UTJECAJ PRIMJENE 13 – CIS RETINOIČNE KISELINE I VISOKOMASNE PREHRANE NA RAZVOJ METABOLIČKOG SINDROMA U LEWIS ŠTAKORICA

Ilić, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:044408

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ivana Ilić

UTJECAJ PRIMJENE 13 – CIS RETINOIČNE KISELINE I VISOKOMASNE PREHRANE NA RAZVOJ METABOLIČKOG SINDROMA U LEWIS ŠTAKORICA

Doktorska disertacija

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ivana Ilić

UTJECAJ PRIMJENE 13 – CIS RETINOIČNE KISELINE I VISOKOMASNE PREHRANE NA RAZVOJ METABOLIČKOG SINDROMA U LEWIS ŠTAKORICA

Doktorska disertacija

Osijek, 2021.

Mentorica rada: prof. dr. sc. Nada Oršolić

Komentorica rada: prof. dr. sc. Tatjana Belovari, dr. med.

Rad ima 145 stranica.

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Nadi Oršolić na aktivnom sudjelovanju u cijelom istraživanju: pomoći i aktivnom zalaganju pri osmišljavanju i provedbi pokusa, od njegovih začetaka do samog kraja, pisanju rada, oblikovanju doktorske disertacije, konkretnim i smislenim rješenjima te – ne manje važnoj – usađenoj ljubavi prema znanosti.

Zahvaljujem komentorici prof. dr. sc. Tatjani Belovari i svim djelatnicima Zavoda za histologiju i embriologiju, osobito mag. biol. exp. Ediju Rođaku.

Hvala djelatnicima Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu na pomoći i savjetima prilikom provedbe pokusa i svih dijelova istraživanja.

Zahvaljujem Fakultetu za dentalnu medicinu i zdravstvo na potpori prilikom istraživanja, osobito članovima Katedre za anatomiju, histologiju, embriologiju, patološku anatomiju i patološku histologiju.

Hvala prijateljima koji su bili i ostali uz mene.

Hvala mojoj braći koji su bili moj smijeh u lošim danima.

Velika hvala mojim roditeljima koji su mi tijekom cijelog života i školovanja pružali ljubav, podršku, razumijevanje te uvijek imali konkretna i konstruktivna rješenja za svaki moj problem.

Hvala mojima Mateju i Ani….. Vi ste moj život obojili najljepšim bojama i svemu što radim dali smisao. Ovo je naš zajednički uspjeh.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA IV
POPIS TABLICA IX
POPIS SLIKA XI
1. UVOD 1
1.1. Pretilost 1
1.2. Metabolički sindrom 2
1.3. Masno tkivo 3
1.3.1. Plastičnost masnog tkiva 4
1.3.2. Podjela masnog tkiva 5
1.4. Adipokini 6
1.4.1. Leptin 6
1.4.2. Adiponektin 8
1.5. Proupalni citokini 10
1.5.1. Leptin kao proupalni citokin 12
1.6. Makrofagna polarizacija i mogućnost njezine modulacije 13
1.7. Arginaza i dušik oksid 15
1.8. Nealkoholna masna bolest jetre 16
1.9. Oksidacijski stres 18
1.9.1. Slobodni radikali 18
1.9.2. Reaktivne kisikove vrste – ROS 19
1.9.3. Reaktivne dušikove vrste – RNS 20
1.9.4. Egzogeni izvori slobodnih radikala 20
1.9.5. Utjecaj oksidacijskog stresa na stanične komponente i signalne puteve 20
1.10. Antioksidansi 21
1.10.1. Enzimski antioksidansi 21
1.10.2. Neenzimski antioksidansi 22
1.11. Oksidacijski stres i pretilost 23
1.12. Vitamin A 24
1.13. Uloga vitamina A i njegovih metabolita u pretilosti i oksidacijskom stresu 25
1.14. 13 – cis retinoična kiselina 27
1.15. Model štakora u istraživanjima pretilosti i metaboličkih poremećaja 27
2. HIPOTEZA 29
3. CILJ ISTRAŽIVANJA 30
4. MATERIJAL I METODE 31
4.1. Pokusne životinje 31
4.2. Hrana za životinje 31
4.3. Plan pokusa 33
4.4. Praćenje promjene ukupne mase štakora 34
4.5. Praćenje unosa hrane i vode 35
4.6. Adipozni indeks 35
4.7. Relativna masa pojedinih organa 35

4.8. Oralni test tolerancije glukoze i glikemijske promjene tijekom vremena 35
4.9. Analiza hormona leptina i adiponektina 36
4.10. Lipidogram i aterogeni pokazatelji 36
4.11. Analiza upalnih citokina 37
4.12. Mjerenje dušikovog oksida indirektnom metodom prema Griessu 38
4.13. Određivanje aktivnosti arginaze 38
4.14. Hematološka analiza krvi 39
4.15. Biokemijska analiza krvi 39
4.16. Analiza parametara oksidacijskog stresa jetre i bubrega 40
4.16.1. Priprema uzoraka za analizu 40
4.16.2. Određivanje proteina po Lowreyu 40
4.16.3. Enzimska aktivnost katalaze 41
4.16.4. Lipidna peroksidacija 42
4.16.5. Razina ukupnog glutationa 43
4.17. Histološka analiza jetre 44
4.17.1. Priprema uzoraka za analizu 44
4.17.2. Analiza stupnja steatoze 44
4.17.3. Analiza stupnja fibroze 45
4.18. Statistička analiza 45
5. REZULTATI 47
5.1. Promjena mase štakora 47
5.2. Unos hrane i vode i adipozni indeks 49
5.3. Relativna masa organa 51
5.4. Oralni test tolerancije glukoze i glikemijske promjene 53
5.5. Analiza hormona leptina i adiponektina 56
5.6. Lipidogram 57
5.7. Aterogeni pokazatelji 61
5.8. Analiza upalnih citokina 65
5.9. Analiza aktivnosti dušikovog oksida 68
5.10. Analiza aktivnosti arginaze 71
5.11. Hematološka analiza krvi 73
5.12. Biokemijska analiza krvi 77
5.13. Parametri oksidacijskog stresa 82
5.13.1. Mjerenje aktivnosti katalaze u uzorcima tkiva bubrega i jetre 82
5.13.2. Mjerenje lipidne peroksidacije u uzorcima tkiva bubrega i jetre 84
5.13.3. Mjerenje ukupnog glutationa u uzorcima tkiva bubrega i jetre 86
5.14. Histološka analiza jetre 88
5.14.1. Steatoza jetre 88
5.14.2. Fibroza jetre 89
6. RASPRAVA 92
7. ZAKLJUČAK 109
8. SAŽETAK 110
9. SUMMARY 111

10. LITERATURA 112
11. ŽIVOTOPIS 140

POPIS KRATICA

AC	aterogeni koeficijent (engl. *atherogenic coefficient*)
AIP	aterogeni indeks (engl. *atherogenic index*)
ALB	albumini (engl. *albumins*)
ALP	alkalna fosfataza (engl. *alkaline phosphatase*)
ALT	alanin aminotranferaza (engl. *alanin aminotranferase*)
AMY	amilaza (engl. *amylase*)
AP-1	protein aktivacije (engl. *activator protein-1*)
Arg-1	arginin 1 (engl. *arginine 1*)
ATM	makrofagi masnog tkiva (engl. *adipose tissue macrophage*)
BAT	smeđe masno tkivo (engl. *brown adipose tissue*)
BMI	indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)
BSA	goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumine*)
BUN	dušik urea u krvi (engl. *blood urea nitrogen*)
CA^{2+}	kalcij (engl. *calcium*)
CAT	katalaza (engl. *catalase*)
CLS	strukture slične kruni (engl. *crown like structures*)
CPI	kardioprotektivni indeks (engl. *cardioprotective index*)
CRABP	stanični vezni protein (engl. *retinoic acid binding protein*)
CRE	kreatinin (engl. *creatinine*)
CRP	C reaktivni protein (engl. *C reactive protein*)
CRR	kardijalni rizik (engl. *cardiac risk*)
CuZn-SOD	izoforma SOD, bakar-cink superoksid dismutaza (engl. *SOD isoform dependent on copper and zinc*)
DM II	dijabetes melitus tipa II (engl. *type II diabetes mellitus*)
DTNB	5,5-ditiobis-2-nitrobenzoična kiselina (engl. *5,5-ditiobis-2-nitobenzoic acid*)

ECM	izvanstanični matriks (engl. *extracellular matrix*)
EC-SOD	izvanstanična izoforma SOD (engl. *SOD extracellular isoform*)
eNOS	endotelna dušik oksid sintaza (engl. *endothelial nitric oxide synthase*)
EPC	endotelne progenitorne stanice (engl. *endothel progenitor cells*)
FFA	slobodne masne kiseline (engl. *free fatty acids*)
GLOB	globulini (engl. *globulins*)
GSH	glutation (engl. *glutathione*)
GSH/GSSG	omjer oksidiranog i reducuranog glutationa (*GSH/GSSG ratio)*
GSH-Px	glutation peroksidaza (engl. *glutathione peroxidase*)
H	hematokrit (engl. *haematokrit*)
H_2O_2	hidrogen peroksid (engl. *hydrogen peroxide*)
Hbg	hemoglobin (engl. *haemoglobin*)
HDL-c	lipoproteini visoke gustoće (engl. *high density lipoproteins*)
HE	hemalaun eozin (engl. *hemalaun eosin*)
HFD	visokomasna hrana (engl. *high fat diet*)
HMW	adiponektin visoke molekularne težine (engl. *high molecular weight*)
HSC	hepatalne zvjezdaste stanice (engl. *hepatic stellate cells*)
IFN-γ	interferon gama (engl. *interferon gamma*)
IL-10	interleukin 10 (engl. *interleukin 10*)
IL-18	interleukin 18 (engl. *interleukin 18*)
IL-1β	interleukin 1 beta (engl. *interleukin 1β*)
IL-6	intekleukin 6 (engl. *interleukin 6*)
IL-8	interleukin 8 (engl. *interleukin 8*)
iNOS	inducibilna dušik oksid sintaza (engl. *inducible nitric oxide synthase*)
K^+	kalij (engl. *potassium*)
KOPB	kronično opstruktivna plućna bolest (engl. *chronic obstructive pulmonary disease*)

LDL-c	lipoproteini niske gustoće (engl. *low density lipoproteins*)
LMW	adiponektin niske molekularne težine (engl. *low molecular weight*)
LPL	lipoprotein lipaza (engl. *lipoprotein lipase*)
LPS	bakterijski lipopolisaharid (engl. *bacterial lipopolysaccharides*)
LTB4	leukotrien B4 (engl. *leukotriene B4*)
MCH	prosječna količina hemoglobina u eritrocitima (engl. *mean corpuscular hemoglobin*
MCHC	prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima (engl. *mean corpuscular hemoglobin concentration*)
MCP-1	monocitni kemotaktički čimbenik 1 (engl. *monocyte chemotactic factor-1*)
MCV	prosječni volumen eritrocita (engl. *mean corpuscular volume*)
MDA	malondialdehid (engl. *malondialdehyde*)
MIF	inhibitor migracije (engl. *migration inhibitory factor*)
MMW	adiponektin srednje molekularne težine (engl. *medium molecular weight*)
Mn-SOD	izoforma SOD, mangan superoksid dismutaza (engl. *SOD isoform depedent on mangan*)
NA^+	natrij (engl. *sodium*)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)
NAFL	hepatosteatoza (engl. *nonalcoholic fatty liver*)
NAFLD	nealkoholna masna bolest jetre (engl. *non alcoholic fatty liver disease*)
NAFLD	nealkoholna masna bolest jetre (engl. *nonalcoholic fatty liver disease*)
NASH	nealkoholni steatohepatitis (engl. *nonalcoholic steatohepatitis*)
NF-κB	nuklearni čimbenik kappa B (engl. *nuclear factor kappa B*)
NK stanice	prirodnoubilačke stanice (engl. *NK cells*)
nNOS	neuronalna dušik oksid sintaza (engl. *neuronal nitric oxide synthase*)
NO	dušikov oksid (engl. *nitric oxide*)
NOS	dušik oksid sintaza (engl. *nitric oxide synthase*)
O_2^-	superoksidni anion (engl. *superoxide anion*)

OGTT	oralni test tolerancije glukoze (engl. *oral glucose tolerance test*)
OH^-	hidroksilni radikal (engl. *hydroxyl radical*)
$ONOO^-$	peroksinitrit (engl. *peroxynitrite*)
PAI-I	plazminogen aktivator inhibitor I (engl. *plasminogen activator inhibitor-I*)
PDGF	trombocitni čimbenik rasta (engl. *platelet derived growth factor*)
PHOS	fosfati (engl. *phosphate*)
PNPLA3	patatin-slična domeni fosfolipaza proteina A3 (engl. *patatin-like phospholipase domain containing 3*)
PTH	paratiroidni hormon (engl. *parathyroid hormone*)
RA	retinoična kiselina (engl. *retinoic acid*)
RalDH	retinal dehindrogenaza (engl. *retinal dehydrogenase*)
RANTES	kemokin CCL5 (engl. *regulated on activation and secretion normal T cell expressed*)
RBP	retinol-vezujući protein (engl. *retinol binding protein*)
RDW	raspodjela eritrocita prema veličini (engl. *red blood cell distribution width*)
RNS	reaktivni dušikovi radikali (engl. *reactive nitrogen species*)
RoDH	retinol dehidrogenaza (engl. *retinol dehydrogenase*)
ROS	reaktivni kisikovi radikali (engl. *reactive oxygen species*)
SOCS2	supresor citokinske signalizacije-*2* (engl. *suppressor of cytokine signaling 2*)
SOD	superoksid dismutaza (engl. *superoxide dismutase*)
STD	standardna hrana (engl. *standard laboratory chow diet*)
SVF	stromalna vaskularna frakcija (engl. *stromal vascular fraction*)
TBA	tiobarbituratna kiselina (engl. *thiobarbituric acid*)
TBIL	ukupni bilirubin (engl. *total bilirubin*)
TC	ukupni kolesterol (engl. *total cholesterol*)
TG	trigliceridi (engl. *triglycerides*)
TGF-β	transformirajući čimbenik rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*)

TLR4	receptor sličan Toll receptoru 4 (engl. *toll like receptors)*
TNB	5 –tionitrobenzoična kiselina (engl. *tionitrobenzoic acid*)
TNF-α	čimbenik tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor alpha*)
TP	ukupni proteini (engl. *total proteins*)
T_{reg}	T regulatorne stanice (engl. *T regulatory cells*)
UCP-1	termogenin (engl. *uncoupling protein-1*)
VEGF	krvožilni endotelni čimbenik rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*)
VLDL-c	lipoproteini vrlo niske gustoće (engl. *very low density lipoproteins*)
VPC	vaskularne progenitorne stanice (engl. *vascular progenitor cells*)
WAT	bijelo masno tkivo (engl. *white adipose tissue*)
WHO	svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*)
XO	ksantin oksidaza (engl. *xanthine oxidase*)
13 cRA	13 cis retinoična kiselina (*13 cis retinoic acid*)

POPIS TABLICA

Tablica 4.1. Sastav standardne i visokomasne hrane. 32

Tablica 4.2. Priprema otopina korištenih u određivanju proteina metodom po Lowryu. 41
Tablica 4.3. Priprema otopine A. 43

Tablica 5.1. Analiza unosa hrane, vode i adipozni indeks štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 50

Tablica 5.2. Analiza lipida (kolesterola, triglicerida, lipoproteina visoke gustoće) u krvi štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).....59

Tablica 5.3. Analiza lipida (lipoproteina niske gustoće i lipoproteina vrlo niske gustoće) u krvi štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 60

Tablica 5.4. Serumska analiza upalnih citokina (interleukin 1α, interleukin 1ß**,** interleukin 2, interleukin 4) štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 66

Tablica 5.5. Serumska analiza upalnih citokina (interleukin 6, interleukin 10**,** interleukin 12, interleukin 13) štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). ….....67

Tablica 5.6. Serumska analiza upalnih citokina (interferon γ, čimbenik tumorske nekroze α, čimbenik stimulacije granulocitno–makrofagnih kolonija) štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 68

Tablica 5.7. Analiza hematoloških pokazatelja (broj eritrocita, hemoglobin, hematokrit, indeksi eritrocita) u krvi štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 74

Tablica 5.8. Analiza hematoloških pokazatelja (trombocita, leukocita i diferencijalne krvne slike) u krvi štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 76

Tablica 5.9. Analiza biokemijskih pokazatelja (albumini, alkalna fosfataza, amilaza, ukupni proteini) štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 78

Tablica 5.10. Analiza biokemijskih pokazatelja (globulini, alanin aminotransferaza) štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA)..79

Tablica 5.11. Analiza biokemijskih pokazatelja (ioni) štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 80

Tablica 5.12. Analiza biokemijskih pokazatelja (metaboliti) štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 81

POPIS SLIKA

Slika 1. 1. Razvoj sustavne upale u organizmu i dugoročnih posljedica u smislu kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa uslijed hipertrofije i hiperplazije masnog tkiva te posljedičnog lučenja proupalnih citokina u sistemsku cirkulaciju. 2

Slika 1.2. Utjecaj leptina na imunološki odgovor i polarizaciju makrofaga. 13

Slika 1.3. Utjecaj tkivnih makrofaga na biologiju masnog tkiva i sustavnu upalu u organizmu. 15

Slika 4.1. Plan pokusa. 34

Slika 5.1. Promjena tjelesne mase štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 48

Slika 5.2. Relativna masa pojedinih organa štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 52

Slika 5.3. Oralni test tolerancije glukoze štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 54

Slika 5.4. Glikemijske promjene štakora hranjenih standardnom (A) i visokomasnom (B) hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 55

Slika 5.5. Serumska koncentracija hormona leptina štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 56

Slika 5.6. Serumska koncentracija hormona adiponektina štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 57

Slika 5.7. Aterogeni indeks štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 61

Slika 5.8. Aterogeni koeficijent štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 62

Slika 5.9. Kardijalni rizik štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 63

Slika 5.10. Kardioprotektivni indeks štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 64

Slika 5.11. Omjer TG/HDL-c u štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 65

Slika 5.12. Aktivnost NO u serumu (A), bubregu (B) i jetri (C) štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 70

Slika 5.13. Aktivnost arginaze u serumu (A) i bubregu (B) štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 72

Slika 5.14. Koncentracija katalaze u bubregu (A) i jetri (B) štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom, uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA) u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg. 83

Slika 5.15. Koncentracija malondialdehida u bubregu (A) i jetri (B) štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom, uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA) u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg. 85

Slika 5.16. Koncentracija glutationa u bubregu (A) i jetri (B) štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 87

Slika 5.17. Histološke slike steatoze jetre štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom, uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 88

Slika 5.18. Grafički prikaz histoloških promjena jetre u vidu steatoze štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom, uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 89

Slika 5.19. Histološke slike fibroze jetre štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom, uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 90

Slika 5.20. Grafički prikaz histoloških promjena jetre u vidu fibroze štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom, uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA). 91

1. UVOD

1.1. Pretilost

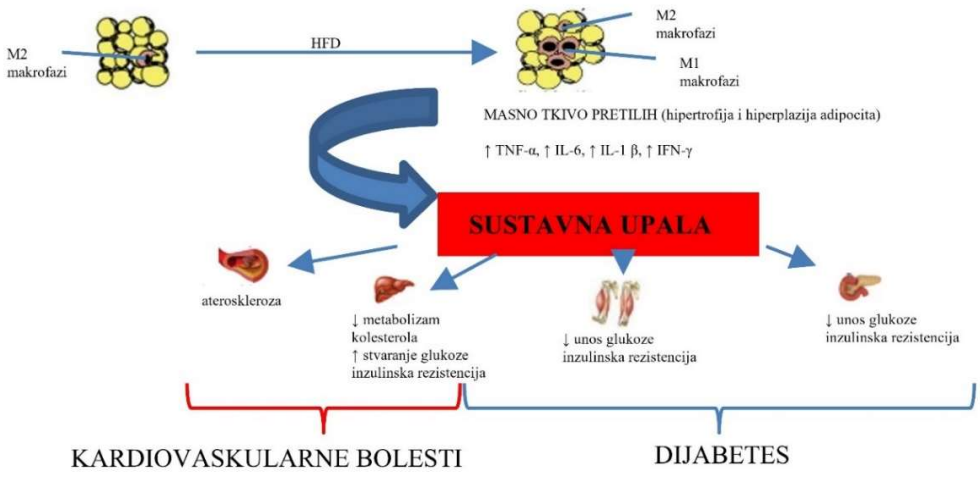
Povećanje tjelesne mase uzrokovano je neuravnoteženošću između unosa i potrošnje energije, sve manjom fizičkom aktivnošću, a izraženijim sjedilačkim (sedentarnim) načinom života (1). Danas je najzastupljenija metoda klasifikacije pretilosti računanje indeksa tjelesne mase (engl. *body mass index*, BMI) koji se dobije računanjem tjelesne mase u kilogramima s visinom u metrima kvadratnim (2). BMI se, ovisno o vrijednostima tjelesne mase i visine jedinke, kreće u određenim razmjerima, te se prema tome provodi klasifikacija pretilosti, kako slijedi: BMI između 18,5 i 24,9 kg/m^2 odgovara normalnoj tjelesnoj masi, vrijednosti od 25,0 do 29,9 kg/m^2 odgovaraju prekomjernoj tjelesnoj masi, između 30,0 i 34,9 kg/m^2 predstavlja prvi stupanj pretilosti, između 35,0 i 39,9 kg/m^2 drugi stupanj pretilosti, a vrijednosti iznad 40,0 kg/m^2 podrazumijevaju treći stupanj pretilosti (3).

Prema podatcima Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organisation,* WHO) broj se pretilih od 1975. godine utrostručio, a posebno je zabrinjavajuć porast pretilosti u dječjoj dobi. Konkretno, 2016. godine zabilježen je 41 milijun djece mlađe od 5 godina prekomjerne tjelesne mase ili pretilih. Smatra se da će se taj trend nastaviti te će do 2030. u SAD-u biti 65 milijuna više pretilih nego 2014. godine, a u Velikoj Britaniji 11 milijuna više (4). Osim što predstavlja estetski problem sama za sebe, narušava psihosocijalno zdravlje i samodoživljaj pojedinca, pretilost se povezuje s mnogim drugim poremećajima, poput dijabetesa tipa II, hipertenzije, ateroskleroze, povećane sklonosti za srčane i moždane udare pa čak i nekim oblicima karcinoma (5). Te su bolesti izazvale snažne posljedice na zdravlje populacije i kvalitetu života, ali i uvelike povećale troškove zdravstvenog sustava (6). Prema nekim procjenama 2030. godine u Velikoj će Britaniji i SAD-u kao posljedica porasta prevalencije pretilosti biti od 6 do 8,5 milijuna slučajeva više zabilježenog dijabetesa tipa II, 5,7 do 7,3 milijuna srčane bolesti i infarkta (4) u idućih 40 godina, a jedan će od tri Amerikanca imati dijabetes tipa II (7).

1.2. Metabolički sindrom

Pretilost, predominantno abdominalnog tipa, jedan je od najvažnijih predisponirajućih čimbenika za razvoj metaboličkog sindroma (8). Metabolički sindrom (Slika 1.1) je entitet koji uključuje poremećaj metabolizma glukoze, dislipidemiju, hipertenziju, visceralnu pretilost i kronično nisko tinjajuću upalu (9). U novije se vrijeme metaboličkom sindromu pridružuju i neki drugi poremećaji, poput porasta oksidacijskog stresa u organizmu, poremećaja imunološkog odgovora, disbioze crijevog mikrobioma, te hepatosteatoze (10). Metabolički sindrom i poremećaji vezani uz njega, predisponiraju pojedince za razvoj kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa tipa II (11). Prevalencija metaboličkog sindroma je porasla 35 % od 2012. godine i danas oko dvije trećine Amerikanaca su nositelji nekog od gore spomenutih obilježja tog sindroma (12).

Postoji značajna poveznica između biologije adipocita i razvoja metaboličkog sindroma (13).



Slika 1. 1. Razvoj sustavne upale u organizmu i dugoročnih posljedica u smislu kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa uslijed hipertrofije i hiperplazije masnog tkiva te posljedičnog lučenja proupalnih citokina u sistemsku cirkulaciju.

TNF-α – čimbenik tumorske nekoroze α, IL-6 - interleukin 6, IL-1β – interleukin 1 beta, IFN-γ – interferon gama. Preuzeto i prilagođeno iz rada, uz dopuštenje autora (11).

1.3. Masno tkivo

Masno je tkivo organ koji služi za skladištenje energije u obliku triglicerida, toplinsku izolaciju, zaštitu i učvršćivanje unutarnjih organa. Uz kožu je jedan od najvećih organa u tijelu, konkretno kod muškaraca čini 15-20 % ukupne tjelesne mase, a kod žena 20-25 %. Raspodjela masnog tkiva ovisi o dobi, spolu, prehrambenim navikama, genetici i okolišnim čimbenicima (14).

Masno tkivo pripada skupini vezivnih tkiva s posebnim svojstvima. Čine ga u najvećem postotku masne stanice imenom adipociti ili lipociti, stanice koje u svojoj citoplazmi skladište trigliceride u obliku masnih kapljica. Jezgra je potisnuta periferno i tanka, a mitohondriji su slabo razvijeni. Tijekom pripreme histoloških preparata kapljica masti koja ispunjava citoplazmu adipocita otopi se uranjanjem preparat u ksilol, koji je dio standardnog histološkog postupka te se, zbog karakterističnog izgleda, masne stanice nazivaju i stanicama izgleda prstena pečatnjaka (14).

Uz adipocite, u masnom se tkivu nalaze i druge stanice koje uključuju preadipocite, endotelne stanice, različite stanice imunološkog sustava poput makrofaga masnog tkiva, fibroblaste, vaskularne progenitorne stanice (engl. *vascular progenitor cells,* VPC), a sve se one zajedničkim imenom nazivaju stromalnom vaskularnom frakcijom (engl. *stromal vascular fraction,* SVF) (15). U masnom se tkivu fiziološki nalaze rezidentni protuupalni M2 makrofazi koji imaju ulogu u remodeliranju masnog tkiva, odstranjivanju mrtvih ili umirućih adipocita te novačenju i diferencijaciji adipocitnih progenitora (16). Razvojem pretilosti dolazi do prelaska M2 fenotipa u M1 fenotip (Slika 1.1.) i time započinje lokalna upalna kaskada (17). To se naziva makrofagnom polarizacijom i upala je jedan od čimbenika kojom se može provoditi njezina modulacija (18). Promjena M2 u M1 fenotip može se dokazati nakon samo tjedan dana prehrane bogate mastima u animalnom modelu, a povećava se vremenom i povećanjem stupnja pretilosti (19). Uvećani upalni makrofagi koji okružuju adipocite morfološki nalikuju na strukture slične kruni (engl. *crown like structures,* CLS) (20). Infiltracija makrofaga u masnom tkivu i posljedično lokalna i sustavna upala povezane su sa smanjenom osjetljivošću na inzulin.

U posljednje vrijeme promijenjeno je gledište uloge masnog tkiva od inertnog skladišnog organa do danas poznatog aktivnog oragana koji ima sekretornu ulogu, funkciju endokrine žlijezde. Naime, u uvjetima pozitivne energijske ravnoteže, tj. aktivacije, dolazi do lučenja velike količine proupalnih citokina, poput čimbenika tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor alpha*, TNF-

α), interleukina 6 (engl. *interleukin 6*, IL-6), interleukina 8 (engl. *interleukin 8*, IL-8), leptina, slobodnih masnih kiselina (engl. *free fatty acid*s, FFA), visfatina, rezistina, retinol vežućeg proteina (engl. *retinol binding protein*, RBP), plazminogen aktivator inhibitora I (engl. *plasminogen activator inhibitor*-I, PAI-I), monocitnog kemotaktičkog čimbenika (engl. *monocyte chemotactic factor-1*, MCP-1), koji djeluju na druge organe i organske sustave, posredujući u razvoju sustavne upale i pretilosti pridruženih poremećaja, poput inzulinske rezistencije, nealkoholne masne bolesti jetre (engl. *non alcoholic fatty liver disease*, NAFLD), kardiovaskularnih posljedica i oksidacijskih poremećaja (15).

1.3.1. Plastičnost masnog tkiva

Masno tkivo ima svojstvo plastičnosti, aktivni je endokrini organ sa sposobnošću rasta tijekom cijelog života (21). Visoko je karakteristična mogućnost njegove brze prilagodbe na prehrambene manjke ili suviške promjenom morfologije, tj. hipertrofijom i hiperplazijom adipocita te promjenama u izvanstaničnom matriksu masnog tkiva (22).

U stanjima pozitivnog energijskog unosa, bijelo masno tkivo prolazi kroz morfološke promjene u smislu povećanja volumena postojećih adipocita, imenom hipertrofija, te *de novo* stvaranja adipocita imenom hiperplazija (23). Metaboličke su potrebe hipetrofičnog i hiperplastičnog masnog tkiva povećane, a postojeće krvne žile u masnom tkivu ne mogu podnijeti tolike metaboličke potrebe, posljedično čemu dolazi do hipoksije, te infiltracije aktiviranih makrofaga koji luče proupalne citokine (24). Kada je prinos energije veći nego hipertrofični i hiperplastični adipociti mogu podnijeti, dolazi do ektopičnog odlaganja lipida u druge organe, prvenstveno u jetru, skeletni mišić i gušteraču, a navedeno se zove lipotoksičnost (25). Lipotoksičnost dovodi do narušavanja morfologije i funkcije zahvaćenog organa.

Tijekom pretilosti događa se i patološka pregradnja masnog tkiva uglavom križno povezanim kolagenom tipa VI, s prekomjernim nakupljanjem izvanstaničnog matriksa (engl. *extracellular matrix*, ECM) (26). Nakupljanje ECM smanjuje plastičnost tkiva i rezultira disfunkcijom adipocita, ranije spomenutim ektopičnim skladištenjem masti i metaboličkim poremećajima te pridnosi pretilosti pridruženoj inzulinskoj rezistenciji (27). Genetika i okolišni čimbenici također imaju važnu ulogu u količini i raspodjeli masnog tkiva u organizmu.

1.3.2. Podjela masnog tkiva

Masno tkivo može se podijeliti u tri osnovne skupine: bijelo, smeđe i ružičasto masno tkivo. Bijelo masno tkivo (obično, žuto) (engl. *white adipose tissue*, WAT) sastoji se od velikih okruglih stanica koje u svojoj citoplazmi sadržavaju jednu veliku kapljicu masti zbog čega se još zove i unilokularno. Ime je dobilo po karotenoidima, žutom pigmentu koji se nalazi u citoplazmi masne stanice, i tako ovisno o njegovoj količini, boja može varirati od bijele do tamnožute. Stanice bijelog masnog tkiva zbijene su jedna uz drugu i stvaraju režnjiće odvojene retikulinskim vlaknima pa su na presjeku poligonalnog oblika. Bijelo masno tkivo služi prvenstveno kao skladište energije koju pohranjuje u citoplazmi u obliku triglicerida. Osjetljivo je na živčane i hormonske podražaje i bogato je prožiljeno. No ipak, simpatički živčani završetci ne završavaju na adipocitima nego na krvnim žilama uz adipocite. Adrenalin koji se otpušta na krajevima simpatičkih živčanih vlakana aktivira lipazu osjetljivu na hormone koja potiče lipolizu masti na periferiji. U novorođenčeta je bijelo masno tkivo jednoliko raspoređeno po tijelu. Razvojem dolazi do lučenja muških/ženskih spolnih hormona, hormona nadbubrežne žlijezde i štitnjače koji utječu i na spolnu raspodjelu masnog tkiva (14).

Bijelo masno tkivo dijeli se na supkutano i visceralno (28). Visceralno masno tkivo povezano je s povećanim rizikom za razvoj inzulinske rezistencije i dislipidemije (29) te hipertenzije (30), za razliku od supkutanog masnog tkiva koje je povezano s očuvanjem osjetljivosti na inzulin (31).

Smeđe masno tkivo (engl. *brown adipose tissue*, BAT) ime je dobilo po mnogobrojnim krvnim žilama koje se nalaze poput mreže između adipocita i po mnoštvu mitohondrija koji sadrže obojene citokrome. Ono se sastoji od manjih stanica, višekutnog oblika, s okruglom jezgrom u sredini i velikom broju masnih kapljica u citoplazmi pa se zato zove i multilokularno. Također, ima puno mitohondrija koji sadržavaju karakteristični nevezani protein tip 1 (engl. *uncoupling protein 1,* UCP-1) te tako proizvode toplinu i štite organizam od hladnoće. To je osobito važno u novorođenačkoj dobi kada smeđe masno tkivo čini 2-5 % ukupne tjelesne mase novorođenčeta (14). Odrastanjem se količina smeđeg masnog tkiva smanjuje, no ipak ostaje očuvana u paraspinalnoj i supraklavikularnoj regiji (32). U štakora je prisutno tijekom cijelog života u interskapularnoj regiji (33).

Ružičasto masno tkivo prvi je puta opisano 2014. godine u radovima grupe talijanskih znanstvenika o mišjim supkutanim depoima tijekom skotnosti i laktacije. Masno tkivo, prema njihovim istraživanjima, nastaje transdiferencijacijom iz bijelih adipocita supkutanog masnog tkiva. Ružičasto masno tkivo su zapravo alveolarne žlijezdane stanice čija je funkcija proizvodnja i sekrecija mlijeka. Ono histološki nalikuje WAT, a metabolički BAT jer sadržava UCP-1. Ima sposobnost lučenja leptina koji je važan u prevenciji pretilosti i metaboličkih poremećaja u mišjih potomaka (34).

1.4. Adipokini

1.4.1. Leptin

Leptin je hormon koji se izlučuje najvećim dijelom iz masnog tkiva, a ime je dobio prema grčkoj riječi za tanko (*leptos*) (35). Sadržava 167 aminokiselina. Otkriven je 1995. godine, kao produkt *ob* gena u Jackson laboratoriju (36). Prvi je od adipokina izoliranih u masnom tkivu u sklopu „kronične, nisko tinjajuće upale“ te predstavlja svojevrsno „utjelovljenje“ ideje o aktivnosti masnog tkiva koje luči hormone i citokine u sistemsku cirkulaciju i posreduje u pretilosti pridruženim poremećajima. Odsutnost leptina u životinjskom modelu ili homozigotna mutacija *ob/ob* gena uzrokuje masivnu hiperfagiju i pretilost u animalnom modelu te endokrine abnormalnosti (35). Učinak leptina ostvaruje se njegovim vezanjem za leptinske receptore koji se nalaze u hipotalamusu (ObRs), ali i u nekim drugim tkivima, poput adipocita i endotelnih stanica (37). Podliježe dnevnim varijacijama u lučenju, najviše vrijednosti bivaju zabilježene rano ujutro i kasno navečer (38).

Fiziološke su funkcije leptina mnogobrojne: sudjeluje u regulaciji količine masnog tkiva u organizmu, kontroli unosa hrane, povećava potrošnju energije za vrijeme rasta masnog tkiva i održavanju energijske homeostaze. Vežući se za ObRs receptore u hipotalamusu izaziva anoreksigenične (apetit inhibirajuće) i oreksigenične (apetit stimulirajuće) učinke te njihovim međusobnim antagonizmom sudjeluje u kontroli unosa hrane. Osim toga, leptin djeluje i na neke druge dijelove središnjeg živčanog sustava pridonoseći osjećaju sitosti (35). Osim djelovanja na središnji živčani sustav, leptin u animalnom modelu i na periferiji potiče potrošnju energije

aktivacijom simpatičkog živčanog sustava (39) i poticanjem termogeneze u smeđem masnom tkivu (40,41). Navedeno nije potvrđeno u humanim istraživanjima (42).

No, tijekom ranog razvoja pretilosti razvija se rezistencija na leptin i fiziološka funkcija leptina na periferiji ne biva tako učinkovita (43). Danas postoji nekoliko teorija o razlozima razvoja leptinske rezistencije, poput oštećenja ili smanjenja leptinskih receptora u hipotalamusu, inhibicije leptinskog signalnog puta supresorskim molekulama, poteškoćama u prolasku leptina kroz krvno moždanu barijeru, no i dalje se na tom polju mnogo istražuje. Mehanizmi koji bi rasvijetlili patogenezu leptinske rezistencije mogli bi biti nove ciljne točke u terapiji pretilosti i metaboličkog sindroma (35).

Zanimljiv je i važan utjecaj leptina na endokrini sustav u humanom i animalnom modelu. Hipoleptinemija dovodi do manjka gonadotropina na periferiji koji uvelike utječu na funkcioniranje reproduktivnog sustava, dovodeći do anovulatornih ciklusa, izostanka mjesečnice i nemogućnosti začeća. Važan je za početak puberteta, a njegova deficijencija u tom razdoblju uzrokuje hipogodnadizam. Također, smanjuje lučenje hormona štitnjače što posljedično usporava metaboličke procese, povećavaju koncentraciju hormona rasta koji mobilizira energijske zalihe glukoze i masti za metaboličke procese i potrebe organizma (35).

Uz sve navedeno, leptin ima proupalni učinak, posreduje u imunološkom odgovoru aktivacijom Th1 staničnog puta (44). Potiče proliferaciju T pomoćničkih stanica i povećava proizvodnju proupalnih citokina djelovanjem na različite imunološke stanice, predominantno monocite i makrofage (45). Kemotaktički djeluje na neutrofile u patogenezi upale, aktivira B limfocite i potiče ih na lučenje TNF-α, IL-6 i interleukina 10 (engl. *interleukin 10,* IL-10). Kod miševa koji imaju homozigotnu mutaciju gena za leptin (*ob/ob* miševi) ili leptinskog receptora (*db/db* miševi), dokazana je atrofija kore timusa (46–48).

Leptin ima važnu ulogu u pretilosti induciranom oksidativnom stresu potičući stvaranje reaktivnih kisikovih radikala i hidroksilnih radikala. U modelu štakora, injekcija leptina uzrokuje porast serumskog malondialdehida (engl. *malondialdehyde*, MDA) koji je siguran znak oksidacijskog stresa. Leptin potiče proizvodnju proupalnih citokina i smanjuje kapacitet staničnih andioksidansa (49,50).

1.4.2. Adiponektin

Adiponektin je polipeptid kojeg kod ljudi čine 244 aminokiseline, relativne molekularne težine 30 kDa, a sastoji se od N-terminalne, kolagenu slične domene i C-terminalne, globularne, domene. Kodira ga *AdipoQ* gen koji se nalazi na 3q27 (51). Ima nekoliko izomera: trimer niske molekularne težine (engl. *low molecular weight*, LMW), heksamer srednje molekularne težine (engl. *medium molecular weight*, MMW) i multimer visoke molekularne težine (engl. *high molecular weight*, HMW). Ovaj posljednji, multimer visoke molekularne težine nastaje polimerizacijom dva manja izomera i najpotentnija je forma adiponektina koja je odgovorna za poboljšanje osjetljivosti perifernih tkiva na inzulin i kardioprotektivne učinke adiponektina. Globularni adiponektin, kojeg čini isključivo C-terminalna domena adiponektina, također je biološki aktivna tvar (52). Postoje dva tipa receptora za adiponektin: AdipoR1 i AdipoR2. Oba su transmembranski receptori s N-terminalnom citoplazmatskom regijom, i C-terminalnom izvanstaničnom regijom koja se sastoji od 25 aminokiselina. AdipoR1 nalaze se u skeletnim mišićima, a AdipoR2 u stanicama jetre (53). Uz ova dva, u posljednje je vrijeme opisan još jedan receptor za adiponektin imenom T-kadherin. Na njega se isključivo mogu vezati heksameri srednje molekularne težine i multimeri visoke molekularne težine. Također, ne posjeduje transnmembransku komponentu, nego samo membranski dio koji komunicira s izvanstaničnim matriksom (54).

Adiponektin se izlučuje najvećim dijelom iz masnog tkiva, no danas je poznato da ga stvaraju i stanice posteljice (55), humani i mišji osteoblasti (56), stanice parenhima jetre (57), epitelne stanice (58) i skeletno mišićno tkivo (59).

Adiponektin djeluje na inzulinski receptor i pospješuje njegova svojstva na periferiji, tako što, uz PI3K/AKT signalni put, aktivira još neke druge, poput IRS1/2, AMPK i p38 MAPK signalnih puteva. Njihovom se aktivacijom pojačava osjetljivost perifernih tkiva na inzulin i pospješuje ulazak glukoze u stanicu. Ima antiaterogena, protuupalna svojstva i antidijabetička svojstva Razvojem pretilosti i inzulinske rezistencije, dolazi do pada koncentracije adiponektina, kako u ljudi, tako i u animalnom modelu (52).

Metabolički se učinci inzulina očituju u mnogim tkivima, osobito u skeletnom mišiću, jetri, masnom tkivu i endotelu krvnih žila. Konkretno, u skeletnom mišiću miša adiponektin pospješuje

beta oksidaciju masnih kiselina, unos i iskorištavanje glukoze, te broj GLUT4 receptora na membrani mišića (60). Njegovi se učinci dodatno pojačavaju kod prehrane bogate mastima i šećerima (61).

Antiaterogena svojstva adiponektina očituju se u inhibiciji stvaranja i napredovanja aterogenog plaka u stijenci krvne žile na način da se smanjuje broj adhezijskih molekula na endotelnim stanicama i proliferacija glatkih mišićnih stanica tunike medije (62). Sve to smanjuje krvožilnu reaktivnost i djeluje zaštitno u napredovanju ateroskleroze, posredno smanjujući rizik za razvoj koronarne bolesti, hipertenzije i kardiovaskularnih poremećaja (52).

Povećani izražaj adiponektina u *ob/ob* miševa povećao je količinu supkutanih masnih depoa u životinja i poboljšao njegovu prožiljenost. Kako je već ranije spomenuto, povećanje količine supkutanog masnog tkiva povezuje se s pojačanom osjetljivošću na inzulin, kako u ljudi, tako i životinja (63). Ovime se očituju protuupalna svojstva adiponektina koji zaštitno djeluje u rasplamsavanju i tinjanju upale u visceralnom masnom tkivu koje posredno dovodi do razvoja pretilosti pridruženih poremećaja. I u drugim je istraživanjima potvrđen smanjeni izražaj adiponektina u visceralnom masnom tkivu pretilih jedinki i onih koji pokazuju poremećaj metabolizma glukoze i inzulinsku rezistenciju (64).

Injekcija rekombinantnog adiponektina snižava serumske vrijednosti glukoze u modelu miša, bez izazivanja hipoglikemije (52). Smanjuje sve abnormalnosti vezane uz pretilost, poput hepatomegalije, hepatosteatoze i povišenih vrijednosti alanin aminotransferaze (engl. *alanin aminotranferase,* ALT) (65), najvjerojatnije smanjujući oksidativna oštećenja hepatocita koja se smatraju inicijalnim čimbenikom u pretilosti produženim metaboličkim komplikacijama (66). Adiponektin inhibira upalu potaknutu TNF-α (67).

1.5. Proupalni citokini

Proučavanjem pretilosti upala masnog tkiva zadobila je posebnu pozornost, započevši otkrivanjem infiltracije i aktivacije makrofaga u masnom tkivu, kako u humanom, tako i u animalnom modelu (68). Prvi citokin koji je otkriven u upalnom masnom tkivu pretilih miševa bio je TNF-α (69), a povećanjem njegove koncentracije započinje upalna kaskada koja vodi do pretilosti pridružene smanjene osjetljivosti perifernih tkiva na učinke inzulina, imenom, inzulinska rezistencija (70).

TNF-α je prvi otkriveni proupalni citokin koji se izlučuje iz masnog tkiva te je davne 1993. godine dokazano da neutralizacija TNF-α u sistemskoj cirkulaciji dovodi do povećanog unosa glukoze u stanicu i boljeg odgovora na djelovanje inzulina (71). U kasnije objavljenim radovima potvrđena je njegova posrednička uloga u napredovanju pretilosti i patogenezi inzulinske rezistencije (72,73). Njegova se koncentracija u krvnoj struji povećava rastom (hipertrofijom i hiperplazijom) masnog tkiva, ali se zapravo glavnina TNF-α izlučuje iz proupalnih M1 makrofaga SVF-a. TNF-α poticajno djeluje na lučenje proupalnih citokina IL-6 i interleukina 1 beta (engl. *interleukin-1β,* IL-1β) (74). TNF-α izravno djeluje na inzulinski signalni put, blokirajući vezanje inzulina s njegovim receptorom te posljedično smanjujući unos glukoze u stanicu (68). TNF-α potiče lipolizu masnog tkiva povećavajući time koncentraciju slobodnih masnih kiselina u krvnoj struji i ektopično odlaganje lipidnih kapljica u drugim organima što se naziva lipotoksičnost (72). Važan je i u stvaranju aterosklerotskog plaka, potiče ekspresiju adhezijskih molekula i proliferaciju tunike medije i tunike adventicije (75). Inhibitorno djeluje na lučenje i eskpresiju adiponektina (76).

IL-6 i IL-18 još su dva važna citokina koji se luče iz masnog tkiva, a važni su u patogenezi pretilosti i inzulinske rezistencije (77). Do jedne trećine cirkulirajućeg IL-6, konkretnije 10-35 %, luči se iz WAT, a do tri puta više iz visceralnog u odnosu na supkutano masno tkivo (78). Iz hipertrofičnih adipocita bijelog masnog tkiva stvara se veća količina IL-6, ali jednako kao i kod TNF-α, većina se IL-6 proizvodi iz stanica SVF-a (15). IL-6 smatra se biljegom visceralne pretilosti jer visceralno masno tkivo luči puno veće količine IL-6 u odnosu na supkutano masno tkivo (79). Osim u bijelom masnom tkivu, IL-6 se stvara i u skeletnom mišiću i jetri (74,80). Izražaj IL-6 pozitivno korelira s inzulinskom rezistencijom u *in vivo* i *in vitro* animalnim istraživanjima (81),

indeksom tjelesne mase u humanim istraživanjima te povećava rizik za razvoj dijabetesa tipa II (82). Izravno dovodi do porasta C reaktivnog proteina (engl. *C reative protein,* CRP) i fibrinogena te potiče profibrotično stanje organizma. IL-6 i TNF-α smanjuju koncentraciju cirkulirajućeg adiponektina (83).

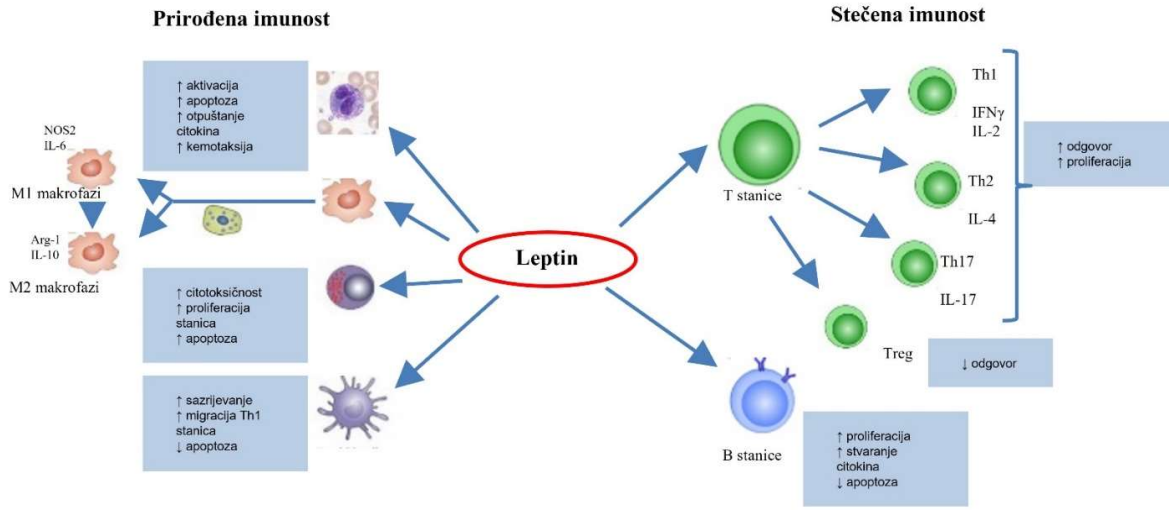
Koncentracija interleukina 18 (engl. *interleukin 18*, IL-18) povećava se u pretilih pojedinaca (15), a smanjuje se sa smanjenjem tjelesne mase (84).

Stanje akutne upale povezuje se s izražajem transkripcijskih čimbenika nuklearnog čimbenika kapa B (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells,* NF-κB) i proteina aktivacije (engl. *activator protein-1,* AP-1) koji potiču izražaj gena koji kodiraju brojne molekule potrebne za upalne odgovore poput upalnih citokina, TNF-α, IL-6, IL-1 i IL-18, endotelnih adhezijskih molekula (E selektin), kostimulacijskih molekula (CD80, CD86), a sve navedeno pobuđuje adaptivnu imunost i sustavni upalni odgovor organizma.

IL-1 proupalni je citokin koji postoji u dvije molekularne inačice, IL-1α i IL-1β, koji imaju slične, ali ne u postpunosti iste biološke funkcije. IL-1α kemotaktički djeluje na neutrofile rasplamsavajući akutnu upalu, a IL-1β stimulira novačenje makrofaga te sudjeluje u stvaranju inflamasoma (85). Obje se inačice, pak, vežu na receptor tipa I koji se nalaze na makrofazima, upalnim stanicama, dendritičkim stanicama i limfocitima, posredno rasplamsavajući upalnu kaskadu (86). Gen koji kodira stvaranje IL-1 nalazi se na kromosomu 2 i u ljudi i miševa, a na istom se kromosomu nalazi kodirajuće mjesto za IL-18 i IL-33. Ta tri spomenuta citokina dijele sličnu strukturnu C-terminalnu domenu (87). Prekomjerno stvaranje i izražaj IL-1 potiče pretilogeni okoliš izazivajući povećanu potrebu za hranom u miševa. Također, IL-1 izravno utječe na metabolizam lipida djelovanjem izravno na lipoprotein lipazu i potiče stvaranje aterogenog plaka. Također, smanjuje unos glukoze u masno tkivo ulazeći u interakciju s inzulinom te sinergistički sa TNF-α i IL-6 potiče proupalni okoliš masnog tkiva i sistemsku lipotoksičnost, tj. nakupljanje triglicerida u parenhimatoznim organima (88).

1.5.1. Leptin kao proupalni citokin

Novija istraživanja ukazuju na leptin kao hormon koji autokrinim i parakrinim djelovanjem posreduje između metabolizma i imunološkog odgovora (Slika 1.2.), te kao hormon koji može imati ulogu proupalnog citokina izravno utječući na diferencijaciju stanica imunološkog sustava i sintezu proupalnih čimbenika. Leptinski receptor (LEPR) pripada klasi I proupalnih citokina i ima signalne karakteristike slične receptoru IL-6. LEPR se nalazi na monocitima, granulocitima i NK stanicama. Leptin djeluje na fagocitnu sposobnost monocita, tj. tkivnih makrofaga i potiče oksidacijski stres u makrofazima. Kemotaktički djeluje na bakterije potičući aktivaciju Th1 imunološkog odgovora te posredno stvaranje proupalnih citokina poput TNF-α, IL-8, IL-12, IL-6, IFN-γ, IL-1β, a inhibitorno djeluje na protuupalne IL-4, IL-10 te prirodnoubilačke stanice (engl. *NK cells,* NK stanice) (47). Sudjeluje u upalnom procesu i na način da kemotaktički djeluje na neutrofile, eozinofile i bazofile, potičući i njihovu infiltraciju na mjestu upale (46). Njegova koncentracija u krvnoj struji ne ovisi samo o količini hrane koja se unosi u organizam, nego i o različim drugim čimbenicima kao što su hormoni i koncentracija proupalnih citokina. S tim u vezi, povećanje koncentracije TNF-α, IL 1-β, IL-6 dovodi do povećanja koncentracije leptina, i obrnuto. Povećanje koncentracije bakterijskog lipopolisaharida (engl. *bacterial lipopolysaccharide*, LPS) te stanja poput infekcije, akutne upale i sepse povećavaju razinu serumskog leptina. Poveznica između leptina i upale proučavana je u nekoliko upalnih, autoimunih i alergijskih bolesti, od kojih je najpoznatija poveznica s pretilošću, metaboličkim sindromom i dijabetesom tipa II. Povećana koncentracija leptina povezuje se pojačanim nakupljanjem lipidnih kapljica u jetri, povećanom sintezom slobodnih masnih kiselina, nakupljanjem ROS-a, što posljedično rezultira upalom i fibrozom jetrenog parenhima (47). U patogenezi dijabetesa tipa II, koji se smatra jednom od najvažnijih komplikacija metaboličkog sindroma, leptin se izdvaja kao posrednik koji pridonosi razvoju inzulinske rezistencije (89). Ipak, neka druga istraživanja upućuju na drukčije zaključke, izdvajajući leptin kao inzulin osjetljiv hormon tako što povećava masu i održivost β stanica Langerhansovih otočića (90). U svakom slučaju, leptin ne utječe na smanjenje tjelesne težine, vjerojatno zbog razvoja rezistencije na leptin u pretilih bolesnika. Daljnja istraživanja međudjelovanja leptina i imunološkog sustava dat će jasniju sliku o njegovoj ulozi u autoimunim bolestima, karcinomima, upalnim bolestima i pothranjenosti.



Slika 1.2. Utjecaj leptina na imunološki odgovor i polarizaciju makrofaga.

TNF-α – čimbenik tumorske nekoroze α, IL-6 - interleukin 6, IL-10 – interleukin 10, IL-4 – interleukin 4, IL-17 – interleukin 17, IFNγ – interferon gama, NOS2 – dušik oksid sintaza 2, Arg1 – arginaza 1, IL-2 – interleukin 2, IL-4 – interleukin 4, IL-17 – interleukin 17, T_{reg} – T regulatorne stanice. Preuzeto i prilagođeno iz rada, uz dopuštenje autora (48).

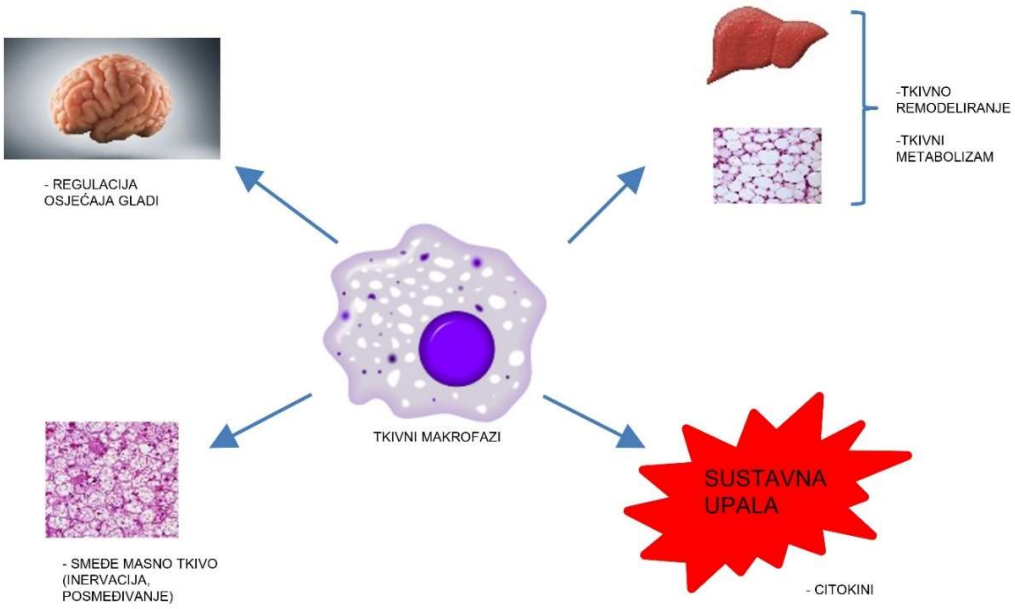
1.6. Makrofagna polarizacija i mogućnost njezine modulacije

Makrofazi su rasprostranjeni po cijelom tijelu u sklopu retikuloendotelnofagocitnog sustava, ponajviše u masnom tkivu, gdje čine 10 % ukupnog volumena u mršavih jedinki, dok se njihov broj značajno povećava u pretilih štakora i doseže 40 % ukupnog volumena masnog tkiva (74). Osim u masnom tkivu, nalaze se i u drugim ogranima koji su odgovorni za metabolizam glukoze, poput jetre, gušterače, crijeva, mozga (91). Iz tih organa ulaze u sistemsku cirkulaciju, a iz sistemske cirkulacije ponovno recirkuliraju u tkiva u fazi upale radi kemotaktičkog utjecaja proupalnih kemokina MCP-1 i lekotriena B4 (engl. *leukotriene B4,* LTB4). Više je različitih fenotipa makrofaga koji se prvenstveno razlikuju po svojoj morfologiji, tj. izražaju različitih receptora na slobodnoj površini, ali i po funkciji u organizmu. M2 makrofazi (alternativno aktivirani) odgovorni su za rezoluciju upalnih procesa i zacjeljivanje, rast tkiva te imaju važnu ulogu u održavanju homeostaze organizma. Nalaze se u masnom tkivu mršavih jedinki, a IL-4, IL-

13 i TGF-β potiču njihovu ekspresiju. Na njihovoj se membrani nalazi receptor za Ym-1, IL-10 i arginin 1 (*Arg 1*) na koji se veže enzim arginaza koji katalizira arginin na ornitin i ureu u ciklusu uree te imaju protuupalnu ulogu u organizmu. Na svojoj staničnoj površini eksprimiraju biljege CD206 i CD301 te izlučuju IL-10 u sistemsku cirkulaciju (92). M1 (klasično aktivirani) makrofazi, nazivaju se još i proupalnima, odgovorni su za fagocitozu i borbu protiv stranih patogena. M1 fenotip potaknut je Th1 citokinima i proupalnim interferonom gama (IFN-γ), a u sistemsku cirkulaciju izlučuju proupalne citokine, TNF-α, IL-6, IL-1, IL-12 i IL-23. M1 makrofazi također potiču Th1 imunosni odgovor i eksprimiraju brojne MHC-II molekule, CD80, CD86 i CD68 kostimulatorne molekule. Na svojoj površini M1 makrofagi imaju i supresor citokinsko signalnu molekulu (engl. *suppressor of cytokine signaling*, SOCS2) koja potiče stvaranje dušikovog oksida (engl. *nitric oxide*, NO). Također, M1 makrofazi metaboliziraju glukozu anaerobnom glikolizom potičući stvaranje LDH, što se povezuje s povećanjem količine reaktivnih kiskovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i NO (93).

Makrofagna polarizacija naziv je za mogućnost promjene fenotipa makrofaga ovisno o egzogenom stimulusu te ukazuje na njihovu funkcionalnu plastičnost. Polarizacija makrofaga u masnom tkivu povezuje se s metaboličkim komplikacijama koje prate prate pretilost, prvenstveno inzulinskom rezistencijom. No, i u mnogim je drugim kroničnim bolestima i stanjima njihov raspored narušen, kao što je starenje, kardiovaskularne bolesti te razvoj i napredovanje karcinoma (94). Početak metaboličkih promjena u sklopu pretilosti povezuje se s promjenom broja i fenotipa makrofaga u perifernim organima, osobito u jetri i masnom tkivu.

Osim što se povezuje s razvojem inzulinske rezistencije, infiltracija M1 makrofaga u tkivu jetre upućuje i na upalu i fibrozu jetrenog parenhima, konkretno napredovanje nealkoholne masne bolesti jetre (engl. *nonalcoholic fatty liver disease*, NAFLD). NAFLD karakterizira povećano nakupljanje lipidnih kapljica u hepatocitima, koje rezultira upalom, oštećenjem i nekrozom istih, što potiče nealkoholni steatohepatitis (engl. *nonalcoholic steatohepatitis*, NASH) napredovanje fibroze i cirozu, ponekad i razvoj hepatocelularnog karcinoma (18). Upalna aktivacija jetrenih makrofaga, imenom Kupfferove stanice, potaknuta je sadržajem nekrotičnih hepatocita i bakterijskim produktima uslijed disbioze koji portalnom cirkulacijom dolaze izravno u jetru. Potonje se naziva metabolička endotoksemija (95).



Slika 1.3. Utjecaj tkivnih makrofaga na biologiju masnog tkiva i sustavnu upalu u organizmu. Preuzeto i prilagođeno iz rada, uz dopuštenje autora (18).

1.7. Arginaza i dušik oksid

Osim citokinskog profila, ključna je razlika između M1 i M2 makrofaga i u njihovom metabolizmu aminokiselina što ima važne uloge u njihovim funkcijama. M2 makrofage karakterizira visoki izražaj Arg-1, citosolnog enzima koji metabolizira L-arginin do ornitina i poliamina. Poliamini su značajni za proizvodnju kolagena, staničnu proliferaciju, fibrozu te ostale procese povezane s remodeliranjem tkiva. Arginaza je kao enzim odgovoran za hidrolizu L arginina u L ornitin i ureu u ciklusu uree te je važan u metabolizmu sinteze NO. Prvo je otkriven u jetri sisavaca, a potom i u drugim tkivima i organima (96). Postoje dvije izoforme tog enzima, arginaza I i arginaza II, koji dijele 60 % strukturne sličnosti. Arginaza I isključivo je citoplazmatski enzim i nalazi se predominantno u jetri, a najvažnija joj je funkcija eliminacija dušika u ciklusu uree. Arginaza II, pak, mitohondrijski je enzim čija uloga nije do kraja razjašnjena, a nalazi se u prostati, bubregu, probavnom sustavu i krvnim žilama (97).

Dušik oksid sintaza (engl. *nitric oxide synthase*, NOS) enzim je koji se u metaboličkim procesima također natječe za vezno mjesto na L argininu i djeluje kao antagonist arginaze. M1

makrofage karakterizira povećani izražaj inducibilne dušik oksid sintaze (engl. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS) te proizvodnja NO koji je bitan efektor njihove mikrobiocidne aktivnosti. Inducibilna iNOS sintetizira NO koji se zadržava danima u mikromolarnoj koncentraciji (98). iNOS katalizira pretvorbu L-arginina u NO i citrulin. Sinteza NO odvija se u dva koraka; u prvom djelovanjem NOS dolazi do hidroksilacije L-arginina u N-hidroksi-L-arginin (NOHA) koji se potom u drugom koraku oksidira u L-citrulin i NO. Također, postoje tri izoforme tog enzima, ovisno o tome gdje se nalazi u organizmu: endotelna NOS (engl. *endothelial nitric oxide synthase*, eNOS), neuronalna (engl. *neuronal nitric oxide synthase*, nNOS) i inducibilna NOS (engl. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS). nNOS i eNOS koje su konstitutivno eksprimirane u neuronima i endotelnim stanicama te iNOS koja se pojačano eksprimira u upalnim procesima. Djelovanje eNOS antagonistički djeluje na arginazu u endotelnim stanicama krvnih žila i potiče njihovu vazodilataciju, stoga porast kocentracije arginaze smanjuje raspoloživost L arginina za eNOS, posljedično smanjuje stvaranje vazodilatatora NO i djeluje vazokonstriktorno, proupalno i aterogeno (99). S druge strane, iNOS nalazi se u makrofazima i svojom aktivnošću potiče stvaranje peroksinitrita i prooksidativnog NO te porast koncentracije arginaze I u makrofazima ima protuuplanu i antiaterogenu funkciju, smanjujući raspoloživost L arginina za iNOS (100). Arginaza I smanjuje upalnu aktivnost ulazeći u interakciju s iNOS. Antiupalni citokini, IL-4, IL-10 i IL-13 potiču aktivnost arginaze I u makrofazima pojačavajući antiupalni učinak (101). Stoga, točna uloga arginaze ne ovisi samo o kojoj se izoformi radi (I ili II), nego i o tkivno-organskoj ekspresiji antagnističkog enzima, eNOS ili iNOS.

Porast arginaze I i posljedično smanjenje NO u endotelnim stanicama povezuje se s brojim kroničnim patološkim stanjima, poput ateroskleroze, hipertenzije, mikro i mako vaskularnih komplikacija u sklopu DM II, miokardijalnog infarkta, moždanog udara i starenja (99,102). Sukladno tomu, blokada arginaze poboljšava funkciju endotela u pacijenata s razvijenim dijabetes melitusom tipa II (engl. *type II diabetes mellitus*, DM II) te se i u humanim istraživanjima blokatori arginaze koriste kao terapijsko sredstvo protiv pretilosti i njoj pridruženih poremećaja (103).

1.8. Nealkoholna masna bolest jetre

Nealkoholna masna bolest jetre smatra se hepatalnom pojavnošću metaboličkog sindroma i najčešća je kronična bolest jetre u Sjedinjenim Američkim državama (6). Čine ju: hepatosteatoza

(engl. *nonalcoholic fatty liver*, NAFL), NASH i ciroza jetre; entiteti među kojima postoji jasna morfološka razlika, a ipak, pokazuju sklonost prelasku jednog oblika u drugi. Patogeneza i etiologija hepatostetatoze složene su (104), ali se najčešće povezuje s pretilošću, inzulinskom rezistencijom i hiperlipidemijom (105).

NAFL se češće pojavljuje u pretilih pojedinaca (13), potvrđena je u >20 % američke populacije, u nekih etničkih skupina čak doseže 45 % (106). Karakterizira ju 5 ili više % steatotičnih hepatocita, uz odsutnost druge patologije jetre, poput autoimunih bolesti, virusnih hepatitisa, hemokromatoze i sl. (107). Nekoliko je mehanizama koji, sinergistički ili pojedinačno, dovode do hepatosteatoze, poput: povećane lipolize triglicerida iz supkutanih ili visceralnih depoa, smanjene oksidacije masnih kiselina uz povećanu *de novo* lipogenezu, te smanjenu sintezu lipoproteina vrlo niske gustoće (engl. *very low density lipoproteins*, VLDL-c) koji služe kao nosači za trigliceride u sistemskoj cirkulaciji (108).

Neka istraživanja govore o teoriji dva hitca (engl. *two - hit hypothesis*) kao o onoj koja objašnjava početak i napredovanje jetrene bolesti (109). Prvi korak predstavlja, već spomenuto, nakupljanje triglicerida u hepatocitima koje se morfološki očituje kao mikro ili makro vezikularna steatoza. U makrovezikularnoj steatozi lipidna kapljica u potpunosti ispunjava citoplazmu hepatocita, potiskujući jezgru prema periferiji. Takvi hepatociti morfološki mogu nalikovati adipocitima (110). Sekundarno dolazi do izraženijih oštećenja hepatocita, u vidu baloniranja, stvaranja apoptotičkih tjelešaca, lobularnih upalnih promjena, uz i dalje prisutnu steatozu te ove promjene predstavljaju drugi stadij jetrene bolesti imenom NASH (107). Posljednji je stadij bolesti jetre u sklopu metaboličkog sindroma ciroza koja nastaje aktivacijom hepatalnih zvjezdastih stanica (engl. *hepatic stellate cells*, HSC). Porast koncentracije MDA u hepatocitima kao produkta oksidacijskog stresa poticajno djeluje na aktivaciju HSC (109). One su inače normalno smještene u perisinusoidalnim prostorima jetrenog parenhima i služe kao skladište vitamina A. Razvojem pretilosti dolazi do njihove aktivacije koja podrazumijeva promjenu njihove morfologije, uz povećanu proizvodnju vezivnog tkiva koje sudjeluje u pregradnji jetrenog parenhima i napredovanju prema cirozi.

Kasnije je dokazano da jako puno čimbenika potiče napredovanje jetrene bolesti prema NASH i cirozi jetre. Osobito je važna poveznica upale u masnom tkivu i disbioze crijevnog mikrobioma s napredovanjem bolesti jetre. Naime, iz „aktiviranog“ se masnog tkiva luči mnoštvo

već spomenutih proupalnih citokina i adipokina, a razvojem pretilosti dolazi i do povećanog stvaranja LPS-a. Oni ulaze u sistemsku cirkulaciju i posreduju u napredovanju bolesti jetre. Sistemska koncentracija TNF-α i IL-6 u izravnoj su vezi s napredovanjem prema steatohepatitisu (111). Lipidna peroksidacija uzrokuje izraženija mitohondrijska oštećenja hepatocita i oksidacijski stres. Uz sve to, steatotična je jetra radi svog oštećenja dodatno sklona utjecaju svih navedenih čimbenika u napredovanju jetrene bolesti prema NASH i cirozi. Shvaćeno je da se bolest jetre u sklopu metaboličkog sindroma ne može svesti na tzv. dva hitca, te je nazvana teorijom mnogo hitaca (engl. *multi-hit hypothesis*) (111).

Uz okolišne čimbenike, važno je spomenuti i naslijeđe koje također ima važnu ulogu u razvoju hepatosteatoze. Polimorfizam u patatin-sličnoj domeni fosfolipaze proteina A3 (engl. *patatin like phospholipase domain containing 3*, PNPLA3) povezuje se s povećanjem stupnja steatoze u patogenezi NAFLD. PNPLA3 gen kodira protein nepoznate funkcije (111), a izoliran je u jetri i masnom tkivu u istraživanju o povezanosti genoma (112).

Dokazana je poveznica između razvoja inzulinske rezistencije i hepatoseatoze: u miševa kod kojih je bila razvijena inzulinska rezistencija, dokazana je i veća sklonost za razvoj hepatosteatoze (13).

1.9. Oksidacijski stres

Povećano nakupljanje slobodnih radikala u stanici, uz smanjenu aktivnost i učinkovitost antioksidansa, naziva se oksidacijskim stresom. Oksidacijski stres posreduje u brojnim patološkim stanjima i bolestima, poput neuroloških poremećaja, ateroskleroze, hipertenzije, dijabetesa, karcinoma, kronično opstruktivne plućne bolesti (engl. *chronic obstructive pulmonary disease*, KOPB), idiopatske plućne fibroze (113).

1.9.1. Slobodni radikali

Slobodni radikali su atomi ili molekule koje u svojoj strukturi sadržavaju nesparene elektrone što ih čini vrlo reaktivnima. Uslijed te reaktivnosti, ulaze u kemijske reakcije s drugim

atomima ili molekulama stvarajući manje reaktivne ili nereaktivne vrste. Nereaktivne se vrste nazivaju neradikalima. Dvije su najpoznatije skupine slobodnih radikala: reaktivni kisikovi radikali (engl. *reactive oxygen species,* ROS) i reaktivni dušikovi radikali (engl. *reactive nitrogen species,* RNS). Oni imaju brojne fiziološke funkcije u stanici i kao takvi nisu štetni. Njihovo negativno djelovanje započinje kada njihova koncentracija u stanici ili tkivu premaši normalne vrijednosti (113,114).

1.9.2. Reaktivne kisikove vrste – ROS

ROS se stvaraju u živim organizmima kao proizvod staničnog metabolizma. ROS su visoko reaktivne molekule koje mogu oštetiti stanične strukture, poput ugljikohidrata, nukleinskih kislina, lipida te narušiti staničnu homeostazu (115).

ROS se mogu podijeliti u dvije skupine: slobodne radikale i neradikale. Najvažniji ROS su superoksidni anion (engl. *superoxide anion*, O_2^-), hidroksilni radikal (engl. *hydroxyl radical*, OH^-) i hidrogen peroksid (engl. *hydrogen peroxide*, H_2O_2). OH^- je najpotentniji od svih radikala i uzrokuje brza i jaka oštećenja staničnih struktura. Nastaje razgradnjom H_2O_2 ili reakcijom O_2^- i H_2O_2. Može započeti lipidnu peroskidaciju preuzimanjem elektrona (e-) iz nezasićenih masnih kislina (113). Superoksidni anion nastaje dodavanjem elektrona na elementarni kisik. Većina superoksidnih aniona nastaje u mitohondrijima na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani u sustavu prijenosa elektrona. Mogu se neutralizirati djelovanjem antioksidansa superoksid dismutaze (engl. *superoxide dismutase*, SOD) koji provodi dismutaciju superoksidnog aniona u vodikov peroksid. Vodikov peroksid pak, osim dismutacijom superoksidnog aniona, može nastati i djelovanjem enzima ksantin oksidaze (engl. *xanthine oxidase*, XO) i nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *nicotinamid adenine dinucleotid phosphate,* NADPH) te u peroksisomima iz kisika (113).

U istraživanjima se, kao biljeg oksidacijskog stresa stanice, najčešće prate vrijednosti MDA. On je stabilan produkt koji nastaje djelovanjem ROS na polinezasićene masne kiseline u sastavu stanične membrane. U nekim se radovima opisuju i izoprostani (F-2 isoprostan) kao biljezi staničnih oštećenja (116). Oni nastaju lipidnom peroskidacijom arahidonske kiseline. Lipidna peroksidacije dovodi do promjena u membrani te remeti njezinu cjelovitost (113,114).

1.9.3. Reaktivne dušikove vrste – RNS

Predstavnik RNS-a je dušik oksid (NO). On ima brojne fiziološke funkcije u organizmu: sudjeluje u vazodilataciji krvnih žila, stanični je i međustanični glasnik, ima protuupalno djelovanje (117). No, u prisutnosti superoksidnog radikala stvara vrlo reaktivnu i potentnu dušikovu vrstu, imenom peroksinitrit (engl. *peroxynitrite*, ONOO-). ONOO- izazivaju oštećenje proteina procesom nitriranja ili nitrozacije, a mogu dovesti i do oksidacije DNA, lipidne peroksidacije i sulfoksidacije metionina (114).

1.9.4. Egzogeni izvori slobodnih radikala

Pušenje se smatra važnim egzogenim izvorom slobodnih radikala. Cigaretni dim sadržava mnoštvo oksidansa i slobodnih radikala, a djeluje i kemotaktički na stanice imunosnog sustava koje pojačano stvaraju slobodne radikale. Zračenje, izloženost teškim metalima, poput kadmija, olova i selena, hipoksija i izloženost ozonu još su neke od egzogenih izvora slobodnih radikala (113).

1.9.5. Utjecaj oksidacijskog stresa na stanične komponente i signalne puteve

U stanjima oksidacijskog stresa stanice se pokušavaju oduprijeti oksidacijskim učincima aktivacijom obrambenih enzima, transkripcijskih čimbenika i strukturnih proteina. Povećanje omjera oksidiranog i reducuranog glutationa (engl. *GSH/GSSG ratio*, GSH/GSSG) u korist oksidirane forme jedna je od važnih sastavnica koja pridonosi oksidacijskom stresu. Veća proizvodnja ROS-a dovodi do oštećenja DNA, proteina i lipida, aktivacije nekoliko prooksidativnih transkripcijskih čimbenika i stvaranja proupalnih citokina (113).

Oštećenja DNA uključuju dvostruka ili jednostruka kidanja DNA uzvojnice, delecije, translokacije ili stvaranja ukriženih veza s proteinima. Većina se tih promjena očituje u karcinogenezi, starenju, neurodegenerativnim, kardiovaskularnim i autoimunim bolestima. Neki egzogeni čimbenici, poput cigaretnog dima, arsena, željeza, kadmija, kroma također mogu potaknuti proces karcinogeneze stvaranjem ROS-a (113).

Također, ROS mogu direktno utjecati na morfologiju stanične membrane poticanjem lipidne peroksidacije, narušavajući lipidni dvosloj i povećavajući staničnu propusnost (118). Time se uvelike utječe na cjelovitost i funkciju stanica. U ljudi se indirektni proizvodi oksidacijskog stresa, poput tiobarbituratne kiseline i isoprostana koriste u procjeni kronične obstruktivne plućne bolesti (engl. *chronic obstructive pulmonary disease*, KOPB), DM II, tumora, upalnih i drugih kroničnih bolesti (119,120).

ROS uzrokuju oštećenje polipeptidnih lanaca, odvijanje ili njihovo krivo zavijanje, povećanu aktivnost kaspaza, oksidaciju specifičnih aminokiselina te time povećavaju sklonost proteolizi (121). Oksidativna oštećenja enzima uzrokuju smanjenje ili gubitak njihove funkcije.

Uz sve navedeno, ROS oštećuju prijenos signala u stanici te aktiviraju proupalnu kaskadu stvarajući nuklearni čimbenik kappa B (engl. *nuclear factor kappa B*, NF-κB). NF-κB dodatno potiče stvaranje proupalnih citokina IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-8 (122).

1.10. Antioksidansi

Živi organizmi imaju ugrađene antioksidativne sustave koji uglavnom učinkovito sprječavaju aktivnost reaktivnih kisikovih radikala. Mogu biti enzimski i neenzimski (113).

1.10.1. Enzimski antioksidansi

Glavni enzimski antioksidansi su SOD, katalaza (engl. *catalase*, CAT) i glutation peroksidaza (engl. *glutathione peroxidase*, GSH-Px), a osim njih u tkivima i stanicama nalaze se još hem oksidaza-1, te redoks proteini poput tioredoksina, peroksiredoksina, glutaredoksini te brojni drugi (113).

SOD je enzim odgovoran za dismutaciju superoksidnih aniona te u toj reakciji stvara vodikov peroksid. Nalazi se u svim stanicama, a posebno u metabolički aktivnima. U najvećoj se koncentraciji nalazi u plućima i prisutna je u 3 izoforme: izoforma ovisna o bakru i cinku (engl. *isoform dependent on copper and zinc*, CuZn-SOD), izoforma ovisna o manganu (engl.

manganese-dependent isoform, Mn-SOD) i izvanstanična izoforma (engl. *extracellular isoform*, EC-SOD). CuZn-SOD i Mn-SOD su smještene u stanici (113).

CAT je tetramerni enzim odgovoran za zaštitu stanica od štetnog djelovanja vodikova peroksida reducirajući ga do vode. Nalazi se najvećim djelom u peroksisomima. Tu sposobnost ima i GSH-Px, ali u uvjetima nižih koncentracija H_2O_2. Kako koncentracija H_2O_2 u stanici raste, povećava se i aktivnost CAT (113). Aktivnost CAT raste u jetri i bubrezima štakora oboljelih od DM II (115).

Osim što su odgovorni za eliminaciju H_2O_2 iz stanica, glutation peroksidaza i reduktaza uklanjaju štetne proizvode lipidne peroksidacije iz stanice. Glutation i NADPH služe kao donori elektrona. GSH-Px opisana je u četiri izoforme (113). U štakora oboljelih od dijabetesa povećana je aktivnost glutation peroksidaze u jetri, bubrezima, gušterači, krvi i aorti te smanjena u retini i srcu (115).

1.10.2. Neenzimski antioksidansi

Neenzimski antioksidansi su tvari male molekularne mase koje lako mogu difundirati u staničnom i izvanstaničnom okolišu, ovisno o potrebama. To su vitamini, mokraćna kiselina, karotenoidi, flavonoidi.

Vitamin C (askorbinska kiselina) nalazi se u unutarstaničnom i izvanstaničnom okolišu. Utječe na regeneraciju vitamina E, a njegova se koncentracija u stanicama smanjuje s godinama. Vitamin E je vrlo potentan stanični antioksidans u borbi protiv radikala koji nastaju lipidnom peroksidacijom stanične membrane. α-tokoferol je najpotentnija forma vitamina E. Vitamin E potiče apoptozu stanica raka i sprječava stvaranje slobodnih radikala (113).

Glutation je važan antioksidans prisutan u svim dijelovima stanice. Topljiv je u vodi i u velikim se količinama nalazi u jetri. Kao što je već spomenuto, glutation preko GSH-Px uklanja vodikov peroksid i produkte lipidne peroskidacije. U zdravim stanicama postoji u reduciranom obliku (GSH) i oksidiranom obliku (GSSH), a povećanje omjera GSSG/GSH je znak oksidacijskog stresa i mjera je stanične toksičnosti (113).

Karotenoidi su skupina biljnih pigmenata koji također imaju antioksidacijski kapacitet, a među najpoznatijima je β-karoten. On snažno reagira s hidroksilnim, superoksidnim i peroksidnim radikalama u stanici. Ima sposobnost djelovanja na transkripcijske čimbenike, direktno djelujući na pojedine signalne puteve. Sprječava stvaranje proupalnih citokina, poput NF-κB, IL-6 i TNF-α. Može inducirati apoptozu stanice, što je osobito važno u biologiji tumora (113).

1.11. Oksidacijski stres i pretilost

Mnoge su bolesti i patološki procesi u organizmu povezani s povećanim stvaranjem ROS-a, poput neplodnosti, karcinoma, astme, pretilosti, dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti i aterogenih poremećaja (123). Biomarkeri oksidacijskog stresa su povišeni u pretilih pojedinaca i koreliraju sa *BMI*, postotkom masnog tkiva u organizmu, oksidacijom lipoproteina niske gustoće (engl. *low density lipoproteins*, LDL) i koncentracijom triglicerida (engl. *triglycerides*, TG) (116). To je jedan od načina kojim ROS bivaju uključeni u patogenezu ateroksleroze i hipertenzije.

Nakupljanje triglicerida u masnom tkivu dovodi do povećane ekspresije NADPH oksidaze što povećava stvaranje O_2^- u masnom tkivu, a samim time i oksidativni stres (124). Posljedično, generirani ROS ulaze u sistemsku cirkulaciju povećavajući lučenje upalnih adipocitokina, te oni sinergistički dovode do poremećaja pridruženih metaboličkom sindromu, poput ateroskleroze, inzulinske rezistencije i DM II (124).

S druge strane, pretilost prati i povećanje koncentracije cirkulirajućih FFA koje narušaravaju metabolizam glukoze. FFA utječu na povećanje oksidacijskih procesa u mitohondrijima i peroksisomima jetre, skeletnih mišića i masnog tkiva, generirajući ROS. ROS izaziva oštećenje staničnih struktura i povećanje koncentracije proupalnog citokina TNF-α koji potiče daljnje stvaranje ROS-a u stanici i pojačanje lipidne peroksidacije (125).

Slobodni radikali djeluju na povećanje masnog tkiva, poticanjem proliferacije preadipocita, njihove diferencijacije u zrele adipocite te posredujući u njihovoj hipertrofiji (123). ROS krvlju dolaze i do hipotalamičkih centara u mozgu koji sudjeluju u kontroli unosa hrane i osjećaja sitosti, smanjujući njihovu osjetljivost i posljedično dovodeći do hiperfagije (123).

Osim istaknutog pojačanog stvaranja ROS-a, organizam pogođen pretilošću ima i smanjenu antioksidacijsku sposobnost. Dokazana je smanjena koncentracija vitamina A, C, E i karotenoida u masnom tkivu (126), ali i endogeno proizvedenih SOD i CAT (124).

1.12. Vitamin A

Vitamin A je mikronutrijent i antioksidans koji se nalazi namirnicama poput jetre, mrkve, manga, jaja. Jetra se ističe kao najveći izvor vitamina A, u kojoj je on pohranjen u obliku retinil palmitata (127), a najveći se rezervoar vitamina A nalazi u HSC smještenima u perisinusoidalnim prostorima jetre (14).

Vitamin A sudjeluje u mnoštvu bioloških procesa tijekom razvoja i starenja, kako ljudi, tako i životinja. Ima ulogu u fiziologiji vidnog podražaja, regulaciji rasta, reprodukcije, održavanju epitelnog tkiva (128), nadziranju mehanizama proliferacije, diferencijacije i održavanja homeostaze imunosnog sustava (129) te u reparatornim procesima u sisavaca. Također je važan i tijekom rane embriogeneze, osobito u indukciji apoptoze pojedinih stanica i organogenezi (130,131).

Nakon apsorpcije u enterocitima, vitamin A se u krvi veže za RBP koji ga prenosi do ciljnih tkiva. Retinol se pretvara u retinal aktivnošću mikrosomalne ili citosolne retinol dehidrogenaze (engl. *retinol dehydrogenase*, RoDH), a retinal u retinoičnu kiselinu aktivnošću citosolne retinal dehidrigenaze (engl. *retinal dehydrogenase*, RalDH) (130,131). Za ostvarivanje fizioloških funkcija i vezanje za stanične ciljne receptore, retinal se mora pretvoriti u retinoičnu kiselinu (engl. retinoic acid, RA). RA se veže za stanični vezni protein (engl. *retinoic acid binding protein*, CRABP) u citoplazmi i kao kompleks odlaze prema jezgri vežući se na jezgrine receptore (RAR ili RXR) te vrši svoje fiziološke funkcije (132). Svi trans oblici RA (engl. *trans RA*) vežu se za RXR receptore, a 9-cis RA veže se za RAR receptore.

Manjak enzima retinaldehid dehidrogenaze i nakupljanje retinala u animalnom modelu miša štiti ih od pretilošću izazvane inzulinske rezistencije, vjerojatno procesom „posmeđivanja“ bijelog masnog tkiva, povećanjem ekspresije UCP-1 proteina na mitohondrijskoj membrani i povećanjem potrošnje energije putem termogeneze (127). Još je 80. – ih godina prošlog stoljeća

dokazano da retinoična kiselina inhibira diferencijaciju adipocita i sprječava razvoj pretilosti i inzulinske rezistencije na modelu štakora (133). Također, RA utječe na metabolizam lipida u jetri, smanjujući nakupljanje triglicerida, a potičući oksidaciju masnih kiselina (127).

Unos prevelike količine vitamina A, bilo preko hrane animalnog porijekla, bilo različitim prehrambenim dodacima, dovodi do hipervitaminoze A, smanjenja gustoće koštanih gredica i toksičnosti jetre. Osobito je važno upozoriti žene koje planiraju trudnoću i one u graviditetu na kontroliran unos vitamina A u organizam jer on može imati štetan utjecaj na začeće i embriogenezu (127).

1.13. Uloga vitamina A i njegovih metabolita u pretilosti i oksidacijskom stresu

Novija *in vitro i in vivo* istraživanja masnog tkiva rasvijetlila su metabolite vitamina A: retinol, retinaldehid i RA te njihovo posredništvo u razvoju pretilosti. Prvu poveznicu između metabolizma vitamina A, masnog tkiva i metabolizma glukoze opisali su 2005. Yang i sur. kada je po prvi puta otkriveno da povišena koncentracija RBP4 pridonosi inzulinskoj rezistenciji u jetri i mišićnom tkivu (134). Kasnije je to potvrđeno u još nekoliko animalnih istraživanja.

Vitamin A dokazano utječe na metabolizam lipida, izazivajući hipertrigliceridemiju i dislipidemiju u genetičkom modelu pretilih i u mršavim štakorima (135). Zarei i sur. potvrdili su posljedičnu dislipidemiju nakon primjene RA na animalnom modelu Wistar štakora (136). Smatra se da retinoična kiselina povećava stvaranje VLDL-a u jetri i smanjuje aktivnost lipoprotein lipaze (engl. *lipoprotein lipase*, LPL) u perifernim tkivima (21), pospješujući time dislipidemiju. Vezano za konkretnu ulogu u pretilosti, zabilježena su različita istraživanja.

Neki radovi potvrđuju da vitamin A i njegovi derivati ulaze u međureakciju sa staničnim membranama i imaju štetno djelovanje na stanične organele: pospješuju lipidnu peroksidaciju, karbonilaciju i nitraciju proteina, dovode do disfunkcije mitohondrija i uzrokuju staničnu nekrozu i apoptozu. Vitamin A uzrokuje istjecanje elektrona iz mitohondrija i dovodi do pojačanog nakupljanja ROS-a, čime potvrđuje svoj prooksidativni učinak (137). Rigobello i sur. potvrdili su da RA u bilo kojem obliku (*trans ili cis*) uzrokuje oticanje organela izoliranih iz štakorske jetre, s posljedičnim gubitkom njihove funkcije (138). Prooksidativni učinak dodatka retinoične kiseline

dokazan je i u kasnije objavljenim radovima (139,140). Oralna primjena RA u jedinki na visokomasnoj hrani povećava oksidacijski stres u bubregu Wistar štakora, smanjujući njihov antioksidacijski kapacitet, a povećavajući karbonilirane proteine koji su važan biljeg oksidacijskih poremećaja (136). Intragastrična primjena vitamina A u dozi između 1000 i 9000 IU/kg/dnevno tijekom 3,7 ili 28 dana uzrokuje teška oštećenja na mozgu štakora i u drugim organima u mužjaka štakora soja Wistar, uzrokujući i promjene u njihovom ponašanju zabilježene testom otvorenog prostora (engl. *open field test*) i testom tamna/svijetla kutija (engl. *light*/*dark box*) (141–144). Male doze RA, 1 mg/kg, uzrokuju oštećenje stanica hipokampusa, smanjenu sposobnost učenja i anksiozno ponašanje u odraslih štakora (141,145). U ljudi na terapiji isotretinoinom za liječenje težih oblika akne (lat. *acne nodularis, acne conglobata*) dokazan je smanjen metabolizam u orbitofrontalnom korteksu koji se povezuje s izraženijim depresivnim ponašanjem, ponekad i suicidalnim idejama (146–148).

Druga, pak, istraživanja, upućuju na antioksidacijski učinak dodatka retinoične kiseline. U istraživanju Samokyszyna i sur. dokazano je da dodatak RA inhibira lipidnu peroksidaciju na mikrosomima jetre štakora u kulturi (149). U jetri C57BL/6J miševa također je dokazano smanjeno stvaranje ROS nakon primjene RA zbog poticajnog djelovanja RA na Sirtuin 1 (*Sirt1*) receptor u jetri koji ima antioksidacijsko djelovanje (150). Antioksidacijski učinak 13 cRA dokazan je i na koži miša nakon primjene snažnog tumorskog promotora benzoil peroksida na koži miša. Uz dodatak konkretno 13 cis retinoične kiseline (engl. *13 cis retinoic acid*, 13 cRA) došlo je do smanjenja lipidne peroksidacije u koži i povećanja antioksidansa GSH (151). Uza sve navedeno, RA dokazano smanjuje tjelesnu masu štakora smanjujući količinu visceralnog i retroperitonealnog masnog tkiva (21,150), najvjerojatnije aktivacijom UCP-1 u smeđem masnom tkivu, posmeđivanjem bijelog masnog tkiva i aktivacijom glukokortikoidnih i termogenih receptora (21).

Retinol vezni protein 4 (engl. *retinol binding protein*, *RBP4*) služi kao serumski nosač i prijenosnik vitamina A. Povišene serumske koncentracije RBP4 povezuju se s poremećajem metabolizma glukoze, a povećani izražaj RBP4 zabilježen je u masnom tkivu miševa s razvijenom inzulinskom rezistencijom (134).

Sažimajući sve navedeno, čini se da retinol vezan za RBP i RA ima potpuno različite uloge u metabolizmu lipida i glukoze (127). U razmatranju uloge RA na pretilost i oksidativni stres u

organizmu, svakako je važno imati u vidu i genetsku raznolikost, dob, spol, raspodjelu masnog tkiva u organizmu i funkciju bubrega (152).

1.14. 13 – cis retinoična kiselina

Aktivni metabolit vitamina A jest 13 cRA. Ona se u medicini koristi za mnoge poremećaje, od kojih je najpoznatije liječenje teških oblika akne u skupini adolescenata. 13 cRA ima protuupalno i antisebogeno djelovanje, sprječavajući stvaranje loja u žlijezdama lojnicama i upalnu kaskadu koja je ključna u patogenezi akne (153). Za vrijeme trajanja terapije, koja je uobičajna 15-20 tjedana, vidljive su brojne nuspojave, od kojih su najčešće hipertrigliceridemija i hiperkolesterolemija, hiperkalcemija, porast jetrenih transaminaza, poremećaji raspoloženja, suha koža i sluznice, heilitis (154). Osim u terapiji akne, 13 cRA koristi se i u terapiji nekih maligniteta, poput neuroblastoma i planocelularnih karcinoma (155,156), te za liječenje nekih drugih dermatoloških poremećaja, poput rozacee (157) i seborojičnog dermatitisa (158).

1.15. Model štakora u istraživanjima pretilosti i metaboličkih poremećaja

Metabolički je sindrom višestruke etiologije, a pretilost je jedna od entiteta koji se vežu uz njega. Uz brojne etiološke čimbenike koji su navedeni ranije u tekstu, vrlo su važni i oni okolišni, koji su, u načelu podloži kontroli pojedinca, poput sjedilačkog načina života, fizičke aktivnosti i prehrambenih navika (1). Stoga, odabir modela za proučavanje pretilosti treba što više imitirati zapadnjački stil života i prehrambene navike pojedinaca.

Smatra se da je nesrođeni soj štakora (engl. *outbreed*) najidealniji model za proučavanje pretilosti jer dobro imitira genetsku raznolikost koja je prisutna u ljudskoj populaciji. Najčešće se primjenjuju različiti pristupi hranjenu: prehrana s visokim udjelom masti, prehrana s visokim udjelom šećera ili prehrana s visokim udjelom masti i šećera. Hrana s visokim udjelom masti izaziva uglavnom povećanje tjelesne mase i količine masnog tkiva, povećanje koncentracije glukoze, kolesterola, triglicerida, leptina i inzulina. Postotak masti može varirati između 20 i 60 % ukupnog kalorijskog unosa, a izvor masti mogu biti proizvodi biljnog porijekla, poput

suncokretovog ili sojinog ulja, ili proizvodi životinjskog porijekla. Hrana s visokim udjelom šećera može biti: s visokim udjelom glukoze, fruktoze ili saharoze (159). Postoje istraživanja koja uspoređuju metaboličke učinke različitog sastava ugljikohidrata u hrani (160). Za proučavanje metaboličkih poremećaja mogu se koristiti i genetski modificirani sojevi, koji imaju ukinut ili mutiran određeni gen, te se očituju nekontrolirano pojačanim apetitom, masivnom hiperfagijom i smanjenom potrošnjom energije. Primjeri takvih modela jesu: *ob/ob* miševi, *db/db* miševi, Zucker fatty štakori, Goto Kakizaki štakori. Svaki od tih modela ima neke svoje prednosti i neka ograničenja. Metabolički se poremećaji i pretilost mogu inducirati različitim farmakoterapijskim pristupima, primjerice glukokortikoidima ili antipsihotikom olanzapinom (159).

Najčešće korišteni sojevi za proučavanje metaboličkih poremećaja jesu Spraque Dawley štakori, Wistar štakori i C57BL/6 J soj miševa. U radu je izabran soj Lewis štakora s obzirom da brojni navodi pokazuju da su Lewis štakori pogodan model za prehranom-induciranu pretilost, dijabetes i dijabetes–induciran streptozotocinom. Osim toga, Lewis štakor je vrlo osjetljiv na indukciju autoimunih bolesti, kao što je eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis, inducirani artritis, upala, glomerulonefritis i eksperimentalni miokarditis (161,162), a pokazuju i veću osjetljivost u neuroprotektivnoj terapiji posebice u kroničnoj upali – prouzročenoj norepinefrin osjetljivim nociceptorima i razvija bolji odgovor na upalu i lipidnu peroksidaciju u odnosu na Fischer 344 i Sprague Dawley štakore (163,164). Navedeni su pokazatelji pretilosti - pridruženi poremećaji. Nadalje, štakori su u odnosu na miševe prikladniji životinjski model za proučavanje ljudskih poremećaja u pretilosti, starenju, raku, dijabetesu, transplantaciji i kardiovaskularnim istraživanjima. Modeli štakora pokazuju veće fiziološke sličnosti s ljudima nego miševi. Također, radi njihove veće veličine kirurška intervencija može se izvesti i pratiti lakše nego kod miševa. Uza sve to, jako dobro reagiraju na oksidacijska oštećenja, osobito lipidnu peroksidaciju (165, 166).

Prednost korištenja animalnih modela je, uz mogućnost određivanja uvjeta, izbor odgovarajućeg soja, odgovarajuća kontrola, dob, laka dostupnost, ekonomska isplativost, prilagodba tehnika, mogućnost višestrukog ponavljanja pokusa te provjere rezultata kao i mogućnost praćenja biokemijskih, funcionalnih i histomorfoloških promjena u pretilosti i metaboličkom sindromu.

2. HIPOTEZA

Dugoročna primjena 13 cRA i prehrana bogata mastima u ženki štakora soja Lewis narušit će homeostatske procese u regulaciji tjelesnih masti, metabolizmu glukoze i adipokina vodeći kroničnoj upali i oksidacijskom stresu. Prehrana bogata mastima i primjena 13 cRA izazvat će histološke promjene jetrenog parenhima.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je rada istražiti ulogu 13 cRA na metaboličke poremećaje u uvjetima normalne prehrane i prehrane obogaćene mastima u štakora soja Lewis preko:

a) mjerenja koncentracije ključnih adipokina (leptina, adiponektina),

b) istraživanja funkcionalne poveznice između razine ključnih adipokina i koncentracije glukoze i lipida u krvi te histoloških promjena na tkivu jetre,

c) istraživanja poveznice između upalnih citokina, oksidacijskog stresa i aterogenih pokazatelja,

d) istraživanja doprinosa 13 cRA u povećanju/smanjenju aterogenih pokazatelja, očuvanju krvožilne funkcije i srca, te hepatorenalne funkcije.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Pokusne životinje

U istraživanje je uključeno 36 ženki štakora soja Lewis, starosti 4-6 mjeseci, mase 200 – 350 g iz uzgoja Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno matematičkog fakulteta u Zagrebu. Istraživanja na životinjama provedena su u skladu sa smjernicama koje su na snazi u Republici Hrvatskoj (Zakon o dobrobiti životinja, NN 37/13, NN 55/13) te u skladu s vodičem za držanje i korištenje laboratorijskih životinja [Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHHS (NIH) Publ # 86-23].

Odobrenje za provođenje pokusa dalo je Povjerenstvo za bioetiku i dobrobit životinja Prirodoslovno matematičkog fakulteta u Zagrebu (KLASA: 643-02/19-01/3, URBROJ: 251-58-10617-19-284), Ministrastva poljoprivrede RH (KLASA: UP/I-322-01/19-01/32, URBROJ: 525-10/0255-19-4) te Medicinskog fakulteta u Osijeku (KLASA: 602-04/19-08/04, URBROJ: 2158-61-07-19-123).

4.2. Hrana za životinje

Životinje su hranjene dvjema različitim vrstama hrane za glodavce: standardnom hranom i visokokaloričnom hranom. Kontrolna se skupina hranila standardnom hranom (engl. *standard laboratory chow diet*, STD), odnosno kompletnom repeletiranom hranom za miševe i štakore 4RF21 (engl. *Complete food for MICE and RATS 4RF21 Repelletted*). Druga se skupina hranila visokomasnom hranom (engl. *high fat diet*, HFD), kod koje 45 % od ukupne energije otpada na nezasićene masti. (engl. *Complete feed for RODENTS PURIFIED Diet 45 % ENERGY FROM FATS*). Sastav standardne i visokokalorijske hrane prikazan je u Tablici 4.1.

Tablica 4.1. Sastav standardne i visokomasne hrane.

STANDARDNA HRANA			
SASTAV	Pšenica, ječam, sojino brašno ekstrahirano tostirano, kukuruzni gluten, slama pšenice, riblje meso, mineralni dikalcijev fosfat, kalcijev karbonat, natrijev klorid, proteini iz sirutke, sojino ulje, kvasci		
Hranjivi aditivi:	E672 – Vitamin A	I.U.	14400
	E671 – Vitamin D3	I.U.	1260
	E1 – Fe	mg	180
	E5 - Mn	mg	54
	E6 – Zn	mg	67,5
	E4 – Cu	mg	11,7
	E2 – I	mg	0,90
	3d302 – Co	mg	0,63
Tehnološki aditivi	E562 – Sepiolit	mg	880
Analitički konstituenti (u %)	Sirove bjelančevine	%	18,50
	Sirove masti i ulja	%	3,0
	Sirova vlakna	%	6,0
	Sirovi pepeo	%	7,0
VISOKOMASNA HRANA			
SASTAV	Kazeinski prah, saharoza, svinjska mast, maltodekstrin, kukuruzni škrob, sojino ulje, kalcijev karbonat, natrijev monofosfat, dikalcijev fosfat, natrijev klorid, natrijev sulfat, magnezijev oksid		
Hranjivi aditivi:	E672 – Vitamin A	I.U.	7600
	E671 – Vitamin D3	I.U.	1900
	E1 – Fe	mg	49,5
	E5 - Mn	mg	13
	E6 – Zn	mg	41,2
	E4 – Cu	mg	7,4
	E2 – I	mg	0,26
	E8– Co	mg	0,19
	E7 – Mo	mg	0,19
Konzervansi	E332– Kalcijev citrat		
Bojila	E123 – košenil crveno A	mg	100
Analitički konstituenti (u %)	Sirovi proteini	%	21
	Sirove masti i ulja	%	23
	Sirova vlakna	%	4,5
	Sirovi ugljik	%	3,5

4.3. Plan pokusa

Ženke štakora soja Lewis podijeljene su u 6 skupina (n = 6) s različitim protokolom hranjenja i primjene 13 cRA, kako slijedi:

a) STD-C (ženke hranjene standardnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak suncokretovog ulja tijekom prvih 30 dana)

b) STD+7,5 (13 cRA) (ženke hranjene standardnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dozi 7,5mg/kg tijekom prvih 30 dana)

c) STD+15 (13 cRA) (ženke hranjene standardnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dozi 15mg/kg tijekom prvih 30 dana)

d) HFD-C (ženke hranjene visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak suncokretovog ulja tijekom prvih 30 dana)

e) HFD+7,5 (13 cRA) (ženke hranjene visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dozi 7,5mg/kg tijekom prvih 30 dana)

f) HFD+15 (13 cRA) (ženke hranjene visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dozi 15mg/kg tijekom prvih 30 dana)

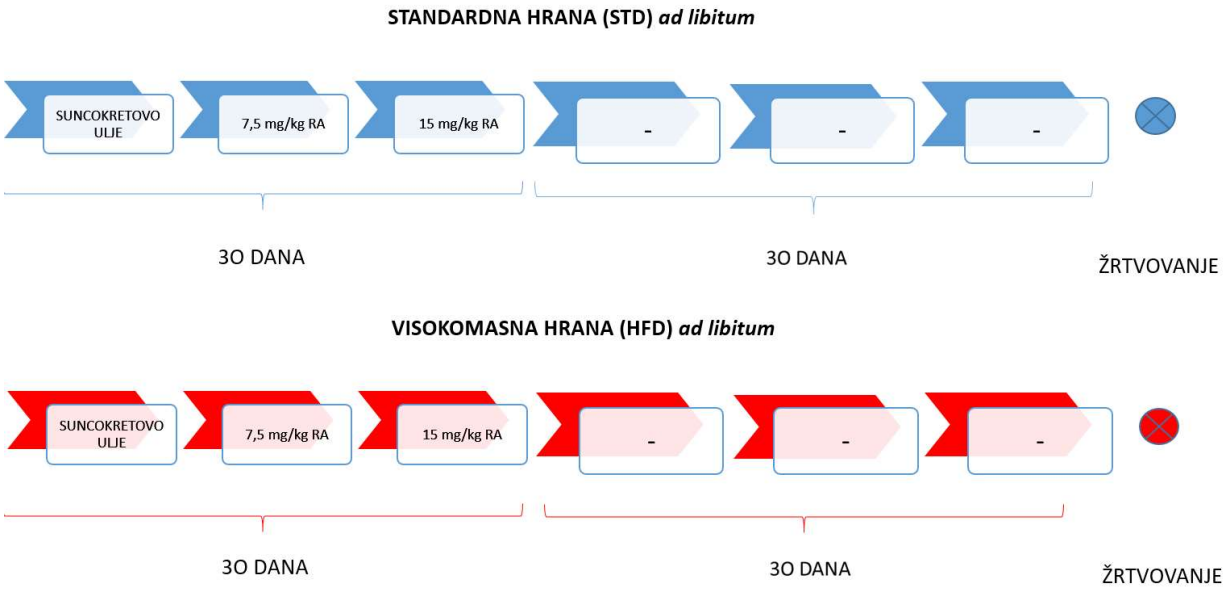
Patofiziološke promjene izazvane su oralnom primjenom RA (kanilom) u dozi od 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana na način da se sadržaj kapsula Roaccutane ® (Roche d.o.o., Francuska) pomiješa sa suncokretovim uljem kako bi se dobile spomenute koncentracije.

Navedene dvije koncentracije 13 cRA odabrane su u skladu s postojećom literaturom koja potvrđuje da je doza 7,5 mg/kg 13 cRA u animalnom modelu istovjetna dozi 550-600 ng/mL u ljudi; te 15 mg/kg 13 cRA dozi 880-1650 ng/mL u ljudi (167) . Primjena koncentracije od 7,5mg/kg 13 cRA u skladu je s razinom 13 cRA u serumu ljudi nakon upotrebe kapsula Roaccutane u terapiji akne (0,5 – 1 mg/kg), a doza od 15 mg/kg pokazatelj je primjene dvostruko veće doze u odnosu na terapijsku.

Tijekom obrade životinja nije bila korištena anestezija i analgezija; postupak anestezije i anelgezije primjenjen jedino tijekom postupka žrtvovanja životinja gdje su one anestezirane i analgezirane intraperitonealnom primjenom kombinacije Narketana® Vetoquinol S.A., BP 189

Lure Cedex, Francuska (djelatna tvar Ketamin) i xylapana® Vetoquinol Biowet Sp., Gorzow, R. Poljska (djelatna tvar Ksilazin) u dozi od 25 mg/kg.

Tijekom izvođenja pokusa nije bilo životinja koje su pokazivale narušeno opće stanje i bol, te tako nije bila učinjena selektivna eutanazija povećanom dozom anestetika ili cervikalnom dislokacijom.



Slika 4.1. Plan pokusa.

Ženke štakora soja Lewis (n=6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA eksperimentalnim skupinama u dvije koncentracije tijekom 30 dana, kako slijedi: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg. Kontrolnoj je skupini tijekom 30 dana ordinirano suncokretovo ulje. Primjena 13 cRA trajala je 30 dana, tijekom idućih 30 dana je ukinuta te su se ženke štakora soja Lewis hranile isključivo STD ili HFD *ad libitum*, nakon čega je, 60. – og dana pokusa, izvršeno žrtvovanje životinja.

4.4. Praćenje promjene ukupne mase štakora

Prije početka pokusa životinje su izvagane i razvrstane u skupine prema približno sličnoj tjelesnoj masi. Mjerenje tjelesne mase obavljeno je digitalnom vagom 1x tjedno tijekom 60 dana. Vaganje je obavio voditelj pokusa. Postotak promjene tjelesne mase izačunat je na kraju pokusa prema formuli:

$$Promjena\ tjelesne\ mase\ (\%) = \frac{konačna\ masa - \ početna\ masa}{konačna\ masa} \cdot 100 \quad (1)$$

4.5. Praćenje unosa hrane i vode

Unos hrane i količina vode kontrolirana je svakodnevno. Unos hrane i vode prikazan je kao razlika između početne i konačne težine u razdoblju od 24 sata. Rezultati su izraženi u gramima (g) ili mililitrima (mL).

4.6. Adipozni indeks

Adipozni indeks je korišten kao mjera pretilosti, s obzirom da se količina masti postupno povećava razvojem pretilosti. Nakon žrtvovanja štakora, izdvojeno je masno tkivo i izvagano. Ukupna tjelesna količina masnog tkiva izmjerena je i prikazana kao zbroj pojedinačnih težina masnih tkiva: perigonadalno masno tkivo + retroperitonealno masno tkivo + visceralno masno tkivo. Adipozni indeks (%) izračunao se na sljedeći način:

$$Adipozni\ indeks\ (\%) = \frac{[retroperitonealno\ masno\ tkivo\ (g) + visceralno\ masno\ tkivo\ (g) + perigonadalno\ masno\ tkivo\ (g)]}{[tjelesna\ masa\ (g)]} \cdot 100 \quad (2)$$

4.7. Relativna masa pojedinih organa

Po završetku su pokusa organi štakora izolirani i izvagani na digitalnoj vagi (Electronic balance ABS 220-4, Kern&Sohn, Germany). Relativna masa svakog pojedinog organa izračunata je prema formuli:

$$Relativna\ masa\ organa\ (\%) = \frac{konačna\ masa\ organa}{konačna\ masa\ štakora} \cdot 100 \quad (3)$$

4.8. Oralni test tolerancije glukoze i glikemijske promjene tijekom vremena

Nakon 60. dana trajanja pokusa te nakon prekonoćnog (8 -10 h) gladovanja životinja, izmjerena je koncentracija glukoze u krvi u 0., 15., 30., 60., 90. i 120. min, neposredno nakon

intragastrične primjene glukoze kanilom u dozi od 3 g/kg/TT. Uzorak krvi za analizu glukoze u krvi uzet je iz repne vene nakon laganog uboda sterilnom iglom, a razina glukoze mjerena glukometrom s odgovarajućim test - trakicama.

Postotak glikemijske promjene u pojedinoj je grupi izračunat kao funkcija vremena korištenjem dolje navedene formule:

$$\%\ glikemijske\ promjene\ = \frac{(G1-G0)}{G1} \cdot 100 \quad (4)$$

gdje G0 predstavlja vrijednosti glukoze prije aplikacije otopine glukoze, a G1 vrijednosti glukoze u 30′, 60′, 90′ i 120′ nakon primjene iste.

4.9. Analiza hormona leptina i adiponektina

Razina adipokina u serumu određena je pomoću ELISA metode. Korišteni su kitovi Rat leptin Elisa kit 96 – Well Plate (Cat. # EZRL – 83K, Merck Millipore Corporation, USA) i Rat adiponektin Elisa kit 96 – Well Plate (Cat. # EZRADP – 62K, Merck Millipore Corporation, USA). Određivanje razine leptina i adiponektina napravljeno je prema naputku proizvođača.

Serum je dalje korišten za mjerenje razine lipida u krvi, biokemijsku analizu, analizu upalnih citokina, mjerenje dušik oksida (NO) i arginaze 1.

4.10. Lipidogram i aterogeni pokazatelji

Razina lipida u serumu određena je pomoću uređaja Architect c 8000 (Abbott), a iz dobivenih vrijednosti izračunat je aterogeni indeks (AIP, engl. *atherogenic index*), aterogeni koeficijent (AC, engl. *atherogenic coefficient*)), kardijalni rizik (CRR, engl. *cardiac risk ratio*) i kardioprotektivni indeks (CPI, engl. *cardioprotective index*) te indikator inzulinske resistencije prema formulama koje slijede:

$$Aterogeni\ indeks\ (AIP)\text{: } AIP\ =\ log\left[\frac{TG}{HDL-c}\right] \quad (5)$$

$$Aterogeni\ koeficijent\ (AC)\text{: } AC\ = \frac{TG - HDL - c}{HDL - c}\ (6)$$

$$Kardijalni\ rizik\ (CRR)\text{: } CRR\ = \frac{TG}{HDL - c}\ (7)$$

$$Kardioprotektivni\ indeks\ (CPI)\text{: } CPI\ = \frac{HLD - c}{LDL - c}\ (8)$$

$$Indikator\ inzulinske\ rezistencije\ (IR)\text{: } IR = \frac{TG}{HDL - c}\ (9)$$

gdje TG predstavlja serumsku koncentraciju triglicerida, HDL–c predstavlja serumsku koncentraciju liporoteina visoke gustoće, LDL-c – predstavlja serumsku koncentraciju lipoproteina niske gustoće

4.11. Analiza upalnih citokina

Upalni parametri iz krvi određeni su pomoću ELISA metode. Korišten je kit proizvođača Multi-Analyte ELISArray for Rat, Kit: MER004A tvrtke Quiagen. Od upalnih citokina analizirani su IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17A, IFN-γ, TNF-α, GM-CSF.

Korišteno je dvostruko razrijeđenje seruma. Prije same analize pripremljene su otopine prema naputku proizvođača (Wash Buffer, Assay Buffer, Sample Dilution Buffer, Antigen Standard Cocktail). Pripremljene su pozitivna i negativna kontrola, te je 50 µL uzorka dodano u odgovarajuće jažice, nakon čega je uslijedila inkubacija u trajanju 2 sata. Pločica se ispirala 3 puta, potom se u sve jažice dodalo 100 µL Detection Antibody otopine uz inkubacijsko razdoblje od 1 sat. Ponovno je uslijedilo ispiranje 3x, i u sve je jažice dodan Avidin-HRP. Razdoblje inkubacije trajalo je 30 minuta, nakon čega je uslijedilo ispiranje 4x, dodavanje Development otopine i Stop otopine. Apsorbancija je očitana unutar 30 minuta od dodavanja posljednje otopine na valnoj duljini 450 nm i 570 nm.

4.12. Mjerenje dušikovog oksida indirektnom metodom prema Griessu

Za određivanje dušikovog oksida korišten je kit Griess reagent system (Promega, SAD), koji se temelji na indirektnoj metodi prema Griess-u kojom zapravo određujemo količinu NO_2^-. Ova metoda temelji se na međureakciji spojeva sulfanilamida i N-1-naftiletilendiamin dihidroklorina (NED) u kiselom okolišu. U toj reakciji nitrit reagira sa sulfonilnom kiselinom i stvara diazo kation koji se spaja u aromatske amine ružičastog obojenja koji apsorbiraju u vidljivom dijelu spektra pri 540 nm. Na temelju serijskih razrijeđenja standardne 0,1 M nitritne otopine utvrđuje se koncentracija nitrita u serumu.

Sam postupak sastoji se od dodavanja 50 µL seruma u eksperimentalne jažice te stvaranja baždarnog pravca. Od svakog su uzorka analizirani triplikati. Tijekom postupka dodaje se 50 µL sulfanilamid otopine u sve jažice, te se inkubira 5-10 minuta u mraku. Potom se dodaje 50 µL NED otopina, uz inkubaciju 5-10 minuta. Apsorbancija se očitava na 540 nm.

4.13. Određivanje aktivnosti arginaze

Mjerenje razine aktivnosti arginaze iz uzoraka seruma razrijeđenih u PBS-u 8x i bubrega razrijeđenih 40x provodilo se pomoću ELISA kita (Sigma-Aldrich) za arginazu koji se temelji na konverziji L-arginina do uree i ornitina. Nastala urea specifično reagira sa supstratom pri čemu nastaje obojenje koje je proporcionalno aktivnosti arginaze. Jedna jedinica arginaze predstavlja količinu enzima dovoljnu za konverziju 1 µM L-arginina do ornitina i uree u minuti pri pH od 9,5 i temperaturi od 37ºC. Standardna radna otopina uree pripremljena je dodavanjem 24 µL uree standarda (50 mg/dL) i 176 µL dH_2O kako bi se dobila 1 mM standardna radna otopina uree.
U mikrotitarsku pločicu dodano je 40 µL uzorka u duplikatu s time da je dodano isto toliko uzoraka u duplikatu kao slijepa proba. Isti je volumen dodan u jažice za standardnu radnu otopinu uree i dH_2O. Nakon toga je dodano u svim uzorcima, osim uzoraka slijepe probe, 5x razrijeđenog supstratnog pufera dobivenog miješanjem 8 µL arginin pufera sa 2 µL otopine Mn, nakon čega je slijedila inkubacija od 2 sata pri 37ºC. Prije isteka dvosatne inkubacije, pripremljen je urea reagens dobiven miješanjem već gotovih reagensa A i reagensa B (100 µL reagensa A i 100 µL reagensa B pripremljenih u kitu). Po isteku inkubacije, kako bi se zaustavila reakcija dodano je 200 µL urea

reagensa u svaku jažicu uključujući i uzorke slijepe probe. Potom je dodano 10 µL 5x razrijeđenog supstratnog pufera u uzorke slijepe probe te je provedena inkubacija od 60 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije izmjerena je apsorbancija na 430 nm na uređaju Ao Absorbance Microplate Reader (proizvođač: Azure Biosystems, SAD).

Aktivnost arginaze određena je pomoću sljedeće formule:

$$Aktivnost\ arginaze = \frac{A\ uzorka - A\ prazne\ jažice}{A\ standarda - A\ vode} \cdot \frac{(1\ mM \cdot 50 \cdot 10^3)}{(V \cdot T)} \quad (10)$$

gdje je A – apsorbancija, T - vrijeme reakcije u minutama, V - volumen uzorka dodan u jažice, 1 mM koncentracija standarda ureje, 50 reakcijski volumen, a 10^3 konverzijski čimbenik mM u µM.

4.14. Hematološka analiza krvi

Uzorci krvi za hematološku analizu uzeti su iz abdominalne aorte svake jedinke pojedinačno prilikom žrtvovanja životinja. Uzorci krvi za hematološku analizu stavljeni su u heparinizirane staklene vacutainere s dodatkom EDTA (Becton Dickinson, Plymouth, UK) te pohranjeni na temperaturi od 4ºC do analize. Od hematoloških parametara analiziran je broj leukocita, diferencijalna krvna slika, postotak hemoglobina (Hgb), hematokrit (H), prosječan volumen eritrocita (MCV), prosječna količina hemoglobina u eritrocitima (MCH), prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima (MCHC) te raspodjela eritrocita prema veličini (RDW). Hematološki parametri analizirani su na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu preporučenim analitičkim metodama na elektronskom brojaču Horiba ABX169 (Micros, Francuska).

4.15. Biokemijska analiza krvi

Uzorci krvi za biokemijsku analizu uzeti su iz abdominalne aorte svake jedinke pojedinačno i prikupljeni su u vacutainere bez antikoagulansa. Za određivanje biokemijskih parametara korišten je serum, a vrijednosti svakog pojedinog parametra određene pomoću VetScan® kompleta (engl. Comprehensive Diagnostic Profile reagent rotor) na uređaju VetScan® VS2 (Abaxis, UK). Analizirana je koncentracija albumina (ALB g/L), alkalne fosfataze (ALP - U/L), alanin aminotransferaze (ALT – U/L), amilaze (AMY – U/L), ukupnog bilirubina (TBIL - µmol/L),

dušika uree u krvi (BUN – mmol/L), kalcija (Ca^{2+} – mmol/L), fosfata (PHOS – mmol/L), kreatinina (CRE – µmol/L), glukoze (GLU – mmol/L), natrija (Na^{+} - mmol/L), kalija (K^{+} - mmol/L), ukupnih proteina (TP – g/L) te globulina (GLOB – g/L).

4.16. Analiza parametara oksidacijskog stresa jetre i bubrega

4.16.1. Priprema uzoraka za analizu

Tijekom žrtvovanja izolirana su i izvagana tkiva bubrega i jetre te pohranjena na temperaturi od -20ºC do daljnje analize. Za daljnju analizu odvagano je 75 - 100 mg tkiva pojedinog organa zasebno u Eppendorf epruvete volumena 2 mL te je dodan fosfatni pufer (PBS) u omjeru 1:10. Uzorci su homogenizirani ultrazvučnim homogenizatorom te centrifugirani 15 min pri 15000 okretaja i temperaturi od 4ºC. Odvojen je supernatant od taloga u novu epruvetu te su napravljena razrjeđenja 10x, 40x te 100x. Uzorci su zatim do analize pohranjeni na -20ºC.

4.16.2. Određivanje proteina po Lowreyu

Proteini, u prethodno pripremljenim homogenatima tkiva jetre i bubrega, određeni su metodom prema Lowrey i sur. (168). Metoda se zasniva na biuretskoj reakciji – redukciji bivalentnog bakrova iona u reakciji s peptidnom vezom u bazičnim uvjetima pri čemu nastaje monovalentni bakrov ion. Dolazi i do oksidacije aromatskih bočnih ogranaka (triptofana, tirozina i cisteina) koji reagiraju s Folinovim reagensom te nastaje nestabilan produkt koji se polako reducira stvarajući plavo obojenje reakcijske smjese. U 100 µL uzoraka tkiva jetre i bubrega razrijeđenih 10 puta dodano je 2 mL otopine D (Tablica 4.2.). Reakcijska smjesa inkubirana je na sobnoj temperaturi kroz 10 minuta te je dodano 200 µL otopine E. Nakon dodatka otopine E reakcijska je smjesa vorteksirana te stavljena na inkubaciju u zatamnjenu komoru na 30 minuta. Potom je mjerena apsorbancija uzoraka pri valnoj duljini od 600 nm. Kao standard uzete su poznate serijske koncentracije (2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,015625 mg/mL) goveđeg serumskog albumina (engl. *Bovine Serum Albumine,* BSA) na temelju kojih je izrađen baždrani

pravac. Vrijednosti proteina dobivene su korištenjem standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji BSA iz koje je prvo izračunat nagib pravca. Na temelju baždarnog pravca kasnije su izračunate koncentracije proteina u samim uzorcima (u mg/mL uzorka) korištenjem sljedeće formule:

$$qc = \left(\frac{A_{uzorka} - b_{st.krivulje}}{nagib\ pravca\ st.krivulje}\right) \cdot razrjeđenje \quad (11)$$

pri čemu je: qc – koncentracija proteina, A – apsorbancija uzorka

Tablica 4.2. Priprema otopina korištenih u određivanju proteina metodom po Lowryu.

Otopina	**Priprema otopina (za 100 uzoraka)**
Otopina A: 2 % (w/v) Na_2CO_3 u 0,1M NaOH	9,6 g Na_2CO_3 + 480 mL 0,1M NaOH
Otopina B: 1 % (w/v) natrij-kalij tartarat u dH_2O	0,1 g Kalijev - natrijev tartatat + 10 mL dH_2O
Otopina C: 0,5 % (w/v) $CuSO_4 \times 5H_2O$ u dH_2O	0,05 g $CuSO_4 \times 5H_2O$ + 10 mL dH_2O
Otopina D	Otopine A, B i C u omjeru A:B:C = 48:1:1
Otopina E: Folin-Ciocalteu reagens	pomiješati Folin & Ciocalteu's phenol reagens i dH_2O u omjeru 2:1 (npr. 14 mL Folin & Ciocalteu's phenol reagens + 7 mL dH_2O)

4.16.3. Enzimska aktivnost katalaze

Aktivnost katalaze u tkivima određena je metodom prema Aebiju (169). U toj se metodi aktivnost katalaze određuje preko količine potrošenog H_2O_2. Za mjerenje su korišteni uzorci tkiva bubrega razrijeđeni 40x te uzorci jetre razrijeđeni 100x. U kivetu je dodano 20 µL uzorka te 980 µL 10 mM H_2O_2 prethodno pripremljenog od 113 µL 30 % H_2O_2 te 99,887 mL PBS-a. Aktivnost katalaze mjerena je spektrofotometrijski praćenjem smanjenja količine H_2O_2 tijekom jedne minute pri valnoj duljini od 240 nm. Kao standard koristio se 10 mM H_2O_2. Aktivnost CAT izračunata je prema formuli $CAT = 500 \cdot \frac{U}{mg\ proteina/mL\ uzorka}$ (12), gdje je $U\ (mM) = \frac{A \cdot 1000}{\varepsilon}$, ekstinkcijski

koeficijent iznosi ε = 39,4 po m/Mcm. Koncentracija katalaze izražena je u U/mg proteina što je proporcionalno μmol razgrađenog H_2O_2 u 60 sekundi po mg proteina.

4.16.4. Lipidna peroksidacija

MDA jedan je od stabilnih produkata u kaskadi reakcija slobodnih radikala s nezasićenim masnim kiselinama u procesu lipidne peroksidacije te je njegova koncentracija u tkivu proporcionalna s razinom lipidne peroksidacije. Metoda mjerenja razine lipidne peroksidacije u tkivu zasniva se na reakciji MDA s 2-tiobarbituratnom kiselinom (*thiobarbituric acid*, TBA) stvarajući kompleks MDA – TBA koji daje crveno obojenje te je njegova koncentracija spektrofotometrijski mjerljiva pri valnoj duljini od 532 nm. Reakcija se odvija pri pH nižem od 7 (kiseli uvjeti) te pri povišenoj temperaturi.
Za mjerenje razine lipidne peroksidacije korišteni su homogenati tkiva. U 100 μL uzorka dodano je 1,6 mL otopine A (Tablica 4.3) te su Eppendorf epruvete stavljene u vodenu kupelj na inkubaciju pri temperaturi od 95ºC na 60 minuta. Nakon inkubacije epruvete s uzorcima stavljene su na led 10 minuta kako bi se uzorci ohladili. Uzorci su zatim 15 minuta centrifugirani na 5000 okretaja kako bi se nastale folikule odvojile od supernatanta. Potom se supernatant stavlja u spektrofotometar te se mjeri apsorbancija pri 532 nm. Koncentracija MDA u uzorku računa se pomoću formule

$$c = \frac{A_{uzorka} \cdot V_{reakcijske\ smjese}\ (mL)}{\varepsilon \cdot V_{\ uzorka\ (mL)} \cdot c_{proteina\ u\ uzorku\ (\frac{mg}{mL})}} \quad (13)$$

pri čemu je: c – koncentracija (MDA, proteina u uzorku), V – volumen, A - dobivena apsorbancija, a ε ekstinkcijski koeficijent MDA te iznosi ε=0,156 mL/mol. Koncentracija MDA u uzorku izražena je u nmol MDA po mg proteina.

Tablica 4.3. Priprema otopine A.

Otopine	**Način pripreme otopina**
8,1 % SDS	0,81 g SDS-a u 10 mL dH_2O
20 % octena kiselina	20 mL 99,5 % octene kiseline i 2,31 mL HCl, nadopuni se do 50 mL dH_2O i podesi pH=3,5 te nadopuni dH_2O do 100 mL
0,8 % TBA	0,8 g TBA u 40 mL dH_2O uz lagano zagrijavanje. Nakon otapanja dodaje se 500 µL 5M NaOH te se nadopuni s dH_2O do 100 mL
Otopina A	100 µL 8,1 % SDS + 750 µL 20 % octene kiseline (pH = 3,5) + 750 µL 0,81 % TBA

4.16.5. Razina ukupnog glutationa

Ukupna količina GSH mjerena je pomoću modificirane Tietzeove metode (170). Metoda se temelji na reakciji slobodnog GSH u tkivu s tiolnim reagensom 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoične kiseline (DTNB – Ellmanov reagens) čiji produkt je kromofor 5 – tionitrobenzoična kiselina (TNB) čija se koncentracija spektrofotometrijski mjeri pri valnoj duljini od 412 nm. Reakcijom GSH i DTNB-a stvara se kompleks GS-TNB. Dodanim enzimom GSH reduktaze i NADPH-a dolazi do regeneracije slobodnog GSH te se u reakcijsku smjesu otpušta TNB. Brzina nastanka TNB-a je proporcionalna koncentraciji GSH u uzorku tkiva. Za mjerenje GSH u tkivu korištene su mikrotitarske pločice. Koncentracija GSH mjerena je u uzorcima tkiva jetre i bubrega (razrjeđenje 10x). U svaku jažicu dodano je 40 µL 35 mM HCl, 40 µL 10 mM DTNB te 20 µL uzorka. Kao standard, na temelju kojeg je napravljen baždarni pravac, korištene su sljedeće koncentracije reduciranog glutationa (GSH): 60; 30; 15; 7,5; 6; 3,25; 3; 1,875; 1,5; 0 µg/mL. Mikrotitarske pločice su stavljene u spektrofotometar te je mjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 412 nm. Nakon toga je dodan enzim GSH reduktaza te je apsorbancija mjerena tijekom 5 minuta. Na temelju rezultata, za sve standarde su nacrtani pravci te je na temelju koeficijenata nagiba pravaca

napravljen baždarni graf kao ovisnost nagiba o koncentraciji GSH u uzorku. Iz tog su grafa određene koncentracije glutationa u tkivu prema formuli:

$$c = \frac{nagib\ pravca - nagib\ slijepe\ probe}{nagib\ pravca\ standarda} \cdot razrjeđenje \quad (14)$$

pri čemu je: c – koncentracija GSH

Koncentracija GSH izražena je u μM GSH po mL proteina u uzorku.

4.17. Histološka analiza jetre

4.17.1. Priprema uzoraka za analizu

Prilikom žrtvovanja, desni jetreni režanj izuzet je za histološku analizu tkiva jetre. Za histološku analizu jetra je fiskirana stavljanjem u fiksativ (4 % formaldehid), i dalje provedena kroz postupak standardne histološke obradbe materijala. Provedena je histološka analiza na tkivu jetre (procjena stupnja steatoze i fibroze). Nakon fiksacije, uzorci tkiva isprani su temeljito u destiliranoj vodi te podvrgnuti postupku dehidriranja uranjanjem u rastuće koncentracije etanola (70 %, 80 %, 96 %, 100 %). Uzorci su tkiva zatim uklopljeni u parafin, rezani pomoću mikrotoma (Leica RM 550) na rezove debljine od 7-8 μm te obojani s hemalaunom i eozinom (engl. *hemalaun eosin*, HE) – za procjenu stupnja steatoze i pikrosiririjusom – za procjenu stupnja fibroze.

4.17.2. Analiza stupnja steatoze

Pripremljeni 5 μm debeli tkivni rezovi jetre obojani su hemalaun eozinom i pregledani svjetlosnim mikroskopom Olympus CX40. Oštećenje jetrenog parenhima semikvantificirano je na sljedeći način (171):

I. nekoliko (3 – 5 masno promijenjenih hepatocita)

II. malo (6 – 15 masno promijenjenih hepatocita)

III. umjereno (16 – 20 masno promijenjenih hepatocita)

IV. značajno (više od 20 masno promijenjenih hepatocita)

Za utvrđivanje masne promjene jetre izbrojani su masno promijenjeni hepatociti s naglaskom na analizu mikrovezikularne i makrovezikularne steatoze jetre. Mikrovezikularna steatoza podrazumijeva pojavu sitnih vakuola masti u citoplazmi, a makrovezikularna steatoza promjene s krupnom vakuolom masti u citoplazmi.

Broj masno promijenjenih hepatocita analiziran je na 20 velikih vidnih povećanja mikroskopa (400x).

4.17.3. Analiza stupnja fibroze

Pripremljeni 5 μm debeli tkivni rezovi jetre obojeni su metodom pikrosirijus crveno, na kojima se vezivno tkivo boji crvenom bojom. Obojeni dijelovi preparata uzeti iz usporedivih područja analizirani su pod svjetlosnim mikroskopom Axiovert 200M (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka) i kamerom AxioCam MRm (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka). Preparati su slikani uz pomoć motoriziranog stolića mikroskopa u polju veličine 10 x 10 slika (povećanje 200x, format TIFF) te povezani u jednu sliku uz pomoć programskog paketa ImageJ; distribucija Fiji (172). Analiza površine kolagena je vršena korištenjem opcije „Thresholding“ u istom programskom paketu. Ukupna površina tkiva je ručno označena u programu GIMP (eng. GNU Image Manipulation Program; verzija: 2.10.14) i pretvorena u obojenu masku. Dobivena maska koja predstavlja ukupno fotografirano tkivo jetre je korištena u programskom paketu ImageJ (distribucija Fiji) za mjerenje ukupne površine tkiva. Zastupljenost kolagena u tkivu je izražena kao površina kolagena (mm2) u odnosu na površinu ukupnog tkiva jetre (mm2).

4.18. Statistička analiza

Veličina uzorka procijenjena je pomoću računalnog programa Gpower (174) s karakteristikama: pogreška tipa 1 (α=0,05), snaga (1-β=0,8) i učinak veličine (engl. *effect size*) 0,3, uz očekivano korištenje dvosmjerne analize varijance sa šest nezavisnih skupina i dva ponovljena mjerenja (6x2 ANOVA) s korelacijom između ponovljenih mjerenja r=0,6. Time je minimalni

potrebni broj ispitanika procijenjen na 36, odnosno 6 životinja po skupini. Dodatno je broj životinja određen poštujući "3R" pristup, metodom "Resource Equation" pomoću formule:

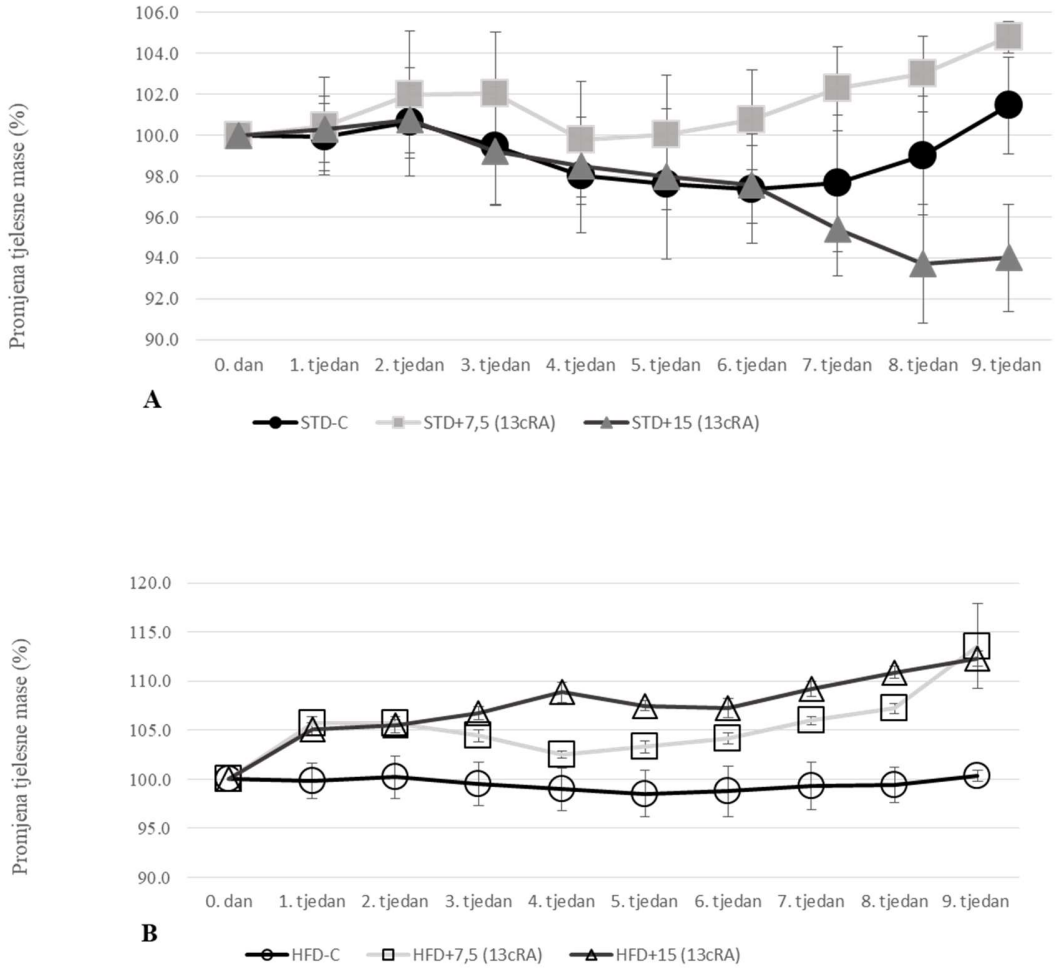
E= (Ukupni broj životinja u pokusu) - (broj grupa), gdje je E broj stupnjeva slobode u testu ANOVA i trebao bi biti između 10 i 20 (173). Podaci su statistički obrađeni pomoću računalnog programa Statistica 13 (StatSoft, Tulsa, Oklahoma, SAD). Numerički podaci su deskriptivno prikazani pomoću aritmetičke sredine i standardne devijacije. Normalnost distribucije ispitana je pomoću Kolmogorov Smirnovljevog testa. Razlike među numeričkim varijablama ispitane su pomoću Kruskal Wallisovog testa s Dunnovim post hoc testom. Sve P-vrijednosti su dvosmjerne, a razina statističke značajnosti određena s $\alpha=0,05$.

5. REZULTATI

Cilj rada bio je istražiti dugoročni učinak primjene 13 cRA tijekom 30 dana na metaboličke i biokemijske promjene štakora hranjenih STD ili HFD prehranom tijekom 60 dana. Kako bismo ostvarili postavljeni cilj istražili smo učinak HFD uz primjenu 13 cRA na promjenu tjelesne mase, hematološke i biokemijske parametre, oralni test tolerancije glukoze, razinu hormona leptina i adiponektina, upalnih citokina, koncentracije dušikovog oksida i arginaze, parametre oksidacijskog stresa jetre i bubrega, te histoloških promjena jetrenog parenhima. U svrhu navedenog, u kontrolnoj je skupini šest ženki štakora soja Lewis hranjeno standardnom hranom, isto toliki broj visokomasnom hranom. Eksperimentalnim skupinama, također 6 životinja po skupini, dodana je 13 cRA u dvije spomenute koncentracije (7,5 mg/kg i 15 mg/kg) tijekom 30 dana. Nakon obrade provedene su analize te rezultati prikazani kako slijedi:

5.1. Promjena mase štakora

Promjene mase životinja tijekom obrade praćeni su svakih 7 dana, a rezultati su prikazani na Slici 5.1. Životinje su vagane tijekom 60 dana, prije početka obrade, tijekom obrade te nakon obrade. Promjena je mase izražena u % te su rezultati prikazani grafički. Usporedbom rezultata vidljiv je statistički značajan porast tjelesne mase u jedinki hranjenih HFD, uz dodatak 13 cRA u dozi 15 mg/kg. Promjena u tjelesnoj masi uočljiva je od 4. tjedna pokusa do kraja pokusa. U jedinki na visokomasnoj hrani, uz dodatak 13 cRA u dozi 7,5 mg/kg na kraju pokusa zabilježene su najveće vrijednosti tjelesne mase koje su statistički značajne u odnosu na skupinu STD+15 (13 cRA) ($P = 0,005$). U jedinki na HFD uz dodatak 13 cRA u dozi od 15 mg/kg na kraju pokusa zabilježen je statistički značajan porast tjelesne mase u usporedbi sa skupinom HFD-C ($P = 0,023$).



Slika 5.1. Promjena tjelesne mase štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Rezultati su prikazani kao AS (SD). Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina.

5.2. Unos hrane i vode i adipozni indeks

Rezultati prehrambenih parametara (unos hrane i vode), udio pojedinog masnog tkiva i adipozni indeks prikazani su u Tablici 5.1. Zapaženo je da životinje kontrolne skupine, hranjene STD, unose veću količinu hrane i pića u odnosu na ostale skupine, bez razlike tijekom razdoblja obrade (Tablica 5.1.). Štakori hranjeni HFD uz dodatak 13 cRA pokazali su veći unos hrane u usporedbi sa životinjama koje su konzumirale samo HFD, bez statističke značajnosti ($P = 0,14$). Skupina HFD+15 (13 cRA) pokazuje povećanje perigonadalnog ($P = 0,007$), retroperitonealnog ($P = 0,009$) i visceralnog ($P = 0,007$) masnog tkiva te povećanje ukupne količine masnog tkiva i adipoznog indeksa ($P < 0,001$) u odnosu na STD+15 (13 cRA) (Tablica 5.1.). Razlika u indeksu adipoznosti primijećena je i HFD+7,5 (13 cRA) skupine u odnosu na STD+15 (13 cRA) skupinu ($P = 0,008$) (Tablica 5.1.).

Tablica 5.1. Analiza unosa hrane, vode i adipozni indeks štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

Skupina[a]	**Unos hrane (g/danu)**	**Unos tekućine (mL/danu)**	**Perigonadalno masno tkivo (% TM)**	**Retroperitonealno masno tkivo (% TM)**	**Visceralno masno tkivo (% TM)**	**Adipozni indeks (%)**
STD-C	21,69 (1,43)	36,03 (1,19)	1,04 (0,15)	1,09 (0,07)	0,99 (0,11)	3,12 (0,03)
STD+7,5 (13 cRA)	19,95 (1,38)	35,76 (1,91)	0,81 (0,03)	0,85 (0,06)	0,77 (0,04)	2,43 (0,02)
STD+15 (13 cRA)	16,94 (1,70)	34,92 (1,11)	0,72 (0,01)	0,75 (0,04)	0,68 (0,02)	2,15 (0,02)
HFD-C	18,45 (1,31)	28,99 (1,35)	1,28 (0,05)	1,45 (0,23)	1,39 (0,07)	4,12 (0,05)
HFD+7,5 (13 cRA)	19,73 (2,07)	30,37 (0,85)	1,37 (0,01)	1,55 (0,11)	1,49 (0,03)	4,41 (0,05)
HFD+15 (13 cRA)	21,90 (1,80)	30,02 (0,69)	1,52 (0,02)	1,72 (0,03)	1,65 (0,06)	4,89 (0,06)

[a] Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA) u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Visceralno, perigonadalno i retroperitonealno masno tkivo odstranjeno je tijekom žrtvovanja i izvagano. Adipozni indeks (%) izračunat je korištenjem formule:

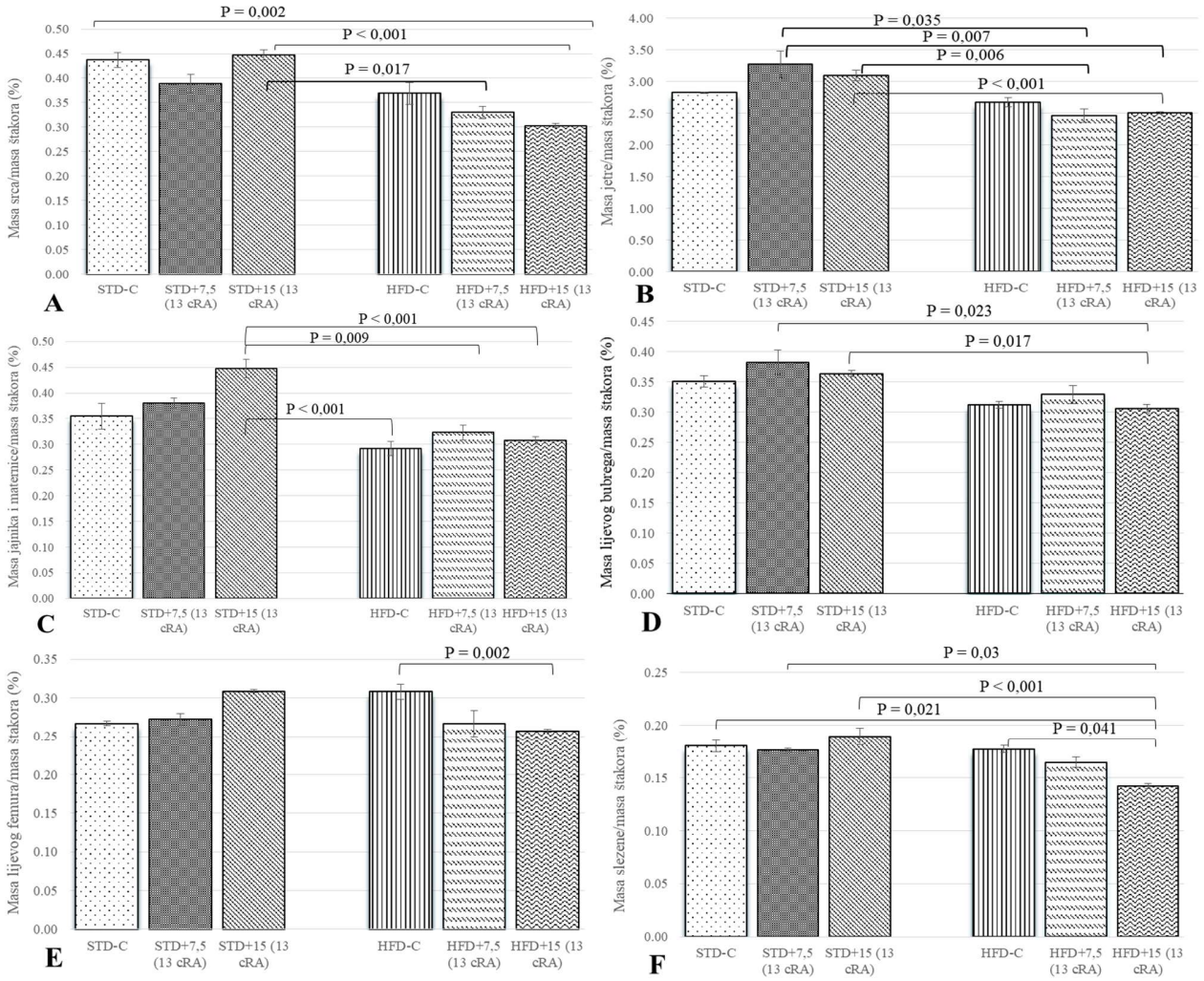
$$Adipozni\ indeks\ (\%) = \frac{[retroperitonealno\ masno\ tkivo\ (g) + visceralno\ masno\ tkivo\ (g) + perigonadalno\ masno\ tkivo\ (g)]}{[tjelesna\ masa\ (g)]} \cdot 100 \quad (2)$$

i izražen u postotku. Broj štakora po skupini: 6. Rezultati su prikazani kao AS (SD).

Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina; TM – tjelesna masa; AS – aritmetička sredina; AS (SD) – aritmetička sredina (standardna devijacija)

5.3. Relativna masa organa

Na Slici 5.2. prikazane su relativne mase pojedinih organa u odnosu na konačnu masu štakora. Na Slici 5(A) vidljivo je statistički značajno smanjenje relativne mase srca u skupini HFD+15 (13 cRA) u odnosu na STD-C (P = 0,002) i u odnosu na STD+15 (13 cRA) (P<0,001). Relativna masa jetre također je smanjena u jedinki na HFD uz dodatak 13 cRA u obje koncentracije (P = 0,035, P =0,007) u odnosu na skupinu STD+7,5 (13 cRA). Relativna masa gonada prikazana je na slici 5.2. (C), te je vidljivo značajno smanjenje mase u HFD+15 (13 cRA) u odnosu na STD+15 (13 cRA) (P<0,001). Najviše vrijednosti relativne mase jajnika i uterusa zabilježene su u skupini STD+15 (13 cRA). Relativna masa lijevog bubrega (Slika 5.2.(D)), lijevog femura (Slika 5.2.(E)) i slezene (Slika 5.2.(F)) najniže su u skupini HFD+15 (13 cRA).



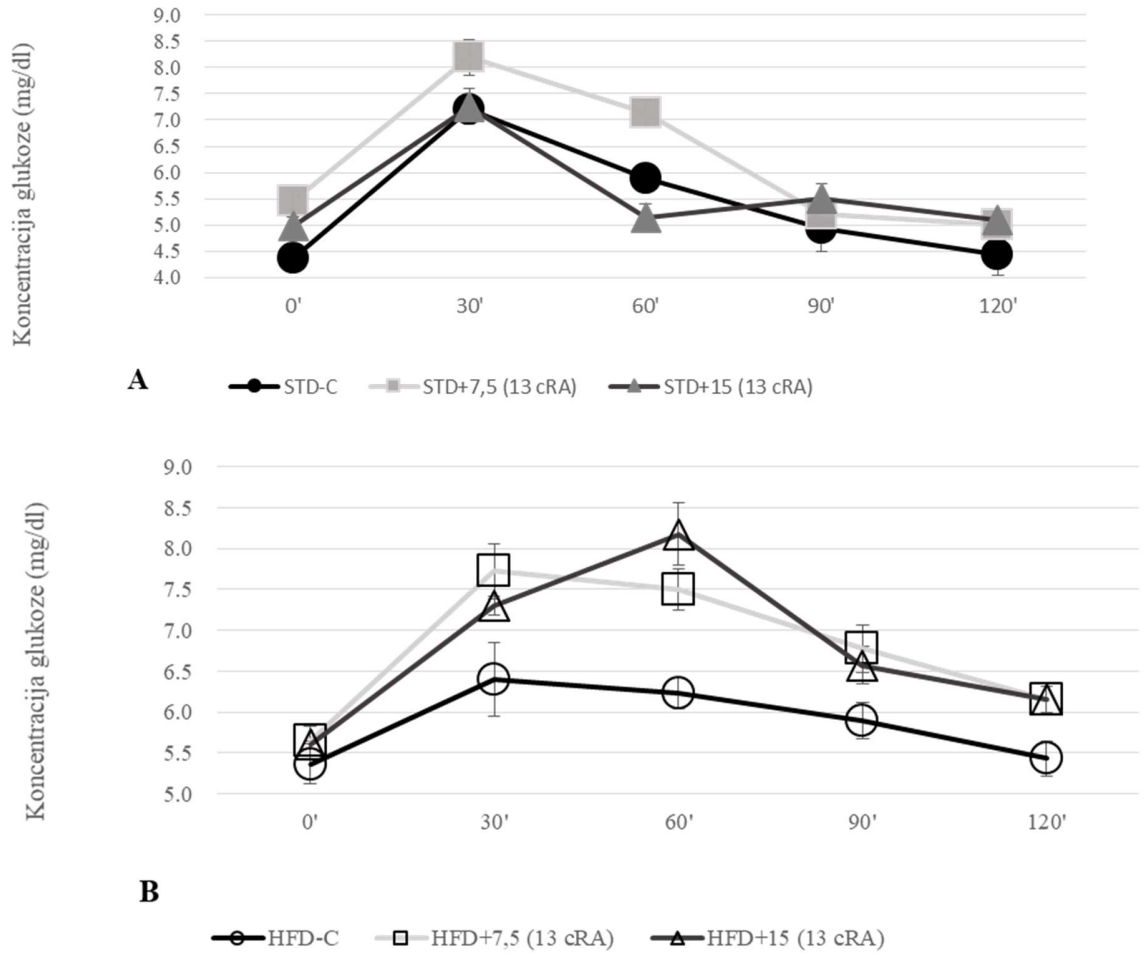
Slika 5.2. Relativna masa pojedinih organa štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Rezultati su prikazani kao AS (SD). Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina; AS – aritmetička sredina; SD - standardna devijacija. A – relativna masa srca; B – relativna masa jetre; C – relativna masa jajnika i maternice; D – relativna masa lijevog bubrega; E – relativna masa lijevog femura; F – relativna masa slezene.

5.4. Oralni test tolerancije glukoze i glikemijske promjene

Mjerenje glukoze u plazmi štakora nakon prekonoćnog gladovanja je široko prihvaćeni dijagnostički kriterij za metabolički sindrom i pretilost te služi kao “zlatni standard" za dijagnozu poremećaja metabolizma glukoze. Oralni test tolerancije glukoze (OGTT, engl. *oral glucose tolerance test*) je najčešće korišteni test za procjenu homeostaze glukoze u glodavaca gdje se gladovanjem štakora preko noći postiže povećanje osjetljivosti na inzulin (175).

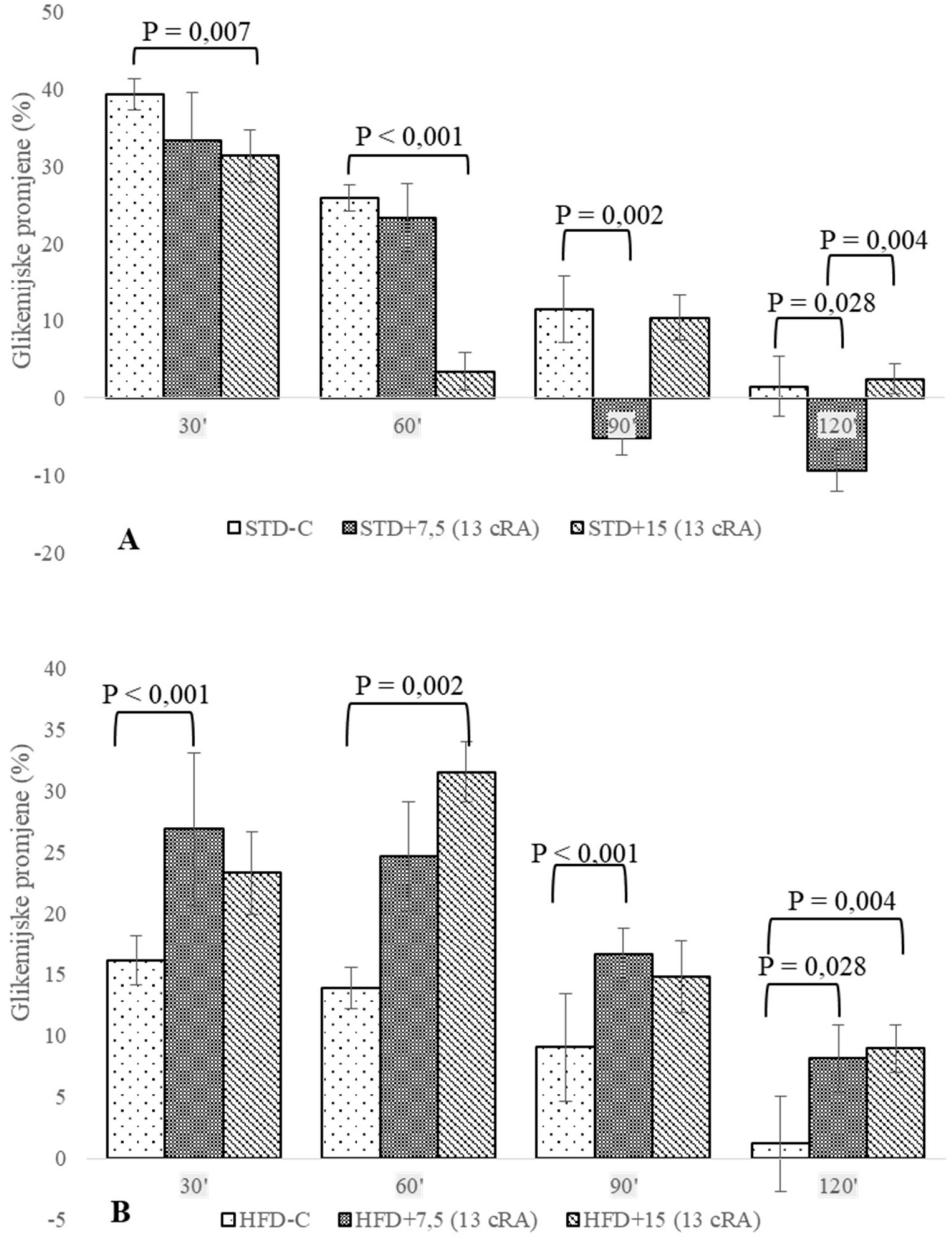
OGTT prikazan je na slici 5.3. (A i B), a glikemijske promjene na slici 5.4. (A i B). Vidljivo je da jedinke hranjene HFD imaju statistički značajno više vrijednosti glukoze u 0′ minuti ($P = 0,014$; $P = 0,002$). Također, jedinke na HFD uz dodatak 13 cRA u obje koncentracije (7,5 mg/kg i 15 mg/kg) u 120′ minuti dosežu više vrijednosti glukoze u odnosu na kontrolnu skupinu ($P = 0,006$; $P= 0,003$).



Slika 5.3. Oralni test tolerancije glukoze štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Rezultati su prikazani kao AS (SD). A – OGTT u jedinki na standarnoj hrani. B – OGTT u jedinki na visokomasnoj hrani. Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; OGTT – oralni test tolerancije glukoze; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina; AS – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija.

Glikemijske promjene u jedinki prikazane su na Slici 5.4. (A i B). Uočljive su niže vrijednosti glukoze u jedinki na STD uz dodatak 13 cRA, za razliku od jedinki na HFD u 90´ i 120´.



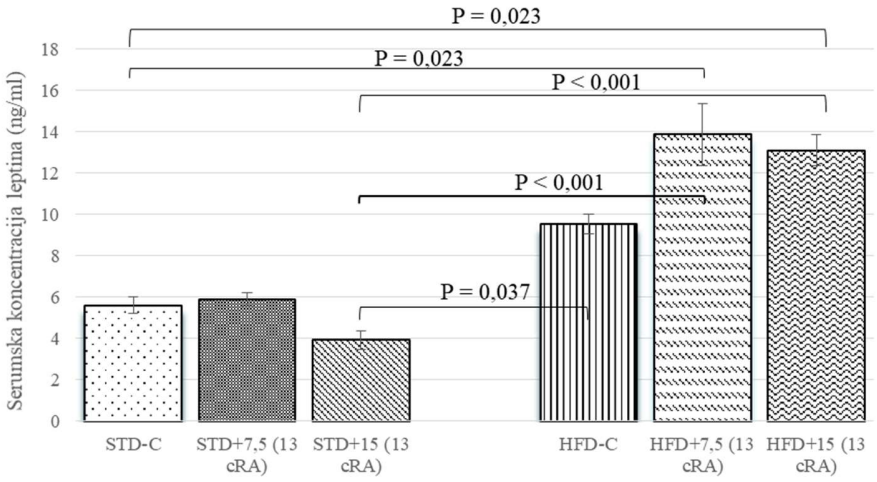
Slika 5.4. Glikemijske promjene štakora hranjenih standardnom (A) i visokomasnom (B) hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Rezultati su prikazani kao AS (SD). Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; OGTT – oralni test tolerancije glukoze; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina; AS – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija.

5.5. Analiza hormona leptina i adiponektina

Pretilost karakterizira povećanje količine masnog tkiva, ne samo kao inertnog rezervoara energije, nego i kao endokrinog organa koji proizvodi različite adipokine poput leptina, adiponektina, adipsina, rezistina i otprilike 50 biološki aktivnih proteina. Adiponektin i leptin su najobilniji peptidi koje izlučuju adipociti i igraju središnju ulogu u bolestima povezanim s pretilošću. Kako bismo razumjeli utječe li HFD samostalno ili u kombinaciji s 13 cRA na kontrolu pretilosti i tjelesne mase, istražili smo razinu leptina i adiponektina i lipidne parametre (TG, ukupnu koncentraciju kolesterola [TC, engl. *total cholesterol*], lipoproteina visoke gustoće [HDL-c, engl. *high density lipoproteins*] i LDL- c).

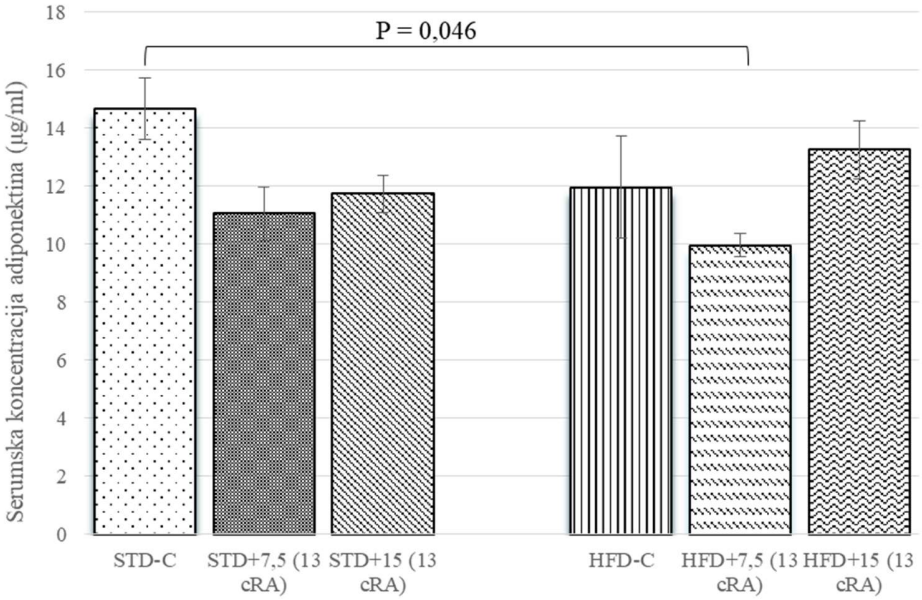
Analizom rezultata leptina u serumu Lewis štakora nakon žrtvovanja zabilježenih u jutarnjim satima (Slika 5.5.) vidljiv je porast koncentracije leptina u jedinki na HFD, kako u kontrolnoj skupini, tako i u skupinama uz dodatak 13 cRA. Statistički značajan porast zabilježen je u skupinama HFD+7,5 (13 cRA) i HFD+15 (13 cRA) u odnosu na STD-C (P = 0,023). Najniže vrijednosti leptina zabilježene su u skupini STD+15 (13 cRA).



Slika 5.5. Serumska koncentracija hormona leptina štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Mjerenja su provedena u jutarnjim satima. Rezultati su prikazani kao AS (SD). Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina; AS – aritmetička sredina; AS (SD) – aritmetička sredina (standardna devijacija).

Serumska vrijednost adiponektina u štakora soja Lewis hranjenih standardnom i visokomasnom hranom, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije prikazana je na Slici 5.6. Najniže vrijednosti adiponektina zabilježene su u skupini HFD+7,5 (13 cRA), što je i statistički značajno u odnosu na STD-C (P = 0,046).



Slika 5.6. Serumska koncentracija hormona adiponektina štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Mjerenja su provedena u jutarnjim satima. Rezultati su prikazani kao AS (SD). Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina; AS (SD) – aritmetička sredina (standardna devijacija).

5.6. Lipidogram

Najznačajniji čimbenik koji pridonosi dislipidemiji povezanoj s pretilosti je nekontrolirano oslobađanje FFA iz masnog tkiva, osobito visceralnog masnog tkiva, pomoću lipolize, što uzrokuje povećano nakupljanje masnih kiselina u jetri i sintezu lipoproteina vrlo niske gustoće, dok hipertrigliceridemija može biti glavni uzrok ostale dislipidemije što vodi odgođenom uklanjanju lipoproteina bogatih trigliceridima i stvaranja LDL-a. Koncentracije TC, TG, HDL-c i LDL-c u

serumu analizirane su kako bi se utvrdio dislipidemijski učinak 13 cRA kod štakora hranjenih STD ili HFD. Lipidogram je prikazan u Tablici 5.2. i 5.3. Vidljiv je statistički značajan porast koncentracije LDL-a u jedniki na STD, u ovisnosti o primjeni 13 cRA ($P = 0,008$; $P = 0,021$). Koncentracija HDL-c se smanjuje u ovisnosti o primjeni 13 cRA i u jedinki na visokomasnoj hrani, uz zabilježenu statistički značajnu razliku u STD+7,5 (13 cRA) i STD+15 (13 cRA) u odnosu na STD-C ($P = 0,015$; $P < 0,001$). Vrijednosti TC povećale su se u jedniki na HFD, kao i vrijednosti TG, sa statistički značajnom razlikom u HFD+15 (13 cRA) u odnosu na STD-C ($P < 0,001$). Vrijednosti VLDL-c rasle su u ovisnosti o primjeni 13 cRA u jedinki na STD, kao u i jedinki na HFD, uz zabilježenu statistički značajnu razliku u skupinama HFD+7,5 (13 cRA) ($P = 0,023$) i HFD+15 (13 cRA) ($P = 0,007$) u odnosu na STD-C.

Tablica 5.2. Analiza lipida (kolesterola, triglicerida, lipoproteina visoke gustoće) u krvi štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

	LIPIDOGRAM (AS (SD))			
	Skupina[a]	**AS (SD)**	**P***	**P****
TC (mmol/L)	**STD-C**	1,33 (0,02)	-	0,165
	STD+7,5 (13 cRA)	1,27 (0,04)	1	**0,002**
	STD+15 (13 cRA)	1,31 (0,04)	1	**0,008**
	HFD-C	1,51 (0,03)	0,166	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	1,45 (0,04)	1	1
	HFD+15 (13 cRA)	1,57 (0,08)	**0,025**	1
TG (mmol/L)	**STD-C**	0,81 (0,02)	-	1
	STD+7,5 (13 cRA)	1,12 (0,06)	1	1
	STD+15 (13 cRA)	0,53 (0,03)	1	0,458
	HFD-C	1,04 (0,11)	1	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	1,41 (0,05)	0,620	1
	HFD+15 (13 cRA)	1,91 (0,03)	**< 0,001**	0,045
HDL-c (mmol/L)	**STD-C**	0,49 (0,11)	-	0,145
	STD+7,5 (13 cRA)	0,28 (0,01)	0,150	1
	STD+15 (13 cRA)	0,22 (0,03)	**< 0,001**	0,569
	HFD-C	0,31 (0,07)	0,145	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	0,38 (0,05)	1	1
	HFD+15 (13 cRA)	0,38 (0,05)	1	1

Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Rezultati su prikazani kao AS (SD). P^{*} – statistički značajna razlika u odnosu na STD-C; P^{**} - statistički značajna razlika u odnosu na HFD-C. Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina; AS – aritmetička sredina; AS (SD) – aritmetička sredina (standardna devijacija), TC – ukupni kolesterol ; TG – trigliceridi ; HDL-c – serumska koncentracija lipoproteina visoke gustoće

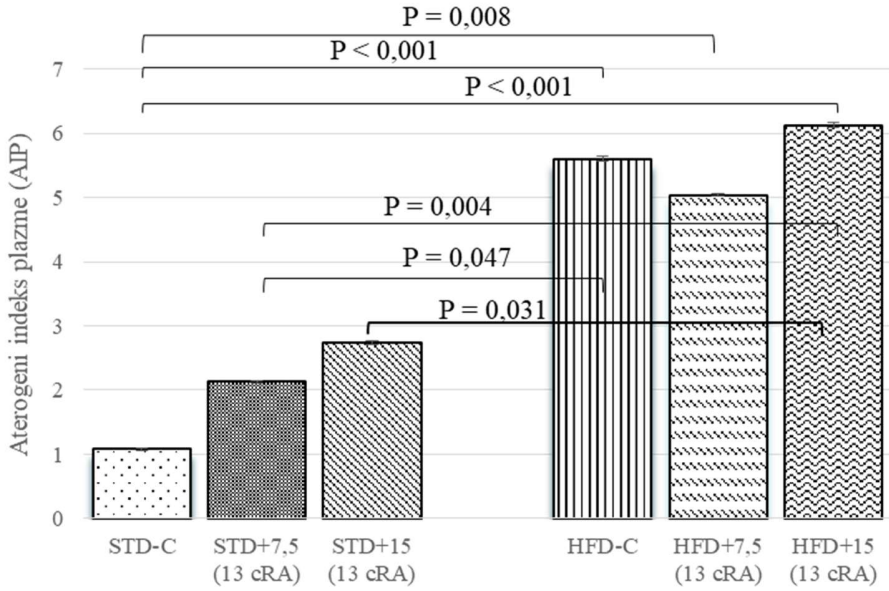
Tablica 5.3. Analiza lipida (lipoproteina niske gustoće i lipoproteina vrlo niske gustoće) u krvi štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

	LIPIDOGRAM (AS (SD))			
	Skupina[a]	**AS (SD)**	**P***	**P****
LDL-c (mmol/L)	**STD-C**	0,50 (0,09)	-	0,126
	STD+7,5 (13 cRA)	1 (0,24)	**0,008**	1
	STD+15 (13 cRA)	0,85 (0,12)	**0,021**	1
	HFD-C	0,80 (0,09)	0,126	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	0,59 (0,08)	1	0,624
	HFD+15 (13 cRA)	0,40 (0,17)	1	**0,017**
VLDL-c (mmol/L)	**STD-C**	0,10 (0,01)	-	0,574
	STD+7,5 (13 cRA)	0,16 (0,01)	1	0,723
	STD+15 (13 cRA)	0,20 (0,03)	0,650	1
	HFD-C	0,22 (0,02)	0,790	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	0,28 (0,01)	**0,023**	1
	HFD+15 (13 cRA)	0,38 (0,05)	**0,007**	1

Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Rezultati su prikazani kao AS (SD). P* – statistički značajna razlika u odnosu na STD-C; P** - statistički značajna razlika u odnosu na HFD-C Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina; AS – aritmetička sredina; AS (SD) – aritmetička sredina (standardna devijacija); LDL-c – serumska koncentracija lipoproteina niske gustoće; VLDL-c - serumska koncentracija lipoproteina vrlo niske gustoće.

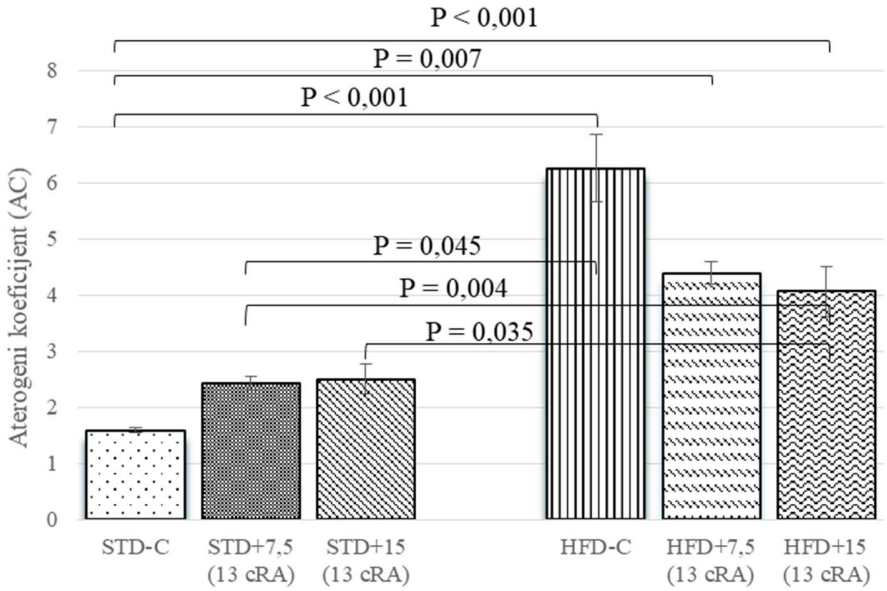
5.7. Aterogeni pokazatelji

Pretilost je povezana s povećanim rizikom od koronarne srčane bolesti, dijelom i zbog jake povezanosti s aterogenom dislipidemijom, koju karakteriziraju visoke vrijednosti TG i niski HDL. Analizom rezultata AIP, AC i CRR prikazanih na Slici 5.7., 5.8., 5.9. vidljiv je statistički značajan porast vrijednosti navedenih parametara u skupina na HFD i uz dodatak 13 cRA, uz zabilježeno statistički značajno povećanje u STD+7,5 (13 cRA), HFD+7,5 (13 cRA) i HFD+15 (13 cRA) u odnosu na kontrolnu skupinu STD-C.



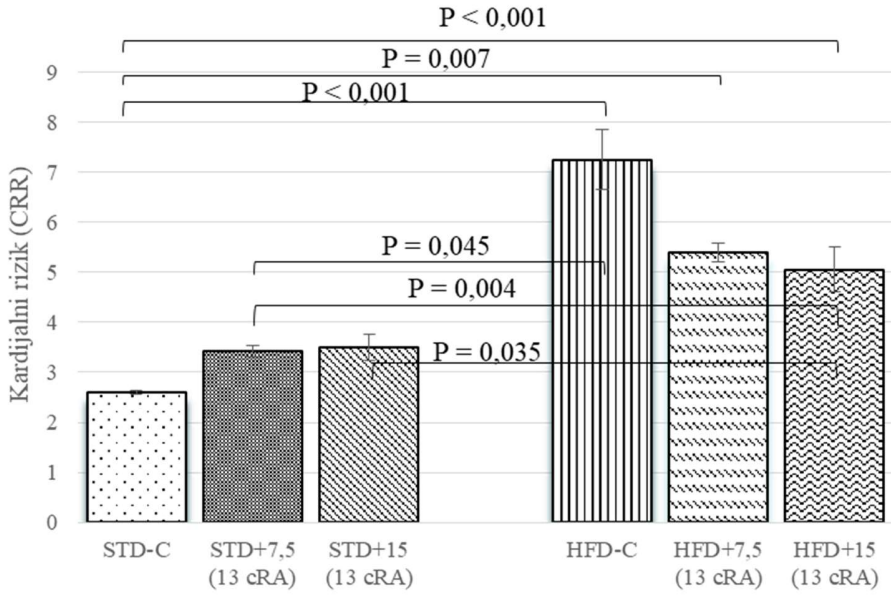
Slika 5.7. Aterogeni indeks štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Rezultati su prikazani kao AS (SD). Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina; AIP – aterogeni indeks; AS – aritmetička sredina; AS (SD) – aritmetička sredina (standardna devijacija).



Slika 5.8. Aterogeni koeficijent štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

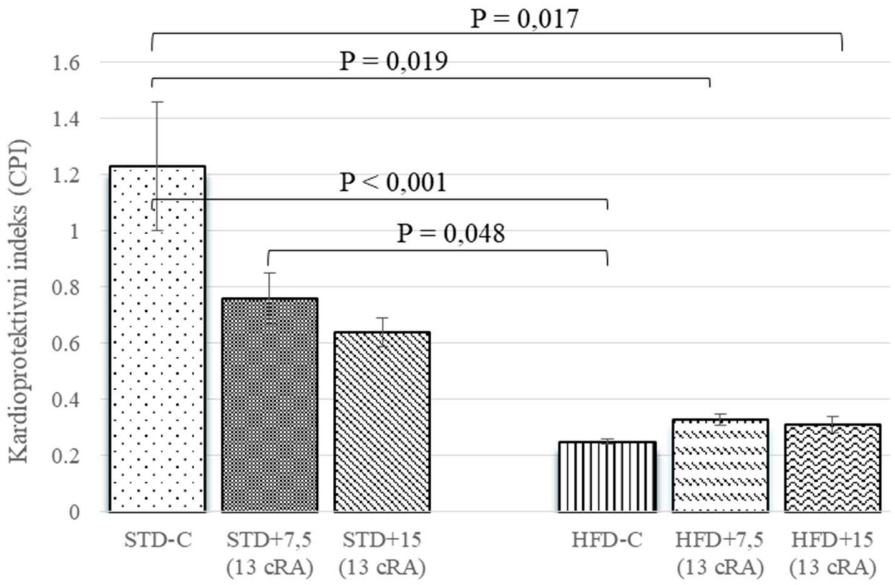
Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Rezultati su prikazani kao AS (SD). Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina; AS – aritmetička sredina; AC – aterogeni koeficijent; AS (SD) – aritmetička sredina (standardna devijacija).



Slika 5.9. Kardijalni rizik štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Rezultati su prikazani kao AS (SD). Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina; CRR – kardijalni rizik; AS – aritmetička sredina; AC – aterogeni koeficijent; AS (SD) – aritemetička sredina (standardna devijacija).

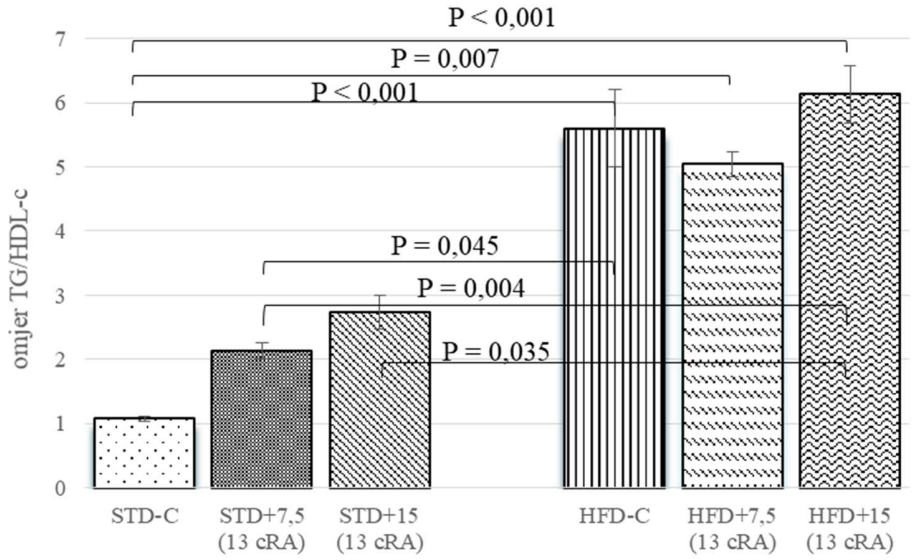
Vrijednosti CPI prikazane su na Slici 5.10. Zapaženo je statistički značajno smanjenje CPI u skupinama HFD-C ($P < 0,001$), HFD+7,5 (13 cRA) ($P = 0,019$) i HFD+15 (13 cRA) ($P = 0,017$) u odnosu na kontrolnu skupinu STD-C.



Slika 5.10. Kardioprotektivni indeks štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Rezultati su prikazani kao AS (SD). Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina; CPI – kardioprotektivni indeks; AS – aritmetička sredina; AS (SD) – aritmetička sredina (standardna devijacija).

Omjer TG/HDL-c koristi se kao surogatni pokazatelj inzulinske rezistencije gdje prema najnovijoj literaturi (176) omjer TG/HDL-C može biti pokazatelj kardio-metaboličkog rizika i kardiovaskularnih bolesti. Koristi se i kao parametar u hipertenzivnih ispitanika (177), prediktor kontrole glikemije u jedinki normalne tjelesne mase, ali i kod prekomjerne mase i pretilih bolesnika i životinja. Podaci omjera TG/HDL-c prikazani su na Slici 5.11. gdje je zabilježen najveći omjer navedenih parametara u jedinki na HFD, kako u kontrolnoj, tako i onim skupinama kojima je dodana 13 cRA u obje koncentracije, sa statistički značajnom razlikom u odnosu na STD-C ($P < 0,001$). U skupini HFD+15 (13 cRA) statistička je značajnost zabilježena i u odnosu na STD+7,5 (13 cRA) ($P = 0,004$) i STD+15 (13 cRA) ($P = 0,035$).



Slika 5.11. Omjer TG/HDL-c u štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Rezultati su prikazani kao AS (SD). Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina; TG – trigliceridi; HDL-c – lipoproteinini visoke gustoće; AS – aritmetička sredina; AS (SD) – aritmetička sredina (standardna devijacija).

5.8. Analiza upalnih citokina

Za masno je tkivo karakteristična infiltracija nekoliko vrsta stanica imunološkog sustava, poput monocita, neutrofila, Th1 i Th17 limfocita i M1 (protuupalnih) makrofaga čiji udio u pretilosti može biti i do 40 % (74). Pojačano izlučivanje FFA, zasićenih masnih kiselina i oksidiranih LDL-c te LPS-a promjenom crijevne mikroflore aktivira mirujuće makrofage i adipocite što može pojačati izlučivanje proupalnih citokina i kemokina.

U Tablicama 5.4., 5.5., i 5.6. prikazane su vrijednosti citokina koji sudjeluju u upalnom odgovoru. Za istaknuti je porast serumske koncentracije IL-6, IL-1β, IFN-γ u jedinki na visokomasnoj hrani, kako u kontrolnoj tako i u skupinama kojima je dodana 13 cRA u obje koncentracije. U istim se skupinama bilježi porast IL-10 koji pripada Th2 upalnom odgovoru.

Tablica 5.4. Serumska analiza upalnih citokina (interleukin 1α, interleukin 1ß**,** interleukin 2, interleukin 4) štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

CITOKINI	Skupina[a]	AS (SD)	P*	P**
IL-1α (pg/mL)	**STD-C**	0,16 (0,02)	-	1
	STD+7,5 (13 cRA)	0,26 (0,002)	1	0,246
	STD+15 (13 cRA)	0,20 (0,002)	1	**1**
	HFD-C	0,11 (0,012)	1	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	0,10 (0,002)	1	1
	HFD+15 (13 cRA)	0,11 (0,005)	1	1
IL-1ß (pg/mL)	**STD-C**	0,12 (0,012)	-	0,682
	STD+7,5 (13 cRA)	0,08 (0,001)	1	0,077
	STD+15 (13 cRA)	0,07 (0,002)	1	**0,005**
	HFD-C	0,26 (0,005)	0,682	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	0,26 (0,03)	1	1
	HFD+15 (13 cRA)	0,25 (0,002)	1	1
IL-2 (pg/mL)	**STD-C**	0,12 (0,003)	-	0,104
	STD+7,5 (13 cRA)	0,08 (0,002)	1	1
	STD+15 (13 cRA)	0,08 (0,001)	1	1
	HFD-C	0,02 (0,001)	0,104	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	0,02 (0,002)	**0,021**	1
	HFD+15 (13 cRA)	0,02 (0,002)	**0,003**	1
IL-4 (pg/mL)	**STD-C**	0,10 (0,004)	-	0,077
	STD+7,5 (13 cRA)	0,04 (0,008)	1	0,861
	STD+15 (13 cRA)	0,03 (0,002)	1	1
	HFD-C	0,01 (0,001)	0,077	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	0,01 (0,002)	0,056	1
	HFD+15 (13 cRA)	0,01 (0,001)	**0,001**	1

Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Rezultati su prikazani kao AS (SD). P^{*} – statistički značajna razlika u odnosu na STD-C; P^{**} - statistički značajna razlika u odnosu na HFD-C Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina; IL-1α interleukin 1 alfa; IL-1β interleukin 1 beta; IL-2 – interleukin 2, IL-4 – interleukin 4, AS – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija.

Tablica 5.5. Serumska analiza upalnih citokina (interleukin 6, interleukin 10**,** interleukin 12, interleukin 13) štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

CITOKINI	Skupina[a]	AS (SD)	P*	P**
IL-6 (pg/mL)	**STD-C**	0,15 (0,003)	-	1
	STD+7,5 (13 cRA)	0,10 (0,006)	1	0,140
	STD+15 (13 cRA)	0,10 (0,002)	1	0,417
	HFD-C	0,41 (0,049)	1	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	0,41 (0,023)	1	1
	HFD+15 (13 cRA)	0,57 (0,055)	0,246	1
IL-10 (pg/mL)	**STD-C**	0,33 (0,005)	-	0,683
	STD+7,5 (13 cRA)	0,30 (0,002)	1	0,077
	STD+15 (13 cRA)	0,25 (0,001)	1	**0,005**
	HFD-C	0,38 (0,024)	0,683	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	0,37 (0,001)	0,683	1
	HFD+15 (13 cRA)	0,36 (0,001)	1	1
IL-12 (pg/mL)	**STD-C**	0,10 (0,003)	-	1
	STD+7,5 (13 cRA)	0,07 (0,001)	0,077	1
	STD+15 (13 cRA)	0,04 (0,004)	**< 0,001**	0,140
	HFD-C	0,08 (0,004)	1	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	0,08 (0,005)	1	1
	HFD+15 (13 cRA)	0,07 (0,006)	0,077	1
IL-13 (pg/mL)	**STD-C**	0,08 (0,012)	-	1
	STD+7,5 (13 cRA)	0,07 (0,008)	0,683	1
	STD+15 (13 cRA)	0,03 (0,001)	**< 0,001**	0,417
	HFD-C	0,07 (0,002)	1	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	0,07 (0,003)	0,683	1
	HFD+15 (13 cRA)	0,07 (0,005)	0,417	1

Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Rezultati su prikazani kao AS (SD). P^{*} – statistički značajna razlika u odnosu na STD-C; P^{**} - statistički značajna razlika u odnosu na HFD-C; IL (6, 10, 12, 13) – interleukin (6, 10, 12, 13); AS – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija.

Tablica 5.6. Serumska analiza upalnih citokina (interferon γ, čimbenik tumorske nekroze α, čimbenik stimulacije granulocitno–makrofagnih kolonija) štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

CITOKINI	Skupina[a]	AS (SD)	P*	P**
IFN-γ (pg/mL)	**STD-C**	0,12 (0,003)	-	0,417
	STD+7,5 (13 cRA)	0,07 (0,003)	1	0,041
	STD+15 (13 cRA)	0,04 (0,003)	1	**0,002**
	HFD-C	0,29 (0,024)	0,417	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	0,28 (0,012)	1	1
	HFD+15 (13 cRA)	0,25 (0,01)	1	1
TNF-α (pg/mL)	**STD-C**	0,27 (0,023)	-	0,077
	STD+7,5 (13 cRA)	0,14 (0,002)	1	0,683
	STD+15 (13 cRA)	0,11 (0,002)	1	1
	HFD-C	0,06 (0,011)	0,077	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	0,07 (0,002)	0,077	1
	HFD+15 (13 cRA)	0,05 (0,001)	**< 0,001**	1
GM-CSF (pg/mL)	**STD-C**	0,13 (0,003)	-	0,139
	STD+7,5 (13 cRA)	0,23 (0,016)	1	0,139
	STD+15 (13 cRA)	0,07 (0,009)	1	1
	HFD-C	0,02 (0,006)	0,139	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	0,03 (0,002)	0,417	1
	HFD+15 (13 cRA)	0,01 (0,002)	**0,004**	1

Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Rezultati su prikazani kao AS (SD). P^{*} – statistički značajna razlika u odnosu na STD-C; P^{**} - statistički značajna razlika u odnosu na HFD-C. IFN-γ – interferon gama; GM-CSF - čimbenik stimulacije granulocitno–makrofagnih kolonija; AS – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija.

5.9. Analiza aktivnosti dušikovog oksida

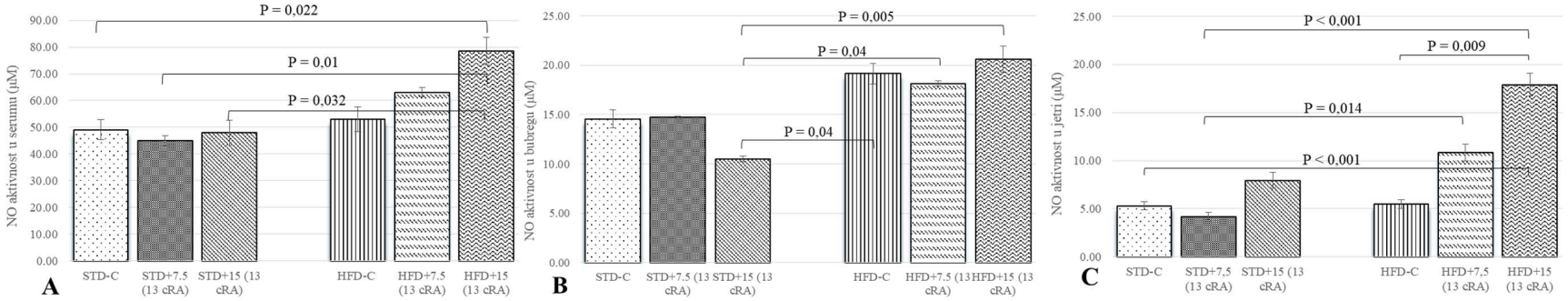
NO može biti važan pokazatelj upale, oksidacijskog stresa, ali i polarizacije makrofaga u M1 fenotip dok prema Fujita i sur. (178) mjerenje razine metabolita NO (nitrata/nitrita) u serumu može

biti jednostavna, sigurna, prikladna i pouzdana metoda za procjenu nakupljanja visceralne masti u kliničkom dijagnostičkom pregledu.

Na Slici 5.12. (A) vidljiv je porast serumske aktivnosti NO u jedinki na HFD uz dodatak 13 cRA, sa zabilježenom statistički značajnom razlikom u skupini HFD+15 (13 cRA) u odnosu na STD-C, STD+7,5 (13 cRA) i STD+15 (13 cRA) ($P = 0,022$; $P = 0,01$; $P = 0,032$).

Na Slici 5.12. (B) vidljiv je porast bubrežne aktivnosti NO u jedinki na HFD uz dodatak 13 cRA, sa zabilježenom statistički značajnom razlikom u skupini HFD+15 (13 cRA) u odnosu na STD+15 (13 cRA) ($P = 0.005$). Najniže vrijednosti aktivnosti NO u tkivu bubrega zabilježene su u skupini STD+15 (13 cRA).

Na Slici 5.12. (C) vidljiv je porast aktivnosti NO u jedinki na HFD uz dodatak 13 cRA, sa zabilježenom statistički značajnom razlikom u skupini HFD+7,5 (13 cRA) u odnosu na STD+7,5 (13 cRA) ($P = 0,014$) i HFD+15 (13 cRA) u odnosu na STD-C ($P < 0,001$), HFD-C ($P = 0,009$) i STD+7,5 (13 cRA) ($P < 0,001$). Najniže vrijednosti aktivnosti NO u tkivu jetre zabilježene su u skupini STD+7,5 (13 cRA).



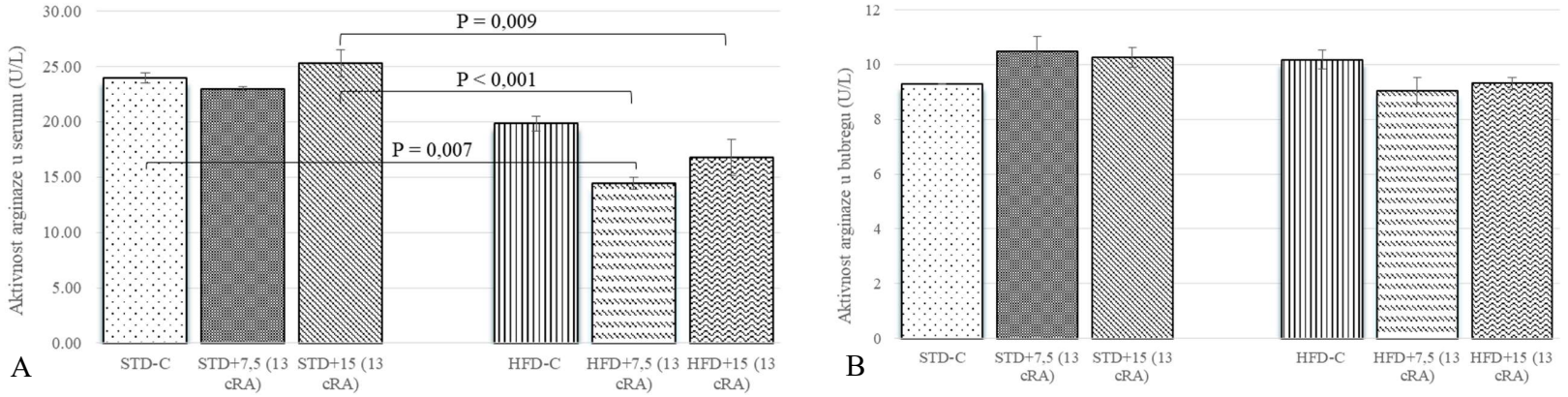
Slika 5.12. Aktivnost NO u serumu (A), bubregu (B) i jetri (C) štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Rezultati su prikazani kao AS (SD). Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina; NO – dušik oksid; AS – aritmetička sredina; AS (SD) – aritmetička sredina (standardna devijacija).

5.10. Analiza aktivnosti arginaze

Analizom serumske koncentracije arginaze (Slika 5.13 (A)) utvrđeno je smanjenje vrijednosti iste u jedinki na HFD, uz statistički značajnu razliku u skupinama HFD+7,5 (13 cRA) u odnosu na STD-C ($P = 0,007$). Vrijednosti arginaze u skupini STD+15 (13 cRA) su povišene i u odnosu na HFD+7,5 (13 cRA) ($P < 0,001$).

Analizom bubrežne aktivnosti arginaze (Slika 5.13. (B)) utvrđeno je blago smanjenje vrijednosti iste u jedinki na HFD, bez zabilježene statistički značajne razlike.



Slika 5.13. Aktivnost arginaze u serumu (A) i bubregu (B) štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Rezultati su prikazani kao AS (SD. Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina; AS – aritmetička sredina; AS (SD) – aritmetička sredina (standardna devijacija).

5.11. Hematološka analiza krvi

Značajka je pretilosti proupalno stanje te oslobađanje brojnih posrednika upale od strane masnog tkiva koji su odgovorni za metabolički sindrom povezan s pretilošću. Ti posrednici mogu izazvati značajne promjene u hematološkim parametrima povezanim s upalom. Temeljem toga istražili smo povezanost između pretilosti i broja leukocita kao prediktora metaboličkog sindroma u pretilih štakora. Nakon 60 dana obrade štakora STD i HFD, te 13 cRA u dvije različite koncentracije, jedinkama je analizirana krv. Ispitani su parametri: Hgb, H, MCV, MCH, MCHC, RDW, ukupni leukociti te diferencijalna krvna slika (neutrofili i limfocti).

U Tablici 5.7. vidljivo je da se broj eritrocita, Hbg, H, MCV, MCH, MCHC i RDW-a nije značajnije mijenjao među skupinama, ovisno o načinu hranjenja životinja i primjeni 13 cRA.

Tablica 5.7. Analiza hematoloških pokazatelja (broj eritrocita, hemoglobin, hematokrit, indeksi eritrocita) u krvi štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

	HEMATOLOŠKI PARAMETRI (AS (SD))						
Skupina[a]	**Eritrociti ($\bullet 10^{12}$/L)**	**Hbg (g/L)**	**H (%)**	**MCV (fL)**	**MCH (pg)**	**MCHC (g/L)**	**RDW (%)**
STD-C	7,82 (0,65)	150,33 (9)	41,33 (3,14)	52,00 (1,15)	19,00 (1,15)	362,50 (7,51)	13,50 (0,58)
STD+7,5 (13 cRA)	7,25 (0,13)	141,50 (0,58)	38,50 (0,58)	53,25 (0,96)	19,25 (0,96)	363,00 (1,15)	13,75 (0,96)
STD+15 (13 cRA)	7,25 (0,22)	141,33 (2,25)	38,33 (1,37)	52,83 (0,75)	19,33 (0,82)	361,00 (9,47)	13,67 (0,82)
HFD-C	7,88 (0,22)	156,67 (6,25)	42,00 (1,1)	51,67 (1,37)	19,17 (0,75)	362,67 (13,43)	14,00 (0,89)
HFD+7,5 (13 cRA)	7,67 (0,58)	150,00 (7,8)	40,67 (3,14)	53,17 (0,75)	19,00 (0,89)	370,67 (10,17)	13,67 (0,82)
HFD+15 (13 cRA)	7,60 (0,09)	152,00 (1,79)	41,00 (0,89)	52,67 (0,82)	18,83 (0,75)	356,00 (6,26)	13,67 (0,82)

[a] Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Rezultati su prikazani kao AS (SD). Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina; MCV - prosječni volume eritrocita, MCH - prosječna količina hemoglobina u eritrocitima, MCHC - prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima, RDW - raspodjela eritrocita prema veličini; AS – aritmetička sredina; AS (SD) – aritmetička sredina (standardna devijacija)

U Tablici 5.8. vidljivo je povećanje broja trombocita u ovisnosti o primjeni 13 cRA kod jedinki na STD, bez zabilježene statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu. HFD također uzrokuje porast broja trombocita, bez statistički značajne razlike, a primjena 13 cRA u dozi u jedinki na HFD dovodi do pada broja trombocita, što je statistički značajno u odnosu na HFD-C ($P = 0,009$; $P = 0,007$).

U Tablici 5.8. također, jasno je istaknuta leukocitoza i neutrofilija u odnosu na kontrolnu skupinu u jedinki na HFD, izraženije uz povećanje doze primjenjene 13 cRA. Statistički značajna neutrofilija zabilježena je u skupini HFD+15 (13 cRA) u odnosu na STD-C ($P = 0,034$). Broj limfocita nije se značajnije mijenjao po skupinama.

Tablica 5.8. Analiza hematoloških pokazatelja (trombocita, leukocita i diferencijalne krvne slike) u krvi štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

	HEMATOLOŠKI PARAMETRI (AS (SD))				
Skupina[a]	**Trombociti (• 10^9/L)**	**MPV (fL)**	**Leukociti (• 10^9/L)**	**Neutrofili (%)**	**Limfociti (%)**
STD-C	582,00 (41,57)	8,00 (0,82)	6,13 (0,14)	19,33 (6,71)	70,67 (14,76)
STD+7,5 (13 cRA)	624,50 (8,66)	8,25 (1,26)	6,00 (0,14)	18,50 (7,51)	79,50 (8,66)
STD+15 (13 cRA)	693,00 (45,15)	8,83 (0,98)	6,00 (0,09)	14,00 (5,87)	86,00 (5,87)
HFD-C	674,33 (9,4)	9,67 (1,86)	7,48 (0,5)	25,00 (3,9)	74,00 (3,22)
HFD+7,5 (13 cRA)	563,33 (42,49)	8,00 (0,89)	7,60 (0,48)	25,00 (3,22)	74,67 (3,39)
HFD+15 (13 cRA)	568,00 (14,39)	8,50 (0,55)	7,82 (0,3)	36,33 (7,23)	77,33 (6,71)

[a] Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Rezultati su prikazani kao AS (SD). Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina; MPV – prosječan volumen trombocita; AS – aritmetička sredina; AS (SD) – aritmetička sredina (standardna devijacija)

5.12. Biokemijska analiza krvi

Biokemijska analiza seruma iz krvi štakora pokazala je značajne razlike u koncentraciji enzima i proteina između životinja s različitim tretmanom (Tablica 5.9. i Tablica 5.10.). Vidljivo je smanjenje koncentracije ALB u jedinki kojima je dodana 13 cRA, kako na STD, tako i na HFD, a statistički značajna razlika uočena je u STD+7,5 (13 cRA) i STD+15 (13 cRA) u odnosu na STD-C ($P = 0,003$; $P = 0,002$), te u skupinama STD+7,5 (13 cRA) i STD+15 (13 cRA) u odnosu na HFD-C ($P = 0,039$; $P = 0,027$). Vrijednosti ALP nisu pokazale statistički značajne razlike među skupinama, ali je vidljiv porast vrijednosti ALP u ovisnosi o primjeni 13 cRA, kako u STD tako i u HFD skupini. Vrijednosti AMY pokazuju statistički značajan porast u HFD+15 (13 cRA) u odnosu na STD-C ($P = 0,005$). TP pokazuju trend pada u ovisnosti o načinu ishrane i primjenjenoj dozi 13 cRA, sa zabilježenom statistički značajnom razlikom u HFD+15 (13 cRA) u odnosu na STD-C ($P = 0,022$). Zabilježen je statistički značajan pad koncentracije globulina u jedinki na HFD uz dodatak 13 cRA u obje koncentracije ($P = 0,022$; $P = 0,032$) u odnosu na kontrolnu skupinu STD-C. Vrijednost enzima ALT povećavala se u ovisnosti o primjeni 13 cRA, kako u standardno hranjenih životinja, tako i u jedinki na HFD, sa zabilježenom statistički značajnom razlikom u skupini STD+15 (13 cRA) ($P < 0,001$) i HFD+15 (13 cRA) ($P = 0,022$) u odnosu na STD-C.

Biokemijska analiza seruma iz krvi štakora koja prikazuje razlike u koncentraciji iona i metabolita između životinja s različitim tretmanom vidljive su u Tablici 5.11. i 5.12. Zabilježen je statistički značajan porast koncentracije Ca^{2+} u skupinama HFD+7,5 (13 cRA) ($P = 0,002$) i HFD+15 (13 cRA) ($P < 0,001$) u odnosu na STD-C. Koncentracija Na^{+} i K^{+} smanjila se u jedinki na HFD, uz statistički značajnu razliku u HFD+7,5 (13 cRA) u odnosu na STD-C ($P = 0,022$) kod koncentracije Na^{+} i u skupini HFD+15 (13 cRA) u odnosu na STD-C ($P < 0,001$) kod koncentracije K^{+}. BUN je statistički značajno smanjen u HFD+7,5 (13 cRA) i HFD+15 (13 cRA) ($P < 0,001$) u odnosu na STD-C. PHOS, CRE i TBIL nisu pokazali statistički značajnu razliku među skupinama.

Tablica 5.9. Analiza biokemijskih pokazatelja (albumini, alkalna fosfataza, amilaza, ukupni proteini) štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

	Skupina[a]	AS (SD)	P*	P**
ALB (g/L)	**STD-C**	53,00 (3,10)	-	1
	STD+7,5 (13 cRA)	45,33 (2,58)	**0,003**	**0,039**
	STD+15 (13 cRA)	44,33 (3,14)	**0,002**	**0,027**
	HFD-C	52,33 (3,72)	1	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	51,00 (1,07)	1	1
	HFD+15 (13 cRA)	51,13 (4,67)	1	1
ALP (U/L)	**STD-C**	181,00 (32,30)	-	1
	STD+7,5 (13 cRA)	204,17 (8,42)	1	0,560
	STD+15 (13 cRA)	210,00 (25,65)	1	0,239
	HFD-C	177,83 (22,68)	1	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	178,75 (3,49)	1	1
	HFD+15 (13 cRA)	204,00 (41,11)	1	1
AMY (U/L)	**STD-C**	576,17 (20,54)	-	0,426
	STD+7,5 (13 cRA)	583,50 (31,43)	1	1
	STD+15 (13 cRA)	613,67 (25,13)	0,728	1
	HFD-C	616,33 (12,60)	0,426	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	634,25 (31,06)	0,066	1
	HFD+15 (13 cRA)	654,25 (28,71)	**0,005**	1
TP (g/L)	**STD-C**	67,00 (5,59)	-	1
	STD+7,5 (13 cRA)	67,83 (1,17)	1	1
	STD+15 (13 cRA)	64,33 (2,58)	1	1
	HFD-C	65,67 (2,73)	1	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	64,75 (1,39)	1	1
	HFD+15 (13 cRA)	59,75 (3,33)	**0,022**	0,092

Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Rezultati su prikazani kao AS (SD). Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina; ALB – albumini; ALP – alkalna fosfataza; AMY – amilaza; TP – ukupni proteini; AS (SD) – aritmetička sredina (standardna devijacija).

Tablica 5.10. Analiza biokemijskih pokazatelja (globulini, alanin aminotransferaza) štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

	Skupina[a]	AS (SD)	P*	P**
GLOB (g/L)	**STD-C**	15,67 (1,86)	-	1
	STD+7,5 (13 cRA)	17,33 (2,25)	1	1
	STD+15 (13 cRA)	18,67 (4,50)	1	0,066
	HFD-C	13,67 (1,86)	1	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	6,50 (1,60)	0,220	1
	HFD+15 (13 cRA)	6,25 (1,39)	**0,032**	1
ALT (U/L)	**STD-C**	32,67 (2,25)	-	1
	STD+7,5 (13 cRA)	37,00 (2,10)	1	1
	STD+15 (13 cRA)	41,33 (1,37)	**< 0,001**	0,066
	HFD-C	35,00 (1,79)	1	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	37,50 (2,88)	1	1
	HFD+15 (13 cRA)	39,75 (2,82)	**0,046**	0,936

Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Rezultati su prikazani kao AS (SD). Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina; GLOB – globulini; ALT – alanin aminotransferaza; AS (SD) – aritmetička sredina (standardna devijacija).

Tablica 5.11. Analiza biokemijskih pokazatelja (ioni) štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

	Skupina[a]	AS (SD)	P*	P**
Ca^{2+} (mmol/L)	**STD-C**	2,41 (0,02)	-	0,728
	STD+7,5 (13 cRA)	2,45 (0,02)	1	1
	STD+15 (13 cRA)	2,52 (0,05)	0,728	1
	HFD-C	2,54 (0,04)	0,728	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	2,57 (0,09)	0,002	0,728
	HFD+15 (13 cRA)	2,82 (0,28)	**< 0,001**	0,320
PHOS (mmol/L)	**STD-C**	1,92 (0,09)	-	1
	STD+7,5 (13 cRA)	1,84 (0,11)	1	1
	STD+15 (13 cRA)	1,79 (0,24)	1	1
	HFD-C	1,94 (0,15)	1	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	1,89 (0,12)	1	1
	HFD+15 (13 cRA)	1,91 (0,14)	1	1
Na^{+} (mmol/L)	**STD-C**	134,00 (1,55)	-	0,066
	STD+7,5 (13 cRA)	134,67 (2,25)	1	0,066
	STD+15 (13 cRA)	132,67 (1,86)	1	1
	HFD-C	131,67 (0,52)	0,066	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	131,25 (0,89)	**0,022**	1
	HFD+15 (13 cRA)	132,00 (1,07)	0,239	1
K^{+} (mmol/L)	**STD-C**	5,43 (0,41)	-	0,369
	STD+7,5 (13 cRA)	4,77 (0,23)	0,827	1
	STD+15 (13 cRA)	4,53 (0,36)	0,066	1
	HFD-C	4,77 (0,49)	0,369	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	4,70 (0,20)	0,176	1
	HFD+15 (13 cRA)	4,40 (0,20)	**< 0,001**	0,277

[a]Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Rezultati su prikazani kao AS (SD). Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina; Ca^{2+} - kalcij; PHOS – fosfati; Na^{+} - natrij, K^{+} - kalij; AS – aritmetička sredina; AS (SD) – aritmetička sredina (standardna devijacija).

Tablica 5.12. Analiza biokemijskih pokazatelja (metaboliti) štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

	Skupina[a]	AS (SD)	P*	P**
CRE (µmol/L)	**STD-C**	32,33 (5,24)	-	1
	STD+7,5 (13 cRA)	37,00 (2,68)	1	0,827
	STD+15 (13 cRA)	39,00 (2,68)	0,277	0,109
	HFD-C	32,33 (4,23)	1	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	35,25 (3,81)	1	1
	HFD+15 (13 cRA)	36,25 (4,62)	1	1
TBIL (µmol/L)	**STD-C**	5,00 (0,01)	-	1
	STD+7,5 (13 cRA)	5,00 (0,01)	1	1
	STD+15 (13 cRA)	5,00 (0,01)	1	1
	HFD-C	5,00 (0,01)	1	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	5,00 (0,01)	1	1
	HFD+15 (13 cRA)	5,50 (0,05)	1	1
BUN (mmol/L)	**STD-C**	5,97 (0,40)	-	1
	STD+7,5 (13 cRA)	5,57 (0,58)	1	1
	STD+15 (13 cRA)	4,70 (0,18)	1	1
	HFD-C	5,40 (1.01)	0,426	-
	HFD+7,5 (13 cRA)	3,95 (0,51)	1	0,128
	HFD+15 (13 cRA)	4,03 (0,35)	**< 0,001**	0,128

[a]Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Rezultati su prikazani kao AS (SD). Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina; CRE – kreatinin; TBIL – ukupni bilirubin; BUN – dušik urea u krvi; AS (SD) – aritmetička sredina (standardna devijacija).

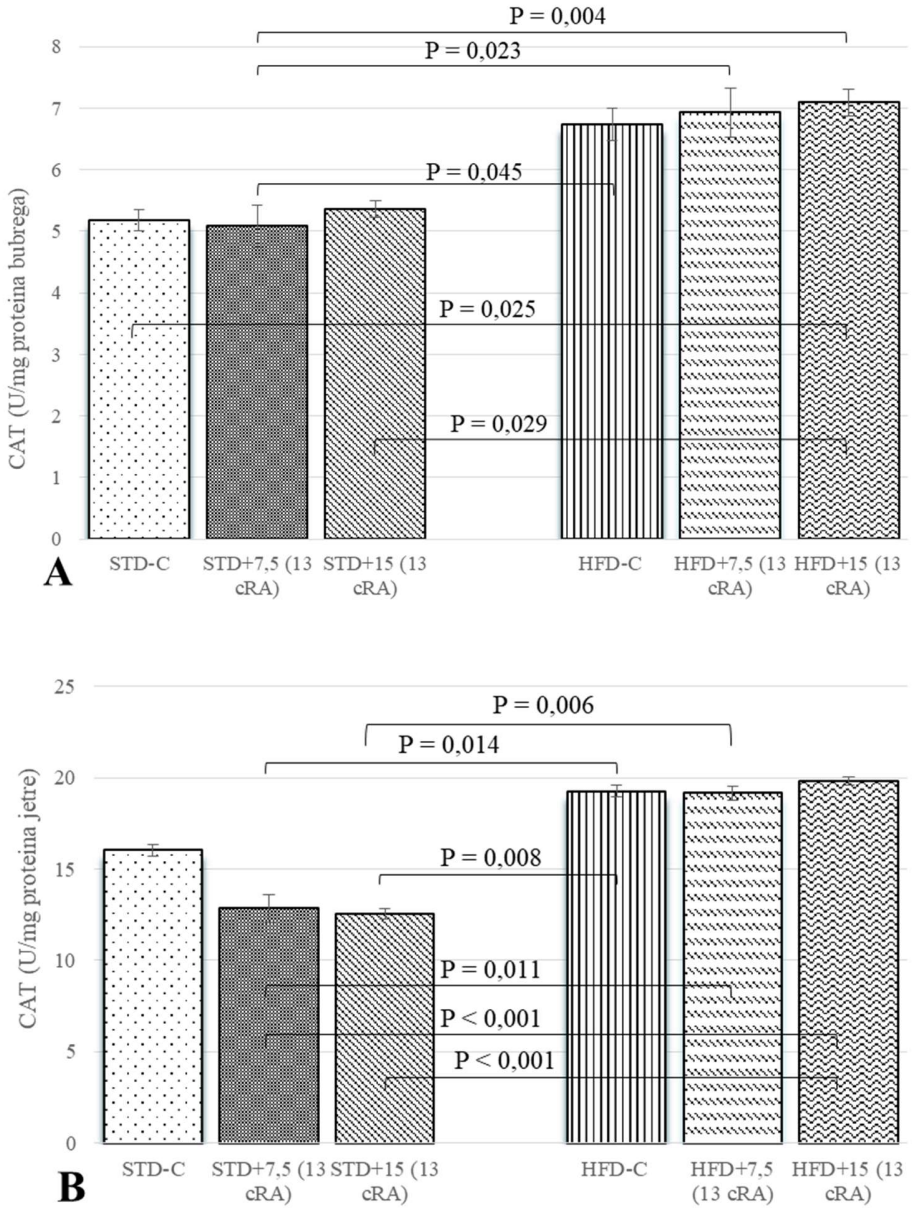
5.13. Parametri oksidacijskog stresa

5.13.1. Mjerenje aktivnosti katalaze u uzorcima tkiva bubrega i jetre

Nepravilna proizvodnja adipokina kod pretilosti inducira proizvodnju ROS-a, ali veza između promjena u razini adipokina i oksidacijskog stresa ostaje nejasna. Kako bismo istražili odnos između razine adipokina u krvi i biljega oksidacijskog stresa, istraživali smo učinak 13 cRA na biljege oksidacijskog stresa bubrega i jetre kod štakora hranjenih STD ili HFD.

Analizom rezultata CAT u tkivu bubrega (Slika 5.14 (A)) vidljiv je porast koncentracije iste u jedinki na HFD, uz statistički značajnu razliku u skupinama HFD+7,5 (13 cRA) i HFD+15 (13 cRA) u odnosu na STD+7,5 (13 cRA) ($P = 0,023$; $P = 0,004$). Vrijednosti katalaze u skupini HFD+15 (13 cRA) statistički su povišene i u odnosu na STD-C ($P = 0,025$) i STD+15 (13 cRA) ($P = 0,029$).

Analizom rezultata CAT u tkivu jetre (Slika 5.14 (B)) vidljiv je porast koncentracije iste u jedinki na HFD, uz statistički značajnu razliku u skupinama HFD+7,5 (13 cRA) i HFD+15 (13 cRA) u odnosu na STD+7,5 (13 cRA) ($P = 0,011$; $P < 0,001$). Vrijednosti CAT u skupini HFD+15 (13 cRA) statistički su povišene i u odnosu na STD+15 (13 cRA) ($P < 0,001$).



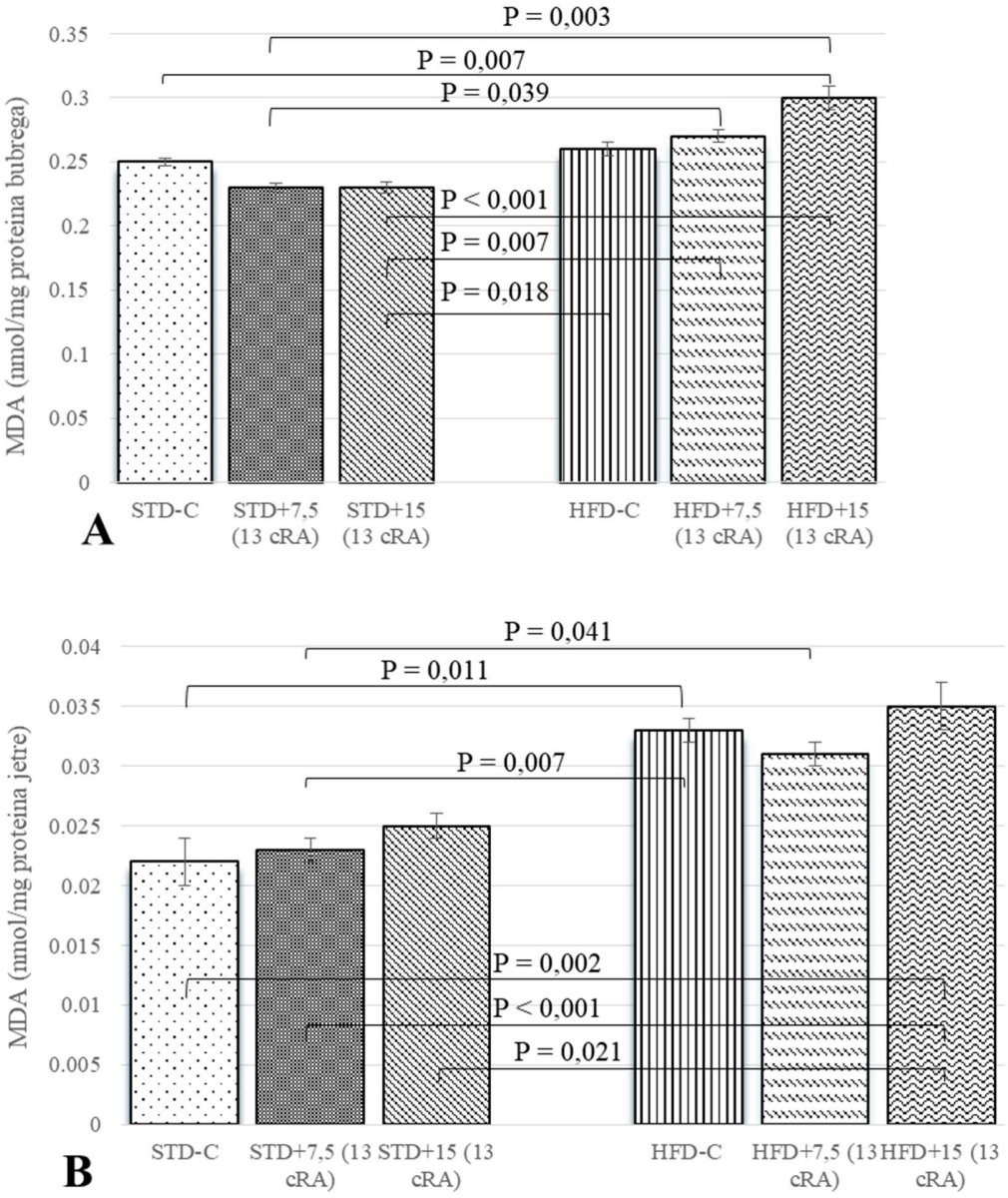
Slika 5.14. Koncentracija katalaze u bubregu (A) i jetri (B) štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Rezultati su prikazani kao AS (SD). Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina; CAT - katalaza; AS (SD) – aritmetička sredina (standardna devijacija).

5.13.2. Mjerenje lipidne peroksidacije u uzorcima tkiva bubrega i jetre

Rezultati lipidne peroksidacije u tkivu bubrega prikazane su na Slici 5.15. (A). Vidljiv je statistički značajan porast MDA, koji je biljeg lipidne peroksidacije, u jedinki na HFD uz dodatak 13 cRA u dozi od 7,5 mg/kg ($P = 0,039$) i 15 mg/kg ($P < 0,001$) u odnosu na STD+7,5 (13 cRA). U skupini HFD+15 (13 cRA) statistički značajan porast vidljiv je i u odnosu na STD-C ($P = 0,007$) i STD+15 (13 cRA) ($P < 0,001$).

Rezultati lipidne peroksidacije u tkivu jetre prikazani su na Slici 5.15. (B).Vidljiv je statistički značajan porast lipidne peroskidacije u jedinki na HFD, uz zabilježenu statistički značajnu razliku u HFD-C i HFD+15 (13 cRA) u odnosu na STD-C ($P = 0,011$; $P = 0,002$). Također je zabilježen statistički značajan porast MDA u skupinama HFD+7,5 (13 cRA) ($P = 0,041$) i HFD+15 (13 cRA) ($P < 0,001$) u odnosu na STD+7,5 (13 cRA).



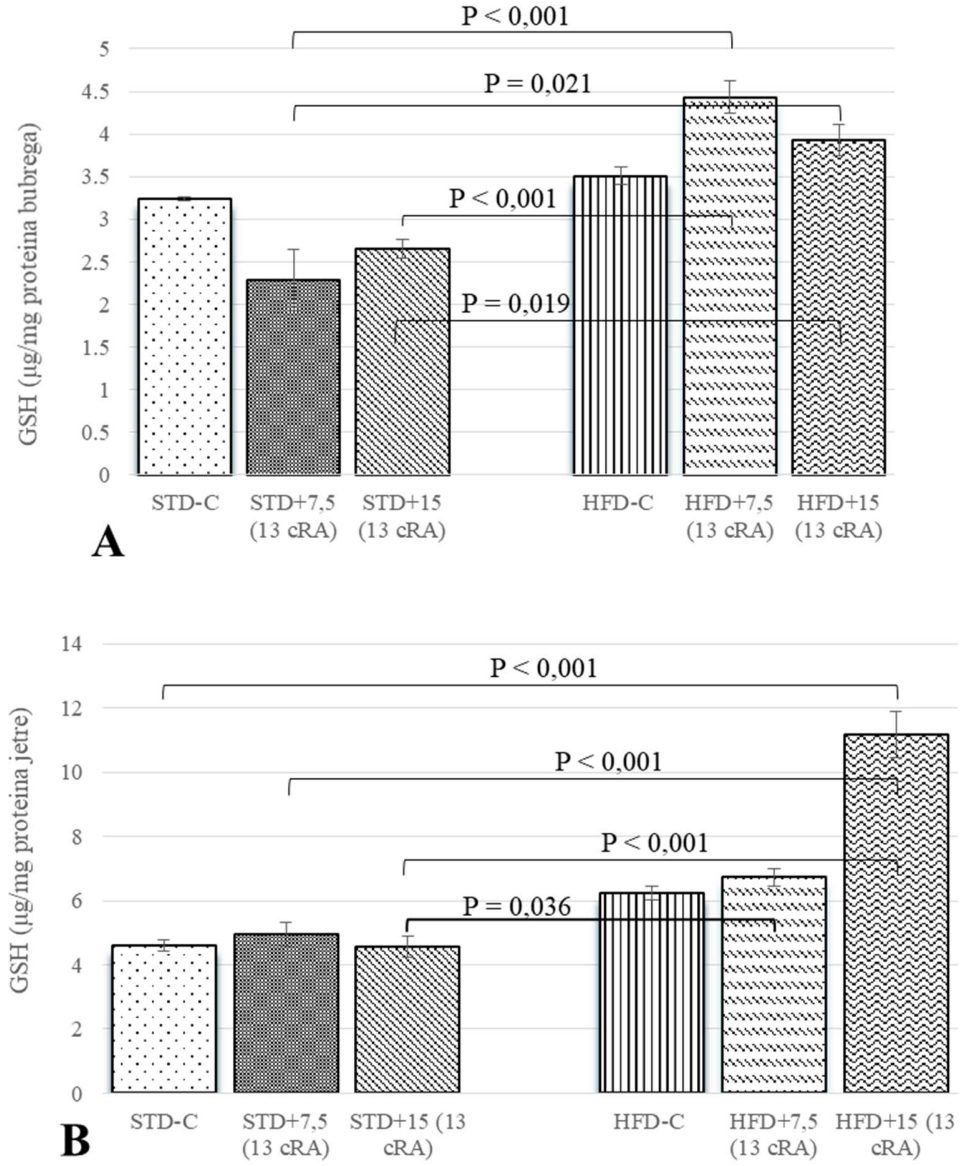
Slika 5.15. Koncentracija malondialdehida u bubregu (A) i jetri (B) štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom, uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA) u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg.

Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Rezultati su prikazani kao AS (SD). Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina; MDA - malondialdehid; AS (SD) – aritmetička sredina (standardna devijacija).

5.13.3. Mjerenje ukupnog glutationa u uzorcima tkiva bubrega i jetre

Rezultate mjerenja koncentracije GSH u tkivu bubrega prikazuje Slika 5.16 (A). Statistički značajan porast GSH vidljiv je u HFD+7,5 (13 cRA) i HFD+15 (13 cRA) u odnosu na STD+7,5 (13 cRA) ($P < 0,001$; $P = 0,021$). Najniže vrijednosti GSH su zabilježene u STD+15 (13 cRA), što je statistički značajno u odnosu na HFD+7,5 (13 cRA) ($P < 0,001$).

Rezultate mjerenja koncentracije GSH u tkivu jetre prikazuje Slika 5.16 (B). Statistički značajan porast vidljiv je u skupini HFD+15 (13 cRA) u odnosu na skupine STD-C ($P < 0,001$), STD+7,5 (13 cRA) ($P < 0,001$), STD+15 (13 cRA) ($P < 0,001$).



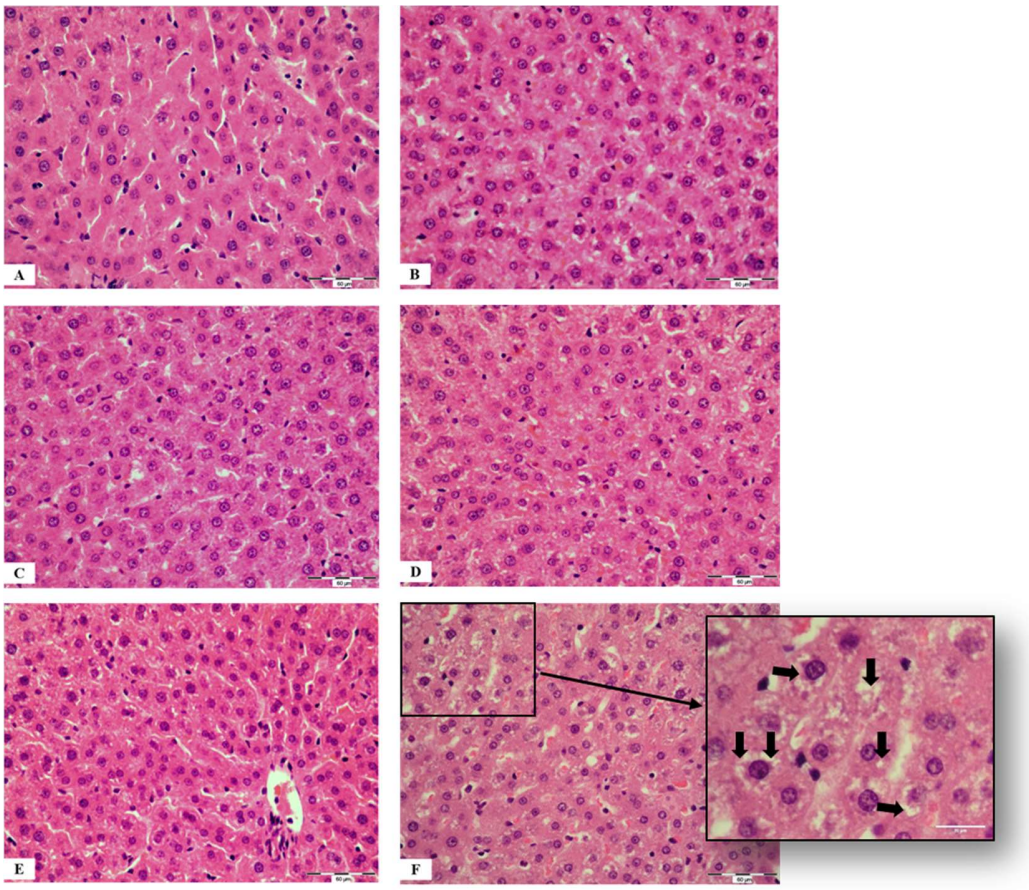
Slika 5.16. Koncentracija glutationa u bubregu (A) i jetri (B) štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Rezultati su prikazani kao AS (SD). AS (SD). Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina; GSH - glutation; AS (SD) – aritmetička sredina (standardna devijacija).

5.14. Histološka analiza jetre

5.14.1. Steatoza jetre

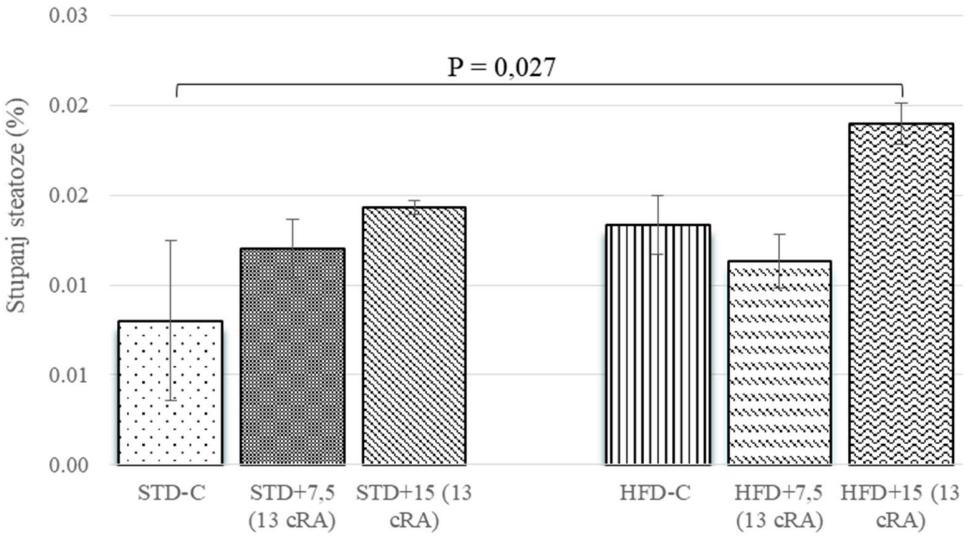
Na Slici 5.17 prikazane su histološke slike jetrenog parenhima. Najveća oštećenja jetrenog parenhima u vidu mikrovezikularne steatoze vidljiva su u skupini HFD+15 (13 cRA) (Slika 5.17 (F)). Između ostalih skupina nisu primjećena statististički značajnija oštećenja jetrenog parenhima u odnosu prema kontrolnoj skupini STD-C (Slika 5.17, Slika 5.18)



Slika 5.17. Histološke slike steatoze jetre štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom, uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Bojenje: hemalaun eozin. A – STD-C; B – HFD-C; C – STD+7,5 (13 cRA); D – HFD+7,5 (13 cRA); E – STD+15 (13 cRA); F - HFD+15 (13 cRA).

Na Slici 5.18 vidljiv je grafički prikaz steatoze jetre, uz statististički značajnu razliku u skupini HFD+15 (13 cRA) u odnosu na kontrolnu skupinu STD-C (P = 0,027).

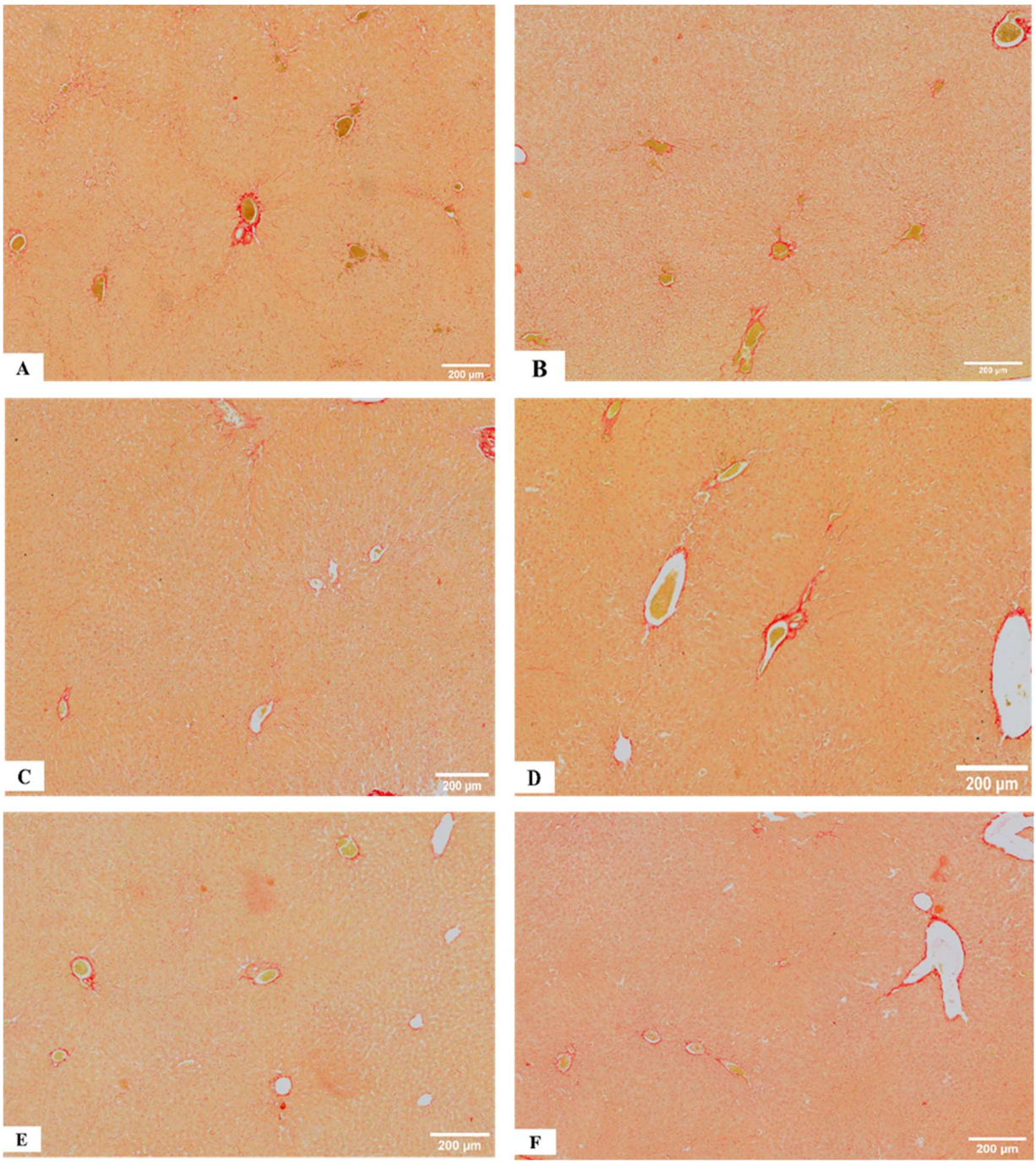


Slika 5.18. Grafički prikaz histoloških promjena jetre u vidu steatoze štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom, uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. A – STD-C; B – HFD-C; C – STD+7,5 (13 cRA); D – HFD+7,5 (13 cRA); E – STD+15 (13 cRA); F - HFD+15 (13 cRA). Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina.

5.14.2. Fibroza jetre

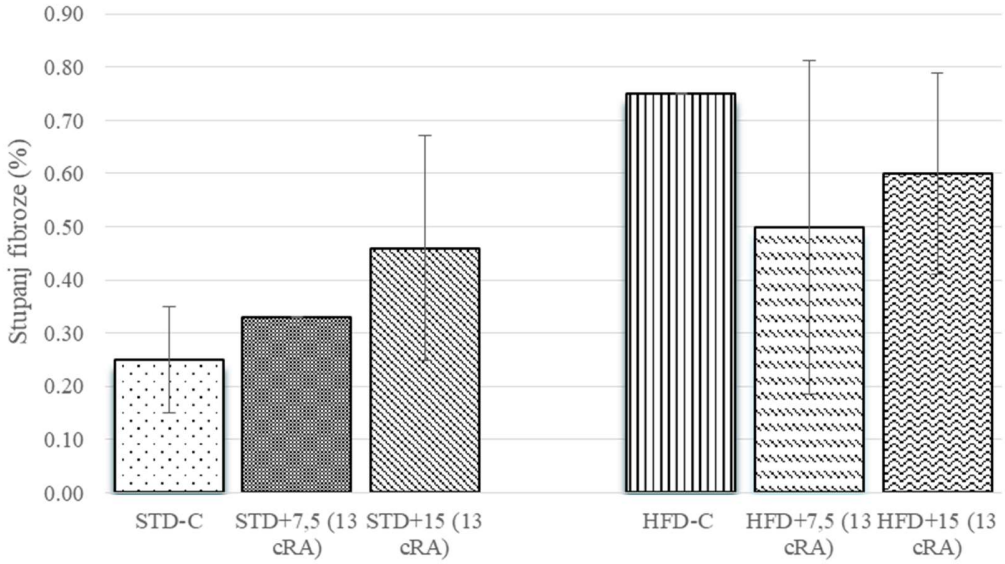
Na Slici 5.19. prikazane su histološke slike jetrenog parenhima. Najveća količina vezivnog tkiva uočena je u skupini HFD-C (Slika 5.19. (B)), no bez statistički značajne razlike u odnosu prema ostalim skupinama. Između ostalih skupina nisu primjećena značajnija odlaganja vezivnog tkiva u jetrenom parenhimu.



Slika 5.19. Histološke slike fibroze jetre štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom, uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Bojenje: pikrosirijus. A – STD-C; B – HFD-C; C – STD+7,5 (13 cRA); D – HFD+7,5 (13 cRA); E – STD+15 (13 cRA); F - HFD+15 (13 cRA).

Na Slici 5.20. vidljiv je je grafički prikaz fibroze jetre, uz vidljiv najveći stupanj fibroze u HFD-C skupini, no bez statistički značajne razlike među ispitivanim skupinama.



Slika 5.20. Grafički prikaz histoloških promjena jetre u vidu fibroze štakora hranjenih standardnom i visokomasnom hranom, uz dodatak 13 cis retinoične kiseline (13 cRA).

Razlike među skupinama testirane su Kruskal Wallisovim testom, P vrijednosti su rezultat Dunnovog post hoc testa. Ženke štakora soja Lewis (n = 6) hranjene su standardnom i visokomasnom hranom tijekom 60 dana, uz dodatak 13 cRA u dvije koncentracije: 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. A – STD-C; B – HFD-C; C – STD+7,5 (13 cRA); D – HFD+7,5 (13 cRA); E – STD+15 (13 cRA); F - HFD+15 (13 cRA). Kratice: STD – standardna hrana; HFD – visokomasna hrana; 13 cRA – 13 cis retinoična kiselina; C – kontrolna skupina.

6. RASPRAVA

Pretilost je jedan od najvećih problema 21. stoljeća te pogađa milijune ljudi diljem svijeta, poprimajući i globalne razmjere. Kao što je već ranije istaknuto, velik problem su i pretilosti pridruženi komorbiditeti koji uvelike opterećuju zdravstveni sustav i povećavaju smrtnost u svijetu.

U našem smo istraživanju koristili prehranom induciran model pretilosti, koji se koristi kako bi bio što sličniji prehrambenim navikama ljudi koji žive u zapadnim kulturama (159,179). Takvi su modeli u prednosti u odnosu na genetičke modele pretilosti zbog mogućnosti različitih pristupa hranjenju i određivanja postotka pojedinih hranjivih tvari (159). Hrana s visokim udjelom masti uzrokuje pretilost, hiperglikemiju i hiperlipidemiju. Vitamin A i njegovi metaboliti važni su u mastima topivi mikronutrijenti za brojne fiziološke procese u velikom broju tkiva, poput diferencijacije stanica, indukcije apoptoze, stvaranja vidnog podražaja, embriogeneze i organogeneze. Uz sve to, imaju i važnu ulogu u regulaciji raspodjele i povećanja masnog tkiva te pridruženih metaboličkih komplikacija, a mnoga istraživanja potvrđuju ulogu vitamina A u pretilosti (135,180–182). Neka istraživanja upućuju da vitamin A ima ulogu u razvoju i napredovanju pretilosti, dok druga upućuju na zaštitnu ulogu vitamina A.

Temeljem navedenog i zbog činjenice da se isotretinoin široko rabi u terapiji akne kod mladih, smatramo da je vrijedno istražiti dugoročni učinak derivata vitamina A, 13 cRA, u kombinaciji s različitim načinom prehrane, standardnom ili visokomasnom, na promjenu mase, raspodjelu masti, metabolizam glukoze, disbalans hormona, lipidne i aterogene pokazatelje, upalu, hematološke i biokemijske pokazatelje, biljege oksidacijskog stresa te razvoj histopatoloških promjena jetre. Pretilost je kronična bolest, posljedica višestrukih etioloških čimbenika i njezin razvoj ovisi o genetskoj predispoziciji u kombinaciji s različitim okolišnim čimbenicima koji dovode do kronično neuravnoteženog unosa energije u odnosu na njegovu potrošnju. Točnije, suvremeno društvo donijelo je značajne promjene u načinu života mladih, posebice „pretilogeni okoliš“ (engl. “*obesogenic environment*”), koji uključuje lagan, 24-satni pristup visokoenergetskoj prehrani i velike količine hrane, kao i društveno okruženje koje promiče sjedilački način života, ali i kronični stres (183). Prema Sengupta (184), jedna ljudska godina gotovo je jednaka dva tjedna štakora (13,8 štakorskih dana), te smo u našem istraživanju koristili štakore čija dob odgovara pubertetu u ljudi,

budući da su mladi skloni unosu brze visokomasne masne hrane, a i u toj se dobi isotretinoin najčešće propisuje za terapiju akne.

Porast tjelesne težine zabilježen je u jedinki na HFD, uz dodatak 15 mg/kg 13 cRA u usporedbi s kontrolnom skupinom hranjenom STD ili HFD. Naši rezultati ukazuju na statistički značajan porast tjelesne mase od 4. tjedna, pa do kraja pokusa. U jedinki na HFD zabilježen je povećan unos hrane i vode međutim samo jedinke na HFD uz dodatak 13 cRA pokazale su statistički značajan porast tjelesne mase. Primjena 13 cRA u jedinki na STD smanjila je količinu visceralnog, perigonadalnog i retroperitonealnog masnog tkiva, kao i adipozni indeks, no bez zabilježene statistički značajne razlike. Jedinke na HFD uz dodatak 13 cRA u dozi od 15 mg/kg pokazuju značajan porast masnog tkiva (visceralnog, perigonadalnog, retroperitonealnog) te adipoznog indeksa u odnosu na STD s 15 mg/kg 13 cRA.

Porast tjelesne mase uzrokovan je neuravnoteženošću između unosa energije i njezine potrošnje, što posljedično uzrokuje nakupljanje triglicerida u WAT (185). Naši su podatci sukladni istraživanju Beuetnerra i Ali Farana (186,187) koji su pokazali da se statistički značajan porast u tjelesnoj masi može uočiti nakon 4-tjedne primjene HFD, dok su drugi autori ukazali da je potrebna primjena HFD tijekom dužeg razdoblja za statistički značajne razlike u tjelesnoj masi (188,189). Crawford i sur. pokazali su da HFD tijekom 6 tjedana primjene u Spraque Dawley štakora povećava *BMI* i vrijednosti glukoze natašte (12), što je također potvrđeno i u Wistar štakor a (190–192). Ne manje važan je podatak da povećanje količine masnog tkiva u organizmu ne mora biti praćeno značajnim porastom tjelesne mase.

Neka istraživanja pokazuju da retinoidi mogu smanjiti tjelesnu masu na račun supkutanih i visceralnih masnih depoa u miševa na HFD (150,182). Mogući mehanizam kojim vitamin A djeluje na smanjenje tjelesne mase i količinu masnog tkiva jest putem pojačane termogeneze i aktivacije UCP1 proteina smještenog na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani adipocita. Štoviše, smanjeni termogeni kapacitet BAT, odnosno aktivnost UCP1 proteina, uočen je kod nekih genetički pretilih sojeva (193). U istraživanju Jeyakumar i sur. (181) dodatak 129 mg/kg 13 cRA rezultirao je smanjenjem tjelesne mase u štakora, što nije sukladno našim rezultatima. S druge strane, naše je istraživanje sukladno s drugim istraživanjem Jeyakumar i sur. koji su pokazali da dugotrajna prehrana bogata vitaminom A poticajno djeluje na dobivanje na tjelesnoj masi, pretilost, dislipidemiju, hiperinzulinemiju, hiperleptinemiju i povišene vrijednosti HDL-c u mršavih i

pretilih štakora soja WNIN/GR-Ob (181). Hipertrigliceridemija i dislipidemija već su od ranije pozante nuspojave retinoida. U ljudi je dokazano da se primjena vitamina A u dozi 8500 IJ/kg dnevno koristi u svrhu dobivanja na tjelesnoj masi u prijevremeno rođene djece male tjelesne mase (0,8-1.1 kg) (194). S tim u vezi, može se zaključiti da utjecaj vitamina A i njegovih metabolita na pretilost ovisi uvelike o vrsti, dobi, spolu, genetici i dozi koja se primjenjuje (181).

Moguće je da bi duljevremena primjena HFD u našem istraživanju dovela do značajnijih promjena u tjelesnoj masi između istraživanih skupina. Postotak dobivanja na tjelesnoj masi, također, može biti slabije izražen uslijed zaštitnog utjecaja hormona estrogena, prolaktina, hormona štitnjače, glukokortikoida, koji također mogu utjecati na adipocite masnog tkiva (195–197).

Estrogen ima važan utjecaj na adipogenezu i raspodjelu masnog tkiva, te utječe na razliku u raspodjeli masnog tkiva među spolovima (198). U našem smo istraživanju odabrali ženke štakora soja Lewis za proučavanje svih gore navedenih metaboličkih parametara. Ženke i mužjaci međusobno se razlikuju u regulaciji unosa hrane, ponašanju i održavanju tjelesne mase. Kod ljudi nekoliko zdravstvenih rizika povezanih s pretilošću je specifično za spol (199,200). Primjerice, razina TC i TG, rizici za metabolički sindrom, razvoj dijabetesa tipa II, hipertenzija, te bolesti srca i krvožilnog sustava su veći u žena u odnosu na muškarace, a posljedično tome je i smrtnost u ženskog spola dvostruko veća. U životinja, spolne razlike u hranjenju i tjelesnoj težini i pretilosti povezane su s perinatalnom androgenizacijom mozga i cirkulirajućim spolnim steroidima u hipotalamusu. No ipak, podaci o pretilosti kod životinja jako su kontroverzni s obzirom na spol, dob, genetske i epigenetske čimbenike (201). Jedan od mogućih mehanizama kojima vitamin A potiče adipogenezu jest preko stimulacije gena PPARγ (engl. peroxisome proliferator-activated receptor gamma) (181). Prema istraživanju Gilesa i sur. fiziologija ženki štakora puno je vjerodostojniji model pokazatelja pretilosti kod ljudi, zbog uvida u ulogu spolnih hormona na metaboličke promjene u pretilosti tijekom primjene RA te pokazatelje oksidacijskog stresa, biokemijske parametre i koncentraciju adipokina (201). Opisan je i zaštitni učinak estrogena na adipogenezu: tijekom estrusnog ciklusa u štakora estrogeni djeluju inhibitorno na uzimanje hrane, a ovariektomija vodi hiperfagiji i ubrzanoj pretilosti (202). Manjak estrogena, pak, u modelu štakora dokazano ima posljedice na mnoge organe i metaboličke procese. Djeluje na imunosni sustav pojačavajući upalni odgovor i novačenje tkivnih makrofaga prema mjestu upale, u mišićima

izaziva nakupljanje lipidnih kapljica, upalu i zamor, smanjuje izlučivanje inzulina iz β stanica Langerhansovih otočića, u jetri izaziva nakupljanje TC, TG te posljedičan razvoj steatoze i inzulinske rezistencije, te, ne manje važno, djeluje na kost smanjujući njezinu gustoću i povećavajući rizik razvoja patoloških fraktura (203). Estrogen je važan čimbenik koji direktno utječe na remodeliranje koštanog tkiva, djelujući na stanice koštanog sustava – osteocite, osteoblaste i osteoklaste. Konkretno, smanjuje apoptozu i oksidacijski stres osteoblasta, te na taj način sudjeluje u održavaju stvaranja koštanoga tkiva. S druge strane, potiče apoptozu osteoklasta aktivacijom RANKL receptora (ligand za RANK (receptor-aktivator nuklearnog čimbenika κB) (204). U našem je istraživanju smanjen volumen femura u jedinki na HFD uz dodatak veće doze 13 cRA najniži.

Literatura ukazuje da kontuinirani dnevni šestomjesečni dodatak 120-150 mg/kg 13 cRA uzrokuje značajno smanjenje volumena jajnika, broja antralnih folikula u jajniku i smanjenje serumske koncentracije anti Müllerovog hormona (205), koji se izlučuje iz folikularnih granuloza stanica i pokazatelj je ovarijske rezerve (206). Abali i sur. u svom su istraživanju pokazali smanjenje ovarijske rezerve uslijed primjene 7,5 i 15 mg/kg 13 cRA tijekom 30 dana zbog smanjenja broja zrelih folikula u Spraque Dawley štakorica (207). U našem je pokusu vidljiv porast relativne mase spolnih organa (uterusa i ovarija) u jedinki na STD uz dodatak 13 cRA u obje koncentracije uz zapaženu statističku značajnost u STD+15 (13 cRA) u odnosu na sve skupine hranjene HFD. U jedinki na HFD uz dodatak 13 cRA zapažena je manja masa spolnih organa, sa statistički značajnom razlikom u odnosu na STD s visokom dozom 13 cRA. Drugi autori pokazuju kako sedmodnevna terapija 13 cRA u dozama 7,5 i 15 mg/kg ne utječe na relativnu masu ovarija i uterusa (167,208). U humanim istraživanjima primjena isotretinoina tijekom 6 mjeseci značajno smanjuje volumen jajnika i broj antralnih folikula do 12 mjeseci nakon ukidanja posljednje tablete (205,209).

Naši su rezultati, također, pokazali smanjenu relativnu masu jetre i bubrega u HFD s 15 mg/kg 13 cRA skupini, što je u skladu s postojećom literaturom. Poveznica između povećanog unosa masne hrane i oštećenja bubrega opisano je još 1858. godine od strane Virchowa (210), a poslije su drugi znanstvenici to potvrdili (211). Objašnjenje se temelji na nastanku dislipidemije/hiperlipidemije uzrokovane visokomasnom hranom te posljedičnom povećanju oksidacijskog stresa u bubregu i stvaranju ROS-a, što je potvrđeno i u našem istraživanju. Uz to, u

našem istraživanju oštećenje bubrega pokazano je i povećanjem vrijednosti NO u skupini HFD s obje doze 13 cRA te smanjenjem vrijednosti arginaze u spomenutim skupinama. Istraživanje Abdel Moneem Ali i sur. potvrđuje da 10-tjedna primjena HFD dovodi do nekroze epitela renalnih tubula i kongestije krvi u krvim žilama (212), a Ali Faran ukazuju na oštećenje podocita glomerula i mezangijsku sklerozu kao posljedicu 4-tjedne primjene HFD (187). Navedene histološke promjene izazivaju smanjenje relativne mase bubrega na kraju pokusa, što je sukladno našim rezultatima. U jetri, pak, kao posljedica HFD i dodatka 13 cRA u dozi 15 mg/kg dolazi do odlaganja lipidnih kapljica uz gubitak normalnog jetrenog parenhima, što smanjuje njezinu relativnu masu. U gore spomenutom istraživanju Abdel Moneem Ali i sur. zabilježeni su suprotni rezultati po pitanju relativne mase jetre; naime, jedinkama na HFD zabilježene su više vrijednosti na kraju pokusa u odnosu na kontrolnu skupinu (212). Metabolizam jetre je poremećen uslijed 6-tjedne primjene HFD zbog lipotoksičnog učinka FFA koje se u obliku TG nakupuljaju u hepatocitima i čine kapljice masti. Posredno tome, dolazi do njihove povećane oksidacije i stvaranja VLDL-a koji se izlučuje u sistemsku cirkulaciju (213), što je dokazano i u našem istraživanju. Navedene promjene dokazane su s napredovanjem NAFLD, bolešću jetre povezanom s inzulinskom rezistencijom zbog smanjenih perifernih učinaka hormona inzulina (213). U našem su istraživanju histološke promjene jetre u sklopu steatoze diskretne, ali je vidljiv značajan poremećaj u metabolizmu glukoze, masti i aterogenim pokazateljima. Također, u našem je istraživanju dokazan porast serumske i jetrene vrijednosti NO i smanjenje serumske vrijednosti arginaze, koji također upućuju na početna oštećenja jetrenog parenhima. Što se, pak, odlaganja vezivnog tkiva u jetri tiče, u našem pokusu najveće promjene zabilježene su u skupini HFD-C, no promjene u svim skupinama bile su vrlo diskretne u odnosu na kontrolnu skupinu. To se može objasniti sposobnošću jetre za regeneracijom i moguće potrebitim duljevremenim tretmanom za izraženije histološke promjene.

Analizom učinaka STD, HFD i dodatka 13 cRA na hematološke pokazatelje u krvi nisu zapažene statistički značajne promjene na broj eritrocita, hemoglobina i hematokrita te parametre vezane uz MCV, MCH, MCHC, RDW. Do sada objavljena istraživanja govore o smanjenju Hbg i H u jedinki na HFD (214,215). Isti autori, Edozien i Switzer, davne 1977. u radu potvrđuju da 13 cRA primjenjena u dozi od 15 mg/kg tijekom 4, 8 i 12 tjedana uzrokuje statistički značajno smanjenje vrijednosti Hbg (214,216). U našem je istraživanju također zabilježeno smanjenje broja eritrocita, Hbg i H, no bez statistički značajne razlike.

Međutim, u našem radu zapazili smo povećanje broja trombocita u ovisnosti o primjeni 13 cRA u jedinki na standardnoj, a njihovo smanjenje uočeno je u jedinki na HFD, no bez zabilježene statististički značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu. Trombociti ili krvne pločice nastaju iz koštane srži odvajanjem od citoplazme megakariocita. Trombociti u svojoj citoplazmi sadržavaju tvari koje sudjeluju u procesu zgrušavanja krvi, poput iona Ca2+, serotonina, fibrinogena, trombocitnog čimbenika rasta (PDGF, engl. platelet derived growth factor) te sudjeluju u procesu primarne i sekundarne agregacije trombocita, zgrušavanju, retrakciji ugruška i njegovu odstranjenju u sklopu kolagulacijske kaskade (14). S obzirom da se 13 cRA koristi u sklopu terapije akne, mnogo je istraživanja u humanom modelu koji objedinjuju nuspojave vezane za 13 cRA. Tako, većina autora smatra kako 13 cRA izaziva statistički značajno smanjenje broja trombocita nakon tromjesečne primjene, zbog njezinog supresivnog djelovanja na koštanu srž (217) dok manji broj radova upućuje na povećanje broja krvnih pločica nakon terapije 13 cRA (218).

Poznato je da poremećaj metabolizma glukoze, konkretno inzulinska rezistencija i DM II, dovode do povećanja broja trombocita i njihove reaktivnosti (219), te do poremećaja u zacjeljivanju rana. To se događa zbog povećane upale u organizmu i smanjene sposobnosti imunosnog sustava u borbi protiv stranih patogena. U zdravih pojedinaca proces zacjeljivanja rane vođen je međureakcijom multiplih citokina i kemokina koji se otpuštaju iz keratinocita, fibroblasta, endotelnih stanica, makrofaga i trombocita. Kod hipoksije uzrokovane stvaranjem rane dolazi do otpuštanja krvožilnog endotelnog čimbenika rasta (engl. vascular endothelial growth factor, VEGF) od strane makrofaga, fibroblasta i epitelnih stanica, čime dolazi do fosforilacije i aktivacije eNOS u koštanoj srži, rezultirajući povećanjem koncentracije NO koji novači endotelne progenitorne stanice (engl. endothel progenitor cells, EPC) u sistemsku cirkulaciju. S druge strane, u mišjem modelu dijabetesa poremećena je fosforilacija eNOS u koštanoj srži, što izravno organičava EPC novačenje iz koštane srži u sistemsku cirkulaciju (220).

Osim toga u skupini HFD uz dodatak 13 cRA (15 mg/kg) zabilježena je statistički značajna leukocitoza s neutrofilijom, u odnosu na kontrolnu skupinu. Brojna istraživanja pokazuju leukocitozu kao posljedicu HFD zbog upale koja prati pretilost (215,221), a neutrofili su prve stanice koje reagiraju na proces upale. Upalne stanice uz pomoć svojih citokinskih posrednika

novače druge stanice imunosnog sustava kao što su makrofagi te limfociti (222) i potiču sustavni upalni odgovor organizma. 13 cRA ima vrlo važnu ulogu u diferencijaciji neutrofila u koštanoj srži, stvaranju dendritičkih stanica i B limfocita. Iz B limfocita razvijaju se plazma stanice koje su odgovorne za stvaranje protutijela u organizmu. 13 cRA posebno potiče stvaranje IgA (223), kojeg najviše nalazimo u slini, sluznici nosa i bronha, kolostrumu, suzama, sluznici rodnice i crijeva te čini imunosnu barijeru sluznica i naziva se još i sekrecijski IgA (14). Istraživanje Sato-Mita i sur. iz 2009. pokazuju da HFD dovodi do porasta koncentracije limfocita, no bez statistički značajne razlike (224).

Istraživanja pokazuju kako je aktivnost imunosnog sustava veća u ženskog nego u muškog spola. Limfociti ženskog spola bilježe izraženiji odgovor prema stranim antigenima i mitotsku aktivnost, osiguravajući domaćinu povećanu rezistenciju na niz infekcija, ali također i povećanu sklonost ženskog spola za razvoj autoimunih bolesti. Sve to upućuje na zaključak da spolni hormoni, gonadalni steroidi, imaju važnu posredničku ulogu u regulaciji imunosnog odgovora. IL-1 važan je citokin u započinjanju imunosnog odgovora, a njegova je koncentracija povišena je u lutealnoj fazi menstrualnog ciklusa kod ljudi, što upućuje na poveznicu između gonadalnih steroida i imunosnog sustava. Manjak estrogena snižava koncentraciju IL-1 (225). U postmenopauzalnih žena dokazana je povišena koncentracija IL-8, MCP-1 i CCL5 kemokina poznatog pod nazivom RANTES (engl. regulated on activation and secretion normal T cell expressed) važnih biljega upale i aktivacije imunosnog sustava. RANTES je citokin koji je osobito visok u osteoporozi. U Spraque Dawley štakora kojima je deficijencija estrogena izazvana ovariektomijom, dokazana je pojačana adhezija leukocita na stijenci arteriola, povećani izražaj neutrofilnih kemoktaktičkih čimbenika i serumska koncentracija MCP-1 (226).

Leukocitoza s neutrofilijom, porast serumske vrijednosti NO, a smanjenje arginaze, te porast serumske koncentracije proupalnih citokina IL-6, IL-1β, IFN-γ parametri su našeg istraživanja koji upućuju na sistemsku upalu zabilježenu u jedinki na HFD, uz najizraženije promjene u skupini uz dodatak 13 cRA u višoj koncentraciji. Zabilježen je i neznatan porast IL-10 koji je protuupalni citokin, no to se može objasniti kao kompenzatorni mehanizam borbe organizma sa stranim patogenom kao i poticanjem popravka tkiva i održavanja angiogeneze u masnom tkivu te funkcije adipocita. M2 makrofagi mogu djelomično spriječiti aktivaciju i akumulaciju M1 makrofaga, i sekrecijom IL-10 pomoći u zaštiti adipocita od štetnih učinaka citokina. Međutim, s povećanjem

adipoznosti, M1 polarizirani makrofagi dobivaju dominantnu ulogu te proizvode NO i visoke količine proupalnih citokina kao što su IL-1β i IL-6 INF-γ, što su polučili i naši rezultati. Potvrđeno je da u masnom tkivu pretilih i u osoba s razvijenom inzulinskom rezistencijom je pojačana aktivnost M1 makrofaga masnog tkiva, mastocita, dendritičkih stanica, neutrofila i Th17 limfocita koji luče IL-17, IL-21 i IL-22 (227).

Stvaranje i izlučivanje protuupalnih citokina karakteristično je za M2 fenotip makrofaga, a proupalnih za M1 makrofage. Makrofagna polarizacija regulirana je s mnogo različitih citokina, od kojih IL-13 i IL-4 potiču M2 fenotip, a IFN-γ, IL-12 M1 fenotip. Vrlo blisko makrofagnoj polarizaciji je i promjena Th2 u Th1 stanični odgovor i narušena aktivnost T regulatornih stanica (engl. T regulatory cells, Treg) (228). Tako, IFN-γ knockout miševi pokazivali su polarizaciju prema M2 makrofazima, poboljšanu osjetljivost na inzulin i smanjen volumen adipocita masnog tkiva (229), dok su GM-CSF knockout miševi imali manju serumsku koncentraciju proupalnih citokina i, također, poboljšanu osjetljivost na inzulin (230). GM-CSF ima mogućnost stimulacije IL-10 i tolerogenih Treg stanica, smanjujući tako mogućnost za razvoj autoimunih bolesti (231). U istraživanju Poreta i sur. porast citokina IL-6, IL-1β i IL-1α, a smanjena vrijednost IL-10 zabilježene su i u visceralnom i perigonadalnom masnom tkivu mužjaka na HFD (232), što je u skladu s našim rezultatima. I u humanim je istraživanjima dokazan je porast koncentracije IFN-γ, IL-4, IL-5, IL-12 and IL-13 koji koreliraju s BMI, količinom visceralnog masnog tkiva i razvojem metaboličkog sindroma (231) dok su rezultati za razina IL-10 bili nedosljedni. Kronična, supklinička, tinjajuća upala povezuju se s pretilosti pridruženim poremećajima, poput inzulinske rezistencije i kardiovaskularnim poremećajima zbog lučenja proupalnih citokina iz masnog tkiva, makrofagnom polarizacijom u masnom tkivu gdje se formiraju strukture CLS oko adipocita i smanjenim omjerom Th2/Th1 limfocita. Manjak TNF-α povećava osjetljivost inzulinskog receptora u mišiću i masnom tkivu i smanjuje količinu cirkulirajućih FFA (73). TNF-α potiče lipolizu FFA iz masnog tkiva u sistemsku cirkulaciju i smanjuje vrijednosti serumskog antiaterogenog i protuupalnog adiponektina (72). Tako brojni dokazi izdvajaju masno tkivo općenito, a posebice visceralno masno tkivo, kao ključni regulator upale. Pretilost je karakterizirana kroničnom upalom niskog stupnja i u pretilosti masno tkivo postaje disfunkcionalno; dovodi do povećane proizvodnje proupalnih adipokina i smanjene proizvodnje protuupalnih adipokina, posljedične hiperplazije i hipertrofije masnih stanica te disbalansa u

otpuštanju adipokina. To stanje povećava kontraktilnost i upalu te dovodi do krvožilnih bolesti poput hipertenzije, ateroskleroze i krvožilne disfunkcije.

Nadalje, podaci upućuju da pretilost može predstavljati stanje kronične upale niskog stupnja povezanog s infiltracijom upalnih stanica u masno tkivo posebice makrofaga M1. Iako su populacije makrofaga prisutne u gotovo svim tjelesnim tkivima, njihov povećani broj zapažen je u upravo u WAT te se nazivaju makrofagi masnog tkiva (engl. *adipose tissue macrophage*, ATM). Njihov broj kod ljudi i glodavaca se povećava povećanjem tjelesne mase i podudara sa stupnjem inzulinske rezistencije što je sukladno našim rezultatima. Makrofagi su brojniji u visceralnom nego potkožnom masnom tkivu, što je sukladno s hipotezom da visceralna masnoća igra istaknutiju ulogu u rezistenciji na inzulin. Štoviše, gubitak tjelesne mase dovodi do smanjenja i upalnih biljega i biljega ATM-a (233). Visceralno masno tkivo akumulira makrofage koji oslobađaju upalne citokine koji mogu djelovati na inzulinsku osjetljivost, a postoji i mogućnost da i lipotoksičnost u perifernom tkivu i visceralna proizvodnja citokina u masnom tkivu mogu doprinijeti sistemskoj inzulinskoj rezistenciji. Kod pretilih osoba makrofagi visceralnog masnog tkiva izlučuju TNF-α i IL-6 koji su djelom odgovorni za inzulinsku rezistenciju i dislipidemiju povezanu s nekontroliranim oslobađanjem FFA iz masnog tkiva pomoću lipolize kod pretilosti. TNF-α je važan čimbenik koji potiče oslobođanje masnih kiselina i citokina iz visceralnog masnog tkiva u krvotok gdje putem portalnog krvotoka direktno ulaze u jetru vodeći nastanku masne jetre (234). Nadalje, kronično povećanje IL-6 u osoba s metaboličkim poremećajima, može dovesti do otpornosti na inzulin u jetrenim i masnim stanicama te tako mogu pogoršati metaboličke nuspojave i kontrolu glikemije. Upravo inzulinska osjetljivost jetre ključna je u nastajanju i/ili progresiji NAFLD (104,105).

Kasnije je pokazano da nakupljanje makrofaga u pretilosti nije ograničeno na WAT, nego i na druge organe kritične za homeostazu glukoze, poput jetre, gušterače, crijeva, čak i mozga. Imunosna disfunkcija unutar masnog tkiva je dovoljna da naruši sustavni metabolizam glukoze (91). Višak hranjivih tvari dovodi do povećanja adipocita, s povećanim izlučivanjem kemoatraktanata CCR2 krvnih monocita u WAT (235).

Povećanim izlučivanjem TNF-α, FFA te kemokina, proizvode se MCP-1 i njegov receptor, CCR2, CCL7, LTB4 i inhibitor migracije (engl. *migration inhibitory factor,* MIF). Izlučuju se i drugi čimbenici koji utječu na matične stanice koštane srži prilikom čega se povećava stupanj

mijelopoeze, što dodatno povećava priljev makrofaga u masno tkivo (91). Većina novačenih monocita je putem tih upalnih signala diferencirana u M1 makrofage te čine čak do 50 % svih stanica u WAT pretilih miševa (91).

Masno tkivo je zajednički rezervoar proupalnih citokina, ali i adipokina, koji se izlučuju u sistemsku cirkulaciju. Prema Peelmanu i sur., mehanizam odgovoran za leukocitozu u pretilosti, dijabetesu i aterosklerozi može biti leptin (236) i leptinski receptor koji ima strukturne sličnosti klasi I citokinskih receptora (237). Zanimljivo je da ta klasa receptora uključuje i gp130 podjedinicu IL-6, navodeći na zaključak da IL-6 i i leptin mogu djelovati na sličan način sinergistički djelujući na porast broja leukocita (238). Polimorfonuklerarni i mononuklearni leukociti mogu biti aktivirani povećanim koncentracijama glukoze (239), oksidativnim stresom (240), angiotenzinom II (241), citokinima (242) i drugim čimbenicima koji sudjeluju u patogenezi mikro i makrovaskularnih komplikacija.

Nadalje, vidljive su promjene i u biokemijskim pokazateljima između STD i HFD u prisutnosti 13 cRA. Zapaženo je statistički značajno smanjenje koncentracije ALB u jedinki na STD kojima je primjenjena 13 cRA u obje koncentracije. Jedinke na HFD ne pokazuju statistički značajne razlike, što je sukladno rezultatima koji potvrđuju da se 13 cRA u sistemskoj cirkulaciji veže za ALB (243). ALB su proteini akutne faze koji mogu biti povećani u stanjima upale, kao što je pretilost (192). Ukupni proteini, pak značajno padaju u jedinki na HFD uz primjenu 15 mg/kg 13 cRA. Navedeno je moguće objasniti oštećenjem bubrega koje nastaje u sklopu pretilosti, koji onda pojačano propuštaju proteine kroz oštećene glomerule (212). Drugi mogući razlog jest početak razvoja inzulinske rezistencije u sklopu koje inzulin gubi svoje anaboličke učinke na periferiji, pa dolazi do pojačanog katabolizma proteina (244). Naši podatci su u skladu s podatcima Faran i sur. koji su pokazali smanjenje ALB, GLOB i omjera ALB-GLOB u jedinki na HFD (187).

Također povećanje enzima ALP u ovisnosti je o primjeni 13 cRA, bez statistički značajne razlike među skupinama, što je sukladno istraživanju koje pokazuje da 21 – dnevni tretman s 13 cRA u dozi 0,4 i 10 mg/kg uzrokuje povećanje ALP-a (245).

S druge strane, vidljivo je da HFD uzrokuje smanjenje vrijednosti ALP. ALP ima važnu ulogu u protuupalnim zbivanjima u crijevu. Izražaj intestinalne ALP ovisi o okolišnim čimbenicima, u prvom redu načinu prehrane te o stanju crijevne mikroflore organizma. Smanjeni izražaj ALP-a povezuje se s pretilošću, upalnim bolestima crijeva i celijakijom. Primjena intestinalne ALP u

miševa s razvijenim kolitisom uzrokuje smanjenje lokalne proizvodnje proupalnog citokina TNF-α (246). Osim što uzrokuje smanjenje intestinalne ALP, HFD primjenjena tijekom 8 tjedana kod Spraque Dawley štakora dovodi do smanjene ekspresije TLR4 (engl. *Toll like receptor 4*) koji pospješuje upalu. Također je zanimljivo da dugotrajno gladovanje smanjuje vrijednosti intestinalne ALP u miševa, čineći ih podložnijima infekcijama i proboju stranih patogena (247).

AMY je enzim koji se sintetizira u žlijezdama slinovnicama, predminantno doušnoj žlijezdi, i gušterači te je odgovoran za razgradnju škroba na jednostavnije šećere (248). Povećana koncentracija AMY u serumu najčešće se povezuje s pankreatitisom. U velikom je broju animalnih istraživanja pokazana povećana vrijednost AMY u jedinki na HFD (160,248), ali i jedinki kojima je primjenjena 13 cRA (249). Povećanje AMY može se objasniti pojačanom razgradnjom složenih ugljikohidrata na jednostavnije šećere, koji onda dovode po pojačanog odlaganja u masno tkivo i jetru, te posreduju razvoju pretilosti. U humanim je istraživanjima također potvrđeno povećanje AMY u pretilih, kao i u onih koji imaju razvijenu kliničku sliku dijabetesa tipa II (250,251). Naši su rezultati u sukladu sa spomenutima, primjena 13 cRA i HFD uzrokovala je porast vrijednosti AMY, bez zabilježene statistički značajne razlike. S druge strane, u literaturi su zapažena i istraživanja koja povezuju pretilost sa smanjenom vrijednošću AMY (252).

Vrijednosti ALT također pokazuju ovisnost o primjeni 13 cRA, kako u STD, tako i HFD životinja, sa vidljivom statistički značajnom razlikom kod primjene visoke doze 13 cRA u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu. ALT je enzim koji se nalazi u hepatocitima i jedan je od najčešće korištenih biomarkera za uvid u poremećaje funkcije i strukture jetre. Povećanje vrijednosti ALT povezuju se sa pretilošću i pridruženim metaboličkim komplikacijama, poput DM II (253,254). Povećanje koncentracije ALT-a u našem istraživanju, prema dostupnoj bi se literaturi, moglo povezati s oštećenjem membrane hepatocita u jedinki na HFD. Na to ukazuju i neka druga istraživanja: stanična membrana postaje propusnija za prolazak enzima koji se inače nalaze u hepatocitima vodeći njegovim povećanim vrijednostima u sistemskoj cirkulaciji (187). Primjena 13 cRA također dovodi do povećanja vrijednosti ALT-a, što je opisano u mnogim humanim istraživanjima kod pacijenata, predominantno adolescenata, na terapiji isotretinoinom (255).

Vidljivo je i povećana razina Ca^{2+} u jedinki na HFD uz dodatak 13 cRA u odnosu na kontrolnu skupinu, što je sukladno rezultatima Wanga i sur. (256). Neka istraživanja potvrđuju smanjene vrijednosti Ca^{2+} u jedinki na HFD (212). Smanjena koncentracija Ca^{2+} u krvi može dovesti do

snižene aktivnosti enzima koji su odgovorni za metabolizam masti, poput hormon osjetljive lipaze i lipaze masnog tkiva (257), što dovodi povećanog nakupljanja masnog tkiva, osobito abdominalnog tipa. Postoji niz istraživanja koja povezuju visoke doze vitamina A sa toksičnim učinkom na koštani sustav u štakora i mogućnost izazivanja spontanih fraktura, lokaliziranih uglavnom na dijafizi dugih kostiju. Visoke doze RA u razdoblju 1-3 tjedna uzrokuje oksidativni stres, smanjenje koštane mase (engl. *bone mineral density*, BMD) i histomorfološke promjene koje odgovaraju osteoporozi (258). Konkretno, u istraživanju Oršolić i sur. 14 – dnevna primjena 80 mg/kg 13 cRA uzrokovala je promjene u vidu osteoporoze u modelu štakora (259). Prema istraživanju Penga i sur. dodatak visokih doza RA u kratkom vremenu izaziva osteoporozu, uzrokujući resorpciju Ca^{2+} predominantno iz spužvaste kosti, a glavni razlog za to je smanjenje koncentracije estrogena (260). Posljedično tomu, dolazi do povećanja koncentracije upalnih citokina i oksidativnog stresa (258,261) koji djeluju na povećanje broja osteoklasta, a apoptoze osteoblasta. Također, smanjeno je djelovanje vitamina D u organizmu, a pojačana aktivnost paratiroidnog hormona (engl. parathyroid hormone, PTH) (261,262) čime konkretno dolazi do smanjene apsorpcije Ca^{2+} u crijevu i pojačanog izlučivanja Ca^{2+} bubrezima, rezultirajući hipokalcemijom. Sve gore spomenuto dovodi do promjene ultrastrukture kosti, njezine pojačane resorpcije kosti i smanjene enhondralne osifikacije koja rezultira promjenama u epifiznoj ploči (260). Niže serumske vrijednosti Ca^{2+} povezuju se i s drugim patološkim stanjima, poput hipertenzije, karcinoma, inzulinske rezistencije (257). U humanim istraživanjima, pak, primjena, 13 cRA za liječenje *acne nodularis* u terapijskoj dozi od 1 mg/kg, ne izaziva promjene u koncentraciji iona Ca^{2+} (263), no treba biti korištena s oprezom kod ljudi s bilo kakvom patologijom koštanog sustava (264). Ca^{2+} ioni važni su u izgradnji anorganskog dijela kosti i njegovu metabolizmu (265), kontrakciji mišića, prenošenju živčanih impulsa i lučenju hormona (266).

Dodatak 13 cRA pozitivno utječe i na crijevnu mikrofloru poticanjem aktivacije B limfocita i plazma stanica, te stvaranja IgA iz plazma stanica. Također, 13 cRA osnažuje međustanične spojeve u crijevima (*zonula occludens*) i održava normalnu crijevnu mikrofloru. IgA je ključni imunoglobulin koji potiče sazrijevanje imunosnog sustava u crijevima te njegov pravodoban odgovor. Lokalno izlučivanje IgA štiti sluznicu crijeva, neutralizira endogene i egzogene toksine, smanjuje broj proupalnih epitopa na crijevnim bakterijama. 13 cRA potiče aktivaciju dendritičkih

stanica i makrofaga koji stvaraju IL-10 i pretvorbu T limfocita u T_{reg} stanice. Manjak IgA u modelu štakora povezuje se s učestalijim razvojem kolorektalnih adenoma i disbiozom (267).

Promjene u koncentracija Na^+ prikazane u radu Zarei i sur. pokazuju smanjenje koncentracije Na^+ i K^+ u jedinki na HFD, uz dodatak RA, bez statistički značajne razlike (136). Na^+ ioni su prisutni u izvanstaničnom okolišu i za održavanje homeostaze organizma njegova koncentracija iznosi oko 142 mmol/ L (268). Povišene vrijednosti Na^+ najčešće se povezuju sa hipertenzijom i kardiovaskularnim bolestima. Također, povećani unos iona Na^+ dovodi do povećanja količine WAT i hiperleptinemije (269). Ioni K^+ prisutni su u 98 % unutarstaničnom okolišu (140 – 150 mmol/L), a u izvanstaničnom okolišu održava se u u referentnom intervalu od 3,5-5,0 mmol/L (268,270). Regulacija transmembranskog prijenosa K^+ važna je za održavanje membranskog i akcijskog potencijala stanice, a stanja poremećene homeostaze K^+ kao u našim rezultatima najčešće se dovode u vezu s poremećenom funkcijom bubrega (270).

I BUN i CRE predstavljaju parametre funkcije bubrega. Povećane vrijednosti CRE ukazuju na početno oštećenje bubrega i potencijalni nefrotoksični učinak (187). Još je krajem 19. stoljeća Virchow ukazao na oštećenje bubrega uzrokovano prekomjernim unosom masne hrane (210), a kasnije je istraživanjima dokazano da konkretno dolazi do oštećenja podocita i mezangijske skleroze (271). U humanim istraživanjima nije zabilježena promjena u vrijednosti oba parametra nakon tromjesečne i šestomjesečne terapije isotretinoinom u dozi 1mg/kg (272). U animalnom je modelu, na štakorima soja Lewis, dokazano čak da primjena 13 cRA ima imunosupresivni i antifibrotični učinak te da sprječava napredovanje nekih oblika nefropatija (273).

U našem je istraživanju pokazano kako je koncentracija TC, TG, LDL-c i VLDL-c statistički značajno viša u HFD životinja u odnosu na STD, što je sukladno ranije objavljenim rezultatima (274). Povišena razina TG i TC ključna je u metabolizmu lipoproteina, te u skladu je s povišenim raazinama LDL-c koji je važan aterogeni pokazatelj. Naši rezultati, također, ukazuju na povećanje AIP, AC, CRR u jedinki na HFD, kao i na povećane koncentracije glukoze na kraju testa opterećenja glukozom, u 120′. Displipidemija i oksidacija LDL-c, kao i niske vrijednosti HDL-c su rizični čimbenici za razvoj koronarne bolesti srca (275). Osim toga, inzulinska rezistencija, zajedno s drugim poremećajima poput DM II, hipertenzije i dislipidemije (povišene koncentracije TC, LDL-c i TG u krvi) predstavlja glavne čimbenike rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti.

Inzulinska rezistencija početni je događaj DM II. Danas se zna da inzulinska rezistencija nije samo posljedica povećane sistemske vrijednosti glukoze u krvi zbog njezine nemogućnosti za ulazak u stanicu, nego ovisi i o brojnim drugim čimbenicima, uključujući hormone, adipokine i upalne citokine (276). Povećanje cirkulirajućih FFA smatra se ključnim događajem u patogenezi inzulinske rezistencije (44). U našem istraživanju, HFD nije samo uzrokovala promjene u metabolizmu lipida, nego i u metabolizmu glukoze, što je potvrđeno OGTT testom. HFD uz dodatak 13 cRA u obje koncentracije (7,5 mg/kg i 15 mg/kg) pokazala je statistički značajan porast u 120´ u odnosu prema kontrolnoj skupini STD-C. Najvjerojatnije objašnjenje za to je inzulinska rezistencija, ali to ne možemo sa sigurnošću pokazati s obzirom da u ovom istraživanju test tolerancije na inzulin nije bio izveden, kao niti provjera funkcije inzulinskog signalnog puta (fosforilirani inzulinski receptorski supstrat). U ovom smo istraživanju koristili omjer TG/ HDL-c kao zamjenski biljeg inzulinske rezistencije, što je pokazano i u nekim drugim istraživanjima (176). Prema postojećoj literaturi, omjer TG/HDL-c može biti biljeg kardiometaboličkih rizičnih čimbenika i kardiovaskularnih bolesti, kao i koristan parametar u hipertenzivnih osoba (177). Također, omjer TG/HDL-c može biti koristan parametar glikemijske kontrole u pretilih osoba i životinja, kao i u onih normalne tjelesne mase. Omjer TG/HDL-c pokazuje značajan porast u jedinki na HFD, kako u kontrolnoj, tako i u skupinama uz dodatak 13 cRA.

Poveznica između smanjenog unosa glukoze u stanicu i smanjene sekrecije inzulina kao i inzulinske rezistencije potvrđena je u ranije objavljenim istraživanjima (160,277). Promjene u metabolizmu glukoze događaju se zbog smanjenog broja inzulinskih receptora na stanicama i broja GLUT2 receptora na β stanicama gušterače (278), kao i narušenog unutarstaničnog signaliziranja koje sprječava unos glukoze u stanicu (279,280). Dodatak 13 cRA jedinkama na STD ne pokazuje statistički značajne promjene u koncentraciji glukoze tijekom testa, kao ni na kraju testa. Poremećaj metabolizma glukoze u jedinki na visokomasnoj prehrani korelira s povišenim vrijednostima proupalnih citokina: IL-6 i IL-1β, što je dokazano i u našem istraživanju.

Za masno tkivo je karakteristična infiltracija nekoliko tipova imunosnih stanica, poput monocita, neutrofila, Th1 i Th17 limfocita i M1 (protuupalnih) makrofaga čiji udio u pretilosti može biti i do 40 % ili 50 %. Pojačano izlučivanje FFA, zasićenih masnih kiselina i oksidiranih LDL-c te LPS promjenom crijevne mikroflore u pretilosti aktivira mirujuće makrofage i adipocite što dovodi do izlučivanja proupalnih citokina, kao što su IL-6, IL-1β i kemokina MCP-1, CCR2 i

CCR5. Ovi citokini dodatno mogu potaknuti novačenje monocita i diferencijaciju M1 makrofaga u masnom tkivu. U klasično aktiviranim (M1) makrofagima pojačano izraženi iNOS-a pridonosi upali masnog tkiva, inzulinskoj rezistenciji i raznim metaboličkim bolestima uključujući steatozu i fibrozu. Ovim bolestima jetre pridonosi, osim inzulinske rezistencije, hiperglikemija i hiperlipidemija s akumulacijom TG u hepatocitima (poremećena beta-oksidacija), ali i drugi čimbenici uključujući oksidacijski stres, apoptozu i crijevne endotoksine. Naši su rezultati pokazali da u skupinama najizraženijeg oksidacijskog stresa, najvećeg porasta težine i zabilježenih glikemijskih promjena (HFD s 13 cRA), postoji i porast serumske, bubrežne i jetrene koncentracije NO.

Narušavanje ravnoteže između oksidansa i antioksidansa, poznat u literaturi kao oksidacijski stres, često se navodi kao važan patogenetski mehanizam početka razvoja i napredovanja metaboličkog sindroma i njemu pridruženih poremećaja (281,282). Kao što je u uvodu spomenuto, oksidacijski poremećaj predstavlja povećano stvaranje ROS i RNS u stanicama, uz smanjenje antioksidansa poput vitamina C, E i A, te endogeno proizvedenih SOD, GSH i CAT. Navedna zbivanja uzrokuju oštećenja lipida, proteina, ugljikohidrata i DNA u stanicama rezultirajući staničnim i tkivnim oštećenjima (113,115).

HFD također vodi povećanom oksidacijskom stresu, što je u našem istraživanju dokazano na tkivu jetre i bubrega, uz povišene vrijednosti proupalnih citokina, koji potiče kroničnu upalu na što ukazuje i povećanje broja leukocita (leukocitoza) uz neutrofiliju kao biljeg kronične, nisko tinjajuće upale. Hiperleptinemija i leptinska rezistencija mogu povećati količinu ROS-a, oksidativni stres i potaknuti upalu na što ukazuju i ranije objavljena istraživanja potvrđujući da HFD vodi porastu oksidacijskog stresa u jetri i bubregu (283–285). MDA je stabilni produkt lipidne peroksidacije, kaskadne reakcije slobodnih kisikovih radikala s lipidima koji vode destabilizaciji stanične membrane. Povećanje MDA prati porast aktivnosti CAT i GSH posebice u skupini HFD s visokom dozom 13 cRA. GSH nije povećan u drugim skupinama na HFD što je u sukladu s drugim istraživanjima koje pokazuju da porast oksidativnog stresa ne mora biti praćen porastom GSH u jetri i bubregu (283,285,286).

Naši su rezultati u skladu s većinom rezultata dostupne literature koji potvrđuju porast lipidne peroksidacije u jedinki na HFD (283–285). Što se tiče utjecaja 13 cRA na parametre oksidacijskog stresa, u literaturi postoje dvojaki podatci. Naime, neki radovi upućuju na

antioksidativni učinak 13 cRA, kako u animalnom modelu, tako i u kulturi stanica (149,151). Druga skupina istraživača dokazuje prooksidativni učinak 13 cRA u tkivu jetre, mozga i bubrega, uzrokujući mitohondrijska oštećenja u stanicama, pogodujući lipidnoj peroksidaciji, karbonilaciji proteina i staničnoj smrti (137,142–144), što je u skladu s našim rezultatima gdje 13 cRA povećava oksidativna oštećenja u stanicama jetre i bubrega. U istraživanju Rigobella i sur. zabilježeno je trans RA mogu u kulturi stanica uzrokovati povećanu propusnost stanične membrane jetre, pospješujući gubitak njezine funkcionalnosti (138).

Povećanjem koncentracije 13 cRA u jedinki na HFD koncentracija adiponektina raste što se može pojasniti poznatim prouupalnim i antiaterogenim svojstvima adiponektina. U *in vitro* istraživanjima dokazano je da adiponektin ublažava upalu u endotelnim stanicama, mišićima, epitelnim stanicama pretežno preko aktivacije AMPK i cikličke AMP-protein kinaze (287,288). Adiponektin ima izravan učinak na upalne bolesti suprimirajući stvaranje ROS i NF-κB signalni put, te potičući protuupalni IL-10 (287,289,290).

Vitamin A je u masti topiv vitamin koji se veže za RBP, specifičan protein koji je nužan za njegov prijenos u cirkulaciji. Povišene koncentracije RBP-a i povećani izražaj RBP-a u masnom tkivu miša može uzrokovati poremećaj u inzulinskoj signalizaciji u mišićima i jetri, posljedično vodeći dijabetesu tipa II (134). S druge strane, retinaldehid, prekursor vitamina A, može povećati potrošnju energije aktivacijom mitohondrijskog UCP1 proteina i poticanjem posmeđivanja WAT, te tako utječući na gubitak tjelesne mase (127). Moguće je da porast GSH u skupini životinja HFD i visoke koncentracije 13 cRA djelomično smanjuje učinak oksidativnog stresa, što je vidljivo preko blagog porasta koncentracije adiponektina u navedenoj skupini, što je sukladno istraživanju Helioovaara i sur. (67). S druge strane, taj porast nije dostatan da bi dokinuo poremećaje u metabolizmu glukoze i aterogenim pokazateljima.

Sve gore spomenuto upućuje da retinol vezan za RBP ima potpuno drukčiju ulogu od 13 cRA u metabolizmu glukoze i lipida, što dodatno rasvjetljuje složen metabolizam vitamina A. Istraživanja na životinjama i humana istraživanja koje se bave proučavanjem veze između vitamina A i pretilosti, inzulinske signalizacije i dijabetesa tipa II su dvojaka, i važno je uzeti u razmatranje druge čimbenike poput genetike, dobi, spola, raspodjele masnog tkiva, funkcije bubrega (127), što sve utječe na ulogu vitamina A u pretilosti, raspodjeli masnog tkiva u organizmu i koncentraciji glukoze.

6. RASPRAVA

Sažimajući podatke dobivene u ovom istraživanju, svi rezultati iz našeg istraživanja upućuju da HFD prehrana Lewis štakora uzrokuje pretilost, što je potvrđeno zabilježenim porastom tjelesne mase, pretilošću, dislipidemijom, hiperleptinemijom, visokim vrijednostima VLDL-a, oksidativnim stresom jetre i bubrega te povećanjem u aterogenim pokazateljima. Dodatak 13 cRA imao je negativan učinak na sve istraživane parametre u HFD hranjenih Lewis štakora. Čini se da različiti sojevi štakora različito odgovaraju na prehranu bogatu mastima, osobito uz dodatak 13 cRA. Daljnja istraživanja su potrebna za razjašnjavanje imunosnih i histopatoloških promjena u tkivima i razjašnjavanje uloge 13 cRA u STD i HFD hranjenih štakora soja Lewis.

7. ZAKLJUČAK

Temeljem dobivenih rezultata donosimo zaključke kako slijedi:

- Dugoročna prehrana štakorica soja Lewis s HFD, u odnosu na STD prehranu, uz primjenu 13 cRA u ranoj fazi života vodi metaboličkim i biokemijskim promjenama:
  - porastu tjelesne mase, povećanju ukupnog masnog tkiva i adipoznog indeksa
  - poremećaju lipidnih odrednica u krvi, porastu TG, TC, LDL-c, VLDL-c te smanjenju razine HDL-c i nastanku dislipidemije,
  - poremećaju razine hormona leptina i adiponektina te nastanku hiperleptinemije,
  - smanjenju oralne tolerancije na glukozu, poremećaju odnosa TG/HDL-c i porastu leptina
  - povećanju upalnih odrednica u serumu, porastu NO i Th1 citokina (IL-1β, IL-6, INF-γ) te polarizaciji makrofaga prema M1 makrofagnom fenotipu
  - povećanju oksidativnog stresa u jetri i bubregu
  - povećanju aterogenih pokazatelja u krvi AIP, AC, CRR te smanjenju CPI
  - pojavnosti histopatoloških promjena u jetri, posebice mikrovezikularne steatoze.

- Dugoročna prehrana štakorica soja Lewis s 13 cRA u kombinaciji sa STD nije izazvala značajne metaboličke promjene, osim:
  - neznatnog povećnja razine TG, TC i aterogenih odrednica
  - smanjenja razine leptina.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Cilj je rada bio istražiti ulogu visokomasne hrane i derivata vitamina A, 13 cRA na metaboličke, upalne i adipogene parametre u ženki štakorica soja Lewis.

Nacrt studije: Štakorice soja Lewis podijeljene su u 2 velike skupine, hranjene standardnom (STD) i visokomasnom (HFD), gdje 45 % od ukupne energije otpada na zasićene masti) hranom. Patofiziološke promjene izazvane su oralnom primjenom 13-cis retinoične kiseline (13 cRA) gastričnom kanilom u dozi od 7,5 mg/kg i 15 mg/kg tijekom 30 dana. Kontrolna skupina je obrađena suncokretovim uljem. Nakon 30-dnevne obrade, životinje su dodatnih 30 dana hranjene STD ili HFD hranom *ad libitum* prema protokolu te žrtvovane 60 dana.

Materijal i metode: Tijekom pokusa praćena je tjelesna masa, a neposredno prije žrtvovanja, napravljen je oralni test tolerancije na glukozu (OGTT test). Prilikom žrtvovanja uzeti su uzorci krvi iz abdominalne aorte za hematološku i biokemijsku analizu, analizu lipidograma i aterogenih pokazatelja, koncentracije NO, arginaze i 12 proupalnih citokina, hormona leptina i adiponektina. Iz tkiva jetre i bubrega analizirani su parametri oksidacijskog stresa, a dio tkiva jetre poslužio je za histološku analizu i procjenu stupnja steatoze i fibroze dok je masno tkivo uzeto za procjenu adipoznog indeksa.

Rezultati: Prehrana bogata mastima uz dodatak 13 cRA dovela je do povećanja tjelesne mase štakora, adipoznog indeksa, dislipidemije, hiperleptinemije, koncentracije VLDL-a, oksidativnog stresa jetre i bubrega, te aterogenih pokazatelja. Primjena 13 cRA u jedinki na STD nije dovela do promjena tjelesne mase tijekom 60-dnevnog tretmana, ali je dovela do blage promjene lipidograma, a dislipidemija je od ranije poznata nuspojava primjene retinoida.

Zaključak: 13 cRA i HFD utječu na metaboličke parametre, metabolizam glukoze i lipida te njihova primjena ima različit utjecaj na metaboličke parametre u ovisnosti o primjeni STD ili HFD hrane. Rezultati doprinose rasvjetljavanju složene uloge derivata vitamina A u patogenezi pretilosti. Ostali se čimbenici, poput genetike, soja kojem je primijenjena terapija, starosti, spola, raspodjele masnog tkiva u organizmu također trebaju uzeti u obzir.

Ključne riječi: isotretinoin; lipidi; metabolički sindrom; oksidativni stres; visokomasna hrana

9. SUMMARY

THE EFFECT OF HIGH FAT DIET AND 13-CIS RETINOIC ACID APPLICATION ON LIPID PROFILE, GLYCEMIC RESPONSE AND OXIDATIVE STRESS IN FEMALE LEWIS RATS

Study objective: The aim of this study was to determine the effect of high fat diet and 13 cRA, on metabolic, adipogenic and inflammatory parameters in female Lewis rats.

Study design: Rats were divided into two groups: rats fed STD and fed HFD, where saturated fatty acids accounted for 45 % of total energy. There were three additional groups (6 rats per): two groups that received 13 cRA (7,5 mg/kg and 15 mg/kg) during a 30-day period and the control group that was given sunflower oil. Animals were sacrificed after 60 days.

Material and methods: Body weight was monitored during the experiment. Shortly before the sacrifice, OGTT was performed. Venous blood sample was taken for haematological, biochemical analysis, levels of NO, arginase and proinflammatory cytokines, leptin and adiponectin, lipidogram and atherogenic parameters. Samples of liver and kidney tissue were taken for the analysis of oxidative stress parameters and liver tissue was also histologically analysed.

Results: High fat diet with the 13 cRA supplementation resulted in increased weight gain, adiposity index, dyslipidaemia, hyperleptinaemia, VLDL concentrations, liver and kidney oxidative stress and atherogenic indices. Administration of 13 cRA in Lewis rats fed STD did not change the weight of the animals during the 60-day treatment, but it did lead to a slight change in lipidogram parameters. Here it should be noted that dyslipidaemia is an already known side effect of retinoid application.

Conclusion: 13 cRA and HFD affect metabolic parameters, as well as glucose and lipid metabolism. Its administration has a different effect on metabolic parameters, depending on whether the STD or the HFD was applied. This study further clarified the complex role of vitamin A derivates in obesity pathogenesis. It is also important to consider other factors, such as genetics, particular strain which was given the therapy, age, sex, and adipose tissue distribution in the organism.

Keywords: high fat diet; isotretinoin; lipids; metabolic syndrome; oxidative stress

10. LITERATURA

1. Wagner A, Dallongeville J, Haas B, Ruidavets JB, Amouyel P, Ferrières J, i sur. Sedentary behavior, physical activity and dietary patterns are independently associated with the metabolic syndrome. Diabetes Metab. 2012;38:428–35.

2. Keys A, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, Taylor HL. Indices of relative weight and obesity. Int J Epidemiol. 2014;43:655–65.

3. Aronne LJ. Classification of obesity and assessment of obesity-related health risks. Obes Res. 2002;10:105–15.

4. Wang YC, McPherson K, Marsh T, Gortmaker SL, Brown M. Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. The Lancet. 2011;378:815–25.

5. Hotamisligil GS, Erbay E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. Nat Rev Immunol. 2008;8:923–34.

6. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: Common threads and missing links. Cell. 2012;148:852–71.

7. Boyle JP, Thompson TJ, Gregg EW, Barker LE, Williamson DF. Projection of the year 2050 burden of diabetes in the US adult population: Dynamic modeling of incidence, mortality, and prediabetes prevalence. Popul Health Metr. 2010;8:29.

8. Carr DB, Utzschneider KM, Hull RL, Kodama K, Retzlaff BM, Brunzell JD, i sur. Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. Diabetes. 2004;53:2087–94.

9. Eckel RH, Alberti K, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. Lancet. 2010;375:181–3.

10. Carrier A. Metabolic syndrome and oxidative stress: a complex relationship. Antioxid Redox Signal. 2017;26:429-431.

11. Yao L, Herlea-Pana O, Heuser-Baker J, Chen Y, Barlic-Dicen J. Roles of the chemokine system in development of obesity, insulin resistance, and cardiovascular disease. J Immunol Res. 2014; 2014:1-11.

12. Corrie C, Layla W, Sweazea AKL. Six-Week High-Fat Diet Alters the Gut Microbiome and Promotes Cecal Inflammation, Endotoxin Production, and Simple Steatosis without Obesity in Male Rats. Lipids. 2019;54:119-131.

13. Attie AD, Scherer PE. Adipocyte metabolism and obesity. J Lipid Res. 2009;50:395–9.

14. Junqueira LC, Carneiro J. Osnove histologije. Prema 10. američkom izd. Zagreb: Školska knjiga; 2005.

15. Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: The role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. Int J Mol Cell Med. 2014;15:6184–223.

16. Lee Y-H, Thacker R, Hall B, Kong R, Granneman JG. Exploring the activated adipogenic niche: Interactions of macrophages and adipocyte progenitors. Cell Cycle. 2014;13:184–90.

17. Tateya S, Kim F, Tamori Y. Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. Front Endocrinol. 2013;4:1–14.

18. Daemen S, Schilling JD. The Interplay Between Tissue Niche and Macrophage Cellular Metabolism in Obesity. Front Immunol. 2020;10:1–16.

19. Lynch L, Nowak M, Varghese B, Clark J, Hogan AE, Toxavidis V, i sur. Adipose Tissue Invariant NKT Cells Protect against Diet-Induced Obesity and Metabolic Disorder through Regulatory Cytokine Production. Immunity. 2012;37:574–87.

20. Bigornia SJ, Farb MG, Mott MM, Hess DT, Carmine B, Fiscale A, i sur. Relation of depot-specific adipose inflammation to insulin resistance in human obesity. Nutr Diabetes. 2012;2:30-6.

21. Jeyakumar SM, Vajreswari A. Vitamin a as a key regulator of obesity & its associated disorders: Evidences from an obese rat model. Indian J Med Res. 2015;141:275–84.

22. Pellegrinelli V, Carobbio S, Vidal-Puig A. Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. Diabetologia. 2016;59:1075–88.

23. Prins JB, Rahilly SO. Regulation of adipose cell number in man. Clin Sci (Lond). 1997;92:3-11.

24. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Hosoya Y, Yamashita H, Fujita H, i sur. Adipogenesis in Obesity Requires Close Interplay. Diabetes. 2007;56:1517–26.

25. Parlee SD, Lentz SI, Mori H, MacDougald OA. Quantifying size and number of adipocytes in adipose tissue. Methods Enzymol. 2014;537:93–122.

26. Sun K, Tordjman J, Clément K, Scherer PE. Fibrosis and adipose tissue dysfunction. Cell Metab. 2013;18:470–7.

27. Spencer M, Yao-Borengasser A, Unal R, Rasouli N, Gurley CM, Zhu B, i sur. Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010;299:1016-27.

28. Jensen MD. Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. J Clin Endocrinol Metab. 2008;93:57–63.

29. Wajchenberg BL, Giannella-Neto D, Da Silva MER, Santos RF. Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. Horm Metab Res. 2002;34:616–21.

30. Boyko EJ, Fujimoto WY, Leonetti DL, Newell-Morris L. Visceral adiposity and risk of type 2 diabetes. Diabetes Care. 2000;23:465–71.

31. Misra A. Relationship of anterior and posterior subcutaneous abdominal fat to insulin sensitivity in nondiabetic men. Obes Res. 1997;5:93–9.

32. Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, Okamatsu-Ogura Y, Kameya T, Kawai Y, i sur. Age-related decrease in cold-activated brown adipose tissue and accumulation of body fat in healthy humans. Obesity. 2011;19:1755–60.

33. Florez-Duquet M, Horwitz BA, McDonald RB. Cellular proliferation and UCP content in brown adipose tissue of cold- exposed aging Fischer 344 rats. Am J Physiol. 1998;274:196–203.

34. Giordano A, Smorlesi A, Frontini A, Barbatelli G, Cint S. White, brown and pink adipocytes: The extraordinary plasticity of the adipose organ. Eur J Endocrinol. 2014;170:159-71.

35. Kelesidis T, Kelesidis I, Chou S, Mantzoros CS. The Role of Leptin in human Physiology: emerging clinical applications. Ann Intern Med. 2011;152:93–100.

36. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature. 1994;372.425–32.

37. Bjorbæk C, Elmquist JK, Michl P, Ahima RS, van Bueren A, McCall AL, i sur. Expression of Leptin Receptor Isoforms in Rat Brain Microvessels. Endocrinology. 1998;139:3485–91.

38. Licinio J, Mantzoros C, Negrão AB, Cizza G, Wong M-L, Bongiorno PB, i sur. Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary–adrenal function. Nat Med. 1997;3:575–9.

39. Haynes WG, Morgan DA, Walsh SA, Mark AL, Sivitz WI. Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. J Clin Invest. 1997;100:270–8.

40. Collins S, Kuhn CM, Petro AE, Swick AG, Chrunyk BA, Surwit RS. Role of leptin in fat regulation. Nature. 1996;380:677–677.

41. Scarpace PJ, Matheny M, Pollock BH, Tümer N. Leptin increases uncoupling protein expression and energy expenditure. Am J Physiol Endocrinol Metab. 1997;273:226–30.

42. Chan JL, Mietus JE, Raciti PM, Goldberger AL, Mantzoros CS. Short-term fasting-induced autonomic activation and changes in catecholamine levels are not mediated by changes in leptin levels in healthy humans. Clin Endocrinol. 2007;66:49–57.

43. Gruzdeva O, Borodkina D, Uchasova E, Dyleva Y, Barbarash O. Leptin resistance: Underlying mechanisms and diagnosis. Diabetes Metab Syndr Obes. 2019;12:191–8.

44. Rochlani Y, Pothineni NV, Kovelamudi S. Metabolic syndrome : pathophysiology, management , and modulation by natural compounds. Ther Adv Cardiovasc Dis. 2017;11: 215–225.

45. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation- induced immunosuppression. Nature. 1998;394:897–901.

46. Naylor C, Petri WA. Leptin Regulation of Immune Responses. Trends Mol Med. 2016;22:88–98.

47. Pérez-Pérez A, Vilariño-García T, Fernández-Riejos P, Martín-González J, Segura-Egea JJ, Sánchez-Margalet V. Role of leptin as a link between metabolism and the immune system. Cytokine Growth Factor Rev. 2017;35:71–84.

48. Francisco V, Pino J, Campos-Cabaleiro V, Ruiz-Fernández C, Mera A, Gonzalez-Gay MA, i sur. Obesity, Fat Mass and Immune System: Role for Leptin. Front Physiol. 2018;9:1–20.

49. Beltowski J. Leptin decreases plasma paraoxonase 1 (PON1) activity and induces oxidative stress: the possible novel mechanism for proatherogenic effect of chronic hyperleptinemia. Atheroscler. 2003;170:21–9.

50. Fortuño A, Bidegain J, Baltanás A, Moreno MU, Montero L, Landecho MF, i sur. Is leptin involved in phagocytic NADPH oxidase overactivity in obesity? Potential clinical implications. J Hypertens. 2010;28:1944–50.

51. 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;270:26746–9.

52. Achari AE, Jain SK. Adiponectin, a therapeutic target for obesity, diabetes, and endothelial dysfunction. Int J Mol Sci. 2017;18:1321.

53. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, i sur. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. Nature. 2003;423:762–9.

54. Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao TS, Lodish HF. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:10308–13.

55. Caminos JE, Nogueiras R, Gallego R, Bravo S, Tovar S, García-Caballero T, i sur. Expression and Regulation of Adiponectin and Receptor in Human and Rat Placenta. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90:4276–86.

56. Berner HS, Lyngstadaas SP, Spahr A, Monjo M, Thommesen L, Drevon CA, i sur. Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells. Bone. 2004;35:842–9.

57. Yoda-Murakami M, Taniguchi M, Takahashi K, Kawamata S, Saito K, Choi-Miura N-H, i sur. Change in Expression of GBP28/Adiponectin in Carbon Tetrachloride-Administrated Mouse Liver. Biochem Biophys Res Commun. 2001;285:372–7.

58. Patel J V, Abraheem A, Dotsenko O, Creamer J, Gunning M, Hughes EA, i sur. Circulating serum adiponectin levels in patients with coronary artery disease: relationship to atherosclerotic burden and cardiac function. J Intern Med. 2008;264:593–8.

59. Delaigle AM, Jonas J-C, Bauche IB, Cornu O, Brichard SM. Induction of Adiponectin in Skeletal Muscle by Inflammatory Cytokines: in Vivo and in Vitro Studies. Endocrinology. 2004;145:5589–97.

60. Mao X, Kikani CK, Riojas RA, Langlais P, Wang L, Ramos FJ, i sur. APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. Nat Cell Biol. 200;8:516–23.

61. Fruebis J. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98:2005–10.

62. Matsuda M, Shimomura I, Sata M, Arita Y, Nishida M, Maeda N, i sur. Role of Adiponectin in Preventing Vascular Stenosis. J Biol Chem. 2002;277:37487–91.

63. Kim J-Y, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, i sur. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. J Clin Invest. 2007;117:2621–37.

64. Ye J-M, Doyle PJ, Iglesias MA, Watson DG, Cooney GJ, Kraegen EW. Peroxisome Proliferator--Activated Receptor (PPAR) - Activation Lowers Muscle Lipids and Improves

Insulin Sensitivity in High Fat--Fed Rats: Comparison With PPAR- Activation. Diabetes. 2001;50:411–7.

65. Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KSL, Cooper GJS. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. J Clin Invest. 2003;112:91–100.

66. Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, i sur. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. Nat. Med. 2007;13:332–9.

67. Heliövaara MK, Remitz A, Reitamo S, Teppo AM, Karonen SL, Ebeling P. 13-cis-Retinoic acid therapy induces insulin resistance, regulates inflammatory parameters, and paradoxically increases serum adiponectin concentration. Metabolism. 2007;56:786–91.

68. De Luca C, Olefsky JM. Inflammation and insulin resistance. FEBS Lett. 2008;582:97–105.

69. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-α in human obesity and insulin resistance. J Clin Invest. 1995;95:2409–15.

70. Picchi A, Gao X, Belmadani S, Potter BJ, Focardi M, Chilian WM, i sur. Tumor Necrosis Factor-Induces Endothelial Dysfunction in the Prediabetic Metabolic Syndrome. Circ Res. 2006; 99:69-77.

71. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-α: Direct role in obesity-linked insulin resistance. Science. 1993;259:87–91.

72. Ruan H, Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: Direct and indirect effects of tumor necrosis factor-α. Cytokine Growth Factor Rev. 2003;14:447–55.

73. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-α function. Nature. 1997;389:610–4.

74. Weisberg SP, Mccann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation. J Clin Invest. 2003;112:1796–1808.

75. Boesten LSM, Zadelaar ASM, Van Nieuwkoop A, Gijbels MJJ, De Winther MPJ, Havekes LM, i sur. Tumor necrosis factor-α promotes atherosclerotic lesion progression in APOE*3-leiden transgenic mice. Cardiovasc Res. 2005;66:179–85.

76. Hector J, Schwarzloh B, Goehring J, Strate TC, Hess UF, Deuretzbacher C, i sur. TNF-α alters visfatin and adiponectin levels in human fat. Horm Metab Res. 2007;39:250–5.

77. Fernández-Real JM, Ricart W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. Endocr Rev. 2003;24:278–301.

78. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, i sur. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-α, in vivo. J Clin Endocrinol Metab. 1997;82:4196–200.

79. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and Subcutaneous Adipose Tissues of Obese Subjects Release Interleukin-6: Depot Difference and Regulation by Glucocorticoid 1. J Clin Endocrinol Metab. 1998;83:847–50.

80. Wieckowska A, Papouchado BG, Li Z, Lopez R, Zein NN, Feldstein AE. Increased Hepatic and Circulating Interleukin-6 Levels in Human Nonalcoholic Steatohepatitis. Am J Gastroenterol. 2008;103:1372–9.

81. Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, i sur. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87:2084–9.

82. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, i sur. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. J Biol Chem. 2003;278:13740–6.

83. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89:2548–56.

84. Esposito K, Pontillo A, Ciotola M, Di Palo C, Grella E, Nicoletti G, i sur. Weight loss reduces interleukin-18 levels in obese women. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87:3864–6.

85. Rider P, Carmi Y, Guttman O, Braiman A, Cohen I, Voronov E, i sur. IL-1α and IL-1β Recruit Different Myeloid Cells and Promote Different Stages of Sterile Inflammation. J Immunol. 2011;187:4835–43.

86. Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. Blood. 1991;77:1627–52.

87. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. Immunity. 2013;39:1003–18.

88. Jager J, Grémeaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Interleukin-1β-Induced Insulin Resistance in Adipocytes through Down-Regulation of Insulin Receptor Substrate-1 Expression. Endocrinology. 2007;148:241–51.

89. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. J Allergy Clin Immunol. 2005;115:911–9.

90. Ebert T, Roth I, Richter J, Tönjes A, Kralisch S, Lossner U, i sur. Different associations of adipokines in lean and healthy adults. Horm Metab Res. 2014;46:41–7.

91. Kraakman MJ, Murphy AJ, Jandeleit-Dahm K, Kammoun HL. Macrophage polarization in obesity and type 2 diabetes: Weighing down our understanding of macrophage function? Front Immunol. 2014;5:1–6.

92. Haase J, Weyer U, Immig K, Klöting N, Blüher M, Eilers J, i sur. Local proliferation of macrophages in adipose tissue during obesity-induced inflammation. Diabetologia. 2014;57:562–71.

93. Castoldi A, De Souza CN, Saraiva Câmara NO, Moraes-Vieira PM. The macrophage switch in obesity development. Front. Immunol. 2016;6:1–11.

94. Chylikova J, Dvorackova J, Tauber Z, Kamarad V. M1/M2 macrophage polarization in human obese adipose tissue. Biomed Papers. 2018;162:79–82.

95. Caricilli AM, Picardi PK, de Abreu LL, Ueno M, Prada PO, Ropelle ER, i sur. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. PLoS Biol. 2011;9: e1001212.

96. Pohjanpelto P, Holtta E. Arginase activity of different cells in tissue culture. Biochim Biophys Acta. 1983;151:191–5.

97. Morris SM. Arginine metabolism in vascular biology and disease. Vasc Med. 2005;10:83–7.

98. Vahora H, Khan MA, Alalami U, Hussain A. The Potential Role of Nitric Oxide in Halting Cancer Progression Through Chemoprevention. J Cancer Prev. 2016;21:1–12.

99. Pernow J, Jung C. Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: Reversal of arginine steal? Cardiovasc Res. 2013;98:334–43.

100. Getz GS, Reardon CA. Arginine/arginase NO NO NO. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006;26:237–9.

101. Wei LH, Jacobs AT, Morris SM, Ignarro LJ. IL-4 and IL-13 upregulate arginase I expression by cAMP and JAK/STAT6 pathways in vascular smooth muscle cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2000;279:248–56.

102. Peyton KJ, Liu X, Shebib AR, Johnson FK, Johnson RA, Durante W. Arginase inhibition prevents the development of hypertension and improves insulin resistance in obese rats. Amino Acids. 2019;50:747–54.

103. Moon J, Do HJ, Cho Y, Shin MJ. Arginase inhibition ameliorates hepatic metabolic abnormalities in obese mice. PLoS One. 2014;9:1–10.

104. Angulo P. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. N Engl J Med. 2002 Apr 18;346:1221–31.

105. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, i sur. Nonalcoholic Fatty Liver, Steatohepatitis, and the Metabolic Syndrome. Hepatology. 2003;37:917-23.

106. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, i sur. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: Impact of ethnicity. Hepatology. 2004;40:1387–95.

107. Bedossa P. Pathology of non-alcoholic fatty liver disease. Liver Int. 2017;37:85–9.

108. Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S. Alterations in Adipose Tissue and Hepatic Lipid Kinetics in Obese Men and Women With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Gastroenterology. 2008;134:424–31.

109. Day CP, James OFW. Steatohepatitis: A tale of two "Hits"? Gastroenterology. 1998;114:842–5.

110. Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathology and Pathogenesis. Annu Rev Pathol. 2010;5:145–71.

111. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. Hepatology. 2010;52:1836–46.

112. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, i sur. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. Nat Genet. 2008;40:1461–5.

113. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. World Allergy Organ J. 2012;5:9-19.

114. Gasparovic AC, Zarkovic N, Zarkovic K, Semen K, Kaminskyy D, Yelisyeyeva O, i sur. Biomarkers of oxidative and nitro-oxidative stress: conventional and novel approaches. Br J Pharmacol. 2017;174:1771-83.

115. Maritim AC, Sanders RA, Iii JBW. Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants : A Review. J Biochem Mol Toxicol. 2003;17:24-38.

116. Bautista M, Esquivel-Soto J, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Valadez-Vega C. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. Int J Mol Sci. 2011;12:3117-32.

117. Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White CR, Jo H, Freeman BA, i sur. Biological aspects of reactive nitrogen species. Biochim Biophys Acta Bioenerg. 1999;1411:385–400.

118. Girotti AW. Mechanisms of lipid peroxidation. J Free Radic Biol Med. 1985;1:87–95.

119. Montuschi P, Collins J V., Ciabattoni G, Lazzeri N, Corradi M, Kharitonov SA, i sur. Exhaled 8-Isoprostane as an In Vivo Biomarker of Lung Oxidative Stress in Patients with COPD and Healthy Smokers. Am J Respir Crit Care Med. 2000;162:1175–7.

120. Nowak D, Kasielski M, Antczak A, Pietras T, Bialasiewicz P. Increased content of thiobarbituric acid-reactive substances and hydrogen peroxide in the expired breath condensate of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease: no significant effect of cigarette smoking. Respir Med. 1999;93:389–96.

121. Kelly FJ, Mudway IS. Protein oxidation at the air-lung interface. Amino Acids. 2003;25:375–96.

122. Akira S, Kishimoto T. NF-IL6 and NF-kappa B in cytokine gene regulation. Adv Immunol. 1997;65:1–46.

123. Manna P, Jain SK. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. Metab Syndr Relat Disord. 2015;13:423–44.

124. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, i sur. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. J Clin Invest. 2004; 114: 1752–61.

125. Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, Parisi E, Di Rosa G, i sur. Oxidative stress in obesity: A critical component in human diseases. Int J Mol Sci. 2015;16:378–400.

126. Di Domenico M, Pinto F, Quagliuolo L, Contaldo M, Settembre G, Romano A, i sur. The Role of Oxidative Stress and Hormones in Controlling Obesity. Front Endocrinol. 2019;10:1–13.

127. Mody N. Alterations in vitamin A/retinoic acid homeostasis in diet-induced obesity and insulin resistance. Proc Nutr Soc. 2017;76:597–602.

128. Eastep J, Chen G. The relationships of high-fat diet and metabolism of lipophilic vitamins. Integr Food Nutr Metab. 2015;2:174–9.

129. García OP. Micronutrients, immunology and inflammation: Effect of vitamin A deficiency on the immune response in obesity. Proc Nutr Soc. 2012;71:290–7.

130. Napoli JL. Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 1999;1440:139–62.

131. Napoli JL. Physiological insights into all-trans-retinoic acid biosynthesis. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 2012;1821:152–67.

132. Noy N. Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. Biochem J. 2000;348:481–95.

133. Sato M, Hiragun A, Mitsui H. Preadipocytes possess cellular retinoid binding proteins and their differentiation is inhibited by retinoids. Biochem Biophys Res Commun. 1980;95:1839–45.

134. Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, i sur. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. Nature. 2005;436:356–62.

135. Jeyakumar S, Vajreswari A. Vitamin A as a key regulator of obesity & its associated disorders: Evidences from an obese rat model. Indian J Med Res. 2015; 141: 275–84.

136. Zarei L, Rad SM, Fard AA. Co-administration of retinoic acid and atorvastatin mitigates high-fat diet induced renal damage in rats. Vet Res Forum. 2019;10:133–8.

137. De Oliveira MR. Vitamin A and Retinoids as Mitochondrial Toxicants. Oxid Med Cell Longev. 2015;2015:1–13.

138. Rigobello MP, Scutari G, Friso A, Barzon E, Artusi S, Bindoli A. Mitochondrial permeability transition and release of cytochrome c induced by retinoic acids. Biochem Pharmacol. 1999;58:665–70.

139. De Oliveira MR, Soares Oliveira MW, Müller Hoff ML, Behr GA, da Rocha RF, i sur. Evaluation of redox and bioenergetics states in the liver of vitamin A-treated rats. Eur J Pharmacol. 2009;610:99–105.

140. De Oliveira MR, Oliveira MWS, Lorenzi R, Fagundes Da Rocha R, Fonseca Moreira JC. Short-term vitamin A supplementation at therapeutic doses induces a pro-oxidative state in the hepatic environment and facilitates calcium-ion-induced oxidative stress in rat liver mitochondria independently from permeability transition pore formation. Cell Biol Toxicol. 2009;25:545–60.

141. De Oliveira MR, Silvestrin RB, Mello e Souza T, Moreira JCF. Oxidative stress in the hippocampus, anxiety-like behavior and decreased locomotory and exploratory activity of adult rats: Effects of subacute vitamin A supplementation at therapeutic doses. NeuroToxicology. 2007;28:1191–9.

142. De Oliveira MR, de Bittencourt Pasquali MA, Silvestrin RB, Mello e Souza T, Moreira JCF. Vitamin A supplementation induces a prooxidative state in the striatum and impairs locomotory and exploratory activity of adult rats. Brain Research. 2007;1169:112–9.

143. De Oliveira MR, Moreira JCF. Acute and chronic vitamin A supplementation at therapeutic doses induces oxidative stress in submitochondrial particles isolated from cerebral cortex and cerebellum of adult rats. Toxicol Lett. 2007;173:145–50.

144. De Oliveira MR, Silvestrin RB, Mello E Souza T, Moreira JCF. Therapeutic vitamin A doses increase the levels of markers of oxidative insult in substantia nigra and decrease locomotory and exploratory activity in rats after acute and chronic supplementation. Neurochem Res. 2008;33:378–83.

145. Crandall J, Sakai Y, Zhang J, Koul O, Mineur Y, Crusio WE, i sur. 13-Cis-Retinoic Acid Suppresses Hippocampal Cell Division and Hippocampal-Dependent Learning in Mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:5111–6.

146. Wolverton SE, Harper JC. Important controversies associated with isotretinoin therapy for acne. Am J Clin Dermatol. 2013;14:71–6.

147. Saitta P, Keehan P, Yousif J, Way B V, Grekin S, Brancaccio R. An update on the presence of psychiatric comorbidities in acne patients, Part 2: Depression, anxiety, and suicide. Cutis. 2011;88:92–7.

148. Nevoralová Z, Dvořáková D. Mood changes, depression and suicide risk during isotretinoin treatment: A prospective study. Int J Dermatol. 2013;52:163–8.

149. Samokyszyn VM, Marnett LJ. Inhibition of microsomal lipid peroxidation by 13-cis-retinoic acid. Methods Enzymol. 1990;190:281–8.

150. Geng C, Xu H, Zhang Y, Gao Y, Li M, Liu X, i sur. Retinoic acid ameliorates high-fat diet-induced liver steatosis through sirt1. Sci China Life Sci. 2017;60:1234–41.

151. Sultana S, Alam A, Sharma S, Khan N. 13-cis Retinoic acid ameliorates benzoyl peroxide-induced oxidative stress and hyperproliferative response in murine skin: A chemopreventive study. Cancer Detect Prev. 2004;28:200–7.

152. Kotnik P, Fischer-Posovszky P, Wabitsch M. RBP4: a controversial adipokine. Eur J Endocrinol. 2011;165:703-11.

153. Williams HC, Dellavalle RP, Garner S. Acne vulgaris. The Lancet. 2012;379:361–72.

154. Ferguson SA, Cisneros FJ, Gough BJ, Ali SF. Four weeks of oral isotretinoin treatment causes few signs of general toxicity in male and female Sprague – Dawley rats. 2005;43:1289–96.

155. Reynolds CP, Matthay KK, Villablanca JG, Maurer BJ. Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma. Cancer Lett. 2003;197:185–92.

156. Wieder R, Pavlick AC, Bryan M, Hameed M, Baredes S, Pliner L, i sur. Phase I/II Trial of Accutane as a Potentiator of Carboplatin and Paclitaxel in Squamous Cell Carcinomas. Am J Clin Oncol. 2002;25:447–50.

157. Park H, Del Rosso JQ. Questions • challenges • controversies: Use of oral isotretinoin in the management of rosacea. J Clin Aesthet Dermatol. 2011;4:54–61.

158. De Souza Leão Kamamoto C, Sanudo A, Hassun KM, Bagatin E. Low-dose oral isotretinoin for moderate to severe seborrhea and seborrheic dermatitis: a randomized comparative trial. Int J Dermatol. 2017;56:80–5.

159. Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Fairus A, Ima-Nirwana S. Animal models of metabolic syndrome: a review. Nutr Metab. 2016;13:1–12.

160. Huang B, Chiang M, Yao H, Chiang W. The effect of high-fat and high-fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats. Diabetes Obes Metab. 2004;6:120-6.

161. Pitarokoili K, Ambrosius B, Gold R. Lewis Rat Model of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Curr Protoc Neurosci. 2017;81:1-20.

162. Castañeda-Lopez ME, Garza-Veloz I, Ortiz-Rodriguez JM, Castañeda-Miranda R, Solis-Sanchez LO, Vega-Carrillo HR, i sur. Animal Models of Rheumatoid Arthritis. Animal Model Exp Med. 2018;13:258-80.

163. Ibarra A. Sprague-Dawley rats display differences in lipid peroxidation, motor recovery, and rubrospinal tract preservation after spinal cord injury. 2015;6:1–7.

164. Banik RK, Sato J, Yajima H, Mizumura K. Differences between the Lewis and Sprague Dawley rats in chronic in ammation induced norepinephrine sensitivity of cutaneous C- fiber nociceptors. 2001;299:21–4.

165. Iannaccone PM, Jacob HJ. Rats! Disease Models & Mechanisms. 2009;2:206–10.

166. Oršolić N, Kunštić M, Kukolj M, Gračan R, Nemrava J. Oxidative stress, polarization of macrophages and tumour angiogenesis: Efficacy of caffeic acid. Chem Biol Interact. 2016;256:111-24.

167. Ferguson SA, Siitonen PH, Cisneros FJ, Gough B, Young JF. Steady state pharmacokinetics of oral treatment with 13-cis-retinoic acid or all-trans-retinoic acid in male and female adult rats. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2006;98:582–7.

168. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193:265–75.

169. Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 1984;105:121–6.

170. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. Anal Biochem. 1969;27:502–22.

171. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, i sur. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology. 2005;41:1313–21.

172. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods. 2012;9:676-682.

173. Erdfelder E, Faul F, Buchner A. GPower: A general power analysis program. Behav Res Methods Instrum Comput. 1996;28:1–11.

174. Charan J, Kantharia N. How to calculate sample size in animal studies? J Pharmacol Pharmacother. 2013;4:303-6.

175. Bowe JE, Franklin ZJ, Hauge-Evans AC, King AJ, Persaud SJ, Jones PM. Metabolic phenotyping guidelines: Assessing glucose homeostasis in rodent models. J Endocrinol. 2014;222:13–25.

176. Behiry EG, El Nady NM, AbdEl Haie OM, Mattar MK, Magdy A. Evaluation of TG-HDL Ratio Instead of HOMA Ratio as Insulin Resistance Marker in Overweight and Children with Obesity. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 2019;19:676–82.

177. Borrayo G. Tg/Hdl-c Ratio as Cardio-Metabolic Biomarker even in Normal Weight Women. Acta Endocrinol (Bucharest). 2018;14:261–7.

178. Fujita K, Wada K, Nozaki Y, Yoneda M, Endo H, Takahashi H, et al. Serum nitric oxide metabolite as a biomarker of visceral fat accumulation: Clinical significance of measurement for nitrate/nitrite. Med Sci Monit Basic Res. 2011;17:123–31.

179. Martins IJ, Redgrave TG. Obesity and post-prandial lipid metabolism. Feast or famine? J Nutr Biochem. 2004;15:130–41.

180. Jeyakumar SM, Vijaya Kumar P, Giridharan N V., Vajreswari A. Vitamin A improves insulin sensitivity by increasing insulin receptor phosphorylation through protein tyrosine phosphatase 1B regulation at early age in obese rats of WNIN/Ob strain. Diabetes Obes Metab. 2011;13:955–8.

181. Jeyakumar SM, Sheril A, Vajreswari A. Chronic vitamin A-enriched diet feeding induces body weight gain and adiposity in lean and glucose-intolerant obese rats of WNIN/GR-Ob strain. Exp Physiol. 2015;100:1352–61.

182. Jeyakumar SM, Vajreswari A, Giridharan N V. Vitamin A regulates obesity in WNIN/Ob obese rat; independent of stearoyl-CoA desaturase-1. Biochem Biophys Res Commun. 2008;370:243–7.

183. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, i sur. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. The Lancet. 2011;378:804–14.

184. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. Int J Prev Med. 2013;4:624–30.

185. Seo DC, Choe S, Torabi MR. Is waist circumference ≥ 102/88 cm better than body mass index ≥ 30 to predict hypertension and diabetes development regardless of gender, age group, and race/ethnicity? Meta-analysis. Prev Med. 2017;97:100–8.

186. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. Obesity. 2007;15:798–808.

187. Faran SA, Asghar S, Khalid SH, Khan IU, Asif M, Khalid I, i sur. Hepatoprotective and renoprotective properties of lovastatin-loaded ginger and garlic oil nanoemulsomes: Insights into serum biological parameters. Medicina (Lithuania). 2019;55: 579

188. Nagy C, Einwallner E. Study of in vivo glucose metabolism in high-fat diet-fed mice using oral glucose tolerance test (OGTT) and insulin tolerance test (ITT). J Vis Exp. 2018; 131:1–12.

189. 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;133:1081–7.

190. Panchal SK, Poudyal H, Iyer A, Nazer R, Alam A, Diwan V, i sur. High-carbohydrate high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. J Cardiovasc Pharmacol. 2011;57:51–64.

191. Auberval N, Dal S, Bietiger W, Pinget M, Jeandidier N, Maillard-Pedracini E, i sur. Metabolic and oxidative stress markers in Wistar rats after 2 months on a high-fat diet. Diabetol Metab Syndr. 2014;6:1–9.

192. Marques TM, Wall R, Sullivan OO, Fitzgerald GF, Shanahan F, Quigley EM, i sur. Dietary trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid alters fatty acid metabolism and microbiota composition in mice. Br J Nutr. 2015;113:728-38.

193. Atgie C, Marette A, Desautels M, Tulp O, Bukowiecki LJ. Specific decrease of mitochondrial thermogenic capacity in brown adipose tissue of obese SHR/N-cp rats. Am J Physiol Cell Physiol. 1993;265:1674–80.

194. Mactier H, Weaver LT. Vitamin A and preterm infants: What we know, what we don't know, and what we need to know. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2005;90:103–8.

195. Peckett AJ, Wright DC, Riddell MC. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. Metab Clin Exp. 2011;60:1500–10.

196. Carré N, Binart N. Prolactin and adipose tissue. Biochimie. 2014;97:16–21.

197. Obregon MJ. Adipose tissues and thyroid hormones. Front Physiol. 2014;5:1–13.

198. Krotkiewski M, Bjorntorp P, Sjostrom L, Smith U. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. J Clin Invest. 1983;72:1150–62.

199. Taraschenko OD, Maisonneuve IM, Glick SD. Sex differences in high fat-induced obesity in rats: Effects of 18-methoxycoronaridine. Physiol Behav. 2011;103:308–14.

200. Taylor LE, Ramirez LA, Musall JB, Sullivan JC. Tipping the scales: Are females more at risk for obesity- and high-fat diet-induced hypertension and vascular dysfunction? Br J Pharmacol. 2019;176:4226–42.

201. Giles ED, Jackman MR, MacLean PS. Modeling Diet-Induced Obesity with Obesity-Prone Rats: Implications for Studies in Females. Front Nutr. 2016;3:50.

202. Brown L, Clegg D. Central Effects of Estradiol in the Regulation of Adiposity. J Steroid Biochem Mol Biol. 2010;122:65–73.

203. Even PC, Virtue S, Morton NM, Fromentin G, Semple RK. Editorial: Are Rodent Models Fit for Investigation of Human Obesity and Related Diseases? Front Nutr. 2017;4:58.

204. Khosla S, Oursler MJ, Monroe DG. Estrogen and the skeleton. Trends Endocrinol Metab. 2012;23:576–81.

205. Aksoy H, Cinar L, Acmaz G, Aksoy U, Aydin T, Vurdem UE, i sur. The effect of isotretinoin on ovarian reserve based on hormonal parameters, ovarian volume, and antral follicle count in women with acne. Gynecol Obstet Invest. 2015;79:78–82.

206. Fleming R, Broekmans F, Calhaz-Jorge C, Dracea L, Alexander H, Nyboe Andersen A, i sur. Can anti-Müllerian hormone concentrations be used to determine gonadotrophin dose and treatment protocol for ovarian stimulation? Reprod Biomed Online. 2013;26:431–9.

207. Abali R, Yuksel MA, Aktas C, Celik C, Guzel S, Erfan G, i sur. Decreased ovarian reserve in female Sprague-Dawley rats induced by isotretinoin (retinoic acid) exposure. Reprod Biomed Online. 2013;27:184–91.

208. Cisneros FJ, Gough BJ, Patton RE, Ferguson SA. Serum levels of albumin, triglycerides, total protein and glucose in rats are altered after oral treatment with low doses of 13-cis-retinoic acid or all-trans-retinoic acid. J Appl Toxicol. 2005;25:470–8.

209. Cinar SL, Kartal D, Aksoy H, Cinar E, Aydin T, Öz L, i sur. Long-term effect of systemic isotretinoin on female fertility. Cutan Ocul Toxicol. 2017;36:132–4.

210. Gyebi L, Soltani Z, Reisin E. Lipid Nephrotoxicity: New Concept for an Old Disease. Curr Hypertens Rep. 2012;14:177–81.

211. Ruan XZ, Varghese Z, Moorhead JF. An update on the lipid nephrotoxicity hypothesis. Nat Rev Nephrol. 2009;5:713–21.

212. Ali AAM, Mansour A, Hassanine EA, Abdel-Razek AH, Mahmoud HAH. Ameliorative role of a combination of chitosan, calcium, vitamins A and E against high fat diets-induced adverse effects in rats. J Basic Appl Zool. 2019;80:11.

213. Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: Biochemical, metabolic, and clinical implications. Hepatology. 2010;51:679–89.

214. Edozien JC, Switzer BR. Effects of Dietary Protein, Fat and Energy on Blood Hemoglobin and Hematocrit in the Rat. J Nutr. 1977;107:1016–21.

215. Chandra HK, Mishra G, Sahu N, Nirala SK, Bhadauria M. Effect of rutin against high-fat diet and alcohol-induced alterations in haematological variables of rats. Asian J Pharm Clin Res. 2018;11:5–8.

216. Hixson EJ, Denine EP. Comparative subacute toxicity of all-trans- and 13-cis-retinoic acid in swiss mice. Toxicol Appl Pharmacol. 1978;44:29–40.

217. Ataseven A, Ugur Bilgin A. Effects of Isotretinoin on the Platelet Counts and the Mean Platelet Volume in Patients with Acne Vulgaris. ScientificWorldJournal. 2014;2014:1–4.

218. Karadag AS, Ertugrul DT, Takci Z. Isotretinoin modestly increases platelet count in acne patients. J Dermatolog Treat. 2013;24:139–40.

219. Santilli F, Simeone P, Liani R, Davi G. Platelets and diabetes mellitus. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2015;120:28-39

220. Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes Find the latest version : Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. J Clin Invest. 2007;117:1219–22.

221. Mahmoud AM. Hematological alterations in diabetic rats - Role of adipocytokines and effect of citrus flavonoids. EXCLI Journal. 2013;12:647–57.

222. Talukdar S, Oh DY, Bandyopadhyay G, Li D, Xu J, McNelis J, i sur. Neutrophils mediate insulin resistance in high fat diet fed mice via secreted elastase. Nat Med. 2012;18:1407–12.

223. Kim CH. Retinoic Acid, Immunity, and Inflammation. Vitamins and Hormones. Elsevier Inc. 2011;86:83–101.

224. Sato-Mito N, Suzui M, Yoshino H, Kaburagi T, Sato K. Long term effects of high fat and sucrose diets on obesity and lymphocyte proliferation in mice. J Nutr Health Aging. 2009;13:602–6.

225. Shu-Kuang Hu, Mitcho YL, Rath NC. Effect of estradiol on interleukin 1 synthesis by macrophages. Int. J. Immunopharmacol. 1988;10:247–52.

226. Abu-Taha M, Rius C, Hermenegildo C, Noguera I, Cerda-Nicolas J-M, Issekutz AC, i sur. Menopause and Ovariectomy Cause a Low Grade of Systemic Inflammation that May Be

Prevented by Chronic Treatment with Low Doses of Estrogen or Losartan. J Immunol. 2009;183:1393–402.

227. Mraz M, Haluzik M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. J Endocrinol. 2014;222:113–27.

228. Schipper HS, Prakken B, Kalkhoven E, Boes M. Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. Trends Endocrinol. Metab. 2012;23:407–15.

229. O'Rourke RW, White AE, Metcalf MD, Winters BR, Diggs BS, Zhu X, i sur. Systemic inflammation and insulin sensitivity in obese IFN-γ knockout mice. Met. Clin. Exp. 2012;61:1152–61.

230. Kim D-H, Sandoval D, Reed JA, Matter EK, Tolod EG, Woods SC, i sur. The role of GM-CSF in adipose tissue inflammation. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2008;295:1038-46.

231. Schmidt FM, Weschenfelder J, Sander C, Minkwitz J, Thormann J, Chittka T, i sur. Inflammatory cytokines in general and central obesity and modulating effects of physical Activity. PLoS ONE. 2015;10:1–17.

232. Poret JM, Souza-Smith F, Marcell SJ, Gaudet DA, Tzeng TH, Braymer HD, i sur. High fat diet consumption differentially affects adipose tissue inflammation and adipocyte size in obesity-prone and obesity-resistant rats. Int J Obes. 2018 20;42:535–41.

233. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. J Clin Inves. 2007;117:175–84.

234. Rytka JM, Wueest S, Schoenle EJ, Konrad D. The Portal Theory Supported by Venous Drainage–Selective Fat Transplantation. Diabetes. 2011;60:56–63.

235. Bajpai G, Bredemeyer A, Li W, Zaitsev K, Koenig AL, Lokshina I, i sur. Tissue Resident CCR2− and CCR2+ Cardiac Macrophages Differentially Orchestrate Monocyte Recruitment and Fate Specification Following Myocardial Injury. Circ. Res. 2019;124:263–78.

236. Peelman F, Waelput W, Iserentant H, Lavens D, Eyckerman S. Progress in Lipid Research Leptin : linking adipocyte metabolism with cardiovascular and autoimmune diseases. Prog. Lipid Res. 2004;43:283–301.

237. Frühbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. Biochem J. 2006;393:7–20.

238. Baumann H, Morella KK, Whitet DW, Dembskii M, Bailon PS, Kim H, i sur. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1996;93:8374–8.

239. Kiriakidis S, Wait R, Pertyn M, Beech J, Feldmann M, Paleolog EM. Advanced glycation end products upregulate angiogenic and pro-inflammatory cytokine production in human monocyte / macrophages. Cytokine. 2004;28:35–47.

240. Shurtz-Swirski R, Sela S, Herskovits AT, Shasha SM, Shapiro G, Nasser L, i sur. Involvement of Peripheral Polymorphonuclear Leukocytes in Oxidative Stress and Inflammation in Type 2 Diabetic Patients. Diabetes Care. 2001;24:104–10.

241. Lee P, Peng H, Gelbart T, Beutler E. The IL-6- and lipopolysaccharide-induced transcription of hepcidin in HFE-, transferrin receptor 2-, and 2 -microglobulin-deficient hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2004;101:4–6.

242. Scherberich JE. Proinflammatory blood monocytes: main effector and target cells in systemic and renal disease; background and therapeutic implications. Int J Clin Pharmacol Ther. 2003;41:459–64.

243. Karnaukhova E. Interactions of human serum albumin with retinoic acid , retinal and retinyl acetate. Biochem. Pharmacol. 2007;73:901–10.

244. Anderson SR, Gilge DA, Steiber AL, Previs SF. Diet-induced obesity alters protein synthesis: tissue-specific effects in fasted versus fed mice. Metabolism. 2008;57:347–54.

245. Cahn J, Bordier P, Herold M, Meunier MT. Pharmacological studies on retinoic acid in Wistar and in atrichos rats. Acta Derm Venereol Suppl (Stockh). 1975;74:33–5.

246. Estaki M, DeCoffe D, Gibson DL. Interplay between intestinal alkaline phosphatase, diet, gut microbes and immunity. World J. Gastroenterol. 2014;20:15650–6.

247. Goldberg RF, Austen WG, Zhang X, Munene G, Mostafa G, Biswas S, i sur. Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2008;105:3551–6.

248. Saravanan G, Ponmurugan P, Deepa A, Senthilkumar B. Anti-obesity action of gingerol : effect on lipid profile , insulin , leptin , amylase and lipase in male obese rats induced by a high-fat diet. J. Sci. Food Agric. 2014;94:2972-7.

249. Hixson EJ, Burdeshaw JA, Denine EP, Harrison SD. Comparative subchronic toxicity of all-trans- and 13-cis-retinoic acid in Sprague-Dawley rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1979;47:359–65.

250. Nakajima K. Low serum amylase and obesity, diabetes and metabolic syndrome: A novel interpretation. World J Diabetes. 2016;7:112.

251. Bonnefond A, Yengo L, Dechaume A, Canouil M, Castelain M, Roger E, i sur. Relationship between salivary/pancreatic amylase and body mass index: A systems biology approach. BMC Med. 2017;15:1–10.

252. Bruzzone R, Trimble ER, Gjinovci A, Renold AE. Changes in content and secretion of pancreatic enzymes in the obese Zucker rat. Biochem. J. 1984;100:333–6.

253. Liu Z, Que S, Xu J, Peng T. Alanine aminotransferase-old biomarker and new concept: A review. Int J Med Sci. 2014;11:925–35.

254. Toita R, Kawano T, Fujita S, Murata M, Kang JH. Increased hepatic inflammation in a normal-weight mouse after long-term high-fat diet feeding. J Toxicol Pathol. 2018;31:43–7.

255. Nazarian RS, Zheng E, Halverstam C, Cohen SR, Wolkoff AW. Prolonged Serum Alanine Aminotransferase Elevation Associated with Isotretinoin Administration. Case Reports Hepatol. 2019;2019:1–3.

256. Wang Y, Dellatore P, Douard V, Qin L, Watford M, Ferraris RP, i sur. High fat diet enriched with saturated, but not monounsaturated fatty acids adversely affects femur, and both diets increase calcium absorption in older female mice. Nutr Res. 2016;36:742–50.

257. He Y-H, Song Y, Liao X-L, Wang L, Li G, Alima, i sur. The Calcium-Sensing Receptor Affects Fat Accumulation via Effects on Antilipolytic Pathways in Adipose Tissue of Rats Fed Low-Calcium Diets. The J Nutr. 2011;141:1938–46.

258. Fahmy SR, Soliman AM. Oxidative stress as a risk factor of osteoporotic model induced by vitamin A in rats. Aust J Basic Appl Sci. 2009;3:1559–68.

259. Oršolić N, Nemrava J, Jeleč Ž, Kukolj M, Odeh D, Terzić S, i sur. The beneficial effect of proanthocyanidins and icariin on biochemical markers of bone turnover in rats. Int J Mol Sci. 2018;19.

260. Xu P, Guo X, Zhang Y, Li Y, Cao J, Xiong Y. The effect of retinoic acid on induction of osteoporotic model rats and the possible mechanism. Chin Int J Traumatol. 2005;36:229–32.

261. Liao EY, Luo X hang, Wang W bo, Wu X ping, Zhou H de, Dai R chun, i sur. Effects of different nylestriol/levonorgestrel dosages on bone metabolism in female Sprague-Dawley rats with retinoic acid-induced osteoporosis. Endocr. Res. 2003;29:23–42.

262. Conte da Frota ML, Gomes da Silva E, Behr GA, de Oliveira MR, Dal-Pizzol F, Klamt F, i sur. All-trans retinoic acid induces free radical generation and modulate antioxidant enzyme activities in rat sertoli cells. Cell. Mol. Biochem. 2006;285:173–9.

263. Duncan WE, Guill M, Aton J. Serum calcium concentrations during treatment with isotretinoin. J Am Acad Dermatol. 1983;6:1096-1097.

264. Miziołek B, Bergler-Czop B, Stańkowska A, Brzezińska-Wcisło L. The safety of isotretinoin treatment in patients with bone fractures. Postepy Dermatol Alergo. 2019;36:18–24.

265. Bonjour JP, Kohrt W, Levasseur R, Warren M, Whiting S, Kraenzlin M. Biochemical markers for assessment of calcium economy and bone metabolism: Application in clinical trials from pharmaceutical agents to nutritional products. Nutr Res Rev. 2014;39:252–67.

266. Nobre JL, Lisboa PC, Santos-Silva AP, Lima NS, Manhães AC, Nogueira-Neto JF, i sur. Calcium supplementation reverts central adiposity, leptin, and insulin resistance in adult offspring programed by neonatal nicotine exposure. J Endocrinol. 2011;210:349–59.

267. Lyu Y, Wu L, Wang F, Shen X, Lin D. Carotenoid supplementation and retinoic acid in immunoglobulin A regulation of the gut microbiota dysbiosis. Exp. Biol. Med. 2018;243:613–20.

268. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. 11. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2006.

269. Oh SW, Koo HS, Han KH, Han SY, Chin HJ. Associations of sodium intake with obesity, metabolic disorder, and albuminuria according to age. PLoS One. 2017;12:1–17.

270. Zacchia M, Abategiovanni ML, Stratigis S, Capasso G. Potassium: From Physiology to Clinical Implications. Kidney Dis. 2016;2:72–9.

271. Cases A, Coll E. Dyslipidemia and the progression of renal disease in chronic renal failure patients. Kidney Int. 2005;68:87–93.

272. Parlak N, Ünal E, Aksoy N. Isotretinoin is a Safety Therapy on Kidney: A Retrospective Study. Turk J Dermatol. 2018;12:18–22.

273. Adams J, Kiss E, Arroyo ABV, Bonrouhi M, Sun Q, Li Z, i sur. 13-cis Retinoic Acid Inhibits Development and Progression of Chronic Allograft Nephropathy. Am J Pathol. 2005;167:285–98.

274. Oršolić N, Jurčević IL, Đikić D, Rogić D, Odeh D, Balta V, i sur. Effect of Propolis on Diet-induced hyperlipidemia and atherogenic indices in mice. Antioxidants. 2019;8:156.

275. Mahalle N, Garg M, Naik S, Kulkarni M. Study of pattern of dyslipidemia and its correlation with cardiovascular risk factors in patients with proven coronary artery disease. Indian J Endocrinol Metab. 2014;18:48–55.

276. Muoio DM, Newgard CB. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β-cell failure in type 2 diabetes. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008;9:193–205.

277. Flanagan AM, Brown JL, Santiago CA, Aad PY, Spicer LJ, Spicer MT. High-fat diets promote insulin resistance through cytokine gene expression in growing female rats. J Nutr Biochem. 2008;19:505–13.

278. Kim YB, Iwashita S, Tamura T, Tokuyama K, Suzuki M. Effect of High-Fat Diet on the Gene Expression of Pancreatic GLUT2 and Glucokinase in Rats. Biochem Biophys Res Commun. 1995;208:1092–8.

279. Lavau M, Fried SK, Susini C, Freychet P. Mechanism of insulin resistance in adipocytes of rats fed a high-fat diet. J. Lipid Res. 1979;20:8–16.

280. Karpe F, Dickmann JR, Frayn KN. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: Time for a reevaluation. Diabetes. 2011;60:2441–9.

281. Vona R, Gambardella L, Cittadini C, Straface E. Review Article Biomarkers of Oxidative Stress in Metabolic Syndrome and Associated Diseases. Oxid Med Cell Longev. 2019;2019:1-19.

282. Moreno-Fernández S, Garcés-Rimón M, Vera G, Astier J, Landrier JF, Miguel M. High fat/high glucose diet induces metabolic syndrome in an experimental rat model. Nutrients. 2018;10:1–15.

283. Vijayakumar RS, Surya D, Nalini N. Antioxidant efficacy of black pepper (Piper nigrum L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. Redox Rep. 2004;9:105–10.

284. Milagro FI, Campión J, Martíez JA. Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. Obesity. 2006;14:1118–23.

285. Noeman SA, Hamooda HE, Baalash AA. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. Diabetol Metab Syndr. 2011;3:17.

286. Hsu CL, Yen GC. Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. Br J Nutr. 2007;98:727–35.

287. Nigro E, Scudiero O, Palmieri A, Mazzarella G, Costagliola C, Bianco A, i sur. New Insight into Adiponectin Role in Obesity and Obesity-Related Diseases. Biomed Res Int. 2015;2014:658913.

288. Subedi A, Park P-H. Autocrine and paracrine modulation of microRNA-155 expression by globular adiponectin in RAW 264.7 macrophages: Involvement of MAPK/NF-κB pathway. Cytokine. 2013;64:638–41.

289. Nigro E, Scudiero O, Sarnataro D, Mazzarella G, Sofia M, Bianco A, i sur. Adiponectin affects lung epithelial A549 cell viability counteracting TNFa and IL-1ß toxicity through AdipoR1. Int J Biochem. Cell Biol. 2013;45:1145–53.

290. Ouchi N, Walsh K. Adiponectin as an anti-inflammatory factor. Clin Chim Acta. 2007;380:24–30.

11. ŽIVOTOPIS

Opći podatci:

Ime i prezime: Ivana Ilić, r. Lovrić

Datum rođenja: 22.12.1989.

Adresa: Lovinčićeva ulica 7, 10 000 Zagreb

tel: 098/1604099

e-mail: ilic.ivana2212@gmail.com

Zaposlenje:

listopad 2014. – ožujak 2015. - liječnik pripravnik u OB Sveti Duh

rujan 2015. – ... - asistentica na Katedri za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku

ak. god. 2015./2016. - vanjska suradnica u Medicinskoj školi u Osijeku (kolegij Anatomija i fiziologija)

ak. god. 2016./2017. - vanjska suradnica na Veleučilištu Lavoslav Ružička u Vukovaru (kolegij Anatomija s histologijom)

veljača 2017. – ... - specijalističko usavršavanje iz Dermatologije i venerologije pri KBC Sestre milosrdnice u Zagrebu

listopad 2017. – ... - asistentica na Katedri za anatomiju, histologiju, embriologiju, patološku anatomiju i patološku histologiju Fakulteta za dentalnu medicinu i zdravstvo

Školovanje:

1996. – 2004. - osnovnoškolsko obrazovanje u Osijeku

2004. – 2008. - Isusovačka klasična gimnazija u Osijeku

2008. – 2014. - Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

rujan 2015. - ... - Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo Mediciniskog fakulteta u Osijeku

Nagrade:

Dekanova nagrada za godišnji seminarski rad izložen na Danima doktoranada 2017.:

„The Effect of Isotretinoin and High Fat Diet on Adipokine Concentrations and Development of Metabolic Syndrome in Spraque Dawley Rats“

Članstva:

Hrvatsko mikroskopijsko društvo

Europsko mikroskopijsko društvo

Hrvatsko dermatovenerološko društvo

Stručne aktivnosti:

- aktivno sudjelovanje: Summer School on Stress: From Hans Selye's Original Concept to Recent Advances, Osijek, Croatia, June 13-17, 2016

- tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s laboratorijskim životinjama rada s pokusnim životinjama, B kategorija (Zagreb, Hrvatska, 17. – 26. studenog 2016.)

- sudjelovanje u javnozdravstvenom projektu grada Zagreba „Djeluj sada“, održanom u Zagrebu 24. svibnja 2018. (preventivni pregled madeža)

- aktivno sudjelovanje: S. Špoljar, I. Lovrić, M. Delaš Aždajić, M. Šitum “Ehlers Danlos sindrom – izazovi rane dijagnostike i cjeloživotnog praćenja”. Poučna iskustva i znanstveni izazovi u dermatološkoj praksi – odabrani slučajevi (15. prosinački simpozij, 1. prosinca 2018.)

- aktivno sudjelovanje: S. Špoljar, I. Lovrić, M. Delaš Aždajić, M. Šitum “Pachyonichia congenita – interakcija anamnestičkih podataka i kliničke slike” Poučna iskustva i znanstveni izazovi u dermatološkoj praksi – odabrani slučajevi (15. prosinački simpozij, 1. prosinca 2018.)

- aktivno sudjelovanje: I. Prkačin, I. Ilić, S. Poduje, M. Šitum. “Rano otkrivanje melanoma – najznačajniji čimbenik prevencije”. Dermatološka onkologija – od ordinacije obiteljske medicine do dermatovenerološke klinike (16. prosinački simpozij, 6. prosinca 2019.)

11. ŽIVOTOPIS

Publikacije:

a) Radovi koji se indeksiraju u Current Contents:

1. Bijelić N, Belovari T, Stolnik D, Lovrić I, Baus Lončar M. Histomorphometric Parameters of the Growth Plate and Trabecular Bone in Wild-Type and Trefoil Factor Family 3 (Tff3)-Deficient Mice Analyzed by Free and Open-Source Image Processing Software. Microsc Microanal. 2017;23:818–825.

2. Aždajić MD, Lovrić I, Franceschi N, Šitum M, Vučić M, Buljan M. Full manuscript title: Early subungual melanoma: A diagnostic and treatment challenge. Dermatol Ther. 2018;31(6):e12706.

3. Aždajić MD, Likić R, Aždajic S, Šitum M, Lovrić I, Grbić DS . Outpatient benzodiazepine utilization in Croatia - drug use or misuse. Int J Clin Pharm. 2019 Oct 8

4. Mujkić R, Šnajder Mujkić D, Ilić I, Rođak E, Šumanovac A, Grgić A, Divković D, Selthofer-Relatić K. Early Childhood Fat Tissue Changes-Adipocyte Morphometry, Collagen Deposition, and Expression of CD163 + Cells in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue of Male Children. Int J Environ Res Public Health. 2021 Mar 31;18(7):3627.

b) Radovi objavljeni u časopisima koji se indeksiraju u SCI:

1.Tolušić Levak M, Mihalj M, Koprivčić I, Lovrić I, Novak S, Bijelić N, Baus-Lončar M, Belovari T, Kralik K, Pauzar B. Differential expression of TFF genes and protein in breast tumors. Acta Clin Croat 2018; 57:264-77.

2. Lugović Mihić L, Ilić I, Budimir J, Pondeljak N, Mravak Stipetić M. Common allergies and allergens in oral and perioral diseases. Acta Clin Croat 2020; 59:318-28.

3. Ilić I, Oršolić N, Rođak E, Odeh D, Lovrić M, Mujkić R, Delaš Aždajić M, Grgić A, Tolušić Levak M, Vargek M, Dmitrović B, Belovari T. The effect of high-fat diet and 13-cis retinoic acid application on lipid profile, glycemic response and oxidative stress in female Lewis rats. PLOS One. 2020. 2020;15:e0238600.

c) Radovi objavljeni u časopisima koji se indeksiraju u Medline:

1. Farčić N, Barać I, Pačarić S, Lovrić I, Ilakovac V. Acute Postoperative Pain in Trauma

Patients - The Fifth Vital Sign. Open access Maced J Med. 2017; 5(3):310-15.

d) Ostali članci:

1.Bolanča Ž, Franceschi N, Lovrić I, Novak I. Kvaliteta života osoba koje boluju od gnojnog hidradenitisa (hidradenitis supurativa). 2018; 129.

e) Sažetci kongresnih priopćenja koji su objavljeni u časopisima koji se indeksiraju u CC-u:

1. Šnajder D, Mujkić R, Lovrić I, Grgić, Perić Kačarević Ž, Blažičević V. Determination of collagen content and number of CD68 and CD163 positive cells in white adipose tissue of male rat offspring depending on maternal and postnatal diet. Obesity Facts. 2019. str. 80-81. (PO1.005)

2. Lovrić I, Odeh D, Mujkić R, Rođak E, Grgić A, Vargek M, Šnajder D, Oršolić N. The effect of high-fat diet and retinoic acid application on oxidative stress, inflammation and insulin resistance in Lewis rats. Obesity Facts. 2019. str. 187. (PO2.022)

3. Mujkić R, Šnajder Mujkić D, Ilić I, Grgić A, Rođak E, Selthofer Relatić K, Divković D. Expression of CD163+ cells and collagen deposition in subcutaneous and visceral adipose tissue of young male children. Obesity Reviews. 2020. (EP-220)

4. Ilić I, Rođak E, Mujkić R, Bijelić N, Blažičević V, Kopačin V, Tolušić Levak M, Grgić A, Delaš Aždajić M, Šnajder Mujkić D, Belovari T, Oršolić N. Histomorphometric and metabolic liver changes in female Lewis rats depending on the diet and retinoic acid application. Obesity Reviews. 2020. (EP-385)

f) Ostala kongresna priopćenja:

1. Pušeljić S, Tomac V, Lovrić I, Wagner J, Škrlec I. Prikaz kliničkih i etioloških obilježja djece s autističnim spektrom poremećaja u klinici za pedijatriju KBC Osijek. VI. hrvatski kongres humane genetike s međunarodnim sudjelovanjem. 2015. str. 40-40.

2. Lovrić I, Stolnik D, Bijelić N, Belovari T, Baus Lončar, M. Growth plate and trabecular bone histomorphometry in wild-type and TFF3 knock-out mice. 13th Multinational Congress on Microscopy. 2017. str. 336-337.

3. Rođak E, Ivić K, Belovari T, Lovrić I, Bijelić N, Baus Lončar M. A histological analysis of glycogen content in hepatocytes of trefoil factor family 2 and trefoil factor family 3 knock-out mice. 13th Multinational Congress on Microscopy. 2017. str. 335-335.

4. Bijelić N, Stolnik D, Rođak E, Lovrić I, Belovari T. A method for measuring area and surface-related parameters on microphotographs by using free and open source image processing software. 13th Multinational Congress on Microscopy. 2017. str. 335-335.

5. Bijelić N, Belovari T, Lovrić I, Baus Lončar M. The dynamic of Tff1 and Tff3 peptide presence in mouse embryonic gastrointestinal system from day 14 to 18 of intrauterine development. 17th International European Light Microscopy. 2017. str. 91-92.

6. Rođak E, Lovrić I, Bijelić N, Belovari T. A novel and economical staining method for quick identification and evaluation of FFPE sections in a histology laboratory. 17th International European Light Microscopy. 2017. str. 93-94.

7. Oršolić N, Nemrava J, Odeh D, Kukolj M, Lesar N, Lovrić I, Jeleč Ž. The effectiveness of icariin on biomarkers for osteoporosis. 13th Croatian biological congress with international Participation. 2018. str. 290-291.

8. Franceschi N, Dediol I, Lovrić I, Šitum M. Erythematous lesions on the face – think of psoriasis. 15th spring symposium of the European Academy of dermatology and venerology. str. 24. (P484)

9. Novak I, Kolić M, Lovrić I, Šitum M. Oral cavity erosions – seeking past the obvious. 6. kongres hrvatskih dermatovenerologa s međunarodnim sudjelovanjem. str. 24. (P12)

10. Lovrić I, Novak I, Šitum M, Buljan M. Sweet´s syndrome – a window to underlying malignancy. 6. kongres hrvatskih dermatovenerologa s međunarodnim sudjelovanjem. str. 24. (P13)

11. Delaš Aždajić M, Lovrić I, Franceschi N, Šitum M, Vučić M, Buljan M. Diagnostic challenge of early subungual melanoma. 6. kongres hrvatskih dermatovenerologa s međunarodnim sudjelovanjem. p. 26. (P28)

12. Mujkić R, Šnajder Mujkić D, Ilić I, Grgić A, Rođak E, Divković D, Selthofer-Relatić K. Early childhood fat tissue changes – future risk for metabolic related diseases: subcutaneous and

visceral fat adipose tissue CD163+ cells expression and collagen deposition in young male children. 13th Congress of the Croatian Cardiac Society with international participation under the patronage of the Croatian Academy of Sciences and Arts. str. 57-57.