Funkcionalni i molekularni učinci prehrane bogate mastima u štakora s promijenjenom homeostazom serotonina

Baković, Petra

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:800927

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-15**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Petra Baković

FUNKCIONALNI I MOLEKULARNI UČINCI PREHRANE BOGATE MASTIMA U ŠTAKORA S PROMIJENJENOM HOMEOSTAZOM SEROTONINA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Petra Baković

FUNKCIONALNI I MOLEKULARNI UČINCI PREHRANE BOGATE MASTIMA U ŠTAKORA S PROMIJENJENOM HOMEOSTAZOM SEROTONINA

DOKTORSKI RAD

Mentorica: dr.sc. Jasminka Štefulj

Zagreb, 2021.

Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOLOGY

Petra Baković

FUNCTIONAL AND MOLECULAR EFFECTS OF HIGH-FAT DIET IN RATS WITH ALTERED SEROTONIN HOMEOSTASIS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2021.

Ovaj doktorski rad izrađen je u

Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju

Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu,

pod vodstvom dr. sc. Jasminke Štefulj,

u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije

pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta

Sveučilišta u Zagrebu

INFORMACIJE O MENTORU

Ime i prezime: **Jasminka Štefulj**
Matični broj znanstvenika: 232860
Mrežna stranica: *https://www.irb.hr/eng/About-RBI/People/Jasminka-Stefulj*
Google Znalac: *https://scholar.google.hr/citations?user=sOeKq7IAAAAJ&hl*

Obrazovanje

1997: BSc, medicinska biokemija, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2000: MSc, mol. i stanična biologija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2005: DSc, biologija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Zaposlenja

1997-danas: Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković, Zagreb
(1997-2006: znanstvena novakinja; 2006-2011: znan. suradnica;
2011-2020: viša znan. suradnica; 2020-danas: znanstvena savjetnica)
2012-danas: Odjel za psihologiju, Hrvatsko katoličko sveučilište, Zagreb
(2012-2017: docentica; 2017-danas: izvanredna profesorica)
2006-2008: Institut za patofiziologiju i imunologiju, Medicinsko sveučilište u Grazu, Graz
(poslijedoktorandica, suradnica na projektu)

Mentorstvo

2010-danas: ko-mentorica 1 doktorske disertacije (Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu), mentorica 9 diplomskih radova (6 Prirodoslovno-matematički fakultet, 3 Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu); 2000-2010: neposredna voditeljica 5 diplomskih radova (3 Sveučilište u Zagrebu, 2 Medicinsko sveučilište u Grazu)

Nastavna aktivnost

Voditeljica kolegija: *Sinapsa: od gena do proteina* (doktorski studij Neuroznanost, Sveučilište u Zagrebu, od 2010.), *Biološka psihologija I* (preddiplomski studij psihologije, Hrvatsko katoličko sveučilište, od 2012.), *Epigenetika u psihologiji* (preddiplomski studij psihologije, Hrvatsko katoličko sveučilište, od 2018.), *Osnove stanične biologije i genetike* (preddiplomski studij psihologije, Hrvatsko katoličko sveučilište, 2012-2018)
Suradnica na kolegijima: *Biološka psihologija II* (preddiplomski studij psihologije, Hrvatsko katoličko sveučilište, od 2012.), *Medical Genetics* (studij medicine, Medicinsko Sveučilište u Grazu, 2006-2008), 2 diplomska i 2 doktorska kolegija (Sveučilište u Zagrebu, 2000-2006)

Sudjelovanja u znanstvenim projekatima

Voditeljica: 1 istraživčki projekt Hrvatske zaklade za znanost (2018-2022), 2 istraživačka projekta Hrvatskog katoličkog sveučilišta (2017-2018; 2016), 1 istraživački projekt Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta (2010-2014)
Su-voditeljica: 2 bilateralna projekata (s Njemačkom, 2013-2014; s Austrijom, 2012-2013)
Suradnica: 1 istraživački projekt Hrvatske zaklade za znanost, 1 istraživački projekt Zaklade Tanita, Japan, 2 istraživačka projekta Austrijske zaklade za znanost, 4 istraživačka projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta

Nagrade i stipendije

2010/2011, Stipendija za gostujuće znanstvenike, BankAustria
1998/1999, Stipendija Vlade Republike Austrije
1995, Rektorova nagrada, Sveučilište u Zagrebu

Znanstvena aktivnost

koautorica 32 znanstvena rada i 50ak kongresnih priopćenja; citiranost u *Web of Science*: >1000

Zahvale

Zahvaljujem se mentorici, dr.sc. Jasminki Štefulj na pruženoj prilici, strpljivom vodstvu, pomoći, savjetima te na satima razgovora koji su mi pomogli u oblikovanju ove disertacije.

Zahvaljujem se voditeljici laboratorija, dr. sc. Lipi Čičin-Šain na kritičkom čitanju teksta disertacije, konstruktivnim razgovorima te na pruženom znanju.

Zahvaljujem se dr.sc. Maji Kesić na iskazanom strpljenju tijekom učenja novih eksperimentalnih tehnika te nesebičnom dijeljenju svog iskustva u istraživanju.

Zahvaljujem se našoj tehničarki Katarini Karlo na svoj tehničkoj pomoći pruženoj tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se dr.sc. Marini Horvatiček, Maji Perić, dr.sc. Marini Kukolj, Zvonimiru Ercegovcu i dr.sc. Ivoni Bečeheli na odličnoj radnoj atmosferi.

Zahvaljujem se dr.sc. Luciji Markulin što je bila uvijek spremna odgovoriti na sva moja znanstvena pitanja, velikodušno odvajajući vrijeme za njih te što mi je bila potpora tijekom ovih 5 godina doktorskog studija.

Zahvaljujem se mojoj obitelji na beskrajnoj ljubavi i podršci koje mi pružaju čitav život.

Sveučilište u Zagrebu Doktorski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

FUNKCIONALNI I MOLEKULARNI UČINCI PREHRANE BOGATE MASTIMA U ŠTAKORA S PROMIJENJENOM HOMEOSTAZOM SEROTONINA

PETRA BAKOVIĆ

Laboratorij za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju,

Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, HR-10000 Zagreb

Održavanje energetske ravnoteže je složena fiziološka funkcija čija disregulacija može rezultirati pretilošću i metaboličkim poremećajima poput dijabetesa. Ovim radom željelo se doprinijeti boljem razumijevanju uloge serotonina (5HT) u mehanizmima regulacije energetske homeostaze, korištenjem sublinija štakora s konstitucijski povišenom (5HT-visoka) ili sniženom (5HT-niska) aktivnošću serotonina. Životinje iz obiju sublinija podvrgnute su visokokaloričnoj prehrani s visokim udjelom masti te je uspoređen njihov funkcionalni i molekularni odgovor na takav metabolički izazov. U skladu s prethodnim nalazima, životinje iz 5HT-visoke sublinije su u uvjetima standardne prehrane imale lošije metaboličko zdravlje od 5HT-niskih životinja. Međutim, 5HT-niske životinje su u odgovoru na visokokaloričnu prehranu pokazale veću sklonost debljanju, slabiju regulaciju glikemije, jači razvoj rezistencije na inzulin te veće promjene u ekspresiji različitih gena u hipotalamusu i bijelom masnom tkivu. Dobiveni rezultati pokazuju da je konstitucijski snižena aktivnost serotonina povezana s većom osjetljivošću na štetne učinke visokokalorične prehrane.

123 stranice, 28 slika, 11 tablica, 311 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: pretilost, serotonin, visokokalorična prehrana, animalni model, Wistar-Zagreb 5HT štakor

Mentorica: dr. sc. Jasminka Štefulj, znanstvena savjetnica

Ocjenjivači: dr.sc. Sofia Ana Blažević, docentica

dr.sc. Lipa Čičin-Šain, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju

dr.sc. Maja Jazvinšćak Jembrek, viša znanstvena suradnica

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Doctoral thesis

FUNCTIONAL AND MOLECULAR EFFECTS OF HIGH-FAT DIET: STUDIES IN SUBLINES OF RATS WITH CONSTITUTIONALLY ALTERED SEROTONIN HOMEOSTASIS

PETRA BAKOVIĆ

Laboratory of Neurochemistry and Molecular Neurobiology,

Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, HR-10000 Zagreb

Maintenance of energy balance is a complex physiological function, dysregulation of which can lead to obesity and metabolic disorders such as diabetes. Here, we aimed to contribute to a better understanding of the role of serotonin (5HT) in the mechanisms regulating energy homeostasis, by using sublines of rats with constitutionally increased (5HT-high) or decreased (5HT-low) activity of 5HT. Animals from both sublines were subjected to a high-calorie, high-fat diet and compared for their functional and molecular response to this metabolic challenge. Consistent with previous findings, when administered conventional diet, animals from the 5HT-high subline had poorer metabolic health than animals from 5HT-low subline. However, in response to a high-fat diet, 5HT-low animals showed a greater tendency to gain weight, poorer glycemic control, higher development of insulin resistance, and more pronounced changes in the expression of various metabolic genes in the hypothalamus and adipose tissue. The obtained results suggest that constitutionally decreased activity of 5HT is associated with a higher susceptibility to adverse effects of a high-calorie diet.

123 pages, 28 figures, 11 tables, 311 refrences, original in Croatian

Key words: obesity, serotonin, high-fat diet, animal model, Wistar-Zagreb 5HT rat

Supervisor: Jasminka Štefulj, Ph. D., Senior scientist

Reviewers: Sofia Ana Blažević, Ph. D., Assistant professor

Lipa Čičin-Šain, Ph. D., Senior scientist

Maja Jazvinšćak Jembrek, Ph. D., Senior research associate

1. UVOD.....1

2. LITERATURNI PREGLED.....3

2.1. Pretilost.....3

2.1.1. Raširenost pretilosti u suvremenom svijetu.....3

2.1.2. Uzroci i patofiziologija pretilosti.....3

2.2 Animalni modeli pretilosti 7

2.3. Serotonin u organizmu sisavaca.....11

2.4. Uloga serotonina u regulaciji energetske ravnoteže i razvoju pretilosti.....14

2.4.1. Središnji serotonin i energetska ravnoteža.....14

2.4.2. Periferni serotonin i energetska ravnoteža.....16

2.5. Wistar-Zagreb 5HT štakor.....18

3. MATERIJALI I METODE.....21

3.1. Koncept istraživanja.....21

3.2. Hrana za životinje, kemikalije i otopine.....23

3.3. Korištena tehnička oprema i pribor.....28

3.4. Vađenje uzoraka krvi te priprema seruma, plazme i plazme bogate trombocitima 30

3.5. Funkcionalni testovi.....30

3.5.1. Test tolerancije glukoze (GTT) 30

3.5.2. Test tolerancije inzulina (ITT).....31

3.6. Infracrvena termografija.....31

3.7. Žrtvovanje životinja i uzimanje uzoraka tkiva.....32

3.8. Određivanje lipidnih parametara u uzorcima krvi.....32

3.9. Određivanje trombocitnih serotoninskih parametara.....33

3.9.1. Mjerenje razine serotonina u trombocitima.....33

3.9.2. Mjerenje brzine aktivnog unosa serotonina u trombocite.....34

3.10. Određivanje razine mRNA odabranih gena.....34

3.10.1. Izolacija RNA.....35

3.10.2. Reverzna transkripcija.....35

3.10.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu.....36

3.11. Određivanje razine odabranih proteina.....38

3.11.1. Određivanje razine odabranih proteina u uzorcima bijelog masnog tkiva...38

3.11.2. Određivanje razine odabranih proteina u uzorcima plazme.....39
3.11.2.1. Izračun HOMA-IR.....39
3.12. Statistička obrada podataka.....39
4. REZULTATI.....41
4.1. Životinje uključene u pokus.....41
4.2. Unos hrane.....42
4.3. Ukupna tjelesna masa i mase pojedinih organa životinja.....44
4.3.1. Ukupna tjelesna masa.....44
4.3.2. Mase pojedinih organa.....45
4.4. Trombocitni serotoninski parametri.....48
4.4.1. Razina serotonina u trombocitima.....48
4.4.2. Aktivnost trombocitnog serotoninskog prijenosnika.....48
4.5. Razine lipida u krvi.....49
4.5.1. Ukupni kolesterol.....49
4.5.2. HDL kolesterol.....50
4.5.3. Trigliceridi.....51
4.6. Razine odabranih proteina u krvi.....52
4.6.1. Inzulin.....53
4.6.2. Glukagon.....53
4.6.3. Adiponektin.....54
4.6.4. Leptin.....54
4.7. Razina glukoze u krvi.....55
4.8. Test tolerancije glukoze.....56
4.9. Test tolerancije inzulina.....57
4.10. Homeostatski model za procjenu inzulinske rezistencije.....58
4.11. Termografija.....59
4.12. Razine mRNA odabranih gena u hipotalamusu, gonadnom bijelom masnom tkivu i smeđem masnom tkivu.....61

4.12.1. Hipotalamus.....61
4.12.2. Gonadno bijelo masno tkivo.....64
4.12.3. Smeđe masno tkivo.....68
4.13. Razine odabranih proteina u gonadnom bijelom masnom tkivu.....68
4.13.1. Trigliceridna lipaza masnog tkiva (Atgl).....69
4.13.2. Sintaza masnih kiselina (Fasn).....70
5. RASPRAVA.....71
5.1. Unos hrane.....72
5.2. Tjelesna masa.....75
5.3. Serotoninski parametri u mozgu, krvi i bijelom masnom tkivu.....77
5.4. Lipidni profil.....78
5.5. Termogeneza.....80
5.6. Glukozna homeostaza.....81
5.7. Razine mRNA za odabrane adipokine.....84
5.8. Ograničenja i buduća istraživanja.....86
6. ZAKLJUČCI.....87
7. POPIS LITERATURE.....89
8. PRILOG.....113
9. ŽIVOTOPIS.....122

1. UVOD

Pretilost, rastući zdravstveni problem u današnjem svijetu, je složeni metabolički poremećaj koji se manifestira prekomjernim nakupljanjem masnog tkiva u organizmu. Na razvoj pretilosti, koja nastaje kao posljedica poremećene energetske ravnoteže u organizmu, utječu razni čimbenici, kao što su prehrana, nedovoljna fizička aktivnost, genetika i mnogi drugi. Unatoč brojnim istraživanjima, molekularni mehanizmi koji stoje u podlozi pretilosti i s pretilošću povezanih metaboličkih poremećaja poput dijabetesa još uvijek nisu dovoljno dobro poznati.

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5HT) je biogeni monoamin koji regulira brojne fiziološke funkcije, djelujući kao modulatorni neurotransmiter u središnjem živčanom sustavu, hormon iz probavnnog trakta ili parakrina/autokrina signalna molekula u različitim perifernim organima. Središnji i periferni 5HT sustavi imaju važnu ulogu u regulaciji energetske ravnoteže. Središnji 5HT ulazi u interakcije s različitim neuropeptidima i neurotransmiterima, orkestrirajući apetit i energetski metabolizam. Periferni 5HT djeluje na različite metaboličke organe, poput bijelog masnog tkiva, smeđeg masnog tkiva, jetre i gušterače, modulirajući njihove endokrine funkcije i energetski metabolizam. Prehrambene tvari potencijalno mogu mijenjati 5HT signalizaciju kako u perifernim organima tako i u mozgu.

U istraživanju molekularne podloge pretilosti i s pretilošću povezanih metaboličkih poremećaja poput dijabetesa važnu ulogu imaju animalni modeli. U ovom istraživanju korišten je animalni model Wistar-Zagreb 5HT (WZ-5HT) štakor, razvijen odabirnim parenjem štakora soja Wistar-Zagreb prema ekstremnim vrijednostima trombocitnih serotoninskih parametara. Time su dobivene dvije sublinije životinja - 5HT-visoka i 5HT-niska sublinija, karakterizirane konstitucijski povišenom odnosno sniženom aktivnošću serotonina na razini čitavog organizma. Pored različitih bihevioralnih razlika, životinje iz dviju WZ-5HT sublinija pokazuju i male, ali značajne, cjeloživotne razlike u tjelesnoj masi, udjelu masnog tkiva u organizmu te glukoznoj homeostazi.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ovim istraživanjem željelo se doprinijeti boljem razumijevanju uloge 5HT u molekularnoj podlozi pretilosti i s pretilošću povezanih metaboličkih poremećaja, analizom funkcionalnog i molekularnog odgovora životinja iz WZ-5HT sublinija na specifični metabolički izazov - prehranu bogatu mastima. Specifični ciljevi istraživanja bili su kod životinja iz WZ-5HT sublinija usporediti učinak prehrane bogate mastima na:

- prirast tjelesne mase i udio masnog tkiva
- metaboličke parametre u krvi (razinu lipida, glukoze i odabranih hormona)
- sposobnost regulacije razine glukoze u krvi i osjetljivost na inzulin
- serotoninske parametre u krvi
- termogenu aktivnost smeđeg masnog tkiva
- ekspresiju odabranih metaboličkih gena u mozgu (hipotalamusu) i perifernim metaboličkim organima (bijelom i smeđem masnom tkivu)

Budući da se životinje iz dviju sublinija WZ-5HT štakora konstitucijski razlikuju s obzirom na aktivnost 5HT sustava, naše očekivanje je bilo da će se razlikovati u funkcionalnom i molekularnom odgovoru na prehranu bogatu mastima.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Pretilost

Svjetska zdravstvena organizacija definira pretilost (gojaznost, debljinu) kao prekomjerno nakupljanje masnog tkiva u organizmu koje može naštetiti zdravlju, a do kojeg dolazi uslijed narušene energetske ravnoteže odnosno neuravnoteženog unosa i potrošnje kalorija (WHO 2021.). Prekomjerna tjelesna masa i pretilost uobičajeno se klasificiraju na temelju indeksa tjelesne mase (BMI, engl.*body mass index*) koji se kod čovjeka izračunava tako da se tjelesna masa (kg) podjeli s kvadratom visine (m^2). BMI u rasponu od 25,0 do 30,0 kg/m^2 klasificira se kao prekomjerna tjelesna masa, a BMI iznad 30,0 kg/m^2 klasificira se kao pretilost (Purnell, 2000.).

2.1.1. Raširenost pretilosti u suvremenom svijetu

Pretilost predstavlja jedan od vodećih javnozdravstvenih problema u suvremenom svijetu. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije iz 2016. godine, 1,9 milijardi ljudi ima prekomjernu tjelesnu masu te je od toga 650 milijuna ljudi pretilo (13% svjetske populacije) (Web izvor 1.). Učestalost pretilosti raste zabrinjavajućom brzinom u razvijenim i nerazvijenim zemljama diljem svijeta (Abelson i Kennedy, 2004.; Mitchell i sur., 2011.). Studije koje su se bavile proučavanjem trendova BMI, provedene na ukupno 128,9 milijuna djece, adolescenata i odraslih osoba, pokazuju da je između 1975. i 2016. godine došlo do značajnog porasta prevalencije pretilosti u svim zemljama svijeta (Bentham i sur., 2017.).

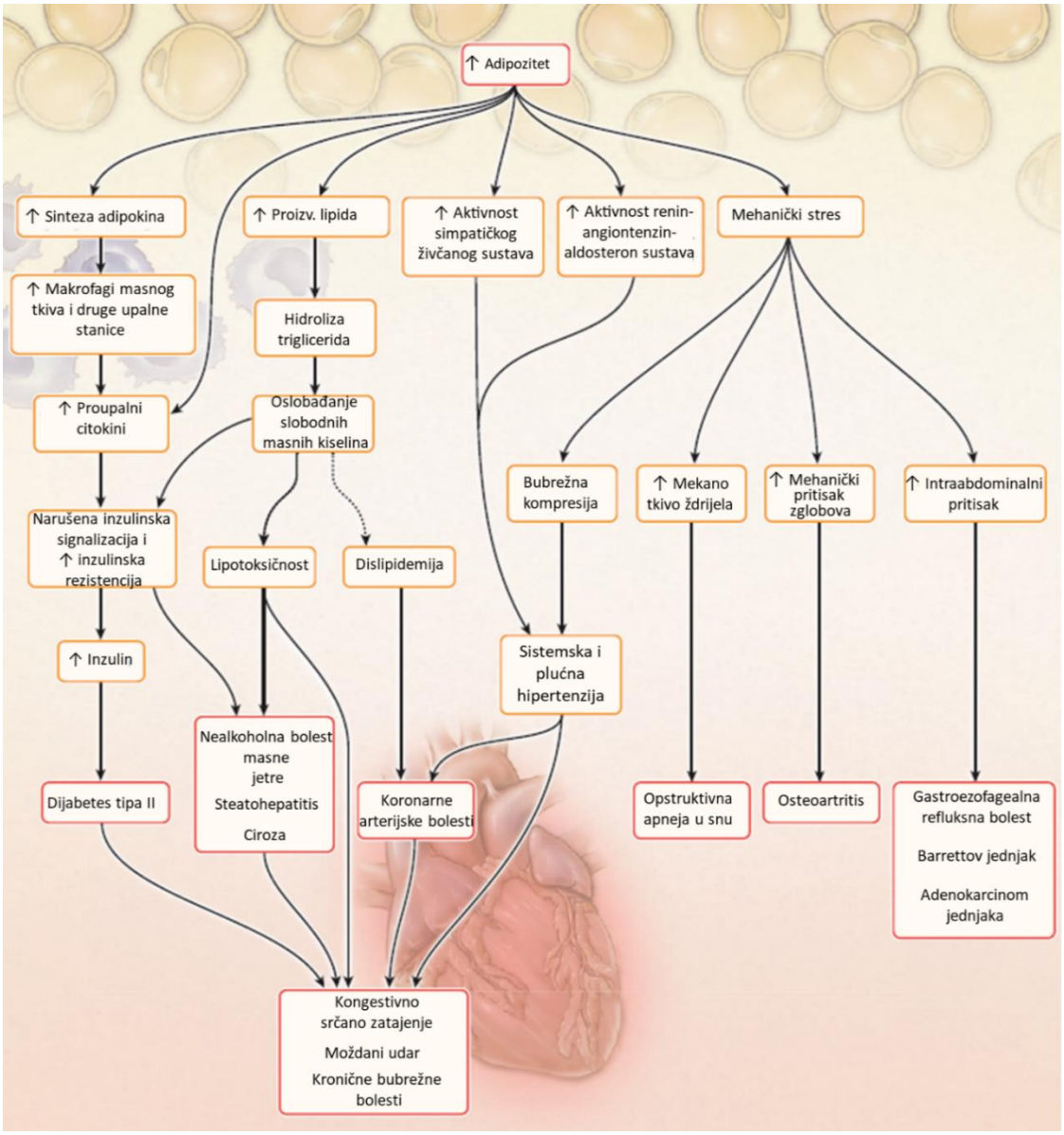
2.1.2 Uzroci i patofiziologija pretilosti

Na razvoj pretilosti utječu brojni biološki, genetički, društveni i okolinski te bihevioralni čimbenici, što je čini složenom, multifaktorijalnom bolesti (Hruby i Hu, 2015.). Od društvenih čimbenika, najznačajniji utjecaj na razvoj pretilosti ima zapadnjački način života, koji je zahvatio većinu zemalja svijeta, a karakteriziraju ga mehanizacija, urbanizacija i sjedilački način života. Također, veliku ulogu u razvoju pretilosti imaju i promjene u prehrani koja postaje sve bogatija zasićenim mastima (Popkin, 2001.). Istraživanja su pokazala da postoji pozitivna korelacija između povećane količine energije koja se prehranom dobije iz masti i udjela pretilih osoba u populaciji (Melanson i sur., 2009.), što ukazuje na to da je udio masti u prehrani važan faktor u razvoju pretilosti. Osim masti, povišen unos ugljikohidrata također doprinosi razvoju pretilosti (Dam i sur.,

2007.). Iako se pretilost uvelike povezuje s okolinskim čimbenicima, čak i u zajedničkoj okolini samo dio populacije razvije pretilost (Valera i sur., 2015.), što se djelomično može objasniti različitim biološkim čimbenicima kao što su spol (Kanter i Caballero, 2012.), dob (Jura i Kozak, 2016.), crijevna mikroflora (Davis, 2016.) i intrauterini okoliš (Adamo i sur., 2012.). Genetička predispozicija je također jedan od ključnih faktora u razvoju pretilosti, a razumijevanje njezine uloge je omogućeno zahvaljujući obiteljskim istraživanjima (Lake i sur., 1997.). Istraživanja su pokazala visoku nasljednost pretilosti, čak 40-70%, ovisno o istraživanoj populaciji (Allison i sur., 1996.; Choquet i Meyre, 2012.; Silventoinen i sur., 2016.). U ovakvim istraživanjima teško je razlučiti genetički i okolinski utjecaj na razvoj pretilosti, međutim, ovaj problem je djelomično riješen istraživanjima provedenim na blizancima (Silventoinen i sur., 2016.) i posvojenim osobama (Sorensen i sur., 1989.). S obzirom na genetičku podlogu, pretilost se može podijeliti u tri skupine. Prvu skupinu čini pretilost uzrokovana mutacijom u samo jednom genu (monogenska pretilost). U ovom slučaju, radi se o genima koji kodiraju za proteine uključene u leptin-melanokortin signalni put koji regulira apetit u središnjem živčanom sustavu (Zegers i sur., 2012.). Do sada je poznato 12 takvih gena (Thaker, 2017.). Drugu skupinu čini sindromska pretilost koja je posljedica neurorazvojnih abnormalnosti ili nekih drugih organskih/sistemskih malformacija. Pretilost je karakteristika gotovo 100 različitih sindroma (Kaur i sur., 2017.), a najpoznatiji oblici sindromske pretilosti su Prader-Willi (Butler, 1990.; G. Butler, 2012.) i Bardet-Biedl sindromi (Guo i Rahmouni, 2011.). Treću skupinu čini pretilost uzrokovana većim brojem genskih varijanti (poligenska pretilost). Ovaj oblik pretilosti je najzastupljeniji kod ljudi. Pojedina genska varijanta individualno malo doprinosi fenotipu, ali ako osoba ima mnogo rizičnih genskih varijanti javlja se kumulativni efekt koji, u kombinaciji s drugim čimbenicima, može imati velik utjecaj na fenotip. Primjerice, cijelogenomske asocijacijske studije su otkrile da su neke učestale varijante u prvom intronu gena *Fto* (engl.*fat mass and obesity associated gene*) povezane s povećanim BMI (Frayling i sur., 2007.).

Pretilost značajno povećava rizik za razvoj različitih kroničnih bolesti: kardiovaskularnih oboljenja (Iliodromiti i sur., 2018.; Khan i sur., 2018.), metaboličkih bolesti kao što su dijabetes melitus tipa 2 (Al-Goblan i sur., 2014.; Leitner i sur., 2017.) i metabolički sindrom (Ritchie i Connell, 2007.), bolesti mišićno-koštanog sustava (King i sur., 2013.; Wearing i sur., 2006.), depresije (Luppino i sur., 2010.), Alzheimerove bolesti (Pedditizi i sur., 2016.) i različitih tumora (Demark-Wahnefried i sur., 2012.; Pischon i Nimptsch, 2016.). Procjenjuje se da pretilost smanjuje

životni vijek za 5 do 20 godina, ovisno o ozbiljnosti stanja i prisutnosti ostalih komorbidnih poremećaja (Fontaine i sur., 2003.; De Gonzalez i sur., 2010.). Slika 2.1. prikazuje neke od puteva kojima metabolički i mehanički učinci pretilosti dovode do povećanog rizika za razvoj različitih kroničnih oboljenja.



Slika 2.1. Neki putevi kroz koje povećani adipozitet vodi prema povećanju rizika za obolijevanje od različitih kroničnih bolesti (prilagođeno prema Heymsfield i Wadden, 2017.).

Masno tkivo ima značajnu ulogu u održavanju energetske ravnoteže i razvoju pretilosti (Rosen i Spiegelman, 2006.). Postoje dvije glavne vrste masnog tkiva koje se međusobno razlikuju

morfološki i funkcionalno - smeđe i bijelo masno tkivo (Park, 2014.). Bijelo masno tkivo građeno je pretežito od bijelih adipocita, stanica specijaliziranih za skladištenje energije u obliku lipida (triglicerida), obično unutar jedne velike lipidne kapljice koja zauzima oko 90 % volumena stanice (Trayhurn i Beattie, 2001.). Neki od ključnih proteina uključenih u metabolizam lipida u masnom tkivu su trigliceridna lipaza masnog tkiva (Atgl, engl. *adipose triglyceride lipase*), lipoprotein lipaza (Lpl), hormon senzitivna lipaza (Hsl), sintaza masnih kiselina (Fasn, engl. *fatty acid synthase*) i protein-4 za vezanje masnih kiselina (Fabp4, engl. *fatty acid-binding protein 4*) (Bolsoni-Lopes i Alonso-Vale, 2015.; Zechner i sur., 2012.). Za razliku od bijelog masnog tkiva koje služi za pohranu lipida, smeđe masno tkivo specijalizirano je za razgradnju lipida uz proizvodnju topline u procesu zvanom termogeneza (Kissig i sur., 2016.). Smeđi adipociti, osnovne stanice u smeđem masnom tkivu, su manji od bijelih adipocita, sadrže nekoliko lipidnih kapljica i veliku količinu mitohondrija te eksprimiraju Ucp1 (engl. *uncoupling protein 1*), specifični mitohondrijalni protein odgovoran za pretvorbu kemijske energije u toplinu. U novije vrijeme identificirana je podvrsta masnog tkiva koja je nazvana bež ili svijetlo masno tkivo. Ono je morfološki i funkcionalno sličnije smeđem masnom tkivu te nastaje „posmeđivanjem“ bijelih adipocita, uslijed izlaganja hladnoći ili β-adrenergičnoj stimulaciji (Park, 2014.; Rosen i Spiegelman, 2014.). Masno tkivo djeluje i kao endokrini organ te doprinosi održavanju energetske ravnoteže izlučivanjem hormona - adipocitokina iz bijelih adipocita (Khan i Joseph, 2014.) i batocitokina iz smeđih adipocita (Villarroya i sur., 2017.). Neki od najpoznatijih adipocitokina su leptin, hormon uključen u regulaciju unosa hrane (Hussain i Khan, 2017.) te adiponektin (Arita i sur., 1999.) i rezistin (Degawa-Yamauchi i sur., 2003.). Nadalje, od 22 fibroblastna faktora rasta (Fgf, engl. *fibroblast growth factor*), barem tri (Fgf1, Fgf10 i Fgf21) su također i adipocitokini, uključeni u razvoj i funkciju adipocita (Ohta i Itoh, 2014.). Uslijed pretilosti, u bijelom masnom tkivu mijenja se ekspresija različitih proteina uključenih u regulaciju metabolizma - primjerice, mijenja se ekspresija gena *Glut4* (glukoznog transportera 4) (Machado i sur., 1994.), *Cebpa* (engl. *CCAT/enhancer – binding protein α*) i *Vegfa* (engl. *vascular endothelial growth factor*) (Matulewicz i sur., 2017.). Također, uslijed pretilosti, u masnom tkivu se razvija upalno stanje - dolazi do infiltracije imunoloških stanica u masno tkivo i povećane proizvodnje proupalnih citokina što naposljetku vodi razvijanju sistemske kronične upale niskog stupnja (Castro i sur., 2017.). Kada se uslijed pretilosti zasiti kapacitet bijelog masnog tkiva za skladištenje lipida, dolazi do lipotoksičnosti, nakupljanja lipida u organima poput jetre, skeletnih mišića i srca, (Yazıcı i

Sezer, 2017.) što vodi prema razvoju upalnog stanja i inzulinske rezistencije u tim organima (Monteiro i Azevedo, 2010.).

Unatoč brojnim naporima, postojeće strategije za prevenciju i liječenje pretilosti su još uvijek nedovoljno učinkovite. Stoga su nužna daljnja istraživanja usmjerena na bolje poznavanje molekularnih mehanizama koji stoje u podlozi pretilosti i učestalih komorbiditeta pretilosti poput povećane rezistencije na inzulin i dijabetesa.

2.2. Animalni modeli pretilosti

Animalni modeli su neizbježni u procesu otkrivanja novih farmakoloških meta i optimizacije postojećih tretmana pretilosti. Mali glodavci, štakori i miševi, su najčešće korištene laboratorijske životinje u proučavanju pretilosti i metaboličkih poremećaja povezanih s pretilošću. Animalni modeli pretilosti se mogu podijeliti u dvije glavne skupine (Lutz i Woods, 2012.), ovisno o tome na koji način se izazove pretili fenotip. Jednu skupinu čine divlji sojevi životinja kod kojih je pretilost izazvana eksperimentalnom prehranom (DIO, engl. *diet induced obesity*).

Primjerice, kod štakora i miševa je uočena pozitivna korelacija između razvoja pretilosti i povišenog unosa energije prehranom bogatom mastima pa se stoga prehrana s visokim udjelom masti (HFD, engl. *high fat diet*) koristi kako bi se inducirala pretilost kod animalnih modela (Buettner i sur., 2007.).

Pokazano je da ovakav način prehrane kod različitih sojeva laboratorijskih miševa i štakora dovodi do povećanja tjelesne mase i adipoziteta, smanjene tolerancije na glukozu, inzulinske rezistencije i dislipidemije (Tablica 1.). Osim na navedene metaboličke parametre, prehrana s visokim udjelom masti utječe i na ekspresiju različitih gena u metaboličkim organima poput jetre, gušterače, masnog tkiva i hipotalamusa. U Tablici 2. prikazani su učinci prehrane s visokim udjelom masti na ekspresiju gena bitnih za regulaciju energetske ravnoteže u masnom tkivu i hipotalamusu. Spomenuti učinak ovisi i o samoj genetičkoj pozadini pokusnih životinja, što se može vidjeti na primjeru istraživanja na miševima s deletiranim genom za serotoninski prijenosnik (Veniaminova i sur., 2020.). Drugu skupinu animalnih modela pretilosti čine genetički modificirane životinje kod kojih može biti mutiran jedan ili više gena, što u konačnici rezultira

pretilošću. Primjer za to su Zucker fa/fa štakori kod kojih je mutiran gen za leptinski receptor (Kurtz i sur., 1989.) ili ob/ob miševi kod kojih je mutiran gen za leptin (Drel i sur., 2006.).

Unatoč tome što su genetički modificirane životinje doprinijele razumijevanju mehanizama uključenih u razvoj pretilosti, za bolje razumijevanje pretilosti kod ljudi prednost ipak imaju animalni modeli kod kojih je pretilost izazvana prehranom, budući da ovako uzrokovana pretilost više nalikuje pretilosti koja se najčešće javlja kod ljudi kao rezultat interakcije gena i okoline (Farooqi i Rahilly, 2005.). Kako bi se bolje razumjela patofiziologija pretilosti, potrebno je da animalni modeli kod kojih je pretilost uzrokovana prehranom dobro oponašaju ne samo fenotip nego i samu patogenezu pretilosti koja se javlja kod ljudi. Budući da su postojeći animalni modeli u tome samo donekle uspješni, potreban je razvoj novih i modificiranje postojećih animalnih modela.

Tablica 1. Primjeri istraživanja učinaka prehrane bogate mastima na metaboličke parametre (tjelesnu masu, toleranciju glukoze, osjetljivost na inzulin, kolesterolemiju i trigliceridemiju) kod različitih sojeva štakora i miševa**.**

Pokusne životinje	Udio masti u prehrani	Trajanje prehrane (tjedni)	Tjelesna masa	Tole-rancija glukoze	Osjetlji-vost na inzulin	Kolest-erolem-ija	Trigli-ceride-mija	Literaturni navodi
Sprague-Dawley štakor	45%	24	↑	/	/	↑	↑	Ghibaudi i sur., 2002.
Wistar štakor	42%	12	↑	/	↓	/	↑	Buettner i sur., 2006.
Goto-Kakizaki štakor	45%	16	↑	/	/	=	=	Almon i sur., 2012.
Wistar Han štakor	45%	17	↑	↓	/	/	/	Aslani i sur., 2015.
Wistar štakor	45%	17	↑	↓	↓	=	↑	Marques i sur., 2016.
Wistar HanUnib štakor	60%	8	↑	↓	↓	=	=	Roza i sur., 2016.
Wistar štakor	45%	15	=	/	/	/	↑	Ramalho i sur., 2017.
Wistar štakor	49%	8	↑	↓	/	↑	↑	Lasker i sur., 2019.
Long-Evans štakor	43%	51	↑	/	/	=	↑	Laurentius i sur., 2019.
ZDF štakor	60%	11	↑	/	/	↑	↑	Kundu i sur., 2020.
C57BL/6J miš	58%	8	↑	↓	↓	/	↑	Rossmeisl i sur., 2003.
C57BL/6J miš	60%	20	↑	↓	↓	↑	=	Gallou-Kabani i sur., 2007.
C57BL/6 miš	41%	15	↑	↓	↓	↑	/	Mundy i sur., 2007.
C57BL/6 miš	60%	10	↑	/	/	↑	↑	Kim i sur., 2011.
C57BL/6 miš	40%	12	↑	↓	↓	↑	↑	Shao i sur., 2014.
C57BL/6J miš	45%	24	↑	↓	/	/	/	Rendina-Ruedy i sur., 2015.
C57BL/6J miš	60%	12	↑	/	/	/	/	Hu i sur., 2018.
C57BL/6J miš	21%	3	↑	↓	/	/	/	Veniaminova i sur., 2020.
Sert - /- miš	21%	3	↑	↓	/	/	/	
CD-1 miš	60 %	12	↑	↓	↓	/	=	Gao i sur., 2015.

↑ - povećanje učinka, ↓ - smanjenje učinka, = - nije bilo učinka, / - nije istraživano. ZDF - engl. *Zucker diabetic fatty*, Sert – engl. *serotonin transporter*

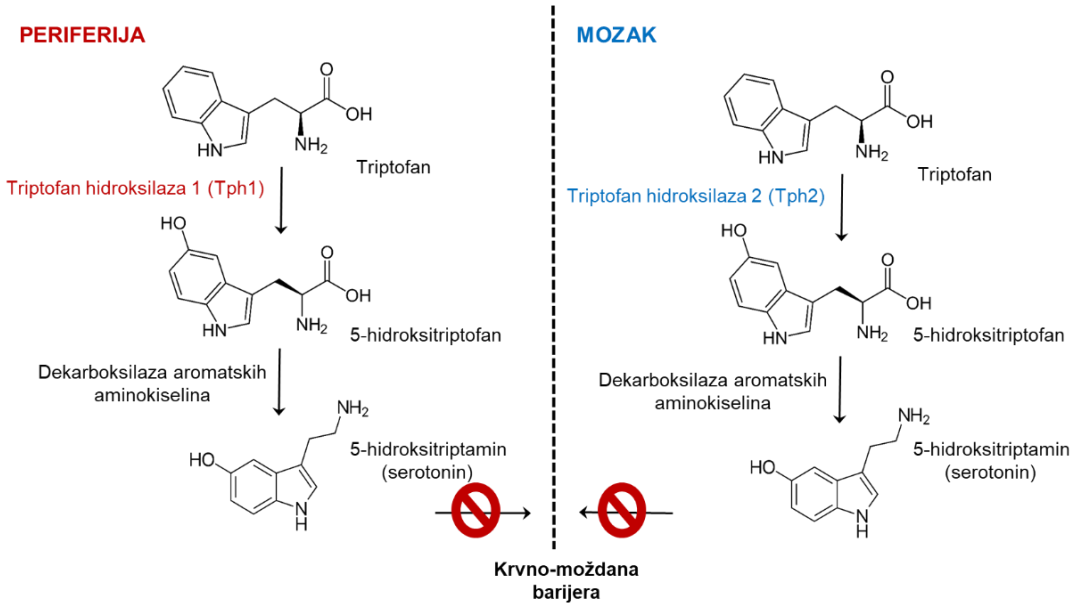
Tablica 2. Primjeri istraživanja učinka prehrane bogate mastima na ekspresiju gena u hipotalamusu i bijelom masnom tkivu

Pokusne životinje	Udio masti u prehrani	Trajanje prehrane (tjedni)	Tkivo	Ekspresija gena			Literaturni navodi
				Povišena	Snižena	Nema učinka	
Sprague-Dawley štakor	50%	3	Hpt	*Hcrt*			Wortley i sur., 2003.
Sprague-Dawley štakor	33%	5	Hpt		*Agrp, Lep, Lepr, Npy*	*Pomc, Cart, Mc4r*	Archer i sur., 2004.
C57BL/6J miš	60%	15	Hpt		*Lepr*		Townsend i sur., 2008.
C57BL6 miš	35%	12	Hpt	*Cart, Npy, Pomc*	*Agrp*		Lee i sur., 2010.
Sprague-Dawley štakor	50%	18	Hpt	*Tnf-α*			Wang i sur., 2012.
Sprague-Dawley štakor	45%	5	Hpt	*Npy, Pparγ*		*Cart, Pomc, Lepr, Agrp*	Cifani i sur., 2015.
C57BL/6J miš	21%	3	Hpt			*Pparγc1a, Pparγc1b,*	Veniaminova i sur., 2020.
SERT - /- miš	21%	3	Hpt		*Pparγc1A,*	*Pparγc1b,*	
Sprague-Dawley štakor	60%	2	WAT		*Irs1, Irs2*		Anai i sur., 1998.
Wistar štakor	60%	11	WAT	*Lep*			Milagro i sur., 2009.
C57BL/6J miš	35%	12	WAT	*Lep*			Shen i sur., 2014.
Wistar štakor	60%	16	WAT			*Fgf21*	García-Ruiz i sur., 2015.
C57BL/6J miš	40%	12	WAT	*Cebpα, Fgf1, Pparγ2*			Choi i sur., 2016.
ddY miš	60%	8	WAT	*Lep*		*Pparγ1, Adipoq*	Yamazaki i sur., 2016.
C57BL/6J miš	35%	16	WAT		*Adipoq, Retn*		Lu i sur., 2018.

Hpt, hipotalamus; WAT, bijelo masno tkivo (engl. *white adipose tissue*)

2.3. Serotonin u organizmu sisavaca

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5HT) je biogeni monoamin čije se otkriće pripisuje talijanskom istraživaču, dr. Vittoriu Erspameru, koji ga je prvi otkrio u ekstraktu enterokromafinih stanica gastrointestinalnog trakta kunića (Whitaker-Azmitia, 1999.). Kao hidrofilna molekula, 5HT ne prelazi krvno moždanu barijeru te u organizmu sisavaca imamo dvije odvojene zalihe serotonina, jednu u središnjem živčanom sustavu i drugu na periferiji (Frazer i sur., 1999.). U organizmu se sintetetizira iz esencijalne aminokiseline L-triptofana. Prvi i ključan korak u sintezi serotonina je hidroksilacija triptofana u 5-hidroksitriptofan (5HTP) pomoću enzima triptofan hidroksilaze (Tph) (Fitzpatrick, 1999.). Postoje dvije izoforme ovog enzima, triptofan hidroksilaza 1 (Tph1) i triptofan hidroksilaza 2 (Tph2) (Walther i sur., 2003a.). Triptofan hidroksilaza 1 je odgovorna za sintezu 5HT u perifernim organima, dok je triptofan hidroksilaza 2 odgovorna za sintezu 5HT u središnjem živčanom sustavu (Sakowski i sur., 2006.) i enteričkim neuronima (Li i sur., 2011.) (slika 2.2.). 5-hidroksitriptofan se dalje dekarboksilira uz pomoć enzima dekarboksilaza aromatskih aminokiselina te nastaje 5-hidroksitriptamin, tj. serotonin. 5HT se razgrađuje oksidacijom pomoću enzima monoamin oksidaze koji je prisutan u dvije izoforme, monoamin oksidaza A (Maoa) i monoamin oksidaza B (Maob) (Bach i sur., 1988.). MaoA ima veći afinitet prema serotoninu nego prema drugim biogenim monoaminima (Green i Youdim, 1975.). Oksidacijom 5HT nastaje 5-hidroksindolacetaldehid. Ovisno o omjeru NAD/NADH (nikotinamid adenin dinukleotid) u tkivu, 5-hidroksindolacetaldehid se može dalje reducirati u 5-hidroksitriptofol uz pomoć enzima alkohol dehidrogenaze (ADH) ili se može oksidirati u 5-hidroksiindoloctenu kiselinu (5HIAA, engl. *5-hydroxyindoleacetic acid*) uz pomoć enzima aldehid dehidrogenaze (ALDH). 5HIAA se transportira kroz krvotok i zahvaljujući glomerularnoj filtraciji izlučuje se kroz bubrege (Hakim i sur., 1970.).



Slika 2.2. Sinteza serotonina na periferiji i u mozgu (prilagođeno prema: El-Merahbi i sur., 2015.)

Samo mali udio ukupnog 5HT u organizmu, oko 5%, se nalazi u mozgu**,** gdje serotonin djeluje kao modulatorni neurotransmiter (Fouquet i sur., 2019.; Okaty i sur., 2019.). Glavno mjesto sinteze 5HT u mozgu su jezgre rafe smještene u moždanom deblu. Uzlazna i silazna serotonergička vlakna inerviraju gotovo sve dijelove središnjeg živčanog sustava. Količina 5HT koja se sintetizira u mozgu ovisi o dostupnoj količini L-triptofana, perkursora 5HT, koji prelazi krvno-moždanu barijeru (Höglund i sur., 2019.). Prehrana, stres, fizička aktivnost i aktivacija imunološkog sustava utječu na koncentraciju L-triptofana u plazmi te samim time na sintezu serotonina u mozgu (Russo i sur., 2009.). Nakon sinteze 5HT u serotonergičkim neuronima, vezikularni monoaminski transporter ga pohranjuje u sinaptičke mjehuriće. Uslijed aktivacije neurona dolazi do stapanja membrane sinaptičkih mjehurića s plazmatskom membranom, 5HT se otpušta u izvanstanični prostor te ulazi u interakcije sa svojim receptorima smještenim na plazmatskoj membrani postsinaptičke stanice (heteroreceptori) ili same presinaptičke stanice (Daubert i Condron, 2010.).

Većina 5HT u organizmu, čak 95%, nalazi se u krvi i perifernim tkivima. Najveći dio 5HT na periferiji sintetiziraju enterokromafine stanice tankog crijeva. 5HT sintetiziran u enterokromafinim stanicama može djelovati lokalno u samom gastrointestinalnom traktu, gdje potiče peristaltiku crijeva putem kontrakcija glatkih mišića, ili se može otpustiti u krvotok (Sikander i sur., 2009.). 5HT otpušten u krvotok brzo ulazi u trombocite u koje ga unosi transmembranski protein poznat pod nazivom serotoninski prijenosnik (5HTT, Sert, engl. *serotonin transporter*) (Mercado i Kilic, 2010.). U trombocitima se 5HT pakira u guste granule

pomoću vezikularnog monoaminskog transportera (White, 1968.). Sami trombociti ne eksprimiraju *Tph* te stoga ne mogu sintetizirati 5HT, ali ga sadrže u velikoj količini zahvaljujući trombocitnom Sert-u koji unosi 5HT iz plazme u unutrašnjost trombocita (Ni i Watts, 2006.). Tako je najveći dio 5HT u krvi (više od 99%) pohranjen u trombocitima, dok je zanemarivi dio 5HT slobodan u plazmi (Brand i Anderson, 2011.).

Iako su enterokromafine stanice crijeva odgovorne za sintezu većine perifernog 5HT, u novije vrijeme su, zahvaljujući razvoju animalnih modela koji imaju inaktiviranu ekspresiju (KO, engl. *knock-out*) gena za Tph1 samo u enterokromafinim stanicama, identificirani tzv. mikroserotonergični sustavi, tj. dodatna mjesta sinteze serotonina na periferiji (Spohn i Mawe, 2017.). Tako je otkriveno da se 5HT na periferiji također sintetizira u β-stanicama gušterače (Kim i sur., 2010.; Paulmann i sur., 2009.), stanicama glatkih mišića aorte (Ni i sur., 2008.), stanicama dojke (Matsuda i sur., 2004.), osteoklastima i osteoblastima (Chabbi-Achengli i sur., 2012.) te adipocitima (Stunes i sur., 2011.).

Serotonin vrši funkciju međustanične signalizacije putem vezanja na svoje membranske receptore, kojih ima ukupno 14. Receptori za serotonin (Htr) podijeljeni su u 7 obitelji, od Htr1 do Htr7, na temelju farmakoloških svojstava, aminokiselinskog slijeda, genske strukture te mehanizma prijenosa signala. Samo je Htr3 ionotropni receptor (Davies, 2011.), dok su svi ostali serotoninski receptori metabotropni te su spregnuti s proteinom G (GPCR, engl. *G-protein coupled receptor*) (Hoyer i sur., 2002.). Serotoninski metabotropni receptori su građeni od sedam transmembranskih domena koje su povezane s tri unutarstanične i tri izvanstanične petlje (McCorvy i Roth, 2015.). Vezanjem na ove receptore, 5HT može uzrokovati oprečne efekte, što serotoninsku signalizaciju čini dodatno složenom. Receptori za serotonin široko su rasprostanjeni u mozgu i različitim perifernim tkivima. Stunes i sur. (2011.) su pretpostavili da i adipociti, kao i druge stanice mezenhimalnog podrijetla, eksprimiraju serotoninske receptore te su prvi pokazali da štakorski adipociti doista eksprimiraju tri tipa serotoninskih receptora (Htr2a, Htr2b i Htr2c).

U novije vrijeme je pokazano da 5HT ima važnu ulogu u unutarstaničnoj signalizaciji i putem kovalentnog vezanja na neke unutarstanične proteine, u procesu nazvanom serotonilacija. Transglutaminaza 2 katalizira vezanje 5HT na glutaminske ostatke citoplazmatskih proteina kao što su male gvanidin trifosfataze (GTPaze) (Bader, 2019.). Serotonilacija malih GTPaza je uočena u trombocitima (Walther i sur., 2003b.) gdje ima ulogu u procesu degranulacije te u β-stanicama gušterače (Paulmann i sur., 2009.) gdje utječe na izlučivanje inzulina. Istraživanje iz 2019. godine je pokazalo da je serotonilacija uključena i u regulaciju ekspresije gena. Uslijed ulaska 5HT u jezgru stanice dolazi do serotonilacije histona

H3, što je dodatni korak koji pomaže u formiranju permisivne (transkripcijski dostupne) strukture kromatina (Farrelly i sur., 2019.).

Kako u mozgu, tako i na periferiji glavni mehanizam regulacije koncentracije 5HT u izvanstaničnom prostoru, a time i učinaka serotonina, je unos 5HT u stanice posredstvom Sert-a. Sert se sastoji od 12 transmembranskih domena i član je obitelji prijenosnika ovisnih o kotransportu iona Na^+ i Cl^-. Pri unosu 5HT u stanicu mijenja se konformacija prijenosnika te se osim 5HT u stanicu unose ioni Na^+ i Cl^-, u smjeru njihovih elektrokemijskih gradijenata. 5HT se otpušta u citoplazmu, a za Sert se vežu stanični ioni K^+ ili H^+ koji se, ponovnom promjenom konformacije prijenosnika, otpuštaju izvan stanice (Baudry i sur., 2019.).

Sert je u mozgu ponajviše eksprimiran u završecima aksona presinaptičkih serotonergičkih neurona. Budući da ima važnu ulogu u regulaciji serotoninske neurotransmisije, postao je glavna meta lijekova iz skupine selektivnih inhibitora povratnog unosa 5HT, koji se koriste kao antidepresivi (Bowman i Daws, 2019.). Na periferiji je *Sert* eksprimiran u enterokromafinim stanicama (Wade i sur., 1996.), trombocitima, limfoblastima (Faraj i sur., 1997.), monocitima (Yang i sur., 2007.), endotelnim stanicama (Brust i sur., 2000.), trofoblastima (Balkovetz i sur., 1989.) te u adipocitima (Stunes i sur., 2011.).

Serotonin u organizmu sisavaca ima višestruke učinke i uključen je u brojne fiziološke procese, kao što su regulacija energetske homeostaze (Lam i sur., 2010.; Oh i sur., 2015.), raspoloženja (Young i Leyton, 2002.), cirkadijanog ritma (Portas i sur., 2000.), spolnog ponašanja (Uphouse, 2014.), osjeta boli (Martin i sur., 2017.), imunoloških (Arreola i sur., 2015.), kardiovaskularnih (Van Nueten i sur., 1985.; Watts i sur., 2012.) te kognitivnih funkcija (Evers i sur., 2005.).

2.4. Uloga serotonina u regulaciji energetske ravnoteže i razvoju pretilosti

Energetska ravnoteža podrazumijeva uravnoteženi odnos između unosa hrane, koja je glavni izvor energije za tijelo, i potrošnje energije (Romieu i sur., 2017.). Kao što je ranije navedeno, narušena energetska ravnoteža vodi prema prekomjernom nakupljanju masnog tkiva u organizmu te razvitku pretilosti i poremećaja povezanih s pretilošću.

2.4.1. Središnji serotonin i energetska ravnoteža

Uloga središnjeg serotonina u regulaciji unosa hrane prepoznata je još 70-ih godina prošlog stoljeća kada su Breisch i sur. (1976.) pokazali na modelu glodavaca da povišena razina

središnjeg 5HT smanjuje apetit i unos hrane te da smanjena razina središnjeg 5HT dovodi do hiperfagije i porasta tjelesne mase. Brojna daljnja istraživanja su potvrdila ove nalaze korištenjem specifičnih supstanci koje aktiviraju/inhibiraju aktivnost serotoninskih receptora u mozgu ili animalnih modela kojima su inaktivirani geni za određene serotoninske receptore ili enzim Tph2. Najviše proučavan serotoninski receptor u kontekstu regulacije apetita i razvitka pretilosti je Htr2c. Miševi kojima je inaktiviran gen za Htr2c razvijaju hiperfagiju, pretilost i hiperinzulinemiju te imaju smanjenu toleranciju glukoze u odnosu na divlji tip miša. Ovi defekti se javljaju u težem obliku kod miševa s deletiranim genom *Htr2c* na prehrani bogatoj mastima u odnosu na divlji tipa miša na prehrani bogatoj mastima (Nonogaki i sur., 1998.). Slično inaktivaciji gena *Htr2c*, inaktivacija gena za Htr1b kod miševa također rezultira povećanjem apetita i tjelesne mase (Lucas i sur., 1998.).

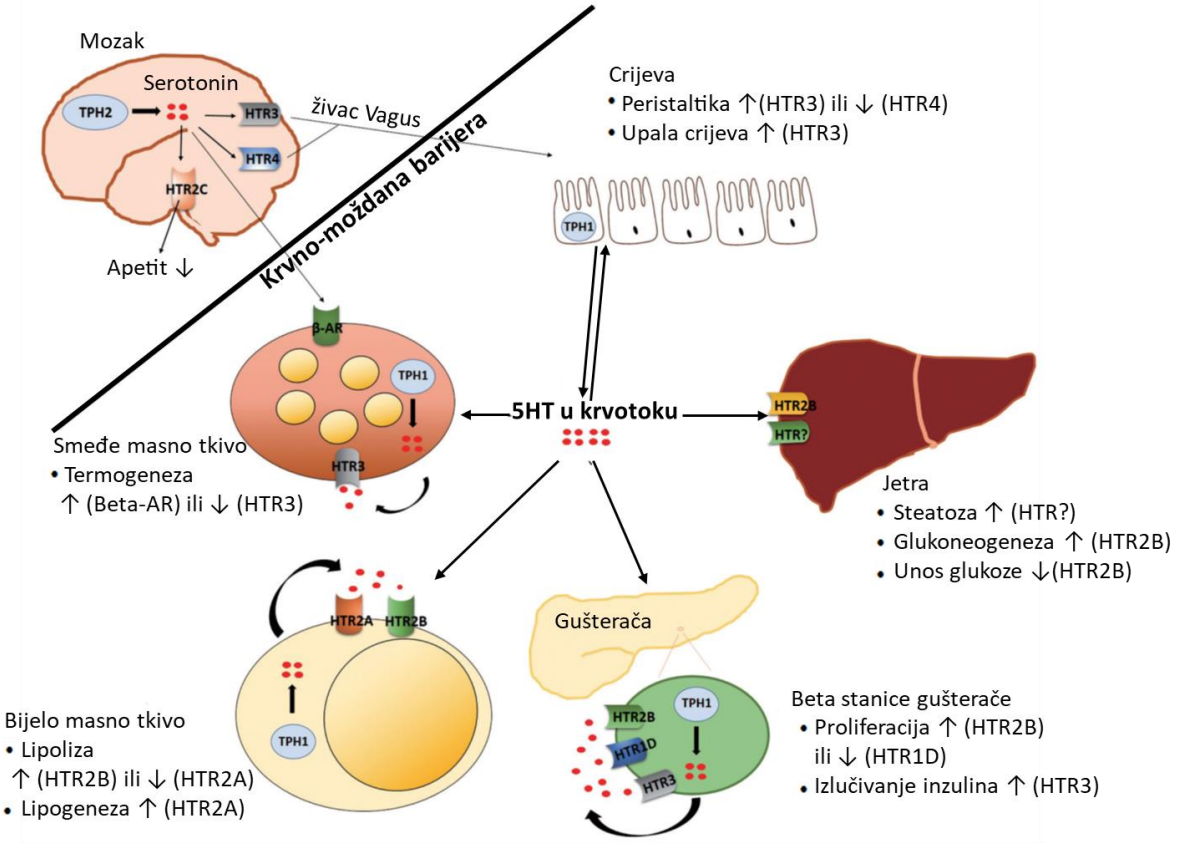
Daljnja istraživanja uloge serotonina u regulaciji unosa hrane pokazala su da on djeluje na razini arkuatne jezgre hipotalamusa koja je okarakterizirana kao specifična regija mozga odgovorna za regulaciju kontrole apetita (Van Den Top i sur., 2004.). U njoj se nalaze dvije različite populacije neurona koje imaju oprečno djelovanje na apetit, tzv. Pomc/Cart neuroni i Npy/Agrp neuroni. Za Pomc/Cart neurone je karakteristično da eksprimiraju pro-opiomelanokortin (Pomc, engl. *pro-opiomelanocortin*) i transkript reguliran kokainom i amfetaminom (Cart, engl. *cocaine and amphetamine regulated transcript*), dok Npy/Agrp neuroni eksprimiraju neuropeptid Y (Npy*)* i peptid povezan s agouti (Agrp, engl. *agouti-related peptide*). Pojačana aktivnost Pomc/Cart neurona smanjuje apetit, a pojačana aktivnost Npy/Agrp neurona ga povećava (Timper i Brüning, 2017.). Središnji serotonin djeluje suprotno na ove dvije populacije neurona. Vezanjem na receptore Htr1b, serotonin stimulira aktivnost Pomc/Cart neurona, dok vezanjem na receptore Htr2c, serotonin inhibira aktivnost Npy/Agrp neurona, što u konačnici dovodi do smanjenja apetita i unosa hrane (Heisler i sur., 2006.). Ovakav učinak središnjeg serotonina na apetit čini ga potencijalnom metom u tretmanu pretilosti. Tako je u tretmanu pretilosti kod ljudi danas odobren lijek lorcaserin koji djeluje kao agonist receptora Htr2c i smanjuje apetit (Colman i sur., 2012.; Martin i sur., 2011.). Isti takav učinak na apetit i unos hrane u organizam ima i agonist receptora Htr1b (CP-94,253) (Lee i Simansky, 1997.), no on još nije u kliničkoj upotrebi.

Uz to što je uključen u regulaciju apetita i unosa hrane, središnji 5HT je također uključen u regulaciju termogeneze u smeđim i bež adipocitima, modulacijom aktivnosti simpatičkog živčanog sustava putem receptora Htr1a i Htr7 (Madden i Morrison, 2006., 2010.). Smanjena aktivnost središnjeg serotonina dovodi do smanjene ekspresije specifičnog termogenog proteina *Ucp1* u smeđem masnom tkivu što rezultira smanjenjem termogeneze, smanjenim brojem bež

adipocita i slabijom prilagodbom na hladnoću (Alenina i sur., 2009.; Cerpa i sur., 2014.; Hodges i sur., 2011.; McGlashon i sur., 2015.).

2.4.2. Periferni serotonin i energetska ravnoteža

U novije vrijeme prepoznato je da i periferni serotonin ima važnu ulogu u održavanju energetske ravnoteže. 5HT proizveden u enterokromafinim stanicama tankog crijeva modulira motoričke i senzoričke funkcije u crijevima te tako inducira i regulira peristaltičku aktivnost i apsorpciju nutrijenata u gastrointestinalnom traktu (Mawe i Hoffman, 2013.; Ormsbee i Fondacaro, 1985.). Osim toga, 5HT kojeg proizvode enterokromafine stanice tankog crijeva krvotokom dospijeva do različitih metaboličkih organa (jetre, gušterače, bijelog i smeđeg masnog tkiva, mišića) te regulira njihovu aktivnost i energetski metabolizam (Slika 2.3). Primjerice, u jetri 5HT kojeg proizvode enterokromafine stanice tankog crijeva modulira lipidni metabolizam (Osawa i sur., 2011.; Watanabe i sur., 2010.), aktivacijom jetrenih receptora Htr2b stimulira glukoneogenezu i smanjuje unos glukoze u hepatocite (Sumara i sur., 2012.), a aktivacijom receptora Htr2a potiče glikolizu u skeletnim mišićima i stimulira unos glukoze u mišićna vlakna (Coelho i sur., 2007.; Hajduch i sur., 1999a., 1999b.).



Slika 2.3. Uloga središnjeg i perifernog serotonina u održavanju energetske ravnoteže (prilagođeno prema Oh i sur., 2016.)

Miševi sa sistemski inaktiviranim genom *Tph1* (*Tph1* KO) (Crane i sur., 2015.; Kwon i sur., 2019.) i miševi kojima je farmakološki inhibirana aktivnost Tph1 (Oh i sur., 2015.; Sumara i sur., 2012.), što u oba slučaja blokira sintezu 5HT u crijevima i drugim perifernim organima, kao i miševi kojima je gen *Tph1* selektivno inaktiviran samo u crijevima (Sumara i sur., 2012.), ne pokazuju promjene u tjelesnoj masi u odnosu na miševe s normalnom sintezom perifernog serotonina. Međutim, na prehrani s visokim udjelom masti, miševi s genetički ili farmakološki blokiranom sintezom perifernog serotonina pokazuju manji prinos u tjelesnoj masi te bolju toleranciju glukoze i osjetljivost na inzulin od miševa s normalom sintezom perifernog serotonina (Crane i sur., 2015.; Oh i sur., 2015.), što upućuje da periferni serotonin pogoršava negativne učinke prehrane s visokim udjelom masti. Suprotno ovim rezultatima, Watanabe i sur. (2016.) su, intraperitonealnom injekcijom serotonina, pokazali da povišena razina perifernog serotonina štiti životinje od negativnih učinaka prehrane s visokim udjelom masti, specifično, od razvoja pretilosti, hiperglikemije i rezistencije na inzulin. S obzirom na navedene kontradiktorne nalaze, potrebna su daljnja istraživanja uloge 5HT u modulaciji učinaka prehrane s visokim udjelom lipida.

Korištenjem inducibilnog KO mišjeg modela kod kojeg je inaktivacija *Tph1* inducirana samo u zrelim β-stanicama gušterače (*Tph1* β KO), otkriveno je da 5HT sintetiziran u gušterači regulira izlučivanja inzulina i glukagona, dvaju ključnih hormona u kontroli homeostaze glukoze i lipida (Cataldo Bascuñan i sur., 2019.; Paulmann i sur., 2009.). Pokazano je da tijekom trudnoće (Kim i sur., 2010.; Ohara-Imaizumi i sur., 2013.) i laktacije (Takahashi i sur., 2020.) prolaktin stimulira ekspresiju *Tph1* i sintezu 5HT u β-stanicama gušterače te da tako sintetizirani serotonin putem autokrine/parakrine signalizacije potiče proliferaciju β-stanica gušterače čime se povećava proizvodnja i izlučivanje inzulina. *Tph1* β KO miševi na standardnoj prehrani imaju normalnu toleranciju glukoze i osjetljivost na inzulin, međutim, ove životinje podliježu štetnim učincima prehrane bogate mastima te razvijaju smanjenu toleranciju na glukozu u odnosu na divlji tip miša (Kim i sur., 2015.).

Još jedan važan način na koji periferni 5HT pridonosi održavanju energetske homeostaze je njegovo regulatorno djelovanje u bijelom masnom tkivu. U regulaciju funkcija bijelog masnog tkiva uključen je i 5HT iz crijeva i 5HT proizveden u samim adipocitima (Stunes i sur., 2011.). Istraživanje provedeno na animalnom modelu sa selektivno inaktiviranim genom *Tph1* u crijevima je pokazalo da 5HT iz crijeva aktivacijom receptora Htr2b na adipocitima povećava fosforilaciju i aktivnost enzima hormon senzitivna lipaza te tako stimulira lipolizu u bijelom masnom tkivu (Sumara i sur., 2012.). Uz to, aktivacija receptora Htr2b serotoninom iz crijeva inhibira lipogenezu (Söhle i sur., 2012.). S druge strane, 5HT

proizveden u bijelom masnom tkivu aktivira receptore Htr2a na adipocitima te time povećava unos lipida u adipocite i suprimira lipolizu (Hansson i sur., 2016.). Stimulacija bijelih adipocita serotoninom dovodi do narušene inzulinske funkcije, degradacije proteina Irs1 (engl. *insulin receptor substrate 1*) i do smanjenog unosa glukoze (Li i sur., 2013.). Također, 5HT je autokrini/parakrini faktor koji je potreban u diferencijaciji bijelih adipocita (Kinoshita i sur., 2010.). Waku i sur. (2010.) su pokazali da metaboliti serotonina sudjeluju u regulaciji adipogeneze kao agonisti receptora Ppar γ (engl, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) (Waku i sur., 2010.).

U smeđem masnom tkivu miševa sa sistemski inaktiviranim genom *Tph1* (*Tph1* KO) i u miševa kojima je farmakološki inhibirana aktivnost Tph1, u odnosu na miševe s normalnom aktivnosti Tph1, dolazi uslijed prehrane bogate mastima do povećanja razine proteina Ucp1 te posljedično do povećane termogeneze (Crane i sur., 2015.). Ovi nalazi upućuju da periferni 5HT, za razliku od središnjeg 5HT, ima inhibitorno djelovanje na termogenezu. Iako je u prijašnjim istraživanjima utvrđena važnost lokalno sintetiziranog 5HT u regulaciji termogeneze u smeđem masnom tkivu (Crane i sur., 2015.), tek su Yabut i sur. (2020.) nedavno pokazali da su mastociti odgovorni za sintezu 5HT koji inhibira termogenezu. Kod prehrane s visokim udjelom masti, nedostatak mastocita u organizmu ili nedostatak sinteze 5HT u mastocitima rezultirao je povišenom ekspresijom gena *Ucp1* i pojačanom termogenezom te je zaštitio životinje od razvoja rezistencije na inzulin i bolesti masne jetre (Yabut i sur., 2020.).

Uzevši sve ovo u obzir, vidljivo je da je serotoninska signalizacija na periferiji složena zbog višestrukih mjesta proizvodnje serotonina, njegove sposobnosti da djeluje kao auto-, para- i endokrini faktor i velikog broja serotoninskih receptora. Zbog toga, te postojanja kontradiktornih nalaza u literaturi, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se u potpunosti razumjela uloga serotonina u regulaciji energetske ravnoteže i razvitku pretilosti.

2.5. Wistar-Zagreb 5HT štakor

U istraživanju uloge serotonina u organizmu sisavaca često se koriste sojevi miševa ili štakora kod kojih je genetičkim metodama inaktiviran gen za neki od regulatornih proteina serotonina (sintetski ili razgradni enzim serotonina, serotoninski prijenosnik, neki od serotoninskih receptora), pri čemu inaktivacija može biti prisutna u čitavom organizmu ili samo u određenim tkivima. Osim genetički modificiranih životinja, koriste se i animalni modeli kod

kojih je aktivnost serotonina manipulirana primjenom specifičnog farmakološkog tretmana poput npr. inhibicije sinteze serotonina, primjene prekursora serotonina i slično.

Wistar-Zagreb 5HT štakor je animalni model razvijen u Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju Instituta „Ruđer Bošković“, odabirnim parenjem štakora soja Wistar prema ekstremnim vrijednostima trombocitnih serotoninskih parametara (Čičin-Šain i Jernej, 2010a.). Prednost ovog modela je što je sličniji fiziološkom stanju nego animalni modeli koji su razvijeni metodama genetičkog inženjerstva te što odstupanja idu u oba smjera od normale (u smjeru smanjenja, ali i pojačanja serotoninske aktivnosti). Razvoj modela bio je moguć zahvaljujući metodi za opetovano uzimanje uzoraka krvi iz jugularne vene životinja (Čičin-Šain i sur., 2009.; Jernej i sur., 1988.). Ukratko, životinjama se u dobi od mjesec dana određuje razina trombocitnog serotonina i aktivnost trombocitnog serotoninskog prijenosnika. Na temelju tih nalaza, u parenje se stavljaju mužjaci i ženke s ekstremno niskim vrijednostima obaju trombocitnih serotoninskih parametara te mužjaci i ženke s ekstremno visokim vrijednostima obaju trombocitnih serotoninskih parametara. Nakon 6-8 generacija ovakvog uzgoja, dobiju se dvije odvojene sublinije životinja: 5HT-visoka (H, engl. *high*) i 5HT-niska (L, engl. *low*) sublinija. Životinje iz 5HT-visoke sublinije imaju konstitucijski povišene, a životinje iz 5HT-niske sublinije imaju konstitucijski snižene vrijednosti obaju trombocitnih serotoninskih parametara (razinu trombocitnog serotonina i aktivnost trombocitnog serotoninskog prijenosnika) (Čičin-Šain i sur., 1998., 2005.). Razlika među sublinijama u aktivnosti trombocitnog serotoninskog prijenosnika popraćena je i otprilike dvostruko većom razinom mRNA za Sert u trombocitima životinja iz 5HT-visoke sublinije (Jernej i sur., 1998.). Osim u trombocitima, neki serotoninski parametri su istraživani i u drugim tkivima ovih životinja. Tako je pokazano da se hipotalamičke razine serotonina i njegovog metabolita, 5-hidroksiindoloctene kiseline, ne razlikuju među sublinijama, međutim, u hipotalamusu životinja iz 5HT-visoke sublinije prisutna je povišena razina mRNA za Sert (Kesić i sur., 2020.). S druge strane, razina mRNA za Sert u crijevima se ne razlikuje između sublinija (Erjavec i sur., 2016.). Također, sublinije se ne razlikuju po razini mRNA za metaboličke enzime serotonina (Tph1 i Maoa) u crijevima (Erjavec i sur., 2016.) niti po razini mRNA za serotoninske receptore Htr1b i Htr2c u hipotalamusu (Kesić i sur., 2020.).

Životinje iz sublinija WZ-5HT štakora se, osim po serotoninskim parametrima, razlikuju i po različitim drugim fenotipskim karakteristikama. Već pri okotu 5HT-niski štakori imaju značajno manju tjelesnu masu u odnosu na 5HT-visoke štakore te je ova razlika prisutna i u odrasloj dobi životinja (Kesić i sur., 2020.). U obiju sublinija, uočena je pozitivna korelacija između razine 5HT u krvi i tjelesne mase životinja. Masa gonadnog bijelog masnog tkiva je

povećana, dok je masa smeđeg masnog tkiva smanjena u životinja iz 5HT-visoke sublinije u odnosu na životinje iz 5HT-niske sublinije, što ukazuju na različitu raspodjelu masti među sublinijama (Kesić i sur., 2020.). Proteinska analiza adipokina (adiponektin, leptin, rezistin) u visceralnom bijelom masnom tkivu je ukazala na povišene razine ovih proteina u 5HT-visokoj subliniji (Kesić i sur., 2015.). Životinje iz 5HT-visoke sublinije također imaju povišenu koncentraciju kolesterola u krvi, smanjenu toleranciju glukoze te razvijaju rezistenciju na inzulin (Erjavec i sur., 2016.).

Kako bi se istražilo jesu li razlike u tjelesnoj masi posljedica razlika u unosu hrane, mjeren je unos hrane u ranoj i odrasloj dobi. Pokazano je da 5HT-visoki štakori u dobi od 2 tjedna imaju tendenciju sisati više mlijeka u usporedbi s 5HT-niskim štakorima iste starosti. U odrasloj dobi, štakori iz 5HT-visoke sublinije imaju značajno viši dnevni unos hrane kada se računa apsolutna količina konzumirane hrane, ali kada se dnevni unos hrane izrazi prema tjelesnoj masi (koja je veća kod 5HT-visokih životinja), gubi se razlika u unosu hrane u odnosu na 5HT-nisku subliniju (Kesić i sur., 2020.). U hipotalamusu životinja iz 5-HT visoke sublinije pronađena je povišena razina mRNA za Npyr, protein uključen u regulaciju apetita te jasan trend prema povišenim razinama mRNA različitih oreksigenih signalnih peptida, njihovih receptora i drugih molekula s oreksigenom aktivnosti (Kesić i sur., 2020.). Razlike u tjelesnoj masi životinja iz sublinija WZ-5HT štakora povezane su i s razlikama među sublinijama u potrošnji energije termogenezom. Specifično, u odnosu na životinje iz 5HT-niske sublinije, životinje iz 5HT-visoke sublinije imaju manju temperaturu iznad smeđeg masnog tkiva smještenog u interskapularnom području te manju ekspresiju specifičnog termogenog proteina, *Ucp1*, u smeđem masnom tkivu (Kesić i sur., 2019.).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Koncept istraživanja

Istraživanje je provedeno na animalnom modelu Wistar – Zagreb 5HT (WZ-5HT) štakor, koji je opisan u prethodnom poglavlju (v. literaturni pregled 2.5.).

Istraživanja su provedena paralelno na objema sublinijama životinja, pri čemu su korištene samo životinje muškog spola iz F24 generacije odabirnog uzgoja. U istraživanje je bilo uključeno ukupno 36 životinja, po 18 životinja iz svake sublinije. U dobi od 10 tjedana, životinje iz svake sublinije su nasumično podijeljene u dvije skupine od po 9 životinja. Tijekom narednih 11 tjedana, do dobi životinja od 21 tjedan, jedna skupina životinja iz svake sublinije je hranjena standardnom peletiranom hranom za laboratorijske glodavce (CD, engl. *control diet*), a druga skupina životinja iz svake sublinije je hranjena hranom s visokim (45%) udjelom masti (HFD, engl. *high fat diet*). Sastav obiju vrsta hrane naveden je u Tablici 3.

Tablica 3. Sastav peletirane hrane za laboratorijske glodavce kojom su hranjene pokusne životinje kroz period od 11 tjedana.

	Standardna hrana (CD)	**Hrana bogata mastima (HFD)**
Ugljikohidrati	53,5%	22,7%
Masti	3%	44,8%
Proteini	18,5%	21,7%

Za vrijeme trajanja kontrolirane prehrane, životinje su vagane četiri puta tjedno, uvijek u isto doba dana (od 9:00 do 9:30 h). Dva puta tjedno određivan je dnevni unos hrane računat kao razlika između mase hrane ponuđene životinjama (po tri životinje u kavezu) i mase hrane preostale nakon 24 sata. Vremenski tijek pokusa prikazan je na Slici 3.1. Lipidni profil (razina kolesterola i triglicerida) u uzorcima krvi iz jugularne vene određivan je u tri vremenske točke (u 4., 9. i 11. tjednu kontrolirane prehrane), pri čemu je krv dva puta uzorkovana nakon što životinje nisu imale 12 sati pristup hrani (natašte), a jedan put u uvjetima slobodnog pristupa hrani. U 9. tjednu kontrolirane prehrane napravljena je infracrvena termografija iznad interskapularnog smeđeg masnog tkiva (BAT, engl. *brown adipose tissue*). Također, u 9. i 10. tjednu kontrolirane prehrane izdvojeni su i pohranjeni uzorci plazme za kasnije analize razine inzulina, glukagona, leptina i adiponektina. U 10. tjednu kontrolirane prehrane napravljeni su test

tolerancije glukoze (GTT, engl. *glucose tolerance test*) i test tolerancije inzulina (ITT, engl. *insulin tolerance test*). U 11. tjednu kontrolirane prehrane, određeni su i trombocitni serotoninski parametri u uzorcima krvi iz jugularne vene: razina serotonina u trombocitima (PSL, engl. *platelet serotonin level*) i brzina aktivnog unosa serotonina u trombocite (PSU, engl. *platelet serotonin uptake*). Nakon ukupno 11 tjedana kontrolirane prehrane, životinje su žrtvovane, izdvojeni su i izvagani pojedini organi (jetra, smeđe masno tkivo, gonadno bijelo masno tkivo, srce i slezena). Masa organa izražena je na dva načina, kao apsolutna masa organa (g) i kao relativna masa organa (g po 100 g tjelesne mase životinje). Prikupljeni su i pohranjeni uzorci različitih tkiva (hipotalamus, korteks, smeđe masno tkivo, gonadno bijelo masno tkivo, visceralno bijelo masno tkivo, jetra, gušterača) za kasnije analize ekspresije gena na razini mRNA (v. poglavlje 3.10) i proteina (v. poglavlje 3.11).

Slika 3.1. Shematski prikaz pokusa koji su napravljeni tijekom 11 tjedana kontrolirane prehrane životinja. U sve provedene analize bile su uključene četiri skupine životinja: životinje na standardnoj prehrani iz 5HT-visoke sublinije (H-CD) i iz 5HT-niske sublinije (L-CD), te životinje na prehrani s visokim udjelom masti iz 5HT-visoke sublinije (H-HFD) i iz 5HT-niske sublinije (L-HFD). Tijekom svih 11 tjedana, praćena je tjelesna masa životinja i mjeren dnevni unos hrane.
GTT – test tolerancije glukoze, ITT – test tolerancije inzulina, PSL – razina trombocitnog serotonina; PSU – brzina aktivnog unosa serotonina u trombocite.

Životinje su tijekom pokusa držane u standardiziranim laboratorijskim uvjetima, po tri u kavezu, uz slobodan pristup vodi i hrani, u uvjetima 12-satnog ciklusa svijetlo-tama, pri temperaturi od 22±2ºC, uz vlagu 55%±10%. Svi postupci na životinjama provođeni su u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (NN 135/06 i 37/13) i Zakonom o dobrobiti životinja (NN 19/19) te ih je odobrilo Bioetičko povjerenstvo Instituta „Ruđer Bošković“ (BEP-1247/2-2015) i Ministarstvo poljoprivrede, Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane (KLASA:UP/I-332-01/15/26). U radu s eksperimentalnim životinjama primjenjivana su pravila Europske Unije (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council).

3.2. Hrana za životinje, kemikalije i otopine

Hrana za životinje

- Standardna peletirana hrana za glodavce (4RF21, Mucedola, Italija)
- Hrana za glodavce s visokim udjelom (45%) masti (TD.06415, Envigo, SAD)

Anesteziranje životinja i uzimanje uzoraka krvi:

- (RS)-2-kloro-2-(difluoromethoksi)-1,1,1-trifluoro-etan (Isoflurin, Vetpharma Animal Health, Španjolska)
- Otopina limunske kiseline, citrata i dekstroze (Solutio ACD, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska) kao antikoagulans
- Geomycin (Pliva, Hrvatska), antibiotik u prahu

Test tolerancije glukoze:

- Lidokain (Belupo, Hrvatska)
- D-(+)-Glukoza (Sigma, SAD)

Test tolerancije inzulina:

- Lidokain (Belupo, Hrvatska)
- Humulin R, 100 IU/mL (Eli Lilly, SAD)

Određivanje trombocitnog serotonina:

- HCl, 0,1 N vodena otopina (Kemika, Hrvatska)
- $ZnSO_4$, 10% vodena otopina (Kemika, Hrvatska)
- NaOH, 1N vodena otopina (Kemika, Hrvatska)
- L-cistein, 1% otopina u 0.1 N HCl (Merck, Njemačka)
- O-ftaldialdehid (OPT), 0,1% otopina u 10 N HCl (Aldrich-Chemie, SAD)
- Serotonin kreatinin sulfat, 20 µg/mL u 0,1M HCl (Sigma, SAD)

Određivanje proteina metodom po M. Bradford:

- *Coomasie Brilliant Blue*, G-250 (Serva, Njemačka)
- Etanol, 96% (Gram-mol, Hrvatska)
- Fosfatna kiselina, 85% (VWR International, SAD)

- Goveđi serumski albumin, 1 mg/mL destilirane vode (Serva, Njemačka)

Mjerenje brzine aktivnog unosa serotonina u trombocite

- ^{14}C-5-hidroksitriptamin-kreatinin-sulfat, specifične aktivnosti 54 mCi/mmol (Perkin Elmer, SAD)
- Krebs-Ringerov pufer bez $CaCl_2$, pH 7,4 (0,154 M NaCl, 0,154 M KCl, 0,154 $MgSO_4$ x 7 H_20, 0,1 M fosfatni pufer)
- Fiziološka otopina (0,9% NaCl)
- Scintilacijska tekućina (Ultima Gold MV, Perkin Elmer, SAD)

Očuvanje nukleinskih kiselina:

- RNAlater (Qiagen, Njemačka)

Izolacija RNA i uklanjanje genomske DNA:

- Dietil-pirokarbonat (DEPC), 0,1% vodena otopina (Sigma, SAD)
- Etanol, 96% (Gram-mol, Hrvatska)
- Kupovna sterilna voda bez nukleaza (DEPC-treated water, Ambion®, Life Technologies, Austrija)
- Kloroform (BDH Prolabo, Velika Britanija)
- Komplet za izolaciju RNA - RNeasy® Mini kit (Qiagen, Njemačka)
- Komplet za izolaciju RNA - RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Njemačka)
- Enzim i pufer za digestiju DNA (RNase-Free-DNase set, Qiagen, Njemačka)

Reverzna transkripcija:

- Komplet za reverznu transkripciju (High Capacity RNA-to-cDNA kit, Applied Biosystems, SAD)

Lančana reakcija polimerazom:

- Reagens za lančanu reakciju polimerazom (FG-Fast SYBR Master Mix, Applied Biosystems, SAD)
- Početnice su nabavljene od tvrtke Life technologies (Beč, Austrija) i Metabion (Planegg, Njemačka). Od liofilizata su pripremljene matične otopine koncentracije 100 µM od kojih su potom pripremane radne otopine koncentracije 10 µM. Sve otopine su čuvane na -20°C. Sastav korištenih početnica naveden je u Tablici 4.

Tablica 4. Oligonukleotidne početnice korištene za umnažanje fragmenata pojedinih cDNA štakora. Kao referentni geni korišteni su beta-aktin (*Actb*) i ribosomalni protein S29 (*Rps29*). Puni nazivi gena od interesa navedeni su u popisu kratica.

Gen (NCBI simbol)	**Pristupni broj (NCBI)**	**Nukleotidni slijed uzvodne i nizvodne početnice (5'-3')**	**Veličina PCR produkta (pb)**	**Izvor sekvence**
Actb	NM_031144.3	GCGCAAGTACTCTGTGTGGA GGCATCATTGACGACATCGAG	65	Erjavec i sur., 2016.
Adipoq	NM_144744.3	GAGACGCAGGTGTTCTTG CCTACGCTGAATGCTGAG	147	Tang i sur., 2012.
Agrp	NM_033650.1	GCAGAGGTGCTAGATCCACAGAA AGGACTCGTGCAGCCTTACAC	70	Leibowitz i sur., n.d.
Atgl	NM_001108509.2	AGACTGTCTGAGCAGGTGGA AGTAGCTGACGCTGGCATTC	158	Karbowska i Kochan, 2012.
Bdnf	NM_001270638.1	GAAAGTCCCGGTATCCAAAAG CGCCACCCAATTCTCTTTTTG	183	Ye i sur., 2012.
Cart	NM_017110.1	GCCAAGTCCCCATGTGTGAC CACCCCTTCACAAGCACTTCA	129	de Rijke i sur., 2005.
Cebpa	NM_012524	GACCATCCGCCTTGTGTGTA CTGACATTGCACAAGGCACC	182	Ye i sur., 2012.
Cebpd	NM_013154.2	GAATTGCTACAGTTTCTTGG ATGCGCAGTCTCTTCCTC	174	Sato i sur., 2007.
Fabp4	NM_053365.1	AGAAGTGGGAGTTGGCTTCG ACTCTCTGACCGGATGACGA	103	Pascual-Serrano i sur., 2017.
Fasn	NM_017332.1	GGTAGGCTTGGTGAACTGTCTC TCTAACTGGAAGTGACGGAAGG	201	Zhang i sur., 2014.
Fgf10	NM_012951.1	GAGATGTCCGCTGGAGAAAG CCCCTTCTTGTTCATGGCTA	191	Ye i sur., 2012.
Fgf21	NM_130752.1	AGGCTTTGACACCCAGGATT ACAGATGACGACCAGGACAC	145	Palou i sur., 2008.

Gapdh	NM_017008.4	TGCCCCCATGTTTGTGATG TGGTGGTGCAGGATGCATT	84	Abumaria i sur., 2006.
Glut1	NM_138827.1	TGGCCAAGGACACACGAATACTGA TGGAAGAGACAGGAATGGGCGAAT	144	Ding i sur., 2016.
Glut3	NM_017102.2	TGGCTACAACACCGGAGTCATCAA CTGCCAAAGCGGTTGACAAAGAGT	198	Zhang i sur., 2012.
Glut4	NM_012751.1	ATCAACGCCCCACAGAAAGT CCTGCCTACCCAGCCAAGT	61	Yao i sur., 2014.
Hcrt	NM_013179	TAGAGCCATATCCCTGCCCT GCGAGGAGAGGGGAAAGTTAG	130	Sousa-Ferreira i sur., 2011.
Hcrtr	NM_013064.1	GCGCGATTATCTCTATCCGAA AAGGCTATGAGAAACACGGCC	75	Bengtsson i sur., 2009.
Hsl	NM_012859.1	CTCCTCATGGCTCAACTCC ACTCCTGCGCATAGACTCC	124	Karbowska i Kochan, 2012.
Htr2a	NM_017254.1	TGGTCATCATGGCAGTGTCC CCACCGGTACCCATACAGGA	143	Ye i sur., 2012.
Htr2b	NM_017250.1	CTCTTCTTTCTGCTTATGTG CAGGAGTGTTTTGAGAGTAG	96	Ye i sur., 2012.
Htr2c	NM_012765.3	GCAAGCATAGGCCAACGAAC TTAGGTGCATCAGGAGCGAG	156	Ye i sur., 2012.
Insr	NM_017071.2	ATCTCCTGGGATTCATGCTG TACTGGGTCCAGGGTTTGAG	196	Ye i sur., 2012.
Irs1	NM_012969	GATTTAAGCACCTATGCCAG GAATCGTGAAAGAGTTCGAG	155	Ye i sur., 2012.
Irs2	NM_001168633.1	CCACACACCTGTCCTCATTG TAATCCGCTTTGCCAAAATC	172	Ye i sur., 2012.
Lep	NM_013076.3	GACACCAAAACCCTCAT CAGGGTCTGGTCCATCT	149	Ye i sur., 2012.
Lepr	NM_012596.1	CCTTGGAGGACTATGGGTGTC GTGGCGCACAAAACAGCTTA	154	Ye i sur., 2012.

Lpl	NM_012598.2	TTGAGAAAGGGCTCTGCCTGAGTT TGCTTCTCTTGGCTCTGACCTTGT	87	Sepa-Kishi i sur., 2017.
Maoa	NM_033653.1	CTATGTGGGACCAACCCAGA AATATGCCAAGGGGTTCCAC	161	Bendre i sur., 2015.
Maob	NM_013198.1	TGGGAAGATTCCAGAGGATG GCTGACAAGATGGTGGTCAA	142	Chen i Chen, 2007.
Npy	NM_012614.2	AGAGATCCAGCCCTGAGACA TCACCACATGGAAGGGTCTT	98	Page i sur., 2009.
Npyr	NM_001113357.1	GCTGTGGAACGTCATCAGCTA TTGATAGATCACGAAGGGCAG	129	Chottová Dvoráková i sur., 2008.
Pomc	NM_139326.2	GAGGTTAAGGAGCAGTGACTAAGA GTAGCAGAATCTCGGCATCTTCC	109	Orozco-Solís i sur., 2010.
Ppargc1b	NM_176075.2	CTACCAGAGCCCACCCAGTA CAGGATGAGGAGCCAGAACT	75	Sadana i sur., 2007.
Retn	NM_144741.1	ACTTCAGCTCCCTACTG GTCTATGCTTCCGCACT	187	Wang i sur., 2007.
Rps29	NM_012876.1	GCCAGGGTTCTCGCTCTTG GGCACATGTTCAGCCCGTAT	75	Poher i sur., 2015.
Sert	NM_0130134.3	TCTGAAAAGCCCCACTGGACT TAGGACCGTGTCTTCATCAGGC	58	Abumaria i sur., 2006.
Tnf	NM_012675.3	CATCTTCTCAAAACTCGAGTGACAA TGGGAGTAGATAAGGTACAGCCC	175	Meli i sur., 2013.
Tph1	NM_001100634.2	AGCATAACCAGCGCCATGAA GGCATCATTGACGACATCGAG	57	Abumaria i sur., 2008.
Ucp1	NM_012682.2	GGGCTGATTCCTTTTGGTCTCT GGGTTGCACTTCGGAAGTTGT	70	Poher i sur., 2015.
Vegfa	NM_001110335.1	CCGGTTTAAATCCTGGAGCG TTTAACTCAAGCTGCCTCGC	138	Dong i sur., 2017.
Wnt10b	NM_001108111.1	GTAATCACGACATGGACTTTGGAG GCACTTCCGCTTCAGGTTTT	146	Liu i sur., 2009.

Elektroforeza na agaroznom gelu:

- Agaroza (Sigma, SAD)
- TAE pufer (0,8M Tris, 0,2 mM octena kiselina, 0.5 M EDTA)
- Pufer za nanošenje uzoraka (50% glicerol, 0,5% bromfenol-plavo, 1 mM EDTA)
- Molekularna ljestvica: Take5™ 100 bp DNA Ladder (highQu, Njemačka)
- Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics, Njemačka)

Izolacija proteina:

- Komercijalni komplet za inhibiciju proteaza (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100X), Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Reagens za izolaciju proteina (T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent, Thermo Fisher Scientific, SAD)

Komercijalni kompleti za kvantitativno određivanje proteina:

- Štakor Fasn (engl. *fatty acid synthase*) ELISA komplet (E-EL-R0395, Elabscience, Kina)
- Štakor Atgl (engl. *adipose triglyceride lipase*) ELISA komplet (E-EL-R0387, Elabscience, Kina)
- Štakor glukagon ELISA komplet (E-EL-R0425, Elabscience, Kina)
- Štakor inzulin ELISA komplet (DEV8811, Demeditec Diagnostics GmbH, Njemačka)
- Štakor/miš leptin ELISA komplet (DEE006, Demeditec Diagnostics GmbH, Njemačka)
- Štakor adiponektin ELISA komplet (DEE091R, Demeditec Diagnostics GmbH, Njemačka)

3.3. Korištena tehnička oprema i pribor:

- Ultrazvučni dezintegrator (B. Braun Biotech International, Njemačka)
- Homogenizator (Tehtnica, Slovenija)
- Homogenizator (gentleMACS™ Dissociator, Miltenyi Biotec, Njemačka)
- Epruvete za homogenizaciju tipa M (M-tube, Miltenyi Biotec, Njemačka)
- Električne miješalice (IKA, Njemačka)
- Centrifuge (Hettich, Njemačka; Superspeed RC2-B, Sorvall, SDA5417C; Eppendorf Research, Njemačka)

- Vage (Tehtnica, Slovenija; Mettler H54AR, Njemačka; Kern, Njemačka)
- Laboratorijska giljotina za štakore (Ugo Basile, Italija)
- Digestor (Tlos, Hrvatska)
- Naprava za separaciju plazme bogate trombocitima (Laboratorij za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju, Institut "Ruđer Bošković", Hrvatska)
- Aparatura za mjerenje kinetike serotoninskog prijenosnika (Laboratorij za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju, Institut "Ruđer Bošković", Hrvatska)
- Filter-papir GF/C (Whatman, SAD)
- Scintilacijski brojač (Liquid Scintillation Analyzer, Tri-Carb 2810 TR, Perkin Elmer, SAD)
- Spektrofotometar (Ultrospec 2100 pro, Pharmacia Biotech, SAD)
- Spektrofotometar (Implen GmbH, Njemačka)
- Spektrofotofluorimetar (Varian Cary Eclipse, Agilent Technologies, SAD)
- Uređaj za PCR u stvarnom vremenu (StepOnePlus Real-Time PCR System, Applied Biosystems, SAD)
- Transiluminator spojen na digitalnu kameru, Uvitec Alliance 4.7 (Cambridge, Velika Britanija)
- pH metar (Lab 845, SI Analytics, Njemačka)
- Sustav za horizontalnu elektroforezu (Cleaver Scientific, Velika Britanija)
- Magnetska mješalica (IKA Combimag RCH, Njemačka)
- Čitač mikrotitarske pločice (Stat Fax-2100, Awarness Technology, Inc., SAD)
- Automatske pipete (Eppendorf, Njemačka ; Gilson, SAD)
- Injekcijske igle za jednokratnu uporabu, 0,6-0,7 mm (Tik, Slovenija; Terumo, Belgija)
- Plastične štrcaljke 2,5 i 5 mL (Terumo, Belgija)
- Kirurški pribor (škare kiruške, iglodržač, skalpel, špatule, pincete, kirurški konac)
- Operacioni stolić (Laboratorij za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju, Institut "Ruđer Bošković", Hrvatska)
- Uređaj za anesteziranje malih životinja (SomnoSuite, Low-flow anesthesia system, Kent scientific, SAD)
- Glukometar i glukotrakice (iDIA, Njemačka)
- Epruvete za izdvajanje seruma (Microtainer Microgard SST 365967 BD, Beckton-Dickinson, SAD)
- Epruvete za izdvajanje plazme (Multivette® 600 K3E, Sarstedt, Njemačka)
- Termografska kamera (T335, FLIR Systems, Inc., SAD)

3.4. Vađenje uzoraka krvi te priprema seruma, plazme i plazme bogate trombocitima

Za vađenje uzoraka krvi iz jugularne vene potrebno je da životinja bude u općoj anesteziji za vrijeme izvođenja procedure. Za anesteziju je korišten uređaj za anesteziranje malih životinja te inhalacijski anestetik izofluran. Životinja je prvo stavljena u posudu s poklopcem u koju se dovodi anestetik. Nakon što je životinja uspavana (otprilike 2 min), prebačena je na operacioni stolić, pričvršćena je za podlogu pomoću gumenih trakica te joj je na njušku stavljen nosni konus kroz koji se dovodi anestetik kako bi životinja za cijelo vrijeme izvođenja procedure bila održavana u anesteziji inhalacijom anestetika. Koža i površinski mišići vrata razrezali su se iznad ključne kosti te se iglom ušlo u jugularnu venu kroz prsni mišić. Nakon što je uzet uzorak krvi, na mjestu reza su napravljena dva šava pomoću kirurškog konca.

Za pripremu seruma, uzorci krvi su uzeti u epruvete za odvajanje seruma (SST, engl. *serum separating tube*). Nakon što je epruveta napunjena odgovarajućim volumenom krvi (500 µL), uzorak je promiješan inverznim okretanjem epruvete. Uzorci su potom proslijeđeni u klinički laboratorij za određivanje lipidnog profila.

Za pripremu plazme, uzorci krvi (500 µL) su uzeti u epruvete obložene antikoagulansom EDTA K3 (Multivette® 600 K3E), promiješani inverznim okretanjem epruvete te potom centrifugirani na +4°C, 10 min na 1500 x g. Supernatant (plazma) je alikvotiran i pohranjen na -80°C do upotrebe.

1 mL krvi je uzeto za pripremu plazme bogate trombocitima (PRP, engl. *platelet-rich-plasma*) na 0,5 mL antikoagulansa ACD te su potom šprice s antikoaguliranom krvi centrifugirane 25 s na 1050 x g. Tako dobivena supernatantna PRP je iz injekcionih šprica istisnuta u epruvete korištenjem plastičnog nastavka. Dio PRP-a koristio se za određivanje brzine aktivnog unosa serotonina u trombocite, a ostatak se koristio za određivanje razine serotonina u trombocitima.

3.5. Funkcionalni testovi

3.5.1. Test tolerancije glukoze (GTT)

Životinjama je dan prije pokusa uklonjena hrana, u 21:00 sat. S pokusom je započeto nakon 12 sati, idući dan u 09:00 sati ujutro. Životinju se umotalo u ručnik, vršak repa je uronjen u lokalni anestetik lidokain, pričekano je da počne djelovati te je potom odrezan vršak (1-2 mm) repa. Kap krvi iz repne vene istisnuta je na glukotraku koja je bila umetnuta u glukometar te je na ekranu glukometra očitana bazalna vrijednost glukoze. Životinjama je intraperitonealno injicirana otopinu glukoze koncentracije 0,2 g/ml u dozi od 1 ml/100 g tjelesne mase (2 g glukoze/kg tjelesne mase). U određenim vremenskim razmacima (15, 30, 60, 90, 120 min) nakon injiciranja otopine glukoze, životinjama je iz reza na vršku repa istisnuta kap krvi u kojoj je glukometrom izmjerena razina glukoze na iznad opisani način.

3.5.2. Test tolerancije inzulina (ITT)

Životinjama je maknuta hrana 3 sata prije početka pokusa. S pokusom je započeto u 09:00 sati ujutro. Bazalna razina glukoze kod životinja izmjerena je na gore opisan način (poglavlje 3.5.1.). Životinjama je zatim intraperitonealno injicirana otopina inzulina, koncentracije 100 IU/mL, u dozi od 0,5 ml/kg tjelesne mase (0,5 IU inzulina/kg tjelesne mase). U određenim vremenskim razmacima (15, 30, 60, 90, 150, 240 min) nakon injiciranja otopine inzulina životinjama je iz reza na vršku repa istisnuta kap krvi u kojoj je glukometrom izmjerena razina glukoze na već opisani način.

3.6. Infracrvena termografija

Metoda infracrvene termografije (IR, engl. *infrared thermography*) korištena je za određivanje termogene aktivnosti smeđeg masnog tkiva smještenog u interskapularnom prostoru. Životinjama je dan prije snimanja obrijana dlaka s gornjeg dijela leđa kako bi se pristupilo koži između lopatica. Na dan pokusa, prije samog početka snimanja, životinje su anestezirane pomoću uređaja za anesteziranje malih životinja (v. opis procedure u poglavlju 3.4), položene su trbušnom stranom na mramornu ploču te su im sve četiri šape fiksirane pomoću elastičnih traka kako bi se osiguralo da su sve životinje u jednakom položaju pri snimanju. Za vrijeme snimanja životinje su održavane u anesteziji pomoć nosnog konusa kroz

koji se dovodio anestetik. Za mjerenje temperature je korištena infracrvena kamera (T335, FLIR Systems), a za analizu termalnih slika i prezentiranje temperaturnih vrijednosti izmjerenih na površini kože odabranog područja interskapularnog smeđeg masnog tkiva je korišten program ThermoMED, ranije razvijen na Institutu Ruđer Bošković.

3.7. Žrtvovanje životinja i uzimanje uzoraka tkiva

Životinja se anestezirala te se zatim dekapitirala uz pomoć giljotine. Sagitalnim rezom kože prikazao se gornji dio lubanje, škarama se zarezalo po šavovima lubanjske kosti pazeći da se pri tome ne ošteti mozak te se odvojila kalota lubanje. Špatulom su prerezani moždani živci te se mozak pažljivo izvadio na rashlađenu podlogu nakon čega su se uklonile mirisne lukovice. Koristeći zakrivljenu pincetu i stereotaksijski atlas kao vodič, pažljivo su izdvojeni hipotalamus i dio frontalne kore velikog mozga (otprilike 30 mg) i pohranjeni u epruvetu s otopinom za očuvanje nukleinskih kiselina (RNAlater). Uzorak je držan 24 h na +4°C, a potom je pohranjen na -80°C do daljnje obrade. Uzorci pohranjeni na ovaj način su se koristili za izolaciju RNA. Za proteinske analize, dio izdvojenog korteksa je izvagan, prenešen u epruvetu te pohranjen na -80°C do daljnje obrade.

Potom je trup životinje pričvršćen potrbuške za podlogu, rezom kože prikazano je interskapularno smeđe masno tkivo koje je potom izolirano, prebačeno na hladnu podlogu i očišćeno od okolnog tkiva. Pohranjen je uzorak za analizu RNA i za proteinske analize, kao što je opisano iznad za hipotalamus i korteks.

Nakon toga je trup okrenut trbušnom stranom prema gore, napravljen je sagitalni rez kože te transverzalni rezovi kako bi se omogućio pristup unutarnjim organima. Izolirani su jetra, gonadno bijelo masno tkivo (gWAT, engl. *gonadal white adipose tissue*), visceralno bijelo masno tkivo i gušterača te su uzorci tkiva pohranjeni za izolaciju RNA i proteinske analize, na isti način kao što je opisano iznad.

3.8. Određivanje lipidnih parametara u uzorcima krvi

Koncentracije ukupnog kolesterola i kolesterola u sastavu lipoproteina visoke gustoće (HDL, engl. *high density lipoprotein*) te triglicerida u uzorcima seruma mjerene su u kliničkom laboratoriju, na automatskom kemijskom analizatoru Olympus AU480 (Beckman Coulter).

3.9. Određivanje trombocitnih serotoninskih parametara

3.9.1. Mjerenje razine serotonina u trombocitima

Koncentracija trombocitnog serotonina mjerena je fluorimetrijskom metodom, u kojoj uslijed reakcije OPT-a sa serotoninom, pri visokoj temperaturi i u kiselim uvjetima, dolazi do nastajanja fluorescentnih produkata.

Nakon izolacije PRP-a (v. poglavlje 3.4), 600 μL PRP-a je prebačeno u epruvetu prethodno napunjenu s 1600 μL fiziološke otopine te je uzorak centrifugiran 10 min na 9000 x g kako bi se istaložili trombociti. Supernatant se brzo odlio, a na talog trombocita se dodalo 3 mL fiziološke otopine i recentrifugiralo. Supernatant se ponovo odlio te se talog trombocita pohranio na -20°C do određivanja razine trombocitnog serotonina. Na trombocitni talog je dodano 1500 μL kvarcne H_2O (Q H_20) te su uzorci stavljeni u ledenu kupelj i homogenizirani sonikacijom 30 sek uz snagu od 3 W, nakon čega su izdvojeni alikvoti sonikata za određivanje koncentracije trombocitnih proteina i koncentracije serotonina.

Za određivanje koncentracije 5HT, u centrifugalne epruvete redom se dodalo: 1000 μL otopine $ZnSO_4$, 1300 μL sonikata, 500 μL 1N NaOH. U epruvete za standarde se umjesto sonikata dodalo 1300 μL pojedinog standarda (250, 500, 1000 ng 5HT/mL), dok se u epruvete za praznu probu dodalo 1300 μL Q H_2O. Sadržaj epruveta se promiješao i ostavio na sobnoj temperaturi 5 min. Zatim su istaloženi proteini centrifugiranjem 15 min na 1500 x g. U nove staklene epruvete dodalo se 1500 μL deproteiniziranog supernatanta, 100 μL 1%-tne otopine L-cisteina i 2000 μL otopine OPT-a u 10 N HCl. Uzorci su kuhani u vodenoj kupelji (100°C) 10 min te su se ohladili na sobnu temperaturu i potom je mjeren intenzitet fluorescencije na valnoj duljini od 485 nm, uz ekscitacijsku vrijednost od 345 nm. Sadržaj 5HT u trombocitima se računao prema standardnoj krivulji i izrazio se prema jediničnoj masi ukupnih trombocitnih proteina.

Količina ukupnih proteina u homogeniziranim uzorcima trombocita određena je metodom po M. Bradford (Bradford, 1976.). Metoda se temelji na vezanju boje Coomasie Brilliant Blue G-250 na proteine. Vezanje proteina na boju u kiselim uvjetima rezultira promjenom boje iz crveno-smeđe u plavu. Intenzitet boje ovisi o količini proteina u uzorku. Intenzitet apsorpcije uzoraka mjerio se spektrofotometrijski na valnoj duljini od 595 nm, 20 min nakon dodatka boje. Količina proteina računala se prema standardnoj krivulji dobivenoj s poznatim koncentracijama (10, 20, 30, 40, 50 μg/μL) goveđeg serumskog albumina (BSA, engl. *bovine serum albumin*).

3.9.2. Mjerenje brzine aktivnog unosa serotonina u trombocite

Mjerenje aktivnosti trombocitnog serotoninskog prijenosnika temelji se na mjerenju brzine unosa serotonina obilježenog radionuklidom ^{14}C u trombocite u suspenziji. Aktivnost prijenosnika mjerena je pri koncentraciji supstrata (serotonina) 0,5 μM, pri kojoj brzina unosa (v) u našim uvjetima mjerenja iznosi oko 80% maksimalne brzine (V_{max}). U epruvete je dodano 850 μL Krebs-Ringerovog fosfatnog pufera te 50 μL PRP-a. Uzorci su zatim preinkubirani u vodenoj kupelji 10 min na 37°C uz kontinuirano miješanje. Reakcija je započeta dodavanjem 100 μL ^{14}C-5HT koncentracije 5 μM u smjesu Krebs-Ringerovog pufera i PRP-a te su uzorci, uz lagano miješanje, inkubirani 30 sek na 37°C. Reakcija je naglo prekinuta dodavanjem 2,5 mL ledene fiziološke otopine i brzim odvajanjem trombocita od ostatka medija vakum filtracijom kroz Whatman GF/C filter papir uz tlak od 550 mm Hg. Filter papir se zatim isprao 2 x s 5 mL ledene fiziološke otopine te se prenio u bočicu s 1 mL scintilacijske tekućine. Radioaktivnost vezana na filter papiru mjerena je na scintilacijskom beta brojaču kao broj raspada u minuti. Kao "prazna proba" koriste se uzorci Krebs-Ringerovog pufera, PRP-a i radioaktivno obilježenog serotonina inkubirani u lednoj kupelji kroz 30 sek. Ovako pripremljeni uzorak predstavlja radioaktivni serotonin koji zaostaje na membrani trombocita, odnosno filter papiru. Od izmjerenih vrijednosti radioaktivnih raspada po minuti u uzorcima inkubiranim na 37°C odbiju se vrijednosti radioaktivnih raspada po minuti u uzorcima inkubiranim u ledenoj kupelji, kako bi se dobila vrijednost koja odgovara aktivnom unosu serotonina u trombocite. Usporedbom tih vrijednosti sa brojem radioaktivnih raspada u minuti u uzorku standardne otopine ^{14}C-5HT poznate koncentracije, izračunaju se nmoli 5HT unešeni u trombocite. Brzina unosa izražava se kao nmoli ^{14}C-5HT po mg trombocitnih proteina po minuti. Masa trombocitnih proteina određivana je metodom po M. Bradford, kao što je opisano u poglavlju 3.9.1.

3.10. Određivanje razine mRNA odabranih gena

U uzorcima hipotalamusa i gonadnog bijelog masnog tkiva analizirana je razina mRNA ukupno 40 gena od interesa, pomoću metode reverzna transkripcija – kvantitativni PCR u stvarnom vremenu (RT-qPCR). Specifično, analizirana je ekspresija gena serotoninskog sustava te različitih gena uključenih u održavanje energetske ravnoteže, kao što su enzimi i transkripcijski faktori uključeni u glukozni i lipidni metabolizam te geni uključeni u regulaciju apetita.

3.10.1. Izolacija RNA

U svrhu inaktivacije RNA-nukleaza, sav pribor korišten pri izolaciji RNA je tretiran preko noći s DEPC (0,1%) te je potom autoklaviran. Tkivo (hipotalamus, gonadno bijelo i smeđe masno tkivo) pohranjeno u RNAlater-u je posušeno na filter papiru te je izvagana masa dehidriranog tkiva. Za homogenizaciju hipotalamusa korišten je čitavi izolirani hipotalamus, dehidrirane mase 16-23 mg, za homogenizaciju smeđeg masnog tkiva uzeto je 22 mg dehidriranog tkiva, a za homogenizaciju bijelog masnog tkiva uzeto je 100 mg dehidriranog gonadnog bijelog masnog tkiva. RNA iz hipotalamusa i smeđeg masnog tkiva je izolirana pomoću kompleta RNeasy mini kit, a RNA iz gonadnog bijelog masnog tkiva izolirana je pomoću kompleta Lipid RNeasy Mini kit koji je prilagođen izolaciji RNA iz tkiva s povećanim udjelom masti.

Uzorci tkiva su homogenizirani na GentleMacS homogenizatoru. Stavljeni su u GentleMacS epruvetu tipa M te je dodana otopina za homogenizaciju. Hipotalamus je homogeniziran u 700 µl RLT pufera, a masno tkivo je homogenizirano u 1000 µl Qiazola. Program odabran za homogenizaciju je bio RNA 02.01. koji je namijenjen homogenizaciji tkiva za izolaciju RNA. Izolacija je dalje nastavljena po protokolu proizvođača korištenog kompleta za izolaciju RNA. Uključen je i dodatni korak digestije genomske DNA enzimom deoksiribonukleaza I, prema uputama proizvođača. RNA je s kolonice eluirana u konačnom volumenu od 35 µl.

Provjera koncentracije i čistoće izolirane RNA odredila se spektrofotometrijski NanoDrop. Vrijednosti omjera apsorpcije na 260 i 280 nm (A260/A280) su bile između 2,16 i 2,29. Cjelovitost izolirane RNA provjerena je elektroforezom na 1% agaroznom gelu, uz vizualizaciju pomoću Midori Green Advance DNA boje, prema izgledu vrpci 28S i 18S ribosomalnih RNA. Svi uzorci su pokazali oštre 28S i 18S vrpce u omjeru otprilike 2:1. Od 6 uzoraka s najvećom koncentracijom RNA uzeto je po 5 µl i pomiješano kako bi se pripremio uzorak korišten za pripremu standardne krivulje u koraku kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu.

Otopina RNA čuvana je na -80°C te je cijelo vrijeme korištenja držana na ledu.

3.10.2 Reverzna transkripcija

Izolirana RNA prevedena je u cDNA pomoću kompleta High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems). Kako bi se smanjile pogreške u pipetiranju, za sve uzorke je pripremljena skupna otopina (MM, engl. *master mix*) koja se sastojala od RT pufera (u kojem

su sadržani i nukleotidi i početnice) i enzima reverzna transkriptaza. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 20 µl, a količina RNA u svakom uzorku bila je 1,2 µg. Da bi se provjerila prisutnost zaostale genomske DNA u uzorcima RNA, pripremljena je i kontrolna reakcija bez dodatka enzima reverzne transkriptaze (-RT kontrola). Sastav reakcijske smjese prikazan je u Tablici 5.

Tablica 5. Sastav reakcijske smjese za reverznu transkripciju

Komponenta	**V (µl) / uzorku**	
	+RT	**-RT**
2X RT pufer	10,0	10,0
20X RT enzim	1,0	-
Uzorak	1,7 – 9,0	5,6 – 6,7
H_2O bez ribonukleaza	0,0 – 5,5	3,3 – 4,4
Ukupni volumen	20,0	20,0

Reakcijska smjesa je inkubirana na 37°C kroz 60 min. Zaustavljena je zagrijavanjem na 95°C 5 min kako bi se inaktivirala reverzna transkriptaza.

Dobivena cDNA bila je koncentracije 60 ng/µl te je razrijeđena do koncentracije od 10 ng/µl i u nekoliko alikvota je pohranjena na -20°C.

3.10.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Fragmenti pojedinih cDNA kvantificirani su metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR, engl. *quantitative real-time polymerase chain reaction*), korištenjem SYBR Green tehnologije. DNA polimeraza umnožava ciljani fragment cDNA, SYBR Green boja se veže na novonastale dvolančane amplikone te uslijed toga dolazi do porasta fluorescencije čiji je intenzitet proporcionalan količini novonastalog amplikona.

Redni broj ciklusa lančane reakcije polimerazom u kojem dolazi do naglog porasta intenziteta fluorescencije u odnosu na bazalne vrijednosti naziva se granični ciklus (Cq, engl. *quantification cycle*) i mjera je početne količine DNA kalupa.

Za pripremu reakcijske smjese korišten je reagens Fast SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) koji sadrži sve potrebne komponente osim cDNA i specifičnih početnica.

Za sve uzorke se pripremi skupna otopina koja sadrži Master Mix i specifične početnice, a uzorci cDNA se dodaju naknadno. Sastav reakcijske smjese prikazan je u tablici 6. Svaki uzorak je rađen u duplikatu.

Tablica 6. Sastav reakcijske smjese za kvantitativni PCR

Komponenta	**Početna koncentracija**	**Konačna koncentracija**	**V (µl) / uzorku**
Fast SYBR Green Master Mix	2X	1X	5,0
Uzvodna početnica	10,0 µM	0,5 µM	0,5
Nizvodna početnica	10,0 µM	0,5 µM	0,5
Uzorak cDNA	6 ng/µl	0,6 – 1,8 ng/µl	1-3
H_2O			1-3
Ukupni volumen			10,0

Nakon što su dodane sve komponente, reakcija se provodi u uređaju za PCR u stvarnom vremenu (Step-One Plus, Applied Biosystems) prema definiranom termalnom profilu:

1. korak – aktivacija DNA polimeraze 20 sek na 95°C
2. korak – 40 ciklusa od 3 sek na 95°C, 30 sek na 60°C (u ovom koraku prikupljaju se podaci o fluorescenciji)
3. korak – krivulja taljenja, 15 sek na 95°C, 1 min na 60°C, 15 sek na 95°C

Specifičnost reakcije provjerena je elektroforezom produkata PCR-a na 2% agaroznom gelu, a i analizom krivulje taljenja (engl. *melting curve*) nakon svake reakcije.

Određivanje relativne razine mRNA provedeno je metodom standardne krivulje (Larionov i sur., 2005.). Relativna ekspresija gena od interesa normirana je prema geometrijskoj sredini relativne ekspresije 2 referentna gena (geni koji imaju stabilnu ekspresiju): *Gapdh* (engl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) i *Actb* (engl. *beta-actin*) u hipotalamusu i gWATU te *Actb* i *Rps29* (engl. *ribosomal protein 29*) u BAT-u.

3.11. Određivanje razine odabranih proteina

Razine odabranih proteina u uzorcima gonadnog bijelog masnog tkiva te u uzorcima plazme analizirane su korištenjem komercijalnih imunoenzimskih kompleta (ELISA, engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*).

3.11.1. Određivanje razine odabranih proteina u uzorcima gonadnog bijelog masnog tkiva

U uzorcima gonadnog bijelog masnog tkiva analizirana je razina trigliceridne lipaze masnog tkiva (Atgl, engl. *adipose triglyceride lipase*) i sintaze masnih kiselina (Fasn, engl. *fatty acid synthase*). Izvagano je 300 mg gonadnog bijelog masnog tkiva koje je bilo pohranjeno na -80°C. Tkivo je homogenizirano na homogenizatoru s teflonskim tučkom (1 min) u 1200 µl reagensa za ekstrakciju proteina (T-PER) u koji je dodan inhibitor proteaza (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail). Homogenat je prebačen u novu plastičnu epruvetu i homogeniziran sonikacijom 3 x 5 sek uz snagu do 3 W**.** Sonikat je potom centrifugiran dva puta na +4°C, kroz 20 min na 12000 x g te se supernatant prebacio u novu plastičnu epruvetu. Koncentracija ukupnih proteina u homogenatu izmjerena je već opisanom metodom po M. Bradford (vidi poglavlje 3.10.1.).

Za određivanje koncentracije proteina Atgl i Fasn u uzorcima gonadnog bijelog masnog tkiva korišteni su komercijalni imunoenzimski kompleti tvrtke Elabscience (Kina), pri čemu su se slijedile upute proizvođača. Oba kita rade na principu „sendvič“ ELISA-e.

Ukratko, uzorci i standardi su ispipetirani u jažice mikrotitarske pločice na čijim stijenkama se nalaze vezana antitijela specifična za antigen (Atgl ili Fasn). Antigen iz uzoraka i standarada (Atgl ili Fasn) se veže na ova antitijela. Zatim je dodano biotinilirano detekcijsko antitijelo, koje je također specifično za antigen (Atgl ili Fasn) te je nakon toga dodana peroksidaza hrena (Hrp, engl. *horseredish peroxidase*) vezana za avidin, koja se veže na biotinilirano detekcijsko antitijelo te je pločica inkubirana na 37°C kroz 30 min. Nakon inkubacije, nevezane komponente su isprane s mikrotitarske pločice. Dodana je otopina supstrata (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, TMB) u svaku jažicu. Ukoliko otopina u jažici sadrži antigen, biotinilirano detekcijsko antitijelo i konjugat avidin-Hrp, dolazi do pojave plavog obojenja čiji je intenzitet proporcionalan količini antigena u jažici. Enzimska reakcija je zaustavljena nakon 15 min dodatkom reagensa za zaustavljanje reakcije te otopina u jažici prelazi u žuto obojenje. Apsorpcija je mjerena spektrofotometrijski na valnoj duljini od 450 nm.

Kvantifikacija uzoraka ostvarena je usporedbom njihove apsorpcije sa referentnom krivuljom dobivenom iz standardnih uzoraka poznatih koncentracija. Koncentracija proteina od interesa izražena je prema jediničnoj masi ukupnih proteina.

3.11.2. Određivanje razine odabranih proteina u uzorcima plazme

U uzorcima plazme analizirana je razina inzulina, glukagona, leptina i adiponektina. Uzorci plazme su pripremljeni na način opisan u poglavlju 3.5.

Razine adiponektina, inzulina i leptina su mjerene korištenjem ELISA kompleta tvrtke Demeditec (Njemačka), koji funkcioniraju po principu „sendvič“ ELISA-e (protokol opisan u poglavlju 3.11.1.).

Za mjerenje razine glukagona u plazmi korišten je ELISA komplet tvrtke Elabscience (Kina), koji radi na principu kompeticije. Ukratko, uzorci i standardi su ispipetirani u jažice mikrotitarske pločice na čijim stijenkama se nalazi vezan glukagon te je zatim dodano biotinilirano primarno antitijelo koje se specifično veže na glukagon. Glukagon vezan na stijenke jažica i glukagon iz uzorka odnosno standarada se natječu za vezanje na biotinilirano primarno antitijelo. Višak konjugata i nevezanog antigena iz uzorka se isperu s mikrotitarske pločice i doda se konjugat avidin-Hrp nakon čega se pločica inkubira na 37°C kroz 30 min. Zatim se doda otopina supstrata (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, TMB) u svaku jažicu te se nakon 15 min enzimska reakcija zaustavi dodatkom reagensa za zaustavljanje reakcije. Apsorpcija je mjerena spektrofotometrijski na valnoj duljini od 450 nm. Kvantifikacija glukagona u uzorcima ostvarena je usporedbom apsorpcije uzoraka s referentnom krivuljom pripremljenom iz standardnih uzoraka poznatih koncentracija. Koncentracija proteina od interesa izražena je po mL plazme.

3.11.2.1. Izračun HOMA-IR

Iz koncentracija glukoze i inzulina izmjerenim u uzorcima krvi natašte, izračunat je homeostatski model za procjenu inzulinske rezistencije (HOMA-IR, engl. *homeostatic model assesment – insulin resistance*), prema formuli (Matthews i sur., 1985.):

HOMA-IR = (koncentracija glukoze natašte (mmol/L) X koncentracija inzulina natašte (mIU/L) / 22,5

3.12. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je program GraphPad Prism, verzija 7.0 (GraphPad Software Inc, SAD, https://www.graphpad.com/).

Rezultati mjerenja prikazani su na grafovima kao individualne vrijednosti ili kao srednje vrijednosti skupina (M, engl. *mean*). Standardna devijacija (SD, engl. *standard deviation*) je korištena kao pokazatelj varijabilnosti.

Prisutnost vrijednosti koja je značajno odskakala od distribucije ostalih vrijednosti u skupini (engl. *outlier*) detektirana je pomoću Grubb's testa uz granicu značajnosti $p<0,05$ i takva vrijednost nije bila uključena u daljnju statističku obradu.

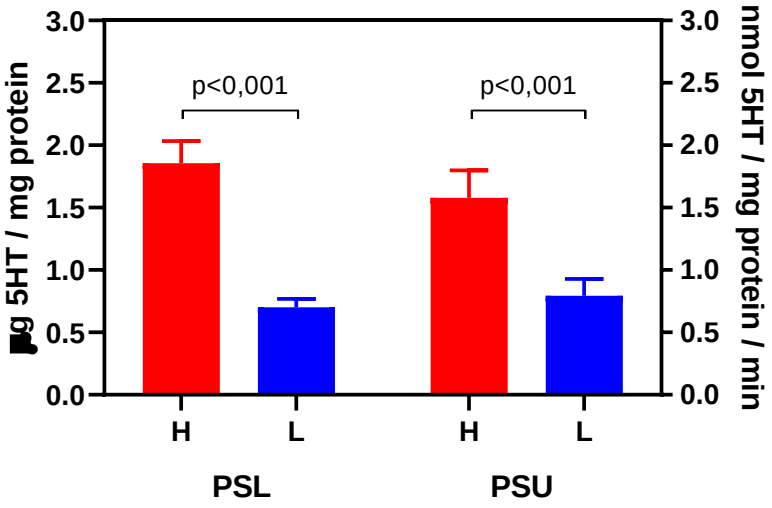
Normalnost distribucije dobivenih podataka testirana je D'Agostino i Pearson omnibus testom. Ukoliko je distribucija podataka bila normalna (slijedila Gaussovu razdiobu) statistička značajnost razlika među skupinama određivana je parametrijskim testom jednosmjernom analizom varijanci (ANOVA, engl. one-way analysis of variance,), a ukoliko distribucija nije bila normalna statistička razlika među skupinama određivana je neparametrijskim Kruskal-Wallis testom. Kao post-hoc testovi za međusobnu usporedbu ciljanih skupina korišteni su Fisherov LSD (LSD, engl. least significant difference) test bez korekcije u slučaju normalne distribucije podataka i Dunnovim test bez korekcije u slučaju kad podaci nisu imali normalnu distribuciju. Granica statističke značajnosti postavljenja je na $p<0.05$. Budući da je aktivnost 5HT sustava kod podlinija WZ-5HT štakora, iako različita, još uvijek u fiziološkom rasponu, očekivane funkcionalne i molekularne razlike među sublinijama su male veličine (10-15%) te ponekad pokazuju samo odgovarajući trend bez statističke značajnosti. Imajući to na umu, na grafovima su prikazane i vrijednosti $p<0.1$, koje ponekad mogu biti korisne u donošenju konačnih zaključaka.

Za analizu područja ispod krivulje (AUC, engl. area under curve) korištena je trapezoidna metoda.

4. REZULTATI

4.1. Životinje uključene u pokus

U istraživanju su korišteni mužjaci iz F24 generacije WZ-5HT štakora, starosti 9 tjedana na početku perioda kontrolirane prehrane. Vrijednosti koncentracije trombocitnog serotonina i aktivnosti trombocitnog serotoninskog prijenosnika kod životinja iz 5HT-visoke (H, engl. *high*) i 5HT-niske (L, engl. *low*) sublinije, određene 4 tjedna prije početka perioda kontrolirane prehrane, prikazane su na Slici 4.1. Može se vidjeti da su vrijednosti oba navedena parametra bile otprilike dvostruko više kod životinja iz 5HT-visoke sublinije u odnosu na životinje iz 5-HT niske sublinije.



Slika 4.1. Koncentracija serotonina u trombocitima (platelet serotonin level, PSL) i aktivnost trombocitnog serotoninskog prijenosnika (platelet serotonin uptake, PSU) kod životinja iz 5HT-visoke (H) i 5HT-niske (L) sublinije WZ-5HT štakora. Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija; n=18 u svakoj skupini. Razlike su testirane t-testom.

Životinje iz svake sublinije nasumično su podijeljene u dvije skupine, od kojih je jedna zatim bila hranjena standardnom laboratorijskom hranom za glodavce, a druga hranom s visokim udjelom masti. Na taj način formirane su četiri eksperimentalne skupine životinja: **H-CD** – 5HT-visoke životinje na prehrani standardnom laboratorijskom hranom za glodavce, **H-HFD** – 5HT-visoke životinje na prehrani s visokim udjelom masti, **L-CD** – 5HT-niske životinje na prehrani standardnom laboratorijskom hranom za glodavce te **L-HFD** – 5HT-niske životinje na prehrani s visokim udjelom masti.

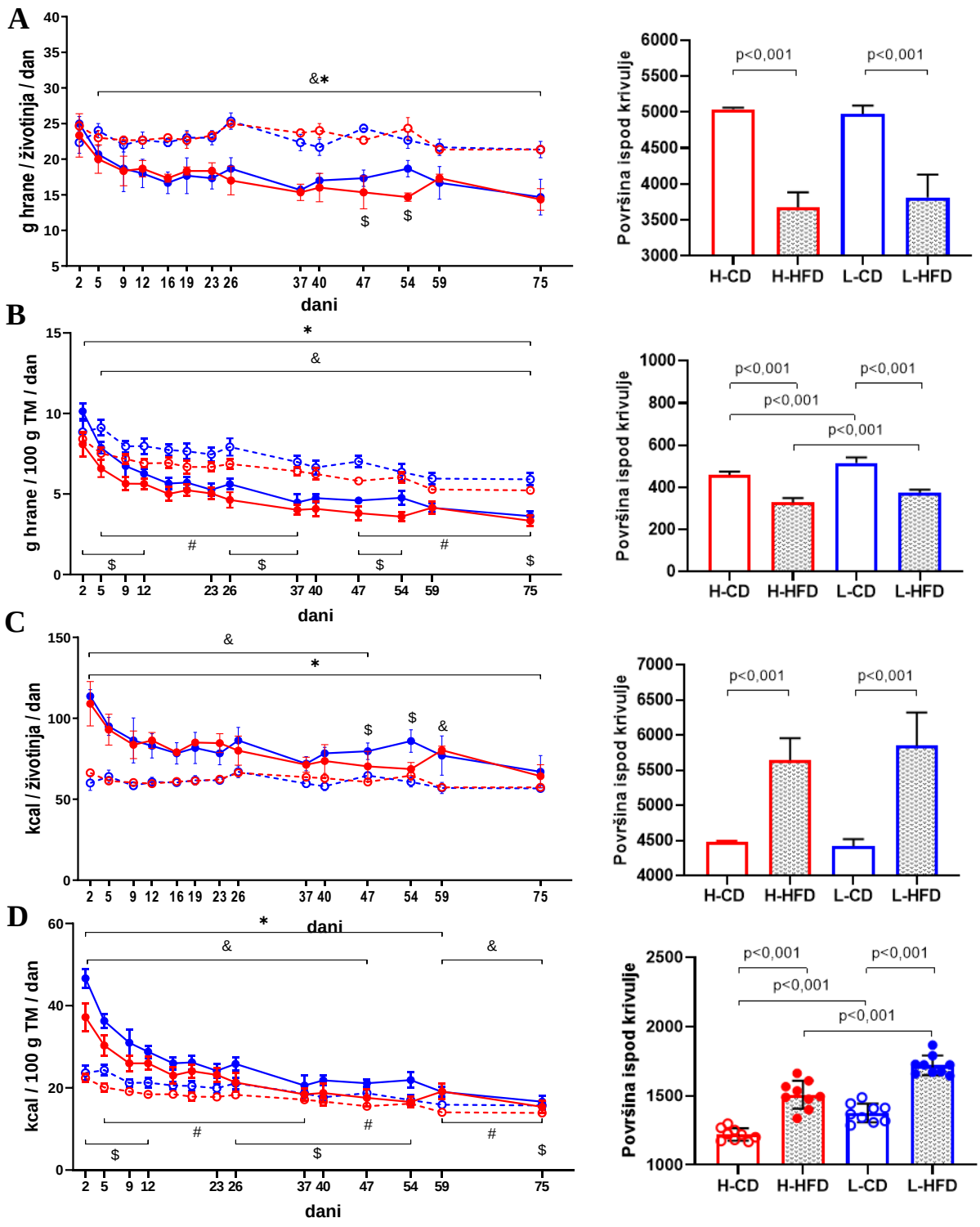
4.2. Unos hrane

Dnevni unos hrane izražen u gramima po životinji je kod obiju sublinija, kroz čitav period kontrolirane prehrane (osim 1. dan), bio manji kod životinja na HFD nego CD (Slika 4.2.A, lijevo). Unos CD se nije razlikovao između 5HT-visokih i 5HT-niskih životinja, dok je unos HFD u dvije točke mjerenja (47. i 54. dan) bio manji kod 5HT-visokih nego 5HT-niskih životinja. Rezultati su dodatno analizirani izračunom površina ispod krivulja prikazanih na Slici 4.2.A, lijevo. Vrijednost površina ispod krivulje nije se razlikovala između H-CD i L-CD kao niti između H-HFD i L-HFD skupine te je bila manja kod H-HFD nego H-CD (za 26,9%) i kod L-HFD nego L-CD (za 23,3%) skupine životinja (Slika 4.2.A, desno).

Dnevni unos hrane izražen u gramima po jediničnoj masi životinje je bio manji kod H-CD nego L-CD skupine (bez statističke značajnosti 2., 40. i 54. dan) i kod H-HFD nego L-HFD skupine (bez statističke značajnosti 23., 40. i 59. dan) te također kod H-HFD nego H-CD skupine (bez statističke značajnosti 1. dan) i kod L-HFD nego L-CD skupine (Slika 4.2.B, lijevo). Analiza površina ispod krivulje potvrdila je prisutnost razlika među sublinijama: Vrijednost površine ispod krivulje je bila manja kod H-CD nego L-CD za 11,2%, kod H-HFD nego L-HFD za 12,4%, kod H-HFD nego H-CD za 28,4% te kod L-HFD nego L-CD za 27,4% (Slika 4.2.B, desno).

Dnevni energetski unos po životinji (kcal /životinji /danu) je kod obiju sublinija bio veći kod životinja na HFD nego CD, pri čemu se razlika između H-HFD i H-CD skupine smanjila u 6. tjednu kontrolirane prehrane i u dvije točke mjerenja (54. i 75. dan) nije bila statistički značajna, dok je razlika između L-HFD i L-CD skupine u svim točkama mjerenja bila statistički značajna (Slika 4.2.C, lijevo). Vrijednost površine ispod krivulje se nije razlikovala između H-CD i L-CD, kao niti između H-HFD i L-HFD skupine, dok je bila veća kod H-HFD nego H-CD (za 26,0%) i kod L-HFD nego L-CD (za 32,4%) skupine (Slika 4.2.C, desno).

Relativni dnevni energetski unos životinja (kcal /100 g /danu) je bio manji kod H-CD nego L-CD skupine (bez statističke značajnosti 2., 40. i 54. dan), kod H-HFD nego L-HFD skupine (bez statističke značajnosti 23. i 59. dan), kod H-CD nego H-HFD skupine (bez statističke značajnosti 37. i 54. dan) te kod L-CD nego L-HFD skupine (bez statističke značajnosti 75. dan) (Slika 4.2.D, lijevo). Površina ispod krivulje bila je značajno manja kod H-CD nego L-CD (za 11,2%), kod H-HFD nego L-HFD (za 12,4%) te značajno veća kod H-HFD nego H-CD (za 19,0%) i kod L-HFD nego L-CD (za 25,1%) (Slika 4.2.D, desno).



Slika 4.2. Dnevni unos hrane tijekom 11 tjedana kontrolirane prehrane izražen u (A) gramima po životinji, (B) gramima po jediničnoj masi životinje, (C) kilokalorijama po životinji i (D) kilokalorijama po jediničnoj masi životinje. Na histogramima desno su površine ispod krivulja prikazanih lijevo. Prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije (n=9 po skupini). Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijance ili Kruskal-Wallisovim testom, a kao post-hoc test su korišteni Fisherov LSD ili Dunnov test. $p<0.1$ za $^{\#}$(H-CD vs. L-CD), $^{\&}$(H-CD vs. H-HFD), *(L-CD vs. L-HFD), $^{\$}$(H-HFD vs. L-HFD). H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD - 5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima; TT, tjelesna masa.

Sumarno, može se zaključiti da je dnevni unos hrane / energije po jediničnoj masi životinje bio manji kod H-CD nego L-CD skupine (za 11,2%) te kod H-HFD nego L-HFD skupine (za 12,4%) dok se apsolutni unos hrane / energije (izražen po životinji) nije razlikovao između navedenih skupina. Unos energije bio je veći kod H-HFD nego H-CD skupine (po životinji za 26,0%, po tjelesnoj masi životinje za 23,5%) te također kod L-HFD nego L-CD skupine (po životinji za 32,4%, po tjelesnoj masi životinje za 25,1%).

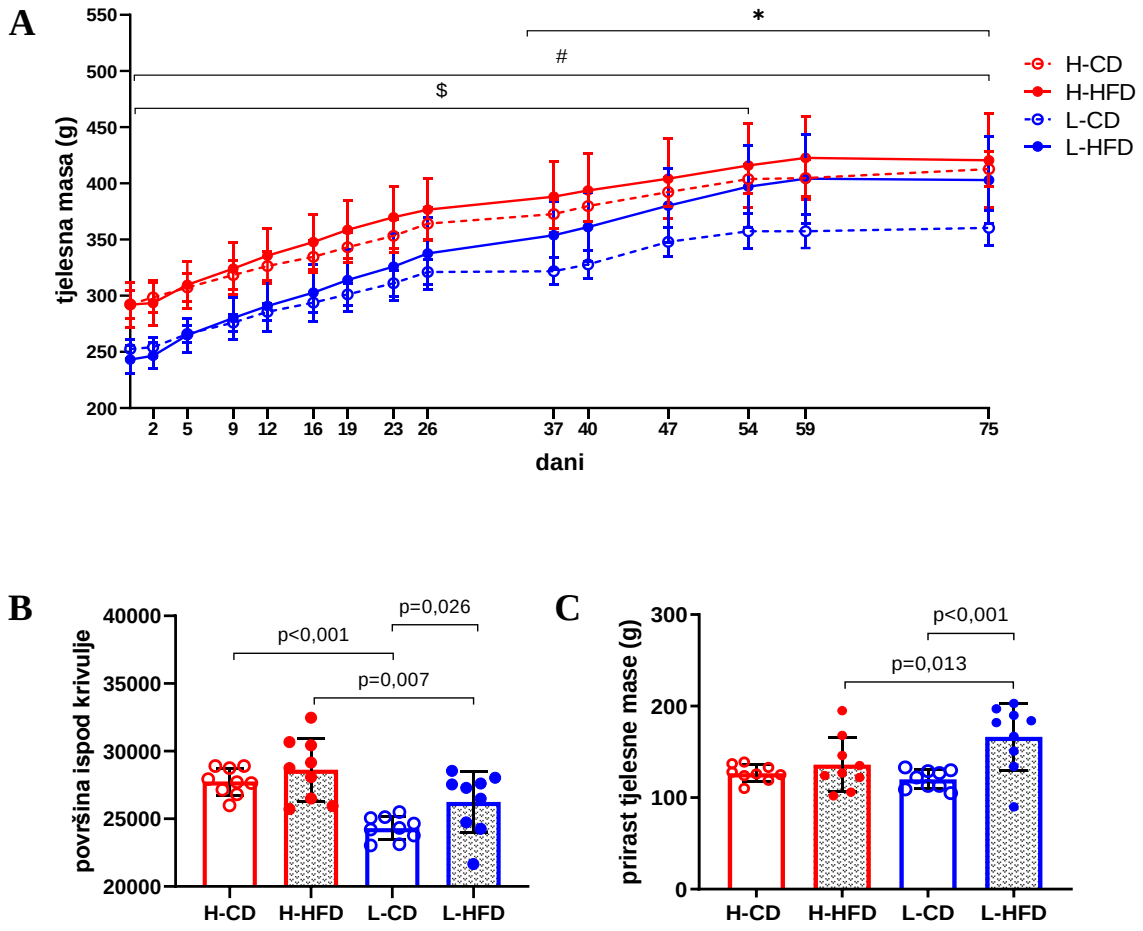
4.3. Ukupna tjelesna masa i mase pojedinih organa životinja

4.3.1. Ukupna tjelesna masa

Životinje iz H-CD skupine su kroz čitav period kontrolirane prehrane imale statistički značajno višu (otprilike za 14%) tjelesnu masu od životinja iz L-CD skupine (Slika 4.3.A). S druge strane, razlika u tjelesnoj masi između životinja iz H-HFD i L-HFD skupine od 9. tjedna (59. dan) kontrolirane prehrane nadalje više nije bila statistički značajna (Slika 4.3.A). Do gubitka razlike između H-HFD i L-HFD skupine došlo je zbog različitog odgovora sublinija na HFD. Naime, u 6. tjednu (37. dana) kontrolirane prehrane, tjelesna masa životinja iz L-HFD skupine je značajno porasla u odnosu na tjelesnu masu životinja iz L-CD skupine, dok kod životinja iz H-HFD skupine taj porast nije bio toliko izražen (Slika 4.3.A). Razlika između sublinija u odgovoru na HFD se također može vidjeti kada se rezultati prikažu kao površina ispod krivulje porasta tjelesne mase (Slika 4.3.B).

Na Slici 4.3.C prikazan je ukupni prirast tjelesne mase životinja kroz 11 tjedana kontrolirane prehrane. Može se vidjeti da je prirast tjelesne mase bio značajno veći kod L-HFD nego L-CD skupine, dok takve razlike nije bilo između H-HFD i H-CD skupine. Uz to, vidljivo je da je prirast tjelesne mase bio veći kod životinja iz L-HFD nego H-HFD skupine.

Ovi rezultati zajednički pokazuju da su uz standardnu prehranu (CD) 5HT-visoke životinje imale višu tjelesnu masu od 5HT-niskih životinja te da je HFD izazvala značajan porast tjelesne mase samo kod 5HT-niskih životinja dok kod 5HT-visokih životinja nije imala statistički značajan učinak na tjelesnu masu u odnosu na CD.



Slika 4.3. A) Porast tjelesne mase tijekom perioda kontrolirane prehrane. Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija (n=9 po skupini). B) Površina ispod krivulje tjelesne mase. C) Prirast u tjelesnoj masi životinja nakon 11 tjedana kontrolirane prehrane. Prikazane su pojedinačne vrijednosti po skupinama, srednja vrijednost i standardna devijacija (n=9 po skupini). Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijance, kao post-hoc test je korišten Fisherov LSD test.
H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD - 5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima. $p<0.1$ za $^{\#}$(H-CD vs. L-CD), * (L-CD vs. L-HFD), $^{\$}$(H-HFD vs. L-HFD).

4.3.2 Mase pojedinih organa

Nakon 11 tjedana kontrolirane prehrane, kod sve četiri skupine životinja izdvojeni su i izvagani pojedini organe (smeđe masno tkivo, gonadno bijelo masno tkivo, srce, jetra, slezena). Rezultati su prikazani kao apsolutne mase organa (Slika 4.4., lijevo) i kao relativne mase organa u odnosu na ukupnu tjelesnu masu životinja (Slika 4.4., desno).

Apsolutna (lijevo) i relativna (desno) masa BAT-a (Slika 4.4.A) bila je niža kod H-CD nego L-CD skupine (apsolutna za 18,0% - 0,11 g, relativna za 28,0% - 0,05 g/100 g TM) te također niža kod H-HFD nego L-HFD skupine (apsolutna za 25,4% - 0,26 g, relativna za 28,4% - 0,07 g/100 g TM). U odgovoru na HFD, apsolutna masa BAT-a se povisila kod obiju sublinija:

za 24,9% (0,15 g) kod 5HT-visokih životinja, a za 37,2% (0,29 g) kod 5-HT-niskih životinja. Porast relativne mase BAT-a u odgovoru na HFD nije bio statistički značajan ni kod 5HT-visokih (21,9% - 0,03 g/100 g TM, p=0,108) ni kod 5HT-niskih (22,7% - 0,05 g/100 g TM, p=0,151) životinja.

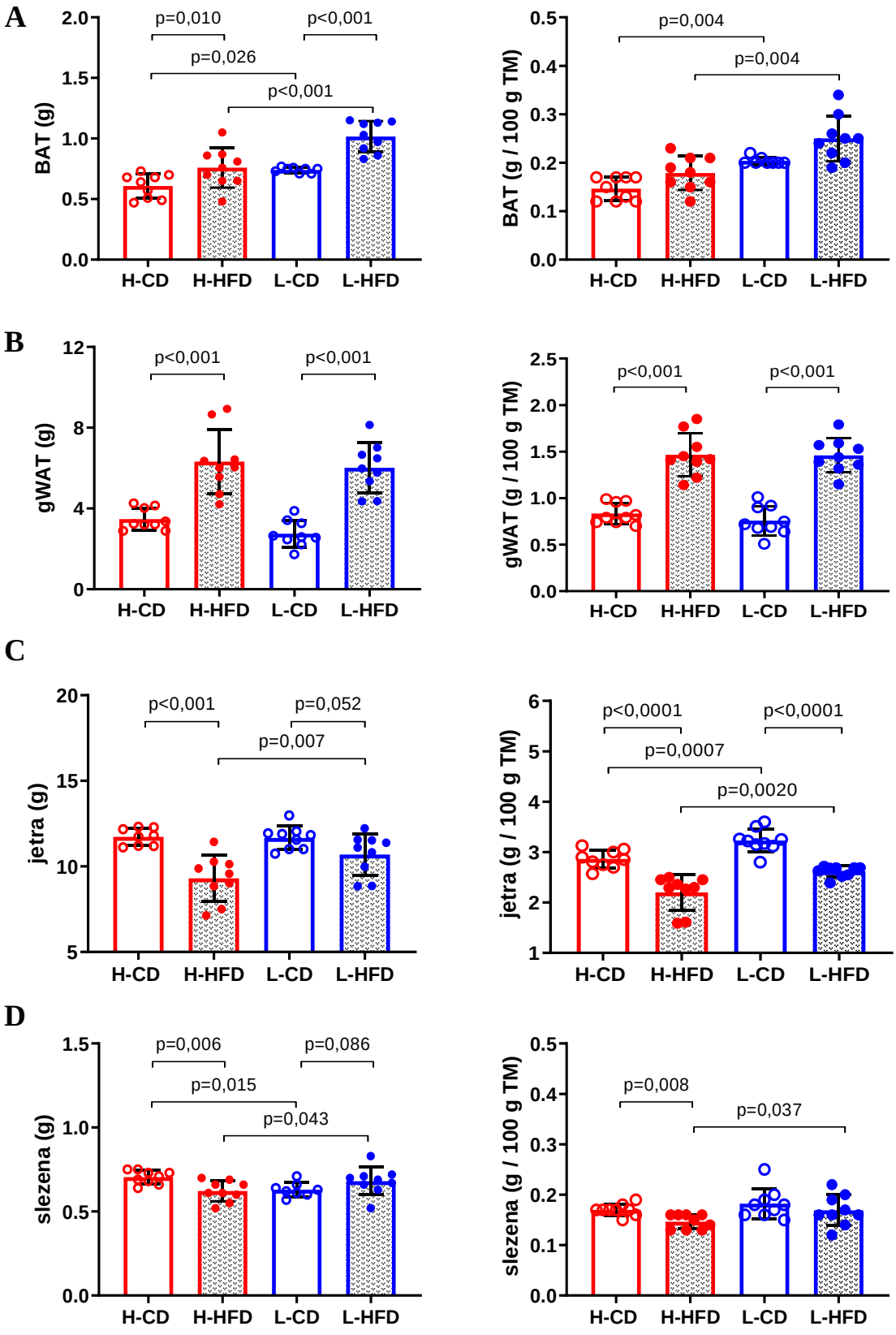
Apsolutna masa gWAT-a (Slika 4.4.B, lijevo) bila je za 26% (0,72 g) viša kod H-CD nego kod L-CD skupine (p=0,022, t-test; p=0,173, Fisherov LSD test). Relativna masa gWAT-a (Slika 4.4.B, desno) bila je za 8% (0,08 g/100 g TM) viša kod H-CD nego kod L-CD skupine, no razlika nije bila statistički značajna (p=0,370). Također, nije bilo statistički značajnih razlika u apsolutnoj i relativnoj masi gWAT-a između H-HFD i L-HFD skupine. U odgovoru na HFD, apsolutna masa gWAT-a se povisila za 82,2% (2,86 g) kod 5HT-visokih životinja, a za 118,3% (3,26 g) kod 5HT-niskih životinja. Relativna masa gWAT-a se u odgovoru na HFD povisila za 76% (0,63 g/100 g TM) kod 5HT-visokih, a za 92,7% (0,70 g/100 g TM) kod 5HT-niskih životinja; u svim slučajevima navedeni je porast bio statistički značajan.

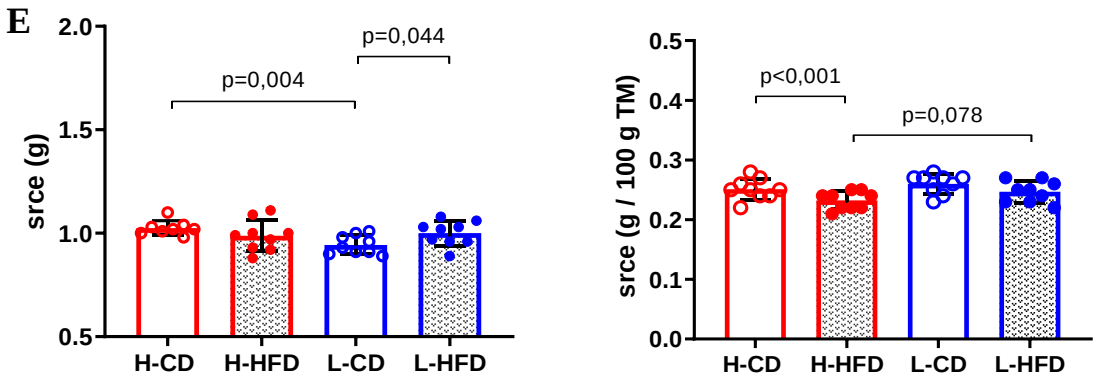
Apsolutna masa jetre nije se razlikovala između H-CD i L-CD skupine (Slika 4.4.C, lijevo) dok je relativna masa jetre bila za 11,4% (0,37 g/100 g TM) manja kod H-CD nego L-CD skupine (Slika 4.4.C, desno). Apsolutna i relativna masa jetre je bila niža kod H-HFD nego L-HFD skupine (apsolutna za 12,9% - 1,39 g, relativna za 15,9% - 0,42 g/100 g TM). U odgovoru na HFD, apsolutna masa jetre se snizila za 20,6% (2,58 g) kod 5HT-visokih životinja, a za 8,3% (1,39 g) kod 5HT-niskih životinja. Relativna masa jetre se u odgovoru na HFD snizila za 23,1% (0,66 g/100 g TM) kod 5HT-visokih, a za 18,9% (0,42 g/100 g TM) kod 5HT-niskih životinja.

Apsolutna masa slezene (Slika 4.4.D, lijevo) je bila viša kod H-CD nego L-CD skupine (za 10,6% - 0,05 g), dok u relativnoj masi slezene (Slika 4.4.D, desno) nije bilo razlike između navedenih skupina. Životinje iz H-HFD skupine su imale nižu i apsolutnu (za 8,6% - 0,08 g) i relativnu (za 13,2% - 0,02 g/100 g TM) masu slezene od životinja iz L-HFD skupine. HFD je kod 5HT-visokih životinja snizila apsolutnu (za 11,7% - 0,08 g) i relativnu (za 15,9% - 0,02 g/100 g TM) masu slezene, dok je kod 5HT-niskih životinja nije imala učinka niti na apsolutnu niti na relativnu masu slezene.

Apsolutna masa srca (Slika 4.4.E, lijevo) je bila viša kod životinja iz H-CD nego L-CD skupine (za 8,6% - 0,10 g), dok se relativna masa srca (Slika 4.4.E, desno) nije razlikovala između životinja iz H-CD i L-CD skupine. Između H-HFD i L-HFD skupine nije bilo razlike niti u apsolutnoj, niti u relativnoj masi srca. Kod 5HT-visokih životinja, HFD nije imala učinak na apsolutnu masu srca, ali je snizila relativnu masu srca (za 8,1% - 0,02 g/100 g TM). S druge

strane, kod 5HT-niskih životinja, HFD je povisila apsolutnu masu srca (za 6% - 0,06 g), dok na relativnu masu srca nije imala učinak.





Slika 4.4. Apsolutna (lijevo) i relativna (desno) masa pojedinih organa nakon 11 tjedana kontrolirane prehrane. A) smeđe masno tkivo, BAT, B) gonadno bijelo masno tkivo, gWAT, C) jetra, D) slezena, E) srce. TM – tjelesna masa. Prikazane su pojedinačne vrijednosti po skupinama, srednja vrijednost i standardna devijacija (n=8-9 po skupini). Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijance (A, B, D, E lijevo; B, C, D desno) ili Kruskal-Wallisovim testom (C lijevo; A, E desno), kao post-hoc test su korišteni Fisherov LSD test ili Dunnov test.
H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD - 5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima.

4.4. Trombocitni serotoninski parametri

Trombocitni serotoninski parametri (razina serotonina u trombocitima i aktivnost trombocitnog serotoninskog prijenosnika; Slika 4.5) određivani su u 11. tjednu kontrolirane prehrane. Prije uzimanja uzoraka krvi, životinje su imale *ad libitum* pristup hrani.

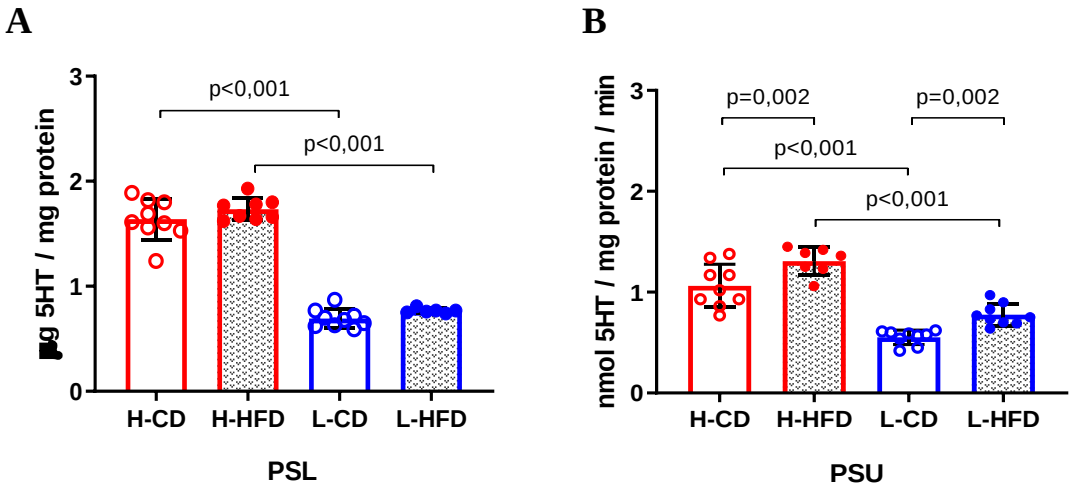
4.4.1. Razina serotonina u trombocitima

Na Slici 4.5.A prikazane su vrijednosti 5HT u trombocitima. Vidljivo je da su životinje iz 5HT-visoke sublinije imale više vrijednosti od životinja iz 5HT-niske sublinije. Niti u jednoj subliniji nije bilo statistički značajnih razlika između skupina na CD i HFD. Ovi rezultati upućuju da HFD nije utjecala na razinu trombocitnog serotonina niti kod jedne sublinije WZ-5HT štakora.

4.4.2. Aktivnost trombocitnog serotoninskog prijenosnika

Na Slici 4.5.B prikazane su vrijednosti aktivnosti trombocitnog serotoninskog prijenosnika izmjerene u 11. tjednu kontrolirane prehrane. Potvrđene su već uočene razlike u PSL i PSU među skupinama u bazalnim uvjetima (v. poglavlje 4.1.). Aktivnost trombocitnog serotoninskog prijenosnika bila je viša (za 24%) kod životinja iz H-HFD skupine u odnosu na životinje iz H-CD skupine. Također, aktivnost trombocitnog serotoninskog prijenosnika bila je

viša (za 42%) kod životinja iz L-HFD skupine u odnosu na životinje iz L-CD skupine. Ovi rezultati uputili su da je HFD dovela do značajnog povišenja aktivnosti trombocitnog serotoninskog prijenosnika kod obiju sublinija WZ-5HT štakora.



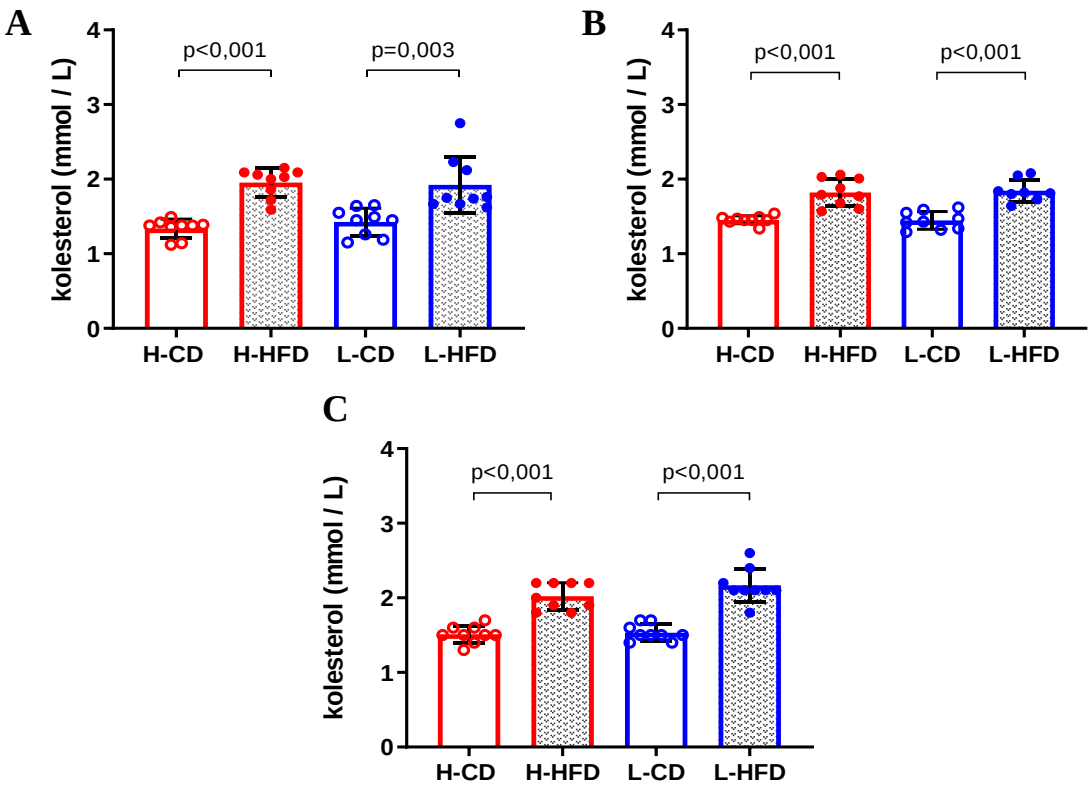
Slika 4.5. Trombocitni serotoninski parametri određivani u 11. tjednu kontrolirane prehrane. A) Koncentracija serotonina u trombocitima (platelet serotonin level, PSL). B) Aktivnost trombocitnog serotoninskog prijenosnika (platelet serotonin uptake, PSU). Prikazane su pojedinačne vrijednosti po skupinama, srednja vrijednost i standardna devijacija (n=6-9 po skupini). Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijance, kao post-hoc test je korišten Fisherov LSD test.
H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD - 5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima.

4.5. Razine lipida u krvi

Iz uzoraka krvi uzetih u 4., 9. i 11. tjednu kontrolirane prehrane pripremljen je serum u kojem se odredio lipidni profil životinja (ukupni kolesterol i trigliceridi mjereni su u sve tri vremenske točke, a HDL samo u 9. tjednu). Kod uzimanja uzoraka krvi u 4. i 9. tjednu kontrolirane prehrane, životinjama je 12 sati prije vađenja uzoraka krvi uklonjena hrana, dok su kod vađenja uzoraka krvi u 11. tjednu kontrolirane prehrane životinje imale pristup hrani *ad libitum*.

4.5.1. Ukupni kolesterol

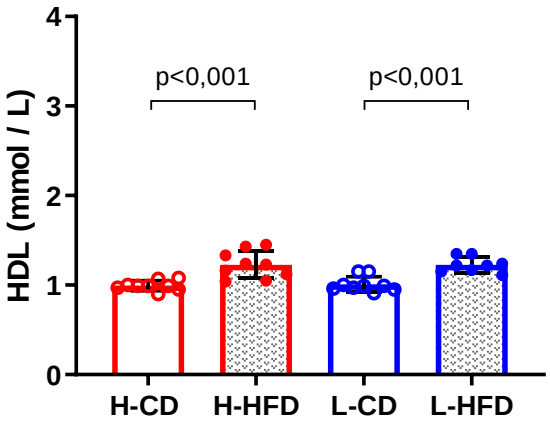
U sve tri vremenske točke, nije bilo razlike u koncentraciji ukupnog kolesterola između H-CD i L-CD skupina kao niti između H-HFD i L-HFD skupina životinja (Slika 4.6.). No, u sve tri vremenske točke, HFD je kod obiju sublinija životinja značajno povisila koncentracije ukupnog kolesterola.



Slika 4.6. Koncentracija ukupnog kolesterola u serumu u A) 4., B) 9. i C) 11. tjednu kontrolirane prehrane. Uzorci krvi za mjerenje uzimani su natašte (A, B) ili nakon pristupa hrani *ad libitum* (C). Prikazane su pojedinačne vrijednosti po skupinama, srednja vrijednost i standardna devijacija (n=8-9 po skupini). Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijance (B, C) ili Kruskal-Wallisovim testom (A), kao post-hoc test su korišteni Fisherov LSD test ili Dunnov test.
H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD - 5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima.

4.5.2. HDL kolesterol

U 9. tjednu kontrolirane prehrane izmjerena je koncentracija HDL kolesterola u serumu životinja (Slika 4.7.). Nije bilo razlike u koncentraciji HDL kolesterola između H-CD i L-CD skupina kao niti između H-HFD i L-HFD skupina životinja. Međutim, kod obiju sublinija, životinje na HFD su imale višu koncentraciju HDL kolesterola u krvi nego životinje na CD.

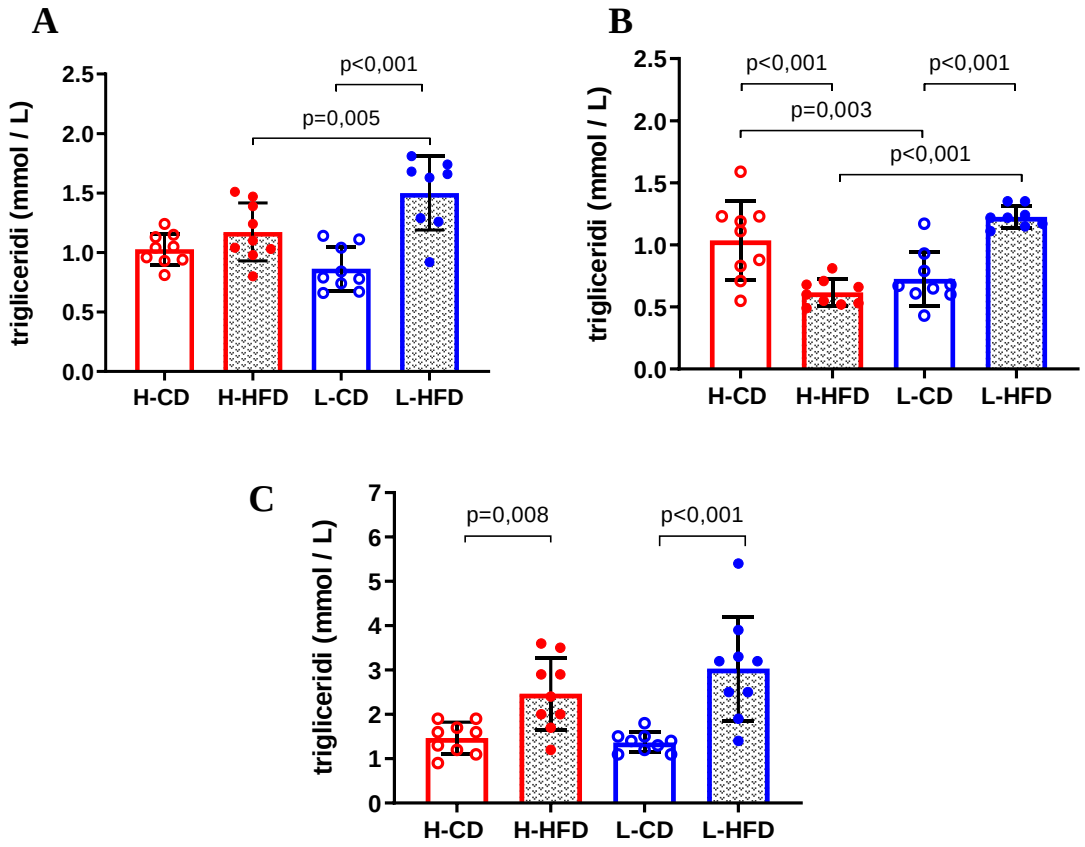


Slika 4.7. Koncentracija HDL kolesterola u serumu u 9. tjednu kontrolirane prehrane. Uzorci krvi za mjerenje uzimani su natašte. Prikazane su pojedinačne vrijednosti po skupinama, srednja vrijednost i standardna devijacija (n=8-9 po skupini). Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijance, kao post-hoc test je korišten Fisherov LSD test.
H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD - 5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima.

4.5.3. Trigliceridi

U 4. i 9. tjednu kontrolirane prehrane, trigliceridi su mjereni u uvjetima natašte. U 9. tjednu životinje iz H-CD skupine su imale višu koncentraciju triglicerida u krvi u odnosu na životinje iz L-CD skupine, dok je u 4. tjednu postojao isti smjer, ali je statistička značajnost dobivena samo t-testom (t-test: p=0,046; Fisherov LSD test: p=0,130). U 11. tjednu kontrolirane prehrane, trigliceridi su određivani u uvjetima pristupa hrani *ad libitum*. U ovim uvjetima, nije uočena razlika između ovih skupina (Slika 4.8.). U uvjetima pristupa hrani *ad libitum* (11. tjedan), nije bilo statistički značajnih razlika niti između H-HFD i L-HFD skupina, no u uvjetima natašte (4. i 9. tjedan), životinje iz H-HFD skupine su imale niže koncentracije triglicerida u krvi nego životinje iz L-HFD skupine.

Koncentracija triglicerida u krvi bila je u sve tri vremenske točke viša kod L-HFD nego L-CD skupine životinja (Slika 4.8). S druge strane, kod 5HT-visoke sublinije, odnos triglicerida između životinja na CD i HFD je varirao: u 4. tjednu nije bilo statistički značajne razlike između H-CD i H-HFD skupine (Slika 4.8.A), u 9. tjednu H-HFD skupina je imala niže vrijednosti od H-CD skupine (Slika 4.8.B), a u 11. tjednu H-HFD skupina je imala više vrijednosti od H-CD skupine (Slika 4.8.C).



Slika 4.8. Koncentracija triglicerida u serumu u A) 4., B) 9. i C) 11. tjednu kontrolirane prehrane. Uzorci krvi za mjerenje uzimani su natašte (A, B) ili nakon pristupa hrani *ad libitum* (C). Prikazane su pojedinačne vrijednosti po skupinama, srednja vrijednost i standardna devijacija (n=8-9 po skupini). Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijance, kao post-hoc test je korišten Fisherov LSD test. H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD - 5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima.

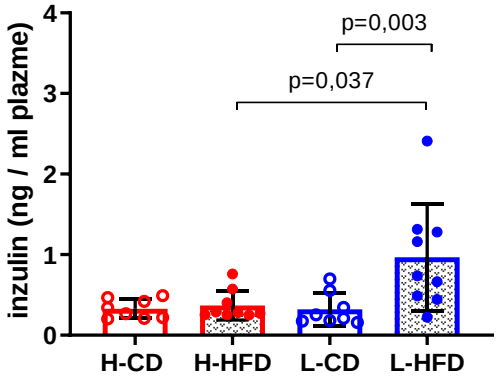
Sumarno, opisane analize lipidnog profila pokazuju da je učinak HFD na kolesterol bio podjednak kod 5HT-visokih i 5HT-niskih životinja dok je učinak HFD na trigliceride bio izraženiji kod životinja iz 5HT-niske sublinije.

4.6. Razine odabranih proteina u krvi

U 9. tjednu kontrolirane prehrane izmjerena je koncentraciju adiponektina, leptina i glukagona u plazmi iz jugularne vene, a u 10. tjednu kontrolirane prehrane izmjerena je koncentraciju inzulina u plazmi iz repne vene. U oba slučaja, krv je uzimana nakon što su životinje bile bez hrane 12 sati.

4.6.1. Inzulin

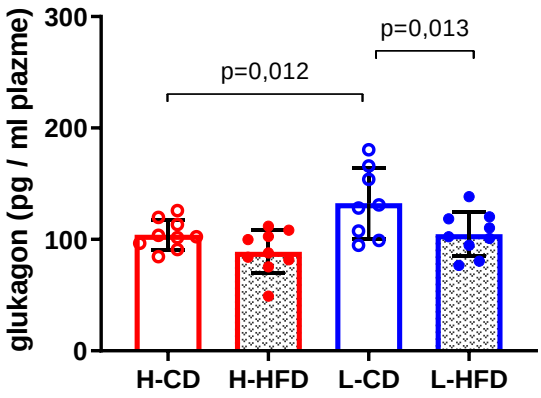
Nije bilo razlike u koncentraciji inzulina u plazmi između životinja iz H-CD i L-CD skupine (Slika 4.9.). Životinje iz L-HFD skupine su imale višu koncentraciju inzulina u plazmi od životinja iz H-HFD skupine (2.6 puta) te također od životinja iz L-CD skupine (3 puta).



Slika 4.9. Koncentracija inzulina u plazmi u 10. tjednu kontrolirane prehrane. Uzorci krvi za mjerenje uzeti su natašte. Prikazane su pojedinačne vrijednosti po skupinama, srednja vrijednost i standardna devijacija (n=8-9 po skupini). Razlike su testirane Kruskal-Wallisovim testom, kao post-hoc test korišten je Dunnov test.
H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD - 5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima.

4.6.2. Glukagon

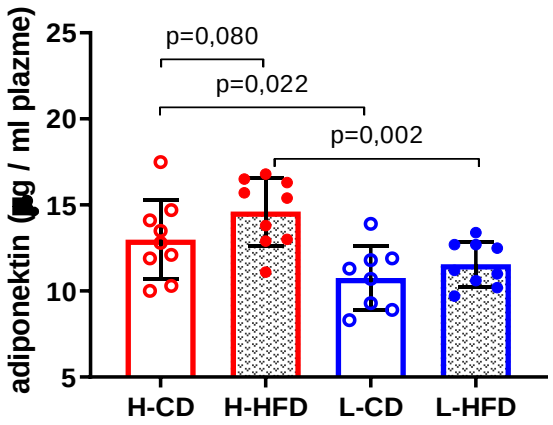
Životinje iz H-CD skupine su imale značajno nižu koncentraciju glukagona u plazmi nego životinje iz L-CD skupine (Slika 4.10.). No, takva razlika nije bila prisutna između H-HFD i L-HFD skupine, budući da je HFD smanjila koncentracije glukagona u plazmi 5HT-niskih životinja za 20,9%, dok je kod 5HT-visokih životinja pad bio manji (14,7%) i nije bio statistički značajan.



Slika 4.10. Koncentracija glukagona u plazmi u 9.tjednu kontrolirane prehrane. Uzorci krvi za mjerenje uzeti su natašte. Prikazane su pojedinačne vrijednosti po skupinama, srednja vrijednost i standardna devijacija (n=8-9 po skupini). Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijance, kao post-hoc test je korišten Fisherov LSD test.
H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD - 5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima.

4.6.3. Adiponektin

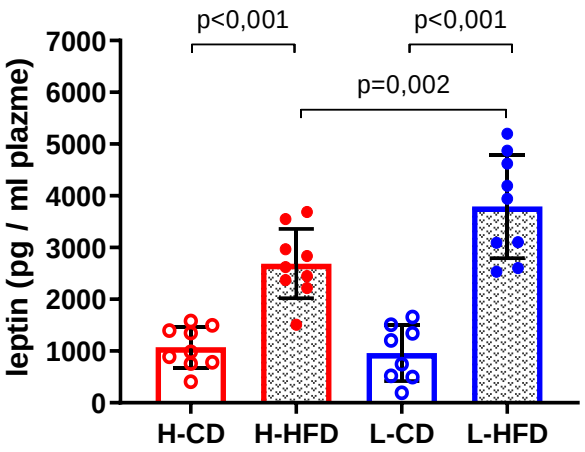
Životinje iz H-CD skupine su imale višu (za 20,7%) koncentraciju adiponektina u plazmi od životinja iz L-CD skupine (Slika 4.11.). Istovjetna razlika (26,4%) bila je prisutna i između H-HFD i L-HFD skupine. Koncentracija adiponektina je bila nešto viša kod životinja na HFD nego na CD, ali razlika nije dosegla prag statističke značajnosti niti kod jedne sublinije (5HT-visoka sublinija: za 12%, p=0.080; 5-HT niska sublinija; za 7%, p=0,398).



Slika 4.11. Koncentracija adiponektina u plazmi u 9. tjednu kontrolirane prehrane. Uzorci krvi za mjerenje uzeti su natašte. Prikazane su pojedinačne vrijednosti po skupinama, srednja vrijednost i standardna devijacija (n=8-9 po skupini). Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijance, kao post-hoc test je korišten Fisherov LSD test.
H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD - 5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima.

4.6.4. Leptin

Koncentracija leptina u plazmi bila je za 11,9% viša kod životinja iz H-CD skupine nego L-CD skupine, no razlika nije bila statistički značajna (Slika 4.12.). Kod obiju sublinija, koncentracija leptina u plazmi je porasla u odgovoru na HFD - kod 5HT-visokih životinja za 2,5 puta, a kod 5HT-niskih životinja za 3,9 puta. Životinje iz H-HFD skupine imale su niže koncentracije leptina od životinja iz L-HFD skupine, što je dodatno potvrdilo jači učinak HFD kod 5HT-niske sublinije.

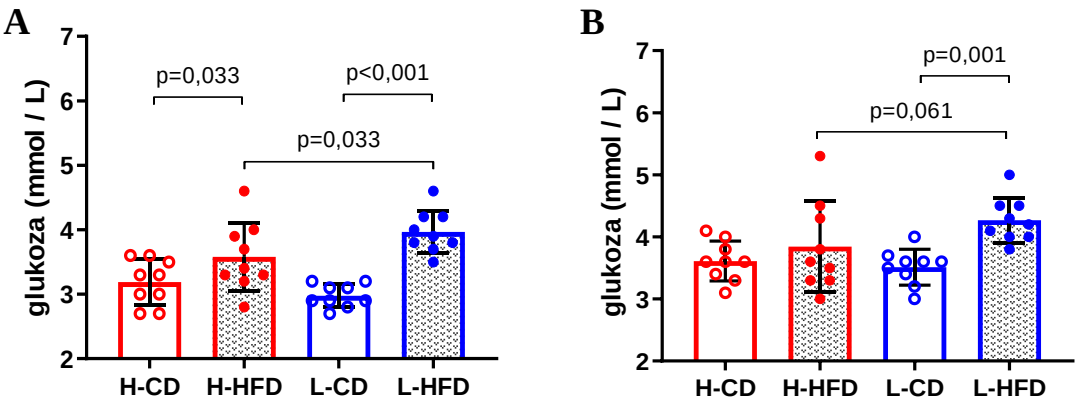


Slika 4.12. Koncentracija leptina u plazmi u 9. tjednu kontrolirane prehrane. Uzorci krvi za mjerenje uzeti su natašte. Prikazane su pojedinačne vrijednosti po skupinama, srednja vrijednost i standardna devijacija (n=8-9 po skupini). Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijance, kao post-hoc test je korišten Fisherov LSD test.
H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD - 5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima.

4.7. Razina glukoze u krvi

Bazalne (natašte) vrijednosti glukoze u krvi su izmjerene u 5. i 10. tjednu kontrolirane prehrane. Životinje iz H-CD skupine imale su u objema vremenskim točkama nešto (do 7%) više vrijednosti glukoze od životinja iz L-CD skupine, no razlika nije bila statistički značajna (Slika 4.13.). S druge strane, životinje iz H-HFD skupine imale su u objema vremenskim točkama značajno niže (oba puta za 9,8%) vrijednosti glukoze od životinja iz L-HFD skupine (Slika 4.13.). U 5. tjednu kontrolirane prehrane, koncentracija glukoze u krvi bila je za 12% viša kod H-HFD nego H-CD skupine, a za čak 33% viša kod L-HFD nego L-CD skupine (Slika 4.13.A). U 10. tjednu kontrolirane prehrane, povećanje koncentracije glukoze u krvi u odgovoru na HFD se zadržalo samo kod 5HT-niskih životinja (21,5%) dok porast kod 5HT-visokih životinja (6,5%) nije bio statistički značajan (Slika 4.13.B).

Sumarno, nema značajnih razlika među sublinijama u bazalnoj vrijednosti glukoze u krvi kod skupina životinja na CD. Rezultati upućuju da je HFD izazvala porast bazalne vrijednosti glukoze u krvi.



Slika 4.13. Koncentracija glukoze u krvi natašte u A) 5. i B) 10. tjednu kontrolirane prehrane. Prikazane su pojedinačne vrijednosti po skupinama, srednja vrijednost i standardna devijacija (n=9 po skupini). Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijance, kao post-hoc test je korišten Fisherov LSD test. H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD - 5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima.

4.8. Test tolerancije glukoze

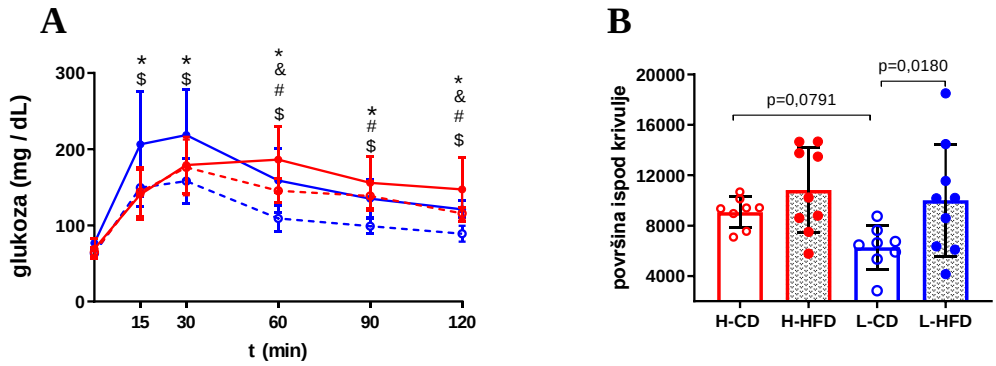
Test tolerancije glukoze proveden je u 10. tjednu kontrolirane prehrane. Životinje 12 sati prije testa nisu imale pristup hrani. Koncentracija glukoze u krvi iz repne vene je bila mjerena u 15., 30., 60., 90. i 120. minuti nakon intraperitonealnog injiciranja otopine glukoze.

Životinje iz H-CD skupine imale su u 60., 90. i 120. minuti nakon aplikacije otopine glukoze višu koncentraciju glukoze u krvi nego životinje iz L-CD skupine (Slika 4.14.A). S druge strane, životinje iz H-HFD skupine su u 60., 90. i 120. minuti imale višu, a u 15. i 30. minuti nižu koncentraciju glukoze od životinja iz L-HFD skupine, što je uputilo na različitu kinetiku metabolizma glukoze između navedenih skupina. U 15. i 30. minuti nije bilo razlike u koncentraciji glukoze između H-CD i H-HFD skupine, dok je u 60. i 120. minuti koncentracija glukoze bila viša (za 28% i 27,3%) u H-HFD nego u H-CD skupini (u 90. minuti koncentracija glukoze je bila za 12.4% viša u H-HFD skupini, ali bez statističke značajnosti). Nasuprot tome, životinje iz L-HFD skupine su u svim vremenskim točkama imale višu koncentraciju glukoze (za 35,8 do 45,7%) od životinja iz L-CD skupine.

Rezultate testa tolerancije glukoze dodatno su analizirani tako što su izračunate površine ispod krivulja prikazanih na Slici 4.14.A. Površina ispod krivulje je bila nešto veća kod H-CD nego L-CD skupine (p=0,0791), dok između H-HFD i L-HFD skupine nije bilo razlika (Slika 4.14.B). U odgovoru na HFD, površina ispod krivulje se povećala za 59,2% kod životinja iz

5HT-niske sublinije, dok kod životinja iz 5HT-visoke sublinje porast nije bio statistički značajan (19,4%, p=0,247).

Sumarno, ovi rezultati pokazuju da je HFD umanjila sposobnost životinja da reguliraju razinu glukoze u krvi te da je taj učinak bio izraženiji kod 5HT-niske nego 5HT-visoke sublinije. Također, rezultati pokazuju da u bazalnim uvjetima životinje iz 5HT-visoke sublinije imaju slabiju sposobnost regulacije razine glukoze od životinja iz 5HT-niske sublinije.



Slika 4.14. Test tolerancije glukoze (GTT) proveden u 10. tjednu kontrolirane prehrane. A) Vremenska krivulja GTT-a. Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija. p<0,1 za $^{\#}$(H-CD vs. L-CD), $^{\&}$(H-CD vs. H-HFD), *(L-HFD vs. L-CD), $^{\$}$(H-HFD vs. L-HFD) B) Površina ispod krivulja GTT-a. Prikazane su pojedinačne vrijednosti po skupinama, srednja vrijednost i standardna devijacija (n=8-9 po skupini). Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijance, kao post-hoc test je korišten Fisherov LSD test.
H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD -5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima.

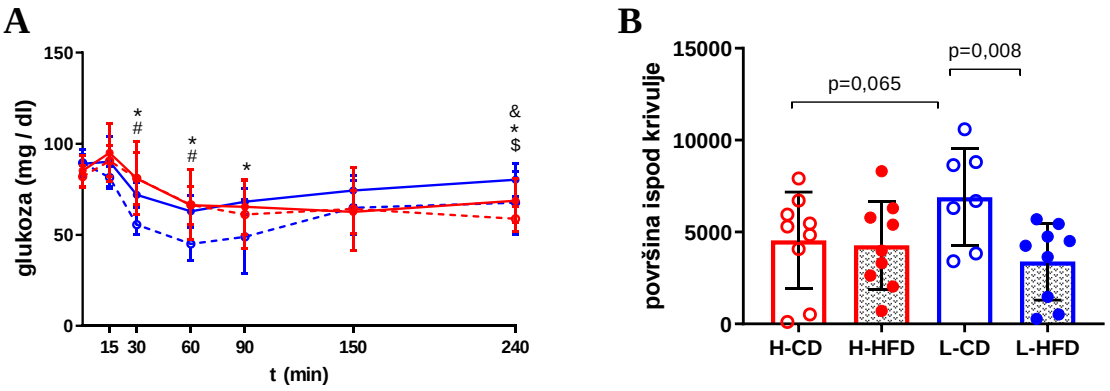
4.9.Test tolerancije inzulina

Test tolerancije inzulina proveden je u 10. tjednu kontrolirane prehrane. Životinje tijekom 3 sata prije izvođenja testa nisu imale pristup hrani. Koncentracija glukoze u krvi iz repne vene mjerena je u 15., 30., 60., 90., 150. i 240. minuti nakon intraperitonealno injicirane otopine inzulina.

Životinje iz H-CD skupine su u odnosu na životinje iz L-CD skupine imale višu koncentraciju glukoze u 30. (za 45,8%) i 60. (za 47,6%) minuti (u ostalim vremenskim točkama nije bilo statistički značajne razlike; Slika 4.15.A). S druge strane, životinje iz H-HFD skupine su u odnosu na životinje iz L-HFD skupine imale nižu koncentraciju glukoze u 240. minuti (za 14,3%) minuti, a u ostalim točkama nije bilo statistički značajne razlike. Životinje iz H-CD i H-HFD skupine su imale podjednake vrijednosti glukoze u svim vremenskim točkama osim u 240. minuti gdje su vrijednosti bile za 16,7% više kod H-HFD skupine. Nasuprot tome, životinje

iz L-HFD skupine su u svim vremenskim točkama imale više (za 10,7 do 39,7%) vrijednosti glukoze od životinja iz L-CD skupine (porast statistički značajan u 30., 60., 90. i 240. minuti; Slika 4.15.A).

Rezultati testa tolerancije inzulina dodatno su analizirani tako što su izračunate površine ispod krivulja prikazanih na Slici 4.15.A. Površina ispod krivulje je bila nešto manja kod H-CD nego L-CD skupine (p=0,065), dok između H-HFD i L-HFD skupine nije bilo razlike. Vrijednost površine ispod krivulje kod životinja iz L-HFD skupine bila je otprilike dvostruko manja nego kod životinje iz L-CD skupine, dok između životinja iz H-CD i H-HFD skupine nije bilo statistički značajne razlike. Sumarno rezultati pokazuju da u bazalnim uvjetima (CD) životinje iz 5HT-visoke sublinije imaju veću rezistenciju na inzulin od životinja iz 5HT-niske sublinije. HFD je povećala rezistenciju na inzulin kod životinja iz 5HT-niske sublinije, no nije imala bitan učinak na rezistenciju na inzulin kod životinja iz 5HT-visoke sublinije.

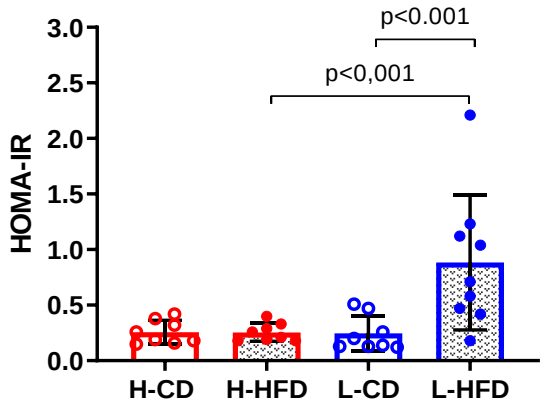


Slika 4.15. Test tolerancije inzulina (ITT) proveden u 10. tjednu kontrolirane prehrane. (A) Vremenska krivulja ITT-a. Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija. p<0,1 za $^{\#}$(H-CD vs. L-CD), $^{\&}$(H-CD vs. H-HFD), *(L-CD vs. L-HFD), $^{\$}$(H-HFD vs. L-HFD). B) Površina ispod krivulja ITT-a. Za izračun površine ispod krivulje kao bazalna vrijednost na osi y postavljena je vrijednost glukoze u t 0 min. Prikazane su pojedinačne vrijednosti po skupinama, srednja vrijednost i standardna devijacija (n=7-9 po skupini). Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijance (A, B) ili Kruskal-Wallisovim testom (B), kao post-hoc test su korišteni Fisherov LSD test ili Dunnov test.
H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD -5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima.

4.10. Homeostatski model za procjenu inzulinske rezistencije

U izračun HOMA-IR uzeti su podaci o koncentraciji glukoze i inzulina izmjereni u 10. tjednu kontrolirane prehrane u uzorcima krvi iz repne vene. HOMA-IR se nije razlikovao između skupina životinja koje su bile na standardnoj prehrani (CD, slika 4.16). S druge strane,

životinje iz L-HFD skupine su imale 3,5 puta viši HOMA-IR od životinje iz H-HFD skupine te također 3,6 puta viši HOMA-IR od životinja iz L-CD skupine. Ovi rezultati jasno pokazuju da je HFD povećala rezistenciju na inzulin isključivo kod životinja iz 5HT-niske sublinije.

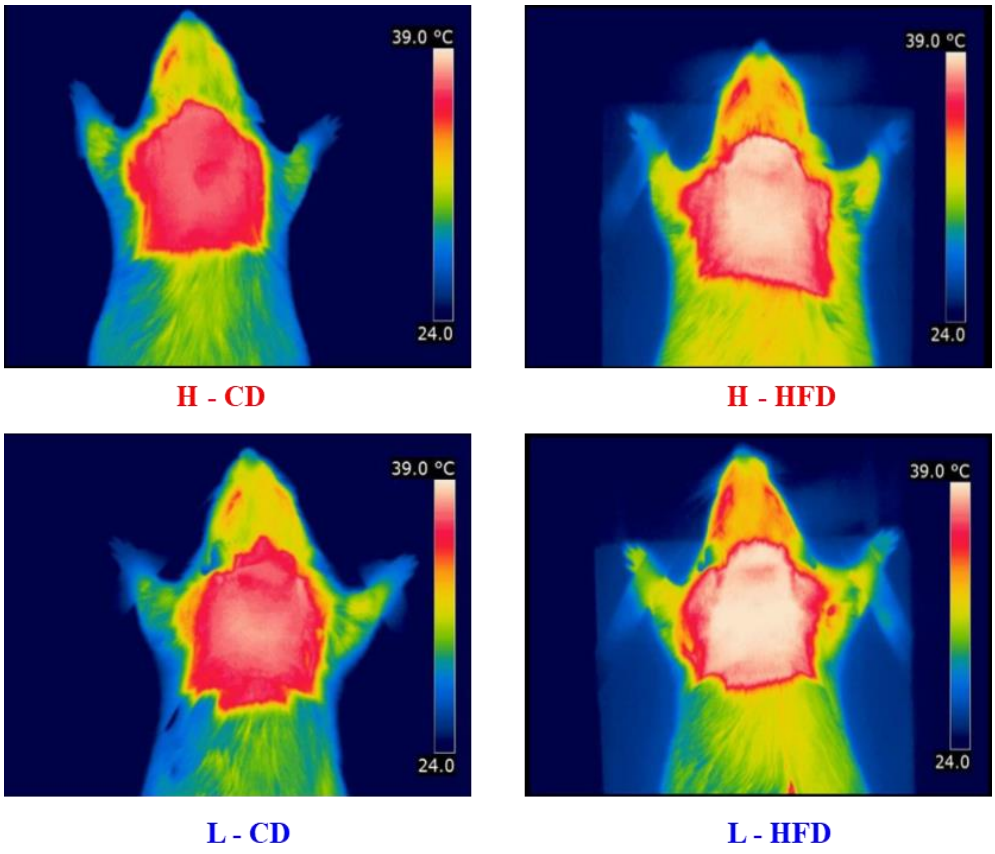


Slika 4.16 Homeostatski model za procjenu inzulinske rezistencije (HOMA-IR). Prikazane su pojedinačne vrijednosti po skupinama, srednja vrijednost i standardna devijacija (n=8-9 po skupini). Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijance, kao post-hoc test je korišten Fisherov LSD test. H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD - 5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima.

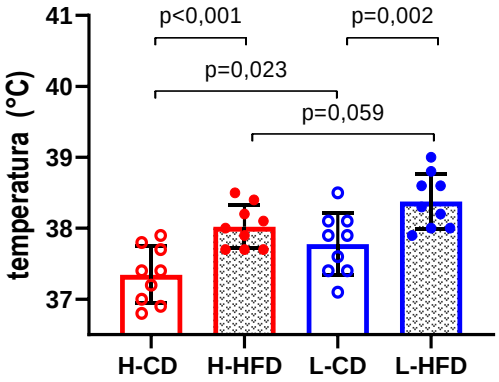
4.11. Termografija

U 9. tjednu kontrolirane prehrane životinja, svim skupinama napravljena je infracrvena termografija površine iznad smeđeg masnog tkiva (BAT) u interskapularnoj regiji. Na snimkama dobivenim termalnom kamerom (Slika 4.17.), odabrano je odgovarajuće područje kože iznad BAT-a te na njemu analizirali temperaturu (Slika 4.18.). Temperatura iznad BAT-a je bila značajno viša kod životinja iz L-CD nego H-CD skupine (za 0,5°C) te je također bila nešto viša kod životinja iz L-HFD nego H-HFD skupine (za 0,4°C). HFD je povisila temperature BAT-a kod životinja iz obiju sublinija – kod životinja iz H-HFD skupine za 0,7°C, a kod životinja iz L-HFD skupine za 0,6°C.

Ovi rezultati sumarno pokazuju da životinje iz 5HT-visoke sublinije imaju manju termogenu aktivnost BAT-a od životinja iz 5HT-niske sublinije te da je HFD kod obiju sublinija povećala termogeni kapacitet BAT-a.



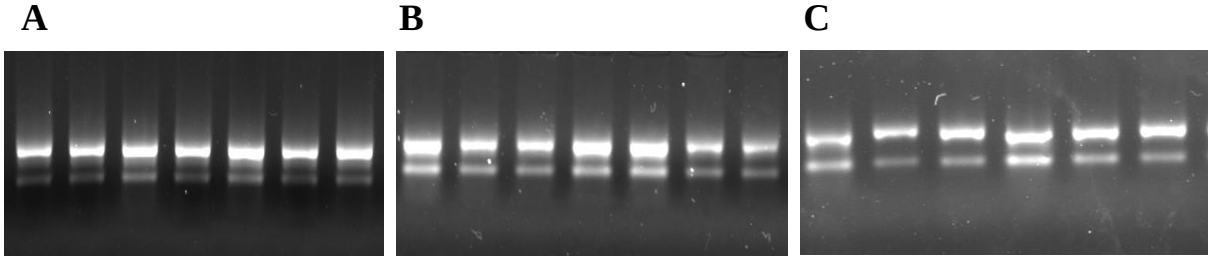
Slika 4.17. Termografske snimke interskapularnog smeđeg masnog tkiva dobivene digitalnom infracrvenom kamerom. Termografska mjerenja i analize termografskih slika proveo je dr.sc. Darko Kolarić, Centar za informatiku i računarstvo, Institut Ruđer Bošković.
H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD - 5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima.



Slika 4.18. Temperatura površine u području iznad interskapularnog smeđeg masnog tkiva. Prikazane su pojedinačne vrijednosti po skupinama, srednja vrijednost i standardna devijacija (n=9 po skupini). Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijance, kao post-hoc test je korišten Fisherov LSD test.
H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD - 5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima.

4.12. Razine mRNA odabranih gena u hipotalamusu, gonadnom bijelom masnom tkivu i smeđem masnom tkivu

Iz uzoraka hipotalamusa i gonadnog bijelog masnog tkiva prikupljenih nakon 11 tjedana kontrolirane prehrane izolirana je ukupna stanična RNA. Cjelovitost izolirane RNA provjerena je elektroforezom na 1%-tnom agaroznom gelu. Svi uzorci RNA pokazali su oštre vrpce 28S i 18S rRNA, s jačim intenzitetom vrpce 28S rRNA (Slika 4.19.), što je potvrdilo dobru očuvanost integriteta RNA. Metodom RT-qPCR analizirana je razina mRNA za odabrane gene. Razina ekspresije izražena je kao omjer razine mRNA za gen od interesa i razine mRNA dvaju odabranih referentnih gena. U slučaju hipotalamus i gWAT-a odabrani referentni geni bili su *Actb* i *Gapdh*, a u slučaju BAT-a, *Actb* i *Rps29*.



Slika 4.19. Reprezentativni uzorci RNA izolirane iz A) hipotalamusa, B) gonadnog bijelog masnog tkiva i C) smeđeg masnog tkiva. Uzorci RNA razdvojeni su elektroforezom na 1% agaroznom gelu. Gornja vrpca odgovara 28S rRNA i donja vrpca odgovara 18S rRNA.

4.12.1 Hipotalamus

U hipotalamusu je analizirana relativna razina mRNA 15 gena od interesa. Specifično, za analize su odabrani geni koji kodiraju za: signalne neuropeptide i njihove receptore (*Agrp*, C*art*, *Hcrt*, *Hcrtr*, *Lepr*, *Npy*, *Npyr*, *Pomc*), proteine uključene u metabolizam glukoze (*Glut3, Irs1, Irs2*), faktore rasta (*Bdnf*), transkripcijske faktore uključene u regulaciju energetske ravnoteže (*Ppargc1b*) te proteine serotoninskog sustava (*Htr2c, Sert*). Rezultati su prikazani grafički na Slici 4.20. Rezultati statističke analize su prikazani u Prilogu u Tablici 10.

Analiza razine ekspresije gena za odabrane neuropeptide i njihove receptore (Slika 4.20.A) pokazala je da su životinje iz H-CD skupine imale višu razinu ekspresije gena *Cart* i *Hcrtr* nego životinje iz L-CD skupine skupine, dok se razina ekspresije ostalih gena nije značajno razlikovala između ovih skupina. Zanimljivo, HFD je snizila razine ekspresije gena *Agrp* i *Hcrt* te povisila razine ekspresije gena *Cart* i *Lepr* samo kod 5HT-niskih životinja. Posljedično, životinje iz L-HFD skupine imale su nižu razinu ekspresiju gena *Agrp* i *Hcrt* od životinja iz H-HFD skupine. S druge strane, razina ekspresije gena *Npyr* porasla je pod

utjecajem HFD kod životinja iz obiju sublinija. Razina ekspresije gena *Npy* i *Pomc* nije se razlikovala između istraživanih skupina.

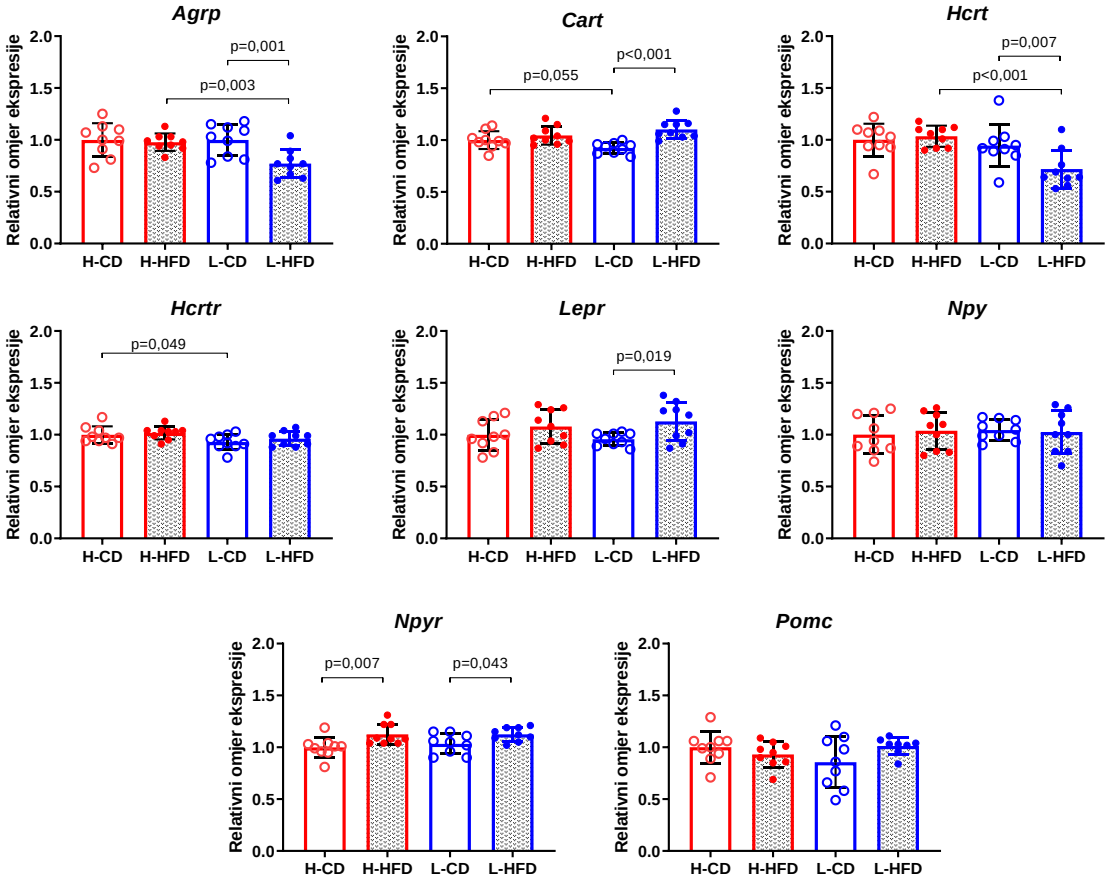
Analiza ekspresije gena za proteine uključene u metabolizam glukoze (Slika 4.20.B) pokazala je da je HFD kod obiju sublinija indikativno povisila razinu ekspresiju gena *Irs2* (razlika nije dosegla statističku značajnost, p=0,059), dok nije imala utjecaj na razinu ekspresije gena *Glut3* i *Irs1*. Razina ekspresije sva tri gena se nije značajno razlikovala između H-CD i L-CD skupine, međutim, nakon tretmana s HFD uočena je statistički značajno viša razina ekspresije gena *Glut3* kod 5HT-visokih u odnosu na 5-HT niske životinje.

Razina ekspresije gena za odabrane faktore rasta (*Bdnf*) i transkripcijske faktore uključene u regulaciju energetske ravnoteže (*Ppargc1b*) (Slika 4.20.C) nije se značajno razlikovala između H-CD i L-CD skupine, a HFD je dovela samo do indikativnog porasta (p=0,078) razine expresije gena *Bdnf* kod životinja iz 5HT-niske sublinije.

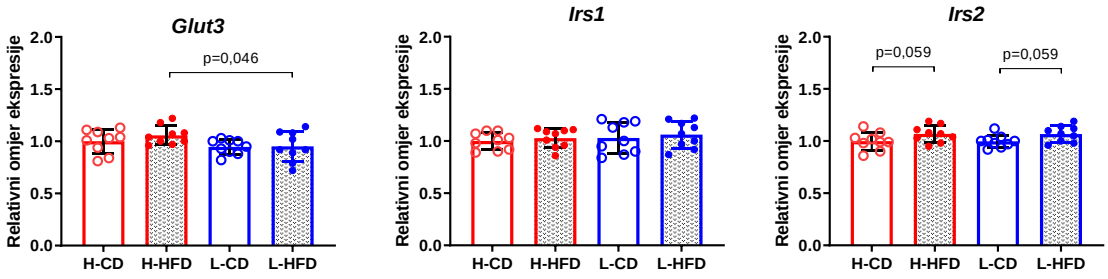
Obzirom na proteine serotoninskog sustava (Slika 4.20.D), razina ekspresije gena *Sert* bila je značajno viša kod životinja iz H-CD nego L-CD skupine. HFD je kod životinja iz 5HT-visoke sublinije snizila razinu ekspresiju gena *Sert* te se nakon tretmana HFD-om ekspresija gena *Sert* u hipotalamusu nije više razlikovala između 5HT-niskih i 5HT-visokih životinja. Nije bilo razlike u razini ekspresije gena *Htr2c* među istraživanim skupinama.

Sumarno, rezultati analize razine ekspresije odabranih gena u hipotalamusu pokazali su da je HFD promijenila razinu ekspresije pojedinih gena (*Agrp, Cart, Hcrt, Lepr, Bdnf*) samo kod životinja iz 5HT-niske sublinije, a razinu ekspresije gena *Sert* snizila samo kod životinja iz 5HT-visoke sublinije.

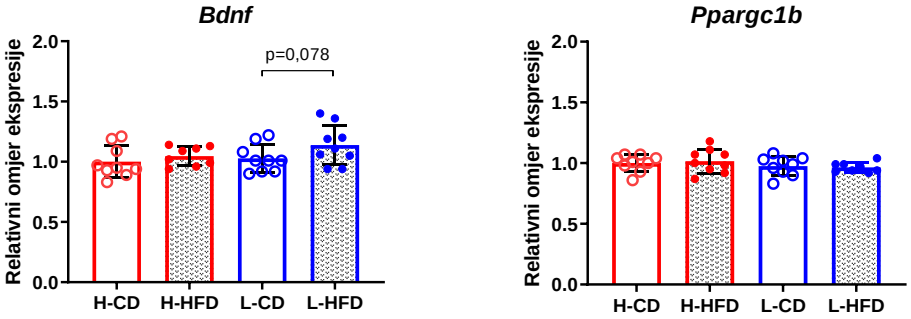
A) Neuropeptidi i njihovi receptori



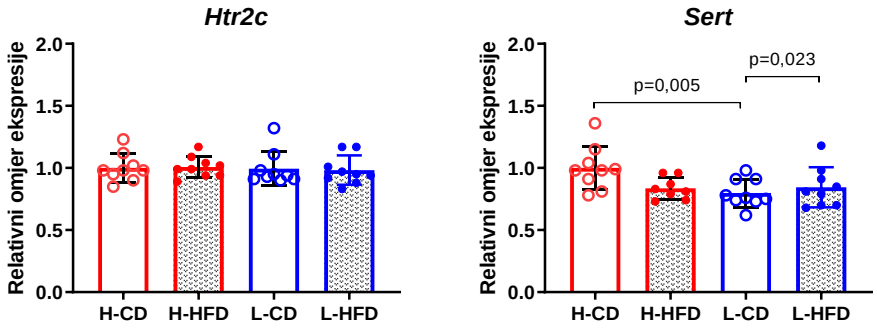
B) Proteini uključeni u metabolizam glukoze



C) Faktori rasta i transkripcijski faktori uključeni u regulaciju energetske ravnoteže



D) Proteini serotoninskog sustava



Slika 4.20. Razine mRNA gena navedenih na grafovima u uzorcima hipotalamusa izoliranim nakon 11 tjedana kontrolirane prehrane. Geni su podijeljeni u grupe: A) neuropeptidi i njihovi receptori, B) proteini uključeni u metabolizam glukoze, C) faktori rasta i transkripcijski faktori uključeni u regulaciju energetske ravnoteže, i D) proteini serotoninskog sustava. Razina ekspresije izražena je prema srednjoj vrijednosti ekspresije dva referentna gena (*Actb* i *Gapdh*). Srednja vrijednost relativne ekspresije gena od interesa u skupini H-CD postavljena je na 1.00. Prikazane su pojedinačne vrijednosti, srednja vrijednost i standardna devijacija (n=7-9 po skupini). Razlike su testirane Kruskal-Wallisovim testom (*Htr2c, Npyr, Pomc*) ili jednosmjernom analizom varijance (ostali geni), kao post-hoc testovi su korišteni Dunnov test ili Fisherov LSD test.

H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD - 5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima.

Actb - actin beta, Agrp - agouti-related peptide, Bdnf - brain-derived neurotrophic factor, Cart - cocaine and amphetamine regulated transcript, Gapdh - glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Glut3 - glucose transporter 3, Hcrt - hypocretin neuropeptide precursor (orexin), Hcrtr - hypocretin (orexin) receptor 1, Htr2c - 5-hydroxytryptamine receptor 2c, Irs1 (2) - insulin receptor substrate 1 (2), Lepr - leptin receptor, Npy - neuropeptide Y, Npyr - neuropeptide Y receptor, Pomc - pro-opiomelanocortin, Ppargc1b - peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 beta, Sert - serotonin transporter*

4.12.2. Gonadno bijelo masno tkivo

U gonadnom bijelom masnom tkivu analizirana je relativna razina mRNA 26 gena od interesa. Specifično, analizirani su geni za regulatorne adipokine (*Adipoq, Lep, Retn*), faktore rasta i imunocitokine (*Fgf10, Fgf21, Tnf, Vegfa*), proteine uključene u metabolizam glukoze (*Glut1, Glut4, Insr, Irs1, Irs2*), proteine uključene u metabolizam lipida (*Atgl, Fabp4, Fasn, Lipe, Lpl*), transkripcijske faktore uključene u regulaciju energetske ravnoteže (*Cebpa, Cebpd, Wnt10b*) te proteine serotoninskog sustava (*Htr2a, Htr2b, Maoa, Maob Sert, Tph1*). Rezultati su prikazani grafički na slici 4.21. Rezultati statističke analize prikazani su u Prilogu u Tablici 11.

Analiza razine ekspresije gena za regulatorne adipokine (Slika 4.21.A), pokazala je da su životinje iz H-CD skupine imale višu razinu ekspresije gena *Adipoq* od životinja iz L-CD skupine. HFD je povisila razine ekspresije gena *Lep* samo kod životinja iz 5HT-niske sublinije te snizila razine ekspresije gena *Retn* kod životinja iz obiju sublinija.

Analiza razine ekspresije gena za faktore rasta i imunocitokine (Slika 4.21.B), pokazala je da su životinje iz H-CD skupine imale višu razinu ekspresiju gena *Fgf10*, a indikativno (p=0,078) nižu razinu ekspresije gena *Fgf21* od životinja iz L-CD skupine. HFD je povisila razinu ekspresije gena *Fgf10* kod životinja iz obiju sublinija, dok je razina ekspresije gena *Fgf21* značajno porasla samo kod 5HT-niskih životinja. Razina ekspresije gena *Vegfa* i *Tnf* nije se razlikovala između istraživanih skupina.

Analiza razine ekspresije gena za proteine uključene u metabolizam glukoze (Slika 4.21.C), pokazala je višu razinu ekspresije gena *Irs2* kod životinja iz H-CD nego L-CD skupine. HFD je snizila razinu ekspresije gena *Glut4* kod životinja iz obiju sublinija. Uz to, dovela je do povišenja razine ekspresije gena *Insr* samo kod životinja iz 5HT-visoke sublinije. Posljedično, životinje iz H-HFD skupine imale su nižu razinu ekspresije gena *Glut1* te višu razinu ekspresije gena *Irs2* od životinja iz L-HFD skupine.

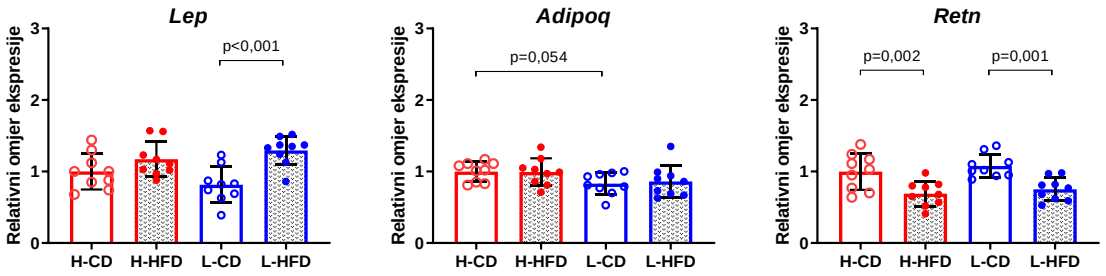
Analiza razine ekspresije gena za proteine uključene u metabolizam lipida (Slika 4.21.D) pokazala je da su životinje iz H-CD skupine imale nižu razinu ekspresiju gena *Fasn* nego životinje iz L-CD skupine, dok se razina ekspresije ostalih gena nije razlikovala između ovih skupina. HFD je povisila razinu ekspresije gena *Fabp4* i *Atgl*, a snizila razinu ekspresije gena *Fasn* kod životinja iz obiju sublinija.

Analiza transkripcijskih faktora uključenih u regulaciju energetske ravnoteže pokazala je da nije bilo razlike u razini ekspresije gena *Cebpa* i *Cebpd* između istraživanih skupina. Razina ekspresije gena *Wnt10b* bila je nešto viša (p=0,053) kod životinja iz H-CD nego L-CD skupine.

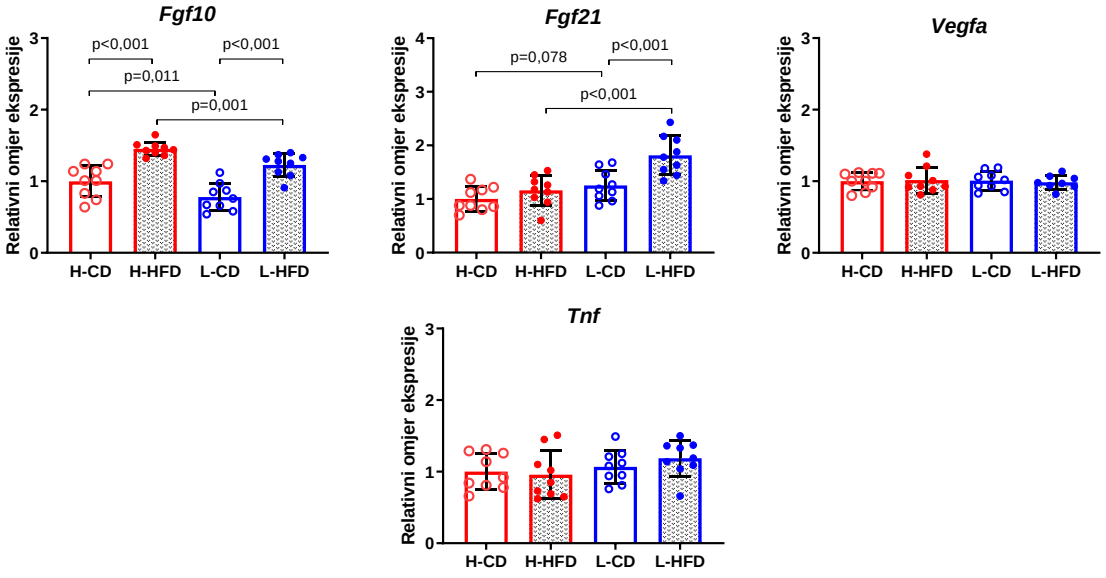
Analiza razine ekspresije gena za proteine serotoninskog sustava, pokazala je da su životinje iz H-CD skupine imale nižu razinu ekspresiju gena *Maob* i višu razinu ekspresiju gena *Htr2a* nego životinje iz L-CD skupine. HFD je kod životinja iz obiju sublinija snizila razinu ekspresije gena *Maob* a povisila razine ekspresije gena *Maoa* i *Htr2b*. S druge strane, razina ekspresije gena *Tph1* se pod utjecajem HFD snizila samo kod životinja iz 5HT-niske sublinije. Životinje iz H-HFD skupine su imale nižu razinu ekspresije gena *Tph1*, *Maoa* i *Maob* od životinje iz L-HFD skupine. Nije bilo razlike u razini ekspresiji gena *Sert* i *Htr2b* između istraživanih skupina.

Sumarno, HFD je promijenila razinu ekspresije više različitih gena u gonadnom bijelom masnom tkivu životinja, pri čemu su promjene razine ekspresije nekih gena bile podjednake kod sublinija WZ-5HT štakora (*Retn*, *Fgf10*, *Glut4*, *Fabp4*, *Fasn*, *Atgl*, *Lpl*, *Maoa*, *Maob*, *Htr2a*), dok su promjene razine ekspresije nekih gena bile prisutne samo kod 5HT-visokih (*Glut1*, *Insr* i *Lipe*) ili 5HT-niskih (*Lep*, *Fgf21*, *Irs2*, *Tph1*) životinja.

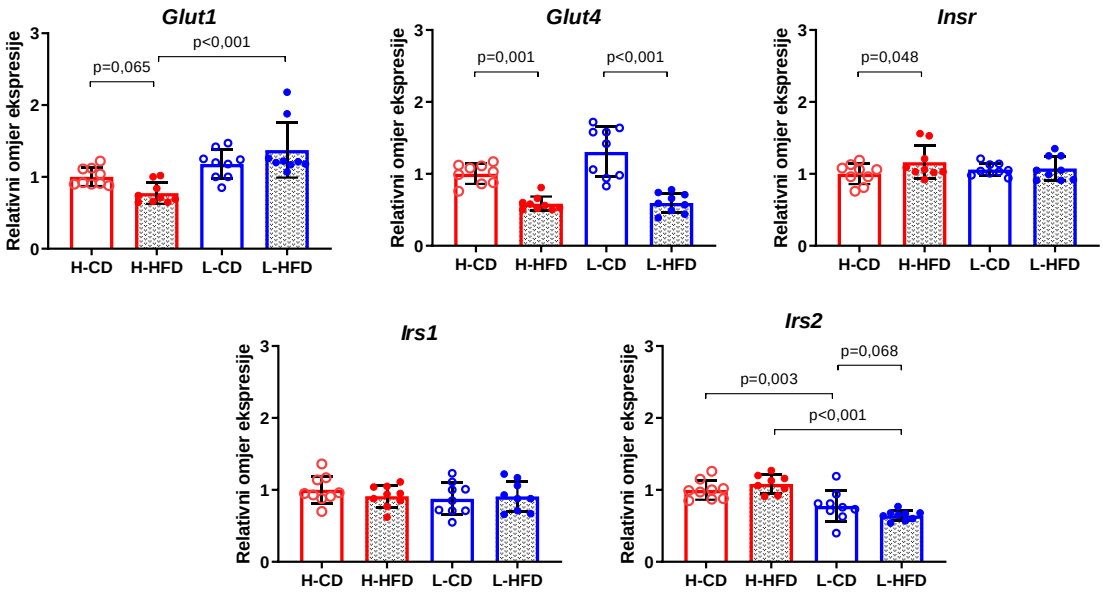
A) Regulatorni adipokini



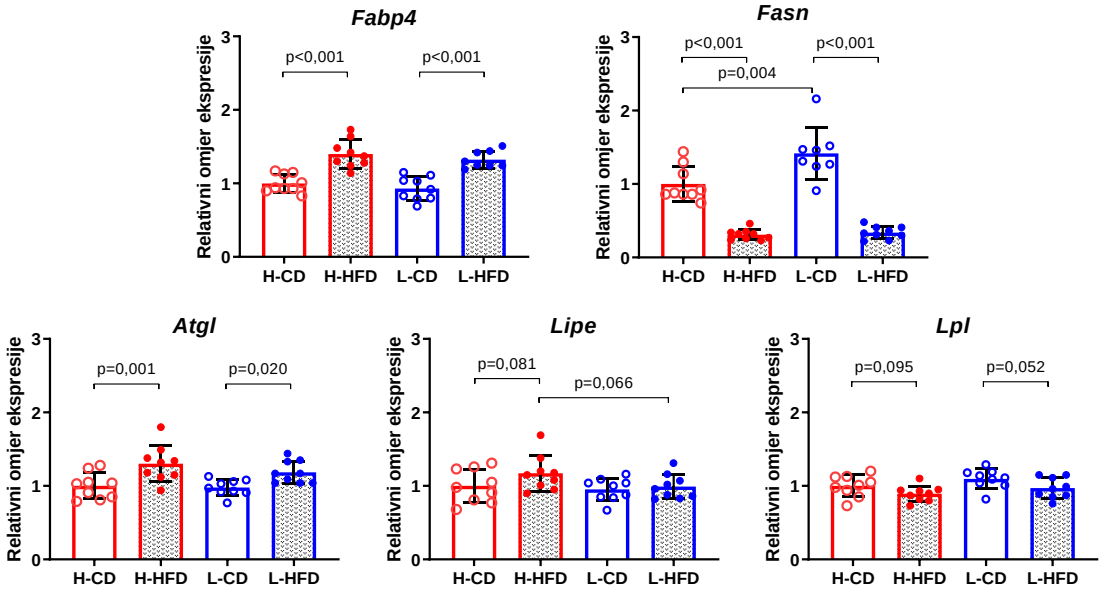
B) Faktori rasta i imunocitokini



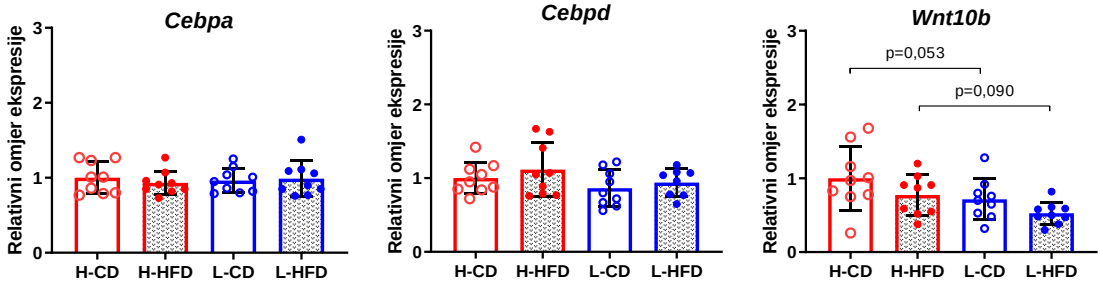
C) Proteini uključeni u metabolizam glukoze



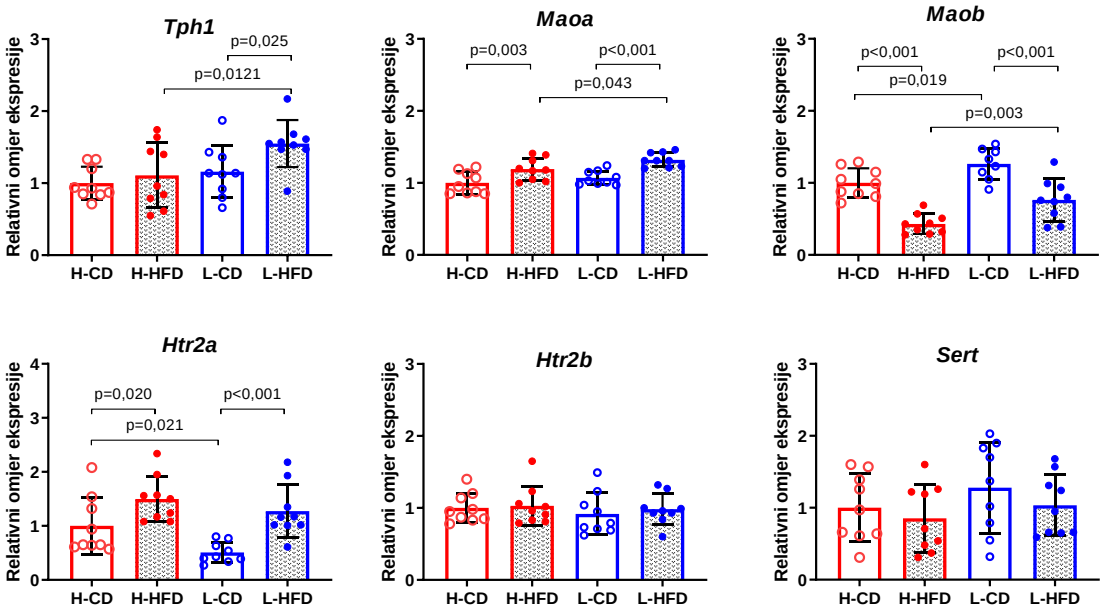
D) Proteini uključeni u metabolizam lipida



E) Transkripcijski faktori uključeni u regulaciju energetske ravnoteže



F) Proteini serotoninskog sustava



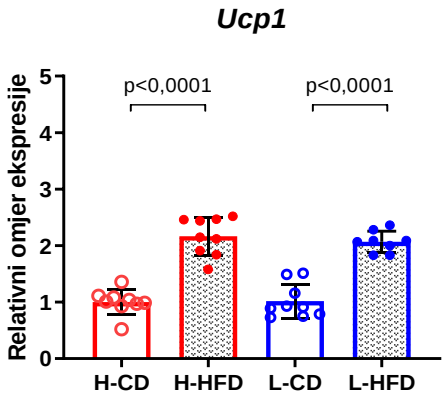
Slika 4.21. Razine mRNA gena navedenih na grafovima u uzorcima gWAT-a izoliranim nakon 11 tjedana kontrolirane prehrane. Geni su podijeljeni u grupe: A) regulatorni adipokini, B) faktori rasta i imunocitokini, C) proteini uključeni u metabolizam glukoze, D) proteini uključeni u metabolizam lipida, E) transkripcijski faktori uključeni u regulaciju energetske ravnoteže, i F) proteini serotoninskog sustava. Razina ekspresije izražena je prema srednjoj vrijednosti ekspresije dva referentna gena, *Actb* i *Gapdh*; skupina H-CD arbitrarno je postavljena na 1.00. Prikazane su pojedinačne vrijednosti, srednja vrijednost i standardna devijacija (n=8-9 po skupini).
Razlike su testirane Kruskal-Wallisovim testom (*Glut1, Glut4, Htr2a, Htr2b, Insr*) ili jednosmjernom analizom varijance (ostali geni), kao post-hoc test su korišteni Dunnov test ili Fisherov LSD test.
H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD - 5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima.

Actb - actin beta, Adipoq - adiponectin, Atgl - adipose tiglyceride lipase, Cebpa - CCAT/enhancer – binding protein alpha, Cebpd - CCAAT enhancer binding protein delta, Fabp4 - fatty acid-binding protein 4, Fasn - fatty acid synthase, Fgf10 (21) - fibroblast growth factor 10 (21), Gapdh - glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Glut1 (4) - glucose transporter 1 (4), Htr2a - 5-hydroxytryptamine receptor 2A, Htr2b - 5-hydroxytryptamine receptor 2B, Insr - insulin receptor, Irs1 (2) - insulin receptor substrate 1 (2), Lep - leptin, Lipe - lipase E, hormone sensitive type, Lpl - lipopotein lipase, Maoa (b) - monoamine oxidase A (B), Retn - rezistin, Sert - serotonin transporter, Tnf - tumor necrosis factor, Tph1 - tryptophan hydroxylase 1, Vegfa - vascular endothelial growth factor, Wnt10b - wingless-related integration site family member 10B

4.12.3. Smeđe masno tkivo

U smeđem masnom tkivu analizirana je relativna razina mRNA specifičnog termogenog proteina (Ucp1). Rezultati su prikazani grafički na Slici 4.22. Rezultati statističke analize prikazani su u Prilogu u Tablici 11.

Nije bilo razlike u razini ekspresije gena za *Ucp1* između H-CD i L-CD skupine, kao ni između H-HFD i L-HFD skupine životinja. HFD je povisila razinu ekspresije gena *Ucp1* kod životinja iz obiju sublinije.

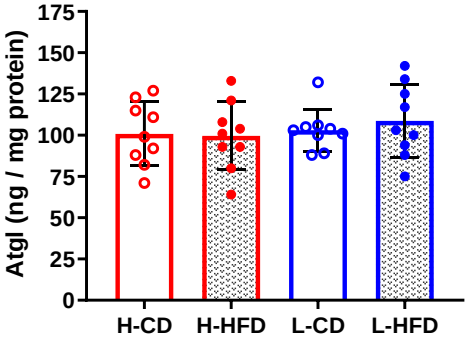


Slika 4.22. Razina mRNA gena *Ucp1* u uzorcima BAT-a izoliranim nakon 11 tjedana kontrolirane prehrane. Razina ekspresije izražena je prema srednjoj vrijednosti ekspresije dva referentna gena, *Actb* i *Rps29*; skupina H-CD arbitrarno je postavljena na 1.00. Prikazane su pojedinačne vrijednosti, srednja vrijednost i standardna devijacija (n=9 po skupini).
Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijance, kao post-hoc test je korišten Fisherov LSD test. H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD - 5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima.

4.13. Razine odabranih proteina u gonadnom bijelom masnom tkivu

4.13.1. Trigliceridna lipaza masnog tkiva (Atgl)

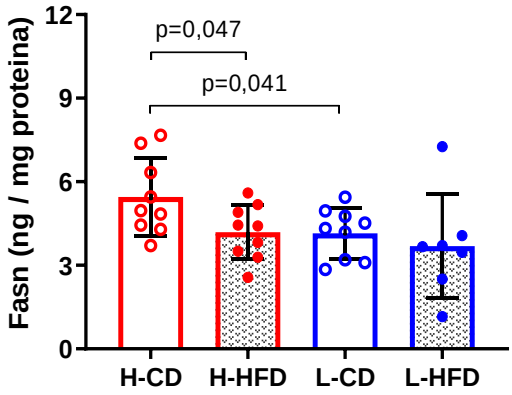
Koncentracija proteina Atgl u gonadnom bijelom masom tkivu (Slika 4.23.) nije se razlikovala između H-CD i L-CD skupine kao niti između H-HFD i L-HFD skupine životinja. Također, niti kod jedne sublinije nije bilo razlike u koncentraciji Atgl-a između životinja koje su bile na HFD i na CD.



Slika 4.23. Koncentracija proteina Atgl u gonadnom bijelom masnom tkivu. Prikazane su pojedinačne vrijednosti po skupinama, srednja vrijednost i standardna devijacija (n=9 po skupini).
Razlike su testirane Kruskal-Wallisovim testom, kao post-hoc test je korišten Dunnov test.
H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD - 5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima.

4.13.2. Sintaza masnih kiselina (Fasn)

Koncentracija proteina Fasn u bijelom gonadnom masnom tkivu bila je viša (za 31%) kod životinja iz H-CD nego L-CD skupine (Slika 4.24.). S druge strane, nije bilo razlike između životinja iz H-HFD i L-HFD skupine budući da je HFD smanjila koncentracije proteina Fasn samo kod 5HT-visokih životinja.



Slika 4.24. Koncentracija proteina Fasn u gonadnom bijelom masnom tkivu. Prikazane su pojedinačne vrijednosti po skupinama, srednja vrijednost i standardna devijacija (n=7-9 po skupini). Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijance, kao post-hoc test je korišten Fisherov LSD test.
H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD - 5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima.

5. RASPRAVA

Pretilost, koja je u današnjem svijetu dosegla epidemijske razmjere, je povezana s povećanim rizikom za razvoj mnogih zdravstvenih poteškoća. Na razvoj pretilosti utječe više čimbenika, između ostalog genetika, prehrana, fizička aktivnost, urbanizacija i sjedilački način života. U posljednjih nekoliko desetljeća, međuodnos pretilosti i prehrane je bio tema mnogih istraživanja, budući da je prehrana jedan od čimbenika koji najviše doprinosi razvoju pretilosti. Energetski unos koji premašuje metaboličke potrebe može brzo dovesti do razvoja pretilosti, rezultirajući nakupljanjem lipida prvenstveno u masnom tkivu, a nakon što se premaši kapacitet masnog tkiva za skladištenje lipida, i u drugim perifernim organima (srce, jetra, skeletni mišići) (Botchlett i Wu, 2018.).

Iako je patogeneza pretilosti do sada bila predmet mnogih istraživanja, molekularni mehanizmi razvoja pretilosti nisu još uvijek dovoljno poznati. Zbog prevalencije pretilosti u svijetu, sve više raste interes za pronalaskom potencijalnih farmakoloških meta u tretmanu pretilosti. Upravo zbog toga povećao se i interes znanstvene zajednice za proučavanje uloge 5HT u pretilosti, budući da je poznato da 5HT ima važnu ulogu u regulaciji energetske ravnoteže (Yabut i sur., 2019.).

U ovom je istraživanju za proučavanje uloge 5HT u razvoju pretilosti korišten animalni model Wistar-Zagreb 5HT štakor koji je dobiven odabirnim parenjem štakora soja Wistar prema ekstremnim vrijednostima trombocitnih serotoninskih parametara. Dobivene su dvije sublinije životinja: 5HT-visoka sublinija (H), karakterizirana konstitucijski povišenom i 5HT-niska sublinija (L), karakterizirana konstitucijski sniženom razinom trombocitnih serotoninskih parametara (Čičin-Šain i sur., 1998., 2005.). Daljnja neurokemijska i bihevioralna istraživanja pokazala su da se životinje iz WZ-5HT sublinija razlikuju s obzirom na aktivnost serotoninske signalizacije i u središnjem živčanom sustavu. Za razliku od animalnih modela kod kojih su metodama genetičkog inženjerstva inaktivirani ili farmakološkim tretmanom inhibirani pojedini proteini serotonergičnog sustava (Tph1, Tph2, Maoa, Maob, Sert, Htr2a, Htr2c), kod sublinija WZ-5HT štakora, promjene 5HT sustava su slabije izražene, u rasponu fizioloških vrijednosti te idu u smjeru i smanjenja i pojačanja, oponašajući tako bolje situaciju koja se javlja kod čovjeka. Uz to, WZ-5HT sublinije pokazuju razlike i u središnjem i u perifernom 5HT sustavu, što je također prednost ovog modela budući da omogućuje donošenje zaključaka na razini integralnog organizma.

Ovo istraživanje se sastojalo u ispitivanju funkcionalnog i molekularnog odgovora životinja iz WZ-5HT sublinije na specifični metabolički izazov – prehranu bogatu mastima. Po jedna skupina životinja iz svake sublinije je kroz period od 11 tjedana bila hranjena standardnom laboratorijskom hranom za glodavce (CD) ili hranom bogatom mastima (HFD).

Kako bi se ispitao funkcionalni odgovor životinja na HFD, tijekom kontroliranog hranjenja je mjerena tjelesna masa životinja, napravljeni su test tolerancije glukoze (GTT) i test tolerancije inzulina (ITT) te je određena termogena aktivnost BAT-a. Kako bi se ispitao molekularni odgovor životinja na HFD, izmjereni su metabolički parametri u krvi (razina lipida, glukoze, odabranih hormona i adipokina), određena je razina odabranih proteina u bijelom masnom tkivu te razina 5HT i aktivnost serotoninskog prijenosnika u trombocitima. Naposljetku, određena je razina ekspresije odabranih gena koji su uključeni u održavanje energetske ravnoteže u hipotalamusu i bijelom masnom tkivu.

Za izazivanje pretilosti kod WZ-5HT štakora korištena je visokokalorična prehrana bogata mastima (HFD). U istraživanjima na glodavcima uobičajeno se koristi hrana bogata mastima kod koje masti čine 40-60% ukupnih kalorija, doke je ovdje korištena hrana s 45% masti, za koju se u novije vrijeme ističe da bolje oponaša nepovoljnu prehranu koja dovodi do pojave pretilosti u ljudi (Speakman, 2019.).

Rezultati istraživanja sumarno su pokazali da se životinje iz WZ-5HT sublinija značajno razlikuju u funkcionalnom i molekularnom odgovoru na HFD, ukazavši pri tome da konstitucijski snižena razina serotonina čini organizam podložnim štetnim učincima visokokalorične prehrane.

5.1. Unos hrane

Između skupina životinja na CD nije bilo razlike u dnevnom unosu hrane / energije po životinji. U našem prethodnom istraživanju pokazano je da su životinje iz 5HT-visoke sublinije imale veći dnevni unos hrane po životinji od životinja iz 5HT-niske sublinije (Kesić i sur., 2020.). Ovakva razlika u dnevnom unosu hrane može biti posljedica različite životne dobi pokusnih životinja korištenih u ovim istraživanjima. U prijašanjem istraživanju (Kesić i sur., 2020.) životinje su bile starosti 5 i pol mjeseci, dok su u ovom istraživanju životinje bile starosti 2 i pol mjeseca. Kada se dnevni unos hrane / energije izrazi s obzirom na tjelesnu masu životinja, može se vidjeti da su životinje iz 5HT-niske sublinije imale veći dnevni unos od životinja iz 5HT-visoke sublinije, što je u skladu s rezultatima prijašnjeg istraživanja (Kesić i sur., 2020.). Slično našim rezultatima, Shong i sur. (2020.) su pokazali da Tph1 FKO miševi, kojima je selektivno inaktiviran gen za sintezu serotonina (*Tph1*) u masnom tkivu, imaju veći dnevni energetski unos u odnosu na divlji tip miša. S druge strane, Watanabe i sur. (2010) nisu

uočili razliku u dnevnom energetskom unosu između miševa s povišenom razinom perifernog 5HT i kontrolnih miševa.

Razlike u dnevnom unosu hrane upućivale su na promjene u hipotalamičkim mehanizmima koji sudjeluju u regulaciji unosa hrane, stoga je analizirana razinu ekspresije oreksigenih i anoreksigenih signalnih peptida i njihovih receptora u hipotalamusu. Razlike između sublinija u ekspresiji oreksigenih (Agrp, Hcrt, Npy) i anoreksigenih signalnih peptida (Cart, Pomc) i njihovih recepora (Hcrtr, Lepr, Npyr) su bile slične ranije objavljenim rezultatima (Kesić i sur., 2020.). Kao i ranije, razine ekspresije gena *Cart* i *Hcrtr* su bile više kod životinja iz H-CD skupine u odnosu na životinje iz L-CD skupine te nije bilo razlike u razini ekspresije gena *Hcrt, Lepr, Npy* i *Pomc*. No, za razliku od ranijih rezultata kada su životinje iz 5HT-visoke sublinije imale višu razinu ekspresije gena *Agrp* i *Npyr,* u ovom istraživanju nije bilo razlike među skupinama životinja na CD u razini ekspresije ovih gena, što opet može biti posljedica razlike u životnoj dobi pokusnih životinja u ova dva istraživanja. Također, treba napomenuti da su razlike među 5HT-sublinijama u bazalnim uvjetima (standardna prehrana) u pravilu male i iznose oko 10% (Kesić i sur., 2020).

Dnevni unos hrane (g po životinji) bio je manji kod životinja koje su bile na HFD nego kod životinja koje su bile na CD. Životinje iz obiju sublinija su u prva dva tjedna smanjile dnevni unos HFD (g/životinja/dan). Iako većina radova, kod kojih su životinje bile podvrgnute specifičnom metaboličkom izazovu, izvještava samo o dnevnom energetskom unosu, tek manji broj radova objavljuje i rezultate dnevnog unosa hrane izraženog u gramima (Chen i sur., 2008.; Díaz-Urbina i sur., 2018.; Picchi i sur., 2011.). U ovim radovima se može vidjeti trend koji je zabilježen i u ovom istraživanju. Kada se životinjama promjeni vrsta prehrane, tj. kada ih se počne hraniti s hranom bogatom mastima, nakon nekoliko tjedana životinje smanje unos hrane izražen u gramima. Iako su životinje iz obiju sublinija imale manji dnevni unos HFD nego CD u gramima, dnevni energetski unos je (Slika 4.2.) je bio veći kod životinja na HFD nego kod životinja na CD. Istraživanja provedena na miševima kojima je genetički ili farmakološki inhibirana sinteza Tph1, nisu pokazala razlike u dnevnom unosu HFD u odnosu na divlji tip miša (Crane i sur., 2015.). No, istraživanja provedena na miševima kojima je selektivno inaktiviran gen za sintezu 5HT (*Tph1*) u masnom tkivu, su pokazala da te životinje imaju veći dnevni unos HFD izražen s obzirom na tjelesnu masu u odnosu na divlji tip miša (Shong i sur., 2020.). Slično se može vidjeti i u ovom istraživanju, ako se usporedi dnevni unos HFD izražen s obzirom na tjelesnu masu životinja, gdje životinje iz L-HFD skupine imaju veći dnevni unos u odnosu na životinje iz H-HFD skupine.

Zanimljivo, samo kod životinja iz 5HT-niske sublinije je pod utjecajem HFD došlo do sniženja razine ekspresije oreksigenih peptida *Agrp* i *Hcrt* te do povišenja razine ekspresije anoreksigenih peptida *Cart* i *Lepr* u hipotalamusu. Ovakav učinak HFD je već zabilježen u literaturi (Kakizaki i sur., 2019., Briggs i sur., 2010., Venancio i sur., 2017.). Ovakva promjena ekspresije gena ukazuje na inhibiciju puteva koji signaliziraju glad, odnosno na aktivaciju puteva koji signaliziraju sitost, što je očekivani, obrambeni odgovor u uvjetima visokokalorične prehrane. Zanimljivo je da se ovakav odgovor javio samo kod 5HT-niske sublinije koja je bila jače pogođena štetnim posljedicama visokokalorične prehrane, što je bilo vidljivo u višem prinosu u tjelesnoj masi i jačem razvoju rezistencije na inzulin. Iz toga bi se moglo zaključiti da su navedene molekularne promjene u hipotalamusu posljedica postojanja jačeg metaboličkog poremećaja kod 5HT-niskih životinja, koje ipak nisu bile dovoljne da spriječe negativne posljedice visokolarične prehrane (što je vidljivo iz nepovoljnih učinaka HFD na prinos u tjelesnoj masi i glukoznu homeostazu kod životinja iz 5HT-niske sublinije).

Leptin je jedan od glavnih anoreksigenih molekula uključenih u regulaciju unosa hrane. Nakon što adipociti otpuste leptin u krvotok, on prelazi krvno-moždanu barijeru te vrši svoju funkciju vezanjem na leptinski receptor u hipotalamusu te na taj način utječe na aktivnost hipotalamičkih neurona i na razinu ekspresije oreksigenih signalnih neuropeptida (Klok i sur., 2007.). Razina ekspresije gena *Npyr u* hipotalamusu je bila povišena kod obiju skupina životinja na HFD, što ukazuje na aktivaciju oreksogenih signalih puteva, odnosno na povećanje apetita i unosa hrane. Ovakav nalaz je bio neočekivan budući da se u uvjetima povišenog energetskog unosa očekuje smanjen unos hrane (Diaz-Urbina i sur., 2018.).

U hipotalamusu je analizirana i razina ekspresije gena *Htr2c*. Iako središnji 5HT dovodi do smanjenja apetita vezanjem na Htr2c receptor (v. literaturni pregled 2.4.1.), za koji je upravo zbog toga odobren i agonist Htr2c u tretmanu pretilosti, nije uočena razlika u razini hipotalamičke ekspresije gena *Htr2c* među istraživanim skupinama. Već je i ranije pokazano da u bazalnim uvjetima, uz CD, nema razlike među sublinijama WZ-5HT u razini ekspresije gena Htr2c (Kesić i sur., 2020.) te se može zaključiti da receptor Htr2c nema bitnu ulogu u molekularnoj podlozi metaboličkih razlika između 5HT-sublinija.

Sumarno, ovi rezultati ukazuju na smanjenu aktivnost oreksigenih (Agrp, Hcrt) i pojačanu aktivnost anoreksigenih (Cart, Lepr) signalnih puteva kod životinja iz L-HFD u odnosu na L-CD skupinu, što u konačnici vodi uočenom smanjenom unosu hrane. Unatoč tome, navedene molekularne promjene u hipotalamusu nisu bile dovoljne da dovedu do smanjenog energetskog unosa kod životinja iz 5HT-niske sublinije na HFD u odnosu na životinje iz 5HT-

visoke sublinije na HFD (obje sublinije na HFD su imale podjednako povišen dnevni energetski unos u odnosu na životinje na CD).

5.2. Tjelesna masa

Životinje iz 5HT-visoke sublinije na početku pokusa imale su značajno višu tjelesnu masu od životinja iz 5HT-niske sublinije. Kod skupina životinja na CD, ta razlika se zadržala kroz čitav period kontrolirane prehrane. Pokazano je da višoj tjelesnoj masi životinja iz H-CD skupine pridonose viša masa gWAT-a, slezene i srca. Uz to, u prijašnjem istraživanju je pokazano da životinje iz 5HT-visoke sublinije imaju višu masu visceralnog i retroperitonealnog masnog tkiva (Kesić i sur., 2020.), duže bedrene kosti i višu dužinu tijela u odnosu na životinje iz 5HT-niske sublinije (Erjavec i sur., 2016.). Suprotno tome, apsolutna i relativna masa BAT-a je bila niža kod životinja iz H-CD skupine u odnosu na životinje iz L-CD skupine, što je jedan od pokazatelja njihove manje termogene aktivnosti BAT-a te je, također, u skladu s dosadašnjim nalazima (Kesić i sur., 2020.).

Nalazi iz literature pokazuju da uz standardnu prehranu, miševi s inaktiviranim genom *Sert* (*Sert* KO) koji, kao i naše životinje iz 5HT-visoke sublinije, imaju povišenu razinu izvanstaničnog 5HT u mozgu i na periferiji, također imaju povišenu tjelesnu masu u odnosu na divlji tip miša i u odnosu na miša koji je heterozigot za gen *Sert* (*Sert* HET) (Murphy i Lesch, 2008.; Üçeyler i sur., 2010.; Veniaminova i sur., 2020.). Međutim, to nije slučaj u miševa kojima je metodama genetičkog inženjerstva inaktivirana (Crane i sur., 2015.; Kwon i sur., 2019.) ili farmakološkim tretmanom inhibirana aktivnost Tph1 (Oh i sur., 2015.; Sumara i sur., 2012.), uz standardu prehranu ne pokazuju promjene u tjelesnoj masi u odnosu na miševe s normalnom sintezom perifernog serotonina.

Na HFD, također su životinje iz 5HT-visoke sublinije veći dio vremena imale višu tjelesnu masu od životinja iz 5HT-niske sublinije. Međutim, pred kraj kontrolirane prehrane ta se razlika izgubila zbog različitog utjecaja HFD na sublinije (Slika 4.3.A). Naime, HFD je značajno povisila tjelesnu masu samo kod životinja iz 5HT-niske sublinije. Iz navedenog bi se moglo zaključiti da je konstitucijski povišena aktivnost 5HT koja je uz standardnu prehranu povisila tjelesnu masu, zaštitila životinje iz 5HT-visoke sublinije od daljnjeg povišenja tjelesne mase prilikom konzumacije hrane bogate mastima, odnosno da je konstitucijski snižena aktivnost 5HT pogodovala povišenju tjelesne mase inducirane prehranom obogaćenom

mastima samo kod životinja iz 5HT-niske sublinije uslijed povišenja dnevnog energetskog unosa.

Watanabe i sur. (2016.) su intraperitonealnim injiciranjem 5HT također pokazali da povišeni periferni 5HT štiti miševe od razvijanja pretilosti izazvane s HFD. Ipak, treba uzeti u obzir da su miševi u njihovom istraživanju bili na HFD koja je sadržavala tek 13,6% masti i to kroz period od 25 tjedana, pri čemu je do povišenja tjelesne mase došlo tek u 12. tjednu kontroliranog hranjenja. Suprotno ovim rezultatima, većina istraživanja provedena na miševima s genetički ili farmakološki blokiranom sintezom perifernog 5HT koji su bili na HFD ukazuje na to da niski periferni 5HT štiti od pretilosti izazvane s HFD (Crane i sur., 2015.; Oh i sur., 2015.; Shong i sur., 2020.; Yabut i sur., 2020.). Iznimno, Sumara i sur. (Sumara i sur., 2012.) izvještavaju da su miševi, kojima je razina perifernog 5HT bila smanjena farmakološki, primjenom Tph1 inhibitora LP533401, na HFD imali jednaku tjelesnu masu kao i kontrolna skupina životinja na HFD kojima je bilo injektirano otapalo. Kod ovakvih animalnih modela treba uzeti u obzir način primjene inhibitora. Dok su Sumara i sur. (2012.) te Oh i sur. (2015.) inhibitor Tph1 aplicirali životinjama oralno, Crane i sur. (2015.) su ga aplicirali intraperitonelno, navodeći uz to da LP533401 ima nisku oralnu bioraspoloživost (Bolsoni-Lopes i Alonso-Vale, 2015.). Ipak, to i dalje ne objašnjava kako su Sumara i sur. (2012.) uz isti način primjene inhibitora (oralno) dobili različite rezultate od Oh i sur. (2015.) koji su uočili porast tjelesne mase kod životinja na HFD koje su imale inhibiranu sintezu perifernog serotonina u odnosu na životinje s normalnom sintezom serotonina. Ono što bi još trebalo uzeti u obzir je postotak masti u prehrani i duljinu trajanja prehrane s HFD. Crane i sur (2015.) izvještavaju kako su u njihovom pokusu životinje bile na HFD s 60% masti 12 tjedana, dok Oh i sur. (2015.) izvještavaju kako su životinje bile na HFD s 45% masti 14 tjedana, međutim Sumara i sur. (2012.) samo navode da su životinje bile na HFD 12 tjedana, bez informacije o postotku masti u prehrani što dodatno otežava usporedbu učinka HFD na tjelesnu masu kod ovog animalnog modela. U ovom istraživanju, životinje su bile na HFD s 45% masti 11 tjedana. Veniaminova i sur. (2020.) su pokazali da divlji tip miša i transgenični Sert miševi (*Sert* KO i *Sert* HET) imaju podjednak prirast tjelesne mase na HFD u odnosu na životinje iz odgovarajuće skupine na CD. Ovakvi nalazi ukazuju na složenu ulogu serotonina u regulaciji energetske ravnoteže.

HFD je, očekivano, imala najveći utjecaj na masu masnog tkiva te su gWAT i BAT na kraju pokusa kontrolirane prehrane imali povišenu i apsolutnu i relativnu masu (u slučaju BAT-a, razlika nije dosegla statističku značajnost) te na masu jetre koja je imala sniženu apsolutnu i relativnu masu kod obiju sublinija životinja. Povećanje mase gWAT-a pod utjecajem HFD je

uobičajeni nalaz, a povećanje mase BAT-a pod utjecajem HFD kod glodavaca je također dosad zabilježeno u literaturi (Lee i sur., 2015.; Seneviratne i sur., 2011.; Shong i sur., 2020.; Zhou i sur., 2020.). U literaturi se mogu pronaći podaci koji ukazuju da HFD snižava masu jetre kod miševa (Crane i sur., 2015.; Watanabe i sur., 2016.). U ovom je istraživanju, prilikom vaganja jetre, primjećeno da su 4 životinje iz H-HFD skupine imale tumorozne tvorbe na jetri. Pojava tumora jetre uslijed prehrane bogate mastima je učestala pojava koja se češće javlja kod mužjaka nego kod ženki glodavaca (Pedersen i sur., 2019.). Obzirom da su navedene promjene primjećene samo kod H-HFD skupine moguće je da povišeni 5HT pogoduje njihovom nastanku.

Podaci o masi organa, dnevnom unosu hrane/energije te o potrošnji energije termogenezom nisu mogli objasniti zašto je HFD značajno povisila tjelesnu masu samo kod životinja iz 5HT-niske sublinije. Prethodna istraživanja su pokazala da, uz CD, životinje iz 5HT-visoke sublinije imaju viši cjelokupni rast (viša tjelesna masa, dužina kostiju, dužina tijela) (Erjavec i sur., 2016.) nego životinje iz 5HT-niske sublinije, što je potvrđeno i u ovom istraživanju te je uz to pokazano da je HFD tijekom perioda kontrolirane prehrane ubrzala cjelokupni rast kod životinja iz 5HT-niske sublinije. Budući da do povišenja tjelesne mase dolazi uslijed neuravnoteženog unosa i potrošnje energije, bilo bi korisno imati precizniji podatak o cjelovitoj potrošnji energije, korištenjem npr. metode indirektne kalorimetrije koja omogućava istodobno mjerenje potrošnje energije, fizičke aktivnosti, unosa hrane i vode. Možda bi takvi precizni podaci uspjeli objasniti zašto je HFD povisila tjelesnu masu samo kod životinja iz 5HT-niske sublinije te smo daljnim istraživanjem fizioloških i molekularnih parametara pokušali saznati razlog toga.

5.3. Serotoninski parametri u mozgu, krvi i bijelom masnom tkivu

U literaturi postoje kontradiktorni podaci o povezanosti razine 5HT u krvi i pretilosti kod ljudi te neka istraživanja ukazuju na njihovu pozitivnu (Young i sur., 2018.), a druga na negativnu korelaciju (Binetti i sur., 2020.; Si i sur., 2021.). Metabolomička analiza seruma štakora je pokazala da HFD, osim što dovodi do razvoja pretilosti, rezultira i povećanom razinom 5HT u krvi (Kim i sur., 2011.), međutim postoje i oprečni rezultati (Kim i sur., 2013.). U ovom istraživanju HFD nije utjecala na razinu 5HT u trombocitima kod niti jedne sublinije životinja, no povećala je aktivnost trombocitnog serotoninskog prijenosnika kod obiju sublinija životinja. Koliko nam je poznato, učinak HFD na aktivnost trombocitnog SERT-a do sada nije

istraživan u glodavaca. Suprotno našim nalazima na trombocitima štakora, Koopman i sur (2013.) su pokazali da visokokalorična prehrana u ljudi smanjuje gustoću proteina SERT u hipotalamusu. U novijem istraživanju iz 2020. (Marazziti i sur.) nije bilo korelacije aktivnosti trombocitnog SERT-a i indeksa tjelesne mase u ljudi. S druge strane, pokazano je da gustoća proteina SERT u mozgu (talamus, pons, putamen, srednji mozak) (Erritzoe i sur., 2010.; Nam i sur., 2018.) i na trombocitima (Giannaccini i sur., 2013.; Marazziti i sur., 2020.) negativno korelira s indeksom tjelesne mase.

Analizirana je razina ekspresije gena *Sert* u hipotalamusu i gWAT-u WZ-5HT štakora. U bazalnim uvjetima, uz CD, razina ekspresije gena *Sert* u hipotalamusu je bila viša kod životinja iz 5HT-visoke sublinije, čime su potvrđeni prijašnji rezultati (Kesić i sur., 2020.), dok u gWAT-u nije bilo razlike među sublinijama na CD. HFD je snizila razinu ekspresije gena *Sert* u hipotalamusu kod životinja iz 5HT-visoke sublinije, ali u gWAT-u nije uočen učinak HFD kod niti jedne sublinije životinja. Dosadašnja istraživanja ukazuju na negativnu korelaciju pretilosti i ekspresije gena *Sert* u masnom tkivu kod ljudi (Lillycrop i sur., 2019.). Ovi nalazi zajednički upućuju na vrlo složen međuodnos energetske ravnoteže i aktivnosti/gustoće Sert-a odnosno njegove ekspresije, koji može biti tkivno specifičan i ovisan o vrsti.

5.4. Lipidni profil

Nije bilo razlike među životinjama iz H-CD i L-CD skupine u koncentraciji ukupnog i HDL kolesterola u krvi. U 2 mjerne točke, kada su uzorci krvi za određivanje triglicerida prikupljeni natašte, životinje iz H-CD skupine su imale višu razinu triglicerida u odnosu na životinje iz L-CD skupine, što nije bio slučaj u 3. mjernoj točki. U 3. mjernoj točki nije bilo razlike u razini triglicerida između životinja iz H-CD i L-CD skupine. Razlog tome je to što su u 3. mjernoj točki uzorci krvi za određivanje triglicerida prikupljeni u uvjetima *ad libitum* pristupa hrani, a prijašnja istraživanja ukazuju na to da koncentracija triglicerida u krvi raste nakon obroka (Triscari i sur., 1980.) te se u ovom slučaju vjerojatno izgubila bazalna razlika.

HFD je povećala razine ukupnog i HDL kolesterola kod obiju sublinija životinja, u skladu s literaturom (v. Tablica 1.). Razina ukupnih triglicerida je bila konzistentno povišena kod 5HT-niskih životinja na HFD, međutim kod 5HT-visoke sublinije su trigliceridi u jednoj mjernoj točki bili niži, a ne viši, kod životinja na HFD u odnosu na CD. Ne možemo objasniti kako je HFD snizila razinu triglicerida kod životinja iz H-HFD skupine.

Kada je riječ o utjecaju HFD na razinu ukupnih triglicerida u krvi, u literaturi se mogu pronaći kontradiktorni podaci. Dok većina radova navodi kako HFD dovodi do povećanja razine triglicerida u krvi (v.Tablica 1.), manji broj navodi da HFD ne utječe na razinu triglicerida u krvi (Eisinger i sur., 2014.; Switskaya i sur., 2007.; Zaman i sur., 2011.), a ima i slučajeva kod kojih je nakon HFD došlo do sniženja koncentracije triglicerida u krvi (Biddinger i sur., 2005.; Guo i sur., 2009.; Zhukova i sur., 2014.). Zhukova i sur. (2014.) su pokazali da je HFD nakon kraće primjene (30 dana) povisila, a nakon duže primjene (90 dana) snizila razinu triglicerida u krvi štakora. Slično kao i u ovom istraživanju (u 2 mjerne točke), Zhukova i sur. (2014.) su određivali koncentraciju triglicerida u uzorcima krvi prikupljenima natašte te je vidljivo da učinak HFD na razinu triglicerida u krvi ovisi o dužini trajanje prehrane, odnosno da s dužim vremenskim periodom konzumiranja HFD dolazi do sniženja razine triglicerida u krvi (u uvjetima kada su životinje natašte), kao i kod naših životinja iz H-HFD skupine u 2. mjernoj točki. Kao razlog za to, navode da prehrana bogata mastima može inhibirati sintezu lipoproteina vrlo niske gustoće (VLDL, engl. very low density lipoprotein) u jetri (Barrows i Parks, 2006.; Parlevliet i sur., 2012.). Budući da VLDL transportira trigliceride iz jetre u druge organe i tkiva, njegova smanjena sinteza može uzrokovati nakupljanje triglicerida u jetri (Zhukova i sur., 2014.).

Istraživanja su pokazala da, u većini slučajeva, prehrana bogata mastima dovodi do povišenja razine ekspresije gena uključenih u razgradnju lipida i do sniženja razine ekspresije gena uključenih u sintezu lipida (Reynés i sur., 2017.) u hipotalamusu, masnom tkivu, jetri i mišićima. U skladu s tim, HFD je povisila razinu ekspresije gena *Atgl* (za 30% u H-HFD i za 21% u L-HFD) te snizila razinu ekpresije gena *Fasn* (za 3.2 puta u H-HFD i za 4.2 puta u L-HFD) u gWAT-u životinja iz obiju sublinija. Atgl je relativno novije otkriveni protein koji, uz hormon-osjetljivu lipazu, ima važnu ulogu u hidrolizi triglicerida u masnom tkivu (Zimmermann i sur., 2004.). Fasn je ključni enzimski kompleks potreban za sintezu masnih kiselina, visoko je eksprimirana u jetri i u masnom tkivu (Wakil, 1989.). No, treba spomenuti da promjena ekspresije ovih gena u gWAT-u nije u potpunosti bila praćena analognim promjenama razine ovih proteina. Konkretno, HFD nije utjecala na koncentraciju proteina Atgl u gWAT-u kod niti jedne sublinije životinja, dok je koncentracija proteina Fasn bila značajno snižena pod utjecajem HFD samo kod životinja iz H-HFD skupine (kod L-HFD skupine se vidi tendencija prema sniženju, ali nije statistički značajna). Treba napomenuti da nije neuobičajena pojava da se razine mRNA i proteina ne podudaraju (Koussounadis i sur., 2015.). HFD je imala znatno slabiji učinak na razine ekspresije razgradnih enzima *Lipe* i *Lpl* u bijelom masnom tkivu. Hormon osjetljiva lipaza (Lipe) je zadužena za hidrolizu triglicerida prvenstveno u masnom

tkivu (Brejchova i sur., 2021.), dok lipoprotein lipaza (Lpl) ima važnu ulogu u hidrolizi triglicerida i izmjeni lipida između lipoproteina u cirkulaciji (Wang i Eckel, 2009.). Adipociti također sintetiziraju i izlučuju Fabp4, protein koji ima ulogu u pohrani i transportu masnih kiselina te lipidnoj signalizaciji. Razina ovog proteina raste pod utjecajem HFD (Wu i sur., 2014.), što je bilo vidljivo i kod naših životinja iz obiju sublinija.

Dosadašnja istraživanja su ukazala na povezanost polimorfizama gena *Htr2a* i pretilosti kod ljudi (Chen i sur., 2013.; Li i sur., 2014.). U ovom istraživanju, razina ekspresije *Htr2a* u gWAT-u je bila viša kod H-CD nego L-CD skupine, a HFD je kod obiju sublinija povisila razinu ekspresije. Nedavno objavljeni rad je pokazao da su miševi s inaktiviranim genom *Htr2a* u masnom tkivu otporni na razvoj pretilosti te da imaju smanjeno nakupljanje lipida u masnom tkivu, ukazujući time na potencijalnu ulogu Htr2a u tretmanu pretilosti (Shong i sur., 2020.). Ovi rezultati upućuju da bi povišena razina ekspresije *Htr2a* kod naših 5HT-visokih životinja mogla biti jedan od uzroka njihovog pretilog fenotipa.

5.5. Termogeneza

U bazalnim uvjetima životinje iz 5HT-niske sublinije su imale višu temperaturu kože u području interskapularnog BAT-a u odnosu na životinje iz 5HT-niske sublinije te višu apsolutnu i relativnu masu BAT-a, što je u skladu s prijašnjim rezultatima (Kesić i sur., 2019.). No, za razliku od prijašnjih rezultata kada je pokazano da životinje iz 5HT-niske sublinije imaju višu razinu ekspresije gena *Ucp1* u smeđem masnom tkivu (Kesić i sur., 2018.), u ovom istraživanju nije bilo razlike među sublinijama u razini ekspresije gena *Ucp1*, što može biti posljedica razlike u životnoj dobi životinja. Ucp1 je protein lokaliziran u unutarnjoj membrani mitohondrija smeđih adipocita te je, kako je već spomenuto, odgovoran za pretvorbu kemijske energije u toplinu. Povišena termogena aktivnost životinja iz 5HT-niske sublinije je jedan od čimbenika koji doprinose nižoj tjelesnoj masi ovih životinja u odnosu na životinje iz 5HT-visoke sublinije.

Već su Rothwell i Stock 1979. godine pokazali da kod štakora koji su na HFD dolazi do povećane metaboličke aktivnosti BAT-a, što je potvrđeno i novijim istraživanjima (Kodo i sur., 2017.). Ovakav odgovor BAT-a na HFD potvrđen je i ovdje, što se vidi u povećanoj temperaturi kože u području interskapularnog BAT-a kod životinja iz obiju sublinija. HFD je kod obiju sublinija životinja povisila razinu ekspresije gena *Ucp1* u smeđem masnom tkivu. Povišena razina ekspresije gena *Ucp1* dovodi do povećanja termogeneze u BAT-u. Jedan od čimbenika

koji prethodi aktivaciji termogeneze u BAT-u je vezanje leptina, kojeg adipociti otpuštaju u krvotok, na leptinske receptore u hipotalamusu, uslijed čega dolazi do aktivacije simpatičkih živaca koji inerviraju BAT (Harlan i sur., 2011.; Rahmouni i Morgan, 2007.). HFD je razinu ekspresije gena *Lep* u bijelom masnom tkivu statistički značajno povisila samo kod životinja iz 5HT-niske sublinije. U krvi je HFD statistički značajno povisila razinu proteina leptina kod obiju sublinija životinja (kod 5HT-visokih za 2,5 puta, a kod 5HT-niskih za 3,9 puta). U skladu s povišenom razinom leptina u masnom tkivu, HFD je u hipotalamusu povisila razinu ekspresije gena *Lepr* (za 8% kod H-HFD i za 13% kod L-HFD), ali to povišenje je doseglo statističku značajnost samo kod životinja iz 5HT-niske sublinije. Istraživanja su pokazala da razina leptina u krvi pozitivno korelira s masom masnog tkiva (Liuzzi i sur., 1999.; Ostlund i sur., 1996.). Povišena razina leptina u krvi, povišena razina ekspresije gena *Lep* u gWAT-u i gena *Lepr* u hipotalamusu zajedno pridonose povećanoj termogenoj aktivnosti BAT-a kod životinja na HFD. Crane i sur (2015.) su životinje divljeg tipa i životinje sa genetički inaktiviranom ili farmakološki inhibiranom sintezom perifernog serotonina podvrgli dijeti bogatoj mastima te su im mjerili unos glukoze u mišiće, srce, jetru i BAT. Pokazali su da su životinje s inaktiviranom i inhibiranom sintezom perifernog serotonina imale viši unos glukoze u BAT (gotovo dvostruko) u odnosu na životinje divljeg tipa. Zaključili su da su životinje oba navedena animalna modela zaštićena od pretilosti izazvane s HFD-om upravo zbog povećanja termogeneze koja je posljedica snižene razine perifernog 5HT. Međutim, u našem istraživanju su životinje iz obiju sublinija imale povišenu termogenu aktivnost BAT-a pod utjecajem HFD, u sličnom opsegu (za 0,7°C kod H-HFD i za 0,6°C kod L-HFD). Kao što je već spomenuto, razlog za povišenu termogenezu kod obiju sublinija je to što je HFD kod obiju sublinija povisila razine gena/proteina leptina i razinu ekspresije gena *Ucp1* u smeđem masnom tkivu.

5.6. Glukozna homeostaza

Glukozna homeostaza se održava s dva bitna faktora: brzinom izlučivanja inzulina iz Langerhansovih otočića gušterače u odgovoru na glukozu u krvi i osjetljivošću ciljnih tkiva na inzulin (Bowe i sur., 2014.). Testovi koji se najčešće izvode za procjenu glukozne homeostaze su test tolerancije glukoze (GTT) i test tolerancije inzulina (ITT).

U bazalnim uvjetima (CD), životinje iz 5HT-visoke sublinije imale su slabiju sposobnost regulacije razine glukoze u krvi (GTT) i višu rezistenciju na inzulin (ITT) od životinja iz 5HT-niske sublinije. Time su potvrđeni rezultati prijašnjeg istraživanja koje je

provedeno na ženkama WZ-5HT štakora (Erjavec i sur., 2016.). Međutim, nije bilo razlike među H-CD i L-CD skupinama u vrijednostima HOMA-IR, koji je još jedan pokazatelj rezistencije na inzulin.

Inzulin i glukagon, hormoni gušterače, tvore bihormonalni sustav regulacije razine glukoze u krvi (Quesada i sur., 2008.). Kod niske koncentracije glukoze u krvi, alfa stanice gušterače luče glukagon koji zatim potiče glikogenolizu i glukoneogenezu u jetri što posljedično dovodi do povećanja koncentracije glukoze u krvi, dok kod visoke koncentracije glukoze u krvi, beta stanice gušterače luče inzulin koji inhibira oslobađanje glukoze iz jetre i potiče unos glukoze u tkiva koja su osjetljiva na inzulin. Upravo zbog uloge koju ova dva hormona imaju u regulaciji razine glukoze u krvi, uz to što je izmjerena bazalna razina glukoze u krvi, izmjerena je i koncentracija ovih hormona. Nije bilo statistički značajne razlike u natašte vrijednostima glukoze u krvi između životinja iz H-CD i L-CD skupine, iako je u 5. tjednu koncentracija glukoze u krvi bila indikativno viša kod životinja iz H-CD skupine (razlika nije dosegla statističku značajnosti). Prijašnja istraživanja su pokazala da u bazalnim uvjetima životinje iz 5HT-visoke sublinije imaju veću razinu glukoze u krvi u odnosu na životinje iz 5HT-niske sublinije (Erjavec i sur,. 2016., Kesić i sur., 2021.). Moguće je da se naši rezultati razlikuju zbog razlike u životnoj dobi životinja. Nije bilo razlike u koncentraciji inzulina u plazmi između životinja iz H-CD i L-CD skupine. Erjavec i sur. (2016.) su pokazali da ženke WZ-5HT štakora iz 5HT-visoke sublinije imaju višu razinu inzulina u krvi u odnosu na životinje iz 5HT-niske sublinije, dok su Kesić i sur. (2021., članak u pripremi) pokazali da nema razlike u razini inzulina u krvi među sublinijama mužjaka WZ-5HT štakora, kao i u ovom istraživanju. Nadalje, koncentracija glukagona je bila viša u plazmi životinja iz L-CD skupine. Ovakav nalaz je u skladu s nalazima iz literature koji ukazuju na to da 5HT proizveden lokalno, u β-stanicama gušterače, inhibira izlučivanje glukagona iz α-stanica gušterače (Almaça i sur., 2016.).

Slično našim rezultatima, Sumara i sur. (2012.) su pokazali da miševi s farmakološki inhibiranom sintezom perifernog 5HT te miševi kojima je gen *Tph1* selektivno inaktiviran u crijevima, na CD, imaju bolju sposobnost regulacije razine glukoze u krvi i veću osjetljivost na inzulin od kontrolne skupine miševa na CD. No, podaci u literaturi nisu jednoznačni. Suprotno tome, Paulmann i sur. (2009.) su pokazali da Tph1 KO miševi na CD imaju slabiju sposobnost regulacije razine glukoze u krvi i da su rezistentniji na inzulin od miševa divljeg tipa, dok su Crane i sur. (2015.) pokazali da Tph1 KO miševi na CD imaju jednaku toleranciju glukoze i osjetljivost na inzulin kao i divlji tip miša. Nadalje, Oh i sur. (2015.) su pokazali da miševi s farmakološki inhibiranom sintezom perifernog 5HT na CD imaju normalnu toleranciju glukoze i osjetljivost na inzulin.

Irs1 i Irs2 (Irs, engl.*insulin receptor substrate*) su dio obitelji proteina koji služe kao supstrat za inzulinski receptor. Smješteni su u citoplazmi te prenose inzulinski signal kako bi potaknuli stanični odgovor (Shaw, 2011.). Razina ekspresije gena *Irs2*, za kojeg je pokazano da ima višu razinu ekspresije u pretilih ljudi (Rametta i sur., 2013.), je bila viša u gWAT-u životinja iz H-CD skupine nego kod L-CD skupine, dok u hipotalmusu nije bilo razlike u razini ekspresije između ovih skupina. Nije bilo razlika u razini ekspresije gena *Irs1* u hipotalamusu i gWAT-u između životinja iz H-CD i L-CD skupine. Inzulin utječe na brojne fiziološke procese vezanjem na inzulinski receptor (Insr), koji je najviše eksprimiran u masnom tkivu, skeletalnim mišićima i jetri (De Meyts, 2000.). Nije bilo razlike među životinjama iz H-CD i L-CD skupine u razini ekspresije gena *Insr* u hipotalamusu, kao ni u gWAT-u. Važnu ulogu u glukoznom metabolizmu imaju i glukozni transporteri. Glukozni transporteri su, na temelju sličnosti u sekvenci gena kojim su kodirani, podijeljeni u 3 klase. Glut1, Glut3 i Glut4 su dio klase 1 te su do sada najbolje okarakterizirani. Sadrže 12 transmembranskih domena te imaju ulogu u transportu monosaharida i drugih malih ugljikovih spojeva u stanicu (Mueckler i Thorens, 2013.). *Glut4* je, osim u adipocitima, eksprimiran i u mišićnim stanicama te je kao i glukozni transporter Glut1 reguliran inzulinom – inzulin potiče njihovu translokaciju iz unutarstaničnih vezikula na plazmatsku membranu. *Glut3* ima najvišu razinu ekspresije u dendritima neurona (Koepsell, 2020.). Nije bilo razlike u razini ekspresije gena *Glut3* u hipotalamusu te gena *Glut1* i *Glut4* u gWAT-u između životinja iz H-CD i L-CD skupine.

HFD je značajno smanjila sposobnost životinja iz 5HT-niske sublinije da reguliraju razinu glukoze u krvi i povećala im rezistenciju na inzulin. Dodatni pokazatelji narušene glukozne homeostaze životinja iz L-HFD skupine su povišena razina inzulina u krvi i povišene vrijednosti HOMA-IR. S druge strane, razina glukagona u krvi bila je niža kod L-HFD nego kod L-CD skupine životinja. Iako većina istraživanja ukazuje na to da je hiperglukagonemija jedan od obilježja pretilosti izazvane s HFD (Ahrén i sur., 1997.; Stern i sur., 2019.), postoje i istraživanja kod kojih HFD nije utjecala na razinu glukagona u krvi (Mu i sur., 2011.; Winzell i sur., 2007.) i kod kojih je HFD snizila razinu glukagona u krvi (Conarello i sur., 2007.; Merino i sur., 2015.). Također, bitno je naglasiti da novija istraživanja ukazuju na veću važnost inzulina nego glukagona u poremećaju glukozne homeostaze (Honzawa i sur., 2019.). Bazalne vrijednosti glukoze u krvi su bile povišene pod utjecajem HFD kod životinja iz obiju sublinija u 5. tjednu kontroliranog hranjenja, dok je u 10. tjednu povišenje bilo statistički značajno samo kod životinja iz 5HT-niske sublinije. Iz ovih rezultata može se zaključiti da je HFD dovela do jačeg poremećaja glukozne homeostaze kod životinja iz 5HT-niske sublinije. Watanabe i sur. (2016.) su intraperitonealnim injiciranjem 5HT mišu pokazali da povišena razina perifernog

5HT kod životinja na HFD povećava sposobnost regulacije glukoze u krvi i osjetljivost na inzulin. Ipak, većina radova navodi suprotno. Kada su na HFD, životinje sa sistemski inaktiviranim genom *Tph1* (Crane i sur., 2015.) kao i sa selektivno inaktiviranim genom *Tph1* u mastocitima (Yabut i sur., 2020.) ili u crijevima (Sumara i sur., 2012.) te životinje kojima je farmakološki inhibirana aktivnost Tph1 (Crane i sur., 2015.; Sumara i sur., 2012.) imaju nižu bazalnu razinu glukoze, veću sposobnost regulacije razine glukoze u krvi i veću osjetljivost na inzulin. Kod miševa kojima je inaktiviran gen *Sert* (*Sert* -/-), HFD je umanjila sposobnost regulacije razine glukoze u krvi, dok kod miševa heterozigota za Sert (*Sert* +/-), koji slično kao i naše životinje iz 5HT-visoke sublinije, imaju povišenu razinu 5HT u krvi, HFD nije imala učinka na glukoznu homeostazu (Veniaminova i sur., 2020.). U navedenom istraživanju transgenični Sert +/- miševi su se pokazali otpornima na štetne učinke HFD, kao i naše životinje iz 5HT-visoke sublinije.

Od članova proteina koji pripadaju obitelji supstrata za receptor inzulina (Irs), Irs2 ima najvišu razinu ekspresije u hipotalamusu i uključen je u reguliranje inzulinske signalizacije u mozgu (Niswender i sur., 2003.). HFD je kod obiju sublinija životinja povisila hipotalamičku razinu ekspresije gena *Irs2* što je u skladu s nalazima iz literature (Ríos-Lugo i sur., 2015.). Istraživanja pokazuju da se u bijelom masnom tkivu razina ekspresije gena *Irs2* smanjuje pod utjecajem HFD (Gámez-Ruiz i sur., 2011.), što je u ovom istraživanju što je u ovom istraživanju bilo indikativno ($p=0.068$) samo kod životinja iz 5HT-niske sublinije. Razina ekspresije gena *Insr* se povisila pod utjecajem HFD samo kod životinja iz 5HT-visoke sublinije. Povišena razina ekspresije gena *Insr* u gWAT-u životinja iz H-HFD skupine može biti jedan od pokazatelja prilagodbe 5HT-visokih životinja na HFD. Naime, povišena razina Insr povećava osjetljivost na inzulin što može objasniti činjenicu da su životinje iz H-HFD skupine, unatoč nepovoljnoj prehrani, imale sličan odgovor na GTT i ITT kao životinje iz H-CD skupine.

Razina ekspresije gena *Glut4* u gWAT-u je bila snižena kod obiju skupina životinja na HFD. Već je i prije pokazano da HFD snižava razine ekspresije gena *Glut4* (Ikemoto i sur., 1995.; Kahn, 2019.; Leguisamo i sur., 2012.; Sevilla i sur., 1997.). Zanimljivo, transgenični miševi s umjereno povišenom ekspresijom gena *Glut4* su donekle zaštićeni od štetnih učinaka HFD - u odnosu na divlji tip miša na HFD ne razvijaju inzulinsku rezistenciju (Atkinson i sur., 2013.). HFD je snizila razine ekspresije gena *Glut1* u gWAT-u, samo kod životinja iz 5HT-visoke sublinije. Glut1 ima sniženu razinu ekspresije kod pretilih ljudi (Schüler i sur., 2018.). HFD nije utjecala na razinu ekspresije gena *Irs1* u gWAT-u ni u hipotalamusu te niti na razinu ekspresije gena *Glut3* u hipotalmusu kod ni jedne sublinije.

5.7. Razine mRNA za odabrane adipokine

Adiponektin, hormon kojeg luče adipociti, povećava osjetljivost na inzulin kod perifernih organa kao što su jetra i mišići (Hotta i sur., 2001.; Yamauchi i sur., 2001., 2002.). Životinje iz 5HT-visoke sublinije, koje u bazalnim uvjetima pokazuju pretili fenotip, imaju višu razinu ekspresije gena *Adipoq* u gWAT-u i višu razinu proteina adiponektina u krvi nego životinje iz 5HT-niske sublinije. Ovaj nalaz nije u skladu s većinom radova koji navode da je pretilost praćena sniženom razinom adiponektina u krvi (Arita i sur., 1999.; Hotta i sur., 2001.; Yang i sur., 2001.), iako ima i radova koji ukazuju da ne postoji korelacija pretilosti s razinom adiponektina u plazmi kod ljudi (Kuo i Halpern, 2011.). Viša bazalna razina adiponektina kod 5HT-visokih životnja mogla bi objasniti njihovu veću otporost na metabolički nepovoljne učinke HFD-a. Također, HFD je indikativno ($p=0.080$) povisila razine proteina adiponektina u krvi samo kod životinja iz 5HT-visoke sublinije,. Bullen i sur (2007.) su pokazali da HFD dovodi do povišenja razine adiponektina u krvi miša. Budući da adiponektin sudjeluje u regulaciji glukozne homeostaze povećavajući osjetljivost na inzulin, ovo može biti jedan od čimbenika koji su doprinijeli prilagodbi životinja iz 5HT-visoke sublinije na HFD, pridonoseći zadržavanju sposobnosti životinja iz ove skupine da reguliraju razinu glukoze u krvi i osjetljivosti na inzulin.

Razina ekspresije gena *Retn*, adipokina koji inhibira unos glukoze u tkiva i narušava osjetljivost na inzulin (Acquarone i sur., 2019.), se snizila pod utjecajem HFD kod životinja iz obiju sublinija. Iako većina radova ukazuje na pozitivnu korelaciju pretilosti i inzulinske rezistencije s razinom rezistina (Su i sur., 2019.), postoji i istraživanje koje ukazuje na negativnu korelaciju (Lay i sur., 2001.).

Među molekulama koje su nedavno prepoznate kao regulatori adipogeneze i energetske ravnoteže je također i nekoliko fibroblastnih faktora rasta (Fgf10, Fgf19, Fgf21) koji su predloženi kao kandidati za terapiju pretilosti (Kyrou i sur., 2017.; Ohta i Itoh, 2014.). Stoga je analizirana razina ekspresije gena *Fgf10* i *Fgf21* u gWAT-u. U bazalnim uvjetima, uz CD, razina ekspresije gena *Fgf10* je bila viša, dok je razina ekspresije gena *Fgf21* bila niža kod životinja iz 5HT-visoke sublinije u odnosu na životinje iz 5HT-niske sublinije. HFD je povisila razine ekspresije gena *Fgf10* kod životinja iz obiju sublinija. Nasuprot tome, razina ekspresije gena *Fgf21* se pod utjecajem HFD povisila samo kod životinja iz 5HT-niske sublinije, koje su imale nepovoljniji metabolički odgovor na HFD i razvile pretilost. Ovakav nalaz u skladu je s

dosadašnjim radovima koji ukazuju da je razina proteina Fgf21 povišena u krvi i masnom tkivu pretilih ljudi i miševa (Geng i sur., 2019.; Zhang i sur., 2008.).

Analiza razine ekspresije gena za transkripcijske faktore, *Cebpd*, koji regulira rane korake adipogeneze (Hishida i sur., 2009.) i *Cebpa*, koji regulira kasne korake adipogeneze (Ambele i sur., 2016.) te gena *Wnt10b*, koji inhibira adipogenezu (Cawthorn i sur., 2012.) pokazala je da nije bilo utjecaja HFD na razinu ekspresije ovih gena u gWAT-u.

5.8. Ograničenja i buduća istraživanja

Većina odabranih gena analizirana je samo na razini mRNA u hipotalmusu, smeđem i bijelom masnom tkivu, dok je za samo dva gena u gWAT-u analizirana i razina odgovarajućeg proteina (Atgl, Fasn), što je najveći nedostatak ovog istraživanja, budući da razina mRNA i razina proteina nisu uvijek u korelaciji.

Nedostatak istraživanja je također i to što su korišteni homogenati masnog tkiva umjesto izoliranih adipocita. Bijelo masno tkivo uz adipocite sadrži i druge stanice kao što su limfociti, makrofagi, fibroblasti, endotelne stanice, itd., što bi moglo kod nekih gena/proteina utjecati na konačni rezultat mjerenja.

Uz to razina ekspresije gena je mjerena u homogenatu hipotalamusa a ne u izoliranim jezgrama hipotalamusa što bi možda moglo bolje objasniti razlike u učinku visokokalorične prehrane na 5HT-sublinije.

U budućim istraživanjima, bilo bi zanimljivo usporediti utjecaj visokokalorične prehrane na funkcionalne i molekularne parametre kod mužjaka i ženki iz 5HT-sublinija, budući da je poznato da spol utječe na aktivnost serotonergičnog sustava (Goel i Bale, 2010.; Songtachalert i sur., 2018.; Zha i sur., 2017.). Uz to, bilo bi zanimljivo istražiti i učinak visokokalorične prehrane na životinje starije životne dobi, budući da starenjem dolazi do promjena u glukoznoj homeostazi (Boemi i sur., 2016.), serotonergičnoj regulaciji i ekspresiji gena serotonergičnog sustava (Herrera-Pérez i sur., 2013.; Rodríguez i sur., 2012.). Također, bilo bi korisno ispitati učinak nepovoljne prehrane na metaboličke parametre jetre, kao što su razina triglicerida i kolesterola, razinu ekspresije gena i razinu proteina uključenih u regulaciju energetske homeostaze u jetri. Budući da su rezultati ovog istraživanja ukazali kako visokokalorična prehrana dovodi do poremećaja u glukoznoj homeostazi koji je veći kod životinja s konstitucijski sniženom aktivnosti serotoninskog sustava, bilo bi korisno istražiti i razinu ekspresije gena i razinu proteina uključenih u glukozni metabolizam u gušterači.

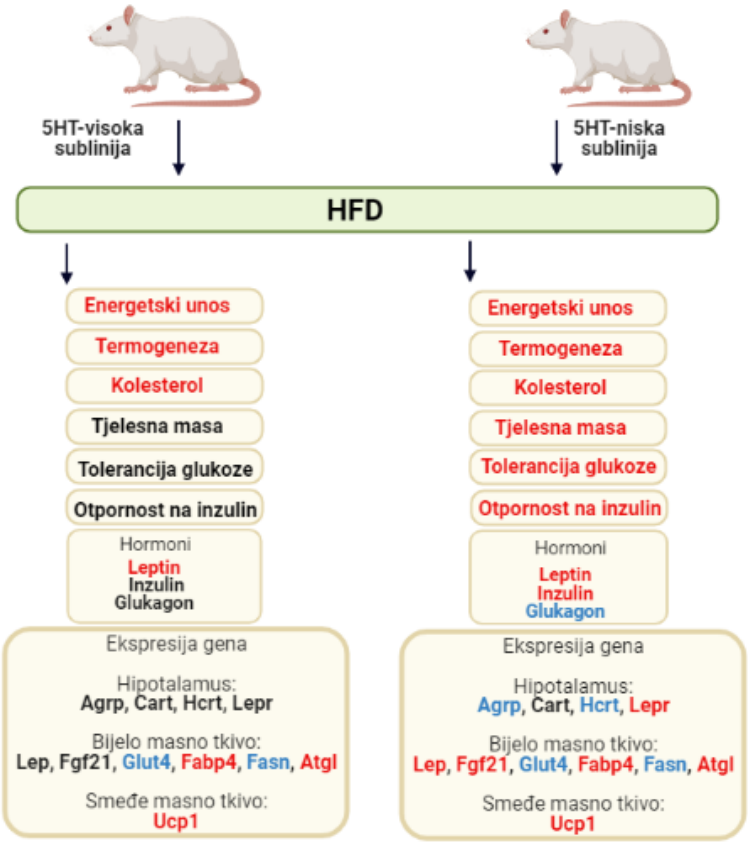
U budućim istraživanjima bilo bi dobro ispitati i učinak druge vrste nepovoljne prehrane, kao što je prehrana bogata ugljikohidratima, ali i prehrane bogate mastima koja sadrži veliki udio zasićenih masnih kiselina, budući da je pokazano da takva prehrana dovodi do većeg nakupljanja masti u organizmu i do povišenja upalnih citokina, oponašajući time bolje patofiziologiju pretilosti u ljudi (de Moura e Dias i sur., 2021.) .

Za kraj, možemo spomenuti da je na ženkama WZ-5HT štakora napravljen prelimiran pokus u kojem je ispitan učinak HFD na neke funkcionalne i molekularne parametre. Ženke su bile starosti 22 tjedna, hranjene su 8 tjedana hranom bogatom mastima, a rezultati su pokazali da i kod ženki konstitucijski snižena razina 5HT pogoduje jačem povišenju tjelesne mase tijekom takve prehrane.

6. ZAKLJUČCI

Ovim istraživanjem željelo se doprinijeti boljem razumijevanju regulatorne uloge neurotransmitera i hormona serotonina (5HT) u održavanju energetske ravnoteže organizma. U tu svrhu korišten je animalni model Wistar-Zagreb 5HT štakor. Model se sastoji od dviju sublinija životinja s konstitucijski povišenom (5HT-visoka sublinija) odnosno sniženom (5HT-niska sublinija) aktivnošću serotonina u središnjem i perifernom odjeljku. Životinje iz obiju sublinja izložene su visokokaloričnoj prehrani (prehrani bogatoj mastima, HFD) te je uspoređen njihov funkcionalni i molekularni odgovor na takav metabolički izazov.

HFD je kod životinja iz obiju sublinija povisila dnevni energijski unos, koncentraciju kolesterola u krvi, ukupnu masu bijelog masnog tkiva te termogenu aktivnost smeđeg masnog tkiva. Nasuprot tome, HFD je samo kod životinja iz 5HT-niske sublinije značajno povisila prirast tjelesne mase. Također, do značajnog poremećaja sposobnosti regulacije glukoze u krvi i povećane otpornosti na inzulin, praćene povišenom razinom inzulina u krvi, došlo je pod utjecajem HFD samo kod životinja iz 5HT-niske sublinije. Na molekularnoj razini, HFD je kod obiju sublinija imala sličan učinak na ekspresiju pojedinih gena u bijelom i smeđem masnome tkivu, primjerice, povisila je ekspresiju gena za proteine uključene u transport masnih kiselina (Fabp4), razgradnju triglicerida (Atgl) i pretvorbu kemijske energije u toplinsku (Ucp1), a snizila ekspresiju gena za proteine uključene u biosintezu masnih kiselina (Fasn) i membranski prijenos glukoze (Glut4). Međutim, ekspresija anoreksigenih signalnih peptida (Lep, Fgf21) u bijelom masnom tkivu povisila se pod utjecajem HFD samo kod životinja iz 5HT-niske sublinije. Slično, HFD je samo kod 5HT-niskih životinja povisila hipotalamičku ekspresiju proteina uključenih u anoreksigene signalne puteve (Cart, Lepr) i snizila ekspresiju proteina uključenih u oreksigene signalne puteve (Agrp, Hcrt). Koncentracija leptina u krvi porasla je pod utjecajem HFD kod obiju sublinija, ali porast je bio veći kod 5HT-niske sublinje. Neočekivano, koncentracija adiponektina u krvi bila je i u uvjetima standardne i visokokalorične prehrane viša kod životinja iz 5HT-visoke nego 5HT-niske sublinije, što bi moglo objasniti njihovu veću otpornost na negativne učinke HFD-a. Kod obiju sublinija HFD je blago, ali značajno povisila brzinu unosa serotonina u trombocite. Najvažniji rezultati su prikazani na Slici 6.1.



Slika 6.1. Shematski prikaz najvažnijih rezultata. Crna boja – nema promjene, Crvena boja – povišenje, plava boja – sniženje. Shema je izrađena u programu BioRender.

Iz navedenih rezultata može se zaključiti da je HFD prehrana izazvala različite funkcionalne i molekularne promjene kod životinja iz obiju sublinija, ali da je imala značajno jači učinak na metaboličku ravnotežu životinja iz 5HT-niske sublinije, naročito u aspektu poremećaja glukozne homeostaze i prirasta tjelesne mase. Adaptabilne promjene u ekspresiji gena uključenih u oreksigene i anoreksigene signalne puteve, koje su bile prisutne samo kod životinja iz 5HT-niske sublinije, nisu bile dovoljne da snize energijski unos i održe metaboličku homeostazu. Povišena razina proteina adiponektina u krvi životinja iz 5HT-visoke sublinije ukazuje na moguću molekularnu podlogu otpornosti 5HT-visokih životinja na HFD.

Zaključno, ovim istraživanjem potvrđeni su prethodni nalazi da je konstitucijski povišena aktivnost serotonina u uvjetima standardne prehrane povezana s pretilošću. Nasuprot tome, konstitucijski snižena aktivnost serotonina povezana je s jačim poremećajem metaboličke homeostaze u uvjetima visokokalorične prehrane. Zajednički, rezultati upućuju na različitu ulogu serotoninske homeostaze u različitim uvjetima prehrane. WZ-5HT štakor ovim je rezultatima potvrđen kao vrijedan animalni model u istraživanju uloge serotonina u razvoju metaboličkih poremećaja kao što su pretilost i dijabetes.

7. POPIS LITERATURE

Abelson P, Kennedy D (2004) The obesity epidemic. Science 304: 1413.

Abumaria N, Ribic A, Anacker C, Fuchs E, Flügge G (2008) Stress upregulates Tph1 but not Tph2 mRNA in the rat dorsal raphe nucleus: identification of two Tph2 mRNA splice variants. Cell Mol Neurobiol 28: 331–342.

Abumaria N, Rygula R, Havemann-Reinecke U, Rüther E, Bodemer W, Roos C, i sur. (2006) Identification of genes regulated by chronic social stress in the rat dorsal raphe nucleus. Cell Mol Neurobiol 26: 145–162.

Acquarone E, Monacelli F, Borghi R, Nencioni A, Odetti P (2019) Resistin: a reappraisal. Mech Ageing Dev 178: 46–63.

Adamo KB, Ferraro ZM, Brett KE (2012) Can we modify the intrauterine environment to halt the intergenerational cycle of obesity? Int J Environ Res Public Health 9: 1263–1307.

Ahrén B, Simonsson E, Scheurink AJW, Mulder H, Myrsén U, Sundler F (1997) Dissociated insulinotropic sensitivity to glucose and carbachol in high- fat diet-induced insulin resistance in C57BL/6J mice. Metabolism 46: 97–106.

Al-Goblan AS, Al-Alfi MA, Khan MZ (2014) Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther 7: 587–591.

Alenina N, Kikic D, Todiras M, Mosienko V, Qadri F, Plehm R, i sur. (2009) Growth retardation and altered autonomic control in mice lacking brain serotonin. Proc Natl Acad Sci USA 106: 10332–10337.

Allison DB, Faith MS, Nathan JS (1996) Risch's lambda values for human obesity. Int J Obes 20: 990–999.

Almaça J, Molina J, Menegaz D, Pronin AN, Tamayo A, Slepak V, i sur. (2016) Human beta cells produce and release serotonin to inhibit glucagon secretion from alpha cells. Cell Rep 17: 3281–3291.

Almon RR, DuBois DC, Sukumaran S, Wang X, Xue B, Nie J, i sur. (2012) Effects of high fat feeding on liver gene expression in diabetic goto-Kakizaki rats. Gene Regul Syst Bio 6: 151–168.

Ambele MA, Dessels C, Durandt C, Pepper MS (2016) Genome-wide analysis of gene expression during adipogenesis in human adipose-derived stromal cells reveals novel patterns of gene expression during adipocyte differentiation. Stem Cell Res 16: 725–734.

Anai M, Ono H, Funaki M, Fukushima Y, Inukai K, Ogihara T, i sur. (1998) Different subcellular distribution and regulation of expression of insulin receptor substrate (Irs)-3 from those of Irs-1 and Irs-2. J Biol Chem 273: 29686–29692.

Archer ZA, Rayner DV, Mercer JG (2004) Hypothalamic gene expression is altered in underweight but obese juvenile male sprague-dawley rats fed a high-energy diet. J Nutr 134: 1369–1374.

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa JI, i sur. (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. Biochem Biophys Res Commun 257: 79–83.

Arreola R, Becerril-Villanueva E, Cruz-Fuentes C, Velasco-Velázquez MA, Garces-Alvarez ME, Hurtado-Alvarado G, i sur. (2015) Immunomodulatory effects mediated by serotonin. J Immunol Res 2015: 354957.

Aslani S, Vieira N, Marques F, Costa PS, Sousa N, Palha JA (2015) The effect of high-fat diet on rat's mood, feeding behavior and response to stress. Transl Psychiatry 5: e684.

Atkinson BJ, Griesel BA, King CD, Josey MA, Olson AL (2013) Moderate Glut4 overexpression improves insulin sensitivity and fasting triglyceridemia in high-fat diet-fed transgenic mice. Diabetes 62: 2249–2258.

Bach AW, Lan NC, Johnson DL, Abell CW, Bembenek ME, Kwan SW, i sur. (1988) cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. Proc Natl Acad Sci USA 85: 4934–4938.

Bader M (2019) Serotonylation: Serotonin Signaling and Epigenetics. Front Mol Neurosci 12: 288.

Balkovetz DF, Tiruppathi C, Leibach FH, Mahesh VB, Ganapathy V (1989) Evidence for an imipramine-sensitive serotonin transporter in human placental brush-border membranes. J Biol Chem 264: 2195–8.

Baudry A, Pietri M, Launay JM, Kellermann O, Schneider B (2019) Multifaceted regulations of the serotonin transporter: impact on antidepressant response. Front Neurosci 13: 91.

Bendre M, Comasco E, Nylander I, Nilsson KW (2015) Effect of voluntary alcohol consumption on Maoa expression in the mesocorticolimbic brain of adult male rats previously exposed to prolonged maternal separation. Transl Psychiatry 5: e690.

Bengtsson MW, Mäkelä K, Herzig KH, Flemström G (2009) Short food deprivation inhibits orexin receptor 1 expression and orexin-A induced intracellular calcium signaling in acutely isolated duodenal enterocytes. Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol 296: G651-8.

Bentham J, Cesare M Di, Bilano V, Bixby H, Zhou B, Stevens GA, i sur. (2017) Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. Lancet 390: 2627–2642.

Biddinger SB, Almind K, Miyazaki M, Kokkotou E, Ntambi JM, Kahn CR (2005) Effects of

diet and genetic background on sterol regulatory element-binding protein-1c, stearoyl-CoA desaturase 1, and the development of the metabolic syndrome. Diabetes 54: 1314–1323.

Binetti J, Bertran L, Riesco D, Aguilar C, Martínez S, Sabench F, i sur. (2020) Deregulated serotonin pathway in women with morbid obesity and NAFLD. Life 10: 1–17.

Boemi M, Furlan G, Luconi MP (2016) glucose metabolism, insulin, and aging: role of nutrition. Mol Basis Nutr Aging A Vol Mol Nutr Ser 29: 393–409

Bolsoni-Lopes A, Alonso-Vale MI (2015) Lipolysis and lipases in white adipose tissue – An update. Arch Endocrinol Metab 59: 335–342.

Botchlett R, Wu C (2018) Diet composition for the management of obesity and obesity-related disorders. J Diabetes Mellit Metab Syndr 3: 10–25.

Bowe JE, Franklin ZJ, Hauge-Evans AC, King AJ, Persaud SJ, Jones PM (2014) Assessing glucose homeostasis in rodent models. J Endocrinol 222: G13–25.

Bowman MA, Daws LC (2019) Targeting serotonin transporters in the treatment of juvenile and adolescent depression. Front Neurosci 13: 156.

Bradffor MM(1976) A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantitites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Brand T, Anderson GM (2011) The measurement of platelet-poor plasma serotonin: A systematic review of prior reports and recommendations for improved analysis. Clin Chem 57: 1376–1386.

Breisch ST, Zemlan FP, Hoebel BG (1976) Hyperphagia and obesity following serotonin depletion by intraventricular p-chlorophenylalanine. Science 192: 382–385.

Brejchova K, Radner FPW, Balas L, Paluchova V, Cajka T, Chodounska H, i sur. (2021) Distinct roles of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase in the catabolism of triacylglycerol estolides. Proc Natl Acad Sci USA 118:e2020999118.

Brust P, Friedrich A, Krizbai IA, Bergmann R, Roux F, Ganapathy V, i sur. (2000) Functional expression of the serotonin transporter in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. J Neurochem 74: 1241–1248.

Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J, i sur. (2006) Defining high-fat-diet rat models: Metabolic and molecular effects of different fat types. J Mol Endocrinol 36: 485–501.

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

Bullen JW, Bluher S, Kelesidis T, Mantzoros CS (2007) Regulation of adiponectin and its receptors in response to development of diet-induced obesity in mice. Am J Physiol Endocrinol Metab 292: 1079–1086.

Butler MG (1990) Prader-Willi syndrome: Current understanding of cause and diagnosis. Am J Med Genet 35: 319–332.

Castro AM, Macedo-de la Concha LE, Pantoja-Meléndez CA (2017) Low-grade inflammation and its relation to obesity and chronic degenerative diseases. Rev Médica del Hosp Gen México 80: 101–105.

Cataldo Bascuñan LR, Lyons C, Bennet H, Artner I, Fex M (2019) Serotonergic regulation of insulin secretion. Acta Physiol 225: e13101.

Cawthorn WP, Bree AJ, Yao Y, Du B, Hemati N, Martinez-Santibañez G, i sur. (2012) Wnt6, Wnt10a and Wnt10b inhibit adipogenesis and stimulate osteoblastogenesis through a β-catenin-dependent mechanism. Bone 50: 477–489.

Cerpa V, Gonzalez A, Richerson GB (2014) Diphtheria toxin treatment of PET-1-Cre floxed diphtheria toxin receptor mice disrupts thermoregulation without affecting respiratory chemoreception. Neuroscience 279: 65–76.

Chabbi-Achengli Y, Coudert AE, Callebert J, Geoffroy V, Côté F, Collet C, i sur. (2012) Decreased osteoclastogenesis in serotonin-deficient mice. Proc Natl Acad Sci USA 109: 2567–2572.

Chen C, Chen W, Chen C, Moyzis R, He Q, Lei X, i sur. (2013) Genetic variations in the serotoninergic system contribute to body-mass index in chinese adolescents. PLoS One 8: e58717.

Chen ML, Chen CH (2007) Chronic antipsychotics treatment regulates Maoa, Maob and Comt gene expression in rat frontal cortex. J Psychiatr Res 41: 57–62.

Chen WP, Ho BY, Lee CL, Lee CH, Pan TM (2008) Red mold rice prevents the development of obesity, dyslipidemia and hyperinsulinemia induced by high-fat diet. Int J Obes 32: 1694–1704.

Choi Y, Jang S, Choi MS, Ryoo ZY, Park T (2016) Increased expression of Fgf1-mediated signaling molecules in adipose tissue of obese mice. J Physiol Biochem 72: 157–167.

Choquet H, Meyre D (2012) Molecular Basis of Obesity: Current Status and Future Prospects. Curr Genomics 12: 154–168.

Chottová Dvoráková M, Wiegand S, Pesta M, Slavíková J, Grau V, Reischig J, i sur. (2008) Expression of neuropeptide Y and its receptors Y1 and Y2 in the rat heart and its supplying autonomic and spinal sensory ganglia in experimentally induced diabetes. Neuroscience 151: 1016–1028.

Čičin-Šain L, Fröbe A, Jernej B (1998) Physiological characteristics of serotonin transporters on rat platelets. Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol 120: 723–729.

Čičin-Šain L, Froebe A, Bordukalo-Niksic T, Jernej B (2005) Serotonin transporter kinetics in rats selected for extreme values of platelet serotonin level. Life Sci 77: 452–461.

Čičin-Šain L, Jernej B (2010) Wistar-Zagreb 5HT rats: a rodent model with constitutional upregulation/downregulation of serotonin transporter. U: Kalueff A, LaPorte J (ur.) Experimental Models of Serotonin Transporter Research. Cambridge University Press 214–44.

Čičin-Šain L, Orešković D, Perović S, Jernej B, Iskrić S (1990) Determination of serotonin in peripheral rat tissues by ion-exchange chromatography-fluorometry. Validation by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. Biogenic Amines 7: 641–50.

Cifani C, Micioni Di Bonaventura M V., Pucci M, Giusepponi ME, Romano A, Francesco A Di, i sur. (2015) Regulation of hypothalamic neuropeptides gene expression in diet induced obesity resistant rats: possible targets for obesity prediction? Front Neurosci 9: 1–9.

Coelho WS, Costa KC, Sola-Penna M (2007) Serotonin stimulates mouse skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase through tyrosine-phosphorylation of the enzyme altering its intracellular localization. Mol Genet Metab 92: 364–370.

Colman E, Golden J, Roberts M, Egan A, Weaver J, Rosebraugh C (2012) The FDA's assessment of two drugs for chronic weight management. N Engl J Med 367: 1577–1579.

Conarello SL, Jiang G, Mu J, Li Z, Woods J, Zycband E, i sur. (2007) Glucagon receptor knockout mice are resistant to diet-induced obesity and streptozotocin-mediated beta cell loss and hyperglycaemia. Diabetologia 50: 142–150.

Crane JD, Palanivel R, Mottillo EP, Bujak AL, Wang H, Ford RJ, i sur. (2015) Inhibiting peripheral serotonin synthesis reduces obesity and metabolic dysfunction by promoting brown adipose tissue thermogenesis. Nat Med 21: 166–172.

Dam RM, Seidell JC (2007) Carbohydrate intake and obesity. Eur J Clin Nutr. 61: S75-99.

Daubert EA, Condron BG (2010) Serotonin: A regulator of neuronal morphology and circuitry. Trends Neurosci 33: 424–434.

Davies PA (2011) Allosteric modulation of the 5-HT3 receptor. Curr Opin Pharmacol 11: 75–80.

Davis CD (2016) The gut microbiome and its role in obesity. Nutr Today 51: 167–174.

Degawa-Yamauchi M, Bovenkerk JE, Juliar BE, Watson W, Kerr K, Jones R, i sur. (2003) Serum resistin (FIZZ3) protein is increased in obese humans. J Clin Endocrinol Metab 89:

5452–5455.

Demark-Wahnefried W, Campbell KL, Hayes SC (2012). Weight management and its role in breast cancer rehabilitation. Cancer 118: 2277–2287.

Díaz-Urbina D, Escartín-Pérez RE, López-Alonso VE, Mancilla-Díaz JM (2018) Effects of a high-fat diet on behavioral eating patterns. Acta Colomb Psicol 21: 106–115.

Ding Y, Tian Y, Guo M, Liu J, Heng D, Zhu B, i sur. (2016) Regulation of glucose transport by thyroid hormone in rat ovary. Cell Tissue Res 366: 455–466.

Dong Y, Wu G, Zhu T, Chen H, Zhu Y, Zhu G, i sur. (2017) Vegf promotes cartilage angiogenesis by phospho-Erk1/2 activation of Dll4 signaling in temporomandibular joint osteoarthritis caused by chronic sleep disturbance in Wistar rats. Oncotarget 8: 17849–17861.

Drel VR, Mashtalir N, Ilnytska O, Shin J, Li F, Lyzogubov V V., i sur. (2006) The leptin-deficient (ob/ob) mouse: A new animal model of peripheral neuropathy of type 2 diabetes and obesity. Diabetes 55: 3335–3343.

Eisinger K, Liebisch G, Schmitz G, Aslanidis C, Krautbauer S, Buechler C (2014) Lipidomic analysis of serum from high fat diet induced obese mice. Int J Mol Sci 15: 2991–3002.

Erjavec I, Bordukalo-Niksic T, Brkljacic J, Grcevic D, Mokrovic G, Kesic M, i sur. (2016) Constitutively elevated blood serotonin is associated with bone loss and type 2 diabetes in rats. PLoS One 11: e0150102.

Erritzoe D, Frokjaer VG, Haahr MT, Kalbitzer J, Svarer C, Holst KK, i sur. (2010) Cerebral serotonin transporter binding is inversely related to body mass index. Neuroimage 52: 284–289.

Evers EAT, Tillie DE, Veen FM Van Der, Lieben CK, Jolles J, Deutz NEP, i sur. (2005) Effects of a novel method of acute tryptophan depletion on plasma tryptophan and cognitive performance in healthy volunteers. Psychopharmacology (Berl) 178: 92–99.

Faraj BA, Olkowski ZL, Jackson RT (1997) Prevalence of high serotonin uptake in lymphocytes of abstinent alcoholics. Biochem Pharmacol 53: 53–7.

Farooqi IS, Rahilly SO (2005) Monogenic obesity in humans. Annu Rev Med 56: 443–458.

Farrelly LA, Thompson RE, Zhao S, Lepack AE, Lyu Y, Bhanu N V., i sur. (2019) Histone serotonylation is a permissive modification that enhances TFIID binding to H3K4me3. Nature 567: 535–539.

Fitzpatrick PF (1999) Tetrahydropterin-Dependent Amino Acid Hydroxylases. Annu Rev Biochem 68: 355–381.

Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB (2003) Years of life lost due to obesity. J Am Med Assoc 289: 187–193.

Fouquet G, Coman T, Hermine O, Côté F (2019) Serotonin, hematopoiesis and stem cells. Pharmacol Res 140: 67–74.

Frazer A, Hensler JG. Serotonin. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW i sur. (1999) Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition. Lippincott-Raven, Philadelphia

Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, i sur. (2007). A common variant in the Fto gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. Science 316: 889–894.

G. Butler M (2012) Prader-Willi Syndrome: Obesity due to Genomic Imprinting. Curr Genomics 12: 204–215.

Gallou-Kabani C, Vigé A, Gross MS, Rabès JP, Boileau C, Larue-Achagiotis C, i sur. (2007) C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. Obesity 15: 1996–2005.

Gámez-Ruiz A, Milagro FI, Campián J, Martínez JA, Miguel C De (2011) High-fat diet feeding alters metabolic response to fasting/non fasting conditions. Effect on caveolin expression and insulin signalling. Lipids Health Dis 10: 55.

Gao M, Ma Y, Liu D (2015) High-fat diet-induced adiposity, adipose inflammation, hepatic steatosis and hyperinsulinemia in outbred CD-1 mice. PLoS One 10: e0117984.

García-Ruiz E, Reynés B, Díaz-Rúa R, Ceresi E, Oliver P, Palou A (2015) The intake of high-fat diets induces the acquisition of brown adipocyte gene expression features in white adipose tissue. Int J Obes 39: 1619–1629.

Geng L, Liao B, Jin L, Huang Z, Triggle CR, Ding H, i sur. (2019) Exercise alleviates obesity-induced metabolic dysfunction via enhancing FGF21 sensitivity in adipose tissues. Cell Rep 26: 2738-2752.e4.

Ghibaudi L, Cook J, Farley C, Heek M Van, Hwa JJ (2002) Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of Sprague-Dawley rats. Obes Res 10: 956–963.

Giannaccini G, Betti L, Palego L, Marsili A, Santini F, Pelosini C, i sur. (2013) The expression of platelet serotonin transporter (Sert) in human obesity. BMC Neurosci 14: 128.

Goel N, Bale TL (2010) Sex differences in the serotonergic influence on the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis. Endocrinology 151: 1784–1794.

Gonzalez AB De, Hartge P, Cerhan JR, Flint AJ, Hannan L, MacInnis RJ, i sur. (2010) Body-

mass index and mortality among 1.46 million white adults. N Engl J Med 363: 2211–2219.

Green AR, Youdim MBH (1975) Effects of monoamine oxidase inhibition by clorgyline, deprenil or tranylcypromine on 5-hydroxytryptamine concentrations in rat brain and hyperactivity following subsequent tryptophan administration. Br J Pharmacol 55: 415–422.

Guo DF, Rahmouni K (2011) Molecular basis of the obesity associated with Bardet-Biedl syndrome. Trends Endocrinol Metab 22: 286–293.

Guo J, Jou W, Gavrilova O, Hall KD (2009) Persistent diet-induced obesity in male C57BL/6 mice resulting from temporary obesigenic diets. PLoS One 4: e5370.

Hajduch E, Dombrowski L, Darakhshan F, Rencurel F, Marette A, Hundal HS (1999a) Biochemical localisation of the 5-HT(2A) (serotonin) receptor in rat skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun 257: 369–372.

Hajduch E, Rencurel F, Balendran A, Batty IH, Downes CP, Hundal HS (1999b) Serotonin (5-hydroxytryptamine), a novel regulator of glucose transport in rat skeletal muscle. J Biol Chem 274: 13563–13568.

Hakim R, Watrous WM, Fujimoto JM (1970) The renal tubular transport and metabolism of serotonin (5-HT) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA9 in the chicken. J Pharmacol Exp Ther 175: 749-62.

Halade G V., Rahman MM, Williams PJ, Fernandes G (2010) High fat diet-induced animal model of age-associated obesity and osteoporosis. J Nutr Biochem 21: 1162–1169.

Hansson B, Medina A, Fryklund C, Fex M, Stenkula KG (2016). Serotonin (5-HT) and 5-HT2A receptor agonists suppress lipolysis in primary rat adipose cells. Biochem Biophys Res Commun 474: 357–363.

Harlan SM, Morgan DA, Agassandian K, Guo DF, Cassell MD, Sigmund CD, i sur. (2011) Ablation of the leptin receptor in the hypothalamic arcuate nucleus abrogates leptin-induced sympathetic activation. Circ Res 108: 808–812.

Heisler LK, Jobst EE, Sutton GM, Zhou L, Borok E, Thornton-Jones Z, i sur. (2006) Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake. Neuron 51: 239–249.

Herrera-Pérez JJ, Fernández-Guasti A, Martínez-Mota L (2013) Brain Sert expression of male rats is reduced by aging and increased by testosterone restitution. Neurosci J 2013: 1–8.

Heymsfield SB, Wadden TA (2017) Mechanisms, pathophysiology, and management of obesity. N Engl J Med 376: 254–266.

Hishida T, Nishizuka M, Osada S, Imagawa M (2009) The role of C/ebpδ in the early stages of adipogenesis. Biochimie 91: 654–657.

Hodges MR, Best S, Richerson GB (2011) Altered ventilatory and thermoregulatory control in male and female adult Pet-1 null mice. Respir Physiol Neurobiol 177: 133–140.

Höglund E, Øverli Ø, Winberg S (2019) Tryptophan metabolic pathways and brain serotonergic activity: A comparative review. Front Endocrinol (Lausanne) 10: 158.

Honzawa N, Fujimoto K, Kitamura T (2019) Cell autonomous dysfunction and insulin resistance in pancreatic α cells. Int J Mol Sci 20: 3699.

Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeyer HK, Arita Y, Hansen BC, i sur. (2001) Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. Diabetes 50: 1126–1133.

Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. Pharmacol Biochem Behav 71: 533–554.

Hruby A, Hu FB (2015) The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. Pharmacoeconomics 33: 673–689.

Hu S, Wang L, Yang D, Li L, Togo J, Wu Y, i sur. (2018) Dietary fat, but not protein or carbohydrate, regulates energy intake and causes adiposity in mice. Cell Metab 28: 415-431.e4.

Hussain Z, Khan JA (2017) Food intake regulation by leptin: Mechanisms mediating gluconeogenesis and energy expenditure. Asian Pac J Trop Med 10: 940–944.

Ikemoto S, Thompsont KS, Takahashi M, Itakura H, Lanet MD, Ezaki O (1995) High fat diet-induced hyperglycemia: Prevention by low level expression of a glucose transporter (Glut4) minigene in transgenic mice (insulin resistance/type 2 diabetes). Proc Natl Acad Sci USA 92:3096-3099 .

Iliodromiti S, Celis-Morales CA, Lyall DM, Anderson J, Gray SR, Mackay DF, i sur. (2018) The impact of confounding on the associations of different adiposity measures with the incidence of cardiovascular disease: A cohort study of 296 535 adults of white European descent. Eur Heart J 39: 1514–1520.

Jernej B, Čičin-Šain L, Iskric S (1988) A simple and reliable method for monitoring platelet serotonin levels in rats. Life Sci 43: 1663–1670.

Jernej B, Hranilović D, Cicin-Sain L (1998) Serotonin transporter on rat platelets: levels of mRNA underlie inherited differences in uptake kinetics. Neurochem Int 33: 519–23.

Jura M, Kozak LP (2016) Obesity and related consequences to ageing. Age (Dordr) 38: 23.

Kahn BB (2019) Adipose tissue, inter-organ communication, and the path to type 2 diabetes: The 2016 banting medal for scientific achievement lecture. Diabetes 68: 3–14.

Kanter R, Caballero B (2012) Global gender disparities in obesity: A Review. Adv Nutr 3: 491–498.

Karbowska J, Kochan Z (2012) Fat-reducing effects of dehydroepiandrosterone involve upregulation of Atgl and Hsl expression, and stimulation of lipolysis in adipose tissue. Steroids 77: 1359–1365.

Kaur Y, Souza RJ de, Gibson WT, Meyre D (2017) A systematic review of genetic syndromes with obesity. Obes Rev 18: 603–634.

Kesić M, Baković P, Horvatiček M, Proust BLJ, Štefulj J, Čičin-Šain L (2020) Constitutionally high serotonin tone favors obesity: study on rat sublines with altered serotonin homeostasis. Front Neurosci 14: 219.

Kesić M, Baković P, Kolarić D, Štefulj J, Čičin-Šain L (2019) Adaptive thermogenesis in brown adipose tissue is affected by constitutive serotonergic tone: study on Wistar-Zagreb 5HT rat model. U: Proceedings of the 26th European Congress on Obesity, Glasgow

Kesić M, Baković P, Štefulj J, Čičin-Šain L (2018) Endogenous serotonergic tone as a modulator of metabolic homeostasis and response to metabolic challenge. U: Proceedings of the 19th Meeting of International Society for Serotonin Research, Cork.

Kesić M, Štefulj J, Čičin-Šain L (2015) Expression of adipokines and their receptors in brain and adipose tissue of rats with genetically altered serotonergic homeostasis. U: the 6th Croatian Neuroscience Congress with International Participation, Book of abstracts.

Khan M, Joseph F (2014) Adipose tissue and adipokines: The association with and application of adipokines in obesity. Scientifica (Cairo) 2014: 328592.

Khan SS, Ning H, Wilkins JT, Allen N, Carnethon M, Berry JD, i sur. (2018) Association of body mass index with lifetime risk of cardiovascular disease and compression of morbidity. JAMA Cardiol 3: 280–287.

Kim H-J, Kim JH, Noh S, Hur HJ, Sung MJ, Hwang J-T, i sur. (2011) Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice. J Proteome Res 10: 722–731.

Kim H, Toyofuku Y, Lynn FC, Chak E, Uchida T, Mizukami H, i sur. (2010) Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. Nat Med 16: 804–808.

Kim K, Oh C-M, Ohara-Imaizumi M, Park S, Namkung J, Yadav VK, i sur. (2015) Functional role of serotonin in insulin secretion in a diet-induced insulin-resistant state. Endocrinology 156: 444–452.

Kim M, Bae SJ, Lim KM (2013) Impact of high fat diet-induced obesity on the plasma levels of monoamine neurotransmitters in C57BL/6 Mice. Biomol Ther 21: 476–480.

King LK, March L, Anandacoomarasamy A (2013) Obesity and osteoarthritis. Indian J Med Res 138: 185–193.

Kinoshita M, Ono K, Horie T, Nagao K, Nishi H, Kuwabara Y, i sur. (2010) Regulation of adipocyte differentiation by activation of serotonin (5-HT) receptors 5-HT2AR and 5-HT2CR and involvement of microRNA-448-mediated repression of KLF5. Mol Endocrinol 24: 1978–1987.

Kissig M, Shapira SN, Seale P (2016) SnapShot: Brown and Beige Adipose Thermogenesis. Cell 166: 258-258.e.1.

Kodo K, Sugimoto S, Nakajima H, Mori J, Itoh I, Fukuhara S, i sur. (2017) Erythropoietin (EPO) ameliorates obesity and glucose homeostasis by promoting thermogenesis and endocrine function of classical brown adipose tissue (BAT) in diet-induced obese mice. doi:10.1371/journal.pone.0173661.

Koepsell H (2020) Glucose transporters in brain in health and disease. Pflugers Arch Eur J Physiol 472: 1299–1343.

Koopman KE, Booij J, Fliers E, Serlie MJ, Fleur SE la (2013) Diet-induced changes in the lean brain: Hypercaloric high-fat-high-sugar snacking decreases serotonin transporters in the human hypothalamic region. Mol Metab 2: 417–422.

Koussounadis A, Langdon SP, Um IH, Harrison DJ, Smith VA (2015) Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. Sci Rep 5: .

Kundu A, Richa S, Dey P, Kim KS, Son JY, Kim HR, i sur. (2020) Protective effect of EX-527 against high-fat diet-induced diabetic nephropathy in Zucker rats. Toxicol Appl Pharmacol 390: 114899.

Kuo SM, Halpern MM (2011) Lack of association between body mass index and plasma adiponectin levels in healthy adults. Int J Obes 35: 1487–1494.

Kurtz TW, Morris RC, Pershadsingh HA (1989) The zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension. Hypertension 13: 896–901.

Kwak SH, Park BL, Kim H, German MS, Go MJ, Jung HS, i sur. (2012) Association of variations in TPH1 and HTR2B with gestational weight gain and measures of obesity. Obesity 20: 233–238.

Kwon YH, Wang H, Denou E, Ghia JE, Rossi L, Fontes ME, i sur. (2019) Modulation of gut microbiota composition by serotonin signaling influences intestinal immune response and susceptibility to colitis. Cell Mol Gastroeneterol Hepatol 7: 709–728.

Kyrou I, Weickert MO, Gharanei S, Randeva HS, Tan BK (2017) Fibroblast growth factors: New insights, new targets in the management of diabetes. Minerva Endocrinol 42: 248–270.

Lake JK, Power C, Cole TJ (1997) Child to adult body mass index in the 1958 British birth cohort: Associations with parental obesity. Arch Dis Child 77: 376–381.

Lam DD, Garfield AS, Marston OJ, Shaw J, Heisler LK (2010) Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. Pharmacol Biochem Behav 97: 84–91.

Larionov A, Krause A, Miller WR (2005) A standard curve based method for relative real time PCR data processing. BMC Bioinformatics 6: 62.

Lasker S, Rahman MM, Parvez F, Zamila M, Miah P, Nahar K, i sur. (2019) High-fat diet-induced metabolic syndrome and oxidative stress in obese rats are ameliorated by yogurt supplementation. Sci Rep 9: 20026.

Laurentius T, Raffetseder U, Fellner C, Kob R, Nourbakhsh M, Floege J, i sur. (2019) High-fat diet-induced obesity causes an inflammatory microenvironment in the kidneys of aging Long-Evans rats. J Inflamm (United Kingdom) 16: 14.

Lay S Le, Boucher J, Rey A, Castan-Laurell I, Krief S, Ferré P, i sur. (2001) Decreased resistin expression in mice with different sensitivities to a high-fat diet. Biochem Biophys Res Commun 289: 564–567.

Lee AK, Mojtahed-Jaberi M, Kyriakou T, Aldecoa-Otalora Astarloa E, Arno M, Marshall NJ, i sur. (2010) Effect of high-fat feeding on expression of genes controlling availability of dopamine in mouse hypothalamus. Nutrition 26: 411–422.

Lee J, Ellis JM, Wolfgang MJ (2015) Adipose fatty acid oxidation is required for thermogenesis and potentiates oxidative stress-induced inflammation. Cell Rep 10: 266–279.

Lee MD, Simansky KJ (1997) CP-94,253: A selective serotonin (5-HT1B) agonist that promotes satiety. Psychopharmacology (Berl) 131: 264–270.

Leguisamo NM, Lehnen AM, Machado UF, Okamoto MM, Markoski MM, Pinto GH, i sur. (2012) GLUT4 content decreases along with insulin resistance and high levels of inflammatory markers in rats with metabolic syndrome. Cardiovasc Diabetol 11: 100.

Leibowitz SF, Sepiashvili K, Akabayashi A, Karatayev O, Davydova Z, Alexander JT, i sur. Function of neuropeptide Y and agouti-related protein at weaning: relation to corticosterone, dietary carbohydrate and body weight. Brain Res 1036: 180-191.

Leitner DR, Frühbeck G, Yumuk V, Schindler K, Micic D, Woodward E, i sur. (2017) Obesity and type 2 diabetes: Two diseases with a need for combined treatment strategies - EASO can lead the way. Obes Facts 10: 483–492.

Li P, Tiwari HK, Lin WY, Allison DB, Chung WK, Leibel RL, i sur. (2014) Genetic association analysis of 30 genes related to obesity in a European American population. Int J Obes 38: 724–729.

Li Q, Hosaka T, Harada N, Nakaya Y, Funaki M (2013) Activation of Akt through 5-HT2A receptor ameliorates serotonin-induced degradation of insulin receptor substrate-1 in adipocytes. Mol Cell Endocrinol 365: 25–35.

Li Z, Chalazonitis A, Huang YY, Mann JJ, Margolis KG, Yang QM, i sur. (2011) Essential roles of enteric neuronal serotonin in gastrointestinal motility and the development/survival of enteric dopaminergic neurons. J Neurosci 31: 8998–9009.

Lillycrop KA, Garratt ES, Titcombe P, Melton E, Murray RJS i sur. (2019) Differential SLC6A4 methylation: a predictive epigenetic marker of adiposity from birth to adulthood. Int J Obes 43: 974–988.

Liu J, Zou L, Wang J, Schuler C, Zhao Z, Li X, i sur. (2009) Hydrostatic pressure promotes Wnt10b and Wnt4 expression dependent and independent on Erk signaling in early-osteoinduced MSCs. Biochem Biophys Res Commun 379: 505–509.

Lu Y, Fan C, Liang A, Fan X, Wang R, Li P, i sur. (2018) Effects of SCFA on the DNA methylation pattern of adiponectin and resistin in high-fat-diet-induced obese male mice. Br J Nutr 120: 385–392.

Lucas JJ, Yamamoto A, Scearce-Levie K, Saudou F, Hen R (1998) Absence of fenfluramine-induced anorexia and reduced c-fos induction in the hypothalamus and central amygdaloid complex of serotonin 1B receptor knock-out mice. J Neurosci 18: 5537–5544.

Luppino FS, Wit LM De, Bouvy PF, Stijnen T, Cuijpers P, Penninx BWJH, i sur. (2010) Overweight, obesity, and depression: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. Arch Gen Psychiatry 67: 220–229.

Lutz TA, Woods SC (2012) Overview of animal models of obesity. Curr Protoc Pharmacol.

Machado UF, Shimizu I, Saito M (1994) Reduced content and preserved translocation of glucose transporter (Glut4) in white adipose tissue of obese mice. Physiol Behav 55: 621–625.

Madden CJ, Morrison SF (2006) Serotonin potentiates sympathetic responses evoked by spinal NMDA. J Physiol 577: 525–537.

Madden CJ, Morrison SF (2010) Endogenous activation of spinal 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors contributes to the thermoregulatory activation of brown adipose tissue. Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol 298: R776–R783.

Marazziti D, Betti L, Baroni S, Palego L, Mucci F, Carpita B, i sur. (2020) The complex interactions amongst serotonin, insulin, leptin and glycolipid metabolic parameters in human obesity. CNS Spectr 14: 1-10.

Marques C, Meireles M, Norberto S, Leite J, Freitas J, Pestana D, i sur. (2016) High-fat diet-induced obesity rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. Adipocyte 5: 11–21.

Martin CK, Redman LM, Zhang J, Sanchez M, Anderson CM, Smith SR, i sur. (2011) Lorcaserin, a 5-HT2C receptor agonist, reduces body weight by decreasing energy intake without influencing energy expenditure. J Clin Endocrinol Metab 96: 837–845.

Martin SL, Power A, Boyle Y, Anderson IM, Silverdale MA, Jones AKP (2017) 5-HT modulation of pain perception in humans. Psychopharmacology (Berl) 234: 2929–2939.

Matsuda M, Imaoka T, Vomachka AJ, Gudelsky GA, Hou Z, Mistry M, i sur. (2004) Serotonin regulates mammary gland development via an autocrine-paracrine loop. Dev Cell 6: 193–203.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and β-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia 28: 412–419.

Matulewicz N, Stefanowicz M, Nikołajuk A, Karczewska-Kupczewska M (2017) Markers of adipogenesis, but not inflammation, in adipose tissue are independently related to insulin sensitivity. J Clin Endocrinol Metab 102: 3040–3049.

Mawe GM, Hoffman JM (2013) Serotonin signalling in the gut-functions, dysfunctions and therapeutic targets. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 10: 473–486.

McCorvy JD, Roth BL (2015) Structure and function of serotonin G protein-coupled receptors. Pharmacol Ther 150: 129–142.

McGlashon JM, Gorecki MC, Kozlowski AE, Thirnbeck CK, Markan KR, Leslie KL, i sur. (2015) Central serotonergic neurons activate and recruit thermogenic brown and beige fat and regulate glucose and lipid homeostasis. Cell Metab 21: 692–705.

Melanson EL, Astrup A, Donahoo WT (2009) The relationship between dietary fat and fatty acid intake and body weight, diabetes, and the metabolic syndrome. Ann Nutr Metab. 55: 229-43

Meli R, Mattace Raso G, Irace C, Simeoli R, Pascale A Di, Paciello O, i sur. (2013) High fat diet induces liver steatosis and early dysregulation of iron metabolism in rats. PLoS One 8:e66570 .

Mercado CP, Kilic F (2010) Molecular mechanisms of SERT in platelets: regulation of plasma serotonin levels. Mol Interv 10: 231–41.

Merino B, Alonso-Magdalena P, Lluesma M, Ñeco P, Gonzalez A, Marroquí L, i sur. (2015) Pancreatic alpha-cells from female mice undergo morphofunctional changes during compensatory adaptations of the endocrine pancreas to diet-induced obesity. Sci Rep 5: 11622.

Meyts P De (2000) The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network. South Dartmouth

Milagro FI, Campión J, García-Díaz DF, Goyenechea E, Paternain L, Martínez JA (2009) High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. J Physiol Biochem 65: 1–9.

Mitchell NS, Catenacci VA, Wyatt HR, Hill JO (2011) Obesity: Overview of an epidemic. Psychiatr Clin North Am 34: 717–732.

Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, i sur. (1997) Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. Nature 387: 903–908.

Monteiro R, Azevedo I (2010) Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. Mediators Inflamm 2010: 289645.

Moura e Dias M de, Reis SA dos, Conceição LL da, Sediyama CMN de O, Pereira SS, Oliveira LL de, i sur. (2021) Diet-induced obesity in animal models: points to consider and influence on metabolic markers. Diabetol Metab Syndr 13: 32.

Mu J, Jiang G, Brady E, Dallas-Yang Q, Liu F, Woods J, i sur. (2011) Chronic treatment with a glucagon receptor antagonist lowers glucose and moderately raises circulating glucagon and glucagon-like peptide 1 without severe alpha cell hypertrophy in diet-induced obese mice. Diabetologia 54: 2381–2391.

Mueckler M, Thorens B (2013) The SLC2 (Glut) family of membrane transporters. Mol Aspects Med 34: 121–138.

Mundy AL, Haas E, Bhattacharya I, Widmer CC, Kretz M, Hofmann-Lehmann R, i sur. (2007) Fat intake modifies vascular responsiveness and receptor expression of vasoconstrictors: Implications for diet-induced obesity. Cardiovasc Res 73: 368–375.

Murphy DL, Lesch KP (2008) Targeting the murine serotonin transporter: Insights into human neurobiology. Nat Rev Neurosci 9: 85–96.

Nam SB, Kim K, Kim BS, Im HJ, Lee SH, Kim SJ, i sur. (2018) The effect of obesity on the availabilities of dopamine and serotonin transporters. Sci Rep 8: 1–6.

Ni W, Geddes TJ, Priestley JRC, Szasz T, Kuhn DM, Watts SW (2008) The existence of a local 5-hydroxytryptaminergic system in peripheral arteries. Br J Pharmacol 154: 663–674.

Ni W, Watts SW (2006) 5-Hydroxytryptamine in the cardiovascular system: Focus on the serotonin transporter (SERT). Clin Exp Pharmacol Physiol 33: 575–583.

Niswender KD, Morrison CD, Clegg DJ, Olson R, Baskin DG, Myers MG, i sur. (2003) Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: A key mediator of insulin-induced anorexia. Diabetes 52: 227–231.

Nonogaki K, Strack AM, Dallman MF, Tecott LH (1998) Leptin-independent hyperphagia and type 2 diabetes in mice with a mutated serotonin 5-HT2C receptor gene. Nat Med 4: 1152–1156.

Nueten JM Van, Janssens WJ, Vanhoutte PM (1985) Serotonin and vascular reactivity. Pharmacol Res Commun 17: 585–608.

Oh C-M, Namkung J, Go Y, Shong KE, Kim K, Kim H, i sur. (2015) Regulation of systemic energy homeostasis by serotonin in adipose tissues. Nat Commun 6: 6794.

Oh C-M, Park S, Kim H (2016) Serotonin as a new therapeutic target for diabetes mellitus and obesity. Diabetes Metab J 40: 89–98.

Ohara-Imaizumi M, Kim H, Yoshida M, Fujiwara T, Aoyagi K, Toyofuku Y, i sur. (2013. Serotonin regulates glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic β cells during pregnancy. Proc Natl Acad Sci USA 110: 19420–19425.

Ohta H, Itoh N (2014) Roles of FGFs as adipokines in adipose tissue development, remodeling, and metabolism. Front Endocrinol (Lausanne) 5: 18.

Okaty BW, Commons KG, Dymecki SM (2019) Embracing diversity in the 5-HT neuronal system. Nat Rev Neurosci 20: 397–424.

Ormsbee HS, Fondacaro JD (1985) Action of serotonin on the gastrointestinal tract. Proc Soc Exp Biol Med 178: 333–338.

Orozco-Solís R, Matos R, Lopes De Souza S, Grit I, Kaeffer B, Manhães De Castro R, i sur. (2010) Perinatal nutrient restriction induces long-lasting alterations in the circadian expression pattern of genes regulating food intake and energy metabolism. Int J Obes 35: 990–1000.

Osawa Y, Kanamori H, Seki E, Hoshi M, Ohtaki H, Yasuda Y, i sur. (2011) L-tryptophan-mediated enhancement of susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease is dependent on the mammalian target of rapamycin. J Biol Chem 286: 34800–34808.

Page KC, Malik RE, Ripple JA, Anday EK (2009) Maternal and postweaning diet interaction alters hypothalamic gene expression and modulates response to a high-fat diet in male offspring. Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol 297: R1049-57.

Palou M, Priego T, Sánchez J, Villegas E, Rodríguez AM, Palou A, i sur. (2008) Sequential changes in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue and liver in response to fasting. Pflugers Arch Eur J Physiol 456: 825–836.

Park A (2014) Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. World J Stem Cells 6: 33–42.

Pascual-Serrano A, Arola-Arnal A, Suárez-García S, Bravo FI, Suárez M, Arola L, i sur. (2017)

Grape seed proanthocyanidin supplementation reduces adipocyte size and increases adipocyte number in obese rats. Int J Obes 41: 1246–1255.

Paulmann N, Grohmann M, Voigt JP, Bert B, Vowinckel J, Bader M, i sur. (2009) Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic β-cells by protein serotonylation. PLoS Biol 7: e1000229.

Pedditizi E, Peters R, Beckett N (2016) The risk of overweight/obesity in mid-life and late life for the development of dementia: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. Age Ageing 45: 14–21.

Pedersen KB, Pulliam CF, Patel A, Piero F Del, Watanabe TTN, Wankhade UD, i sur. (2019) Liver tumorigenesis is promoted by a high saturated fat diet specifically in male mice and is associated with hepatic expression of the proto-oncogene Agap2 and enrichment of the intestinal microbiome with Coprococcus. Carcinogenesis 40: 349–359.

Picchi MG, Mattos AM de, Barbosa MR, Duarte CP, Gandini M de A, Portari GV, i sur. (2011) A high-fat diet as a model of fatty liver disease in rats. Acta Cir Bras 26: 25–30.

Pischon T, Nimptsch K (2016) Obesity and risk of cancer: An introductory overview. Recent Results Cancer Res 208: 1–15.

Poher AL, Veyrat-Durebex C, Altirriba J, Montet X, Colin DJ, Caillon A, i sur. (2015) Ectopic UCP1 overexpression in white adipose tissue improves insulin sensitivity in Lou/C rats, a model of obesity resistance. Diabetes 64: 3700–3712.

Popkin BM (2001) The nutrition transition and obesity in the developing world. J Nutr 131: 871S-873S.

Portas CM, Bjorvatn B, Ursin R (2000) Serotonin and the sleep/wake cycle: Special emphasis on microdialysis studies. Prog Neurobiol 60: 13–35.

Purnell JQ (2000) Definitions, Classification, and Epidemiology of Obesity. Soth Dartmouth

Quesada I, Tudurí E, Ripoll C, Nadal Á (2008) Physiology of the pancreatic α-cell and glucagon secretion: Role in glucose homeostasis and diabetes. J Endocrinol 199: 5–19.

Rahmouni K, Morgan DA (2007) Hypothalamic arcuate nucleus mediates the sympathetic and arterial pressure responses to leptin. Hypertension 49: 647–652.

Ramalho L, Jornada MN Da, Antunes LC, Hidalgo MP (2017) Metabolic disturbances due to a high-fat diet in a non-insulin-resistant animal model. Nutr Diabetes 7: e245.

Rendina-Ruedy E, Hembree KD, Sasaki A, Davis MR, Lightfoot SA, Clarke SL, i sur. (2015) A Comparative study of the metabolic and skeletal response of C57BL/6J and C57BL/6N mice in a diet-induced model of type 2 diabetes. 2015: 758080.

Reynés B, Palou M, Palou A (2017) Gene expression modulation of lipid and central energetic metabolism related genes by high-fat diet intake in the main homeostatic tissues. Food Funct 8: 629–650.

Rijke CE de, Hillebrand JJG, Verhagen LAW, Roeling TAP, Adan RAH (2005) Hypothalamic neuropeptide expression following chronic food restriction in sedentary and wheel-running rats. J Mol Endocrinol 35: 381–390.

Ríos-Lugo MJ, Jiménez-Ortega V, Cano-Barquilla P, Mateos PF, Spinedi EJ, Cardinali DP, i sur. (2015) Melatonin counteracts changes in hypothalamic gene expression of signals regulating feeding behavior in high-fat fed rats. Horm Mol Biol Clin Investig 21: 175–183.

Ritchie SA, Connell JMC (2007). The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. Nutr Metab Cardiovasc Dis 17: 319–326.

Rodríguez JJ, Noristani HN, Verkhratsky A (2012) The serotonergic system in ageing and Alzheimer's disease. Prog Neurobiol 99: 15–41.

Romieu I, Dossus L, Barquera S, Blottière HM, Franks PW, Gunter M, i sur. (2017) Energy balance and obesity: what are the main drivers? Cancer Causes Control 28: 247–258.

Rosen ED, Spiegelman BM (2006) Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. Nature 444: 847–853.

Rosen ED, Spiegelman BM (2014) What we talk about when we talk about fat. Cell 156: 20–44.

Rossmeisl M, Rim JS, Koza RA, Kozak LP (2003) Variation in type 2 diabetes - Related traits in mouse strains susceptible to diet-induced obesity. Diabetes 52: 1958–1966.

Rothwell NJ (1997) A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. Obes Res 5: 650–656.

Roza NAV, Possignolo LF, Palanch AC, Gontijo JAR (2016) Effect of long-term high-fat diet intake on peripheral insulin sensibility, blood pressure, and renal function in female rats. Food Nutr Res 60: 28536.

Russo S, Kema I, Bosker F, Haavik J, Korf J (2009) Tryptophan as an evolutionarily conserved signal to brain serotonin: Molecular evidence and psychiatric implications. World J Biol Psychiatry 10: 258–268.

Sadana P, Zhang Y, Song S, Cook GA, Elam MB, Park EA (2007) Regulation of carnitine palmitoyltransferase I (CPT-Iα) gene expression by the peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator (PGC-1) isoforms. Mol Cell Endocrinol 267: 6–16.

Sakowski SA, Geddes TJ, Thomas DM, Levi E, Hatfield JS, Kuhn DM (2006) Differential

tissue distribution of tryptophan hydroxylase isoforms 1 and 2 as revealed with monospecific antibodies. Brain Res 1085: 11–18.

Sato Y, Nishio Y, Sekine O, Kodama K, Nagai Y, Nakamura T, i sur. (2007) Increased expression of Ccaat/enhancer binding protein-beta and -delta and monocyte chemoattractant protein-1 genes in aortas from hyperinsulinaemic rats. Diabetologia 50: 481–489.

Schüler R, Seebeck N, Osterhoff MA, Witte V, Flöel A, Busjahn A, i sur. (2018) Vegf and Glut1 are highly heritable, inversely correlated and affected by dietary fat intake: Consequences for cognitive function in humans. Mol Metab 11: 129–136.

Seneviratne KN, Kotuwegedara RT, Ekanayake S (2011) Serum cholesterol and triglyceride levels of rats fed with consumer selected coconut oil blends. Int Food Res J 18: 1303–1308.

Sepa-Kishi DM, Sotoudeh-Nia Y, Iqbal A, Bikopoulos G, Ceddia RB (2017) Cold acclimation causes fiber type-specific responses in glucose and fat metabolism in rat skeletal muscles. Sci Rep 7:15430 .

Sevilla L, Gumà A, Enrique-Tarancón G, Mora S, Muñoz P, Palacín M, i sur. (1997) Chronic high-fat feeding and middle-aging reduce in an additive fashion Glut4 expression in skeletal muscle and adipose tissue. Biochem Biophys Res Commun 235: 89–93.

Shao M, Lu X, Cong W, Xing X, Tan Y, Li Y, i sur. (2014) Multiple low-dose radiation prevents type 2 diabetes-induced renal damage through attenuation of dyslipidemia and insulin resistance and subsequent renal inflammation and oxidative stress. PLoS One 9: e92574.

Shaw LM (2011) The insulin receptor substrate (Irs) proteins: At the intersection of metabolism and cancer. Cell Cycle 10: 1750–1756.

Shen W, Wang C, Xia L, Fan C, Dong H, Deckelbaum RJ, i sur. (2014) Epigenetic modification of the leptin promoter in diet-induced obese mice and the effects of N-3 polyunsaturated fatty acids. Sci Rep 4: 5282.

Shong KE, Oh CM, Namkung J, Park S, Kim H (2020) Serotonin regulates de novo lipogenesis in adipose tissues through serotonin receptor 2a. Endocrinol Metab 35: 470–479.

Si J, Zhang H, Zhu L, Chen A (2021) The relationship between overweight/obesity and executive control in college students: the mediating effect of Bdnf and 5-HT. Life 11: 313.

Sikander A, Rana SV, Prasad KK (2009) Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome. Clin Chim Acta 403: 47–55.

Silventoinen K, Jelenkovic A, Sund R, Hur YM, Yokoyama Y, Honda C, i sur. (2016) Genetic and environmental effects on body mass index from infancy to the onset of adulthood: An individual-based pooled analysis of 45 twin cohorts participating in the collaborative project of development of anthropometrical measures in twins (CODATwins) study. Am J Clin Nutr 104: 371–379.

Söhle J, Machuy N, Smailbegovic E, Holtzmann U, Grönniger E, Wenck H, i sur. (2012) Identification of new genes involved in human adipogenesis and fat storage. PLoS One 7: e31193.

Songtachalert T, Roomruangwong C, Carvalho AF, Bourin M, Maes M (2018) Anxiety disorders: sex differences in serotonin and tryptophan metabolism. Curr Top Med Chem 18: 1704–1715.

Sorensen TIA, Price RA, Stunkard AJ, Schulsinger F (1989) Genetics of obesity in adult adoptees and their biological siblings. Br Med J 298: 87–90.

Sousa-Ferreira L, Álvaro AR, Aveleira C, Santana M, Brandão I, Kügler S, i sur. (2011) Proliferative hypothalamic neurospheres express Npy, Agrp, Pomc, Cart and Orexin-A and differentiate to functional neurons. PLoS One 6: e19745.

Spohn SN, Mawe GM (2017) Non-conventional features of peripheral serotonin signalling-the gut and beyond. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 14: 412–420.

Stern JH, Smith GI, Chen S, Unger RH, Klein S, Scherer PE (2019) Obesity dysregulates fasting-induced changes in glucagon secretion. J Endocrinol 243: 149–160.

Stunes AK, Reseland JE, Hauso O, Kidd M, Tømmerås K, Waldum HL, i sur. (2011) Adipocytes express a functional system for serotonin synthesis, reuptake and receptor activation. Diabetes, Obes Metab 13: 551–558.

Su KZ, Li YR, Zhang D, Yuan JH, Zhang CS, Liu Y, i sur. (2019) Relation of circulating resistin to insulin resistance in type 2 diabetes and obesity: a systematic review and meta-analysis. Front Physiol 10: 1399.

Sumara G, Sumara O, Kim JK, Karsenty G (2012) Gut-derived serotonin is a multifunctional determinant to fasting adaptation. Cell Metab 16: 588–600.

Switskaya N, Gourmelen S, Schuster-Klein C, Guardiola-Lemaitre B, Péyet P, Challet E (2007) Increasing the fat-to-carbohydrate ratio in a high-fat diet prevents the development of obesity but not a prediabetic state in rats. Clin Sci 113: 417–425.

Takahashi M, Miyatsuka T, Suzuki L, Osonoi S, Himuro M, Miura M, i sur. (2020) Biphasic changes in β-cell mass around parturition are accompanied by increased serotonin production. Sci Rep 10: 4962.

Tang H, Sebastian BM, Axhemi A, Chen X, Hillian AD, Jacobsen DW, i sur. (2012) Ethanol-Induced Oxidative Stress via the Cyp2e1 pathway disrupts adiponectin secretion from adipocytes. Alcohol Clin Exp Res 36: 214–222.

Tekes K (2008) HPLC determination of serotonin and its metabolites from human platelet-rich plasma; shift to 5-hydroxytryptophol formation following alcohol consumption. J Chromatogr Sci 46: 169–173.

Thaker V V (2017) Genetic and epigenetic causes of obesity. Adolesc Med State Art Rev 28: 379–405.

Timper K, Brüning JC (2017) Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. Dis Model Mech 10: 679–689.

Top M Van Den, Lee K, Whyment AD, Blanks AM, Spanswick D (2004) Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. Nat Neurosci 7: 493–494.

Townsend KL, Lorenzi MM, Widmaier EP (2008) High-fat diet-induced changes in body mass and hypothalamic gene expression in wild-type and leptin-deficient mice. Endocrine 33: 176–188.

Trayhurn P, Beattie JH (2001) Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. Proc Nutr Soc 60: 329–339.

Triscari J, Bryce GF, Sullivan AC (1980) Metabolic consequences of fasting in old lean and obese Zucker rats. Metabolism 29: 377–385.

Üçeyler N, Schütt M, Palm F, Vogel C, Meier M, Schmitt A, i sur. (2010) Lack of the serotonin transporter in mice reduces locomotor activity and leads to gender-dependent late onset obesity. Int J Obes 34: 701–711.

Uphouse L (2014) Pharmacology of serotonin and female sexual behavior. Pharmacol Biochem Behav 121: 31–42.

Valera B, Sohani Z, Rana A, Poirier P, Anand SS (2015) The ethnoepidemiology of obesity. Can J Cardiol 31: 131–141.

Veniaminova E, Cespuglio R, Chernukha I, Schmitt-Boehrer AG, Morozov S, Kalueff A V., i sur. (2020) Metabolic, molecular, and behavioral effects of western diet in serotonin transporter-deficient mice: rescue by heterozygosity? Front Neurosci 14: 24.

Villarroya F, Cereijo R, Villarroya J, Giralt M (2017) Brown adipose tissue as a secretory organ. Nat Rev Endocrinol 13: 26–35.

Wade PR, Chen J, Jaffe B, Kassem IS, Blakely RD, Gershon MD (1996) Localization and function of a 5-HT transporter in crypt epithelia of the gastrointestinal tract. J Neurosci 16: 2352–2364.

Wakil SJ (1989) Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. Biochemistry 28: 4523–4530.

Waku T, Shiraki T, Oyama T, Maebara K, Nakamori R, Morikawa K (2010) The nuclear receptor Pparγ individually responds to serotonin- and fatty acid- metabolites. EMBO J 29: 3395–3407.

Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hörtnagl H, Voits M, Fink H, i sur. (2003a) Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. Science 299: 76.

Walther DJ, Peter JU, Winter S, Höltje M, Paulmann N, Grohmann M, i sur. (2003b) Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet α-granule release. Cell 115: 851–862.

Wang B-W, Hung H-F, Chang H, Kuan P, Shyu K-G (2007) Mechanical stretch enhances the expression of resistin gene in cultured cardiomyocytes via tumor necrosis factor. Am J Physiol Hear Circ Physiol 293: 2305–2312.

Wang H, Eckel RH (2009) Lipoprotein lipase: From gene to obesity. Am J Physiol - Endocrinol Metab 297:E271-E288 .

Wang X, Ge A, Cheng M, Guo F, Zhao M, Zhou X, i sur. (2012) Increased hypothalamic inflammation associated with the susceptibility to obesity in rats exposed to high-fat diet. Exp Diabetes Res 2012: 847246.

Watanabe H, Akasaka D, Ogasawara H, Sato K, Miyake M, Saito K, i sur. (2010) Peripheral serotonin enhances lipid metabolism by accelerating bile acid turnover. Endocrinology 151: 4776–4786.

Watanabe H, Nakano T, Saito R, Akasaka D, Saito K, Ogasawara H, i sur. (2016) Serotonin improves high fat diet induced obesity in mice. PLoS One 11: e147143.

Watts SW, Morrison SF, Davis RP, Barman SM (2012) Serotonin and blood pressure regulation. Pharmacol Rev 64: 359–388.

Wearing SC, Hennig EM, Byrne NM, Steele JR, Hills AP (2006) Musculoskeletal disorders associated with obesity: A biomechanical perspective. Obes Rev 7: 239–250.

Whitaker-Azmitia PM (1999) The discovery of serotonin and its role in neuroscience. Neuropsychopharmacology 21: 2S-8S.

White JG (1968) The dense bodies of human platelets. Origin of serotonin storage particles from platelet granules. Am J Pathol 53: 791–808.

Winzell MS, Brand CL, Wierup N, Sidelmann UG, Sundler F, Nishimura E, i sur. (2007) Glucagon receptor antagonism improves islet function in mice with insulin resistance induced by a high-fat diet. Diabetologia 50: 1453–1462.

World Health Organization, Geneva, Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Global action plan on physical activity 2018–2030: more active people for a healthier world.

Wortley KE, Chang GQ, Davydova Z, Leibowitz SF (2003) Orexin gene expression is increased during states of hypertriglyceridemia. Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol 284: R1454–

R1465.

Wu LE, Samocha-Bonet D, Whitworth PT, Fazakerley DJ, Turner N, Biden TJ, i sur. (2014) Identification of fatty acid binding protein 4 as an adipokine that regulates insulin secretion during obesity. Mol Metab 3: 465–473.

Yabut JM, Desjardins EM, Chan EJ, Day EA, Leroux JM, Wang B, i sur. (2020) Genetic deletion of mast cell serotonin synthesis prevents the development of obesity and insulin resistance. Nat Commun 11: 463.

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, i sur. (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nat Med 8: 1288–1295.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, i sur. (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. Nat Med 7: 941–946.

Yamazaki T, Okawa S, Takahashi M (2016). The effects on weight loss and gene expression in adipose and hepatic tissues of very-low cabohydrate and low-fat isoenergetic diets in diet-induced obese mice. Nutr Metab 13: 1–17.

Yang GB, Qiu CL, Aye P, Shao Y, Lackner AA (2007) Expression of serotonin transporters by peripheral blood mononuclear cells of rhesus monkeys (Macaca mulatta). Cell Immunol 248: 69–76.

Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, i sur. (2001) Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. J Clin Endocrinol Metab 86: 3815–3819.

Yao X-H, Nguyen KH, Nyomba BLG (2014) Reversal of glucose intolerance in rat offspring exposed to ethanol before birth through reduction of nuclear skeletal muscle HDAC expression by the bile acid TUDCA. Physiol Rep 2: e12195.

Yazıcı D, Sezer H (2017) Insulin resistance, obesity and lipotoxicity. Adv Exp Med Biol 960: 277–304.

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics 13: 134.

Young RL, Lumsden AL, Martin AM, Schober G, Pezos N, Thazhath SS, i sur. (2018) Augmented capacity for peripheral serotonin release in human obesity. Int J Obes 42: 1880–1889.

Young SN, Leyton M (2002) The role of serotonin in human mood and social interaction: Insight from altered tryptophan levels. Pharmacol Biochem Behav 71: 857–865.

Zaman MQ, Leray V, Bloc'h J Le, Thorin C, Ouguerram K, Nguyen P (2011) Lipid profile and insulin sensitivity in rats fed with high-fat or high-fructose diets. Br J Nutr 106 Suppl 1: .

Zechner R, Zimmermann R, Eichmann TO, Kohlwein SD, Haemmerle G, Lass A, i sur. (2012) Fat signals - lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. Cell Metab 15: 279–291.

Zegers D, Hul W Van, Gaal LF Van, Beckers S (2012) monogenic and complex forms of obesity: insights from genetics reveal the leptin-melanocortin signaling pathway as a common player. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 22: 325–343.

Zha W, Ho HTB, Hu T, Hebert MF, Wang J (2017) Serotonin transporter deficiency drives estrogen-dependent obesity and glucose intolerance. Sci Rep 7: 1–14.

Zhang C, Niu W, Wang Z, Wang X, Xia G (2012) The effect of gonadotropin on glucose transport and apoptosis in rat ovary. PLoS One 7: .

Zhang T, Zhao S, Li W, Ma L, Ding M, Li R, i sur. (2014) High-fat diet from perilla oil induces insulin resistance despite lower serum lipids and increases hepatic fatty acid oxidation in rats. Lipids Health Dis 13: 15.

Zhang X, Yeung DCY, Karpisek M, Stejskal D, Zhou ZG, Liu F, i sur. (2008) Serum Fgf21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. Diabetes 57: 1246–1253.

Zhou X, Li Z, Qi M, Zhao P, Duan Y, Yang G, i sur. (2020) Brown adipose tissue-derived exosomes mitigate the metabolic syndrome in high fat diet mice. Theranostics 10: 8197–8210.

Zhukova N V, Novgorodtseva TP, Denisenko YK (2014) Effect of the prolonged high-fat diet on the fatty acid metabolism in rat blood and liver. Lipids Health Dis 13: 49.

Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, i sur. (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. Science (80-) 306: 1383–1386.

8. PRILOG

Popis kratica

5HIAA	*5-hydroxyindoleacetic acid,* 5-hidroksiindol octena kiselina
5HT	*5-hydroxytryptamine,* 5-hidroksitriptamin, serotonin
ADH	alkohol dehidrogenaza
ANOVA	*analysis of variance,* analiza varijance
AUC	*area under curve*, površina ispod krivulje
BAT	*brown adipose tissue*, smeđe masno tkivo
BMI	*body mass index,* indeks tjelesne mase
BSA	*bovine serum albumin*, goveđi serumski albumin
CD	*control diet,* standardna prehrana
cDNA	*complementray deoxyribonucleic acid,* komplementarna deoksiribonukleinska kiselina
Cq	*quantification cycle,* granični ciklus
DEPC	*diethylpyrocarbonate,* dietil-pirokarbonat
dNTP	*deoxyribonucleoseide triphosphate*, deoksiribonukleozid trifosfat
EDTA	*ethylene-diaminotetraacetic acid,* etilen-diamino tetraoctena kiselina
ELISA	*enzyme-linked immunosrbent assay,* komplet za imunoenzimski test
GPCR	*G-protein coupled receptor,* receptor spregnut s G-proteinom
GTT	*glucose tolerance test,* test tolerancije glukoze
gWAT	*gonadal white adipose tissue,* gonadno bijelo masno tkivo
H	*high,* 5HT-visoka sublinija WZ-5HT štakora
H-CD	*high, control diet,* 5HT-visoke životinje na prehrani standardnom laboratorijskom hranom za glodavce
H-HFD	*high, high-fat diet,* 5HT-visoke životinje na prehrani s visokim udjelom masti
HDL	*high density lipoprotein*, lipoprotein visoke gustoće
HFD	*high-fat diet,* prehrana bogata mastima
HOMA-IR	*homeostatic model assesment – insulin resistance,* homeostatski model za procjenu inzulinske rezistencije
HPT	hipotalamus
HRP	*horseredish peroxidase*, peroksidaza hrena
IR	*infrared,* infracrvena
ITT	*insulin tolerance test,* test tolerancije inzulina
KO	*knock-out,* inaktiviran (gen)

L	*low,* 5HT-niska sublinija WZ-5HT štakora
L-CD	*low,* 5HT-niske životinje na prehrani standardnom laboratorijskom hranom za glodavce
L-HFD	*low, high-fat diet,* 5HT-niske životinje na prehrani s visokim udjelom masti
LSD	*least significant difference,* najmanja značajna razlika
M	*mean,* srednja vrijednost
MM	*master mix*
mRNA	*messenger ribonucleic acid*, glasnička ribonukleinska kiselina
OPT	*Ortho-phthaldialdehyde*, Orto-ftaldialdehid
PRP	*platelet rich plasma,* plazma bogata trombocitima
PSL	*platelet serotonin level*, razina trombocitnog serotonina
PSU	*platelet serotonin uptake,* brzina unosa serotonina u trombocite
qPCR	*quantitative real-time polymerase chain reaction,* metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu
RER	*relative expression ratio,* relativni omjer ekspresije
RT	reverzna transkripcija
SD	standardna devijacija
SST	*serum separating tube,* epruvete za izdvajanje seruma
TNF	*tumor necrosis factor*, faktor nekroze tumora
WAT	*white adipose tissue*, bijelo masno tkivo
WZ-5HT	Wistar-Zagreb 5HT štakor
ZDF	*Zucker-diabetic fatty rat*

Popis gena

Actb	*beta-actin*, beta-aktin
Adipoq	*aiponectin*, adiponektin
Agrp	*agouti-related peptide*, agouti-povezani peptid
Atgl	*adipose triglyceride lipase*, trigliceridna lipaza masnog tkiva
Bdnf	*brain-derived neurotrophic factor*, moždani neurotrofni faktor
Cart	*cocaine and amphetamine regulated transcript*, kokainom i amfetaminom reguliran transkript
Cebpa	*CCAT/enhancer – binding protein alpha*, CCAAT/pojačivač-vezajući faktor alfa
Cebpd	*CCAAT enhancer binding protein delta*, CCAAT/pojačivač-vezajući faktor delta
Fabp4	*fatty acid-binding protein 4*, protein-4 za vezanje masnih kiselina
Fasn	*fatty acid synthase*, sintaza masnih kiselina
Fgf10	*fibroblast growth factor 10*, fibroblastni faktor rasta 1
Fgf21	*fibroblast growth factor 10*, fibroblastni faktor rasta 10
Fto	*fat mass and obesity associated gene*, gen povezan s masom masnog tkiva i pretilošću
Gapdh	*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
Glut1	glukozni transporter 1
Glut3	glukozni transporter 3
Glut4	glukozni transporter 4
Hcrt	*hypocretin neuropeptide precursor (orexin)*, oreksin
Hcrtr	*hypocretin (orexin) receptor 1*, oreksin receptor 1
Htr2a	*5-hydroxytryptamine receptor 2A*, serotoninski receptor 2A
Htr2b	*5-hydroxytryptamine receptor 2B*, serotoninski receptor 2B
Htr2c	*5-hydroxytryptamine receptor 2C*, serotoninski receptor 2C
Insr	*insulin receptor*, inzulinski receptor
Irs1	*insulin receptor substrate 1*, supstrat 1 za inzulinski receptor
Irs2	*insulin receptor substrate 2*, supstrat 2 za inzulinski receptor
Ldha	laktat dehidrogenaza A
Lep	leptin

Lepr	leptinski receptor
Lipe	*lipase E, hormone sensitive type*, hormon senzitivna lipaza E
Lpl	lipoprotein lipaza
Maoa	monoamin oksidaza A
Maob	monoamin oksidaza B
Npy	neuropeptid Y
Npyr	receptor za neuropeptid Y
Pomc	*pro-opiomelanocortin,* proopiomelanokortin
Ppargc1b	*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 beta*, PPARG koaktivator 1 beta
Rps29	*ribosomal protein 29*
Retn	rezistin
Sert	serotoninski transporter
Tnf	*tumor necrosis factor*, faktor nekroze tumora
Tph1	triptofan hidroksilaza 1
Vegfa	*vascular endothelial growth factor,* vaskularni endotelni faktor rasta
Wnt10b	*wingless-related integration site family member 10B*, 10B član obitelji WNT

Tablica 7. Učinak HFD na tjelesnu masu životinja tijekom 11 tjedana (75 dana) tretmana i masu pojedinih organa/tkiva po završetku tretmana: statistička analiza rezultata

Parametar		Test	Glavni efekt		Post-hoc test (vrijednost P)			
			vrijednost F ili KW	vrijednost P	H-CD vs. L-CD	H-HFD vs. H-CD	L-HFD vs. L-CD	H-HFD vs. L-HFD
Tjelesna masa	37. dan	1wA	13,2	**<0,001**	**<0,001**	0,178	**0,008**	**0,004**
	40. dan	1wA	12,4	**<0,001**	**<0,001**	0,218	**0,004**	**0,008**
	47. dan	1wA	8,46	**0,006**	**<0,001**	0,346	**0,011**	**0,050**
	54. dan	1wA	7,65	**<0,001**	**0,001**	0,328	**0,006**	0,122
	59. dan	1wA	7,69	**<0,001**	**0,002**	0,265	**0,003**	0,190
	75. dan	1wA	6,85	**0,001**	**0,001**	0,556	**0,006**	0,226
	AUC	1wA	10,5	**<0,001**	**<0,001**	0,294	**0,026**	**0,007**
	Ukupni prirast	1wA	6,32	**0,002**	0,567	0,424	**<0,001**	**0,013**
Apsolutna masa organa / tkiva	BAT	1wA	19,1	**<0,001**	**0,026**	**0,010**	**<0,001**	**<0,001**
	gWAT	1wA	24,4	**<0,001**	0,173	**<0,001**	**<0,001**	0,546
	srce	KW	9,02	**0,029**	**0,004**	0,115	**0,044**	0,519
	jetra	1wA	10,8	**<0,001**	0,903	**<0,001**	0,052	**0,007**
	slezena	1wA	3,97	**0,017**	**0,015**	**0,006**	0,086	**0,043**
Relativna masa organa / tkiva	BAT	KW	21,7	**<0,001**	**0,004**	0,108	0,151	**0,004**
	gWAT	1wA	43,3	**<0,001**	0,370	**<0,001**	**<0,001**	0,937
	srce	1wA	4,28	**0,012**	0,270	**0,023**	0,102	0,078
	jetra	1wA	30,5	**<0,001**	**0,002**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
	slezena	KW	11,2	**0,011**	0,650	**0,008**	0,317	**0,037**

Broj korištenih životinja po skupini naveden je u poglavlju Rezultati.
1wA - jednosmjerna analiza varijanci i Fisherov LSD post-hoc test; KW - Kruskal-Wallisov test i Dunnov post-hoc test;
H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD - 5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima. AUC - površina ispod krivulje, BAT - smeđe masno tkivo, gWAT - gonadno bijelo masno tkivo

Tablica 8. Učinak HFD na navedene biokemijske parametre u krvi (4. - 11. tjedan tretmana) i gonadnom bijelom masnom tkivu (po završetku tretmana): statistička analiza rezultata.

Parametar		Test	Glavni efekt		Post-hoc test (vrijednost P)			
			vrijednost F ili KW	vrijednost P	H-CD vs. L-CD	H-HFD vs. H-CD	L-HFD vs. L-CD	H-HFD vs. L-HFD
Krv								
Trigliceridi	4.tj	1wA	12,2	**0,005**	0,130	0,178	**<0,001**	**0,005**
	9.tj	1wA	15,6	**<0,001**	**0,003**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
	11.tj	1wA	10,5	**<0,001**	0,778	**0,008**	**<0,001**	0,117
Kolesterol	4.tj.	KW	25,8	**<0,001**	0,395	**<0,001**	**0,003**	0,806
	9.tj.	1wA	23,1	**<0,001**	0,904	**<0,001**	**<0,001**	0,705
	11.tj.	1wA	37,6	**<0,001**	0,776	**<0,001**	**<0,001**	0,072
HDL	9.tj.	1wA	14,5	**<0,001**	0,765	**<0,001**	**<0,001**	0,976
Glukoza	5.tj	1wA	12.4	**<0,001**	0,236	**0.033**	**<0,001**	**0.033**
	10.tj	1wA	4.79	**0.007**	0.648	0.293	**0.002**	0.061
Inzulin	10.tj.	KW	10,9	**0,012**	0,651	0,590	**0,003**	**0,037**
HOMA-IR	10.tj	1wA	7,75	**<0,001**	0,941	0,988	**<0,001**	**<0,001**
Glukagon	9.tj.	1wA	5,83	**0,003**	**0,012**	0,145	**0,013**	0,134
Adiponektin	9.tj.	1wA	6,85	**0,001**	**0,022**	0,080	0,398	**0,002**
Leptin	9.tj.	1wA	33,8	**<0,001**	0,737	**<0,001**	**<0,001**	**0,002**
PSL	11.tj	1wA	156	**<0,001**	**<0,001**	0,128	0,272	**<0,001**
PSU	11.tj.	1wA	43,2	**<0,001**	**<0,001**	**0,002**	**0,002**	**<0,001**
Bijelo masno tkivo								
Atgl	11.tj.	KW	0,79	0,852	0,704	0,964	0,687	0,460
Fasn	11.tj.	1wA	2,87	**0,053**	**0,041**	0,047	0,489	0,450

Broj korištenih životinja po skupini naveden je u poglavlju Rezultati.
1wA - jednosmjerna analiza varijanci i Fisherov LSD post-hoc test; KW - Kruskal-Wallisov test i Dunnov post-hoc test;
H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD - 5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima. HDL - lipoproteini visoke gustoće, PSL - razina trombocitnog 5HT, PSU - brzina unosa 5HT u trombocite, HOMA-IR - homeostatski model za procjenu inzulinske rezistencije, Atgl - trigliceridna lipaza masnog tkiva, Fasn - sintaza masnih kiselina,

Tablica 9. Učinak HFD na vrijednosti navedenih funkcionalnih testova provedenih u 10. tjednu HFD prehrane: statistička analiza rezultata.

Parametar		Test	Glavni efekt		Post-hoc test (vrijednost P)			
			vrijednost F ili KW	vrijednost P	H-CD vs. L-CD	H-HFD vs. H-CD	L-HFD vs. L-CD	H-HFD vs. L-HFD
GTT	0. min	1wA	4,79	**0,007**	0,648	0,290	**0,002**	0,061
	15. min	1wA	4,38	**0,011**	0,801	0,878	**0,013**	**0,004**
	30. min	1wA	3,05	**0,044**	0,407	0,892	**0,007**	0,060
	60. min	1wA	7,91	**<0,001**	**0,036**	**0,017**	**0,004**	0,091
	90. min	1wA	8,70	**<0,001**	**0,003**	0,155	**0,005**	0,079
	120. min	1wA	9,04	**<0,001**	**0,028**	**0,009**	**0,008**	**0,022**
	AUC	1wA	3,47	**0,028**	0,079	0,247	**0,018**	0,576
ITT	15. min	1wA	1,69	0,189	0,144	0,441	0,164	0,397
	30. min	1wA	6,03	**0,002**	**<0,001**	0,986	**0,022**	0,166
	60. min	KW	12,9	**0,005**	**0,008**	0,491	**0,003**	0,731
	90. min	1wA	2,20	0,110	0,135	0,572	**0,022**	0,713
	150. min	1wA	1,05	0,384	0,940	0,827	0,231	0,118
	240. min	1wA	5,22	**0,005**	0,141	0,080	**0,038**	**0,042**
	AUC	1wA	2,86	0,054	0,065	0,816	**0,008**	0,451
Termografija		1wA	11,4	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**0,002**	0,060

Broj korištenih životinja po skupini naveden je u poglavlju Rezultati.
1wA - jednosmjerna analiza varijanci i Fisherov LSD post-hoc test; KW - Kruskal-Wallisov test i Dunnov post-hoc test;
H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD - 5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima. min. - minuta, AUC - površina ispod krivulje, GTT - test tolerancije glukoze, ITT - test tolerancije inzulina

Tablica 10. Statistička analiza relativne razine mRNA odabranih gena u hipotalamusu WZ-5HT štakora

Gen (NCBI simbol)	Test	Glavni efekt		Post-hoc test (vrijednost p)			
		vrijednost F ili KW	vrijednost P	H-CD vs. L-CD	H-HFD vs. H-CD	L-HFD vs. L-CD	H-HFD vs. L-HFD
Agrp	1wA	5,87	**0,003**	>0,999	0,746	**0,001**	**0,003**
Bdnf	1wA	1,96	0,139	0,636	0,452	0,078	0,152
Cart	1wA	7,89	**<0,001**	0,055	0,240	**<0,001**	0,138
Glut3	1wA	2,06	0,125	0,302	0,264	0,914	0,046
Hcrt	1wA	6,58	**0,001**	0,492	0,663	**0,007**	**<0,001**
Hcrtr	1wA	2,67	0,064	**0,049**	0,538	0,336	0,113
Htr2c	KW	1,50	0,682	0,473	0,737	0,911	0,346
Irs1	1wA	0,43	0,731	0,587	0,601	0,560	0,547
Irs2	1wA	2,55	0,073	0,975	0,059	0,059	0,975
Lepr	1wA	2,48	0,079	0,547	0,257	**0,019**	0,486
Npy	1wA	0,11	0,951	0,586	0,654	0,807	0,881
Npyr	1wA	4,41	**0,011**	0,431	**0,007**	**0,043**	>0,999
Pomc	KW	3,13	0,371	0,231	0,317	0,144	0,204
Ppargc1b	1wA	0,82	0,488	0,936	0,984	0,998	0,523
Sert	1wA	3,61	0,024	**0,005**	**0,023**	0,487	0,905

1wA - jednosmjerna analiza varijanci i Fisherov LSD post-hoc test; KW - Kruskal-Wallisov test i Dunnov post-hoc test;
H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD - 5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima.

Tablica 11. Statistička analiza relativne razine mRNA odabranih gena u gonadnom bijelom i smeđem masnom tkivu WZ-5HT štakora

Gen (NCBI simbol)	Test	Glavni efekt		Post-hoc test (vrijednost p)			
		vrijednost F ili KW	vrijednost P	H-CD vs. L-CD	H-HFD vs. H-CD	L-HFD vs. L-CD	H-HFD vs. L-HFD
Gonadno bijelo masno tkivo							
Adipoq	1wA	2,14	0,114	0,054	0,948	0,706	0,131
Atgl	1wA	6,73	**0,001**	0,794	**0,001**	**0,020**	0,177
Cebpa	KW	0,25	0,968	0,840	0,614	0,973	0,788
Cebpd	1wA	1,43	0,251	0,285	0,361	0,554	0,184
Fabp4	1wA	20,9	**<0,001**	0,336	**<0,001**	**<0,001**	0,310
Fasn	1wA	53,0	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	0,778
Fgf10	1wA	25,6	**<0,001**	**0,011**	**<0,001**	**<0,001**	**0,007**
Fgf21	1wA	13,0	**<0,001**	0,078	0,257	**<0,001**	**<0,001**
Glut1	KW	21,0	**<0,001**	0,105	0,065	0,453	**<0,001**
Glut4	KW	26,2	**<0,001**	0,434	**0,001**	**<0,001**	0,929
Htr2a	1wA	8,83	**<0,001**	**0,021**	**0,020**	**<0,001**	0,272
Htr2b	KW	1,65	0,648	0,330	0,893	0,293	0,955
Insr	1wA	0,87	0,467	0,463	**0,048**	0,832	0,280
Irs1	1wA	0,65	0,588	0,192	0,350	0,730	0,972
Irs2	1wA	16,2	**<0,001**	**0,003**	0,244	0,068	**<0,001**
Lep	1wA	6,90	**0,001**	0,107	0,141	**<0,001**	0,277
Lipe	1wA	2,10	0,120	0,619	0,081	0,694	0,066
Lpl	1wA	3,60	**0,024**	0,138	0,095	0,052	0,230
Maoa	1wA	10,8	**<0,001**	0,264	**0,003**	**<0,001**	**0,043**
Maob	1wA	22,1	**<0,001**	**0,019**	**<0,001**	**<0,001**	**0,003**
Retn	1wA	8,59	**<0,001**	0,384	**0,002**	**0,001**	0,498
Sert	1wA	1,09	0,365	0,253	0,540	0,313	0,453
Tnf	1wA	1,22	0,316	0,975	0,995	0,829	0,289
Tph1	1wA	4,16	**0,013**	0,342	0,520	**0,025**	**0,012**
Vegfa	1wA	0,07	0,972	0,892	0,798	0,737	0,652
Wnt10b	1wA	3,81	**0,019**	0,053	0,119	0,189	0,090
Smeđe masno tkivo							
Ucp1	1wA	49,50	**<0,001**	0,896	**<0,001**	**<0,001**	0,466

1wA - jednosmjerna analiza varijanci i Fisherov LSD post-hoc test; KW - Kruskal-Wallisov test i Dunnov post-hoc test;

H-CD - 5HT-visoke životinje, standardna prehrana; H-HFD - 5HT-visoke životinje, prehrana bogata mastima; L-CD - 5HT-niske životinje, standardna prehrana; L-HFD - 5HT-niske životinje, prehrana bogata mastima.

9. ŽIVOTOPIS

Petra Baković rođena je 1990. godine u Trogiru. U Kaštelima je završila osnovnu školu, a u Splitu je završila Zdravstvenu školu, smjer zdravstveno-laboratorijski tehničar. 2009. godine upisuje preddiplomski studij biotehnologije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Na istom fakultetu 2013. godine upisuje diplomski studij molekularne biotehnologije. Na drugoj godini diplomskog studija uključuje se u dvostruki diplomski studij biondustrijske tehnike, u organizaciji Sveučilišta u Zagrebu i Sveučilišta u Orleans-u (Francuska). U sklopu ovog programa, provela je 6 mjeseci u Nacionalnom centru za znanstvena istraživanja (Centre national de la recherche scientifique-Centre de Biophysique Moléculaire), u Francuskoj, u svrhu izrade diplomskog rada pod naslovom „Molekularna farmakologija serotoninskog 5-HT_6 receptora, terapeutske mete u kognitivnim poremećajima: funkcionalne studije *in vitro* i *in vivo*“, pod vodstvom mentorice dr.sc. Severine Morisset-Lopez.

Godine 2016. godine zapošljava se kao asistent na Medicinskom fakultetu u Splitu, u Laboratoriju za istraživanje sluha i govora, a zatim se 2017. godine zapošljava kao asistent u Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju, voditeljice dr. sc. Lipe Čičin-Šain, Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković.

Sudjelovala je na više znanstveno-istraživačkih projekata: „Serotonergična modulacija pretilosti: međuovisnost regulatornih mehanizama i putova” (HrZZ, 2017.-2020.) u sklopu kojega je izradila i doktorsku disertaciju; „Utjecaj majčinog metaboličkog stanja na serotoninski sustav posteljice i neonatusa: od metilacije DNA do funkcije proteina“ (HrZZ, 2018.-2021.); „Povezanost majčinog emocionalnog stanja u trudnoći i placentarne metilacije DNA gena uključenih u regulaciju serotoninske signalizacije“ (HKS, 2017-2018.).

Dobitnica je FEBS stipendije za sudjelovanje na 45. FEBS-ovom (Federation of European Biochemical Societies, 2021.) kongresu i forumu mladih znanstvenika (2021.) te stipendije za rad na projektu „EVOna“ (ASOO-EU socijalni fond, 2016.)

U sklopu znanstvenog usavršavanja provela je 5 tjedana na studijskom boravku u Istraživačkom centru za vaskularnu biologiju, imunologiju i inflamaciju, Medicinskog sveučilišta u Grazu, Austrija (2020.). Također je završila dva stručna tečaja: LabAnim - tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama, kategorija B - istraživači (Zagreb, 2017.) i tečaj o dopunskoj izobrazbi o primjeni mjera zaštite od ionizirajućeg zračenja (Zagreb, 2017.).

Članica je Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju. Prva je autorica 1 objavljenog (i još jednog u) i koautorica je 1 objavljenog znanstvenog članka te 9 kongresnih priopćenja (prezentirajući autor na 4).

Objavljeni radovi:

Kesić M*, Baković P*, Stojković R, Štefulj J, Čičin-Šain L (2021) Metabolic disturbances in rat sublines with constitutionally altered serotonin homeostasis. Int. J. Mol. Sci. 22: 5400.

Kesić M, Baković P, Proust BLJ, Horvatiček M, Štefulj J, Čičin-Šain L (2020) Constitutionally High Serotonin Tone Favors Obesity: Study on Rat Sublines With Altered Serotonin Homeostasis. Front Neurosci 14: 219.

*dijeljeno prvo autorstvo

Odabrana kongresna priopćenja:

Baković P, Kesić M, Proust BLJ, Štefulj J, Čičin-Šain L (2019) Effects of high-fat diet on glucose and lipid metabolism in rats with constitutionally altered serotonin homeostasis. Book of Abstract of the Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology "Crossroads in Life Sciences", Lovran, Hrvatska. 67

Kesić M, Baković P, Kolarić D, Štefulj J, Čičin-Šain L (2019) Adaptive thermogenesis in brown adipose tissue is affected by constitutive serotonergic tone: study on Wistar-Zagreb 5HT rat model. 26th Congress, Glasgow, April-May 2019: Abstracts. European Congress on Obesity (ECO2019), Glasgow, Škotska, 41.

Baković P, Kesić M, Proust B, Štefulj J, Čičin-Šain L (2018) Wistar-Zagreb serotonin (WZ-5HT) rats - a new animal model of obesity. Pokusne životinje u znanstvenim istraživanjima 2018, 3. znanstveno-stručni simpozij Hrvatskoga društva za znanost o laboratorijskim životinjama, 2. zajednički skup CroLASA-e i SLAS-a s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, Hrvatska, 34.

Baković P, Kesić M, Proust BLJ, Štefulj J, Čičin-Šain L (2018) Functional and molecular response of rats with constitutionally altered serotonin homeostasis to high-fat diet. Book of Abstract of FEBS3+ ″From molecules to living systems″, Siofok, Hungary, 220.

Baković P, Štefulj J, Kesić M, Čičin-Šain L (2017) Glucose dysregulation in obesity: studies in rats with constitutionally altered serotonin homeostasis. Book of Abstracts ″The 6th Croatian Neuroscience Congress with International Participation″. Osijek, Hrvatska, 73