

# UTJECAJ RAZLIČITE KOMBINACIJE MAJČINE I POSTNATALNE PREHRANE NA POVRŠINU I BROJ ADIPOCITA BIJELOG MASNOG TKIVA MUŠKIH POTOMAKA ŠTAKORA

---

Šnajder, Darija

Doctoral thesis / Disertacija

2019

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:234128>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-29**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Darija Šnajder

**UTJECAJ RAZLIČITE KOMBINACIJE MAJČINE I POSTNATALNE PREHRANE  
NA POVRŠINU I BROJ ADIPOCITA BIJELOG MASNOG TKIVA MUŠKIH  
POTOMAKA ŠTAKORA**

Doktorska disertacija

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Darija Šnajder

**UTJECAJ RAZLIČITE KOMBINACIJE MAJČINE I POSTNATALNE PREHRANE  
NA POVRŠINU I BROJ ADIPOCITA BIJELOG MASNOSTI MUŠKIH  
POTOMAKA ŠTAKORA**

Doktorska disertacija

Osijek, 2018.

Mentor rada: prof. dr. sc. Radivoje Radić, dr. med.

Rad ima 80 listova.

Disertacija je izrađena na Katedri za histologiju i embriologiju, Katedri za medicinsku biologiju i genetiku, u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju Katedre za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, na Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu te Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Zahvalila bih prof. dr. sc. Radivoju Radiću na mentorstvu, prof. dr. sc. Mariji Heffer na motivaciji, dr. sc. Željki Perić Kačarević i dr. sc. Anđeli Grgić na savjetima i suradnji od samog početka studije, doc. dr. sc. Nikoli Bijeliću i med. lab. ing. Danici Matić na pomoći s histološkim preparatima te dr. sc. Valeriji Blažićević na patohistološkoj analizi preparata.

Veliko hvala mojoj majci, prijateljima i kolegama na razumijevanju i potpori.

## Sadržaj

Popis kratica.....	III
Popis tablica.....	V
Popis slika.....	VI
1. Uvod.....	1
1.1. Pretilost.....	1
1.2. „Štedljivi fenotip“.....	2
1.3. Patofiziologija pretilosti.....	3
1.4. Masno tkivo.....	6
1.4.1. Raspodjela bijelog masnog tkiva u tijelu.....	7
1.4.2. Morfološke promjene adipocita bijelog masnog tkiva u pretilosti.....	8
1.5. Masno tkivo i upala.....	9
1.6. Obrazloženje uporabe glodavaca u ovom istraživanju.....	11
2. Hipoteza.....	13
3. Ciljevi istraživanja.....	14
4. Materijal i metode.....	15
4.1. Ustroj studije.....	15
4.2. Uzimanje uzoraka za ispitivanje.....	18
4.2.1. Mjerenje tjelesne mase i računanje indeksa tjelesne mase.....	18
4.2.2. Biokemijska analiza.....	19
4.2.3. Histomorfometrija masnog tkiva.....	19
4.2.4. Imunohistokemijska bojenja masnih tkiva.....	22
4.2.5. Semikvantifikacija intenziteta imunohistokemijskog bojenja.....	24
4.3. Statistička analiza.....	25
5. Rezultati.....	26
5.1. Tjelesna masa, dobitak na tjelesnoj masi i indeks tjelesne mase.....	26
5.2. Kolesterol, trigliceridi, glukoza, adiponektin i TNF- $\alpha$ u serumu.....	29
5.3. Histomorfometrija masnih tkiva.....	32
5.3.1. Subkutano masno tkivo.....	32
5.3.2. Visceralno masno tkivo.....	34
5.3.3. Distribucija površine adipocita u masnim tkivima.....	40
5.4. Imunohistokemijsko bojenje masnih tkiva na TNF- $\alpha$ .....	42
5.5. Imunohistokemijsko bojenje masnih tkiva na CD68.....	44

6. Rasprava.....	49
6.1. Tjelesna masa, ukupni dobitak na tjelesnoj masi i indeks tjelesne mase .....	49
6.2. Kolesterol, trigliceridi, glukoza, adiponektin i TNF- $\alpha$ u serumu muških potomaka štakora .....	51
6.3. Histomorfometrija masnih tkiva.....	52
6.4. Daljnja područja koja otvara provedena studija.....	56
7. Zaključci .....	58
8. Sažetak.....	59
9. Summary.....	60
10. Literatura.....	61
11. Životopis .....	79

## Popis kratica

AgRP	aguti-povezan protein (prema engl. <i>agouti-related protein</i> )
AMP	adenozin monofosfat (prema engl. <i>adenosine monophosphate</i> )
BMI	indeks tjelesne mase (prema engl. <i>body mass index</i> )
BMP	koštani morfogeni proteini (prema engl. <i>bone morphogenic proteins</i> )
C3	komponenta komplementa 3 (prema engl. <i>complement component 3</i> )
CART	transkript povezan s kokainom i amfetaminom (prema engl. <i>cocaine- and amphetamine-regulated transcript</i> )
CCL2	kemokin ligand 2 (prema engl. <i>C-C motif chemokine ligand 2</i> )
CD	kontrolna dijeta (prema engl. <i>control diet</i> )
CLS	strukture oblika krune (prema engl. <i>crown-like structures</i> )
CRP	C-reaktivni protein
DAB	3,3'- diaminobenzidin
DAMPS	molekularni obrasci povezani s opasnošću (prema engl. <i>danger-associated molecular patterns</i> )
HFD	hrana bogata zasićenim masnim kiselinama (prema engl. <i>high-fat diet</i> )
HMG-KoA	hidroksi-metilglutaril-koenzim A
ICAM-1	međustanična adhezijska molekula 1 (prema engl. <i>intercellular adhesion molecule 1</i> )
IL-1 $\beta$	interleukin 1 beta
IL-6	interleukin 6
JNK	c-Jun N-terminalna kinaza
LDL	lipoproteini male gustoće (prema engl. <i>low-density lipoproteins</i> )
MCH	hormon za koncentriranje melanina (prema engl. <i>melanin-concentrating hormone</i> )



MCP-1	monocitni kemoatraktantni protein 1 (prema engl. <i>monocyte chemoattractant protein 1</i> )
MHO	metabolički zdrave pretilo osobe (prema engl. <i>metabolically healthy obese</i> )
NKT	ubilačke T-stanice (prema engl. <i>natural killer T-cells</i> )
NPY	neuropeptid Y
NS	<i>nucleus solitarius</i>
PAMPS	molekularni obrasci povezani s patogenom (prema engl. <i>pathogen-associated molecular patterns</i> )
PBS	fosfatni pufer (prema engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PKR	protein kinaza R
PPAR- $\gamma$	peroksisom proliferator-aktivirani receptor gama
TNF- $\alpha$	čimbenik nekroze tumora alfa (prema engl. <i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i> )
UCP1	odvajajući protein 1 (prema engl. <i>uncoupling protein 1</i> )
VCAM-1	vaskularni stanični adhezijski protein 1 (prema engl. <i>vascular cell adhesion protein 1</i> )
VEGF	vaskularni endotelni čimbenik rasta (prema engl. <i>vascular endothelial growth factor</i> )
$\alpha$ -MSH	hormon koji potiče melanocite (prema engl. <i><math>\alpha</math>-melanocyte-stimulating hormone</i> )

## Popis tablica

<b>Tablica 4.1.</b> Sastav dijeta primijenjenih kod hranjenja kontrolnih i eksperimentalnih skupina štakora. ....	16
<b>Tablica 5.1.</b> Srednja vrijednost površine i broj adipocita subkutanog masnog tkiva muških potomaka štakora u 22. tjednu starosti. ....	32
<b>Tablica 5.2.</b> Srednja vrijednost površine i broj adipocita epididimalnog masnog tkiva muških potomaka štakora u 22. tjednu starosti. ....	34
<b>Tablica 5.3.</b> Srednja vrijednost površine i broj adipocita perirealnog masnog tkiva muških potomaka štakora u 22. tjednu starosti. ....	37
<b>Tablica 5.4.</b> Semikvantifikacija intenziteta imunohistokemijskog obojenja masnih tkiva muških potomaka štakora u 22. tjednu starosti na TNF- $\alpha$ . ....	42
<b>Tablica 5.5.</b> Broj pozitivnih stanica na CD68 u mm <sup>2</sup> masnih tkiva muških potomaka štakora u 22. tjednu starosti. ....	45

## Popis slika

<b>Slika 1.1.</b> Kombinacija utjecaja koji posljedično uzrokuju nastanak pretilosti kod čovjeka (autorsko djelo). .....	4
<b>Slika 1.2.</b> Periferna kontrola hipotalamičkih centara zaduženih za energiju i metabolizam kod čovjeka (autorsko djelo). .....	5
<b>Slika 4.1.</b> Prikaz protokola studije. ....	17
<b>Slika 4.2.</b> Prikaz obrade slike programom CellProfiler. ....	21
<b>Slika 5.1.</b> Tjelesna masa 4.-22. tjedna starosti kod muških potomaka štakora. ....	27
<b>Slika 5.2.</b> Ukupni dobitak na tjelesnoj masi muških potomaka štakora tijekom eksperimenta. ....	28
<b>Slika 5.3.</b> Koncentracija kolesterola u serumu muških potomaka štakora nakon 22 tjedna hranjenja standardnom laboratorijskom hranom ili masnom ishranom. ....	29
<b>Slika 5.4.</b> Koncentracija TNF- $\alpha$ u serumu muških potomaka štakora nakon 22 tjedna hranjenja standardnom laboratorijskom hranom ili masnom ishranom. ....	31
<b>Slika 5.5.</b> Reprezentativni prikaz histološkog preparata subkutanog masnog tkiva četiriju skupina ispitivanih muških potomaka štakora. ....	33
<b>Slika 5.6.</b> Broj adipocita po jedinici površine u epididimalnom masnom tkivu muških potomaka štakora u 22. tjednu starosti. ....	35
<b>Slika 5.7.</b> Reprezentativni prikaz histološkog preparata epididimalnog masnog tkiva četiriju skupina ispitivanih muških potomaka štakora. ....	36
<b>Slika 5.8.</b> Broj adipocita po jedinici površine u perirenalnom masnom tkivu muških potomaka štakora u 22. tjednu starosti. ....	38
<b>Slika 5.9.</b> Reprezentativni prikaz histološkog preparata perirealnog masnog tkiva četiriju skupina ispitivanih muških potomaka štakora. ....	39
<b>Slika 5.10.</b> Distribucija površine adipocita po razredima površina u ispitivanim odjeljcima masnih tkiva muških potomaka štakora u 22. tjednu starosti. ....	41

<b>Slika 5.11.</b> Relativni intenzitet imunohistokemijskog bojenja masnih tkiva muških potomaka štakora u 22. tjednu starosti na TNF- $\alpha$ . .....	43
<b>Slika 5.12.</b> Reprezentativni prikaz imunohistokemijskog bojenja subkutanog masnog tkiva muških potomaka štakora u 22. tjednu starosti na CD68. ....	46
<b>Slika 5.13.</b> Reprezentativni prikaz imunohistokemijskog bojenja epididimalnog masnog tkiva muških potomaka štakora u 22. tjednu starosti na CD68. ....	47
<b>Slika 5.14.</b> Reprezentativni prikaz imunohistokemijskog bojenja perirealnog masnog tkiva muških potomaka štakora u 22. tjednu starosti na CD68. ....	48

## 1. Uvod

### 1.1. Pretilost

S obzirom na trenutno rašireni životni stil koji uključuje manjak fizičke aktivnosti, brzu hranu i pretjeran kalorijski unos, prekomjerna tjelesna masa i pretilost, koji su definirani kao prekomjerno nakupljanje masnoga tkiva koje može utjecati na zdravlje, postaju sve značajniji javnozdravstveni problemi.

Stanje uhranjenosti najčešće se opisuje indeksom tjelesne mase (BMI, prema engl. *body mass index*) koji se izračunava tako da se masa osobe u kilogramima podijeli s kvadratom visine u metrima ( $\text{kg/m}^2$ ). Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji pretilost je definirana  $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ , a prekomjerna tjelesna masa  $\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$  (1). U 2014. godini 13 % svjetske populacije bilo je pretilo (11 % muškaraca i 15 % žena), a 42 milijuna djece ispod 5 godina pretilo ili je imalo prekomjernu tjelesnu masu. Svjetska se prevalencija pretilosti udvostručila od 1980. do 2014. god. (1), a prema procjenama do 2025. doseći će 18 % u muškaraca i 21 % u žena (2). U rezultatima Hrvatske zdravstvene ankete 2003. godine opisano je 20,4 % odraslih osoba i 7,6 % 7-godišnjaka kao pretilo, dok procjene Hrvatske zdravstvene ankete iz 2008. godine ukazuju da se udio pretelih odraslih osoba dodatno povećao na 24,4 % (3). Povišen je BMI rizični čimbenik za brojne bolesti: srčanožilne bolesti, šećernu bolest, mišićnokoštane poremećaje (posebno osteoartritis) te neke vrste raka (endometrija, dojke i debelog crijeva) (4). Pretilost je često udružena s inzulinskom rezistencijom, hipertenzijom i dislipidemijom, što onda nazivamo metaboličkim sindromom (5).

Posebnu zabrinutost, kako zbog izravnog i neizravnog utjecaja na zdravlje, tako i zbog značajnih ekonomskih posljedica, izaziva porast pretilosti u sve mlađoj dobi u Republici Hrvatskoj i svijetu. Prema podacima Hrvatskoga zavoda za javno zdravstvo o stanju uhranjenosti školske djece od 7 do 14 godina, služeći se antropometrijskim indeksom tjelesne mase za dob, u razdoblju od 2000. do 2005. god., prekomjernu tjelesnu masu imalo je 23 % ispitanika, dok je 7,2 % bilo pretilo, a primjenjujući antropometrijski indeks tjelesne mase za visinu bilo je 6,9 % pretile djece i 11,9 % djece s prekomjernom tjelesnom masom (6).

Složeni patološki proces razvoja pretilosti zbroj je raznih okolišnih i genetskih interakcija, a čini se da pojedinci iz ugroženih zajednica imaju veći rizik uslijed fetalnog i postnatalnog otiska (7).

## 1.2. „Štedljivi fenotip“

Tijekom svog evolucijskog razvoja, *Homo sapiens* bio je navikao na izmjenjujuća razdoblja gladi i izobilja. Kako bi osigurao preživljavanje u razdobljima s ne tako bogatim prehrambenim izvorima, određeni su geni kontrolirali spremanje i iskorištavanje hranjivih tvari u tijelu. Ti su geni otkriveni i označeni kao „štedljivi geni“ još 1962. godine (8). Kasnije je postavljena i hipoteza tzv. „štedljivog fenotipa“ kako bi se objasnila korelacija između ograničenog rasta fetusa *in utero* (te posljedično smanjene rodne mase) i kasnijeg nastanka metaboličkog sindroma (9). Smanjena količina hranjivih tvari u ranome životu može stvoriti metabolizam koji očekuje smanjene izvore prehrane i lošije se prilagođava obilju. Te promjene metabolizma uključuju smanjeni kapacitet inzulinske sekrecije i inzulinsku rezistenciju (10).

Epidemiološke studije pokazuju da osobe niže rodne mase koje su kasnije u djetinjstvu sustigle svoje vršnjake rastom (tzv. „*catch-up growth*“) imaju veću vjerojatnost oboljenja od abdominalne pretilosti, šećerne bolesti tipa 2 i srčanožilnih poremećaja, posebno ako se sustizanje dogodilo ranije u djetinjstvu. Sustizanje u rastu karakterizirano je nesrazmjerno bržim nakupljanjem masnoga tkiva (11). Primjerice, prospektivna studija u Engleskoj obuhvatila je 848 djece kojima je mjerena visina i masa pri rođenju te u dobi od dviju i pet godina. Djeca koja su pokazala značajno povećanje u masi od rođenja do druge godine te time i klinički „*catch-up*“ rast, u dobi od pet godina bila su viša, teža te su imala veću količinu masnoga tkiva (12).

Iz hipoteze „štedljivog fenotipa“ rezultirala je pretpostavka o prilagodbi fetusa tijekom unutar materničnog razvoja na očekivani postnatalni okoliš. Međutim, pokusi i rijetke epidemiološke studije pokazale su sklonost pretilosti i kod potomaka majki koje su tijekom trudnoće konzumirale više hranjivih tvari nego što je potrebno. Napoli i sur. 1997. i 1999. pokazali su u *post-mortem* studiji talijanske populacije da djeca majki koje boluju od hiperkolesterolemije brže razvijaju masne nakupine u aorti (13, 14). Studija nije ograničila radi li se ovdje o obiteljskoj hiperkolesterolemiji i poremećaju u metabolizmu masti ili hiperkolesterolemiji kao posljedici majčine dijete.

Kod animalnih studija hranjenje majki masnom dijetom tijekom trudnoće i laktacije u glodavaca dovodi do fenotipa potomaka koji slični ljudskom metaboličkom sindromu (15). U štakorskom modelu dijeta bogata mastima u majke inducirala je hiperleptinemiju, hiperinzulinemiju, inzulinsku rezistenciju, hiperfagiju i povišenu razinu lipida u serumu potomaka (16, 17). Armitage i sur. opisali su da je hranjenje majki dijetom bogatom mastima tijekom trudnoće i laktacije rezultiralo povišenim tlakom, abnormalnom serumskom razinom lipida, acetilkolin induciranom vazodilatacijom, hiperleptinijom, poremećenom homeostazom glukoze i pretilošću u potomaka, a to je osobito bilo izraženo kod hranjenja zasićenim masnim kiselinama (18). Drugi su autori pokazali da se metabolizam lipida kod potomaka miševa mijenja ako je majka hranjena dijetom s visokim postotkom masti, a ta je promjena zabilježena i u drugoj generaciji i poslije (19).

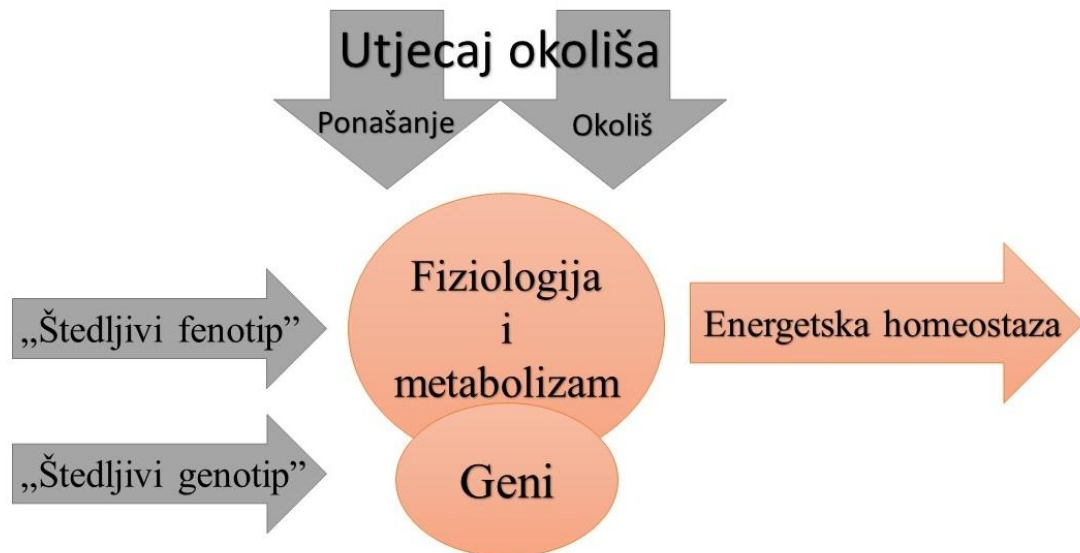
Hipoteza „štedljivog fenotipa“ govori da prehrana majke tijekom trudnoće i laktacije vodi do promjene metabolizma i razvoja odraslog fenotipa koji će biti prilagođen istoj prehrani, te na taj način majka pripremi potomak na izvanmaterničnu okolinu (9).

### **1.3. Patofiziologija pretilosti**

Pretilost je složena multifaktorijalna bolest, a dobivanje na tjelesnoj masi pod utjecajem je nekoliko čimbenika. U središtu su fiziološki i metabolički procesi koji kontroliraju energetske homeostazu, a genetički su kodirani te na njih utječu okoliš i ponašanje jedinke (Slika 1.1.) (20).

Gastrointestinalni trakt nam ne služi samo kao cijev kroz koju prolazi hrana, nego se u njemu i probavljaju i apsorbiraju hranjive tvari. Vidni, mirisni i okusni podražaji potiču endokrinu i egzokrinu sekreciju te motilitet probavnog trakta i prije nego što hrana uđe u usta, a ingestija hrane stimulira mehanoreceptore koji uzrokuju distenziju i propulziju probavne cijevi, ali i potiče probavu točno određenih vrsta molekula. Aferentni signali iz mehanoreceptora i kemoreceptora (utjecaj sastava hrane, osmolarnosti i promjene pH) prenose se putem *nervusa vagusa* do dorzalnog vagalnog kompleksa u produženoj moždini i završavaju u medijalnim i dorzomedijalnim dijelovima jezgre *nucleusa solitariusa* (NS). Projekcije iz NS-a inerviraju paraventrikularnu, dorzomedijalnu i arkuatnu jezgru hipotalamusa i lateralno hipotalamičko područje, središnju jezgru amigdale i *striu terminalis* (21). Postoji ekspresija nekoliko peptida i njihovih receptora na hipotalamičkim neuronima, koji se smatraju

oreksigenima (potiču hranjenje): neuropeptid Y (NPY), aguti-povezan protein (AgRP, prema engl. *agouti-related protein*), hormon za koncentriranje melanina (MCH, prema engl. *melanin-concentrating hormone*), oreksini A i B, ili anoreksigenima: hormon koji potiče melanocyte ( $\alpha$ -MSH, prema engl. *melanocyte-stimulating hormone*) i transkript povezan s kokainom i amfetaminom (CART, prema engl. *cocaine and amphetamine related transcript*) (22).



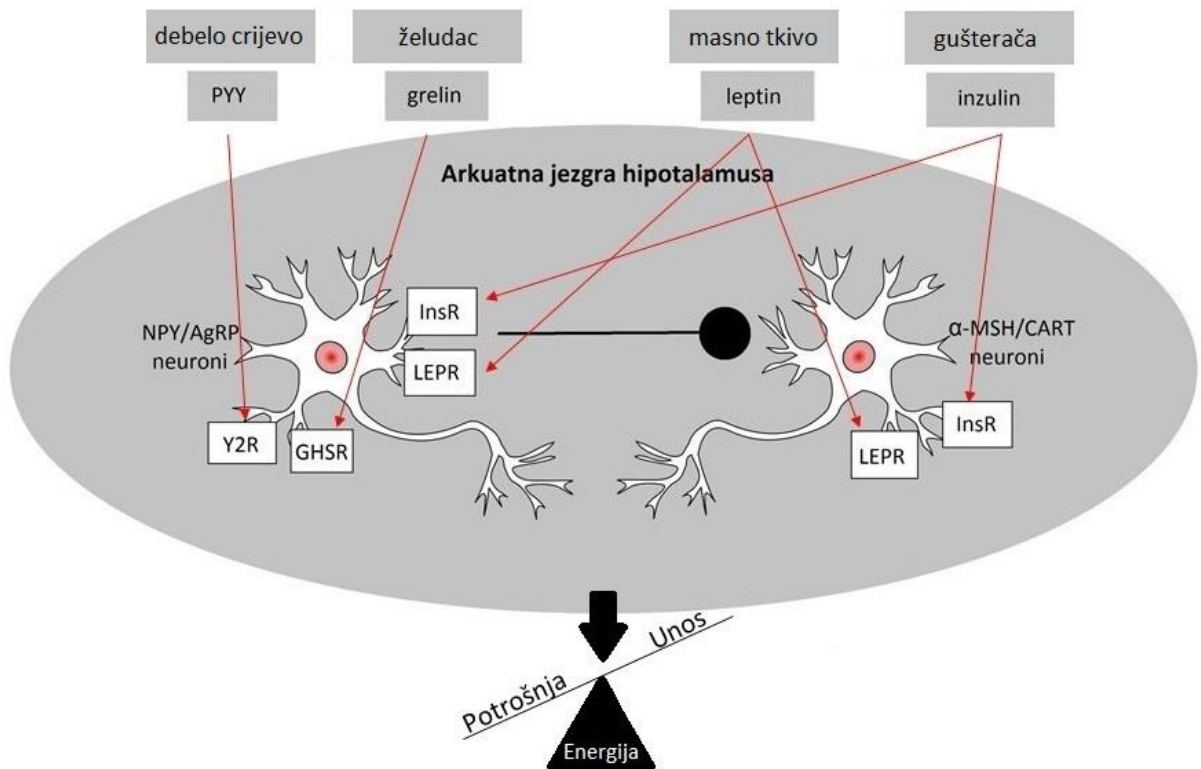
**Slika 1.1.** Kombinacija utjecaja koji posljedično uzrokuju nastanak pretilosti kod čovjeka (autorsko djelo).

Probavni trakt izlučuje i hormone koji kontroliraju hranjenje. Ti peptidi ulaze u mozak kroz *areu postremu* smještenu iznad NS-a. Prvi identificirani peptid koji utječe na smanjenje veličine obroka je kolecistokinin (23), glukagonu sličan peptid-1 smanjuje ingestiju hrane (24), protein YY također smanjuje hranjenje inhibirajući NPY/AgRP neurone hipotalamusa (25), a amilin smanjuje apetit (26). Grelin je protein koji se sastoji od 28 aminokiselina i proizvodi se u želucu kada je isti prazan te se stoga može nazvati i „hormon gladi“ (27). Mjesto djelovanja grelina najvjerojatnije je također hipotalamus, tj. neuroni s ekspresijom NPY i AgRP (28, 29).

Od perifernih čimbenika koji utječu na metabolizam mogu se izdvojiti leptin i inzulin. Leptin je hormon koji uzrokuje smanjenje tjelesne mase smanjujući apetit i povećavajući potrošnju energije stimulacijom simpatičkog sustava brojnih tkiva. Predominantno se proizvodi u adipocitima (29), no u manjim količinama i u želučanom epitelu (30) te posteljici (31). Razina leptina u plazmi u pozitivnoj korelaciji je s količinom masnoga tkiva i stoga on djeluje kao mjerač zalihe energije u tijelu (32). Inzulin proizvode  $\beta$ -stanice gušterače i njegovo se



izlučivanje povećava kao odgovor na rastuću razinu glukoze u krvi odmah nakon obroka, dok je leptin neosjetljiv na akutnu ingestiju hrane (33). Oba navedena hormona ulaze u mozak i vežu se za hipotalamičke neurone (Slika 1.2.) te djeluju tako da smanjuju tjelesnu masu i posjeduju njezinu dugoročnu regulaciju.



**Slika 1.2.** Periferna kontrola hipotalamičkih centara zaduženih za energiju i metabolizam kod čovjeka (autorsko djelo).

Adiponektin je protein od 244 aminokiseline i 28 kDa koji pripada u komplementnu čimbeničku C1q obitelj proteina, a koji izlučuju adipociti (34). Za razliku od leptina njegova se koncentracija povećava kod gladovanja i smanjuje kod pretilosti (35). Adiponektin se smatra medijatorom metaboličkog odgovora na gladovanje te ukoliko se aplicira periferno kako bi imitirao stanje gladovanja dovodi do povećanog unosa hrane, smanjenja utroška energije i povećanja tjelesne mase (36). Ti su učinci povezani s povećanjem aktivnosti adenosin monofosfat (AMP, prema engl. *adenosine monophosphate*) kinaze i ekspresijom NPY u hipotalamusu (37). Adiponektin aktivira neurone *aree postreme* putem AdipoR1 i AdipoR2 transmembranskih proteina i inhibira neurone koji izlučuju oksitocin u paraventricularnoj jezgri hipotalamusa (38, 39). Do ekspresije adiponektina dolazi i u bijelom i u smeđem masnom tkivu

te prema dosadašnjim istraživanjima izoliranog ljudskog masnog tkiva ne postoji značajna razlika u izlučivanju adiponektina između subkutanog i visceralnog odjeljka masnog tkiva (40), no vjerojatno se regulacija odvija različito od odjeljka do odjeljka (41). Tako je primijećena negativna korelacija između BMI-ja i izlučivanja adiponektina kod izoliranih visceralnih adipocita koja se ne prati kod subkutanih adipocita (41). Zanimljivo je i da postoji seksualni dimorfizam u razini cirkulirajućeg adiponektina pri čemu se kod ženki mjeri viša koncentracija adiponektina nego kod mužjaka (42).

Od ostalih perifernih medijatora povezanih s pretilošću i metabolizmom važan je čimbenik nekroze tumora-alfa (TNF- $\alpha$ , prema engl. *tumor necrosis factor alpha*). TNF- $\alpha$  je proupalni citokin čija je ekspresija i razina u krvi pozitivno korelirana s pretilošću i negativno korelirana s gubitkom na tjelesnoj masi (43). Uzrokuje apoptozu preadipocita i zrelih adipocita, smanjujući adipogenezu i povećavajući lipolizu (44). Iako takvi učinci sugeriraju dobrobit povišene koncentracije TNF- $\alpha$ , taj citokin također potiče upalne puteve koji dovode do pretilošću povezane inzulinske rezistencije blokirajući receptore za navedeni hormon (45). Uz metaboličke učinke, TNF- $\alpha$  je povezan s razvojem ateroskleroze i hipertenzije (46). Neke pak studije pokazuju da povišena koncentracija TNF- $\alpha$  u pretilosti može biti i uzrok smanjenom stvaranju adiponektina (47, 48).

#### **1.4. Masno tkivo**

Masno je tkivo organ koji služi za skladištenje energije, proizvodnju topline i zaštitu vitalno važnih organa (49). U sisavaca se masno tkivo može podijeliti na dvije glavne vrste, bijelo i smeđe.

Bijelo masno tkivo specijalizirano je za čuvanje energije u obliku triglicerida i otpuštanje masnih kiselina i glicerola u stanjima gladovanja (50), bogato je vaskularizirano i inervirano i djeluje kao hormonalni homeostatski sustav (51). Postoji i povezanost povećane količine masnoga tkiva i povećane incidencije nekih vrsta karcinoma kao što su postmenopauzalni karcinom dojke i endometrija, što se objašnjava tumorskim iskorištavanjem lokalnih čimbenika rasta, citokina, modulatora izvanstaničnog matriksa i metabolita adipocita (52, 53).

Stanice bijelog masnog tkiva sadrže veliku kapljicu masti koja potiskuje jezgru i citoplazmu stanice na periferiju gdje čine tanak obruč. Adipociti izlučuju brojne molekule koje su ključne u regulaciji metabolizma, kao što su TNF- $\alpha$ , adiponektin, rezistin i drugi (54). Kako bi se moglo prilagoditi prekomjernom dotoku energije u pretilosti, bijelo se masno tkivo remodelira na nekoliko načina: 1. povećanjem volumena (hipertrofija) i/ili broja adipocita (hiperplazija) (55), 2. infiltracijom upalnih stanica (56) i 3. remodeliranjem vaskulature i izvanstaničnog matriksa kako bi se omogućila ekspanzija tkiva (57). No, kada su stanja upale i pretilosti neprekidna, homeostatski mehanizmi podbace uzrokujući tkivnu disfunkciju. Ovo je predominantno masno tkivo u odnosu na sva ostala opisana dalje u tekstu i u stalnom je doticaju s imunološkim stanicama zbog regulacije metabolizma.

Smeđe masno tkivo dobilo je ime po crvenkasto-smeđoj boji koju ima zbog povećane vaskularizacije i visoke količine mitohondrija. Nalazi se kod većine hibernirajućih sisavaca, u fetalnom razvoju i kod djece, dok se njegova količina smanjuje starenjem i pretilošću (58). Njegova je funkcija održavanje termogeneze sagorijevanjem lipida u toplinu. To čini putem metaboličkog ciklusa protona koji izlaze i ulaze u matriks mitohondrija putem „razvezujućeg“ proteina 1 (UCP1, prema engl. *uncoupling protein 1*) (59). Tzv. „klasični smeđi adipociti“ su adipociti nastali iz linije stanica sličnih skeletnom mišiću i to su UCP1<sup>+</sup> stanice s brojnim malim kapljicama masti i gustim mitohondrijima smješteni na specifičnoj anatomskej lokaciji u interskapularnoj i perirenalnoj regiji. UCP1<sup>+</sup> stanice koje se nalaze u brojnim bijelim masnim tkivima u subkutanim regijama glodavaca i ljudi nastale su od linije stanica sličnih glatkom mišiću i nazivaju se „bež“ masnim tkivom (60).

Smeđe masno tkivo prvenstveno služi termoregulaciji, no brani životinje i od metaboličkih bolesti kao što su pretilost, tip 2 šećerne bolesti i hepatska steatoza (61).

#### **1.4.1. Raspodjela bijelog masnog tkiva u tijelu**

Bijelo masno tkivo organizirano je u dvama odjeljcima koji se zovu subkutano i visceralno masno tkivo (62).

Subkutano masno tkivo kod ljudi je smješteno duž cijelog tijela, no najveći depoi se nalaze u abdominalnoj regiji, bedrima i glutealnoj regiji. Ovisno je li smješteno ispod ili iznad *fasciae superficialis* dijeli se na površinsko i duboko subkutano masno tkivo. Visceralno masno

tkivo okružuje unutrašnje organe i može se podijeliti u omentalno, mezenterično, retroperitonealno, gonadalno i perikardijalno (63).

Glodavci imaju dva područja nakupljanja subkutanog masnog tkiva: anteriorno između lopatica i posteriorno od dorzolumbalne do glutealne regije i ono nije sastavljeno od multiplih slojeva kao u ljudi. Visceralno se masno tkivo u glodavaca nalazi perigonadalno (zvano epididimalno u mužjaka i periovarijsko u ženki), retroperitonealno uz bubrege i mezenterično (duž intestinalnog trakta). Mezenterično je masno tkivo po smještaju i biologiji s obzirom na drenažu putem *v. portae* najbliže ljudskom, no nije toliko istraženo zbog ograničenja u kirurškoj manipulaciji i izolaciji od prilježćih krvnih žila (63).

Povećanje visceralnog masnog tkiva povezano je s većim rizikom od inzulinske rezistencije i dislipidemije (64), a neovisan je čimbenik rizika za tip 2 šećerne bolesti (65), hipertenziju (66) i smrtnost (67). Istraživanja su također potvrdila pozitivnu korelaciju između povećanja volumena perirealnog masnog tkiva s povišenjem dijastoličnog krvnog tlaka (68, 69). Suprotno od toga, subkutano je masno tkivo povezano s očuvanom osjetljivošću na inzulin (70).

To se može objasniti dreniranjem krvnog optoka subkutanog masnog tkiva putem *venae caveae*, a visceralnog masnog tkiva portalnom venom što izravno vodi proupalne citokine u jetru (71), a potvrđeno je i u lipektomiranom modelu štakora i miševa kojima je odstranjeno epididimalno i retroperitonealno masno tkivo i kod kojih je došlo do poboljšane inzulinske osjetljivosti, smanjene tumorigeneze i dužeg životnog vijeka neovisno o komorbiditetima (72, 73). U slučajevima odstranjenja subkutanog masnog tkiva kod glodavaca došlo je do porasta koncentracije triglicerida u serumu i bazalnog inzuliničnog indeksa (74, 75), a transplantacija subkutanog masnog tkiva poboljšala je metabolizam glukoze (76). Za razliku od životinjskog modela, kod ljudi liposukcija veće količine subkutanog masnog tkiva nije imala značajnog utjecaja na metabolički profil pacijenata (77), a kod operacija gastričnog *bypassa* količina odstranjenog omentalnog masnoga tkiva premala je da bi imala neki učinak (78).

#### **1.4.2. Morfološke promjene adipocita bijelog masnog tkiva u pretilosti**

Bijelo masno tkivo ima visoku fiziološku plastičnost, a mehanizam pomoću kojeg dolazi do povećanja količine masnoga tkiva po odjeljcima može biti određujući čimbenik nastanka

metaboličkog sindroma u pretilosti. Povećanje masnoga tkiva može biti uslijed povećanja veličine (hipertrofija) ili broja adipocita (hiperplazija), pri čemu hiperplazija predstavlja *de-novo* stvaranje adipocita (adipogenezu) (79).

Wang i sur. dokazali su da izlaganje ispitivanih životinja masnoj prehrani tijekom mjesec dana uzorkuje hipertrofiju adipocita u subkutanom i visceralnom masnom tkivu. Ako se životinje drže duže od mjesec dana na masnoj prehrani, dolazi do hiperplazije visceralnog masnog tkiva, ali nije zabilježena značajna adipogeneza u subkutanom odjeljku (55). U retroperitonealnom masnom tkivu Osborne-Mendel štakora hranjenih masnom dijetom tijekom 9 tjedana dolazi do hiperplazije i hipertrofije adipocita, a nakon što su se štakori ponovno počeli hraniti standardnom laboratorijskom hranom opazio se gubitak na tjelesnoj masi i veličini adipocita, a broj je adipocita ostao nepromijenjen (80). U štakorskom modelu izglednjivanja i ponovnog hranjenja bez inducirane hiperfagije kako bi se pratilo sustizanje u rastu u odnosu na kontrolnu skupinu, kod navedenih životinja povećao se broj adipocita dok je promjer bio manji tijekom prvih 15 dana ponovnog hranjenja (81). Ovo je značajan zaključak budući da je već otprije poznato da je promjer, za razliku od broja adipocita, obrnuto proporcionalan s inzulinskom osjetljivošću (82).

Kod ljudi rano nastupanje pretilosti dovodi do hiperplazije masnog tkiva, a ako do povećanja tjelesne mase dođe u starijoj dobi većinom dolazi do hipertrofije postojećih adipocita (83). Spalding i sur. su uporabljajući  $^{14}\text{C}$  kao marker otkrili da je poluživot prosječnog adipocita 8,3 godine i da je broj adipocita u odrasloj dobi uglavnom fiksiran budući da je broj novonastalih adipocita u homeostazi sa smrću stanica (84), no s druge je strane pretilost povezana s većim obrtajem adipocita s obzirom na učestaliju apoptozu/nekrozu (85).

## **1.5. Masno tkivo i upala**

Upalno se stanje potaknuto metaboličkim viškom razlikuje od klasične medicinske definicije inflamacije koja se opisuje crvenilom, otokom, vrućicom, boli i smanjenom funkcijom upaljenog tkiva. Upalni je poticaj kod pretilosti metaboličke prirode i uzorkovan je viškom hranjivih tvari, a upala se povezuje sa srčanožilnim oboljenjima i šećernom bolesti tipa 2 (86). Metabolički signali iz specijaliziranih metaboličkih stanica kao što su adipociti započinju upalni proces (87).

Prvo je otkriće upale u masnome tkivu miševa bilo kada je dokazana povišena koncentracija TNF- $\alpha$  u tkivu i u samim adipocitima adipoznih miševa u odnosu na kontrolnu skupinu (88). Ekspresija TNF- $\alpha$  izraženija je u visceralnom nego u subkutanom masnome tkivu i proizvodi se u većoj količini od stanica stromovaskularne frakcije masnoga tkiva (kao što su makrofagi) nego od adipocita (89).

Prema trenutnim saznanjima, u masnome tkivu kod upale dolazi ne samo do porasta razine TNF- $\alpha$ , nego i brojnih drugih proupalnih citokina kao što su interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), kemokin ligand 2 (CCL2, prema engl. *C-C motif chemokine ligand 2*), sustav komplementa i drugi (90). Iako je masno tkivo predominantan izvor proupalnih citokina, isti se kod pretilosti mogu naći i u drugim tkivima: gušterači, jetri, mozgu i mišiću (91).

Unutarstanični uzrok ekspresije proupalnih citokina i poticanja upale u masnim tkivima se našao u aktivaciji c-Jun N-terminalne kinaze (JNK) i protein kinaze R (PKR) putem staničnog stresa uzorkovanog nakupljanjem lipida u pretilosti (92, 93). Ovi upalni signalni putevi reguliraju fosforilaciju proteina i transkripcijske čimbenike koji vode do proizvodnje proupalnih molekula (94).

U pretilih ispitanika u usporedbi sa zdravom kontrolom dolazi i do aktivacije staničnih receptora kao što su inflammasom i Toll-like receptor (95). Inflammasom i sustav komplementa se aktiviraju putem tzv. molekularnih obrazaca povezanih uz opasnost i patogene (DAMPs i PAMPs). Aktivacija sustava komplementa dovodi do aktivacije komponente komplementa 3 (C3), koja uzorkuje stvaranje C3a i puta terminalnih učinaka koji završavaju na C5a i C5b-9. Aktivacija inflammasoma uključuje stvaranje citosolnog multiproteinskog kompleksa koji aktivira kaspazu 1 koja cijepa pro-IL-1 $\beta$  u IL-1 $\beta$ . To su sve putevi na koje bi se moglo farmakološki utjecati (96).

Uz poticanje upalnih procesa proupalnim citokinima putem adipocita, u pretilosti dolazi i do infiltracije masnoga tkiva upalnim stanicama. Endotelne adhezijske molekule (npr. ICAM-1 i VCAM-1) i kemoatraktanti vežu se za integrine i kemokinske receptore i mobiliziraju monocite i druge upalne stanice u masno tkivo. Brojni adipokini su potaknuti i mikrohipoksijom koja nastaje zbog ekspanzije adipocita već u ranom stadiju pretilosti i time manjom krvnom opskrbom tkiva (97–99). Tkivni se monociti zatim diferenciraju u makrofage i proizvode iste proupalne citokine koji su opisani prije u tekstu (100). Prema nekim studijama, masna tkiva mršavih ljudi i miševa sadrže oko 5 % makrofaga, a udio makrofaga u pretilih ljudi i miševa može biti do 50 % (101, 102). Pretilost kod ljudi i glodavaca povezana je s povećanom

količinom apoptotičnih i nekrotičnih adipocita kako u bijelom tako i u smeđem masnom tkivu. Većina makrofaga lokalizirana je oko mrtvih adipocita formirajući „*crown-like structures*“ (CLS) – „strukture oblika krune“ s obzirom na njihovu ulogu u fagocitozi brojnih molekula, u ovome slučaju rezidualnih masnih kapljica mrtvih adipocita (85, 103). Općenito, makrofagi mogu biti proupalni ili protuupalni (M1 ili M2 aktivacija). Masna tkiva pretilih miševa pokazuju povećanu količinu proupalne M1 populacije makrofaga, koja negativno utječe na inzulinsku osjetljivost (104), a nekoliko radova pokazuje pozitivnu korelaciju između CLS-a i veličine adipocita, no veći broj CLS-a u visceralnom u odnosu na subkutano masno tkivo kod glodavaca i ljudi i to unatoč manjim stanicama (105–107). Kod kroničnog gubitka tjelesne mase dolazi do smanjenja broja makrofaga u masnome tkivu, što se ne događa kod akutnog gubitka (0-7 dana) ili u dvadeset četverosatnom postu (108).

U pretilim masnim tkivima osim broja makrofaga raste i broj mast i ubilačkih T-stanica (NKT, prema engl. *natural killer T-cells*), a raste i odnos CD8<sup>+</sup> u odnosu na CD4<sup>+</sup> T limfocite te se smanjuje broj imunosupresivnih T regulirajućih stanica (109, 110).

Za razliku od akutne upalne reakcije kod koje dolazi do nastanka, odgovora i prestanka inflamacije, upalu kod pretilosti obilježava njen kronicitet, a do upale dolazi već i nakon 3 tjedna hranjenja hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama (111), što je bitno kod proučavanja studija koje uključuju model masno hranjenih životinja.

## **1.6. Obrazloženje uporabe glodavaca u ovom istraživanju**

Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo i Svjetske zdravstvene organizacije udio pretilih odraslih osoba i djece u stalnom je porastu. Centralna pretilost kao kronična bolest vrlo je često udružena s inzulinskom rezistencijom, hipertenzijom i dislipidemijom u vidu metaboličkog sindroma te samim time uzrokuje znatni trošak za zdravstveni sustav svake zemlje.

Određivanje utjecaja masne prehrane u različitim stadijima razvoja počevši od fetalnog razvoja vrlo je zahtjevno kod ljudi, a prospektivne su studije takvog tipa dugotrajne. Uz genetiku i okolišni čimbenici ima veliki utjecaj na razvoj pretilosti kod ljudi, a to je čimbenik koji je kod ljudi teže kontrolirati.

Glodavci su već godinama uporabljivi kao model za istraživanje ljudskih bolesti kao što su hipertenzija, šećerna bolest i pretilost (112–114). Razvijeni su posebni genetički modeli pretilosti i šećerne bolesti kao što su *db/db* miševi, *ob/ob* miševi, Zucker i Otsuka Long-Evans Tokushima pretili štakori, što je korisno za proučavanje specifičnih metaboličkih puteva koji su potrebni za razvoj neke bolesti, no pretilost i metabolički sindrom u ljudi pod utjecajem su više gena. Recimo, Zucker štakori koji su model za pretilost i šećernu bolest imaju mutaciju receptorskog gena za leptin, a to je stanje koje je kod ljudi vrlo rijedak recesivni genetički poremećaj. Iz navedenog je razloga bolji odabir utjecaj na metabolizam putem modifikacije sastava hrane, a komplikacije koje se razvijaju kod glodavaca na prehrani bogatoj mastima slične ljudskom metaboličkom sindromu (115–117). Budući da su fiziološki putevi regulacije apetita konzervirani u sisavaca, rezultati dobiveni životinjskim studijama mogu se prenijeti na ljude (118). Još jedan čimbenik koji je kod ljudi teže kontrolirati i zbog čega je logičniji odabir animalnoga modela, mogućnost je stroge kontrole unosa hrane.

Majčina prehrana bogata zasićenim masnim kiselinama tijekom gestacije i laktacije utječe na fiziologiju hranjena u glodavaca. Kod štakora, kao i kod ljudi, masna prehrana majke te nastavak takve prehrane u potomaka uzrokuje brojne metaboličke promjene koje su već spomenute ranije (16–19). Samim time ovakav model studije može biti koristan za određivanje ključnoga trenutka početka preventivnih zahvata ili može otvoriti nove mogućnosti terapije.



## **2. Hipoteza**

Prehrana majke tijekom trudnoće i laktacije te promjena režima prehrane kod muških potomaka štakora nakon toga perioda ima utjecaj na broj i površinu adipocita bijelog masnog tkiva te ekspresiju imunohistokemijskog bojenja masnog tkiva na TNF- $\alpha$ , kao i na razinu navedenog serumskog proupalnog citokina.

### 3. Ciljevi istraživanja

Specifični su ciljevi istraživanja:

- izmjeriti tjelesnu masu, dobitak na tjelesnoj masi i indeks tjelesne mase muških potomaka u svim skupinama životinja;
- izmjeriti koncentraciju kolesterola, triglicerida i glukoze u serumu muških potomaka svih skupina;
- odrediti koncentraciju adiponektina u serumu;
- odrediti koncentraciju TNF- $\alpha$  u serumu;
- kvantitativno i kvalitativno opisati morfologiju masnog tkiva u različitim odjeljcima bijelog masnog tkiva, odnosno utvrditi površinu i broj adipocita u ispitivanim odjeljcima bijelog masnog tkiva;
- međusobno usporediti intenzitet imunohistokemijskog obojenja na TNF- $\alpha$  u svim skupinama životinja;
- međusobno usporediti broj CD68 pozitivnih stanica po mm<sup>2</sup> masnog tkiva u svim skupinama životinja;
- testirati povezanost između intenziteta imunohistokemijskog obojenja na TNF- $\alpha$  i promjena u broju i površini adipocita.

## 4. Materijal i metode

### 4.1. Ustroj studije

U istraživanju je uporabljeno deset ženki Sprague-Dawley (*Rattus norvegicus*) štakora. Navedene su štakorice u 9. tjednu starosti randomizirano podijeljene u dvije skupine. Randomizacija je bila jednostavna, što znači da je svaka štakorica imala jednaku mogućnost biti podijeljena u kontrolnu ili ispitivanu skupinu (119), a provela se putem generatora slučajnih brojeva na internetskoj stranici <https://www.randomizer.org> (120). Svakoj je životinji dodijeljen kod (kombinacija slova i broja) kojim je označena kao jedinka i koji je uporabljen prilikom randomizacije.

Jedna je skupina štakorica bila hranjena standardnom laboratorijskom hranom (Mucedolla, Italija) (CD skupina; n = 5), a druga je skupina hranjena hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama (Žito d.o.o., Hrvatska) (HFD skupina; n = 5). Dijeta bogata zasićenim masnim kiselinama osmišljena je uz pomoć prehranbenog tehnologa Tomislava Ivankovića iz tvrtke Žito d.o.o. te proizvedena u kontroliranim uvjetima slijedeći upute o laboratorijskoj hrani u sklopu istraživanja na laboratorijskim životinjama i u skladu sa zakonima Europske Unije i Republike Hrvatske (Narodne novine br. 135/06, 37/13, 125/13, članak 40) (121). Smjesa je osmišljena po uzoru na tzv. „zapadnjačku“ dijetu u kojoj je opisani ukupni udio masti bio do 33 %, odnosno najviše do 45 % (122). Za razliku od palminog ulja u osmišljenoj masnoj dijeti koje sadrži 48,8 % zasićenih masnih kiselina (43,5 % palmitinske kiseline, 4,3 % stearinske kiseline, 1 % miristične kiseline), sojino ulje koje se nalazi u kontrolnoj dijeti na 100 g sadrži 58 g nezasićenih masnih kiselina. Veliki udio zasićenih masnih kiselina u prehrani prema do sada učinjenim studijama uzrokuje porast tjelesne mase, hiperkolesterolemiju LDL tipa, inzulinsku rezistenciju i veći rizik od nastanka srčane krvnožilne bolesti (122–125).

Ovo se istraživanje koncentriralo na muške potomke budući da studije s obzirom na drukčiji hormonalni status među spolovima pokazuju učestaliju perifernu pretilost kod žena, odnosno akumulaciju subkutanog masnog tkiva koje nije uzrok povećanog rizika za razvoj metaboličkog sindroma, a omjer subkutanog i visceralnog masnog tkiva smanjuje se ulaskom u menopauzu (126). Također, prilikom ekspanzije masnog tkiva kod osoba ženskog spola, kao i kod normalno teških osoba, postoji veća sklonost za zdraviji tip ekspanzije kroz hiperplaziju, za razliku od muških i pretilih subjekata (127). Za razliku od toga, muškarci su skloniji

centralnoj ili abdominalnoj pretilosti, koja se sastoji od nakupljanja visceralnog masnog tkiva i povezana je s većim rizikom za nastanak šećerne bolesti tipa 2, povišenog krvnog tlaka i krvnožilnih bolesti (128). To nije u tolikoj mjeri izraženo kod glodavaca, no dokazano je da ženke štakora imaju veću koncentraciju leptina u serumu u odnosu na mužjake, hormona koji inhibira glad, te veću osjetljivost mozga na navedeni hormon što generalno dovodi do veće akumulacije masnoga tkiva bez obzira na režim hranjenja (129).

U Tablici 4.1. naveden je sastav dijeta koje su uporabljene u pokusu.

**Tablica 4.1.** Sastav dijeta primijenjenih kod hranjenja kontrolnih i eksperimentalnih skupina štakora.

Udio namirnice u dijeti	CD*		HFD†
	≤ 14 tjedana starosti	> 14 tjedana starosti	
%			
Žitarice	53,7	66,5	30
Proteini biljnog porijekla (sojino brašno i kvasac)	30,5	18,2	27,2
Proteini životinjskog porijekla	4,7	3,5	
Stočna hrana‡	3,0	7,5	9,7
Mješavina vitamina i minerala§	4,1	3,2	3,9
Masti (sojino ulje)	1,4	0,4	28¶
Aminokiseline	0,1	0,1	0,1

\* standardna laboratorijska hrana

† hrana bogata zasićenim masnim kiselinama

‡ kukuruz, sojina sačma, dehidrirana lucerna, stočni kvasac, kukuruzni gluten, stočna kreda, sol, monokalcijev fosfat, melasa, magnezijev oksid

§ vitamin D3 i vitamin A, željezo, bakar, mangan, kobalt, cink i jod

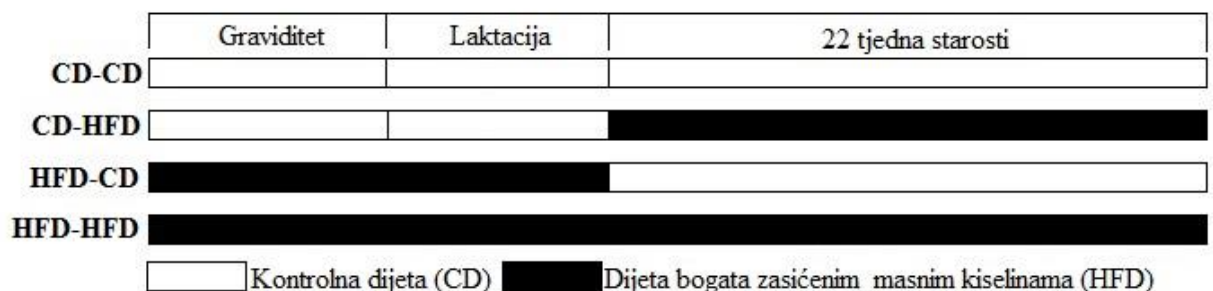
|| lizin, metionin, cistein, triptofan, arginin, valin, izoleucin, treonin

¶ masnoće u obliku palmina ulja

S navršenih 15 tjedana starosti štakorice su parene s istim mužjakom kako bi se izbjegao genetički diverzitet potomaka te utjecaj istoga na rezultate. Nakon 21 dana graviditeta leglo je smanjeno na jednak broj potomaka (n = 12) kako ne bi došlo do različitog odgovora s obzirom na veličinu legla.

Nakon graviditeta i laktacije u trajanju od, također 21 dana, muški su potomci randomizirano podijeljeni u četiri skupine na isti način koji je opisan kod podjele majki, od kojih je polovica hranjena standardnom laboratorijskom hranom, a polovica hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama (Slika 4.1.):

- 1) CD-CD skupina (potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom, n = 6),
- 2) CD-HFD skupina (potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom, n = 6),
- 3) HFD-CD skupina (potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama, n = 6),
- 4) HFD-HFD skupina (potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama, n = 6).



**Slika 4.1.** Prikaz protokola studije. CD-CD (majka i potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom), CD-HFD (masno hranjeni potomci standardno hranjenih majki), HFD-CD (standardno hranjeni potomci masno hranjenih majki) i HFD-HFD (majka i potomci hranjeni masnom hranom).

Pokus je osmišljen kao randomizirani kontrolirani pokus (130).

Muški potomci različitih skupina smješteni su u odvojene kaveze prostorija Vivarija Medicinskog fakulteta Osijek i držani su u kontroliranim temperaturnim uvjetima (temperatura prostorije 22 °C) uz ciklus svjetla i mraka s izmjenom svakih 12 sati (paljenje svjetla u 6 sati). Štakori koji su bili hranjeni standardnom laboratorijskom hranom (CD-CD i HFD-CD skupina) imali su slobodan pristup hrani i vodi, a skupinama potomaka koji su hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama (CD-HFD i HFD-HFD skupina) hrana je davana u 9 i u 16 sati

svakodnevno (ukupno 30 g dnevno). Tako se želio prevenirati nastanak pretilosti uzrokovan pretjeranim unosom masne hrane (131).

U 22. tjednu starosti životinje su žrtvovane injekcijom koktela ketamina 75 mg/kg (Ketanest S 25 mg/mL, 2 mL, Pfizer) i midazolama 0,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/mL, 3 mL, Torrex Chiesi Pharma).

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek (klasa: 602-04/14-08/06, ur. broj: 2158-61-07-14-13) i Ministarstvo poljoprivrede (klasa: UP/I-322-01/11-01/150, ur. broj: 525-06-1-0255/12-2) te je usklađeno prema Europskim direktivama o zaštiti životinja koje se koriste za znanstvene svrhe (Direktiva 210/63/EU). Uzgoj i provođenje istraživanja vođeno je od strane znanstvenih novaka-asistenata Katedre za anatomiju i neuroznanost koji posjeduju licencu za rad s laboratorijskim životinjama u znanstvene svrhe.

## **4.2. Uzimanje uzoraka za ispitivanje**

Nakon anestezije štakorima je uzimana krv iz ventrikula putem interkostalne punkcije (132), 30 min je ostavljena na sobnoj temperaturi, potom je centrifugirana na 3000 o./min 15 min, a serum smrznut na -20 °C.

Nakon toga izolirano je bijelo masno tkivo iz triju odjeljaka: subkutanog, i dva odjeljka visceralnog masnog tkiva: epididimalnog i perirealnog (133).

### **4.2.1. Mjerenje tjelesne mase i računanje indeksa tjelesne mase**

Tjelesna se masa mjerila periodički, prvi puta u 4. tjednu života (nakon laktacije i odvajanja od majke), u 8. (pubertet) i 18. tjednu (zrela jedinka) (134) te posljednji puta u trenutku žrtvovanja (22. tjedan života), tako da su potomci vagani Beurer KS 22 vagom (Peking, Kina). Mjerena je i duljina goljenične kosti mikrometarskim kaliperom od *tuberositas tibiae* do *malleolus medialis* u 22. tjednu života te je tada računat indeks tjelesne mase uporabljajući pojednostavljenu formulu: tjelesna masa (g)/(2 x ukupna duljina goljenične kosti)<sup>2</sup> (mm<sup>2</sup>) (135, 136). Ukupni je dobitak na tjelesnoj masi izračunat formulom: tjelesna masa u 22. tj./tjelesna masa u 4. tj. x 100 (%).

#### **4.2.2. Biokemijska analiza**

Iz seruma se koncentracija kolesterola (Beckman Coulter, Inc., OSR 6216, Indianapolis, SAD), triglicerida (Beckman Coulter, Inc., OSR 61118, Indianapolis, SAD) i glukoze (Beckman Coulter, Inc., OSR 6221, Indianapolis, SAD) odredila komercijalnim kitovima indirektnim spektrofotometrijskim određivanjem na Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek (137).

Koncentracija adiponektina određena je putem ELISA kita dostupnoga na tržištu za određivanje navedenog parametra kod štakora (Demeditec Diagnostics GmbH, Adiponectin rat ELISA, Kiel-Wellsee, Njemačka).

Koncentracija TNF- $\alpha$  u serumu određena je pomoću ELISA kita dostupnoga na tržištu za određivanje TNF- $\alpha$  kod štakora (BioVendor, Laboratory medicine, Češka) prema preporuci i protokolu proizvođača.

Uzorci su se mjerili u duplikatima zbog što točnijeg rezultata i zatim očitavali pomoću čitača mikrotitarskih pločica (ELISA) – BioRad 93200 PR3100 TSC Microplate Reader u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju Katedre za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

#### **4.2.3. Histomorfometrija masnog tkiva**

Bijelo je masno tkivo izolirano iz triju odjeljaka – subkutanog, epididimalnog i perirealnog, uzorci su fiksirani u formalinu i uklopljeni u parafin. Načinili su se prerezi debljine 6  $\mu$ m rabeći Leica RM550 kružni mikrotom (Leica, Beč, Austrija) te su presjeci obojeni histološkom bojom hemalaunom i eozinom. Mikroskopiranje uzoraka izvršeno je na Katedri za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku rabeći Olympus® BX-50 mikroskop (Olympus, Tokio, Japan) i Olympus C-5050 digitalnu kameru (Olympus, Tokio, Japan) koji su povezani na osobno računalo. Digitalne su slike usnimljene s povećanjem od 20 x te je potom izvršeno mjerenje.

Od 1968. g. opisivala se morfometrija adipocita metodom mućkanja masnog tkiva u mućkalici s kolagenazom kako bi se odvojile pojedine stanice koje su zatim fiksirane u trikloroocetnoj kiselini i glutaraldehidu ili osmiju, a promjer i broj stanica određeni su putem Zeiss analizatora ili Coulter brojača (138). No, kod fiksiranja stanica trikloroocetnom kiselinom i glutaraldehidom dolazi do destrukcije stanice kod velikih adipocita, a osmij, uz činjenicu da je toksičan, uzrokuje edem stanica. Sam postupak uporabe kolagenaze, razdvajanja stanica putem mreže i centrifugiranja može oštetiti ili izostaviti određene stanice (139). Iz navedenih razloga u ovom je istraživanju rabljena poluautomatska histomorfometrijska analiza histološki obojenih parafinskih rezova za koju je potrebna samo standardna i sigurna laboratorijska oprema.

Za histomorfometrijsku se analizu masnih tkiva rabio program CellProfiler v. 2.1.1 (Anne E. Carpenter, Thouis R. Jones & Lee Kamentsky), besplatni softver za histomorfometriju i fenotipizaciju stanica dostupan na stranici <http://www.cellprofiler.org> (140–143).

Protokol analize sastoji se od nekoliko modula kako bi se izdvojili rubni obrisi stanica i izmjerila površina svakog pojedinog adipocita.

Prvi je korak pretvaranje slike u boji u sivu cijepanjem crvenih, zelenih i plavih kanala u trima odvojenim slikama u sivim tonovima. Zatim su područja pojačanog intenziteta u odnosu na neposredne susjedne strukture, tzv. „pjega“ (engl. *speckle*) dodatno pojačana uporabom bijelog *tophat* filtera. U ovome slučaju pjega najčešće odgovara adipocitu.

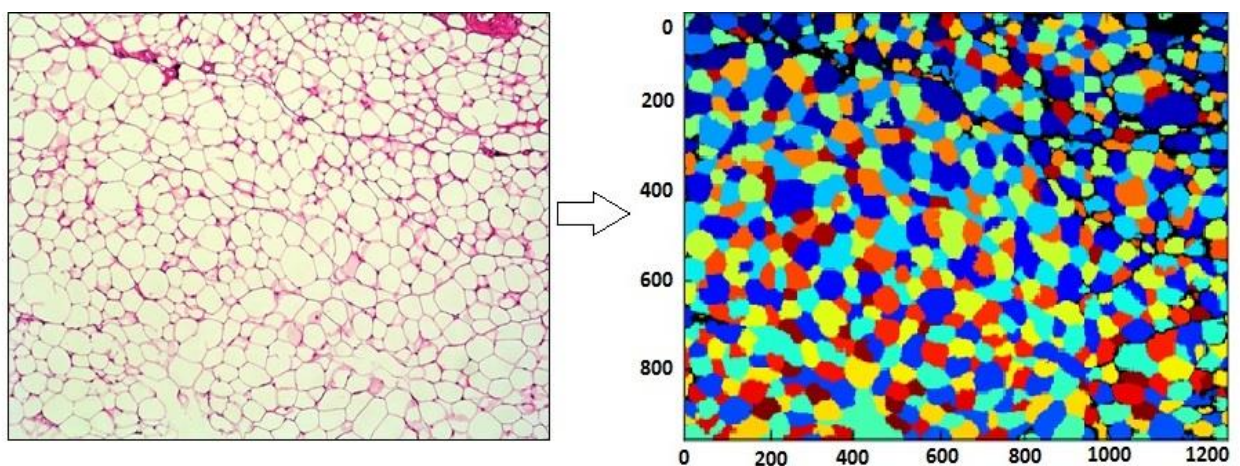
Drugi je korak identificiranje adipocita. To je učinjeno pomoću modula „*Primary Object Identification*“. Masne su stanice identificirane na temelju praga intenziteta i raspona promjera. Raspon promjera postavljen je ručno na oko 40-220 piksela (najmanja i najveća vrijednost) na temelju mjerenja koji su prethodili analizi. Objekti izvan raspona promjera, kao i oni koji su dodirivali granicu slike bili su odbačeni. Za određivanje praga intenziteta rabio se modificirani *Otsu* postupak, dobivši tri kanala različitog intenziteta: „*Foreground*“ („prvi plan“), „*Middle Intensity*“ („srednji intenzitet“) i „*Background*“ („pozadina“). Srednji intenzitet pridružen je pozadini kako bi se uklonilo vezivno tkivo, krvne žile i strukture koje ne odgovaraju masnim stanicama. Donja i gornja granica praga intenziteta postavljene su ručno na 0,7 i 1,0, a ukoliko je bilo neophodno granica je kasnije dodatno modificirana. U slučajevima kada je zbog gradijenta intenziteta jedan adipocit identificiran kao dva ili više objekata uporabljen je modul „*Object Numbers Reassignment*“ za spajanje objekata u jednu stanicu.



Završni je korak bilo mjerenje površine adipocita rabeći modul „*Objects Size/Shape Measurement*“ (Slika 4.2.). Rezultati su dobiveni u pikselima, a za pretvorbu u kvadratne mikrometre ( $\mu\text{m}^2$ ) korišten je izvorni mikrograf s mikrometrom.

Iz dobivenih površina i ukupnog broja adipocita na preparatu izračunat je broj adipocita po jedinici površine ( $/\mu\text{m}^2$ ).

Adipociti su podijeljeni u deset razreda ovisno o njihovoj površini u  $\mu\text{m}^2$  prema uzoru na istraživanje Strissel i sur. (105) (1. površina do  $1999 \mu\text{m}^2$ , 2. površina  $2000-2999 \mu\text{m}^2$ , 3. površina  $3000-3999 \mu\text{m}^2$ , 4. površina  $4000-4999 \mu\text{m}^2$ , 5. površina  $5000-5999 \mu\text{m}^2$ , 6. površina  $6000-6999 \mu\text{m}^2$ , 7. površina  $7000-7999 \mu\text{m}^2$ , 8. površina  $8000-8999 \mu\text{m}^2$ , 9. površina  $9000-10000 \mu\text{m}^2$  i 10. površina  $> 10000 \mu\text{m}^2$ ), nakon čega je izračunat postotak adipocita u pojedinom razredu ovisno o skupini muških potomaka štakora i odjeljku masnoga tkiva.



**Slika 4.2.** Prikaz obrade slike programom CellProfiler. S lijeve se strane vidi histološki preparat masnoga tkiva obojenog hemalaunom i eozinom, a s desne strane gotova obrada programom gdje su okruženi i označeni svi pojedinačni adipociti.

#### **4.2.4. Imunohistokemijska bojenja masnih tkiva**

##### **4.2.4.1. Imunohistokemijsko bojenje na TNF- $\alpha$**

Prerezi debljine 6  $\mu\text{m}$  učinjeni Leica RM550 kružnim mikrotomom (Leica, Beč, Austrija) nanošeni su na adhezivna predmetna stakla Dako (Dako, Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, SAD). Deparafinirani su kroz niz otopina: 100 % ksilol 2x30 min, 100 % etilni alkohol 2x5 min, 96 % etilni alkohol 2x5 min, 70 % etilni alkohol 2x5 min i zatim stavljeni kratko u  $\text{H}_2\text{O}$ . Nakon toga blokirana je endogena peroksidaza 0,3 postotnim vodikovim peroksidom ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) tijekom 15 min i učinjeno je izlaganje epitopa u citratnom puferu (pH 6,0) zagrijavanjem 3 min u mikrovalnoj pećnici. Blokiranje nespecifičnog vezanja učinilo se putem Super Block serum-free protein blocking buffera (Thermo Scientific, Rockford, SAD) na sobnoj temperaturi tijekom 30 min. Primarno poliklonalno zečje anti-TNF- $\alpha$  protutijelo (ab66579, Abcam Cambridge, Ujedinjeno kraljevstvo) (144–146) nanosilo se u koncentraciji 1:200 te je uslijedila inkubacija rezova na 4 °C preko noći, dok se na negativne kontrole nanosio PBS (pH 7,4) bez primarnog protutijela. Nakon inkubacije s primarnim protutijelom, rezovi su se ispirali u PBS-u u koji je dodan Tween (0,05 %) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) 4 puta po 5 minuta. Nakon toga nanoseno je sekundarno konjugirano kozje anti-zečje IgG H&L (HRP) protutijelo (ab97051, Abcam Cambridge, Ujedinjeno kraljevstvo) u razrjeđenju 1:200. Sekundarno protutijelo stajalo je 30 min na sobnoj temperaturi nakon čega je uslijedilo još četiri ispiranja po 5 min u PBS-u s 0,05 % Tweena. Nakon toga nanosena je otopina 3,3'-diaminobenzidina (DAB) pripremljena iz seta otopina DAB Peroxidase Substrate Kit (Vector Laboratories, Burlingame, SAD) i ostavljena najduže 2 min. Ponovno je uslijedilo ispiranje četiri puta po 5 min u PBS-u s 0,05 % Tweena, a zatim su rezovi obojeni hemalaunom i dehidrirani alkoholima (70 % etilni alkohol dva puta po 15 min, 96 % etilni alkohol dva puta po 15 minuta, 100 % ksilol dva puta po 20 min). Naposljetku je nanosen Canada balzam (Kremer Pigmente GmbH & Co. KG, Aichstetten, Njemačka) i stavljeno pokrovno staklo.

Postupak je proveden na Katedri za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Uzorci su fotografirani Olympus C-5050 digitalnom kamerom (Olympus, Tokio, Japan) spojenom na Olympus® BX-50 mikroskop (Olympus, Tokio, Japan) na Katedri za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

#### 4.2.4.2. Imunohistokemijsko bojenje na CD68

CD68 glikolizirani je membranski protein težine 119 kDa u uskoj vezi s obitelji lizosomno povezanih mucin-sličnih membranskih proteina i najčešće je rabljeni dijagnostički marker za identifikaciju makrofaga (147). Iako je CD68 predominantno smješten na lizosomnim membranama, djelomično se nalazi i na površini stanice (148). Imunohistokemijska ekspresija CD68 može se vidjeti u makrofagima, monocitima, neutrofilima, bazofilima, velikim limfocitima, mijeloidnim prekursorima, osteoklastima, mast i sinovijalnim stanicama, Langerhansovim stanicama, sarkomima i malignom melanomu (149).

Postupak imunohistokemijskog bojenja na CD68 proveden je na Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu Kliničke bolnice Osijek u Ventana BenchMark Ultra uređaju (Ventana Medical System, Inc., Arizona, SAD). Ventana BenchMark Ultra sustav je koji potpuno automatiziranim načinom rada imitira ručni način bojenja tkiva koji se rutinski rabi u imunohistokemiji te kapilarno nakapava protutijela i otopine. Programska podrška podržava ustaljeni protokol bojenja tkiva putem radnih stanica koje su umrežene ili putem samostalne konfiguracije.

Prilikom registracije protutijela CD68 u sustav Ventana BenchMark Ultra unesen je njegov protokol u uređaj. Svako je stakalce u uređaju prilikom unošenja protokola za njega dobilo svoj barkod, a cjelokupan proces rada uređaj kontrolira temeljem postavljenog barkoda te se svaki korak u procesu obavlja temeljem podataka unesenih barkodom u uređaj. Izrezano i osušeno predmetno stakalce s parafinskim rezom preparata uložilo se u uređaj te se u njemu obavila potpuno automatizirana deparafinizacija pomoću EZ Prep koncentrata (LOT 206236-01, REF 950-102) koji se razrijedio u omjeru 1:10, postavio u spremnik, a zatim ga je uređaj pumpom nanosio na preparat.

CD68 rađen je pomoću Ultra View Universal DAB Detection kita (REF 760-500, LOT G07369) od istog proizvođača kao i uređaj. Kit se sastoji od pet dispenzora u kojima se nalaze sljedeće otopine: UltraView Universal DAB Inhibitor (3 %  $H_2O_2$ ), UltraView Universal HRP Multimer, UltraView Universal DAB Chromogen (0,2 % DAB), UltraView DAB  $H_2O_2$  (0,4 %  $H_2O_2$ ) te UltraView Universal DAB Copper ( $CuSO_4$  g/L).

Nakon deparafinizacije slijedilo je ispiranje puferom za reakcije koji je razrijeđen tako da se 2 L reakcijskog pufera razrijedilo s 18 L destilirane vode (REF 950-300, LOT D05414). Razrijeđeni se pufer odložio u spremnik iz kojega uređaj povlači otopinu.

Inhibicija endogene peroksidaze obavila se UltraView Universal DAB Inhibitorom (3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) tijekom 10 minuta. Nakon toga slijedilo je ispiranje u puferu za reakcije. Razotkrivanje antigena u tkivu kao mogućeg mjesta vezivanja radilo se tako da uređaj je nakapavao Ultra CC1 (Ultra Cell Conditioner 1, pH 8,4) 30 minuta, a nakon toga se preparat ponovno isprao puferom za reakcije. Slijedilo je primarno anti-CD68 mišje monoklonalno protutijelo klase IgG1 kapa (CONFIRM anti-CD68 (KP-1), Ventana Medical System, Inc., Arizona, SAD) u razrijeđenju omjera 1:200 koje je stajalo na preparatu 30 minuta. Nakon toga slijedilo je ispiranje u puferu za reakcije. Razotkrivanje vezanih mjesta antigen-antitijelo pojačalo se Ultraview Universal HRP Multimerom te se preparat ponovno isprao puferom za reakcije.

Markiranje vezanih mjesta bojilo se UltraView DAB Chromogenom i Ultra View Universal DAB Copperom tijekom 5 minuta. Nakon ponovnog ispiranja u puferu za reakcije preparati su se bojili hemalaunom, ispirali destiliranom vodom, rehidrirali u rastućem nizu alkohola (70 %, 96 %, apsolutni alkohol), bistrili zamjenom ksilena, a nakon bistrenja su se pokrili u automatskom pokrivaču Dako Sakura (Dako, Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, SAD).

Nakon postupka, uzorci su fotografirani Olympus DP70 digitalnom kamerom (Olympus, Tokio, Japan) spojenom na Zeiss Axioskop 2 MOT mikroskop (Carl Zeiss Microscopy, LLC, NY, SAD) na Katedri za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

#### **4.2.5. Semikvantifikacija intenziteta imunohistokemijskog bojenja**

Nakon bojenja, svjetlosnim je mikroskopom analizirana pozitivna reakcija na navedena protutijela semikvantitativnom analizom.

Intenzitet imunohistokemijskog bojanja na TNF- $\alpha$  semikvantificirao se rabeći skalu 0-3 (0 – bez intenziteta, 1 – slab intenzitet, 2 – srednji intenzitet, 3 – jak intenzitet bojenja). Svjetlosnim mikroskopom analizirana su četiri preparata po grupi i odjeljku masnog tkiva u trima poljima pod povećanjem 100 x od strane tri neovisna istraživača, a srednja vrijednost mjerenja uključena je u statističku analizu.

Kod imunohistokemijskog bojenja tkiva s CD68 protutijelom utvrdio se broj CD68 pozitivnih stanica (smeđe obojenje) u kvadratnom milimetru tkiva, svjetlosnim mikroskopom

Olympus CX40 (Olympus, Tokio, Japan), na šest velikih vidnih povećanja mikroskopa, tipičnog povećanja okulara 10 x i objektiva 40 x (vidno polje od približno 0,17 mm<sup>2</sup>) (150).

### 4.3. Statistička analiza

Za statističku su se analizu rabili programi Dell Statistica (inačica 13, Dell Inc., Tulsa, SAD) i IBM SPSS Statistics (inačica 21, IBM Corporation, NY, SAD).

Za uočavanje učinka 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 (151). Numerički su podatci izraženi medijanom i granicama interkvartilnog raspona, a grafički Whisker bar grafovima. Normalnost raspodjele numeričkih podataka testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Zbog asimetrične raspodjele te s obzirom na ograničen broj štakora po skupini zbog zakonskih odredbi za uporabu životinja u znanstvene svrhe rabljeni su neparametrijski testovi. Razlike numeričkih varijabli svih četiriju nezavisnih skupina testirane su Kruskal-Wallisovim testom uz *post hoc* Mann-Whitneyjev U test i Bonferronijevu korekciju. Povezanost numeričkih varijabli ocijenjena je Spearmanovim koeficijentom korelacije  $\rho$  (rho). Statistička značajnost ocjenjivana je zaključivanjem s obzirom na dobivenu P vrijednost u usporedbi s razinom značajnosti  $\alpha = 0,05$  pri čemu se vrijednosti  $P < \alpha$  ocjenjuju kao statistički značajne (152).

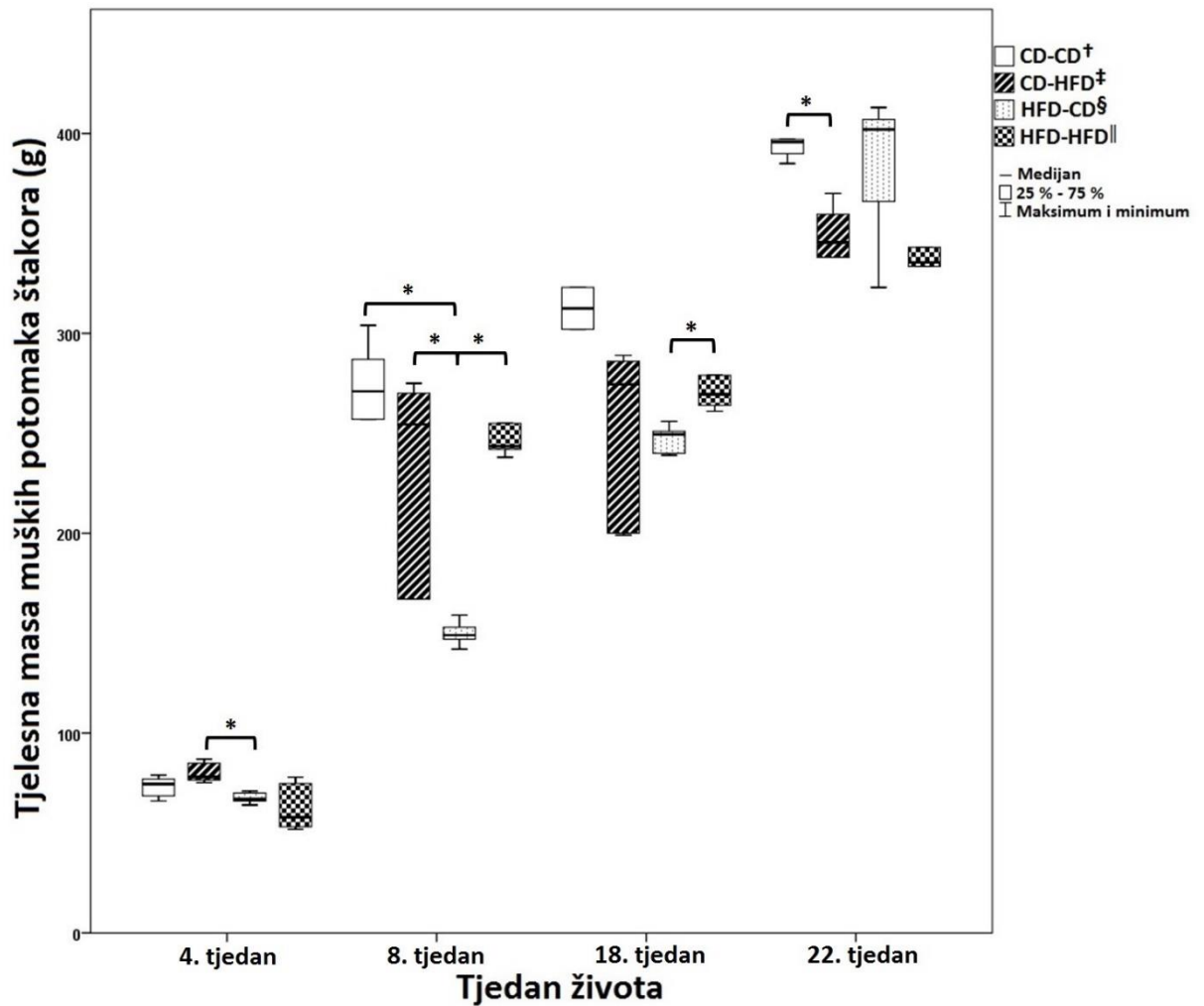
## 5. Rezultati

### 5.1. Tjelesna masa, dobitak na tjelesnoj masi i indeks tjelesne mase

Tjelesna je masa u 4. tjednu starosti nakon laktacije i odvajanja od majke bila veća u skupinama u kojima je majka bila hranjena standardnom laboratorijskom hranom (CD-CD i CD-HFD) nego hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama (HFD-CD i HFD-HFD) (Slika 5.1.). Najmanja zabilježena tjelesna masa bila je u HFD-HFD skupini (57,90 (53,10 – 74,80) g), a najveća u CD-HFD skupini (78,05 (76,50 – 85,00) g). Kruskal-Wallisovim testom pokazana je značajna razlika u tjelesnoj masi u 4. tjednu starosti među skupinama ( $P = 0,009$ ), a *post hoc* analizom pronađena je značajno veća masa muških potomaka štakora CD-HFD skupine u odnosu na HFD-CD skupinu ( $P = 0,012$ , Man-Whitneyjev U test) (Slika 5.1.).

U 8. i 18. tjednu starosti najmanju izmjerenu tjelesnu masu imali su muški potomci HFD-CD skupine, a najveću CD-CD skupine (Slika 5.1.). Kruskal-Wallisovim testom dobivena je značajna razlika u tjelesnoj masi među skupinama u oba spomenuta tjedna života ( $P = 0,002$  za 8. tjedan i  $P = 0,02$  za 18. tjedan). U 8. je tjednu skupina HFD-CD (149,00 (147,00 – 153,00) g) imala značajno nižu tjelesnu masu u usporedbi sa svim ostalim skupinama ( $P = 0,012$ , Man-Whitneyjev U test), dok je u 18. tjednu već spomenuta skupina HFD-CD imala značajno nižu tjelesnu masu (249,50 (240,00 – 251,00) g) uspoređujući je s HFD-HFD skupinom ( $P = 0,012$ , Man-Whitneyjev U test) (Slika 5.1.).

U 22. tjednu starosti tjelesna masa muških potomaka štakora bila je viša u skupinama hranjenim standardnom laboratorijskom hranom (CD-CD i HFD-CD) nego masnom hranom (Slika 5.3.), pri čemu su štakori bili najteži u HFD-CD skupini (402,00 (357,20 – 410,00) g). Najlakši su bili muški potomci HFD-HFD skupine (335,50 (333,50 – 343,00) g). Postoji značajna razlika uspoređujući tjelesne mase među skupinama ( $P = 0,026$ , Kruskal-Wallisov test), a kontrolna skupina ima značajno višu tjelesnu masu u odnosu na CD-HFD skupinu ( $P = 0,012$ , Man-Whitneyjev U test) (Slika 5.1.).



**Slika 5.1.** Tjelesna masa 4.-22. tjedna starosti kod muških potomaka štakora.

\* Man-Whitneyjev U test,  $P = 0,012$

† muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom

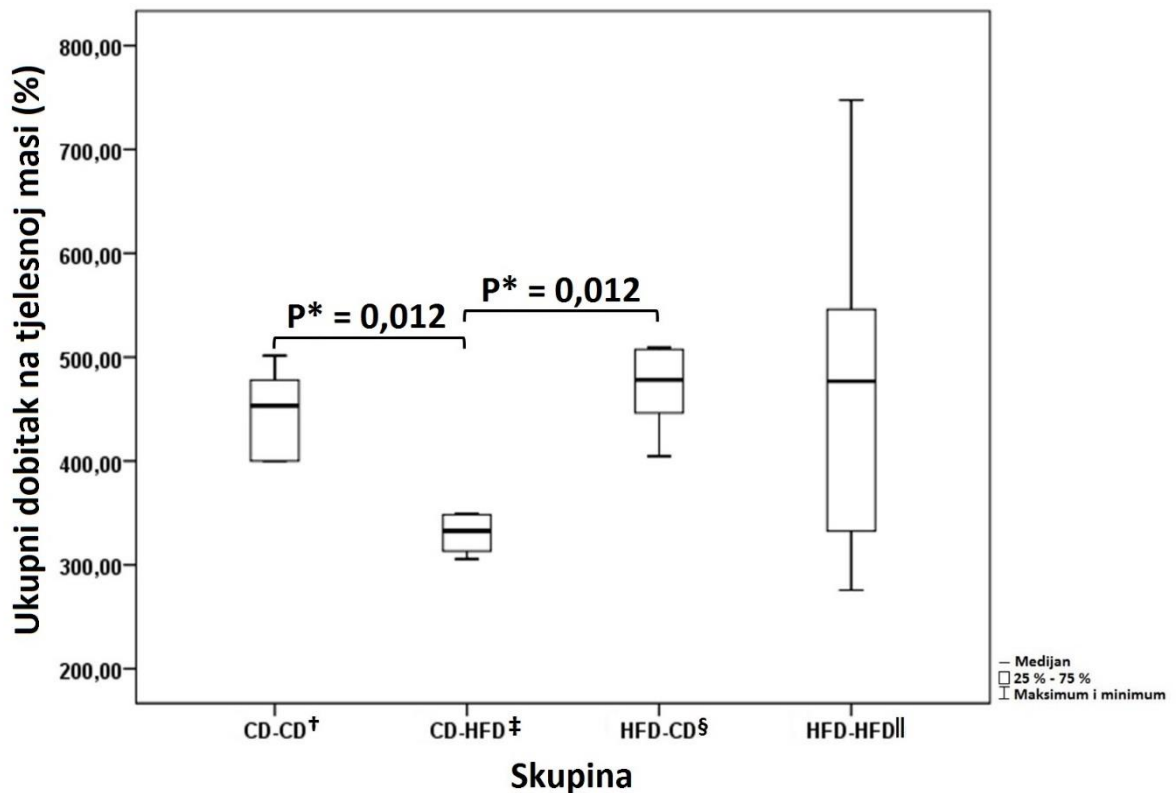
‡ muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićeni masnim kiselinama majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom

§ muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama

|| muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama

Uspoređujući početnu i konačnu masu najveći dobitak na tjelesnoj masi tijekom eksperimenta imale su skupine muških potomaka majki koje su bile hranjene masnom hranom (Slika 5.2.), a razlike između skupina bile su značajne ( $P = 0,022$ , Kruskal-Wallisov test). Najveći dobitak na tjelesnoj masi imala je skupina HFD-CD (478,10 (446,27 – 507,46) %), odmah praćena skupinom HFD-HFD, a najmanji dobitak na tjelesnoj masi imala je skupina CD-HFD (332,66 (313,22 – 348,37) %). Skupina CD-HFD pokazala je značajno manji dobitak

na tjelesnoj masi kada je uspoređena s kontrolnom skupinom ( $P = 0,012$ , Mann-Whitneyjev U test) i skupinom HFD-CD ( $P = 0,012$ , Mann-Whitneyjev U test) (Slika 5.2.).



**Slika 5.2.** Ukupni dobitak na tjelesnoj masi muških potomaka štakora tijekom eksperimenta.

\* Man-Whitneyjev U test

† muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom

‡ muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom

§ muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama

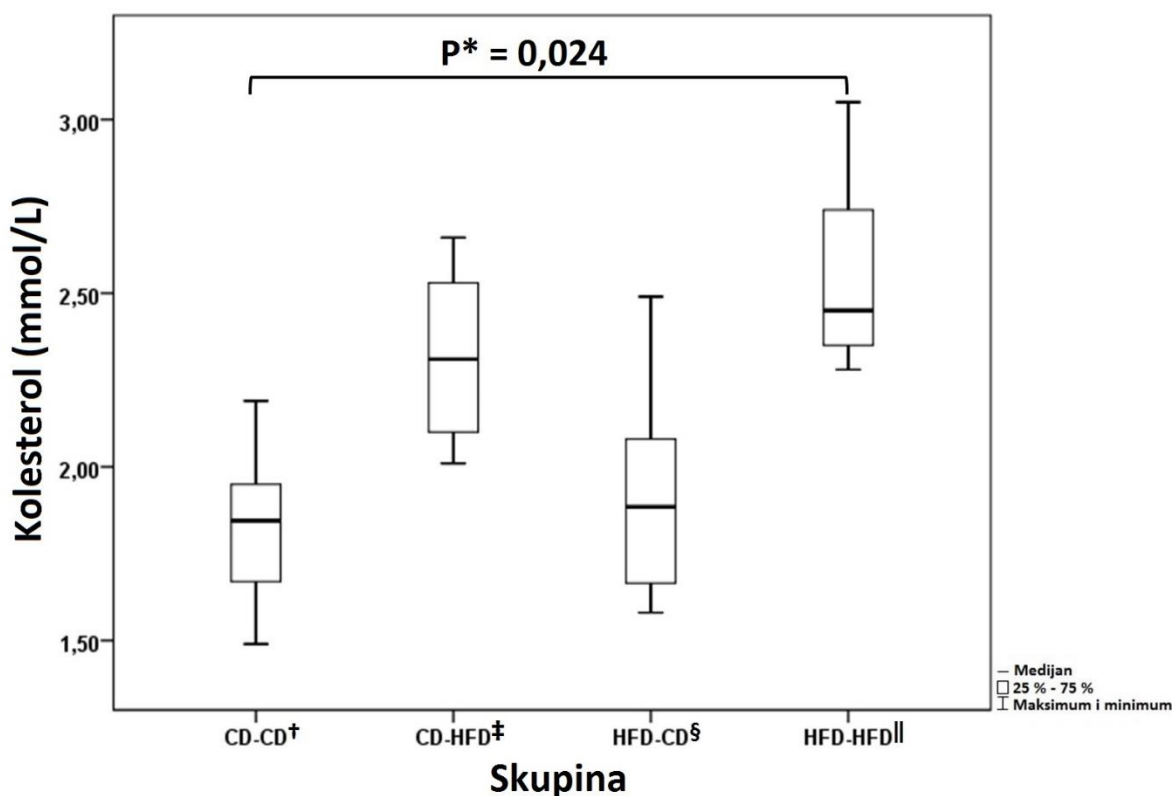
|| muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama

Indeks tjelesne mase bio je najmanji u HFD-CD skupini ( $0,051$  ( $0,049 - 0,052$ )  $g/mm^2$ ), a najveći u HFD-HFD skupini ( $0,059$  ( $0,047 - 0,059$ )  $g/mm^2$ ). Indeks je tjelesne mase u kontrolnoj skupini iznosio  $0,055$  ( $0,049 - 0,059$ )  $g/mm^2$ , a u CD-HFD skupini  $0,053$  ( $0,050 - 0,054$ )  $g/mm^2$ . Statističkom analizom nije nađena značajna razlika u indeksu tjelesne mase između skupina ( $P = 0,473$ , Kruskal-Wallisov test).



## 5.2. Kolesterol, trigliceridi, glukoza, adiponektin i TNF- $\alpha$ u serumu

Najviša koncentracija kolesterola u serumu izmjerena je kod potomaka hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama (Slika 5.3.) pri čemu je najviša bila u HFD-HFD skupini (2,45 (2,35 – 2,74) mmol/L), a nakon toga u CD-HFD skupini (2,31 (2,10 – 2,53) mmol/L). Najniža serumska koncentracija kolesterola izmjerena je u kontrolnoj skupini (1,85 (1,67 – 1,95) mmol/L). Kruskal-Wallisovim testom pokazana je značajna razlika u koncentraciji kolesterola među skupinama ( $P = 0,004$ ). Skupina HFD-HFD imala je značajno višu razinu kolesterola u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $P = 0,024$ , Mann-Whitneyjev U test) (Slika 5.3).



**Slika 5.3.** Koncentracija kolesterola u serumu muških potomaka štakora nakon 22 tjedna hranjenja standardnom laboratorijskom hranom ili masnom ishranom.

\* Man-Whitneyjev U test

† muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom

‡ muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom

§ muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama

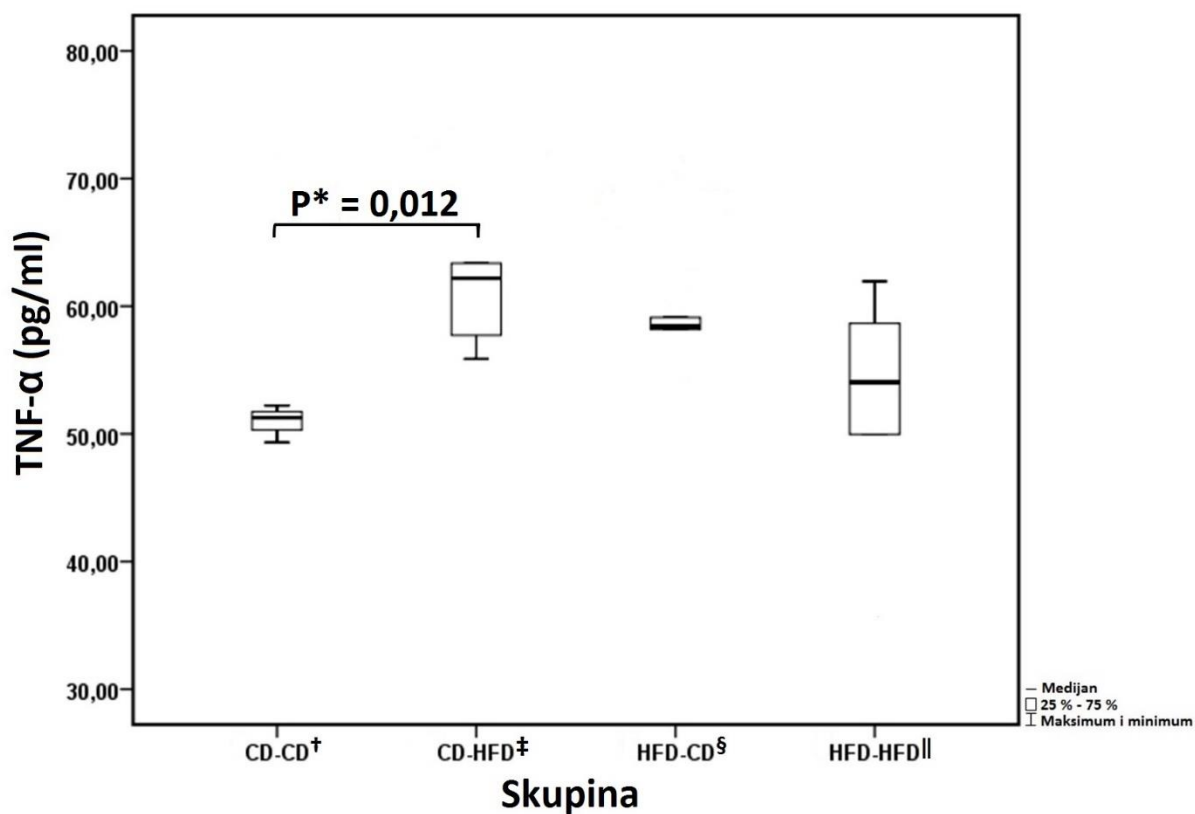
|| muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama

Trigliceridi su u serumu bili najniži u CD-HFD skupini, a najviši u HFD-HFD skupini. Općenito su muški potomci majki koje su bile hranjene masnom hranom imali više serumske razine triglicerida (1,03 (0,87 – 1,27) mmol/L u HFD-CD skupini i 1,12 (1,03 – 1,15) mmol/L u HFD-HFD skupini) u odnosu na potomke majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom (0,78 (0,74 – 0,95) mmol/L u CD-HFD skupini i 0,83 (0,81 – 0,84) mmol/L u CD-CD skupini), no razlika između skupina nije bila značajna ( $P = 0,086$ , Kruskal-Wallisov test).

Glukoza je iznosila 10,25 (9,00 – 10,90) mmol/L u CD-CD skupini, 9,35 (7,20 – 9,70) mmol/L u CD-HFD skupini, 9,95 (8,30 – 12,10) mmol/L u HFD-CD skupini te 8,90 (7,95 – 10,70) mmol/L u HFD-HFD skupini. Skupine potomaka hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama (CD-HFD i HFD-HFD) imale su nešto niže razine glukoze u serumu u odnosu na skupine potomaka hranjenih kontrolnom dijetom (CD-CD i HFD-CD), no usporedbom među skupinama nije bilo značajne razlike ( $P = 0,652$ , Kruskal-Wallisov test).

Najviša je koncentracija adiponektina izmjerena u CD-HFD skupini (16,97 (16,42 – 17,15)  $\mu\text{L/ml}$ ), a najniža u kontrolnoj skupini (15,91 (15,08 – 16,19)  $\mu\text{L/ml}$ ). Koncentracija je adiponektina u serumu HFD-CD skupine iznosila 16,18 (14,43 – 16,65)  $\mu\text{L/ml}$ , a 16,40 (14,58 – 17,05)  $\mu\text{L/ml}$  kod HFD-HFD skupine. Općenito je koncentracija adiponektina u serumu bila nešto viša u skupinama kod kojih su potomci bili hranjeni masnom hranom, no usporedbom skupina nije nađena značajna razlika ( $P = 0,097$ , Kruskal-Wallisov test).

Utvrđena je značajna razlika u koncentraciji TNF- $\alpha$  u serumu između skupina ( $P = 0,027$ , Kruskal-Wallisov test). Koncentracija je TNF- $\alpha$  bila najviša u skupini CD-HFD (62,19 (57,72 – 63,37) pg/ml), što je prema *post hoc* analizi bilo značajno više u usporedbi sa skupinom s najnižom koncentracijom TNF- $\alpha$  (51,27 (49,33 – 52,22) pg/ml), tj. CD-CD skupinom ( $P = 0,012$ , Mann-Whitneyjev U test) (Slika 5.4.).



**Slika 5.4.** Koncentracija TNF- $\alpha$  u serumu muških potomaka štakora nakon 22 tjedna hranjenja standardnom laboratorijskom hranom ili masnom ishranom.

\* Man-Whitneyjev U test

† muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom

‡ muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićeni masnim kiselinama majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom

§ muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama

|| muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama

### 5.3. Histomorfometrija masnih tkiva

#### 5.3.1. Subkutano masno tkivo

Srednja vrijednost površine adipocita subkutanog masnog tkiva bila je veća u skupinama s promijenjenom prenatalnom i postnatalnom prehranom (CD-HFD i HFD-CD) nego u skupinama u kojima tip prehrane nije bio mijenjan (CD-CD i HFD-HFD) (Tablica 5.1., Slika 5.5.). Najveću površinu stanice imala je skupina CD-HFD, a najmanju površinu skupina HFD-HFD, no bez statističke značajnosti između svih skupina ( $P = 0,138$ , Kruskal-Wallisov test) (Tablica 5.1.).

Broj adipocita po jedinici površine obrnuto proporcionalno je korelirao s površinom adipocita pa je tako najmanji broj adipocita zabilježen u CD-HFD skupini, a najveći u HFD-HFD skupini (Tablica 5.1., Slika 5.5.). Kruskal-Wallisovim testom nije nađena značajna razlika u broju adipocita između skupina ( $P = 0,086$ , Tablica 5.1.).

**Tablica 5.1.** Srednja vrijednost površine i broj adipocita subkutanog masnog tkiva muških potomaka štakora u 22. tjednu starosti.

Medijan (interkvartilni raspon)		
	Površina adipocita ( $\mu\text{m}^2$ )	Broj adipocita po jedinici površine ( $\times 10^{-4}/\mu\text{m}^2$ )
CD-CD†	2273,29 (2113,56 – 2550,25)	3,53 (3,42 – 3,59)
CD-HFD‡	2713,87 (2202,79 – 3242,62)	3,20 (2,34 – 3,74)
HFD-CD§	2653,19 (1955,36 – 3136,01)	3,22 (2,55 – 3,97)
HFD-HFD	2115,96 (1645,69 – 2268,18)	3,89 (3,73 – 4,17)
P*	0,138	0,086

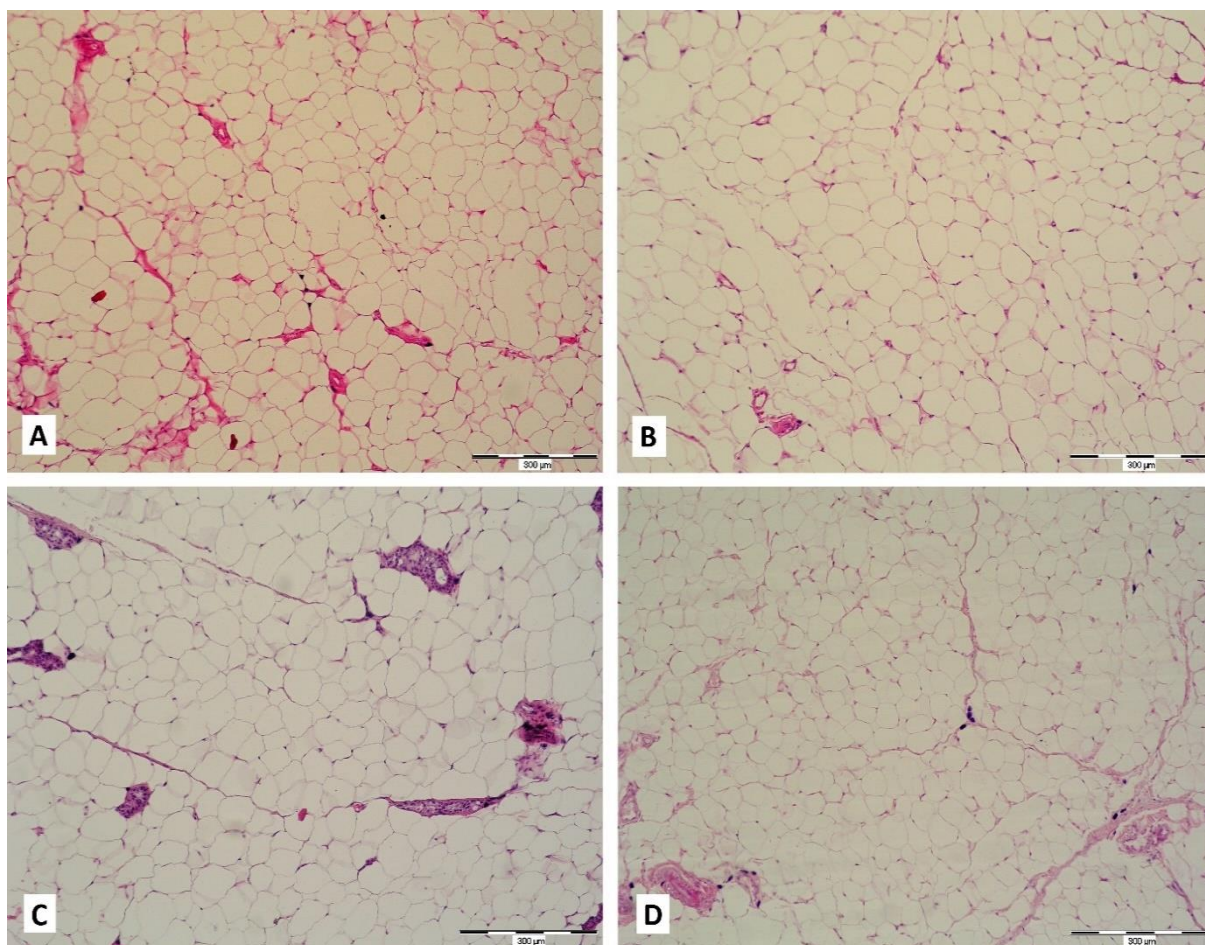
\* Kruskal-Wallisov test

† muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom

‡ muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom

§ muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama

|| muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama



**Slika 5.5.** Reprezentativni prikaz histološkog preparata subkutanog masnog tkiva četiriju skupina ispitivanih muških potomaka štakora. (A) CD-CD muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom, (B) CD-HFD muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićeni masnim kiselinama majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom, (C) HFD-CD muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama, (D) HFD-HFD muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama. Bojenje: hemalaun eozin. Mjerilo: 300 µm.

### 5.3.2. Visceralno masno tkivo

#### 5.3.2.1. Epididimalno masno tkivo

Srednja vrijednost površine masne stanice bila je najveća u HFD-CD skupini, a najmanja u HFD-HFD skupini (Tablica 5.2., Slika 5.7.). Manje površine adipocita zabilježene su u skupinama u kojima nije promijenjena postnatalna prehrana (CD-CD i HFD-HFD) u odnosu na skupine s promijenjenom prehranom, no statistički nije zabilježena značajna razlika među skupinama ( $P = 0,276$ , Kruskal-Wallisov test) (Tablica 5.2.).

Sukladno najvećoj srednjoj vrijednosti površine stanica, najmanji broj adipocita po jedinici površine zabilježen je u HFD-CD skupini, a najveći broj adipocita po jedinici površine izbrojan je u HFD-HFD skupini ( $2,99 (2,88 - 3,12) \times 10^{-4} / \mu\text{m}^2$ ) (Tablica 5.2.). Između skupina bila je zabilježena značajna razlika ( $P = 0,036$ , Kruskal-Wallisov test), a u *post hoc* analizi broj je adipocita bio značajno veći u skupini u kojoj su i majka i potomci bili hranjeni masno uspoređujući je s HFD-CD skupinom ( $P = 0,012$ , Mann-Whitneyjev U test) (Slika 5.6.).

**Tablica 5.2.** Srednja vrijednost površine i broj adipocita epididimalnog masnog tkiva muških potomaka štakora u 22. tjednu starosti.

Medijan (interkvartilni raspon)		
	Površina adipocita ( $\mu\text{m}^2$ )	Broj adipocita po jedinici površine ( $\times 10^{-4} / \mu\text{m}^2$ )
CD-CD†	2746,93 (2242,03 – 3019,36)	2,88 (2,36 – 3,35)
CD-HFD‡	2875,51 (2283,35 – 3353,10)	2,61 (2,41 – 3,40)
HFD-CD§	3219,18 (2832,09 – 4079,17)	2,26 (1,95 – 2,34)
HFD-HFD	2610,81 (2574,72 – 2715,96)	2,99 (2,88 – 3,12)
P*	0,276	0,036

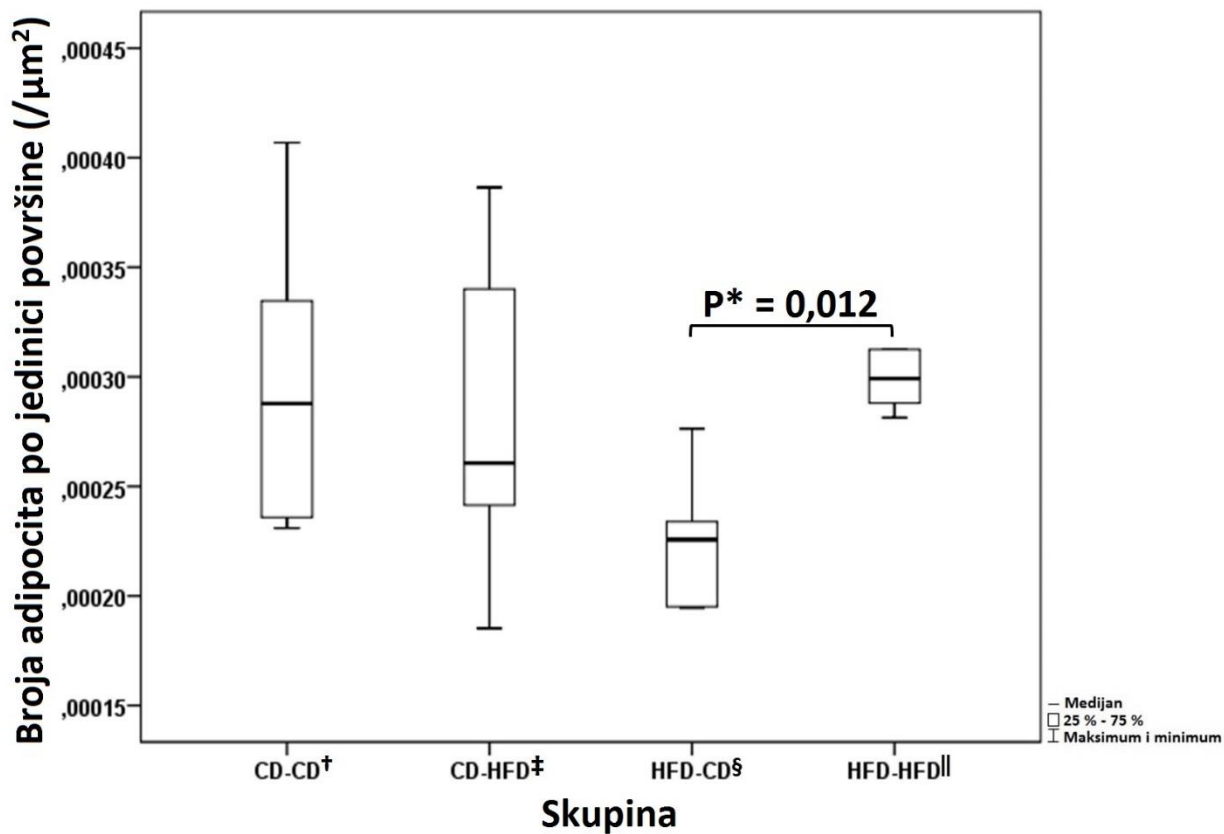
\* Kruskal-Wallisov test

† muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom

‡ muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićeni masnim kiselinama majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom

§ muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama

|| muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama



**Slika 5.6.** Broj adipocita po jedinici površine u epididimalnom masnom tkivu muških potomaka štakora u 22. tjednu starosti.

\* Man-Whitneyjev U test

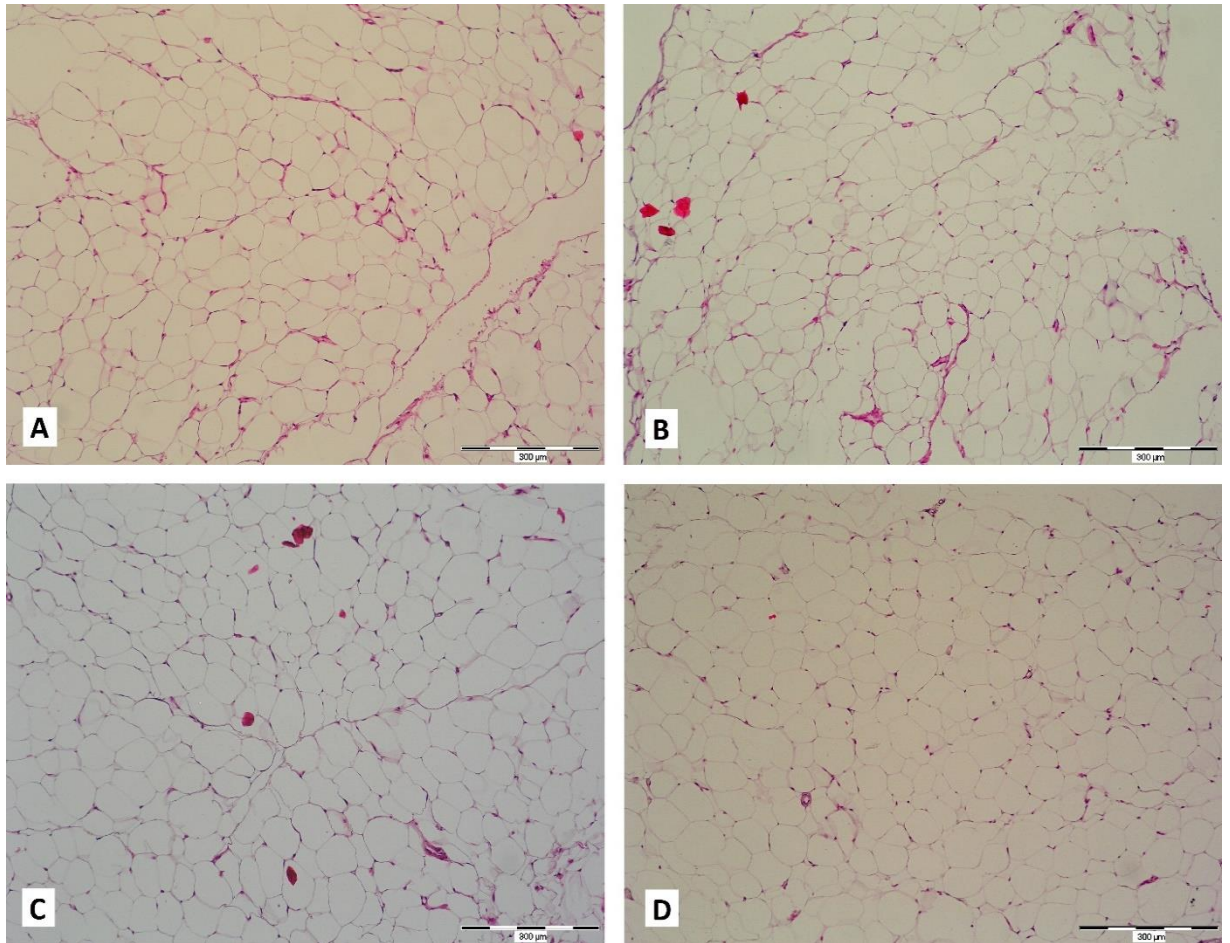
† muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom

‡ muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom

§ muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama

|| muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama





**Slika 5.7.** Reprezentativni prikaz histološkog preparata epididimalnog masnog tkiva četiriju skupina ispitivanih muških potomaka štakora. (A) CD-CD muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom, (B) CD-HFD muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićeni masnim kiselinama majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom, (C) HFD-CD muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama, (D) HFD-HFD muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama. Bojenje: hemalaun eozin. Mjerilo: 300 µm.



### 5.3.2.2. Perirenalno masno tkivo

Najmanju srednju vrijednost površine adipocita perirealnog masnog tkiva imali su potomci HFD-HFD skupine, a najveća površina izmjerena je kod potomaka u CD-CD skupini (Tablica 5.5.). Uspoređujući srednju površinu adipocita nađena je značajna razlika između skupina ( $P = 0,046$ , Kruskal-Wallisov test) (Tablica 5.3.).

Najveći broj adipocita po jedinici površine zabilježen je u HFD-HFD skupini što je bilo značajno veće u odnosu na CD-HFD i HFD-CD skupinu ( $P = 0,012$ , Mann-Whitneyjev U test) (Slika 5.8.). Najmanji broj adipocita bio je u CD-CD skupini (Slika 5.9.) sukladno njihovoj najvećoj površini, a Kruskal-Wallisovim testom nađena je značajna razlika u broju adipocita između svih grupa ( $P = 0,007$ ) (Tablica 5.3.).

Prikaz histoloških uzoraka svih skupina perirealnog masnog tkiva vidi se na Slici 5.9.

**Tablica 5.3.** Srednja vrijednost površine i broj adipocita perirealnog masnog tkiva muških potomaka štakora u 22. tjednu starosti.

Medijan (interkvartilna razlika)		
	Površina adipocita ( $\mu\text{m}^2$ )	Broj adipocita po jedinici površine ( $\times 10^{-4} / \mu\text{m}^2$ )
CD-CD†	2127,47 (1760,09 – 2768,89)	3,28 (2,53 – 4,52)
CD-HFD‡	2007,67 (1827,20 – 2619,71)	3,32 (2,53 – 3,95)
HFD-CD§	1936,53 (1891,55 – 2478,47)	3,55 (3,09 – 4,14)
HFD-HFD	1146,13 (695,73 – 1740,89)	6,58 (4,52 – 9,49)
P*	0,046	0,007

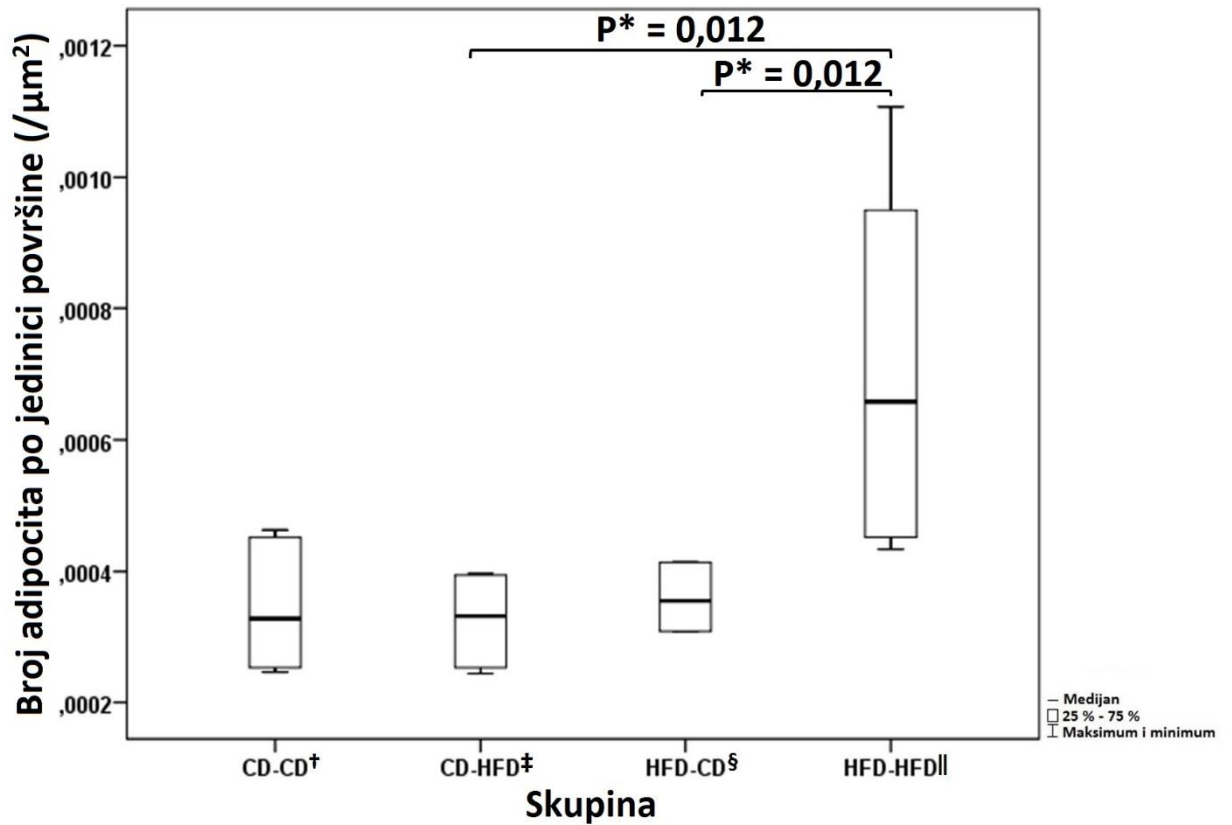
\* Kruskal-Wallisov test

† muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom

‡ muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićeni masnim kiselinama majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom

§ muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama

|| muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama



**Slika 5.8.** Broj adipocita po jedinici površine u perirenalnom masnom tkivu muških potomaka štakora u 22. tjednu starosti.

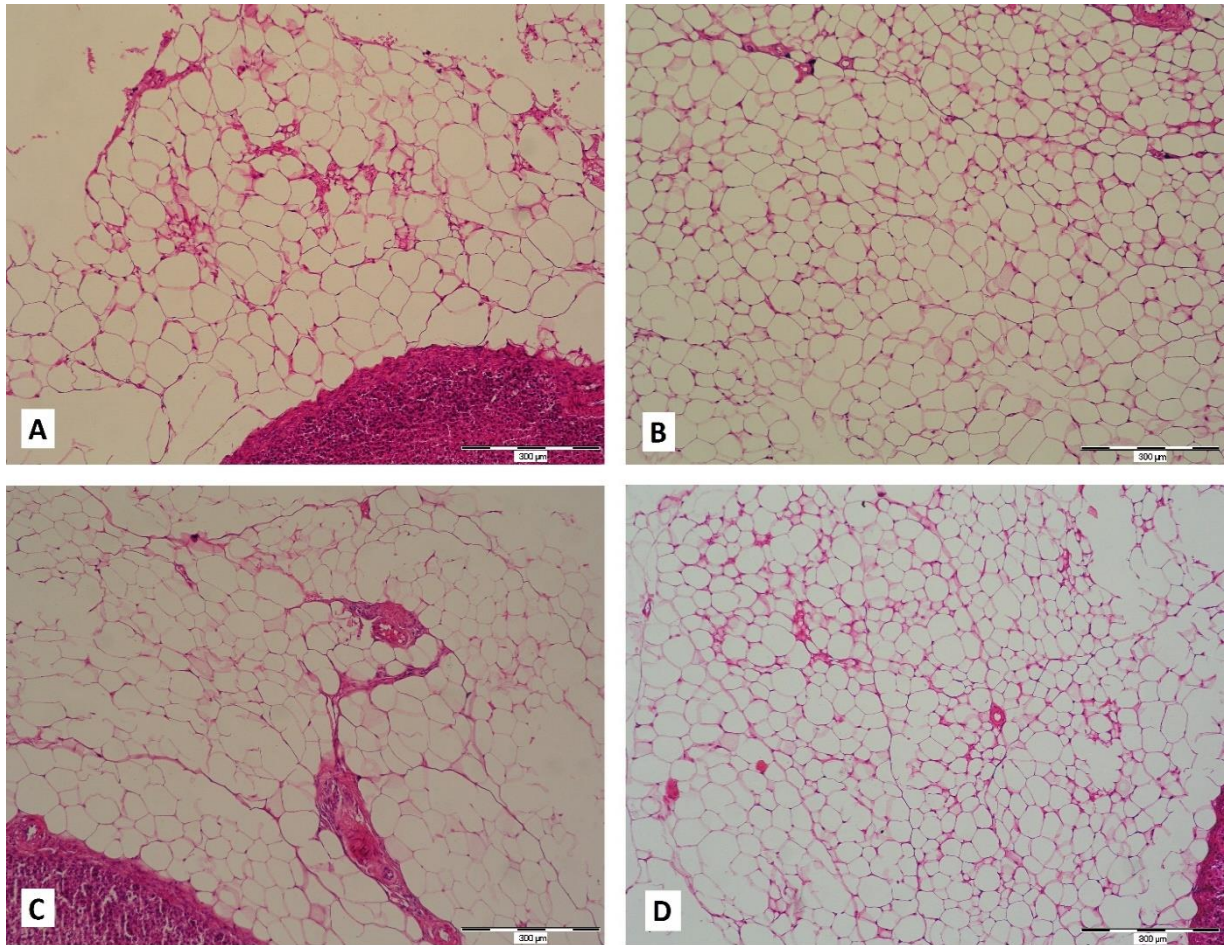
\* Man-Whitneyjev U test

† muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom

‡ muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićeni masnim kiselinama majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom

§ muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama

|| muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama



**Slika 5.9.** Reprezentativni prikaz histološkog preparata perirealnog masnog tkiva četiriju skupina ispitivanih muških potomaka štakora. (A) CD-CD muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom, (B) CD-HFD muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićeni masnim kiselinama majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom, (C) HFD-CD muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama, (D) HFD-HFD muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama. Bojenje: hemalaun-eozin. Mjerilo: 300 µm.

### 5.3.3. Distribucija površine adipocita u masnim tkivima

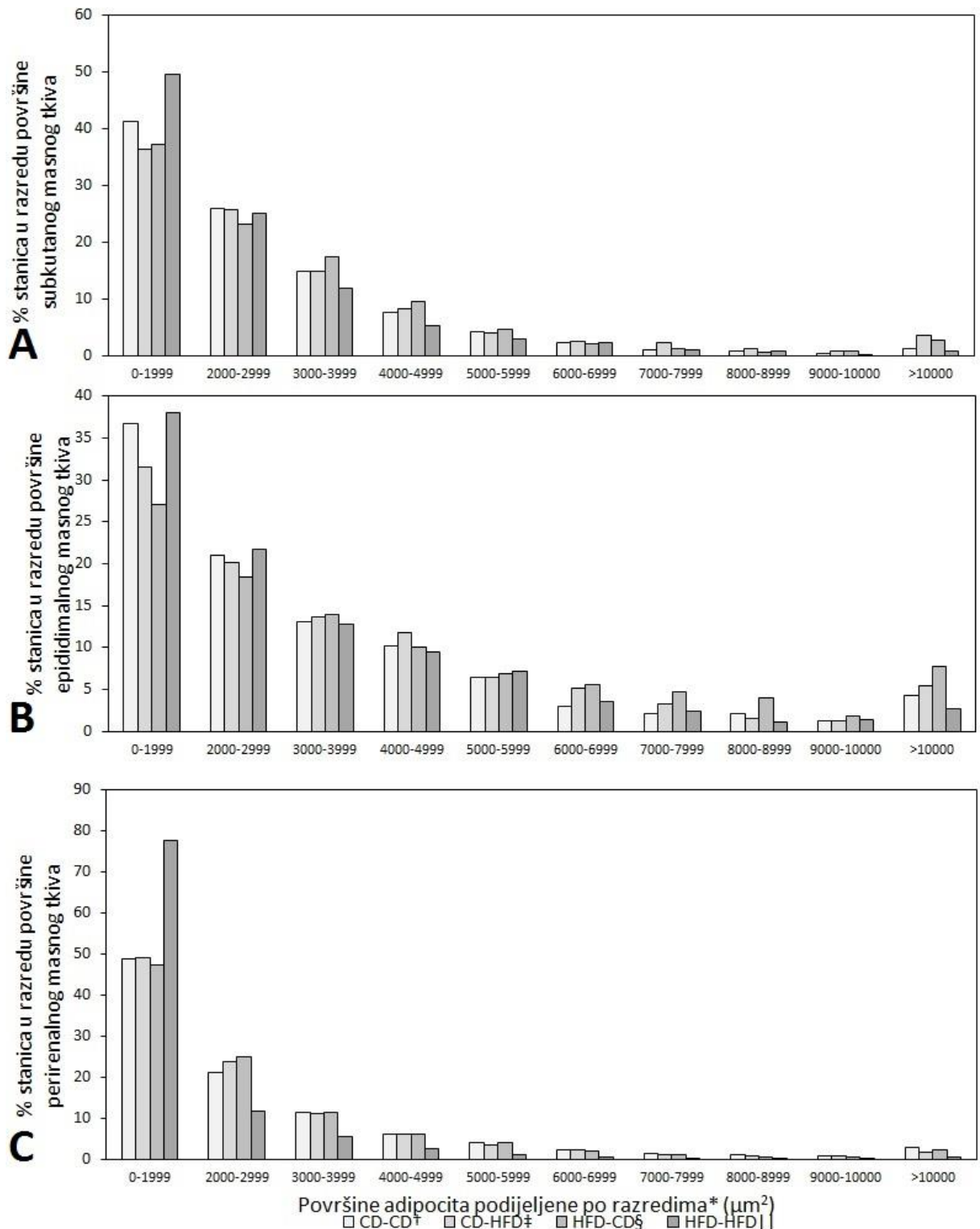
Rezultati su distribucije površine adipocita po odjeljcima masnih tkiva i skupinama muških potomaka štakora prikazani na Slici 5.10.

U subkutanom i epididimalnom masnom tkivu vidi se da je postotak stanica manjih površina veći u skupinama s nepromijenjenom prehranom (CD-CD i HFD-HFD), dok se postotak adipocita površine od  $2000 \mu\text{m}^2$  i više povećava u skupinama s promijenjenom intrauterinom/postnatalnom prehranom (CD-HFD i HFD-CD), a pogotovo je veći postotak adipocita s površinom  $> 10000 \mu\text{m}^2$  u tim skupinama.

Primjećuje se da je u ovima dvama odjeljcima masnih tkiva najveći dio malih adipocita (površine do  $2000 \mu\text{m}^2$ ) bio izbrojen u HFD-HFD skupini.

U perirenalnom masnom tkivu izrazito je visok postotak adipocita s površinom do  $2000 \mu\text{m}^2$  u HFD-HFD skupini, a veći je postotak adipocita površine do  $2000 \mu\text{m}^2$  u svim skupinama u usporedbi sa subkutanom i epididimalnim masnim tkivom.

Općenito sve ispitivane skupine imaju veći postotak manjih adipocita (površine do  $5000 \mu\text{m}^2$ ) u perirenalnom masnom tkivu u odnosu na subkutano i epididimalno masno tkivo.



**Slika 5.10.** Distribucija površine adipocita po razredima površina u ispitivanim odjeljcima masnih tkiva muških potomaka štakora u 22. tjednu starosti. (A) Subkutano masno tkivo, (B) Epididimalno masno tkivo, (C) Perirenalno masno tkivo. \*razredi po Strissel i sur. (105)

† muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom

‡ muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom

§ muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama

|| muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama

#### 5.4. Imunohistokemijsko bojenje masnih tkiva na TNF- $\alpha$

Signal TNF- $\alpha$  u adipocitima uglavnom je blag na svim pregledanim preparatima (u par je iznimaka bio srednjeg intenziteta ili nepostojeći). Osim u adipocitima, bojenje je bilo vidljivo u vezivnom tkivu i u ponekad prisutnim stanicama koje bi morfološki mogle odgovarati makrofagima (jasno većeg intenziteta nego u adipocitima).

Rezultati semikvantifikacije pokazali su da je intenzitet imunohistokemijskog bojenja na TNF- $\alpha$  bio najjači u CD-HFD skupini u svim odjeljcima masnog tkiva (u subkutanom masnom tkivu CD-HFD skupine zabilježen je veći intenzitet na nekim preparatima) (Tablica 5.4.). U svim je odjeljcima masnog tkiva najmanji intenzitet imunohistokemijskog bojenja na TNF- $\alpha$  zabilježen u kontrolnoj skupini (Slika 5.11.). No, nije nađena statistički značajna razlika između grupa (Kruskal-Wallisov test, Tablica 5.4.).

**Tablica 5.4.** Semikvantifikacija intenziteta imunohistokemijskog obojenja masnih tkiva muških potomaka štakora u 22. tjednu starosti na TNF- $\alpha$ .

Masno tkivo	Medijan (interkvartilni raspon)		
	Subkutano	Epididimalno	Perirenalno
CD-CD†	0,50 (0,42 – 0,84)	0,67 (0,67 – 0,92)	0,73 (0,34 – 1,06)
CD-HFD‡	0,67 (0,25 – 1,42)	1,00 (0,75 – 1,67)	1,09 (0,47 – 1,92)
HFD-CD§	0,75 (0,25 – 1,34)	1,00 (0,84 – 1,00)	1,08 (0,75 – 1,33)
HFD-HFD	1,09 (0,75 – 1,17)	0,75 (0,59 – 0,84)	0,76 (0,50 – 0,92)
P*	0,766	0,369	0,726

\* Kruskal-Wallisov test

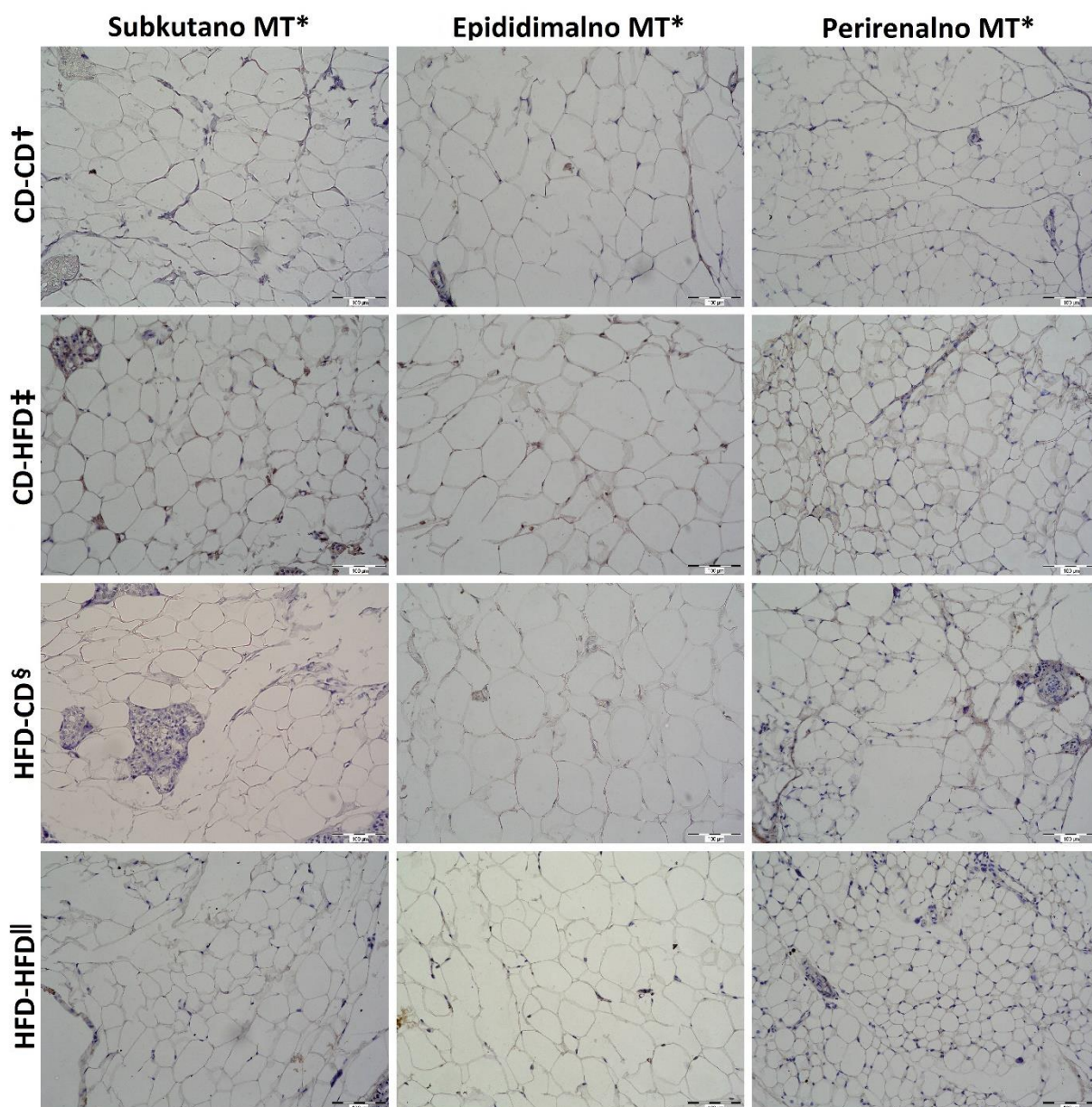
† muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom

‡ muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom

§ muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama

|| muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama





**Slika 5.11.** Relativni intenzitet imunohistokemijskog bojenja masnih tkiva muških potomaka štakora u 22. tjednu starosti na TNF- $\alpha$ . Reprezentativne slike četiriju životinja (jedna po svakoj skupini). Intenzitet imunohistokemijskog obojenja najintenzivniji je u CD-HFD skupini, a najmanje intenzivan u CD-CD skupini. Pozadinsko bojenje: hemalaun. Mjerilo: 100  $\mu$ m.

\* masno tkivo

† muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom

‡ muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićeni masnim kiselinama majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom

§ muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama

|| muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama

Spermanovim koeficijentom korelacije  $\rho$  (rho) ispitana je korelacija između intenziteta imunohistokemijskog bojenja na TNF- $\alpha$  određenog odjeljka masnog tkiva i površine i broja adipocita u tom istom odjeljku. Pronađena je značajna i pozitivna korelacija između srednje površine adipocita i intenziteta imunohistokemijskog bojenja na TNF- $\alpha$  u epididimalnom masnom tkivu u CD-HFD skupini ( $\rho = 0,972$ ,  $P = 0,028$ ).

### **5.5. Imunohistokemijsko bojenje masnih tkiva na CD68**

Odredio se broj CD68 pozitivnih stanica u kvadratnom milimetru tkiva svih odjeljaka masnih tkiva njihovim brojenjem (smeđe obojenje) (Slika 5.12., Slika 5.13. i Slika 5.14.).

U odnosu na visceralna masna tkiva, veći je broj CD68 pozitivnih stanica izbrojen u subkutanom masnom tkivu (Tablica 5.5.).

U subkutanom i epididimalnom masnom tkivu najveći je broj CD68 pozitivnih stanica bio u HFD-HFD skupini, a u perirenalnom masnom tkivu u skupinama u kojima je majka bila hranjena masnom hranom (HFD-CD i HFD-HFD) pri čemu je na nekim preparatima ponovno zabilježen najveći broj CD68 pozitivnih stanica u HFD-HFD skupini (Tablica 5.5.).

Najmanji je broj CD68 pozitivnih stanica izbrojen u kontrolnoj skupini u svim odjeljcima masnih tkiva (Tablica 5.5.).

U svim odjeljcima masnih tkiva nije bilo statistički značajne razlike između grupa (Kruskal-Wallisov test, Tablica 5.5.).



**Tablica 5.5.** Broj pozitivnih stanica na CD68 u mm<sup>2</sup> masnih tkiva muških potomaka štakora u 22. tjednu starosti.

Medijan (interkvartilni raspon)			
Masno tkivo	Subkutano	Epididimalno	Perirenalno
CD-CD†	11,00 (9,00 – 17,00)	0,00 (0,00 – 2,00)	6,50 (5,00 – 12,00)
CD-HFD‡	10,00 (5,00 – 21,00)	1,50 (0,00 – 4,00)	8,50 (7,00 – 10,00)
HFD-CD§	10,50 (2,50 – 33,00)	0,00 (0,00 – 3,50)	15,00 (8,00 – 20,00)
HFD-HFD	37,00 (36,00 – 40,00)	4,00 (0,00 – 8,00)	15,00 (8,00 – 23,00)
P*	0,107	0,495	0,399

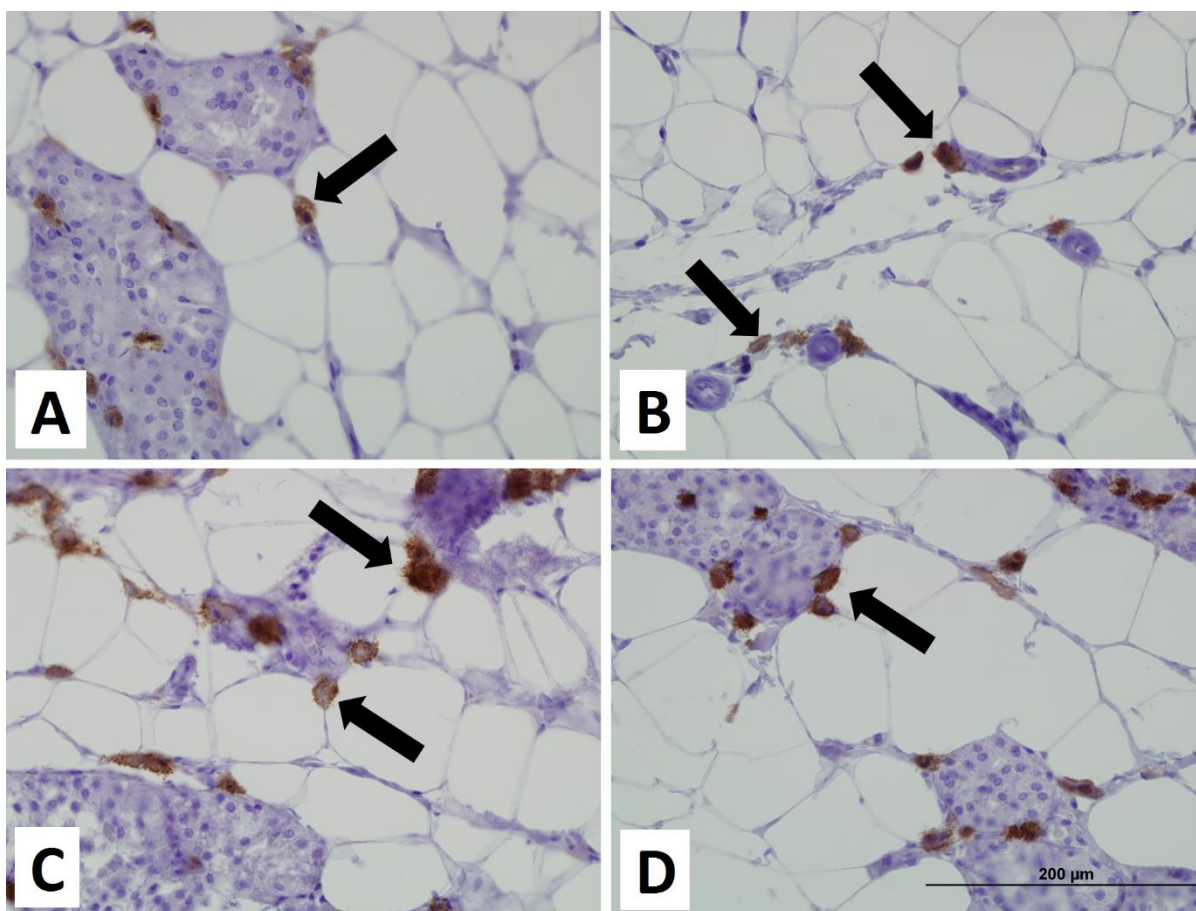
\* Kruskal-Wallisov test

† muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom

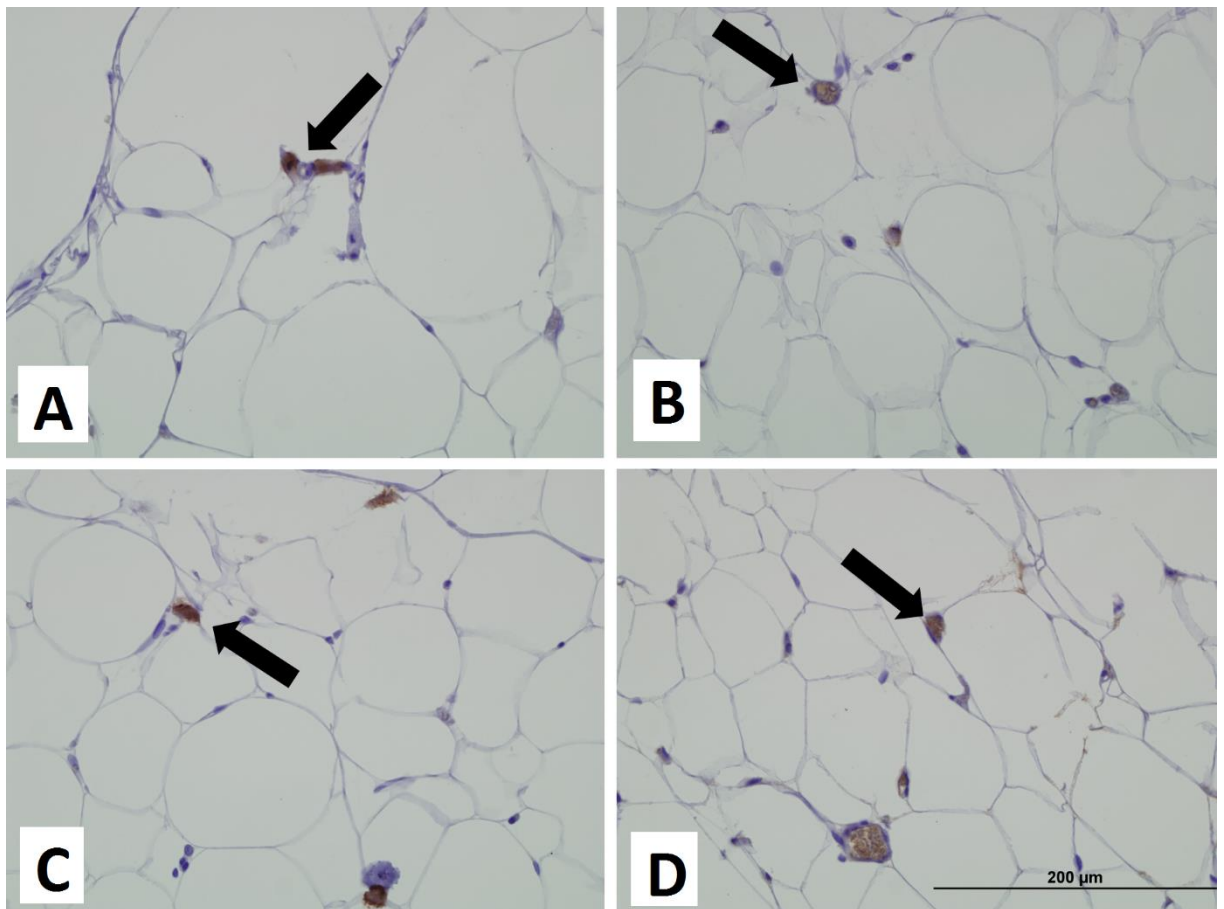
‡ muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićeni masnim kiselinama majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom

§ muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama

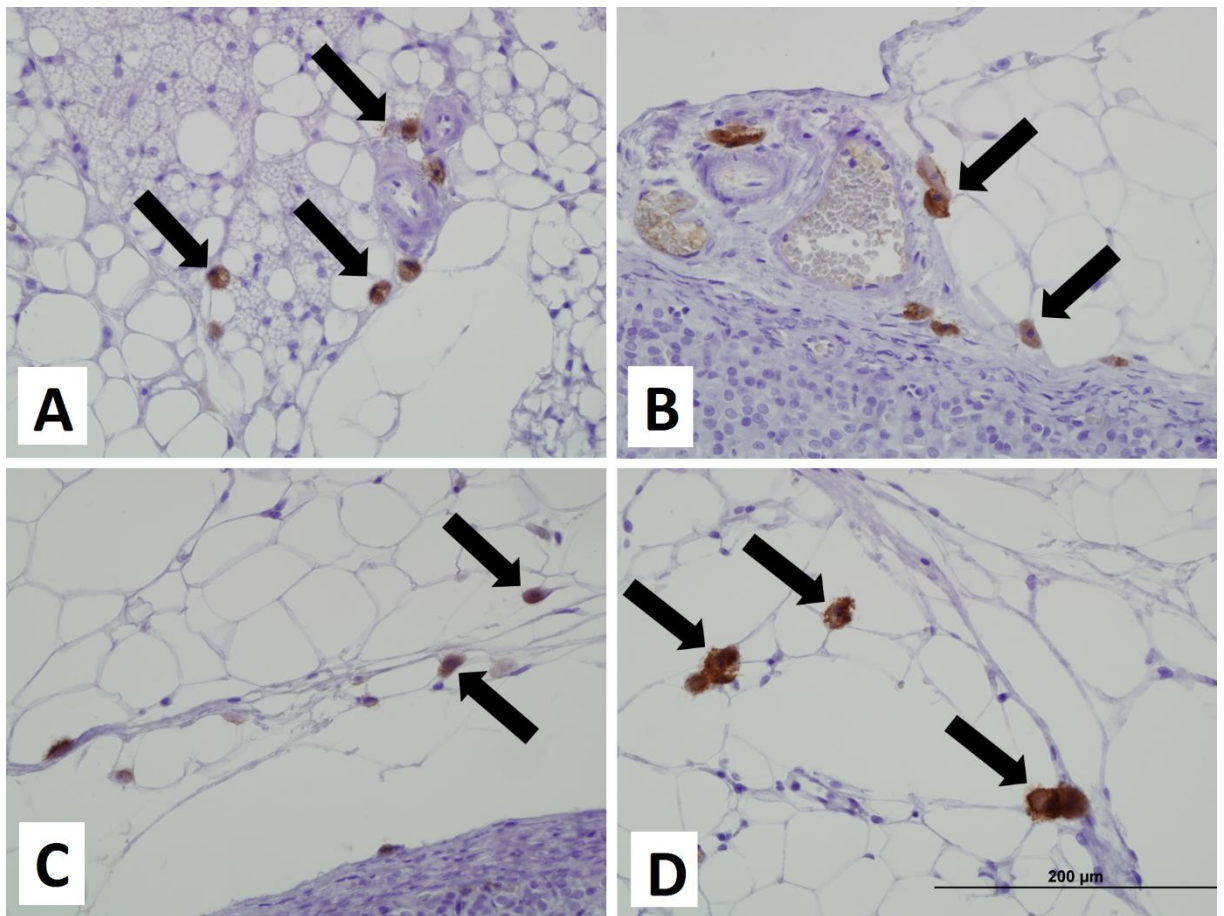
|| muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama



**Slika 5.12.** Reprezentativni prikaz imunohistokemijskog bojenja subkutanog masnog tkiva muških potomaka štakora u 22. tjednu starosti na CD68. Prikaz po jedne životinje po skupini. (A) CD-CD muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom, (B) CD-HFD muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićeni masnim kiselinama majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom, (C) HFD-CD muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama, (D) HFD-HFD muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama. Jasno su vidljive CD68 pozitivne stanice (smeđe bojenje) oko adipocita (označene strjelicom). Pozadinsko bojenje: hemalaun. Povećanje: 400 x. Mjerilo: 200 µm.



**Slika 5.13.** Reprezentativni prikaz imunohistokemijskog bojenja epididimalnog masnog tkiva muških potomaka štakora u 22. tjednu starosti na CD68. Prikaz po jedne životinje po skupini. (A) CD-CD muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom, (B) CD-HFD muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićeni masnim kiselinama majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom, (C) HFD-CD muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama, (D) HFD-HFD muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama. Jasno su vidljive CD68 pozitivne stanice (smeđe bojenje) oko adipocita (označene strjelicom). Pozadinsko bojenje: hemalaun. Povećanje: 400 x. Mjerilo: 200 µm.



**Slika 5.14.** Reprezentativni prikaz imunohistokemijskog bojenja perirealnog masnog tkiva muških potomaka štakora u 22. tjednu starosti na CD68. Prikaz po jedne životinje po skupini. (A) CD-CD muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom, (B) CD-HFD muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom, (C) HFD-CD muški potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama, (D) HFD-HFD muški potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama. Jasno su vidljive CD68 pozitivne stanice (smeđe bojenje) oko adipocita (označene strjelicom). Pozadinsko bojenje: hemalaun. Povećanje: 400 x. Mjerilo: 200 µm.

## 6. Rasprava

Fetalno programiranje i epigenetski utjecaj majke prije 25 godina predstavljeni su kao važni čimbenici u kasnijem razvoju metaboličkog sindroma, šećerne bolesti tipa 2 i srčanožilnih oboljenja (10, 153, 154). Teorija „štedljivog fenotipa“ pretpostavlja da uvjeti kojima je fetus izložen unutar maternično pripremaju potomka na očekivani izvanmaternični okoliš (9), a ova studija omogućuje praćenje promjena kod potomaka u ovisnosti o promjeni prehrane kojoj su potomci bili izloženi tijekom trudnoće i laktacije.

### 6.1. Tjelesna masa, ukupni dobitak na tjelesnoj masi i indeks tjelesne mase

Nakon odvajanja od majke u 4. tjednu starosti veću tjelesnu masu imali su muški potomci štakora majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom, u odnosu na one hranjene hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama.

Mogući uzrok ovog rezultata je što su majke hranjene kontrolnom dijetom imale slobodan pristup hrani, dok su one na masnoj prehrani dobivale 30 g hrane dnevno. Restrikcija prehrane u HFD skupinama učinjena je kako bi se prevenirao pretjerani dobitak na tjelesnoj masi, budući da je u literaturi opisano da hrana bogata mastima u glodavaca inducira hiperfagiju (155) zbog boljeg okusa (156) i smanjenog osjećaja sitosti kod masti u odnosu na ugljikohidrate (157–159), u konačnici rezultirajući pretilosti uzrokovanoj pretjeranim kalorijskim unosom, neovisno o sastavu hrane (160, 161).

Manja rodna masa indikator je razdoblja sporijeg fetalnog rasta, odnosno lošijih unutar materničnih uvjeta (162). Fetalni su rast i razvoj primarno određeni genetičkim potencijalom fetusa na koji se može utjecati okolišnim faktorima kao što je nutritivni status majke (163). Neke studije do sada učinjene na glodavcima također su pokazale da majke hranjene masnom dijetom, neovisno o tome je li to samo tijekom trudnoće i laktacije ili tijekom cijelog života, rađaju potomke manje rodne mase (164–167). Mehanizam manje tjelesne mase u trenutku odvajanja od majke u HFD-CD i HFD-HFD skupini može biti povezan s teorijom o unutar materničnoj retardaciji u rastu zbog fetalne hipoinzulinemije i hipoglikemije koju podupiru istraživanja kako o pothranjivanju, tako i o prekomjernom unosu hrane za vrijeme trudnoće (167). Hranjenje majki masnom dijetom uzrokuje hiperkolesterolemiju kod majke što

je dokazano u prethodno objavljenoj studiji (168), a hiperkolesterolemija također je poznati uzrok fetalnog zaostajanja u rastu, moguće putem smanjenog dotoka hranjivih tvari fetusu preko posteljice zbog njene masne infiltracije (169, 170). Leptin, hormon primarno proizveden u adipocitima bijelog masnog tkiva koji inhibira glad, povišen je kod ženki glodavaca hranjenih masnom dijetom, a koncentracija leptina u serumu pozitivno korelira s koncentracijom leptina u majčinom mlijeku koja je mogla utjecati na potomke (171, 172). Budući da inzulin i leptin kod potomaka, kao ni glukoza pri rođenju i u trenutku odvajanja od majke nisu mjereni, ovo otvara pitanja na koja se može odgovoriti u budućim studijama.

Konačna tjelesna masa u odrasloj dobi bila je značajno manja u skupini muških potomaka štakora na prehrani bogatoj zasićenim masnim kiselinama majke hranjene standardnom laboratorijskom hranom u odnosu na potomke kontrolne skupine, što može biti zbog restrikcije unosa hrane na ukupno 30 g dnevno u dvama obrocima kao što je ranije objašnjeno. Moguće ograničenje je i manji udio ugljikohidrata i proteina u masnoj hrani (173).

Ukupni je postotni dobitak na tjelesnoj masi bio najveći u potomaka majki hranjenih masnom hranom (skupine HFD-CD i HFD-HFD). Budući da su ove skupine imale najmanju tjelesnu masu u 4. tjednu starosti, kod njih je očekivano došlo do sustizanja („*catch-up*“ fenomena) u rastu. Ovaj je fenomen zabilježen u literaturi i u ljudi kod pothranjenosti *in utero* u populaciji Nizozemske i otočne države Nauru za vrijeme Drugog svjetskog rata. Djeca koja su bila izložena gladi samo za vrijeme embrionalnog i fetalnog razvoja, u djetinjstvu i dalje imala su ubrzan porast na tjelesnoj masi (174, 175). Takve su jedinke u odrasloj dobi imale veću vjerojatnost za razvoj pretilosti i šećerne bolesti tipa 2 zbog poremećaja metabolizma glukoze i inzulina (176, 177), a već je Barker 1993. god. zabilježio povezanost niske rodne mase i kasnijeg razvoja metaboličkog sindroma kod muškaraca u Hertfordshireu i Prestonu (154).

Najveće promjene u tjelesnoj težini tijekom života štakora dogodile su se u skupinama kod kojih se prehrana nakon odvajanja od majke razlikovala od unutar maternične prehrane. Iako je početna mjerena masa štakora bila najveća u skupini CD-HFD, ova skupina do kraja studije pokazuje najmanji dobitak na tjelesnoj masi. Za razliku od nje, skupina HFD-CD pokazuje najveći dobitak unatoč manjoj početnoj tjelesnoj masi. To bi se moglo poklapati s teorijom o „štedljivom fenotipu“ gdje majka priprema potomak na očekivani izvanmaternični okoliš te su se najveća odstupanja dogodila kada očekivanja nisu bila ispunjena (9, 10, 178).

Nisu bile zabilježene značajne razlike u indeksu tjelesne mase što pokazuje da je povećanje tjelesne težine bilo ravnomjerno praćeno i povećanjem duljine tijela, odnosno tibije, i vjerojatno nije došlo do posljedica uzrokovanih restrikcijom hrane. To je u skladu s našim prethodno objavljenim rezultatima gdje nije nađena značajna razlika u BMI-ju kod majki ovih potomaka hranjenih masnom ishranom ili standardnom laboratorijskom hranom, kao ni kod ženskih potomaka štakora (168).

## **6.2. Kolesterol, trigliceridi, glukoza, adiponektin i TNF- $\alpha$ u serumu muških potomaka štakora**

Koncentracija kolesterola bila je najviša u skupinama koje su bile hranjene hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama (HFD-HFD i CD-HFD skupine). Istraživanja na glodavcima pokazala su da uzimanje masne hrane u trajanju dužem od tri tjedna uzrokuje povišenje serumskog kolesterola, pobijedivši samoregulaciju lipidnog metabolizma zbog koje ne dolazi do značajnijih promjena kod limitiranog izlaganja masnoj prehrani (179). Jetra značajno pridonosi regulaciji razine serumskog kolesterola kroz pet puteva: unosom lipoproteina male gustoće putem odgovarajućih receptora, oslobađanjem lipoproteina velike i vrlo male gustoće, katabolizmom kolesterola u žučne kiseline i *de novo* sintezom kolesterola (173). U našim objavljenim rezultatima najveća težina jetre zabilježena je u HFD-HFD i CD-HFD skupini (180). Patohistološka je analiza parenhima jetre pokazala povećano nakupljanje masnih kapljica kod potomaka CD-HFD skupine, a zatim najjači intenzitet imunohistokemijskog bojenja jetrenog parenhima na TNF- $\alpha$  u CD-HFD te HFD-HFD skupini. Zaključno, moguće promjene serumskog kolesterola mogu biti uslijed oštećenja jetrenog parenhima, a učinak je više akutnog tipa, nego posljedica međugeneracijskog utjecaja.

U koncentraciji triglicerida u serumu nije zabilježena značajna razlika između skupina.

Koncentracija glukoze u krvi također se nije značajno razlikovala među skupinama, no ovaj je rezultat teže interpretirati s obzirom na vrijeme uzimanja uzoraka.

Adiponektin je hormon koji izlučuje masno tkivo i ima važnu ulogu u modulaciji metabolizma glukoze i inzulina, a smanjena koncentracija serumskog adiponektina nađena je u genetičkom i prehranom-induciranom mišjem modelu pretilosti (181) te kod pretilih ljudi (182). To je u suprotnosti s ostalim adipocitokinima čija je koncentracija povećana u pretilosti



sukladno s povećanjem ukupne količine masnog tkiva (182). Iako nije nađena značajna razlika između skupina, najviša je koncentracija adiponektina izmjerena u CD-HFD skupini što je u skladu s time što je kod te skupine izmjeren najmanji dobitak na tjelesnoj masi. Skupina HFD-HFD, koja je imala manju konačnu masu također je imala višu serumsku koncentraciju adiponektina u odnosu na skupine potomaka na standardnoj laboratorijskoj dijeti. Također, eventualna povećana koncentracija drugih adipocitokina, koja nije mjerena u ovom istraživanju, mogla bi objasniti razinu cirkulirajućeg adiponektina između ispitivanih skupina (183).

TNF- $\alpha$ , citokin koji je prvo otkriven kao proizvod makrofaga i sudionik metaboličkih procesa kronične upale i maligniteta, bio je najviši u skupini CD-HFD. Povećana ekspresija TNF- $\alpha$  mRNA nađena je u masnom tkivu pretilih ljudi i glodavaca, kao i povišena serumska razina tog citokina (88, 184, 185), a lipoproteini male gustoće je potiču (186). Koncentracija je kolesterola bila viša u navedenoj skupini u odnosu na skupine hranjene standardnom laboratorijskom hranom, što je moglo potaknuti povećanu proizvodnju TNF- $\alpha$ . Sljedeća je skupina s također povišenom koncentracijom TNF- $\alpha$  je HFD-CD što bi moglo sugerirati da prelazak na prehranu različitu od prenatalne može potaknuti upalni odgovor, a značajno niža koncentracija TNF- $\alpha$  u CD-CD skupini u odnosu na CD-HFD skupinu može govoriti u prilog zaštitnog mehanizma unutar maternične adaptacije na određeni režim prehrane. Također, u nekim je studijama kod ljudi i glodavaca nađena pozitivna korelacija između serumske koncentracije TNF- $\alpha$  i volumena adipocita bijelog masnog tkiva kako u subkutanom, tako i u visceralnom masnom tkivu (187–189), a kod skupina CD-HFD i HFD-CD izmjerena je najveća površina adipocita u subkutanom i epididimalnom masnom tkivu.

### **6.3. Histomorfometrija masnih tkiva**

Najveća površina adipocita i najmanji broj adipocita po jedinici površine u subkutanom bijelom masnom tkivu izmjereni su u skupinama s promijenjenom prehranom nakon unutar materničnog razvoja i laktacije (skupine CD-HFD i HFD-CD). No, uspoređujući skupine nije nađena značajna razlika u površini i broju adipocita subkutanog masnog tkiva.

U visceralnom epididimalnom masnom tkivu najveća su površina adipocita i najmanji broj adipocita po jedinici površine također izmjereni u skupinama s promijenjenom prehranom nakon unutar materničnog razvoja i laktacije (CD-HFD i HFD-CD skupine), pri čemu su



najveća površina adipocita i najmanji broj adipocita po jedinici površine bili u HFD-CD skupini. Broj adipocita po jedinici površine u HFD-CD skupini bio je značajno manji u usporedbi s HFD-HFD skupinom u kojoj je izmjerena najmanja površina i najveći broj adipocita. S obzirom na to da je značajna razlika između skupina nađena gledajući broj adipocita po jedinici površine, a ne njihovu srednju površinu, ovaj bi se parametar trebao rabiti kao objektivniji kod analize histoloških preparata.

U oba je opisana odjeljka masnih tkiva u skupinama muških potomaka štakora s nepromijenjenom postnatalnom prehranom (skupine CD-CD i HFD-HFD) bio zastupljen veći postotak manjih adipocita površine do 2000  $\mu\text{m}^2$ .

Povećanje bijelog masnoga tkiva može biti uzrokovano povećanjem veličine (hipertrofija) ili broja adipocita (hiperplazija) (79). „Zdrava“ ekspanzija masnoga tkiva karakterizirana je povećanim regrutiranjem prekursora adipocita koji se diferenciraju u nove adipocite manjeg volumena (190), a patološku ekspanziju prati porast masne stanice, visok stupanj infiltracije makrofaga u masnome tkivu, smanjena angiogeneza i obilna fibroza što je sve povezano s kroničnom inflamacijom (103). Wang i sur. pokazali su da izlaganje ispitivanih životinja masnoj prehrani tijekom mjesec dana uzorkuje hipertrofiju adipocita u subkutanom i visceralnom masnom tkivu, a držanje životinja na masnoj prehrani duže od mjesec dana uzorkuje hiperplaziju visceralnog masnog tkiva (55) čime bi se mogao objasniti rezultat najmanje površine i najvećeg broja stanica u HFD-HFD skupini. Hipertrofija masnoga tkiva kod dugotrajnog utjecaja masne prehrane čuva druge organe od lipotoksičnog efekta (191).

Nekoliko signalnih molekula zaduženih za evoluciju mezodermalnih tkiva, čijeg je podrijetla i masno tkivo, ima utjecaj na razvoj masnoga tkiva, između ostalog i koštani morfogeni proteini (BMP, prema engl. *bone morphogenic proteins*) (192, 193). BMP je grupa pleiotropnih proteina koji reguliraju raznolike procese kao što su određivanje stanične sudbine, proliferacija, apoptoza i diferencijacija tijekom embriogeneze i u odrasloj dobi, a ime su dobili jer je 1945. godine Pierre Lacroix hipotetizirao da tvar dobivena iz kosti, koju je nazvao osteogenin, može potaknuti koštani rast i razvoj (194).

U rezultatima je prikazan znatno manji broj adipocita (zbog veće površine stanice) u epididimalnom masnom tkivu kod skupina muških potomaka štakora s promijenjenom postnatalnom prehranom što pokazuje moguću osjetljivost potomaka na promjenu prehrane. U hipertofičnoj je pretilosti poremećena interakcija između diferenciranih adipocita i njihovih prekursoranih stanica što vodi do povećanja postojećih adipocita. Baraban i sur. dokazali su

smanjenu ekspresiju BMP4 u subkutanom masnom tkivu pretilih subjekata te da tretiranje potpuno diferenciranih humanih adipocita BMP4-om uzrokuje smanjenje razine mRNA TNF- $\alpha$ , a simultani tretman s BMP4 i TNF- $\alpha$  poništava disregulatorne učinke TNF- $\alpha$  (195). Budući da BMP4 stimulira adipogenezu, njegova smanjena razina može biti djelomično zaslužna za patološko povećanje bijelog masnog tkiva, a u prilog mogućoj smanjenoj razini BMP4 može govoriti izmjerena povišena serumska koncentracija TNF- $\alpha$  u obje navedene skupine (CD-HFD i HFD-CD). Također je u već objavljenim rezultatima prikazan najveći intenzitet imunohistokemijskog bojenja na TNF- $\alpha$  u koštanoj srži te narušena koštana struktura spužvaste kosti petog lumbalnog kralješka upravo u CD-HFD skupini (196). U prilog mogućoj smanjenoj ekspresiji BMP4 u subkutanom i epididimalnom masnom tkivu muških potomaka štakora skupine CD-HFD može govoriti i povećan intenzitet imunohistokemijskog bojenja navedenih masnih tkiva na TNF- $\alpha$ , kao i najveća serumska koncentracija TNF- $\alpha$ , a povećana ekspresija TNF- $\alpha$  korelira sa smanjenom ekspresijom BMP4 u tkivima (192, 197). Kako bi se potvrdila ili opovrgnula ova hipoteza potrebno je istražiti u ovom smjeru.

Veća površina i manji broj adipocita u skupinama s promijenjenom postnatalnom prehranom u subkutanom i epididimalnom masnom tkivu koje anatomski pripada visceralnom masnom tkivu može biti uslijed anatomske podjele masnih tkiva u glodavaca kod kojega za perigonadalno (u ovom slučaju epididimalno) masno tkivo ne postoji u potpunosti prikladan ekvivalent odjeljka masnoga tkiva u ljudi te se ovo masno tkivo prije treba smatrati „peri-visceralnim“ nego pravim visceralnim masnim tkivom (63).

Kod perirealnog masnog tkiva potomci u HFD-HFD skupini su imali adipocite najmanje površine kao i najveći broj adipocita po jedinici površine, a postojala je značajna razlika između skupina. Generalno su adipociti perirealnog masnog tkiva manji od adipocita subkutanog masnog tkiva u svakoj skupini muških potomaka štakora, a već je ranije pokazano da su adipociti u visceralnom masnom tkivu površinom manji od subkutanih (198).

Sistemska sposobnost prilagodbe na promjene u količini hranjivih tvari – tzv. metabolička fleksibilnost ovisi o sposobnosti adipocita i masnoga tkiva za ekspanziju (199). Pojava hiperplazije kod dugotrajnog utjecaja masne prehrane i povišenih razina kolesterola na visceralno masno tkivo možda se može objasniti većim angiogenim potencijalom visceralnog masnog tkiva, većom gustoćom krvnih žila i obiljem endotelnih stanica (200, 201). Poticanje angiogene kaskade u „zdravom“ masnom tkivu može neutralizirati posljedice hipoksije i time se može povezati s metabolički korisnim učincima (202). Proširenje proangiogene komponente

tijekom ekspanzije masnoga tkiva smanjuje fibrozu, smrt stanica i razinu lokalne inzulinske rezistencije kao rezultat smanjene inflamacije (203). To sve objašnjava „hipoteza ekspanzibilnosti masnoga tkiva“ po kojoj metabolički zdrave osobe, neovisno o tome jesu li pretile ili ne, imaju veći lipogeni (204) i angiogeni kapacitet (205). Visceralno je masno tkivo povezano s pretilošću i pojavom metaboličkog sindroma (206), a ovi rezultati mogu pretpostaviti da je došlo do „zdravijeg“ načina ekspanzije masnoga tkiva putem hiperplazije i nastanka novih malih adipocita (127) u HFD-HFD skupini jer je, uz to, najveći intenzitet imunohistokemijskog bojenja perirealnog masnog tkiva na TNF- $\alpha$  bio vidljiv u skupini s promijenjenom postnatalnom prehranom na masnu hranu (CD-HFD skupina), dok je intenzitet imunohistokemijskog bojanja na TNF- $\alpha$  u HFD-HFD skupini niži i usporediv s kontrolnom skupinom. Unatoč tome što nema statističke značajnosti između grupa u intenzitetu imunohistokemijskog bojanja na TNF- $\alpha$ , ovaj nalaz korelira s rezultatima serumske koncentracije TNF- $\alpha$  koja je značajno viša u CD-HFD skupini. Ovo bi moglo govoriti u prilog epigenetičkom utjecaju majke u pripremi fetusa na očekivani izvanmaternični okoliš (9). Inflamacija je masnog tkiva usko povezana s povećanim rizikom za nastanak šećerne bolesti tipa 2, krvnožilnih oboljenja i masne jetre (207), a u našim objavljenim rezultatima prikazano je da CD-HFD skupina ima najtežu jetru, najizraženije patohistološko oštećenje jetre i najveći intenzitet bojenja parenhima na TNF- $\alpha$  (180) što bi govorilo u prilog ovome nalazu na perirealnom masnom tkivu.

Kako bi se potvrdila ova hipoteza istraživanje se može kasnije proširiti na mjerenje ekspresije vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF, prema engl. *vascular endothelial growth factor*) u masnim tkivima. Lokalna hipoksija zbog ekspanzije masnoga tkiva dovodi do fibroze što isto povećava stanični stres, nekrozu stanica i razvoj kronične inflamacije (208, 209), a buduće mjerenje ekspresije kolagena VI kao mjerilo fibroze može dati uvid u ovu komponentu izvanstaničnog matriksa.

Prema nekim istraživanjima, masna tkiva mršavih ljudi i miševa sadrže oko 5 % makrofaga, dok udio makrofaga kod pretilih ljudi i miševa može biti do 50 % (102, 103), a ovdje je u svim odjeljcima masnih tkiva izbrojen najveći broj CD68 pozitivnih stanica u skupini muških potomaka štakora gdje su i majka i potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama (HFD-HFD skupina), iako bez statističke značajnosti između skupina. Muški potomci štakora u ovom istraživanju nisu bili pretili, niti su štakori HFD-HFD skupine imali najveću konačnu tjelesnu masu. Budući da broj makrofaga obično pozitivno korelira i s veličinom adipocita te ekspresijom TNF- $\alpha$  u tkivu i serumu (105), što ovdje nije slučaj,

nakupljanje makrofaga bi se imunohistokemijskom analizom trebalo diferencirati na M1 i M2 populaciju, odnosno uz dodatno provođenje imunohistokemijskog bojenja na CD163 trebali bi se dodatno lokalizirati protuupalni M2 makrofagi (210).

#### **6.4. Daljnja područja koja otvara provedena studija**

Ova je doktorska disertacija dio projekta „Utjecaj prehrane majke tijekom trudnoće i laktacije na ekspresiju važnih adipokina i AdipoR2 na postnatalnu prehranu potomaka“ te otvara nova pitanja o utjecaju majčine prehrane i prelaska potomaka na drukčiji tip prehrane nakon laktacije na razvoj masnoga tkiva potomaka, a do sada objavljeni radovi ukazuju na znanstvenu popularnost ove tematike.

Kod liječenja hiperlipidemije, koje ima pozitivne učinke na srčanožilni i ukupni mortalitet, već se rabe lijekovi koji utječu i na upalnu komponentu masnoga tkiva, kao i na razinu cirkulirajućih adipocitokina, iako im to nije primarna zadaća. Statini, odnosno lijekovi koji inhibiraju HMG-KoA (hidroksi-metilglutaril-koenzim A) reduktazu, sprječavaju pretvorbu HMG-KoA u mevalonat, što je rani stupanj u sintezi kolesterola. No, istraživanja pokazuju da simvastatin inhibira i izlučivanje TNF- $\alpha$  i MCP-1 u adipocitima (186). Statini i tiazolidinedioni (oralni antidijabetici) povećavaju aktivaciju PPAR- $\gamma$  te je posljedično relativno povišenje koncentracije adiponektina proporcionalno učinku lijeka na poboljšanje inzulinske osjetljivosti (211, 212). Fibrati (npr. gemfibrozil i fenofibrat) također povišuju koncentraciju adiponektina (213).

Inflamacija je, prema dosadašnjim dokazima, poveznica između ekspanzije masnog tkiva i kardiometaboličkih komplikacija, kao i razvoja inzulinske rezistencije (214). No, termin koji se pojavio opisujući nepodudarno metabolički zdrave pacijente u usporedbi s njihovim stupnjem pretilosti termin je „metabolički zdrave pretilo osobe“ (MHO, prema engl. *metabolically healthy obese*) (215). MHO fenotip opisuje se kao pretilost ( $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) bez prisustva metaboličkih bolesti kao što su šećerna bolest tip 2, dislipidemija ili hipertenzija (216). Identifikacija takvih osoba u ambulanti putem nižih upalnih parametara (CRP ili leukocitoze) ili testom tolerancije glukoze trebala bi biti potrebna prije odluke o daljnjem liječenju pretilosti, budući da su studije o poboljšanju metaboličkog statusa nakon redukcije tjelesne težine kroz kalorijsku restrikciju i povećanje fizičke aktivnosti kod takvih osoba kontradiktorne (217, 218). Ipak, dugotrajne su prospektivne studije pokazale da MHO osobe s

vremenom razviju metabolički sindrom (219, 220), što bi značilo da se kod njih ne bi trebalo odustati od tretmana pretilosti, a mediteranska dijeta uz vježbanje ima pozitivni učinak na smanjenje tjelesne mase, inzulinsku osjetljivost i krvni tlak (221).

Također, pojava hipertrofije adipocita u skupinama potomaka s promijenjenom postnatalnom prehranom te najizraženija upala u masnim tkivima CD-HFD skupine govori u prilog što ranijem početku preventivnih mjera već za vrijeme trudnoće (9).

Nova područja koja se otvaraju u području terapije pretilosti ona su koja utječu na područje subkliničke inflamacije, posebno kod komponente inhibiranja angiogeneze koja je potrebna za ekspanziju masnoga tkiva.

## 7. Zaključci

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Muški potomci štakora hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama imali su najmanju konačnu tjelesnu masu zbog ograničenog unosa hrane na 30 g dnevno, no zabilježen je proporcionalan rast s obzirom na to da nije bilo značajne razlike u indeksu tjelesne mase između skupina. Najveće promjene dogodile su se u skupinama kod kojih se postnatalna prehrana razlikovala od unutar maternične, pa je tako u CD-HFD skupini zabilježen najmanji dobitak na tjelesnoj masi unatoč najvećoj početnoj masi, a u skupini HFD-CD najveći dobitak na tjelesnoj masi tijekom pokusa.
- Koncentracija kolesterola u serumu bila je najviša u HFD-HFD skupini, što govori u prilog negativnom utjecaju masne ishrane.
- Najviša je koncentracija TNF- $\alpha$  izmjerena u skupinama s promijenjenom intrauterinom/postnatalnom prehranom (CD-HFD i HFD-CD), što pokazuje nepovoljan utjecaj promjene prehrane u odnosu na očekivane izvanmaternične uvjete na razvoj upalnog odgovora.
- Zabilježena je najveća srednja površina adipocita i najmanji broj stanica u skupinama s promijenjenom intrauterinom/postnatalnom prehranom (CD-HFD i HFD-CD) u subkutanom i epididimalnom masnom tkivu te najveći broj stanica koje su imale manju površinu u perirenalnom masnom tkivu muških potomaka štakora HFD-HFD skupine.
- Zabilježen je najveći intenzitet imunohistokemijskog bojenja na TNF- $\alpha$  u svim odjeljcima masnih tkiva u skupini potomaka s promijenjenom postnatalnom prehranom na masnu ishranu, dok je najveći broj CD68 pozitivnih stanica bio u skupini gdje su i majka i potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama.

## 8. Sažetak

**Cilj istraživanja:** Ekspanzija masnoga tkiva može se dogoditi na nekoliko načina i, pod određenim uvjetima, može biti povezana s kroničnim upalom. Dugotrajna upala u pretilosti pak može dovesti do inzulinske rezistencije i disfunkcije tkiva. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati kako različita kombinacija majčine i postnatalne prehrane utječe na morfologiju masnoga tkiva i nastanak upale navedenog tkiva u muških potomaka štakora.

**Nacrt studije:** Deset ženski Sprague Dawley štakora, starosti 9 tjedana, randomizirano je podijeljeno u dvije skupine i hranjeno ili standardnom laboratorijskom hranom ili hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama tijekom šest tjedana, a potom pareno s istim mužjakom. Nakon graviditeta i laktacije, muški potomci štakora iz obiju skupina podijeljeni su u četiri podskupine ovisno o prehrani kojom su bili hranjeni do 22. tjedna starosti.

**Materijal i metode:** Štakori su bili vagani, a uzorci krvi prikupljeni za biokemijske analize (kolesterola, triglicerida, glukoze, adiponektina i TNF- $\alpha$ ). Uzorci bijelog masnog tkiva uzeti su iz subkutanog, epididimalnog i perirealnog odjeljka masnog tkiva. Na tkivnim presezima provedena je histomorfometrijska analiza primjenom programa CellProfiler 2.1.1 i imunohistokemijsko bojenje na TNF- $\alpha$  i CD68.

**Rezultati:** Veća srednja površina subkutanih i epididimalnih adipocita pronađena je u skupinama muških potomaka štakora s promijenjenom postnatalnom prehranom. U perirealnom masnom tkivu najveći je broj adipocita izmjeren u skupini u kojoj su i majka i potomci bili hranjeni prehranom bogatom zasićenim masnim kiselinama. Intenzitet imunohistokemijskog bojenja na TNF- $\alpha$  statistički se nije značajno razlikovao među skupinama, no koncentracija TNF- $\alpha$  u serumu bila je najviša u skupinama muških potomaka štakora s promijenjenom postnatalnom prehranom. Broj CD68 pozitivnih stanica bio je najveći u skupinama u kojima su i majka i potomci hranjeni masno.

**Zaključak:** Promjene u postnatalnoj prehrani mogu dovesti do upale i promijenjene morfologije masnog tkiva kod potomaka.

**Ključne riječi:** histomorfometrija, masna ishrana, masno tkivo, pretilost, štakori.

## 9. Summary

### **Effect of Different Combination of Maternal and Postnatal Diet on Surface Area and Number of White Adipose Tissue Adipocytes in Male Rat Offspring**

**Objectives:** Adipose tissue expansion can occur through several different ways and, under certain conditions, can be connected with chronic inflammation. Prolonged inflammation in obesity can lead to obesity-related insulin resistance and tissue dysfunction. The aim of this study was to investigate how different combinations of maternal and postnatal diet affect offspring adipose tissue morphology and inflammation.

**Study Design:** Ten female Sprague Dawley rats, 9 weeks old, were randomly divided into two groups and fed either standard laboratory chow or food rich in saturated fatty acids during 6 weeks and then mated with the same male rat. After birth and lactation male rat offspring from both groups were divided into four subgroups depending on the diet they were fed until 22 weeks old.

**Material and Methods:** The rats were weighted, blood samples were collected for biochemical analysis (cholesterol, triglycerides, glucose, adiponectin and TNF- $\alpha$ ). Samples of white adipose tissue were taken from the subcutaneous, epididymal and perirenal fat pad. On tissue sections histomorphometric analysis was conducted using CellProfiler program v. 2.1.1, and immunohistochemical staining for TNF- $\alpha$  and CD68 was performed.

**Results:** Greater mean surface area of subcutaneous and epididymal adipocytes was found in groups of male rat offspring with altered diet. In perirenal adipose tissue the highest number of adipocytes was measured in the group where both mother and offspring were fed high-fat diet. Adipocyte staining intensity for TNF- $\alpha$  did not differ significantly between the groups, but TNF- $\alpha$  serum concentration was the highest in the groups with changed postnatal diet. The number of CD68 positive cells was the highest in the groups where both mother and offspring were fed high-fat diet.

**Conclusion:** Changes in postnatal diet can lead to inflammation and altered morphology of adipose tissue.

**Keywords:** Histomorphometry, High-Fat Diet, Adipose Tissue, Obesity, Rats.



## 10. Literatura

1. World Health Organization. Global Database on Body Mass Index. BMI classification. 2006. Dostupno na adresi: [http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro\\_3.html&](http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html&). Datum pristupa: 25.12.2016.
2. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19·2 million participants. *Lancet*. 2016 Apr;387(10026):1377–96.
3. Republika Hrvatska Ministarstvo zdravlja. Akcijski plan za prevenciju i kontrolu kroničnih nezaraznih bolesti 2015.-2020. Dostupno na adresi: <https://zdravlje.gov.hr/arhiva-80/zakonodavstvo/savjetovanje-sa-zainteresiranom-javnoscu/arhiva/akcijski-plan-za-prevenciju-i-kontrolu-kronicnih-nezaraznih-bolesti-2015-2020/1203>. Datum pristupa: 01.02.2017.
4. WHO. GLOBAL HEALTH RISKS. Dostupno na adresi: [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/global\\_health\\_risks/en/](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/global_health_risks/en/). Datum pristupa: 12.02.2017.
5. Girod JP, Brotman DJ. The metabolic syndrome as a vicious cycle: does obesity beget obesity? *Med Hypotheses*. 2003;60(4):584–9.
6. Bralić I, Jovančević M, Predavec S, Grgurić J. Pretilost djece – novo područje multidisciplinarnog preventivnog programa. *Pediatr Croat*. 2010;54(1):33–42.
7. Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet*. 2005;366(9492):1197–209.
8. Chakravarthy M V, Booth FW. Eating, exercise, and “thrifty” genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases. *J Appl Physiol*. 2004;96(1):3–10.
9. Wells JCK. The thrifty phenotype as an adaptive maternal effect. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2007 Feb;82(1):143–72.
10. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*. 1992;35(7):595–601.
11. Dulloo AG. Adipose Tissue Plasticity in Catch-Up–Growth Trajectories to Metabolic Syndrome: Hyperplastic Versus Hypertrophic Catch-Up Fat. *Diabetes*. 2009;58(5):1037–9.
12. Ong KK, Ahmed ML, Emmett PM, Preece MA, Dunger DB. Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study. *Bmj*. 2000;320(7240):967–71.

13. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, et al. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest. American Society for Clinical Investigation*; 1997 Dec 1;100(11):2680–90.
14. Napoli C, Glass CK, Witztum JL, Deutsch R, D'Armiento FP, Palinski W. Influence of maternal hypercholesterolaemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood: Fate of Early Lesions in Children (FELIC) study. *Lancet*. 1999 Oct 9;354(9186):1234–41.
15. Armitage J, Jensen R, Taylor P, Poston L. Exposure to a high fat diet during gestation & weaning results in reduced elasticity & endothelial function as well as altered gene expression & fatty acid content of rat aorta. *J Soc Gynecol Investig*. 2004;11(2):327.
16. Rajia S, Chen H, Morris MJ. Maternal overnutrition impacts offspring adiposity and brain appetite markers-modulation by postweaning diet. *J Neuroendocrinol*. 2010 Aug;22(8):905–14.
17. Shankar K, Harrell A, Liu X, Gilchrist JM, Ronis MJJ, Badger TM. Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;294(2):R528-38.
18. Armitage JA, Maternal, Fetal Research Unit Division of Reproductive Health E, Development GKT School of Medicine STHLPRLS 7EH UK, Taylor PD, Maternal, et al. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. *J Physiol*. 2005;565(1):3–8.
19. Takasaki M, Honma T, Yanaka M, Sato K, Shinohara N, Ito J, et al. Continuous intake of a high-fat diet beyond one generation promotes lipid accumulation in liver and white adipose tissue of female mice. *J Nutr Biochem*. 2012 Jun;23(6):640–5.
20. Prentice AM. Obesity and its potential mechanistic basis. *Br Med Bull*. 2001;60:51–67.
21. Ahima RS, Antwi DA. Brain Regulation of Appetite and Satiety. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008;37(4):811–23.
22. Mlinar B, Marc J, Pfeifer M. Molekularni mehanizmi inzulinske rezistencije, pretilosti i metaboličkog sindroma. *Biochem Medica*. 2006;16(1):8–24.
23. Liebling DS, Eisner JD, Gibbs J, Smith GP. Intestinal satiety in rats. *J Comp Physiol Psychol*. 1975 Oct;89(8):955–65.
24. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. 2007 May;132(6):2131–57.

25. Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, et al. Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature*. 2002 Aug 8;418(6898):650–4.
26. Murphy KG, Bloom SR. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):854–9.
27. Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*. 2000 Oct 19;407(6806):908–13.
28. Wiedmer P, Nogueiras R, Broglio F, D'Alessio D, Tschöp MH. Ghrelin, obesity and diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007 Oct;3(10):705–12.
29. Zhang Y. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372:425–32.
30. Bado A, Lévassieur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, et al. The stomach is a source of leptin. *Nature*. 1998 Aug 20;394(6695):790–3.
31. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, et al. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med*. 1997 Sep;3(9):1029–33.
32. Considine R V. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 1996;334:292–5.
33. Stanley S, Wynne K, McGowan B, Bloom S. Hormonal regulation of food intake. *Physiol Rev*. 2005 Oct;85(4):1131–58.
34. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*. 1995 Nov 10;270(45):26746–9.
35. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N. The physiological and pathophysiological role of adiponectin and adiponectin receptors in the peripheral tissues and CNS. *FEBS Lett*. 2008 Jan 9;582(1):74–80.
36. Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, et al. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med*. 2004 May 11;10(5):524–9.
37. Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, et al. Adiponectin Stimulates AMP-Activated Protein Kinase in the Hypothalamus and Increases Food Intake. *Cell Metab*. 2007 Jul;6(1):55–68.
38. Fry M, Smith PM, Hoyda TD, Duncan M, Ahima RS, Sharkey KA, et al. Area postrema neurons are modulated by the adipocyte hormone adiponectin. *J Neurosci*. 2006 Sep 20;26(38):9695–702.

39. Hoyda TD, Fry M, Ahima RS, Ferguson A V. Adiponectin selectively inhibits oxytocin neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Physiol*. 2007 Dec 15;585(3):805–16.
40. 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 May;145(5):2273–82.
41. Motoshima H, Wu X, Sinha MK, Hardy VE, Rosato EL, Barbot DJ, et al. Differential Regulation of Adiponectin Secretion from Cultured Human Omental and Subcutaneous Adipocytes: Effects of Insulin and Rosiglitazone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Dec;87(12):5662–7.
42. Yang W-S, Lee W-J, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao C-L, et al. Weight Reduction Increases Plasma Levels of an Adipose-Derived Anti-Inflammatory Protein, Adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Aug;86(8):3815–9.
43. Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Jan 15;314(1):1–16.
44. Cawthorn WP, Heyd F, Hegyi K, Sethi JK. Tumour necrosis factor- $\alpha$  inhibits adipogenesis via a  $\beta$ -catenin/TCF4(TCF7L2)-dependent pathway. *Cell Death Differ*. 2007 Jul 20;14(7):1361–73.
45. Picchi A. Tumor Necrosis Factor- Induces Endothelial Dysfunction in the Prediabetic Metabolic Syndrome. *Circ Res*. 2006 Jun 8;99(1):69–77.
46. Kleinbongard P, Heusch G, Schulz R. TNF $\alpha$  in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure. *Pharmacol Ther*. 2010 Sep;127(3):295–314.
47. Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Hormonal Regulation of Adiponectin Gene Expression in 3T3-L1 Adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Jan;290(3):1084–9.
48. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, et al. PPAR $\gamma$  ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes*. 2001 Sep;50(9):2094–9.
49. Boutens L, Stienstra R. Adipose tissue macrophages : going off track during obesity. 2016;879–94.
50. Cohen P, Spiegelman BM, Drubin DG. Cell biology of fat storage. 2016;27:2523–7.
51. Wronska A, Kmiec Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol*. 2012 Jun;205(2):194–208.

52. Park J, Euhus DM, Scherer PE, Scherer P, Shulman G, Li Y. Paracrine and endocrine effects of adipose tissue on cancer development and progression. *Endocr Rev. American Diabetes Association*; 2011 Aug;32(4):550–70.
53. Park J, Kusminski CM, Chua SC, Scherer PE. Leptin Receptor Signaling Supports Cancer Cell Metabolism through Suppression of Mitochondrial Respiration in Vivo. *Am J Pathol.* 2010 Dec;177(6):3133–44.
54. Rosen ED, Spiegelman BM. What We Talk About When We Talk About Fat. *Cell.* 2014 Jan;156(1–2):20–44.
55. Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med.* 2013 Sep 1;19(10):1338–44.
56. Lolmède K, Duffaut C, Zakaroff-Girard A, Bouloumié A. Immune cells in adipose tissue: Key players in metabolic disorders. *Diabetes Metab.* 2011 Sep;37(4):283–90.
57. Cao Y. Angiogenesis and Vascular Functions in Modulation of Obesity, Adipose Metabolism, and Insulin Sensitivity. *Cell Metab.* 2013 Oct;18(4):478–89.
58. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004;84(1):277–359.
59. Chouchani ET, Kazak L, Jedrychowski MP, Lu GZ, Erickson BK, Szpyt J, et al. Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1. *Nature.* 2016 Mar 30;532(7597):112–6.
60. Berry DC, Jiang Y, Graff JM, Harms M, Seale P, Yoneshiro T, et al. Mouse strains to study cold-inducible beige progenitors and beige adipocyte formation and function. *Nat Commun. Nature Publishing Group*; 2016 Jan 5;7:10184.
61. Cederberg A, Grønning LM, Ahrén B, Taskén K, Carlsson P, Enerbäck S. FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell.* 2001 Sep 7;106(5):563–73.
62. Jensen MD. Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab. The Endocrine Society*; 2008 Nov;93(11 Suppl 1):S57-63.
63. Chusyd DE, Wang D, Huffman DM, Nagy TR, Even PC, Nagy TR. Relationships between Rodent white Adipose Fat Pads and Human white Adipose Fat Depots. 2016;3(April).
64. Wajchenberg BL, Giannella-Neto D, da Silva ME, Santos RF. Depot-Specific Hormonal Characteristics of Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue and their Relation to the Metabolic Syndrome. *Horm Metab Res.* 2002 Nov;34(11/12):616–21.
65. Boyko EJ, Fujimoto WY, Leonetti DL, Newell-Morris L. Visceral adiposity and risk of

- type 2 diabetes: a prospective study among Japanese Americans. *Diabetes Care*. 2000 Apr;23(4):465–71.
66. Hayashi T, Boyko EJ, Leonetti DL, McNeely MJ, Newell-Morris L, Kahn SE, et al. Visceral adiposity and the risk of impaired glucose tolerance: a prospective study among Japanese Americans. *Diabetes Care*. 2003 Mar;26(3):650–5.
  67. Kuk JL, Katzmarzyk PT, Nichaman MZ, Church TS, Blair SN, Ross R. Visceral Fat Is an Independent Predictor of All-cause Mortality in Men\*. *Obesity*. 2006 Feb;14(2):336–41.
  68. De Pergola G, Campobasso N, Nardecchia A, Triggiani V, Caccavo D, Gesualdo L, et al. Para- and perirenal ultrasonographic fat thickness is associated with 24-hours mean diastolic blood pressure levels in overweight and obese subjects. *BMC Cardiovasc Disord*. *BioMed Central*; 2015 Dec 30;15(1):108.
  69. Wang. Telmisartan prevents high-fat diet-induced hypertension and decreases perirenal fat in rats. *J Biomed Res*. 2012 May 30;26(3).
  70. Misra A, Garg A, Abate N, Peshock RM, Stray-Gundersen J, Grundy SM. Relationship of anterior and posterior subcutaneous abdominal fat to insulin sensitivity in nondiabetic men. *Obes Res*. 1997 Mar;5(2):93–9.
  71. Rytka JM, Wueest S, Schoenle EJ, Konrad D. The portal theory supported by venous drainage-selective fat transplantation. *Diabetes*. American Diabetes Association; 2011 Jan;60(1):56–63.
  72. Lu Y-P, Lou Y-R, Bernard JJ, Peng Q-Y, Li T, Lin Y, et al. Surgical removal of the parametrial fat pads stimulates apoptosis and inhibits UVB-induced carcinogenesis in mice fed a high-fat diet. *Proc Natl Acad Sci*. 2012 Jun 5;109(23):9065–70.
  73. Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Atzmon G, Rajala MW, Berg AH, et al. Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process? *Diabetes*. 2002 Oct;51(10):2951–8.
  74. Palacios E, Piñon-López MJ, Racotta IS, Racotta R. Effect of lipectomy and long-term dexamethasone on visceral fat and metabolic variables in rats. *Metabolism*. 1995 Dec;44(12):1631–8.
  75. Weber R V, Buckley MC, Fried SK, Kral JG. Subcutaneous lipectomy causes a metabolic syndrome in hamsters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000 Sep;279(3):R936-43.
  76. Tran TT, Yamamoto Y, Gesta S, Kahn CR. Beneficial Effects of Subcutaneous Fat Transplantation on Metabolism. *Cell Metab*. 2008 May;7(5):410–20.

77. Klein S, Fontana L, Young VL, Coggan AR, Kilo C, Patterson BW, et al. Absence of an Effect of Liposuction on Insulin Action and Risk Factors for Coronary Heart Disease. *N Engl J Med*. 2004 Jun 17;350(25):2549–57.
78. Herrera MF, Pantoja JP, Velazquez-Fernandez D, Cabiedes J, Aguilar-Salinas C, Garcia-Garcia E, et al. Potential Additional Effect of Omentectomy on Metabolic Syndrome, Acute-Phase Reactants, and Inflammatory Mediators in Grade III Obese Patients Undergoing Laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass: A randomized trial. *Diabetes Care*. 2010 Jul 1;33(7):1413–8.
79. Prins JB, O’Rahilly S. Regulation of adipose cell number in man. *Clin Sci (Lond)*. 1997 Jan;92(1):3–11.
80. Faust IM, Johnson PR, Stern JS, Hirsch J. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. *Am J Physiol*. 1978;235(3):E279–86.
81. Summermatter S, Marcelino H, Arsenijevic D, Buchala A, Aprikian O, Seydoux J, et al. Relevance for Muscle-Adipose Glucose Redistribution During Catch-Up Growth. *Diabetes*. 2009;58(October):2228–37.
82. Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, et al. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest*. 1998;101(6):1354–61.
83. Hirsch J, Knittle JL. Cellularity of obese and nonobese human adipose tissue. *Fed Proc*. 29(4):1516–21.
84. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008 Jun 5;453(7196):783–7.
85. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*. 2005;46(11):2347–55.
86. van Greevenbroek MMJ, Schalkwijk CG, Stehouwer CDA. Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences. *Neth J Med*. 2013 May;71(4):174–87.
87. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):428–35.
88. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 1995 May 1;95(5):2409–15.
89. Maury E, Ehala-Aleksejev K, Guiot Y, Detry R, Vandenhooft A, Brichard SM.

- Adipokines oversecreted by omental adipose tissue in human obesity. *AJP Endocrinol Metab.* 2007 Jun 19;293(3):E656–65.
90. Shoelson SE. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006 Jul 3;116(7):1793–801.
  91. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu Rev Immunol.* 2011 Apr 23;29(1):415–45.
  92. Solinas G, Karin M. JNK1 and IKK : molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB J.* 2010 Aug 1;24(8):2596–611.
  93. Nakamura T, Furuhashi M, Li P, Cao H, Tuncman G, Sonenberg N, et al. Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase Links Pathogen Sensing with Stress and Metabolic Homeostasis. *Cell.* 2010 Feb;140(3):338–48.
  94. Gil A, María Aguilera C, Gil-Campos M, Cañete R. Altered signalling and gene expression associated with the immune system and the inflammatory response in obesity. *Br J Nutr.* 2007 Oct 9;98(S1).
  95. Schroder K, Zhou R, Tschopp J. The NLRP3 Inflammasome: A Sensor for Metabolic Danger? *Science (80- ).* 2010 Jan 15;327(5963):296–300.
  96. Van Greevenbroek MMJ, Schalkwijk CG, Stehouwer CDA. Dysfunctional adipose tissue and low-grade inflammation in the management of the metabolic syndrome: current practices and future advances. *F1000Research.* 2016;5(0):1–10.
  97. Chen B, Lam KSL, Wang Y, Wu D, Lam MC, Shen J, et al. Hypoxia dysregulates the production of adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 independent of reactive oxygen species in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Mar;341(2):549–56.
  98. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes.* 2007;56(4):901–11.
  99. Ye J, Gao Z, Yin J, He Q. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *AJP Endocrinol Metab.* 2007 Jul 24;293(4):E1118–28.
  100. Chawla A, Nguyen KD, Goh YPS. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011 Oct 10;11(11):738–49.
  101. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1796–808.



102. Ortega Martinez de Victoria E, Xu X, Koska J, Francisco AM, Scalise M, Ferrante AW, et al. Macrophage Content in Subcutaneous Adipose Tissue: Associations With Adiposity, Age, Inflammatory Markers, and Whole-Body Insulin Action in Healthy Pima Indians. *Diabetes*. 2009 Feb 1;58(2):385–93.
103. Sun K, Kusminski CCM, Scherer PEP. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2094–101.
104. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance. *Annu Rev Physiol*. 2010 Mar 17;72(1):219–46.
105. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, DeFuria J, Jick Z, et al. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes*. 2007;56(12):2910–8.
106. Harman-Boehm I, Blüher M, Redel H, Sion-Vardy N, Ovadia S, Avinoach E, et al. Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jun;92(6):2240–7.
107. Murano I, Barbatelli G, Parisani V, Latini C, Muzzonigro G, Castellucci M, et al. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res*. 2008;49(7):1562–8.
108. 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*. American Society for Clinical Investigation; 2010 Oct;120(10):3466–79.
109. Ohmura K, Ishimori N, Ohmura Y, Tokuhara S, Nozawa A, Horii S, et al. Natural Killer T Cells Are Involved in Adipose Tissues Inflammation and Glucose Intolerance in Diet-Induced Obese Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 2010 Sep;30(9):e169.
110. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med*. Nature Publishing Group; 2009 Aug 26;15(8):930–9.
111. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003 Dec 15;112(12):1821–30.
112. Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Król E. Animal models of obesity. *Obes Rev*. 2007 Mar;8(s1):55–61.
113. Chen D, Wang M-W. Development and application of rodent models for type 2 diabetes. *Diabetes, Obes Metab*. 2005 Jul;7(4):307–17.

114. Doggrel SA, Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res.* 1998;39(1).
115. Sutherland LN, Capozzi LC, Turchinsky NJ, Bell RC, Wright DC. Time course of high-fat diet-induced reductions in adipose tissue mitochondrial proteins: potential mechanisms and the relationship to glucose intolerance. *AJP Endocrinol Metab.* 2008 Aug 19;295(5):E1076–83.
116. Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr.* 2003 Apr;133(4):1081–7.
117. Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J, et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol.* 2006 Jun 1;36(3):485–501.
118. Panchal SK, Brown L, Panchal SK, Brown L. Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol.* Hindawi Publishing Corporation; 2011;2011:351982.
119. Mcpherson GC, Campbell MK, Elbourne DR. Use of randomisation in clinical trials: a survey of UK practice. *Trials.* 2012;13:1.
120. Suresh K. An overview of randomization techniques: An unbiased assessment of outcome in clinical research. *J Hum Reprod Sci.* Medknow Publications; 2011 Jan;4(1):8–11.
121. Alfaro V. Specification of laboratory animal use in scientific articles: Current low detail in the journals' instructions for authors and some proposals. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2005;27(7):495.
122. Frihauf JB, Fekete EM, Nagy TR, Levin BE, Zorilla EP. Maternal Western diet increases adiposity even in male offspring of obesity-resistant rat dams: early endocrine risk markers. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2016 Sep 21;ajpregu.00023.2016.
123. Sun Y, Neelakantan N, Wu Y, Lote-Oke R, Pan A, van Dam RM. Palm Oil Consumption Increases LDL Cholesterol Compared with Vegetable Oils Low in Saturated Fat in a Meta-Analysis of Clinical Trials. *J Nutr.* 2015 Jul 1;145(7):1549–58.
124. Odegaard AO, Koh WP, Yuan J-M, Gross MD, Pereira MA. Western-Style Fast Food Intake and Cardiometabolic Risk in an Eastern Country. *Circulation.* 2012 Jul 10;126(2):182–8.
125. Odia OJ. Palm oil and the heart: A review. *World J Cardiol.* 2015;7(3):144.
126. Snijder MB, Dekker JM, Visser M, Bouter LM, Stehouwer CDA, Kostense PJ, et al. Associations of hip and thigh circumferences independent of waist circumference with the incidence of type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Am J Clin Nutr.* 2003

- May;77(5):1192–7.
127. Arner E, Westermark PO, Spalding KL, Britton T, Ryden M, Frisen J, et al. Adipocyte Turnover: Relevance to Human Adipose Tissue Morphology. *Diabetes*. 2010 Jan 1;59(1):105–9.
  128. Gómez-Hernández A, Beneit N, Díaz-Castroverde S, Escribano Ó. Differential Role of Adipose Tissues in Obesity and Related Metabolic and Vascular Complications. *Int J Endocrinol*. 2016;2016.
  129. Clegg DJ, Brown LM, Woods SC, Benoit SC. Gonadal Hormones Determine Sensitivity to Central Leptin and Insulin. *Diabetes*. 2006;55(4).
  130. Egbewale BE. Random allocation in controlled clinical trials: a review. *J Pharm Pharm Sci*. 2014;17(2):248–53.
  131. Laaksonen K, Nevalainen T, Haasio K, Kasanen I, Nieminen P, Voipio H-M. Food and water intake, growth, and adiposity of Sprague-Dawley rats with diet board for 24 months. *Lab Anim*. SAGE PublicationsSage UK: London, England; 2013 Oct 1;47(4):245–56.
  132. Parasuraman S, Raveendran R, Kesavan R. Blood sample collection in small laboratory animals. *J Pharmacol Pharmacother*. Medknow Publications; 2010 Jul;1(2):87–93.
  133. de La Serre CB, Ellis CL, Lee J, Hartman AL, Rutledge JC, Raybould HE, et al. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol - Gastrointest liver Physiol*. 2010;299(2):G440-8.
  134. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med*. Medknow Publications; 2013 Jun;4(6):624–30.
  135. 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. *Ann Oncol*. 2000 Sep;11(9):1121–6.
  136. Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GMX, Rodrigues HG, Mani F, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim*. 2007;41(1):111–9.
  137. Hindmarsh JT. Jacobs and DeMott, *Laboratory Test Handbook*, 5th Edition. *Clin Biochem*. 2002 Jun;35(4):335.
  138. Hirsch J, Gallian E. Methods for the determination of adipose cell size in man and animals. *J Lipid Res*. 1968;9(1):110–9.
  139. Parlee SD, Lentz SI, Mori H, MacDougald OA. Quantifying Size and Number of

- Adipocytes in Adipose Tissue. In: *Methods in enzymology*. 2014. p. 93–122.
140. Carpenter AE, Jones TR, Lamprecht MR, Clarke C, Kang IH, Friman O, et al. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol.* 2006;7(10):R100.
  141. Kametsky L, Jones TR, Fraser A, Bray M-A, Logan DJ, Madden KL, et al. Improved structure, function and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software. *Bioinformatics.* 2011 Apr 15;27(8):1179–80.
  142. Lamprecht MR, Sabatini DM, Carpenter AE. CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis. *Biotechniques.* 2007 Jan;42(1):71–5.
  143. Ramo P, Sacher R, Snijder B, Begemann B, Pelkmans L. CellClassifier: supervised learning of cellular phenotypes. *Bioinformatics.* Oxford University Press; 2009 Nov 15;25(22):3028–30.
  144. Gu H, Werner J, Bergmann F, Whitcomb DC, Büchler MW, Fortunato F. Necro-inflammatory response of pancreatic acinar cells in the pathogenesis of acute alcoholic pancreatitis. *Cell Death Dis.* 2013 Oct 3;4(10):e816.
  145. Abbondanzo SJ, Chang SL. HIV-1 Transgenic Rats Display Alterations in Immunophenotype and Cellular Responses Associated with Aging. Zheng JC, editor. *PLoS One.* 2014 Aug 15;9(8):e105256.
  146. Wei J, Sun X, Chen Y, Li Y, Song L, Zhou Z, et al. Perinatal exposure to bisphenol A exacerbates nonalcoholic steatohepatitis-like phenotype in male rat offspring fed on a high-fat diet. *J Endocrinol.* 2014 Aug 11;222(3):313–25.
  147. de Souza AWS, van Timmeren M, Sanders J-S, Stegeman C, Heeringa P, Kallenberg CGM, et al. M2 macrophage is the predominant phenotype in airways inflammatory lesions in patients with granulomatosis with polyangiitis. *Arthritis Res Ther.* 2017 Dec 18;19(1):100.
  148. Kunisch E, Fuhrmann R, Roth A, Winter R, Lungershausen W, Kinne RW. Macrophage specificity of three anti-CD68 monoclonal antibodies (KP1, EBM11, and PGM1) widely used for immunohistochemistry and flow cytometry. *Ann Rheum Dis.* BMJ Publishing Group; 2004 Jul;63(7):774–84.
  149. Leong AS-Y (Anthony S-Y, Cooper K, Leong FJW-M. *Manual of diagnostic antibodies for immunohistology.* Greenwich Medical Media; 2003.
  150. van Steenberghe M, Schubert T, Guiot Y, Bouzin C, Bollen X, Gianello P. Enhanced vascular biocompatibility of decellularized xeno-/allogeneic matrices in a rodent model. *Cell Tissue Bank.* 2017 Jun 25;18(2):249–62.

151. Zutphen LFM van., Baumans V, Beynen AC. Principles of laboratory animal science : a contribution to the humane use and care of animals and to the quality of experimental results. Amsterdam ; Elsevier; 1993. 389 p.
152. Marušić M. Uvod u znanstveni rad u medicini. 5. izd. Medicinska naklada; 2013.
153. Armitage JA, Poston L, Taylor PD. Developmental origins of obesity and the metabolic syndrome: the role of maternal obesity. *Front Horm Res.* 2008;36:73–84.
154. Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia.* 1993 Jan;36(1):62–7.
155. Levin BE, Keeseey RE. Defense of differing body weight set points in diet-induced obese and resistant rats. *Am J Physiol.* 1998 Feb;274(2 Pt 2):R412-9.
156. Rolls BJ, Shide DJ. The influence of dietary fat on food intake and body weight. *Nutr Rev.* 1992 Oct;50(10):283–90.
157. Green SM, Delargy HJ, Joanes D, Blundell JE. A satiety quotient: a formulation to assess the satiating effect of food. *Appetite.* 1997 Dec;29(3):291–304.
158. Green SM, Wales JK, Lawton CL, Blundell JE. Comparison of high-fat and high-carbohydrate foods in a meal or snack on short-term fat and energy intakes in obese women. *Br J Nutr.* 2000 Oct;84(4):521–30.
159. Monteleone P, Bencivenga R, Longobardi N, Serritella C, Maj M. Differential Responses of Circulating Ghrelin to High-Fat or High-Carbohydrate Meal in Healthy Women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Nov;88(11):5510–4.
160. Levin BE, Dunn-Meynell AA, Balkan B, Keeseey RE. Selective breeding for diet-induced obesity and resistance in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 1997;273(2).
161. Smith BK, Andrews PK, West DB. Macronutrient diet selection in thirteen mouse strains. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2000;278(4).
162. Vielwerth SE, Jensen RB, Larsen T, Holst KK, Mølgaard C, Greisen G, et al. The effect of birthweight upon insulin resistance and associated cardiovascular risk factors in adolescence is not explained by fetal growth velocity in the third trimester as measured by repeated ultrasound fetometry. *Diabetologia.* 2008 Aug 21;51(8):1483–92.
163. Holemans K, Aerts L, Van Assche FA. Lifetime consequences of abnormal fetal pancreatic development. *J Physiol.* Wiley-Blackwell; 2003 Feb 15;547(Pt 1):11–20.
164. Howie GJ, Sloboda DM, Kamal T, Vickers MH. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol.* 2009 Feb 15;587(Pt

- 4):905–15.
165. Dudley KJ, Sloboda DM, Connor KL, Beltrand J, Vickers MH. Offspring of Mothers Fed a High Fat Diet Display Hepatic Cell Cycle Inhibition and Associated Changes in Gene Expression and DNA Methylation. Wutz A, editor. PLoS One. Public Library of Science; 2011 Jul 11;6(7):e21662.
  166. Ford SP, Long NM. Evidence for similar changes in offspring phenotype following either maternal undernutrition or overnutrition: potential impact on fetal epigenetic mechanisms. *Reprod Fertil Dev*. CSIRO PUBLISHING; 2012;24(1):105.
  167. Cerf ME, Williams K, Nkomo XI, Muller CJ, Du Toit DF, Louw J, et al. Islet cell response in the neonatal rat after exposure to a high-fat diet during pregnancy. *AJP Regul Integr Comp Physiol*. 2005 May 1;288(5):R1122–8.
  168. Marić A, Kačarević ŽP, Čekić N, Šerić V, Radić R. Effects of between generations changes in nutrition type on vaginal smear and serum lipids in Sprague–Dawley rats. *J Matern Neonatal Med*. 2016 May 2;29(9):1491–7.
  169. Montoudis A, Simoneau L, Brisette L, Forest JC, Savard R, Lafond J. Impact of a cholesterol enriched diet on maternal and fetal plasma lipids and fetal deposition in pregnant rabbits. *Life Sci*. 1999;64(26):2439–50.
  170. Bhasin KKS, van Nas A, Martin LJ, Davis RC, Devaskar SU, Lusic AJ. Maternal Low-Protein Diet or Hypercholesterolemia Reduces Circulating Essential Amino Acids and Leads to Intrauterine Growth Restriction. *Diabetes*. 2009 Mar 1;58(3):559–66.
  171. Savino F, Sardo A, Rossi L, Benetti S, Savino A, Silvestro L. Mother and Infant Body Mass Index, Breast Milk Leptin and Their Serum Leptin Values. *Nutrients*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2016 Jun 21;8(6).
  172. Qasem RJ, Li J, Tang HM, Pontiggia L, D’mello AP. Maternal protein restriction during pregnancy and lactation alters central leptin signalling, increases food intake, and decreases bone mass in 1 year old rat offspring. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2016 Apr;43(4):494–502.
  173. Zinkhan EK, Zalla JM, Carpenter JR, Yu B, Yu X, Chan G, et al. Intrauterine growth restriction combined with a maternal high-fat diet increases hepatic cholesterol and low-density lipoprotein receptor activity in rats. *Physiol Rep*. 2016 Jul 11;4(13):e12862.
  174. Ravelli AC, van der Meulen JH, Michels RP, Osmond C, Barker DJ, Hales CN, et al. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet (London, England)*. 1998 Jan 17;351(9097):173–7.
  175. Lindsay RS, Dabelea D, Roumain J, Hanson RL, Bennett PH, Knowler WC. Type 2

- diabetes and low birth weight: the role of paternal inheritance in the association of low birth weight and diabetes. *Diabetes*. 2000 Mar;49(3):445–9.
176. Demicheva E, Crispi F. Long-Term Follow-Up of Intrauterine Growth Restriction: Cardiovascular Disorders. *Fetal Diagn Ther*. 2014;36(2):143–53.
  177. King JC. Maternal Obesity, Metabolism, and Pregnancy Outcomes. *Annu Rev Nutr*. 2006 Aug;26(1):271–91.
  178. Hales CN, Barker DJP. The thrifty phenotype hypothesis: Type 2 diabetes. *Br Med Bull*. 2001;60(1):5–20.
  179. Wang L, Xu F, Zhang X-J, Jin R-M, Li X. Effect of high-fat diet on cholesterol metabolism in rats and its association with Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase/Src/pERK signaling pathway. *J Huazhong Univ Sci Technol*. 2015 Aug 31;35(4):490–4.
  180. Kačarević ŽP, Grgić A, Šnajder D, Bijelić N, Belovari T, Cvijanović O, et al. Different combinations of maternal and postnatal diet are reflected in changes of hepatic parenchyma and hepatic TNF-alpha expression in male rat offspring. *Acta Histochem*. 2017 Sep;
  181. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med*. 2001 Aug 1;7(8):941–6.
  182. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Apr 2;257(1):79–83.
  183. Kappes A, Löffler G. Influences of Ionomycin, Dibutyryl-cycloAMP and Tumour Necrosis Factor-alpha on Intracellular Amount and Secretion of apM1 in Differentiating Primary Human Preadipocytes. *Horm Metab Res*. 2000 Jan 19;32(11/12):548–54.
  184. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993 Jan 1;259(5091):87–91.
  185. Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G. Adiponectin Expression From Human Adipose Tissue. *Diabetes*. 2003;52(7):1779–85.
  186. Wu Z, Chen Y, Zhao S. Simvastatin inhibits ox-LDL-induced inflammatory adipokines secretion via amelioration of ER stress in 3T3-L1 adipocyte. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Mar 8;432(2):365–9.
  187. Ornellas F, Mello VS, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Sexual dimorphism in fat distribution and metabolic profile in mice offspring from diet-induced obese mothers.

- Life Sci. 2013 Oct 6;93(12–14):454–63.
188. Winkler G, Kiss S, Keszthelyi L, Sápi Z, Ory I, Salamon F, et al. Expression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha protein in the subcutaneous and visceral adipose tissue in correlation with adipocyte cell volume, serum TNF-alpha, soluble serum TNF-receptor-2 concentrations and C-peptide level. *Eur J Endocrinol*. 2003 Aug;149(2):129–35.
  189. Symonds ME, Sebert SP, Budge H. The impact of diet during early life and its contribution to later disease: critical checkpoints in development and their long-term consequences for metabolic health. *Proc Nutr Soc*. 2009 Nov 1;68(4):416.
  190. Ruderman NB, Schneider SH, Berchtold P. The “metabolically-obese,” normal-weight individual. *Am J Clin Nutr*. 1981 Aug;34(8):1617–21.
  191. Unger RH, Scherer PE. Gluttony, sloth and the metabolic syndrome: a roadmap to lipotoxicity. *Trends Endocrinol Metab*. 2010 Jun;21(6):345–52.
  192. Xue R, Wan Y, Zhang S, Zhang Q, Ye H, Li Y. Role of bone morphogenetic protein 4 in the differentiation of brown fat-like adipocytes. *AJP Endocrinol Metab*. 2014 Feb 15;306(4):E363–72.
  193. Schulz T, Tseng Y. Emerging role of bone morphogenetic proteins in adipogenesis and energy metabolism. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20:523–31.
  194. LACROIX P. Recent Investigations on the Growth of Bone. *Nature*. 1945 Nov 10;156(3967):576–576.
  195. Baraban E, Chavakis T, Hamilton BS, Sales S, Wabitsch M, Bornstein SR, et al. Anti-inflammatory properties of bone morphogenetic protein 4 in human adipocytes. *Int J Obes*. Nature Publishing Group; 2016;40(2):319–27.
  196. 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 Histochem*. 2016;118(7):711–21.
  197. Kim CW, Song H, Kumar S, Nam D, Kwon HS, Chang KH, et al. Anti-Inflammatory and Antiatherogenic Role of BMP Receptor II in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Jun 1;33(6):1350–9.
  198. Fang L, Guo F, Zhou L, Stahl R, Grams J. The cell size and distribution of adipocytes from subcutaneous and visceral fat is associated with type 2 diabetes mellitus in humans. *Adipocyte*. 2015 Oct 2;4(4):273–9.
  199. Scherer PE. The Multifaceted Roles of Adipose Tissue—Therapeutic Targets for Diabetes and Beyond: The 2015 Banting Lecture. *Diabetes*. 2016 Jun 24;65(6):1452–61.
  200. Vona-Davis L, Rose DP. Angiogenesis, adipokines and breast cancer. *Cytokine Growth*



- Factor Rev. 2009 Jun;20(3):193–201.
201. Landskroner-Eiger S, Qian B, Muise ES, Nawrocki AR, Berger JP, Fine EJ, et al. Proangiogenic contribution of adiponectin toward mammary tumor growth in vivo. *Clin Cancer Res. NIH Public Access*; 2009 May 15;15(10):3265–76.
  202. Kim J-Y, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest*. 2007 Sep 4;117(9):2621–37.
  203. Sun K, Asterholm IW, Kusminski CM, Bueno AC, Wang Z V., Pollard JW, et al. Dichotomous effects of VEGF-A on adipose tissue dysfunction. *Proc Natl Acad Sci*. 2012 Apr 10;109(15):5874–9.
  204. Clemente-Postigo M, Queipo-Ortuño MI, Fernandez-Garcia D, Gomez-Huelgas R, Tinahones FJ, Cardona F. Adipose Tissue Gene Expression of Factors Related to Lipid Processing in Obesity. Gimble JM, editor. *PLoS One*. 2011 Sep 22;6(9):e24783.
  205. Cao Y. Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Feb;9(2):107–15.
  206. Blüher S, Markert J, Herget S, Yates T, Davis M, Müller G, et al. Who Should We Target for Diabetes Prevention and Diabetes Risk Reduction? *Curr Diab Rep*. 2012 Apr 2;12(2):147–56.
  207. Sutherland JP, McKinley B, Eckel RH. The Metabolic Syndrome and Inflammation. *Metab Syndr Relat Disord*. 2004 Jun;2(2):82–104.
  208. Khan T, Muise ES, Iyengar P, Wang Z V., Chandalia M, Abate N, et al. Metabolic Dysregulation and Adipose Tissue Fibrosis: Role of Collagen VI. *Mol Cell Biol*. 2009 Mar 15;29(6):1575–91.
  209. Berria R, Wang L, Richardson DK, Finlayson J, Belfort R, Pratipanawat T, et al. Increased collagen content in insulin-resistant skeletal muscle. *AJP Endocrinol Metab*. 2005 Oct 4;290(3):E560–5.
  210. Barros MHM, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS One. Public Library of Science*; 2013;8(11):e80908.
  211. Kusminski CM, Holland WL, Sun K, Park J, Spurgin SB, Lin Y, et al. MitoNEET-driven alterations in adipocyte mitochondrial activity reveal a crucial adaptive process that preserves insulin sensitivity in obesity. *Nat Med*. 2012 Sep 9;18(10):1539–49.
  212. Pajvani UB, Hawkins M, Combs TP, Rajala MW, Doebber T, Berger JP, et al. Complex Distribution, Not Absolute Amount of Adiponectin, Correlates with Thiazolidinedione-

- mediated Improvement in Insulin Sensitivity. *J Biol Chem.* 2004 Mar 26;279(13):12152–62.
213. Perelas A, Tsoukani A, Perrea D. Effects of lipid-lowering drugs on adiponectin. *Curr Vasc Pharmacol.* 2010 Nov;8(6):836–48.
  214. Barbarroja N, López-Pedreira R, Mayas MD, García-Fuentes E, Garrido-Sánchez L, Macías-González M, et al. The obese healthy paradox: is inflammation the answer? *Biochem J.* 2010 Aug 15;430(1):141–9.
  215. 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. *Arch Intern Med.* 2008 Aug 11;168(15):1617.
  216. Muñoz-Garach A, Cornejo-Pareja I, Tinahones FJ. Does metabolically healthy obesity exist? *Nutrients.* 2016;8(6):1–10.
  217. Janiszewski PM, Ross R. Effects of weight loss among metabolically healthy obese men and women. *Diabetes Care.* American Diabetes Association; 2010 Sep;33(9):1957–9.
  218. Arsenault BJ, Côté M, Cartier A, Lemieux I, Després J-P, Ross R, et al. Effect of exercise training on cardiometabolic risk markers among sedentary, but metabolically healthy overweight or obese post-menopausal women with elevated blood pressure. *Atherosclerosis.* 2009 Dec;207(2):530–3.
  219. Hwang Y-C, Hayashi T, Fujimoto WY, Kahn SE, Leonetti DL, McNeely MJ, et al. Visceral abdominal fat accumulation predicts the conversion of metabolically healthy obese subjects to an unhealthy phenotype. *Int J Obes.* Nature Publishing Group; 2015 Sep 29;39(9):1365–70.
  220. Soriguer F, Gutiérrez-Repiso C, Rubio-Martín E, García-Fuentes E, Almaraz MC, Colomo N, et al. Metabolically Healthy but Obese, a Matter of Time? Findings From the Prospective Pizarra Study. *J Clin Endocrinol Metab.* Oxford University Press; 2013 Jun;98(6):2318–25.
  221. Dalzell C, Nigam A, Juneau M, Guilbeault V, Latour E, Mauriège P, et al. Intensive Lifestyle Intervention Improves Cardiometabolic and Exercise Parameters in Metabolically Healthy Obese and Metabolically Unhealthy Obese Individuals. *Can J Cardiol.* 2014 Apr;30(4):434–40.

## **11. Životopis**

### OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Darija Šnajder

Datum i mjesto rođenja: 26. siječnja 1984., Osijek

Adresa: Krstova 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Mobitel: 091 9468 517

Elektronička pošta: dsnajder@mefos.hr

### ŠKOLOVANJE

1990.-1998. – Osnovna škola Ljudevita Gaja, Osijek

1998.-2002. – III. gimnazija Osijek

2002.-2008. – Medicinski fakultet Osijek, Sveučilišni integrirani preddiplomski i diplomski studij medicine

2011.-2015. – specijalizacija iz nuklearne medicine, Klinički bolnički centar Osijek

2012./2013. – Poslijediplomski specijalistički studij Nuklearna medicina, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

### ZAPOSLENJE

Od 2008. – Katedra za anatomiju i neuroznanost Medicinskog fakulteta Osijek

Od 2011. – Klinički zavod za nuklearnu medicinu i zaštitu od zračenja, Klinički bolnički centar Osijek

### OBJAVLJENI ZNANSTVENI I STRUČNI RADOVI

Autorske knjige

Kusić Z, Bence Žigman Z, Dabelić N, Delalić H, Dmitrović B, Dumić M, Đelmiš J, Franceschi M, Granić R, Jukić T, Jurić A, Kizivat T, Kordić Brandić M, Kruljac I, Marić I, Mihaljević I, Mijatović K, Pajtlar M, Pauzar B, Punda A, Punda M, Staničić J, Šnajder D, Vrkljan M, Žmire J. Hipotireoza. Zagreb: Medicinska naklada; 2014.

#### Poglavlja u knjizi

Heffer-Lauc M, Vajn K, Šnajder D, Viljetić B. Banke tkiva i organa. U: Fatović-Ferenčić S, Tucak A, urednici. Medicinska etika. Zagreb: Medicinska naklada, 2011. str. 89-98.

#### Izvorni znanstveni radovi

1. Šnajder D, Perić Kačarević Ž, Grgić A, Bijelić N, Fenrich M, Belovari T, Radić R. Effect of Different Combination of Maternal and Postnatal Diet on Adipose Tissue Morphology in Male Rat Offspring. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2018; DOI: 10.1080/14767058.2017.1419181.
2. Perić Kačarević Ž, Grgić A, Šnajder D, Bijelić N, Belovari T, Cvijanović O, Balžičević V, Radić R. Different combinations of maternal and postnatal diet are reflected in changes of hepatic parenchyma and hepatic TNF-alpha expression in male rat offspring. *Acta Histochem*. 2017 Sep.
3. Perić Kačarević Ž, Šnajder D, Marić A, Bijelić N, Cvijanović O, Domitrović R, Radić R. High-fat diet induced changes in lumbar vertebra of the male rat offsprings. *Acta Histochemica*. 2016;118:711-721.
4. Labak I, Šnajder D, Kostović Srzentić M, Benšić M, Ništ M, Ilakovac V, Heffer-Lauc M. Writing and Drawing with Both Hands as Indicators of Hemispheric Dominance. *Collegium antropologicum*. 2011;35(S1):65-71.
5. Nikolić V, Radić R, Selthofer R, Mišević T, Dmitrović B, Šnajder D, Šišljagić V, Belovari T, Sučić Z. Vasculometry of Upper and Lower Extremities in Correlation with Development of Pathologic Conditions like the Diabetic Foot. *Collegium Antropologicum*. 2010;34(S1):77-81.