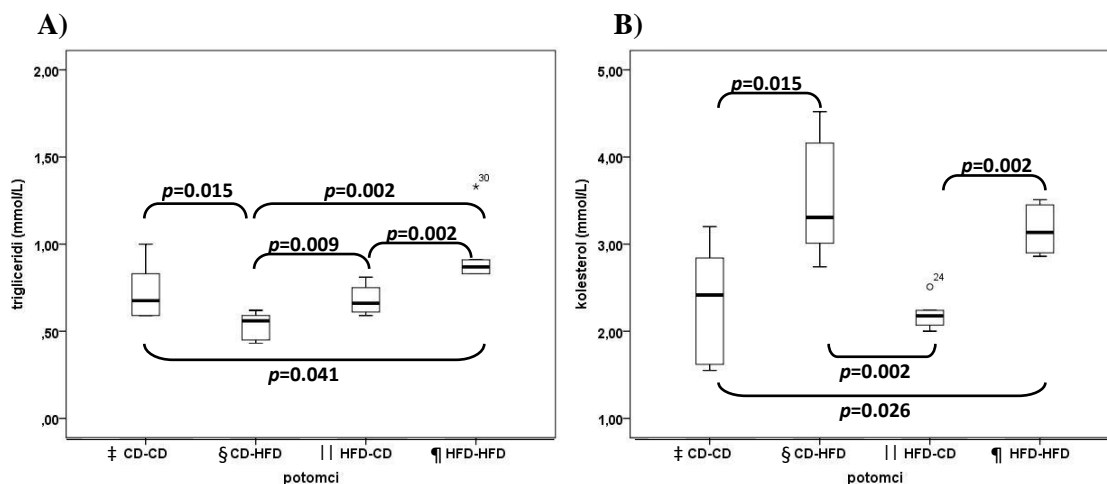
\*CD – standardna laboratorijska hrana, †HFD – hrana bogata zasićenim masnim kiselinama.

#### 5.4.2. Trigliceridi i kolesterol u svim skupinama potomaka

Razine triglicerida razlikovale su se među skupinama potomaka ( $P = 0.001$ ). Najviša razina triglicerida izmjerena je u HFD-HFD skupini ( $Me = 0.87 [0.83-1.01]$ ) dok je u potomaka CD majki, koji su bili izloženi HFD hrani (CD-HFD skupina), izmjerena najniža razina triglicerida ( $Me = 0.56 [0.44-0.59]$ ). *Post hoc* analiza pokazala je značajne razlike između HFD-HFD i CD-HFD te HFD-CD skupine ( $P = 0.002$  u oba slučaja) (Slika 5.9.).

Značajno povećana razina kolesterola u potomaka bila je u CD-HFD skupini ( $Me = 3.30 [2.94-4.25]$ ). Statistički značajna razlika bila je između HFD-CD skupine i CD-HFD te HFD-HFD skupine ( $P = 0.002$  u oba slučaja) (Slika 5.9.).

Izmjerene vrijednosti kolesterola unutar skupina potomaka prikazale su veću varijabilnost unutar uzorka naspram rezultata razine triglicerida. Iznimka su vrijednosti kolesterola u HFD-CD skupini unutar koje je rezultat koherentan (Slika 5.9.).



**Slika 5.9. Grafički prikaz razine A) triglicerida (mmol/l) i B) kolesterola (mmol/l) u svim skupinama potomaka**

Podatci su prikazani koristeći Whiskers bar grafikone. Razlike među grupama testirane su Mann-Whitney U testom, razina statističke značajnosti određena je za vrijednosti  $P < 0.05$ .

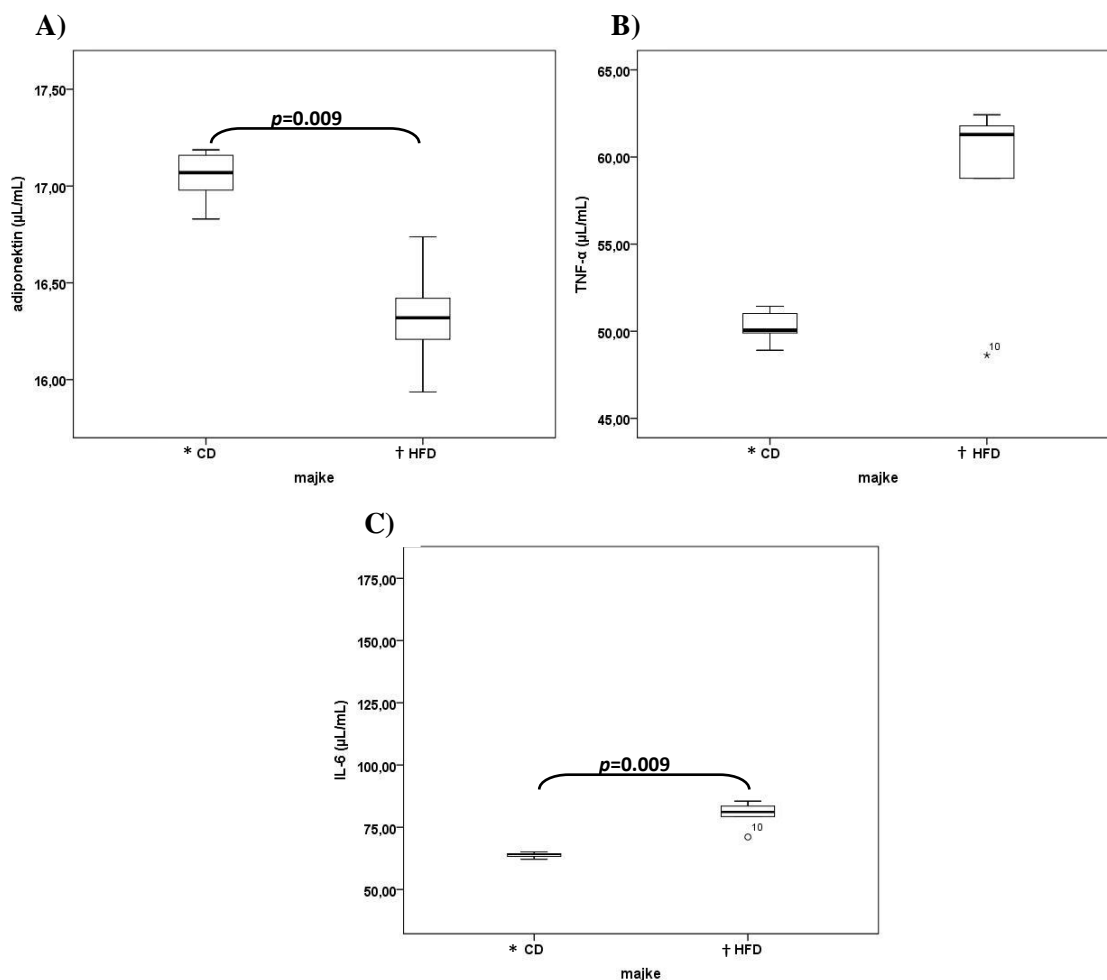
‡CD-CD (standardno hranjeni potomci od standardno hranjenih majki), §CD-HFD (standardno hranjeni potomci od masno hranjenih majki), ||HFD-CD (masno hranjeni potomci od standardno hranjenih majki) i ¶HFD-HFD (masno hranjeni potomci od masno hranjenih majki).

## 5.5. Razina cirkulirajućih adipokina

Gledajući općenito, povišene razine proupalnih adipokina TNF- $\alpha$  i IL-6 izmjerene su u skupini majki hranjenih povećanim udjelom zasićenih masti (HFD skupina) te njihovih potomaka koji su hranjeni istim dijetalnim režimom (HFD-HFD).

### 5.5.1. Adiponektin, TNF- $\alpha$ i IL-6 u obje skupine majki

Statistički značajno niža razina adiponektina izmjerena je u HFD skupini majki (Me=16.32[16.07-16.57],  $P=0.009$ ) (Slika 5.10. A) dok je u istoj skupini izmjerena povišena razina TNF- $\alpha$  i IL-6, no statistički značajna razlika uočena je u izmjerenim vrijednostima IL-6 (Me=81.14[75.18-84.48],  $P=0.009$ ) (Slika 5.10. C).



**Slika 5.10. Grafički prikaz razine A) adiponektina (mmol/l), B) TNF- $\alpha$  (mmol/l) i C) IL-6 (mmol/l) u obje skupine majki**

Podatci su prikazani koristeći Whiskers bar grafikone. Razlike među grupama testirane su Mann-Whitney U testom, razina statističke značajnosti određena je za vrijednosti  $P < 0.05$ .

\*CD – standardna laboratorijska hrana, †HFD – hrana bogata zasićenim masnim kiselinama.

### 5.5.1. Adiponektin, TNF- $\alpha$ i IL-6 u svim skupinama potomaka

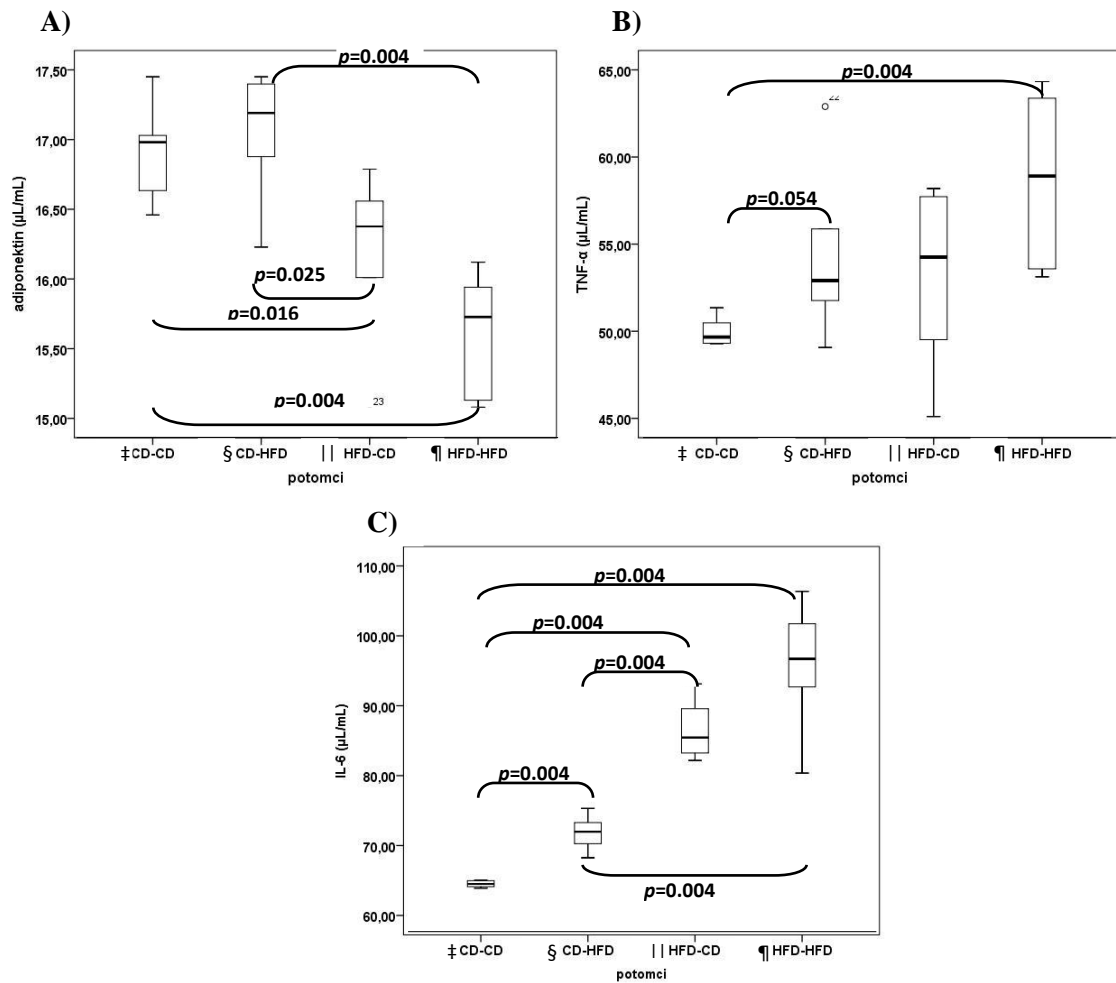
Kruskal-Wallisovim testom uočena je statistička značajna razlika među skupinama potomaka, naizraženije u vrijednostima adiponektina i IL-6 ( $P = 0.001$ ), dok je  $P = 0.024$  iznosio za vrijednosti TNF- $\alpha$ .

Statistički značajne razlike uočene su u izmjerenim razinama adiponektina između pojedinih skupina potomaka, posebice između HFD-HFD skupine s CD-CD, odnosno CD-HFD skupinom ( $P = 0.004$ ). Naime, najniže razine izmjerene su u HFD-HFD skupini

(Me=15.73[15.08-16.12] dok su najviše mjerene u CD-CD skupini (Me=16.98[16.46-17.45]) (Slika 5.11.A).

Najviše koncentracije TNF- $\alpha$  i IL-6 izmjerene su u HFD-HFD potomaka (Me=58.89[53.46-63.61] za TNF- $\alpha$ , odnosno Me=96.71[80.36-106.36] za IL-6). Značajna statistička razlika za vrijednosti TNF- $\alpha$  bila je između CD-CD i HFD-HFD potomaka ( $P=0.004$ ) te potomaka majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom (CD-CD i CD-HFD,  $P=0.054$ ) (Slika 5.11.B). Vrijednosti IL-6 značajno su se razlikovale između skupina CD-HFD i svih ostalih skupina potomaka ( $P=0.004$ ) (Slika 5.11.C).

Najizraženija varijabilnost vrijednosti adiponektina i IL-6 zabilježena je u HFD-HFD skupini (Me=15.73[15.08-16.12] za adiponektin, Me=96.71[80.36-106.36] za IL-6), dok je koherentnost vrijednosti uočena u CD-CD skupini za vrijednosti TNF- $\alpha$  (49.66[49.31-50.69]) i IL-6 (64.51[63.89-65.03]).



**Slika 5.11. Grafički prikaz razine A) adiponektina (mmol/l), B) TNF- $\alpha$  (mmol/l) i C) IL-6 (mmol/l) u svim skupinama potomaka**

Podatci su prikazani koristeći Whiskers bar grafikone. Razlike među grupama testirane su Mann-Whitney U testom, razina statističke značajnosti određena je za vrijednosti  $P < 0.05$ .

‡CD-CD (standardno hranjeni potomci od standardno hranjenih majki), §CD-HFD (standardno hranjeni potomci od masno hranjenih majki), ||HFD-CD (masno hranjeni potomci od standardno hranjenih majki) i ¶HFD-HFD (masno hranjeni potomci od masno hranjenih majki).

## 6. RASPRAVA

Opće je poznato da pretilost narušava funkcioniranje organizma u cijelosti. Hipotalamus, hipofiza i/ili jajnici mogu biti zahvaćeni zbog manjkave prehrane. Intervencije u načinu života i smanjenje tjelesne mase ne samo da poboljšavaju sastav tijela i smanjuju inzulinsku rezistenciju nego također utječu i na reproduktivni fenotip (103).

Ovo istraživanje temeljilo se isključivo na ženskim jedinkama zbog specifičnih sklonosti različitim bolestima muškog i ženskog spola. Primjerice, autoimuni poremećaji učestaliji su u ženskog spola dok je muški skloniji razvoju kardiovaskularnih i infektivnih bolesti (104, 105). Postoje također spolne razlike i u odgovoru HPA osovine na stresne čimbenike; razine glukokortikoida značajno su veće kod ženskog spola nego kod muškog (106). Osim toga, reprodukcija zahtijeva mnogo veću potrošnju energije kod ženskih jedinki nego kod muških. Prehranjivanje potomaka tijekom trudnoće i laktacije te njihov kasnija skrb do odrasle dobi uzrokuje najveći utrošak energije kakvu će ženski sisavac imati tijekom svoga životnog vijeka. Smatra se da je ženski spolni sustav zbog toga skloniji vanjskim utjecajima i stresu nego muški. U kontekstu rada proučavao se utjecaj okolnih čimbenika na koje je spolni sustav iznimno osjetljiv (107). Sukladno svemu navedenom, a zbog relevantnijih rezultata i njihova detaljnijeg pojašnjenja, u ovom istraživanju isključivo se razmatralo djelovanje povećanog unosa zasićenih masti na majke i ženske potomke.

### *Uspješnost skotnosti i preživljavanje potomaka CD i HFD skupine majki*

Rezultati su pokazali da je uspješnost skotnosti u HFD majki bila značajno niža, uspoređujući s kontrolnom skupinom. Nadalje, HFD majke su imale više tegoba u iznošenju zdravih potomaka tijekom perinatalnog perioda, odnosno uočeno je da su potomci HFD majki u većoj mjeri umirali tijekom prva tri dana života što je u skladu s rezultatima prethodnih istraživanja (108). Neuspjeh HFD majki da provedu očekivani metabolički prijenos od trudnoće do laktacije mogao bi djelomično objasniti navedene poteškoće u reprodukciji. Iako uzrok te povezanosti nije u potpunosti razjašnjen, jedno je moguće objašnjenje da smetnje u podjeli makronutritijenata, kao što je pretilost, vode k energetske inhibiciji reprodukcije (109). Nadalje, poznato je da kronične bolesti i kronična upalna stanja značajno mogu utjecati na visoko negativan evolutivni probir. Kronične upalne bolesti mogu voditi k smanjenju reproduktivnog potencijala budući da oboljele jedinke time imaju veliki nedostatak. Shodno

ranije objašnjenom konceptu pretilosti kao kronične upale, može se smatrati da trajna upala može inhibirati hipotalamično-hipofizno-gonadalnu os, vodeći k poteškoćama plodnosti. Navedeno je dokazano u nekolicini istraživanja koja su proučavala utjecaj kroničnih upalnih bolesti na plodnost unatoč dobroj medicinskoj kontroli stanja bolesti (110). U ovom istraživanju su uočene povišene vrijednosti proupalnih citokina u HFD majki što bi moglo imati negativan utjecaj na razvoj hipotalamično-hipofizno-gonadalne osi potomka. Uzrok velike perinatalne smrtnosti nije u potpunosti jasan, ali moglo bi uključivati biološke i bihevioralne komponente. Moguće je da potomci HFD majki nisu u mogućnosti unositi dovoljne količine njihova energetski jakog mlijeka ili metabolizirati dugolančane masne kiseline kojima obiluje to mlijeko. Utjecaj navedenih razlika u sastavu mlijeka na rast potomaka još nije potvrđen (111). Ograničenje u razmatranju navedenih objašnjenja je u činjenici da tijekom istraživanja nije uziman uzorak i razmatran sastav majčinog mlijeka. Moguće je objašnjenje i da potomci nisu u mogućnosti poticati odgovarajući majčinski odgovor budući da HFD majke nemaju izraženu odgovarajuću skrb za potomke. Naime, poznato je da je ponašanje majki štakorica hranjenih hranom sa zasićenim masnim kiselinama abnormalno što vodi do veće učestalosti kanibalizma potomaka (112). Potonje je objašnjeno povećanim stresom majki tijekom hranjenja takvom vrstom hrane (113), neodgovarajućim razvojem potomka (114), te promjenama na hipotalamusu majke uzrokovanim pretilošću (115). Navedeno bi se sitražilo konkretnijom bihevioralnom analizom majki i potomaka, u smislu 24-satnog nadzora skrbi nad potomcima. Na temelju navedenog bi se dokazala pretpostavka da kvaliteta prehrane majke tijekom skotnosti i laktacije ima izravan utjecaj na skrb majke o potomku.

#### *Promjene u reproduktivnom ciklusu potomaka masno hranjenih majki*

U radu se istraživao i utjecaj majčine prehrane te prehrane potomaka na citološke promjene u brisevima rodnice ženskih potomaka. Općenito, citološki brisevi rodnica svih potomaka majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom bili su uredni dok su citološki brisevi rodnica svih potomaka majki hranjenih masnom hranom pokazali nepravilne izmjene faza reproduktivnog ciklusa i/ili produljenu fazu diestrusa. Ovo je prvo istraživanje na štakorima kojim se dokazuje promjena citološkog nalaza u drugoj generaciji ženskih potomaka, a koje je izravna posljedica tipa promjene prehrane. Utjecaj majčine prehrane na kvalitetu spolnog ciklusa potomaka mogao bi se objasniti utjecajem stresnih stimulusa na os

hipotalamus-hipofiza-jajnik. U narednim studijama potrebno je ispitati koncentracije stresnih faktora u majki i potomaka (npr. dnevne oscilacije kortizola) kao i koncentracije spolnih hormona u pojedinima fazama reproduktivnog ciklusa. Budući da su HFD-CD potomci bili naviknuti na veći kalorijski priljev tijekom intrauterinog razdoblja i perioda laktacije, kasniji prijelaz na standardnu laboratorijsku hranu predstavljao je toj skupini prehrabena ograničenja što je predstavljalo svojevrsan stres za jedinku. To se podudara s prijašnjim istraživanjem Schaffer i sur. koji su otkrili da ograničenja hrane mogu rezultirati trajnim promjenama hipotalamus-hipofiza-jajnik osi (HPA os) i imati negativan utjecaj na razvoj jajnika kod ploda (116), a posebice značajni utjecaj ima „hormon stresa“ – glukokortikoid (117). Isto istraživanje pokazalo je i da su ženski potomci, koji su bili pod utjecajem ograničenja hrane tijekom ranog razvoja, imali značajno smanjenje fertilitnosti.

Navedeni rezultati naglašavaju značaj majčine prehrane u regulaciji spolnog ciklusa u potomaka. Sukladno ranije navedenoj teoriji da spolni hormoni imaju važnu ulogu u regulaciji nakupljanja masnog tkiva, rezultati upućuju na to da je prevladavajući hormonalni okoliš ključan u regionalnoj rasprostranjenosti masnog tkiva u oba spola kao i patofiziološke reakcije u organizmu po tipu razvoja metaboličkog sindroma.

#### *Utjecaj hrane bogate zasićenim masnim kiselinama na tjelesnu masu i BMI majki i ženskih potomaka*

Ovo istraživanje je pokazalo statistički značajnu razliku vrijednosti tjelesne mase jedino između CD-CD i CD-HFD skupine potomaka, dok su približno slične vrijednosti tjelesne mase i BMI-a uočene u obje skupine majki i između preostalih skupina potomaka. Hrana bogata zasićenim masnim kiselinama (HFD) često se upotrebljava u istraživanjima utjecaja povećanog unosa hrane tijekom perinatalnog perioda. U ovom istraživanju korišten je poseban način prehrane skupina hranom bogatom zasićenim mastima (dvaput dnevno dostavljanje količine hrane koja zadovoljava dnevne potrebe jedinke u danom razdoblju razvoja) da bi se spriječila pretilost potaknuta prekomjernim unosom hrane te prikazala izmjena u razini lipida koja bi isključivo ovisila o sastavu hrane (118). Time se štakorima nije ograničio pristup hrani, samo se vršila kontrola nad količinom uzete hrane. Korištena hrana temeljila se na recepturi vođenoj svjetskim standardima i sukladno udjelima sastava u dosadašnjim istraživanjima. Naime, standardna laboratorijska hrana standardiziranog je sastava dok je hrana bogata zasićenim masnim kiselinama, koju je proizveo tehnolog u svrhu



ovog istraživanja, prilagođena tako da se od standardizirane hrane razlikuje isključivo u udjelima masti i time definiranim udjelima ostalih prehrambenih sastavnica.

Zbog toga je pretpostavljeno da promjene u razini triglicerida i kolesterola u serumu isključivo ovise o vrsti hrane. Danas je već općeprihvaćeno da je tinjajuća kronična sustavna upala u odsustvu ikakve sustavne ili lokalne infekcije, nazvana još i “sterilnom upalom”, povezana s prehranom bogatom kalorijama i povećanim rizikom inzulinske rezistencije i povezanih poremećaja (119). Brojna istraživanja dokazala su povišene koncentracije citokina lučenih od masnoga tkiva što predlaže ideju da upala može nastati od nakupine aktiviranih makrofaga koji okružuje povećane adipocite u pretilih pojedinaca (44), posebice u nakupinama visceralnog masnog tkiva (120). Jasan pokazatelj navedenog su i primjeri u kojima postoje limiti za korištenje indeksa tjelesne mase; Ruderman i sur. predstavili su koncept „metabolički pretilih normalno teških pojedinaca” (engl. *metabolically obese, normal-weight subject* – MONW) (121) koji imaju normalan BMI, no pate od metaboličkih komplikacija koje se najčešće nalaze kod pretilih osoba. Nasuprot tome, skupina istraživača opisala je i tzv. „metabolički zdrave pretile pojedince” (engl. *metabolically healthy obese* – MHO) čiji je indeks tjelesne mase veći od 30 kg/m<sup>2</sup>, no kod kojih ne postoji razvijena inzulinska rezistencija ili dislipidemija (122). Sukladno navedenom uočeno je da je ključni čimbenik u razvoju metaboličkih komplikacija između MONW i MHO pojedinaca postojanje viška visceralnog masnog tkiva – većina MONW pojedinaca s relativno niskim BMI-om ima značajno veći udio visceralnog masnog tkiva dok mnogi MHO pojedinci s visokim BMI-om imaju mnogo manje visceralnog masnog tkiva (121). U ovom istraživanju BMI se među skupinama nije razlikovao što može biti objašnjeno i činjenicom da je BMI izračunat na temelju jednog mjerenja. Gledajući općenito, BMI muškaraca, kao i žena, raste tijekom života. Zbog toga je moguće da mjerenje i računanje u jednom navratu nije odgovarajući pokazatelj za cjeloživotni BMI te bi mogao prikazati slabu procjenu za dugotrajne utjecaje BMI-a na reproduktivnu fiziologiju. Nadalje, nepostojanje značajne razlike između BMI među skupinama, a postojanje značajnih razlika u razinama lipida i adipokina, govori u prilog mjerenju opsega struka kao značajnijeg pretkazatelja metaboličkih promjena u jedinki. Na temelju saznanja iz ovog istraživanja preporučljivo je da se u narednim studijama prednost da izračunu WHR omjera. Navedeni zaključci jasno upućuju na to da korištenjem samo BMI-a ne možemo pouzdano odrediti koja osoba ima prevagu visceralnog masnog tkiva i općenito nakupljanja masti na neodgovarajućim mjestima u organizmu te da jednostavno mjerenje

opsega struka i određivanje razine cirkulirajućih triglicerida može biti korisno za određivanje skupine pretilih pacijenta sklonih kardiometaboličkom riziku.

### *Utjecaj hrane bogate zasićenim masnim kiselinama na razinu cirkulirajućih lipida majki i ženskih potomaka*

U ovom istraživanju pokazano je da hrana bogata zasićenim masnim kiselinama povećava razinu triglicerida i kolesterola u HFD majki te u HFD-HFD i CD-HFD potomaka. Nadalje, izmjene vrste prehrane rezultirale su promjenama spolnog ciklusa, nepravilnim izmjenama faza ciklusa i produljenjem faze diestrusa. Navedeni rezultati predlažu da hrana bogata mastima povećava razine majčinih triglicerida i kolesterola te da je ta dodatna energija vjerojatno prenesena potomcima tijekom laktacije. Knopp i sur. otkrili su da je prva faza metabolizma masnog tkiva okarakterizirana povećanjem unosa hrane, povećanjem razina inzulina u plazmi i povećanjem jetrenog pretvaranja glukoze u masne kiseline (123). Franco i sur. pokazali su da povećana koncentracija masti i proteina u majčinu mlijeku potiče rani prekomjerni unos hrane u potomaka i da, osim skladištenja energije u obliku masti, ti potomci imaju i veće rezerve glikogena te hiperglikemiju koja bi mogla biti rezultat povećane glukoneogeneze (124). Serumske koncentracije triglicerida bile su najveće u HFD-HFD skupini, a najniže u CD-HFD skupini što upućuje na to da su potomci programirani da budu manje skloni škodljivom utjecaju masne hrane u odrasloj dobi zbog intrauterinog okruženja unosom hrane bogate mastima. Osim toga majka je tijekom laktacijskog perioda preko mlijeka predala povećanu nutritivsku bilancu potomku koji počinje skladištiti suvišak energije u obliku masti i glikogena. Zbog opširnijeg uvida u potencijalni razvoj hiperglikemije i eventulane inzulinske rezistencije u majki i potomaka u sklopu ovog istraživanja bilo je preporučljivo provesti i određivanje razine glukoze i inzulina u serumu štakora, što se zbog tehničkih okolnosti nije moglo realizirati. Time bi se evidentirala postojanost metaboličkog sindroma jedinke.

Navedeni rezultati potvrđuju rezultate prethodnih istraživanja koji su prikazali povećane razine cirkulirajućih lipida u krvi posljedično povećanom unosu zasićenih masnih kiselina (92). Majke hranjene masnom hranom (HFD skupina) kao i obje skupine potomaka hranjenih masnom hranom (CD-HFD i HFD-HFD) imali su značajno povišene vrijednosti serumskog kolesterola uspoređujući s potomcima hranjenih zdravom hranom. Zanimljivo je da su potomci HFD majki, koji su bili izloženi HFD prehrani, imali manje razine kolesterola od

potomaka CD majki hranjenih masnom hranom. Ti rezultati potvrđuju hipotezu „štedljivog fenotipa“ koja pretpostavlja dugotrajnu fiziološku adaptaciju fetusa kao odgovor na okolišne promjene tijekom intrauterinog života, uključujući i metaboličke promjene majke kao pripremu za njihovu očekivani okoliš u odrasloj dobi (93). Oni koji su primili odgovarajuću pripremu od majke bolje će se prilagoditi hranidbenoj okolini u odrasloj dobi, neovisno o vrsti prehrane koju uzima (što se uočava u CD-CD i/ili HFD-HFD skupinama). To je i nadalje podržano istraživanjima koji su prikazali da populacija, koja nije bila izložena zapadnjačkom stilu prehrane tijekom prošlosti, ima veću mogućnost razvoja metaboličkog sindroma (94). No prethodno navedeno do danas se većinom objašnjavalo genetski uvjetovanom sposobnošću za razvojem pretilosti i pridruženih bolesti ili alternativno ubrzanim promjenama životnog stila, no ne i genetskim programiranjem tijekom intrauterinog života (95). To posljednje objašnjenje nekada se priklanja hipotezi „štedljivog fenotipa“ da bi se istaknula razlika s hipotezom „štedljivog genotipa“ (96).

Povećane koncentracije medijatora upale mogu dosegnuti jetru portalnim krvotokom i utjecati na lokalnu proizvodnju citokina što mijenja jetreni lipidni metabolizam, uzrokuje nastanak steatoze te povećano otpuštanje triglicerida u krvotok (125). Postnatalna koncentracija leptina ima važnu ulogu u nastanku hipotalamičkih veza i regulatornih sustava za unos hrane. Te su koncentracije kod potomaka pretilih majki više nego u kontrolnim skupinama i to dovodi do postavljanja regulacijske točke za unos hrane u hipotalamusu na višu razinu.

#### *Utjecaj hrane bogate zasićenim masnim kiselinama na razinu cirkulirajućih adipokina majki i ženskih potomaka*

Rezultati rada prikazali su najniže koncentracije adiponektina u HFD skupini majki, odnosno HFD-HFD skupini potomaka. Nije bilo statistički značajne razlike između CD-CD i CD-HFD potomaka, no dobivena je statistički značajna razlika između HFD-CD i navedenih skupina potomaka. Naime, snižene koncentracije adiponektina, odnosno povišene koncentracije IL-6 i TNF- $\alpha$  u HFD majki i HFD-HFD potomaka potvrđuju teoriju tihe atoregene upale u organizmu jedinke koja potiče povećano lučenje proupalnih citokina, a potiskuje stvaranje protuupalnog adiponektina. Zanimljiv je podatak o statistički značajno većoj koncentraciji IL-6 i TNF- $\alpha$  u HFD-CD skupini potomaka, odnosno o značajno manjoj koncentraciji adiponektina u navedenoj skupini, za razliku od druge skupine potomaka u kojoj je započet različit tip ishrane od majčine (CD-HFD) što bi se moglo objasniti epigenetskim

mehanizmima prijenosa upalne reakcije i poticanja upalnog stanja s majke na potomke. Proupalni citokini povišeni su u pretilih trudnica i smatra se da su oni potencijalni medijatori metaboličkog utiska. Fetalno izlaganje povišenim razinama proupalnih citokina izravno utječe na razvoj neurona za regulaciju energetske unosa što se može potvrditi i ovim istraživanjem. Još jedan uzrok razvoja i održavanja upalnog stadija organizma je hipoksija koja nastaje u bijelom masnom tkivu zbog nastanka fibroze (126) te se time potiče lučenje proupalnih citokina IL-6 i TNF- $\alpha$ , a smanjeno je lučenje adiponektina (127).

Već ranije navedene različitosti u dobivenim rezultatima mjerenja adiponektina u pretilih bolesnica s narušenom reproduktivnom osi ne nude pouzdan odgovor na mehanizam djelovanja adiponektina u navedenoj patofiziologiji ženskog spola. Moguće je da je potrebna bolja metodološka postavka istraživanja i određivanja koncentracije cirkulirajućeg adipokina, odnosno specifičnija analitička potvrda adiponektina. Genska ekspresija adiponektina ne razlikuje se u pretilih ni u nepretim skupina oboljelih žena od vodećeg endokrinog reproduktivnog poremećaja (PCOS), no izražene su obje vrste adiponektinog receptora i u subkutanom i visceralnom masnom tkivu, za razliku od leptina čija je ekspresija mnogo izraženija u subkutanom masnom tkivu (80). Osim toga, adiponektinski receptori u znatnoj su mjeri regulirani spolnim hormonima, što upućuje i na važnu poveznicu između spolnih hormona i funkcioniranja masnog tkiva (79). Zbog navedenog blagotvornog učinka adiponektina na ženski spolni sustav, on bi bio idealno sredstvo u liječenju brojnih upalnih stanja organizma te narušenog reproduktivnog statusa jedinke. Na žalost, uporaba adiponektina i njegovih receptora kao mete u liječenju dosta je komplicirana zbog postojanja različitih izoformi samog adiponektina te mnogobrojnih receptora s raznovrsnim pretpostavkama za adiponektinske izoforme kao i za brojne specifične utjecaje na različite organe.

#### *Šire implikacije istraživanja endokrinog utjecaja masnog tkiva na reproduktivni ciklus*

Rezultati ovog istraživanja prikazani na skupinama potomaka u skladu su s ranije opisanom hipotezom štedljivog fenotipa koja je tijekom prošlosti i otežanim pristupom hrani predstavljala mehanizam za preživljavanje. Budući da je danas pristup hrani, posebice zapadnjačkoj hrani bogatoj zasićenim mastima, većinom lako dostupan, one jedinke koje posjeduju „štedljivi gen“ koji bi im nekoć olakšao preživljavanje sada predstavlja nedostatak.

Masno tkivo treba promatrati kao aktivan endokrini organ. Na temelju navedenoga, prikazujući kompleksnost proinflatarnog signaliziranja adipokina u ovom radu i dosadašnjim istraživanjima, vrlo je vjerojatno da kombinacija više stimulansa, u odnosu na pojedinačni adipokin, utječe na povećano upalno stanje organizma. Time se predisponira razvoj poremećaja metabolizma i reprodukcije. Ovo istraživanje na animalnom modelu potiče svjesnost o endokrinoj aktivnosti masnog tkiva, te njegovu utjecaju na reprodukciju. Zaključci se mogu djelomično translirati na čovjeka, jer nažalost ovakav model istraživanja nije u potpunosti moguće primjeniti na humanom modelu. Primjerice, uočeno je da kod ženskoga spola sindrom policističnih jajnika i posljedični hiperandrogenizam vode k abdominalnoj pretilosti i hiperinzulinemiji (128). Nasuprot tome, današnji podaci predlažu da gubitak na tjelesnoj masi čini jeftin i siguran način da se poboljša metabolički i reproduktivni profil u pretilih žena s poremećajima reprodukcije (npr. PCOS). Brojna su istraživanja pokazala da već pri smanjenju 5 do 10% tjelesne mase može biti dovoljno da se potakne endokrina funkcija, ovulacija te najvjerojatnije i mogućnost zatrudnjivanja takvih žena. Navedeno je najvjerojatnije povezano s činjenicom da 5 do 10% smanjenja tjelesne mase čini 30% gubitka na visceralnom masnom tkivu (129), a time i smanjenje lučenja proupalnih citokina te njihova nepovoljnog metaboličkog utjecaja na cijeli organizam. Početno djelovanje koje se može primijeniti je da, uz već poznato izračunavanje indeksa tjelesne mase, rutinski postane i računanje opsega struka te određivanje razine cirkulirajućih triglicerida. Potrebno je povećati svijest o utjecaju pretilosti diljem svijeta, razumjeti čimbenike koji vode ka kroničnim bolestima pretilih pacijenata te poticati individualne programe za smanjenje visceralnog masnog tkiva.

Unatoč tome, potrebna su daljnja istraživanja da bi se potvrdili patofiziološki procesi kojima metabolizam masnoga tkiva može utjecati na spolne funkcije, a time i buduće mete za liječenje navedenih poremećaja.

## 7. ZAKLJUČAK

1. značajno je manja uspješnost skotnosti u majki hranjenih povećanim udjelom zasićenih masnih kiselina, uspoređujući s kontrolnom skupinom
2. majke hranjene hranom koje obiluju zasićenim masnim kiselinama imale su više tegoba u iznošenju zdravih potomaka tijekom perinatalnog perioda
3. reproduktivni ciklus praćen citološkim analizom je uredan u svih potomaka majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom, dok su svi potomci majki hranjenih masnom hranom pokazali nepravilne izmjene faza reproduktivnog ciklusa i/ili produljenu fazu diestrusa
4. približno slične vrijednosti tjelesne mase i BMI-a uočene u obje skupine majki i između preostalih skupina potomaka, dok je značajna razlika vrijednosti tjelesne mase uočena jedino između CD-CD i CD-HFD skupine potomaka
5. hrana bogata zasićenim masnim kiselinama povećava razinu triglicerida i kolesterola u HFD majki te u HFD-HFD i CD-HFD potomaka
6. snižene koncentracije adiponektina, odnosno povišene koncentracije IL-6 i TNF- $\alpha$  u HFD majki i HFD-HFD potomaka potvrđuju teoriju tihe atoregene upale u organizmu jedinke

## 8. SAŽETAK

**Cilj:** Dosadašnja su istraživanja potvrdila da međugeneracijske promjene u načinu ishrane mogu značajno utjecati na fiziologiju reprodukcije. Cilj ovog istraživanja bio je istražiti utjecaje majčine ishrane i ishrane potomaka na morfologiju vaginalnog brisa, sastava cirkulirajućih lipida te adipokina u majki i potomaka.

**Materijali i metode:** Deset štakorica ženskog spola nasumično je podijeljeno u dvije skupine – prva je hranjena velikim udjelom zasićenih masnih kiselina (HFD), a druga standardnom laboratorijskom hranom (CD). Nakon razdoblja skotnosti i laktacije njihovi su potomci dalje podijeljeni u dvije podskupine hranjene s HFD ili CD hranom, čime se stvaraju četiri skupine potomaka: a) CD-CD, b) CD-HFD, c) HFD-CD i d) HFD-HFD. Majkama u dobi od 37 tjedana te potomcima u dobi od 18 tjedana uzet je uzorak venske krvi, učinjena je biokemijska analiza triglicerida i kolesterola, adiponektina, IL-6 i TNF- $\alpha$  te je učinjena i citološka obrada vaginalnih brisova. Određivana je i njihova tjelesna masa te izračunat indeks tjelesne mase.

**Rezultati:** U HFD-HFD skupini potomaka mjerene su najviše vrijednosti triglicerida, a u CD-HFD skupini najniže vrijednosti kolesterola. Značajno veće koncentracije IL-6 i TNF- $\alpha$ , a najniže vrijednosti adiponektina uočene su u HFD-HFD i HFD-CD potomaka. Razine triglicerida i kolesterola također su se značajno razlikovale unutar skupina ( $P=0.001$ , odnosno  $P=0.002$ ). Analiza vaginalnih citoloških brisova pokazala je nepravilnu izmjenu etapa ciklusa ili produljenu diestrus etapu kod potomaka masno hranjenih majki.

**Zaključak:** Majčina prehrana zasićenim masnim kiselinama značajan je pretkazatelj povećanog rizika za razvoj metaboličkih promjena kod potomaka kao i promjena u reproduktivnom ciklusu.

**Ključne riječi:** adipokini, epigenetika, estrus, masna prehrana, potomstvo

## 9. SUMMARY

### EFFECTS OF BETWEEN GENERATIONS CHANGES IN NUTRITION TYPE ON REPRODUCTIVE CYCLE IN FEMALE SPRAGUE DAWLEY RAT

**Objective:** Previous studies established that between generations changes in feeding protocol can have significant impact on reproductive physiology. The aim of the study was to determinate effects of mothers` nutrition and nutrition of the offspring on the characteristics of vaginal smear and serum lipid and adipokine content.

**Methods:** Ten female rats were randomly divided in two groups, first group fed with food containing high content of saturated fatty acids (HFD) and the second with standard laboratory chow (CD). After coupling and lactation period their offspring were further randomly divided into two subgroups fed HFD or CD forming four study groups: a) CD-CD, b) CD-HFD, c) HFD-CD and d) HFD-HFD. The dams and offspring at the age of 37 and 18 weeks, respectively, were subjected to biochemical analysis of the blood triglyceride, cholesterol, adiponectin, IL-6 and TNF- $\alpha$  levels, as well as cytological analysis of the vaginal smears. Additionally body weight was recorded and BMI calculated.

**Results:** HFD-HFD group presented with highest levels of triglycerides and the CD-HFD with the highest levels of cholesterol. Significantly higher concentrations of IL-6 and TNF- $\alpha$  were observed in HFD-HFD and HFD-CD groups, as well as low adiponectin level. Therefore triglyceride and cholesterol levels were significantly different among the groups ( $P=0.001$  and  $P=0.002$ , respectively). Vaginal cytological smears analysis showed features of irregular phase interchanges or extended estrous phase in offspring of high fat fed dams.

**Conclusion:** Maternal HFD consumption predisposes offspring to increased risk of developing metabolic abnormalities and estrous disorders.

**Key words:** Adipokines, Epigenetics, Estrous, High Fat Diet, Offspring



## 10. LITERATURA

1. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *The Lancet*. 2011;377(9765):557-67.
2. Jung RT. Obesity as a disease. *British medical bulletin*. 1997;53(2):307-21.
3. Chan RS, Woo J. Prevention of overweight and obesity: how effective is the current public health approach. *Int J Environ Res Public Health*. 2010;7(3):765-83.
4. OECD. OBESITY Update. [www.oecd.org/els/health-systems/](http://www.oecd.org/els/health-systems/). 2014.
5. Vague J. La différenciation sexuelle; facteur déterminant des formes de l'obésité. *La Presse medicale*. 1947;55(30):339.
6. Lewis GH. Never Satisfied: A Cultural History of Diets, Fantasies, and Fat. Hillel Schwartz. *American Journal of Sociology*. 1988;93(6):1522-4.
7. Carpenter KJ. A short history of nutritional science: part 1 (1785-1885). *The Journal of nutrition*. 2003;133(3):638-45.
8. Lapidus L, Bengtsson C, Larsson B, Pennert K, Rybo E, Sjöström L. Distribution of adipose tissue and risk of cardiovascular disease and death: a 12 year follow up of participants in the population study of women in Gothenburg, Sweden. *British Medical Journal (Clinical research ed)*. 1984;289(6454):1257-61.
9. Stevens GA, Singh GM, Lu Y, Danaei G, Lin JK, Finucane MM, et al. National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences. *Population Health Metrics*. 2012;10:22-.
10. Hrvatski znanstveno-statistički ljetopis za 2015. godinu [Internet]. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. 2016.
11. Keys A, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, Taylor HL. Indices of relative weight and obesity. *Journal of Chronic Diseases*. 1972;25(6):329-43.
12. Aronne LJ. Classification of obesity and assessment of obesity-related health risks. *Obes Res*. 2002;10(2):105S-15S.
13. Berrington de Gonzalez A, Hartge P, Cerhan JR, Flint AJ, Hannan L, MacInnis RJ, et al. Body-Mass Index and Mortality among 1.46 Million White Adults. *New Engl J Med*. 2010;363(23):2211-9.

14. Li M, Sloboda DM, Vickers MH. Maternal obesity and developmental programming of metabolic disorders in offspring: evidence from animal models. *Exp Diabetes Res.* 2011;592408(10):28.
15. Jeyakumar SM, Vajreswari A, Giridharan NV. Chronic dietary vitamin A supplementation regulates obesity in an obese mutant WNIN/Ob rat model. *Obesity (Silver Spring, Md).* 2006;14(1):52-9.
16. van Leeuwen BL, Kamps WA, Hartel RM, Veth RP, Sluiter WJ, Hoekstra HJ. Effect of single chemotherapeutic agents on the growing skeleton of the rat. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO.* 2000;11(9):1121-6.
17. Novelli EL, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, Mani F, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory animals.* 2007;41(1):111-9.
18. Wildman RP, Muntner P, Reynolds K, McGinn AP, Rajpathak S, Wylie-Rosett J, et al. The obese without cardiometabolic risk factor clustering and the normal weight with cardiometabolic risk factor clustering: prevalence and correlates of 2 phenotypes among the US population (NHANES 1999-2004). *Archives of internal medicine.* 2008;168(15):1617-24.
19. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 2000;21(6):697-738.
20. Blackburn P, Lemieux I, Lamarche B, Bergeron J, Perron P, Tremblay G, et al. Hypertriglyceridemic waist: a simple clinical phenotype associated with coronary artery disease in women. *Metabolism - Clinical and Experimental.* 61(1):56-64.
21. Yoshizumi T, Nakamura T, Yamane M, Waliul Islam AHM, Menju M, Yamasaki K, et al. Abdominal Fat: Standardized Technique for Measurement at CT. *Radiology.* 1999;211(1):283-6.
22. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *The Proceedings of the Nutrition Society.* 2001;60(3):329-39.
23. Ricquier D. Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure. *The Proceedings of the Nutrition Society.* 2005;64(1):47-52.
24. Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, Okamatsu-Ogura Y, Kameya T, Kawai Y, et al. Age-related decrease in cold-activated brown adipose tissue and accumulation of body fat in healthy humans. *Obesity (Silver Spring, Md).* 2011;19(9):1755-60.
25. Florez-Duquet M, Horwitz BA, McDonald RB. Cellular proliferation and UCP content in brown adipose tissue of cold-exposed aging Fischer 344 rats. *The American journal of physiology.* 1998;274(1 Pt 2):R196-203.

26. Nishio M, Yoneshiro T, Nakahara M, Suzuki S, Saeki K, Hasegawa M, et al. Production of functional classical brown adipocytes from human pluripotent stem cells using specific hemopoietin cocktail without gene transfer. *Cell metabolism*. 2012;16(3):394-406.
27. Vijgen GH, Bouvy ND, Teule GJ, Brans B, Schrauwen P, van Marken Lichtenbelt WD. Brown adipose tissue in morbidly obese subjects. *PloS one*. 2011;6(2):e17247.
28. Karpe F, Dickmann JR, Frayn KN. Fatty Acids, Obesity, and Insulin Resistance: Time for a Reevaluation. *Diabetes*. 2011;60(10):2441-9.
29. Giordano A, Smorlesi A, Frontini A, Barbatelli G, Cinti S. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *European Journal of Endocrinology*. 2014;170(5):R159-R71.
30. Morroni M, Giordano A, Zingaretti MC, Boiani R, De Matteis R, Kahn BB, et al. Reversible transdifferentiation of secretory epithelial cells into adipocytes in the mammary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(48):16801-6.
31. Shen W, Wang Z, Punyanita M, Lei J, Sinav A, Kral JG, et al. Adipose Tissue Quantification by Imaging Methods: A Proposed Classification. *Obesity research*. 2003;11(1):5-16.
32. Bjorntorp P. "Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex)*. 1990;10(4):493-6.
33. Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2010;11(1):11-8.
34. Fujioka S, Matsuzawa Y, Tokunaga K, Tarui S. Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. *Metabolism: clinical and experimental*. 1987;36(1):54-9.
35. Ross R, Aru J, Freeman J, Hudson R, Janssen I. Abdominal adiposity and insulin resistance in obese men. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2002;282(3):E657-63.
36. Jensen MD. Role of Body Fat Distribution and the Metabolic Complications of Obesity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93(11 Suppl 1):S57-S63.
37. Krotkiewski M, Björntorp P, Sjöström L, Smith U. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *Journal of Clinical Investigation*. 1983;72(3):1150-62.

38. Mattsson C, Olsson T. Estrogens and glucocorticoid hormones in adipose tissue metabolism. *Current medicinal chemistry*. 2007;14(27):2918-24.
39. Keller C, Larkey L, Distefano JK, Boehm-Smith E, Records K, Robillard A, et al. Perimenopausal obesity. *Journal of women's health* (2002). 2010;19(5):987-96.
40. Brown LM, Clegg DJ. Central effects of estradiol in the regulation of food intake, body weight, and adiposity. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2010;122(1-3):65-73.
41. Kershaw EE, Flier JS. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89(6):2548-56.
42. Calder PC, Ahluwalia N, Brouns F, Buetler T, Clement K, Cunningham K, et al. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *The British journal of nutrition*. 2011;106 Suppl 3:S5-78.
43. Strissel KJ, DeFuria J, Shaul ME, Bennett G, Greenberg AS, Obin MS. T-cell recruitment and Th1 polarization in adipose tissue during diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Obesity (Silver Spring, Md)*. 2010;18(10):1918-25.
44. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2001;280(5):E745-51.
45. Nishida M, Moriyama T, Ishii K, Takashima S, Yoshizaki K, Sugita Y, et al. Effects of IL-6, adiponectin, CRP and metabolic syndrome on subclinical atherosclerosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2007;384(1-2):99-104.
46. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010;316(2):129-39.
47. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(1):175-84.
48. Lynch L, Nowak M, Varghese B, Clark J, Hogan AE, Toxavidis V, et al. Adipose tissue invariant NKT cells protect against diet-induced obesity and metabolic disorder through regulatory cytokine production. *Immunity*. 2012;37(3):574-87.
49. Prieur X, Mok CY, Velagapudi VR, Nunez V, Fuentes L, Montaner D, et al. Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice. *Diabetes*. 2011;60(3):797-809.

50. Kosteli A, Sugaru E, Haemmerle G, Martin JF, Lei J, Zechner R, et al. Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J Clin Invest.* 2010;120(10):3466-79.
51. Lehr S, Hartwig S, Sell H. Adipokines: A treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *PROTEOMICS – Clinical Applications.* 2012;6(1-2):91-101.
52. Gualillo O, González-Juanatey JR, Lago F. The Emerging Role of Adipokines as Mediators of Cardiovascular Function: Physiologic and Clinical Perspectives. *Trends in Cardiovascular Medicine.* 17(8):275-83.
53. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A Novel Serum Protein Similar to C1q, Produced Exclusively in Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry.* 1995;270(45):26746-9.
54. Brochu-Gaudreau K, Rehfeldt C, Blouin R, Bordignon V, Murphy BD, Palin MF. Adiponectin action from head to toe. *Endocr.* 2010;37(1):11-32.
55. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, et al. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *The Journal of biological chemistry.* 2003;278(41):40352-63.
56. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the Release of Adipokines by Adipose Tissue, Adipose Tissue Matrix, and Adipocytes from Visceral and Subcutaneous Abdominal Adipose Tissues of Obese Humans. *Endocrinology.* 2004;145(5):2273-82.
57. Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeier HK, Arita Y, Hansen BC, et al. Circulating Concentrations of the Adipocyte Protein Adiponectin Are Decreased in Parallel With Reduced Insulin Sensitivity During the Progression to Type 2 Diabetes in Rhesus Monkeys. *Diabetes.* 2001;50(5):1126-33.
58. Diez J, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *European Journal of Endocrinology.* 2003;148(3):293-300.
59. Comim FV, Hardy K, Franks S. Adiponectin and its receptors in the ovary: further evidence for a link between obesity and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. *PloS one.* 2013;8(11):e80416.
60. Krentz AJ, von Muhlen D, Barrett-Connor E. Adipocytokines, sex hormones, and cardiovascular risk factors in postmenopausal women: factor analysis of the Rancho Bernardo

study. Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme. 2009;41(10):773-7.

61. Tschritter O, Fritsche A, Thamer C, Haap M, Shirkavand F, Rahe S, et al. Plasma Adiponectin Concentrations Predict Insulin Sensitivity of Both Glucose and Lipid Metabolism. *Diabetes*. 2003;52(2):239-43.

62. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science (New York, NY)*. 1993;259(5091):87-91.

63. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance 2001-05-01 00:00:00. E745-E51 p.

64. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1796-808.

65. de Luca C, Olefsky JM. Inflammation and Insulin Resistance. *FEBS letters*. 2008;582(1):97-105.

66. Ruan H, Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 14(5):447-55.

67. Ruan H, Miles PDG, Ladd CM, Ross K, Golub TR, Olefsky JM, et al. Profiling Gene Transcription In Vivo Reveals Adipose Tissue as an Immediate Target of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ : Implications for Insulin Resistance. *Diabetes*. 2002;51(11):3176-88.

68. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- $\alpha$ , in vivo. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1997;82(12):4196-200.

69. Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes*. 2007;56(4):1010-3.

70. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, et al. Suppressor of Cytokine Signaling-3 (SOCS-3), a Potential Mediator of Interleukin-6-dependent Insulin Resistance in Hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(16):13740-6.

71. Klover PJ, Clementi AH, Mooney RA. Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity. *Endocrinology*. 2005;146(8):3417-27.

72. Bastard J-P, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, et al. Elevated Levels of Interleukin 6 Are Reduced in Serum and Subcutaneous Adipose Tissue of Obese Women after Weight Loss. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000;85(9):3338-42.
73. Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z, Giudice LC. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr Rev*. 1999;20(4):535-82.
74. Brewer CJ, Balen AH. The adverse effects of obesity on conception and implantation. *Reproduction*. 2010;140(3):347-64.
75. Pasquali R, Pelusi C, Genghini S, Cacciari M, Gambineri A. Obesity and reproductive disorders in women. *Human Reproduction Update*. 2003;9(4):359-72.
76. Spritzer PM, Lecke SB, Satler F, Morsch DM. Adipose tissue dysfunction, adipokines, and low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome. *Reproduction*. 2015;149(5):R219-27.
77. Pasquali R. Obesity, fat distribution and infertility. *Maturitas*. 54(4):363-71.
78. Li S, Huang X, Zhong H, Peng Q, Chen S, Xie Y, et al. Low circulating adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome: an updated meta-analysis. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2014;35(5):3961-73.
79. Tan BK, Chen J, Digby JE, Keay SD, Kennedy CR, Randeve HS. Upregulation of adiponectin receptor 1 and 2 mRNA and protein in adipose tissue and adipocytes in insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome. *Diabetologia*. 2006;49(11):2723-8.
80. Lecke SB, Morsch D, Spritzer PM. Circulating levels and subcutaneous adipose tissue gene expression of pigment epithelium-derived factor in polycystic ovary syndrome and normal women: a case control study. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*. 2013;11:77-.
81. Kyrou I, Tsigos C. Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Current opinion in pharmacology*. 2009;9(6):787-93.
82. Kotelevtsev Y, Holmes MC, Burchell A, Houston PM, Schmoll D, Jamieson P, et al. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(26):14924-9.
83. Guo F, Jen KLC. High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. *Physiology & Behavior*. 1995;57(4):681-6.

84. Burdge GC, Hanson MA, Slater-Jefferies JL, Lillycrop KA. Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *The British journal of nutrition*. 2007;97(6):1036-46.
85. Steyn NP, Mann J, Bennett PH, Temple N, Zimmet P, Tuomilehto J, et al. Diet, nutrition and the prevention of type 2 diabetes. *Public health nutrition*. 2004;7(1a):147-65.
86. Lutz TA, Woods SC. Overview of Animal Models of Obesity. *Current protocols in pharmacology / editorial board, SJ Enna (editor-in-chief) [et al]*. 2012;CHAPTER:Unit5.61-Unit5.
87. Sullivan EL, Grove KL. Metabolic imprinting in obesity. *Forum Nutr*. 2010;63:186-94.
88. Rat Guide: A Layman's Guide to Health, Medication Use, Breeding, and Responsible Care of Pet Rats. *RatGuide.com*.2000.
89. Tilly JL. Ovarian follicle counts – not as simple as 1, 2, 3. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2003;1:11-.
90. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia*. 2002;62(4a):609-14.
91. Mandl AM. Cyclical changes in the vaginal smears of senils nulliparous and multiparous rats. *J Endocrinol*. 1961;22:257-68.
92. Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2007;80(2):84-97.
93. McLean AC, Valenzuela N, Fai S, Bennett SA. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *J Vis Exp*. 2012;15(67).
94. Suresh KP. An overview of randomization techniques: An unbiased assessment of outcome in clinical research. *Journal of Human Reproductive Sciences*. 2011;4(1):8-11.
95. Adeyemi KD, Sabow AB, Aghwan ZA, Ebrahimi M, Samsudin AA, Alimon AR, et al. Serum fatty acids, biochemical indices and antioxidant status in goats fed canola oil and palm oil blend. *J Anim Sci Technol*. 2016;58(6):016-0088.
96. Janssens S, Heemskerk MM, van den Berg SA, van Riel NA, Nicolay K, Willems van Dijk K, et al. Effects of low-stearate palm oil and high-stearate lard high-fat diets on rat liver lipid metabolism and glucose tolerance. *Nutr Metab*. 2015;12(57):015-0053.



97. Choi SH, Park SK, Choi CW, Li XZ, Kim KH, Kim WY, et al. The Expression of Adipogenic Genes in Adipose Tissues of Feedlot Steers Fed Supplementary Palm Oil or Soybean Oil. *Asian Australas J Anim Sci.* 2016;29(3):404-12.
98. Varlamov O. Western-style Diet, Sex Steroids and Metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2016;2(16):30143-0.
99. B. Anne Croy ATY, Francesco J. DeMayo, S. Lee Adamson. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy.* 1st ed. Amsterdam: Elsevier/AP; 2014.
100. Balog M, Mlinarevic D, Seric V, Miljanovic M, Blazekovic R, Degmecic IV, et al. Plasma Content of Glucose, C-reactive Protein, Uric Acid and Cholesterol in Male, Female and Ovariectomized Rats upon Acute and Chronic Stress--a Path for Development of Cardiovascular Diseases. *Collegium antropologicum.* 2015;39(2):385-92.
101. Akiyama S, Katsumata S, Suzuki K, Ishimi Y, Wu J, Uehara M. Dietary hesperidin exerts hypoglycemic and hypolipidemic effects in streptozotocin-induced marginal type 1 diabetic rats. *Journal of clinical biochemistry and nutrition.* 2010;46(1):87-92.
102. Peric Kacarevic Z, Snajder D, Maric A, Bijelic N, Cvijanovic O, Domitrovic R, et al. High-fat diet induced changes in lumbar vertebra of the male rat offsprings. *Acta histochemica.* 2016;118(7):711-21.
103. Maes HH, Neale MC, Eaves LJ. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behavior genetics.* 1997;27(4):325-51.
104. Fairweather D, Frisanco-Kiss S, Rose NR. Sex Differences in Autoimmune Disease from a Pathological Perspective. *The American Journal of Pathology.* 2008;173(3):600-9.
105. Maas A, Appelman YEA. Gender differences in coronary heart disease. *Netherlands Heart Journal.* 2010;18(12):598-602.
106. Kudielka BM, Kirschbaum C. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biological psychology.* 2005;69(1):113-32.
107. Martin GB, Rodger J, Blache D. Nutritional and environmental effects on reproduction in small ruminants. *Reproduction, fertility, and development.* 2004;16(4):491-501.
108. Connor KL, Vickers MH, Beltrand J, Meaney MJ, Sloboda DM. Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function. *The Journal of Physiology.* 2012;590(9):2167-80.
109. Glick Z, Yamini S, Lupien J, Sod-Moriah U. Estrous cycle irregularities in overfed rats. *Physiol Behav.* 1990;47(2):307-10.

110. Ostensen M, Almberg K, Koksvik HS. Sex, reproduction, and gynecological disease in young adults with a history of juvenile chronic arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2000;27(7):1783-7.
111. Rolls BA, Gurr MI, van Duijvenvoorde PM, Rolls BJ, Rowe EA. Lactation in lean and obese rats: effect of cafeteria feeding and of dietary obesity on milk composition. *Physiol Behav*. 1986;38(2):185-90.
112. Rolls BJ, Rowe EA. Pregnancy and lactation in the obese rat: effects on maternal and pup weights. *Physiol Behav*. 1982;28(3):393-400.
113. DeSantis DT, Schmaltz LW. The mother-litter relationship in developmental rat studies: cannibalism vs caring. *Developmental psychobiology*. 1984;17(3):255-62.
114. Reynolds RD. Preventing maternal cannibalism in rats. *Science (New York, NY)*. 1981;213(4512):1146.
115. Wehmer F, Bertino M, Jen K-LC. The effects of high fat diet on reproduction in female rats. *Behavioral and Neural Biology*. 1979;27(1):120-4.
116. Schaffer L, Muller-Vizentini D, Burkhardt T, Rauh M, Ehlert U, Beinder E. Blunted stress response in small for gestational age neonates. *Pediatr Res*. 2009;65(2):231-5.
117. Vicennati V, Garelli S, Rinaldi E, Di Dalmazi G, Pagotto U, Pasquali R. Cross-talk between adipose tissue and the HPA axis in obesity and overt hypercortisolemic states. *Hormone molecular biology and clinical investigation*. 2014;17(2):63-77.
118. Laaksonen KS, Nevalainen TO, Haasio K, Kasanen IH, Nieminen PA, Voipio HM. Food and water intake, growth, and adiposity of Sprague-Dawley rats with diet board for 24 months. *Laboratory animals*. 2013;47(4):245-56.
119. Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(2):461s-5s.
120. Hemalatha R, Annapurna VV, Damayanthi K, Radhakrishna KV. Substantial proportion of apparently healthy, urban south Indian young adults has insulin resistance associated with other cardiovascular risk factors 2010.
121. Ruderman N, Chisholm D, Pi-Sunyer X, Schneider S. The metabolically obese, normal-weight individual revisited. *Diabetes*. 1998;47(5):699-713.
122. Karelis AD, St-Pierre DH, Conus F, Rabasa-Lhoret R, Poehlman ET. Metabolic and body composition factors in subgroups of obesity: what do we know? *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(6):2569-75.

123. Knopp RH, Saudek CD, Arky RA, O'Sullivan JB. 2 phases of adipose tissue metabolism in pregnancy: maternal adaptations for fetal growth. *Endocrinology*. 1973;92(4):984-8.
124. Franco JG, Fernandes TP, Rocha CPD, Calviño C, Pazos-Moura CC, Lisboa PC, et al. Maternal high-fat diet induces obesity and adrenal and thyroid dysfunction in male rat offspring at weaning. *The Journal of Physiology*. 2012;590(21):5503-18.
125. Mlinar B, Marc J, Janez A, Pfeifer M. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2007;375(1-2):20-35.
126. Halberg N, Khan T, Trujillo ME, Wernstedt-Asterholm I, Attie AD, Sherwani S, et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Molecular and cellular biology*. 2009;29(16):4467-83.
127. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2094-101.
128. Dunaif A. Insulin Resistance and the Polycystic Ovary Syndrome: Mechanism and Implications for Pathogenesis. *Endocrine Reviews*. 1997;18(6):774-800.
129. Hoeger KM. Obesity and lifestyle management in polycystic ovary syndrome. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2007;50(1):277-94.

## 11. ŽIVOTOPIS

Andela Grgić (rođ. Marić) rođena je u Derventi (Bosna i Hercegovina) 10. veljače 1986. god. Na studij Medicinskog fakulteta Osijek upisuje se 2004. godine nakon maturiranja u Općoj gimnaziji Osijek, a diplomira 2010. godine. Nakon završetka Medicinskog fakulteta odrađuje pripravnički staž doktora medicine u trajanju od godine dana pri Kliničkom bolničkom centru Osijek. Od rujna 2010. god. pohađa Poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo. Od ožujka 2012. god. zaposlena je kao asistent suradnik na Katedri za anatomiju i neuroznanost Medicinskog fakulteta Osijek. Stručni je suradnik na Studiju fizioterapije na Veleučilištu Lavoslav Ružička u Vukovaru iz kolegija Anatomija s histologijom te u Medicinskoj školi Osijek iz predmeta Anatomija i fiziologija. U rujnu 2014. god. započinje specijalizaciju iz Fizikalne medicine i rehabilitacije u Kliničkom bolničkom centru Osijek. Udana za supruga Adama u radosnom iščekivanju novog člana obitelji.

### **Popis objavljenih radova (CC, SCI):**

Marić A., Perić Kačarević Ž., Čekić N., Šerić V., Radić R. Effects of between generation changes in nutrition type on vaginal smear and serum lipids in Sprague-Dawley rats. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 29 (2016) 9; 1491-1497

Marić A., Perić Kačarević Ž., Selthofer R. Changes in nutrition type between generations influence on bone structural changes in rat female offspring. *Periodicum biologorum*. 117 (2015); 65-72

Peric Kacarevic Z, Snajder D, Maric A, Bijelic N, Cvijanovic O, Domitrovic R, et al. High-fat diet induced changes in lumbar vertebra of the male rat offsprings. *Acta histochemica*. 2016;118(7):711-21.

Mihalj H., Baus Lončar M., Mihalj M., Zubčić Ž., Včeva A., Bujak M., Maleš J., Marić A. Influence of allergy and bacterial colonization on the quality of life in nasal polyposis patients. *Collegium Antropologicum*. 37 (2013); 1139-1146

Reproduction (The Journal of the Society for Reproduction and Fertility); April 2015, Volume 149, Number 4: „The cover image depicts vaginal smear cytology in Sprague Dawley rat transitioning between diestrous and proestrous phases. Magnification: 100x Credit: Andela Marić and Nikola Bijelić.”