

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

UTJECAJ KALORIJSKE RESTRIKCIJE NA FIZIOLOGIJU I
METABOLIZAM ČOVJEKA
EFFECTS OF CALORIC RESTRICTION ON HUMAN PHYSIOLOGY AND
METABOLISM
SEMINARSKI RAD

Josipa Cecić Vidoš

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Zagreb, 2019.

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TIPOVI KALORIJSKE RESTRIKCIJE	1
3. KALORIJSKA RESTRIKCIJA	3
3.1. Utjecaj CR-a na metabolizam i molekularnu signalizaciju u stanici	3
3.1.1. Autofagija i uloga mTORC1 proteina	4
3.1.2. Modifikacije mitohondrija i oksidacijski stres	5
3.2. Utjecaj CR-a na tumore i upalne procese	7
3.3. Utjecaj CR-a na pretilost i dijabetes	10
3.4. Utjecaj CR-a na kardiovaskularno zdravlje	11
4. VREMENSKI OGRANIČENO HRANJENJE	12
4.1. Utjecaj TRF-a na cirkadijarne ritmove	12
4.2. Utjecaj TRF-a općenito	13
4.2.1. Tjelesna masa i lipidni parametri u krvnoj plazmi	14
4.2.2. Glukoza, inzulin i inzulinska rezistencija	15
4.2.3. Faktori upale	15
5. ZAKLJUČCI	15
6. LITERATURA	16
7. SAŽETAK	22
8. SUMMARY	22

1. UVOD

Starenje je kompleksan proces akumulacije molekularnih, staničnih i tkivnih oštećenja koja dovode do gubitka funkcije, podložnosti organizma bolestima i smrti. Primarni cilj istraživanja na temu starenja ili dugovječnosti je poboljšati zdravlje starijih ljudi i testirati te poduzeti mjere koje bi dovele do prevencije, odgode ili ublažavanja bolesti povezanih sa starenjem ¹. Jedan dio podataka prikupljen je i u ljudskoj populaciji. Istraživanja na tu temu dala su rezultate koji ukazuju da je promjenom načina prehrane i smanjenjem unosa kalorija moguće produljiti životni vijek ². Većina istraživanja temelji se na eksperimentalnim modelnim organizmima. Jedno od prvotnih istraživanja kalorijske restrikcije (engl. *caloric restriction*, CR) koje je pokazalo da takav način prehrane produljuje život u štakorima i postavilo je temelje za mnoga nova istraživanja koja su pokazala slične rezultate i u nekim drugim vrstama poput kvasaca, primata, ostalih glodavaca, muha i crva ^{3,4}. Znanstvenici su proučavali određene populacije ljudi koji slučajno ili s namjerom prakticiraju nekakav oblik CR-a ⁵. Istraživanja su uključivala populacije ljudi koje su provodile religijski post (muslimani tijekom Ramazana, članovi ortodoksne grčke Crkve i kršćani na Danijelovom postu), stanovnike japanskog otoka Okinawe i članove eksperimenta Biosphere 2 ⁵. Zajedničko svim ovim skupinama je smanjenje tjelesne težine, manja BMI vrijednost, smanjeni kolesterol, LDL, krvni tlak, inzulin i rizik od bolesti povezanih sa starenjem. Proučavanjem ovih populacija nije utvrđen utjecaj na produljenje života (zbog dugog životnog vijeka ljudi), ali imaju najveći udio stogodišnjaka što bi moglo upućivati na to ^{5,6}. Daljnja istraživanja išla su smjeru istraživanja idealnog i lako održivog načina prehrane koji bi imao iste efekte kao i CR te je utvrđeno kako je varijacijom veličine i frekvencije obroka moguće dobiti iste rezultate.

2. TIPOVI KALORIJSKE RESTRIKCIJE

Uz CR postoje još tri najpoznatija režima prehrane koja su eksperimentalno dala pozitivne rezultate, a to su vremenski ograničeno hranjenje (engl. *time-restricted feeding*, TRF), periodični post (engl. *intermittent fasting*, periodic fasting, IF) i dijeta koja oponaša post (engl. *fast-mimicking diet*, FMD). CR podrazumijeva dnevni kalorijski unos smanjen za 15-40%, ali bez pothranjenosti ¹. U eksperimentima koji koriste životinje postotak CR-a određuje se u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Osim navedene pojave produljenja života u miševa i drugih modelnih organizama, CR također utječe na patofiziološke promjene povezane sa starenjem tako što smanjuje stopu metabolizma i oštećenja nastalih oksidacijskim stresom, poboljšava stanični promet i homeostazu proteina, te također pozitivno utječe na metaboličke

poremećaje poput pretilosti, inzulinske rezistencije, dislipidemije i povećanog krvnog tlaka, a pokazano je kako ima utjecaja i na razvoj tumora ⁷⁻¹⁰.

Vremenski ograničeno hranjenje (TRF) je režim prehrane koji ograničava unos hrane na 4-12 sati dnevno bez redukcije kalorijskog unosa ¹. Zasad ne postoje dokazi da TRF utječe na dugovječnost života, ali ovakav način prehrane bi mogao biti rješenje za jedan od najvećih metaboličkih problema koje uzrokuje „zapadnjačka“ dijeta (hrana s visokim udjelom masti i ugljikohidrata, rafinirani šećer), a to je pretilost ¹¹. TRF pomaže u smanjenju tjelesne težine, povećava potrošnju energije, poboljšava kontrolu količine glukoze, smanjuje količinu inzulina i masti u krvi te ublažava upalne procese ^{12,13}. Vrlo važno je naglasiti da TRF utječe i na cirkadijarni ritam organizma odnosno na ekspresiju gena reguliranih vremenom koji omogućuju odgovor organizma na okolišne promjene što je opaženo proučavajući glodavce tj. mišje mutante za neki od regulacijskih gena za cirkadijarne ritmove ¹⁴. Istraživanja ukazuju kako bi TRF bio najviše efektivan važan je relativan odnos vremenskog okvira hranjenja i cirkadijarnog ritma organizama.

Periodični post (IF) podrazumijeva alterniranje 24 sata posta i 24 sata normalnog kalorijskog unosa ili 2 dana posta s 5 dana normalnog kalorijskog unosa. Isti efekt se može postići i ukoliko se u danima posta unosi 25% dnevnog kalorijskog unosa. Evolucijski gledano IF tj. post je prirodni fenomen kojim su životinje, a i ljudi bili izloženi u vremenu kad su morali uhvatiti plijen kako bi se prehranili te su u međuvremenu prisilno postili. U današnjem vremenu ljudi žive sjedilačkim životom što je omogućilo uzimanje visoko kaloričnih obroka čim se pojavi nagon gladi, a to rezultira pojavom pretilosti te izbjegavanjem pozitivnih učinaka koje nosi post ¹⁵. Potvrđeno je da IF u miševima ima utjecaj na dugovječnost, prevenira pretilost, kardiovaskularne bolesti, povišeni krvni tlak, dijabetes i neurodegenerativne bolesti ^{15,16}. Zanimljivo je i da usporava rast tumora te povećava osjetljivost tumora na kemoterapiju ¹⁷. Također, poznato je i da povećava osjetljivost na inzulin te poboljšava rad mozga što je pokazano testovima kognitivnih sposobnosti koji su kao rezultat dali povećanu plastičnosti neurona i poticanje živčanih matičnih stanica na diferencijaciju ¹⁸. Sličan efekt je dokazan i na miševima koji su izloženi ketogenoj prehrani baziranoj na mastima ¹⁹. Klinička istraživanja na ljudima potvrdila su smanjenje kilaže, smanjenje hipertenzije, povećanje inzulinske osjetljivosti te pacijenti koji su primali kemoterapiju tijekom IF-a imali su smanjene nuspojave kemoterapije, a u tom slučaju dolazi do selektivnosti u ubijanju tumorskih stanica i očuvanju zdravih normalnih stanica ²⁰.

Posljednja varijacija prehrane je FMD tj. post-oponašajuća dijeta koja obuhvaća mnogo različitih načina prehrane koji imaju kao posljedicu efekte navedene kod prijašnjih načina prehrane. FMD su osmišljene zbog toga što je CR, TRF i IF teško održavati na duge staze kod ljudi. Bazira se na manjem unosu ugljikohidrata i povećanom unosu masti na način da se izbjegnu periodi bez unosa kalorija. Efekti navedeni za prethodne varijacije prehrane vrijede i za FMD te je još važno istaknuti i to da pomaže ublažavanju simptoma nekih autoimunih bolesti kao što je multipla skleroza preko regulacije imunskog sustava ⁶. Cilj ovog završnog seminara je objediniti eksperimentalne podatke koji pokazuju utjecaj kalorijske restrikcije (CR) i vremenski ograničenog hranjenja (TRF) na ljudsku fiziologiju te objasniti molekularne mehanizme koji stoje iza toga.

3. KALORIJSKA RESTRIKCIJA

3.1. Utjecaj CR-a na metabolizam i molekularnu signalizaciju u stanicima

Starenje je biološki proces kojeg na staničnoj razini obilježava progresivna akumulacija disfunkcionalnih proteina i oštećenja organela ²¹. Navedene promjene uključuju genomsku nestabilnost, skraćivanje telomera, epigenetske promjene, narušavanje proteostaze, promjene u osjećaju za količinu nutrijenata, disfunkcionalnost mitohondrija, stanično starenje, iscrpljivanje matičnih stanica i promjene u međustaničnoj komunikaciji ²². Starenje kao proces pogađa različite organe i karakterizira ga oboljevanje od kroničnih bolesti uzrokovano mehanizmima koji potiču isto. Smatra se da je CR jedna od najuspješnijih intervencija koje odgađaju progresiju starenja i razvoj kroničnih bolesti povezanih sa starenjem što je pokazano na različitim modelnim organizmima i životinjama ²². CR kao intervencija za produljenje života potencijalno mijenja raspodjelu energije i usmjerava energiju od reproduktivnih i biosintetskih procesa te prema procesima koji uključuju održavanje i popravak ²³. Mnogi znanstvenici smatraju da CR djeluje kao umjereni stres na organizam što uzrokuje adaptaciju stanica i organizma te prevenira veću štetu koja bi nastala kao posljedica većeg stresa ²². U vezi s time je i teorija „mitohormeze“ koja kaže da indukcijom mitohondrijskog metabolizma i povećanim stvaranjem reaktivnih kisikovih vrsta (RKV) pokreće aktivni obrambeni mehanizam koji rezultira povećanom rezistencijom na stres i moguće povećava životni vijek ²⁴. Postoji više mehanizama preko kojih CR utječe na dugovječnost i kvalitetu života. Jedan od mehanizama za rješavanje problema nakupljenih proteina u stanici što dovodi do nefunkcionalnosti istih je autofagija koju potiče CR ²¹. Smatralo se da CR smanjuje stopu metabolizma po jedinici mase tkiva i količinu RKV-a koji nastaju oksidativnom fosforilacijom u mitohondriju te oštećuju molekulu DNA, lipide i proteine, ali istina je da to

nije posve točno te da nije do kraja razjašnjen točan mehanizam kojim CR umanjuje štetu izazvanu oksidacijskim stresom za što su potrebna daljnja istraživanja ^{8,25}.

3.1.1. Autofagija i uloga mTORC1 proteina

Autofagija je evolucijski konzerviran proces odgovoran za degradaciju pogrešno smotanih proteina koji tvore agregate i oštećenih organela što ima jako veliki utjecaj na održavanje homeostaze stanice i na dugovječnost ²⁶. Provedena istraživanja su pokazala kako pojačana autofagija produljuje život i da ometanje autofagije smanjuje životni vijek kod modelnih organizama ²¹. Pozanto je i da se autofagna aktivnost smanjuje prirodno s godinama i zato se u vezu sa starenjem dovodi nakupljanje nepotrebnih staničnih komponenata ²⁶. Protein mTORC1 je inhibitor autofagije i njegovom inhibicijom dokazano je produljenje života kod animalnih modelnih organizama i staničnih modela ²⁷. To je središnja stanična kinaza koja regulira stanični rast i sintezu proteina u stanici. Njegova aktivnost potaknuta je nutrijentima, mehaničkim stresom i faktorima rasta, a inhibira ga energetske stres i manjak nutrijenata ²¹.

mTORC1 ima dualnu ulogu koja rezultira štetnom akumulacijom citosolnih proteina koje povezujemo sa starenjem jer istodobno potiče sintezu proteina i inhibira autofagnu degradaciju istih ²⁷. Važno je napomenuti kako postoje tri puta autofagije ovisna o lizosomalnoj razgradnji, a to su: autofagija potpomognuta šaperonima, mikroautofagija i makroautofagija ²⁸. Makroautofagija je dosad najbolje proučena te će se u daljnjem tekstu mehanizam i veza s CR odnositi na istu. Postoji skupina gena povezanih s autofagijom (engl. *autophagy-related genes*, Atgs) čiji produkti su važni za formiranje autofagosoma te su ključni za normalnu autofagnu aktivnost ²⁸. mTORC1 negativno regulira autofagiju hiperfosforilacijom Atg13 i Atg1 (ULK1 kod sisavaca) što onemogućuje njihovu interakciju te inicijaciju stvaranja autofagosoma ²⁹. Također, mTORC1 inhibira autofagiju i na razini transkripcije, fosforilacijom transkripcijskog faktora TFEB na lizosomalnoj membrani što sprječava njegovu translokaciju u jezgru te transkripciju Atg-ova ³⁰. Nije poznato produljuje li supresija mTORC1-a životni vijek direktno povećavajući autofagiju, smanjujući sintezu novih proteina u stanici ili oboje ²⁹. Uočeno je kako dugotrajno prakticanje CR-a potiče autofagiju što rezultira povećanjem broja modulatora i transkripata povezanih s autofagijom ³¹. Autofagija posredovana CR-om se u najvećoj mjeri postiže aktivacijom senzora za nutrijente AMPK i SIRT1 ²⁹. AMPK je kinaza koja je aktivirana tijekom energetske stresa odnosno povećanjem unutarstanične koncentracije AMP-a i ADP-a do čega može doći tijekom tjele vježbe ili manjka nutrijenata što omogućuje CR ²¹. Navedeni proteini povećavaju aktivnost transkripcijskih faktora koji su uključeni u ekspresiju gena FOXO1 i

FOXO3 koji pripadaju Atg-ovima te inhibiraju TORC1²¹. Tijekom starvacije, mTORC1 disocira s lizosoma te otpušta transkripcijski faktor TFEB kojeg defosforilira kalcineurin, kojeg aktivira kalcij otpušten iz lizosoma, pa TFEB odlazi u jezgru gdje potiče početak transkripcije brojnih Atg-ova koji potiču autofagiju³². Inhibicijom autofagije dolazi do smanjenja učinka CR-a na produljenje životnog vijeka³³. CR može smanjiti poremećaje autofagije do kojih dolazi starenjem i smatra se da do toga dolazi barem djelomično inhibicijom TORC1-a što ublažava utjecaj koji on inače ima na autofagiju te da dovodi i do povećanja aktivnosti AMPK i SIRT1-a²¹. Nije poznat mehanizam kojim TORC1 djeluje na SIRT1, ali pretpostavlja se da SIRT1 interagira s TSC2 koji je inhibitor TORC1-a²¹. S druge strane, mehanizam i veza AMPK-a i TORC1-a je jako dobro razjašnjena. AMPK umanjuje aktivnost TORC1-a na barem dva načina. Jedan je aktivacija TSC2 koji spriječava vezanje TORC1-a na aktivator (Rheb) na membrani lizosoma, a drugi način je direktna inhibicija fosforilacijom RAPTOR-a, primarnog regulatornog proteinskog kompleksa TORC1-a³⁴. Uz SIRT1 i AMPK, CR može potaknuti autofagiju inhibicijom IGF-a što rezultira inhibicijom TORC1-a³⁵. Kod ljudi koji prakticiraju CR (smanjen normalni dnevni unos kalorija za 30%) zabilježen je povećan broj posrednika autofagije uključujući obitelji SIRT i AMPK, ULK1 te FOXO-a u odnosu na ljude koji prakticiraju tipičnu „zapadnjačku dijetu“³¹. Također je uočeno kako utišavanje TORC1-a potiče dugovječnost više nego sam CR i da utišavanje Atg-ova poništava efekte izazvane rapamicinom što ukazuje da postoji veza između TORC1-a i autofagije u kontekstu starenja jer je rapamicin jaki inhibitor TORC1-a za koji je poznato da potiče autofagiju u normalnim uvjetima^{27,33}.

3.1.2. Modifikacije mitohondrija i oksidacijski stres

Teorija slobodnih radikala kaže da veliki utjecaj na dugovječnost ima nastanak reaktivnih kisikovih vrsta (RKV) koji nastaju kao nusprodukti staničnog disanja²⁵. U stanici je važna ravnoteža između koncentracije RKV-a i antioksidacijskih enzima kao što su superoksid dismutaze (engl. *superoxide dismutases*, SODs) kako bi se održao reducirajući okoliš²⁵. Neravnoteža navedenih spojeva rezultira oksidacijskim stresom, a akumulacija istog smatra se kao jedan od glavnih razloga starenja²⁵. Istraživanja na različitim životinjama pokazuju kako one sa smanjenom stopom oksidacijskog stresa, kao što su životinje koje se hrane po CR režimu, imaju dulji životni vijek dok životinje koje imaju veću stopu oksidacijskog stresa, primjerice miševi koji nemaju SOD-ove, žive kraće²⁵. Postoje mnoge teorije koje objašnjavaju djelovanje CR-a na dugovječnost baziranih na zaštiti stanica od povećanog oksidacijskog stresa, ali nije jasan mehanizam kojim CR utječe na antioksidativnu aktivnost u

stanicama ²². Postavlja se pitanje utječe li CR na koncentraciju antioksidativnih enzima u stanici ili na neki drugi način modificira aktivnost istih. Dosadašnja istraživanja pokazuju kako prekomjerna ekspresija antioksidansa nema utjecaja na dugovječnost što dovodi u sumnju utjecaj CR-a na koncentraciju antioksidativnih enzima stanicama ³⁶. Važno je napomenuti kako veća koncentracija antioksidansa ne znači nužno veću zaštitu što se mora uzeti u obzir ²². Također različita istraživanja pokazuju da je utjecaj CR-a na antioksidativnu aktivnost ovisan o organu koji se koristi za istraživanje te bi istraživanja trebala uključiti što više različitih organa kako bi se utvrdio pravi utjecaj CR-a na antioksidacijske enzime ³⁷. Iako se smatralo da CR produljuje život tako što usporava metabolizam i reducira količinu RKV-a u mitohondrijima to ipak nije točno jer je dokazano da ne dolazi do smanjenja stope metabolizma u miševima koji se hrane po CR-u (za 30-40% smanjeni dnevni unos kalorija u odnosu na kontrolu) te da čak dolazi do povećane aktivnosti u mitohondrijima ³⁸. Molekularni mehanizam koji stoji iza redukcije oksidacijskog stresa potaknutog CR-om ostaje nedostižan ²⁵. Protein Sir2 kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae* i vinske mušice *Drosophila melanogaster* ima povećanu aktivnost i pokazano je da produljuje životni vijek ovih dvaju vrsta ^{39,40}. Sir2 ima NAD⁺-ovisnu deacetilaznu aktivnost. Rezultati ovih istraživanja sugeriraju da funkcija Sir2 kao posrednika CR-a postoji i kod sisavaca. Ortolog Sir2 kod sisavaca, SIRT1, se pojačano eksprimira u mnogim tkivima kod miševa koji se hrane po CR-u ²⁵. Poznavajući ulogu Sir2 kao posrednika odgovora organizma na CR i informacije da životinje na CR-u imaju smanjeni oksidativni stres znanstvenici su posumnjali da i kod sisavaca homolozi Sir2-a mogu imati ulogu u regulaciji oksidacijskog stresa te su se okrenuli istraživanju mitohondrijskog proteina SIRT3 pošto 90% RKV-a nastaje u mitohondriju ⁴¹. Poznato je da CR inducira povećanu ekspresiju proteina SIRT3, a SIRT3 je NAD⁺-ovisna deacetilaza koja aktivira mitohondrijski antioksidacijski enzim SOD2 te njegova aktivacija smanjuje oksidacijski stres ^{25,42}. Aktivacija SOD2 i povećana rezistencija povezana je s brojnim dugoživućim mišjim modelnim organizmima ⁴³. Povećana ekspresija proteina SOD2 može samo umjereno reducirati koncentraciju RKV-a, ali deacetilacijom značajno se pojačava sposobnost enzima da reducira RKV-ove u stanici, a deacetilira ga SIRT3 ²⁵. Ovi dokazi idu u prilog teoriji mitohondrijske hormeze te je moguće kako je aktivacija SIRT3-a kod životinja koje se hrane po CR-u ključni korak tog obrambenog mehanizma o kojem govori teorija „mitohormeze“ ²⁵. Neki znanstvenici se ne slažu s ovim mehanizmom aktivacije SIRT3-a i deacetilacije SOD2 i smatraju da CR smanjuje membranski potencijal mitohondrija i nastanak RKV-a te da u isto vrijeme modificira i omjer zasićenih i nezasićenih molekula u mitohondrijskoj membrani što prevenira oštećenja izazvana oksidacijskim stresom i održava

fluidnost membrane ²². CR smanjuje stvaranje vodikovog peroksida na kompleksima I i II u mišićima i u jetri što je pokazano na miševima soja C57BL/6 nakon samo jednog mjeseca 40%-tnog CR-a ²².

3.2. Utjecaj CR-a na tumore i upalne procese

Tijekom proteklih nekoliko godina došlo je do otkrića da okolišni faktori i stil života utječu na inicijaciju, proliferaciju i progresiju tumora što sugerira kako je moguće utjecati i prevenirati malignosti. Pokazano je kako na pojavu nekih tumora moguće utječe pretilost, smanjena fizička aktivnost i nezdrava prehrana te kako je CR efektivan u prevenciji tumora u laboratorijskim glodavcima i majmunima ⁴⁴. Antitumorsko djelovanje nije dokazano kod ljudi, ali postoje rezultati koji pokazuju smanjenje koncentracije faktora rasta, anaboličnih hormona, upalnih citokina i markera oksidacijskog stresa koji se povezuju s raznim malignostima ⁴⁴. Tumor je kompleksna bolest povezana s akumulacijom mutacija u kritičnim genima (onkogeni ili tumor-supresijski geni) koje uzrokuju poremećaje u regulaciji proliferacije i diferencijacije stanica, organizaciji tkiva, a naposljetku dovodi do invazije i dislokacije tkiva transformacijom normalnih u zloćudne tumorske stanice. Noviji podatci sugeriraju da na invaziju tkiva, proliferaciju i metastaziranje tumora utječu mikrookoliš i interakcije između stanica tumora i stanica koje ih okružuju ⁴⁴. Brojni okolišni faktori i način života djeluju na regulaciju ekspresije gena za popravak DNA, staničnu proliferaciju i diferencijaciju ili apoptozu što omogućuje akumulaciju mutacija u stanicama koje pod permisivnim uvjetima prolaze transformaciju u zloćudne tumorske stanice ⁴⁵. Izlaganje nekim negenotoksičnim kancerogenima, upalni procesi, povećani oksidacijski stres i sekrecija anaboličkih hormona, imunosupresija i aktivacija puta prijenosa signala rezultiraju genomskom nestabilnosti, gubitkom kontrole proliferacije, rezistencijom na apoptozu i moguće tumorom ⁴⁶. CR, osim što potiče autofagiju, potiče i neke procese popravka DNA te je potencijalna i reproducibilna fiziološka intervencija za zaštitu od tumora u sisavaca ⁹. Razumijevanje metaboličkih i molekularnih mehanizama odgovornih za prevenciju tumora potaknutih CR-om vodi ka otkriću lijekova i terapija za prevenciju i tretiranje tumora. Utjecaj CR-a na tumore nije isti za pojedini tumor. Neki pokazuju bolji odgovor na CR od drugih, a postoje i neki koji su otporni na efekte CR-a ⁴⁴. Antitumorsko djelovanje CR-a je značajno smanjeno u mišjim mutantima za Nrf2 koji su bili izloženi kancerogenima ⁴⁷. Aktivacija transkripcijskog faktora Nrf2 potiče transkripciju različitih antioksidativnih i kancerogen-detoksikacijskih enzima što bi moglo biti važno i povezano s antitumorskim utjecajem CR-a. Patuljasti miševi sa smanjenom inzulin/IGF-1 signalizacijom (utišavanje gena za IGF-1 i IGF-

I receptor) žive dulje i imaju smanjenu stopu oboljenja od tumora povezanih sa starenjem što bi moglo biti povezano s boljom otpornošću na oksidacijski stres kod miševa na CR-u ⁴⁴. Miševi s utišanim genom za Mn-superoksid dismutazu imaju povećane razine oksidativnih oštećenja DNA čime se povećava vjerojatnost oboljenja od tumora ⁴⁴. Ovakvi podatci ukazuju da je veza između oksidativnog stresa, tumora i starenja kompleksna.

Utjecaj CR-a na razinu glukoze mogao bi djelovati izravno antitumorski. Tumorske stanice prolaze reprogramiranje metabolizma u odnosu na normalne stanice što rezultira ovisnošću o protoku glukoze kroz glikolizu te je moguće da pretumorske i tumorske stanice koje prolaze takve promjene u metabolizmu imaju povećanu osjetljivost na smanjenu koncentraciju glukoze u krvi izazvanu CR-om ⁴⁸. Peptidni hormon inzulin koji se proizvodi u β -stanicama gušterače oslobađa se kao odgovor na hiperglikemiju koja je povezana s inzulinskom rezistencijom, neuobičajenim metabolizmom glukoze, kroničnom upalom i sintezom drugih metaboličkih hormona kao što je IGF-1, leptin i adiponektin. Klinička i epidemiološka istraživanja su pokazala kako je povećana koncentracija inzulina povezana s povećanim rizikom od obolijevanja ili progresije raka dojke, endometrija, crijeva, bubrega i gušterače te da utječe i na povećanje koncentracije IGF-1, faktora kritičnog za rast i razvoj mnogih tkiva ⁴⁸. IGF-1 se obično veže za IGF-vezujuće proteine (IGFBP) koji reguliraju količinu slobodnog IGF-1-a u cirkulaciji koji je dostupan da potakne signalizaciju za rast ili opstanak. Povećani IGF-1 u krvi je povezan s nastankom tumora ⁴⁸. Smanjenje inzulina i IGF-1-a kao odgovor na CR je barem djelomično povezan sa smanjenim razinama glukoze u organizmu ⁴⁸. Hiperinzulinemija, koja obično dolazi s pretilosti, rezultira povećanom razinom inzulina u cirkulaciji kao odgovor na hiperglikemiju koja povećava koncentraciju receptora za faktor rasta (GHR) i potiče signalizaciju GHR-a što pojačava sintezu IGF-1-a ⁴⁸. Inzulinska rezistencija i hiperinzulinemija se povezuju sa utišavanjem sinteze IGFBP-ova što povećava razinu dostupnog IGF-1-a. CR poboljšava inzulinsku osjetljivost i normalizira razinu glukoze što rezultira smanjenjem inzulina u krvi, povećanu produkciju IGFBP-ova (posebno IGFBP1 i IGFBP3) i stoga smanjuje razinu dostupnog IGF-1-a. Inzulin može pokrenuti signalni put preko dvije izoforme inzulnskog receptora (IR), IR-A i IR-B od kojih se IR-A eksprimira u mnogim tumorskim stanicama te signalizacija preko tog receptora rezultira mitogenim učinkom i aktivira metabolički signalni put ⁴⁸. Stanice koje ekspimiraju IR-ove i receptore za IGF-1 (IGF-IR) mogu ekspimirati i hibride tih dvaju receptora na koje se veže IGF-1, a inzulin nema afinitet za takve hibride te ekspresija IR-A u tumorskim stanicama dopušta povećano formiranje tih hibridnih receptora i olakšava mitogeničku signalizaciju IGF-1-a ⁴⁸.

Kod epitelnih tumora najčešći signalni put koji se aktivira je PI3K/Akt put kojeg mogu aktivirati i inzulin i IGF-1. Ovaj put uključuje mTOR koji je već spomenut u poglavlju o autofagiji te je njegova aktivnost obično povećana u tumorskim i normalnim stanicama pretilih miševa ili miševa s dijabetesom dok CR smanjuje signalizaciju mTOR-a u tim istim tkivima. Uz Akt, povećana koncentracija AMPK-a do koje dolazi uslijed smanjenog unosa nutrijenata (CR) inhibira aktivaciju mTOR-a, a poznato je i da specifični inhibitori mTOR-a sprječavaju tumorigenezu povezanu s pretilošću ⁴⁹. Prakticiranje CR-a vodi i povećanoj koncentraciji adiponektina, hormona kojeg luči potkožno bijelo adipozno tkivo ⁵⁰. Mogući mehanizam kojim adiponektin djeluje protiv nastanka tumora je povećanje osjetljivosti na inzulin i smanjenje signalizacije inzulin/IGF-1 i mTOR-a aktivacijom AMPK. Adiponektin također smanjuje ekspresiju proupalnih citokina inhibicijom NF- κ B-a kojeg izlučuju aktivirane B-stanice ⁴⁸. Kod upalnih procesa i mnogih tumora dolazi do poremećaja u regulaciji JAK/STAT signalnog puta kojeg aktivira leptin, hormon kojeg sintetizira bijelo adipozno tkivo. Leptin služi kao senzor za nutrijente u organizmu te djeluje na centar za glad u hipotalamusu, ima utjecaj na tumorigenezu, angiogenezu, imunosne odgovore, sintezu citokina i druge biološke procese. Kod pretilih ljudi dolazi do sinteze većih koncentracija leptina te se stvara rezistencija na isti, a dodatno sintezu leptina potiču inzulin, glukokortikoidi, TNF- α i estrogeni. CR smanjuje razinu leptina u krvi na način da utječe na smanjenje masnog tkiva koje ga sintetizira. Istraživanja na životinjama *in vitro* pokazuju da postoji veza između omjera leptina i adiponektina u organizmu i nekih tumora, ali su potrebna daljnja istraživanja kako bi došlo do nekih zaključaka ⁴⁸. Pokazano je da 50%-tni CR smanjuje učestalost mamilarnog karcinoma (ženke soja MMTV-TGF- α) te da to ima veze sa smanjenim omjerom leptin/adiponektin ⁵¹.

Kroniču upalu karakteriziraju povećana koncentracija slobodnih masnih kiselina, citokina i kemokina koji privlače imunosne stanice u lokalni mikrookoliš upale ⁴⁸. Kaskada upale je dalje amplificirana oslobađanjem raznih citokina, najviše iz makrofaga, u lokalnu i sistemsku cirkulaciju. Slobodne masne kiseline koje dolaze iz adipocita u cirkulaciju odlažu se u druga tkiva što potiče inzulinsku rezistenciju, dijabetes, steatozu jetre i gušterače, aktivira molekule uključene u epitelnu karcinogenezu kao što su NF- κ B i COX-2 ⁵². Aktivacija NF- κ B je karakteristična za mnoge tumore i povezana je s inzulinskom rezistencijom i povišenim razinama leptina, inzulina ili IGF-1-a ⁴⁸. Upala se danas smatra obilježjem tumora te se kronična „tinjajuća“ upala povezuje s povećanim rizikom od oboljenja ⁴⁸. Kalorijska restrikcija smanjuje broj tumor-infiltrirajućih makrofaga koji potiču inicijaciju i progresiju

tumora, smanjuje razinu citokina u tkivima i cirkulaciji te utječe na razinu NF- κ B i ekspresiju COX-2 u tkivima i različitim tipovima tumora ⁴⁸. Utjecaj CR-a na upalu također pridonosi i prevenciji od tumora. Tumorima su potrebni nutrijenti i kisik za rast i razvoj te je potrebno formirati nove krve žile čiji nastanak potiče VEGF, vaskularni endotelni faktor rasta kojeg sintetiziraju tumori ⁵³. CR smanjuje sistemsku i tkivnu koncentraciju VEGF-a i na taj način utječe negativno na angiogenezu kod *Copenhagen* štakora s adenokarcinomom prostate na 40%-tnom CR-u ⁴⁸. PAI-1 je također uključen u angiogenezu, a to je inhibitor serinskih proteaza kojeg sintetiziraju endotelne, stromalne i adipozne stanice ⁴⁸. Kao odgovor na CR smanjena je koncentracija PAI-1, ali nije poznata mehanistička veza između PAI-1 i tumora.

3.3. Utjecaj CR-a na pretilost i dijabetes

Sve više se povećava stopa oboljelih od dijabetesa tipa II. Već je spomenuto kako CR povećava koncentraciju adiponektina u krvi i kod ljudi i kod laboratorijskih životinja. Poznato je da pacijenti s dijabetesom imaju smanjenu koncentraciju adiponektina koji modulira inzulinsku aktivnost, reducira razinu inzulina i disfunkciju β -stanica ⁵⁴. Manipulacijom prehrane kod četiri soja miševa (soj C57BL/6 podložan debljanju, genetski pretio *ob/ob* soj, otporan na pretilost A/J soj i *knockout* za PPAR- α) dobiveni su rezultati koji sugeriraju da na sekreciju adiponektina utječe količina unesenih kalorija više nego postotak masti ⁵⁴. Bijelo i smeđe adipozno tkivo povezano je s razvojem poremećaja koje uključuje metabolični sindrom: pretilost, kardiovaskularne bolesti, dijabetes tipa II, tumore i neurodegenerativne bolesti. Istraživanja su pokazala kako povećani adipociti potkožnog abdominalnog tkiva predviđaju dijabetes kod ljudi, a ne pretilost sama ⁵⁵. Povećanje veličine masnih stanica ima važniju ulogu u stvaranju metaboličnih poremećaja za razliku od broja masnih stanica zbog toga što je važan broj masnih kiselina koji se nalazi u tim stanicama, a veći je kod većih adipocita. Neka istraživanja su pokazala kako pod utjecajem CR-a stanice masnog tkiva postaju manje ⁵⁴. Redukcija veličine adipocita korelira s povećanjem senzibilnosti na inzulin do čega dolazi vjerojatno zbog povećanja broja inzulinskih receptora na membrani stanica ⁵⁴. Istraživanja su pokazala da dugotrajni CR potiče prelazak bijelih adipocita u smeđe što utječe na težinu i ima potencijala u terapiji protiv pretilosti ⁵⁶. Važno je napomenuti da različita hrana koja je konzumirana i intermedijerni metaboliti koji nastaju različito utječu na indukciju prelaska bijelog u smeđe tkivo, primjerice laktat i β -hidroksibutirat su jaki induktori dok L-arginin zbog svoje uloge u metabolizmu smeđeg i bijelog adipoznog tkiva ima veliki potencijal za isto ⁵⁴. Brojne studije potvrđuju efektivnost CR-a u smanjenju rizičnih faktora za dijabetes od kojih je jedan da smanjuje visceralno masno tkivo koje je mjesto sinteze TNF- α

kod pacijenata s dijabetesom ⁵⁷. Postoji nekoliko mehanizama za koje se smatra da bi mogli objasniti promjene koje donosi CR na metabolizam glukoze. Smanjeni unos energije smanjuje apoptozu stanica gušterače koja izlučuje inzulin što je dokazano kod miševa s dijabetesom koji su bili na CR-u ⁵⁴. Poboľšana senzitivnost na inzulin povećava ekspresiju SIRT-1-a koji moguće prilagođava glukoneogene i glikolitičke puteve u jetri kao odgovor na CR ⁵⁴. SIRT-1 povećava otpuštanje glukoze iz jetre tako što djeluje na PGC-1 α i kod miševa povećava stopu metabolizma i smanjuje težinu, kolesterol u krvi, adipokine, šećer u krvi i razinu inzulina što bi drugim riječima značilo da aktivnost SIRT-1-a promovira pozitivne efekte CR-a ⁵⁴. Jedan od problema dijabetesa je i oksidacijski stres i komplikacije koje uključuju smanjenu sposobnost endotelnih stanica da se bore protiv glukotoksičnosti koja povlači razne kardiovaskularne posljedice dijabetesa koje uzrokuje hiperglikemija poticanjem stvaranja RKV-a unutar i izvan mitohondrija ⁵⁴. Povećana koncentracija RKV-a inhibira aktivnost gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH) što vodi nakupljanju gliceraldehid-3-fosfata (GA3P) i ostalih glikolitičkih intermedijera. GA3P potiče podizanje razina metilglioksala što vodi povećanoj koncentraciji AGE-ova i protein kinaze C (PKC) što ima brojne efekte na organizam: smanjenje aktivnosti endotelne sintaze dušikovog oksida (eNOS), produkciju RKV-a, pretjeranu aktivnost koagulacijskog sustava, povećanu ekspresiju nekih faktora rasta i stimulaciju NF- κ B-a što sve pojačava upalno stanje ⁵⁴. CR pojačava aktivnost endogenih antioksidativnih sustava kao što je već opisano u poglavlju o modifikacijama mitohondrija i oksidacijskom stresu što smanjuje količinu RKV-a koji štetno utječu na stanice u organizmu.

3.4. Utjecaj CR-a na kardiovaskularno zdravlje

Mnoge epidemiološke studije indiciraju da postoji veza između smanjenog unosa hrane i rizika od oboljevanja od kardiovaskularnih bolesti. Kao što je već spomenuto CR smanjuje oksidativni stres u endotelnim stanicama što se povezuje s fenomenom povišene ekspresije eNOS-a. SIRT-1 acetilira lizin kako bi pojačao aktivnost eNOS-a ⁵⁸. Povećana dostupnost eNOS-a tj. dušikova oksida, povezana sa smanjenom koncentracijom RKV-a, reducira krvni tlak kod ljudi i životinja koji su na CR-u ⁵⁹. Osim što ima vazodilatacijsko djelovanje, NO smanjuje oksidacijski stres i ima protuupalno djelovanje, a također i prevenira aterosklerozu svojim antiproliferativnim djelovanjem na glatke mišiće krvnih žila, inhibira agregaciju trombocita i adheziju stanica povezanih s upalnim procesima ⁵⁴. Neki citokini poput TNF- α , IL-6, IL-1 β i IL-17A su pokazali pozitivnu korelaciju s i kardiovaskularnim bolestima što CR suprimira ⁶⁰. Većina puteva već spomenutih ranije u tekstu (Nrf2, leptin, oksidativni stres, AMPK, adiponektin) koja su rezultat CR-a povezana su sa smanjenjem rizika oboljenja od

kardiovaskularnih bolesti i sa smanjenjem stope mortaliteta te nije čudno kako CR povoljno djeluje na starenje srca i krvnih žila ⁵⁴.

4. VREMENSKI OGRANIČENO HRANJENJE

4.1. Utjecaj TRF-a na cirkadijarne ritmove

Uvjeti života na našem planetu evoluirali su pod jakim utjecajima izmjene svjetla i tame. Okolišni faktori, poput temperature i vlažnosti zraka zajedno s dostupnosti hranjivih tvari, doveli su do evolucije 24-satnog unutrašnjeg vremenskog mehanizma ili cirkadijarnog ritma kako bi omogućila organizmu da predvidi promjene na dnevnoj bazi i prilagodi fitnes ¹⁴. Gotovo svi organizmi imaju cirkadijarne ritmove koji se definiraju kao 24-satne oscilacije koje se mogu naći na molekularnoj, fiziološkoj i bihevioralnoj razini ⁶¹. Dok je plastičnost cirkadijarnih ritmova bila prednost za adaptaciju na različita godišnja doba, danas u svijetu gdje su i hrana i svjetlost konstantno dostupni, može biti prepreka. Nakon izuma električnog osvjetljenja gotovo svaki čovjek može narušiti taj prirodni mehanizam tako što odabire vrijeme za spavanje koje prilagođava svom rasporedu što utječe i na hranjenje, a to vodi različitim poremećajima zbog prekomjernog unosa hrane tj. kalorija. Hranjenje u neoptimalnim djelovima dana potiče pretjerano skladištenje energije umjesto potrošnje ⁶¹. Pokazano je da TRF može pomoći pri očuvanju definiranog dnevnog unosa hrane u određeno vrijeme i time prevenirati neke od kroničnih bolesti. Kod sisavaca, središnji molekularni cirkadijarni sat pronađen je u hipotalamusu i naziva se suprahijazmatska jezgra (engl. suprachiasmatic nuclei, SCN) te sinhronizacija stanica SCN-a vodi koordinaciji cirkadijarnih ritmova perifernih tkiva ⁶². Slični molekularni „satovi“ pronađeni su u mnogim perifernim tkivima kao što su jetra, crijevo, srce, adipozno tkivo, mrežnica oka i različite regije u mozgu ⁶². Udio ciklički eksprimiranih transkriptata u perifernim tkivima je od 5% do 20% transkriptoma i većina ih je tkivno-specifičnih što naglašava cirkadijarnu kontrolu funkcija perifernih tkiva. SCN regulira periferni ritam preko živčanih veza i sekrecije humoralnih faktora ili indirektno potičući ritmično hranjenje, lokomotronu aktivnost i/ili promjenu tjelesne temperature što zauzvrat koordinira ritmičnu ekspresiju gena ⁶². Ekspresiju gena perifernih tkiva poput jetre kontroliraju i SCN i lokalni endogeni sat ⁶². Molekularni sat u SCN neuronima i perifernim stanicama je unutarstanični mehanizam baziran na povratnoj spregi transkripcijsko-translacijskih petlji ⁶². Prvi otkriveni gen kodira za transkripcijski faktor CLOCK koji dimerizacijom s BMAL1 aktivira transkripciju vežući se na E-kutiju i slične sekvence ⁶³. BMAL1 stvara dimere i sa drugim homologima CLOCK proteina, primjerice NPAS2, kako bi se aktivirala transkripcija i održavala ritmičnost ⁶⁴. Mete heterodimera

BMAL1:CLOCK su regulatorne regije gena *Per* (*Per1*, *2* i *3*) i *Cry* (*Cry 1* i *2*) te oligomerizacija ili nuklearna translokacija tih gena vodi inhibiciji BMAL1:CLOCK posredovane transkripcije⁶². Svi prethodno spomenuti geni pokazuju 24-satnu oscilaciju u SCN stanicama i perifernom tkivu osim CLOCK-a koji ne oscilira u SCN stanicama⁶². Uz navedenu petlju postoje i neke druge koje također igraju ulogu u održavanju cirkadijarnog ritma organizma. Prakticiranjem TRF-a hrana je dostupna svaki dan u isto vrijeme i samo na nekoliko sati. TRF djeluje na cirkadijarne ritmove u perifernim tkivima bez efekta na glavni oscilator SCN čime uzrokuje odvajanje periferije i centralnog SCN-a⁶². Mnogi hormoni pokazuju cirkadijarni ritam u izlučivanju: inzulin, glukagon, adiponektin, kortikosteron, leptin i grelin⁶². TRF ima dominantno djelovanje u odnosu na SCN tako da TRF potiče ritam neovisno o izloženosti svjetlu što je pokazano na miševima mutantima za neki od gena iz seta za cirkadijarni ritam ili s oštećenim SCN-om⁶². Fiziološke aktivnosti koje inače diktira SCN kao što su tjelesna temperatura, lokomotorna aktivnost i ritam otkucaja srca promijenjeni su pod utjecajem TRF-a⁶². Mjesto gdje se nalazi oscilator kojeg je moguće uvjetovati hranom (engl. food-entrainable oscillator, FEO) nije poznato iako se sumnja da bi moglo biti u nekim regijama u mozgu, ali te regije se ne mogu smatrati u potpunosti odgovornima za isto⁶⁵. Za uvjetovanje nisu odgovorni ni signali vagusnog živca, niti leptin, a CLOCK i BMAL1 nisu neophodni za FEO⁶⁵. Dalje, istraživanja pokazuju kako bi FEO djelomično mogao biti u stanicama koje sintetiziraju grelin u želucu⁶⁶. Moguće je da TRF kompenzira cirkadijarne ritmove kod pacijenata s tumorima ili starijim osobama koje imaju poremećaje u istima što bi zamijenilo dosadašnju terapiju svjetlosti koja se koristila za resetiranje poremećenih cirkadijarnih ritmova⁶².

4.2. Utjecaj TRF-a općenito

Utjecaj TRF-a na fiziologiju čovjeka i mehanizmi koji se kriju iza toga nisu još uvijek razjašnjeni, ali postoje neka istraživanja koja se baziraju na opažanjima ljudi koji prakticiraju TRF. Zbog praktičnosti TRF-a u odnosu na CR sve je više istraživanja na tu temu, a često se i kao subjekti istraživanja koriste miševi i drugi modelni organizmi. Prednosti koje koje nosi TRF uključuju fiziološke i metaboličke promjene u različitim organima i mogu pomoći u borbi protiv različitih metaboličkih poremećaja dokazanih na miševima¹⁴. TRF u jetri potiče protok glukoze tj. piruvata u ciklus limunske kiseline te glukoza-6-fosfata u put pentozna fosfata što doprinosi sintezi nukleotida. Povećana ekspresija gena *Cyp7A*, koju uzrokuje TRF, potiče sintezu žučne kiseline iz kolesterola. TRF povećava i aktivnost smeđeg adipoznog tkiva čime se podiže i stopa metabolizma, β -oksidacija masnih kiselina i reducira se sinteza glukoze

u jetri ¹⁴. U bijelom adipoznom tkivu dolazi do smanjenja infiltracije makrofaga i upale. Kod vinske mušice, TRF ima pozitivan učinak na zdravlje srca i poboljšava spavanje ¹⁴. Navedene promjene koje inducira TRF kod životinja pokreću pitanje da li unos energije tj. trajanje faze hranjenja određuje metaboličko zdravlje kod ljudi.

4.2.1. Tjelesna masa i lipidni parametri u krvnoj plazmi

Provedena su različita istraživanja na ljudima s različitim uvjetima TRF-a (razlika u duljini faze hranjenja: 4, 7-8 i 10-12 sati) gdje je glavni predmet istraživanja bila tjelesna masa, a kod nekih su praćeni i lipidni parametri: kolesterol i trigliceridi iz krvne plazme (samo za 7-8-satni i 10-12-satni TRF). Kod 4-satnog perioda nije uočena promjena u tjelesnoj masi, ali važno je naglasiti da su neka od istraživanja moguće trajala kratko da bi se uočila nekakva promjena i da su sudionici različite skupine ljudi te se ne mogu međusobno uspoređivati ⁶⁷. Hranjenje tijekom 7-8 sati dnevno je ipak u jednom istraživanju pokazalo smanjenje tjelesne težine za 5% tijekom 4 tjedna prakticiranja TRF-a ⁶⁸. Nije poznat razlog zbog kojeg je samo u jednom istraživanju došlo do smanjenja težine, ali moguće je da su subjekti unosili manju količinu kalorija u odnosu na one u ostalim istraživanjima te je važno napomenuti kako je samo jedno od nekoliko istraživanja pratilo unos energije pa se ne mogu uspoređivati međusobno ⁶⁷. Što se tiče lipida iz krvi koji su praćeni tijekom pojedinih istraživanja, kod istraživanja koje je zabilježilo gubitak kilograma došlo je do promjene. Došlo je do smanjenja ukupnog kolesterola, LDL-a i triglicerida kod muškaraca i žena te blagog povećanja HLDL-a ⁶⁸. Pošto su promjene zabilježene samo u jednom istraživanju i to onom gdje je zabilježen gubitak kilograma moguće je da upravo gubitak kilograma djeluje na promjenu u sastavu lipida plazme što zahtjeva daljnja istraživanja na tu temu prije donošenja nekakvih zaključaka ⁶⁷. Za razliku od prethodnih grupa istraživanja, istraživanja s 10-12 sati kontinuiranog hranjenja dnevno konzistentno pokazuju smanjenje tjelesne mase za 1-3% što prate i promjene u lipidima ⁶⁷. Ovakvi rezultati su iznenađujući pošto se mislilo da dulji vremenski period hranjenja omogućava sudionicima da lakše dosegnu svoj normalni dnevni unos kalorija iako se mora napomenuti kako je većina sudionika bila u procesu Ramadana te je period hranjenja bio po noći i većinu perioda hranjenja sudionici su prespavali ⁶⁷. U većini studija je pokazano smanjenje kolesterola, LDL-a i triglicerida kao i kod 7-8 sati TRF-a, ali značajnije promjene su zamijećene u porastu HLDL-a ⁶⁷. Povećanje HLD-a u tolikoj mjeri je još zabilježen jedino kod ljudi koji prakticiraju treninge izdržljivosti i jedno od ograničenja ovih istraživanja je manjak podataka o potrošnji energije sudionika što je moglo utjecati na rezultate ⁶⁷. Veza između unosa energije i gubitka tjelesne mase postoji, ali važna je pažljiva interpretacija

izvještaja o unosu energije zbog moguće nepouzadnosti. Stoga nije poznato na koji način 10-12-satni TRF utječe na unos energije i potrošnju iste pa tako i na tjelesnu težinu ⁶⁷. Većina istraživanja pokazuje da 10-12-satni TRF moguće djeluje preventivno na zdravlje srca i krvnih žila zbog pozitivne promjene sastava lipida ⁶⁷.

4.2.2. Glukoza, inzulin i inzulinska rezistencija

Jedno od istraživanja je pokazalo povećanu apsorpciju glukoze i inhibiciju lipolize adipoznog tkiva posredovane inzulinom nakon kratkog vremena prakticiranja 4-satnog TRF-a ⁶⁹. Suprotno, jedno drugo istraživanje nije pokazalo nikakva poboljšanja inzulinske rezistencije perifernih tkiva i jetre niti promjenu u inhibiciji lipolize posredovane inzulinom ⁷⁰. Razlike su u tome što su u jednom istraživanju sudionici hranu unosili u krutom stanju, a drugi u tekućem što bi moglo utjecati na rezultate istraživanja ⁶⁷. Kod 7-8-satnog TRF-a nema konzistentnih rezultata, neka istraživanja koja su zabilježila smanjenje težine pokazuju povećanu razinu glukoze u krvi tijekom posta, a neka kod kojih nema promjene u težini pokazuju smanjenje koncentracije glukoze ⁶⁷. Moguće je da kod istraživanja s povećanom razinom glukoze dolazi do povećane glukoneogeneze ili promijenjenih cirkadijarnih ritmova hormona rasta ili kortizola do čega dolazi prilikom kraćeg posta ⁶⁷. Rezultati istraživanja sa sudionicima koji su imali dulju fazu hranjenja (10 do 12 sati) dobiveni su konzistentni rezultati smanjenja razine glukoze u krvi sudionika ⁶⁷. U jednom istraživanju ipak nije zabilježeno smanjenje koncentracije glukoze iako je zabilježen gubitak težine, ali su sudionici prijavili promjene u vremenu spavanja tijekom ispitivanja ⁷¹. Poremećaji u ritmu i duljini spavanja mogu imati negativan utjecaj na razinu glukoze u krvi što moguće objašnjava razlog zbog čega nije došlo do promjene kod sudionika koji su prakticirali 10-12-satni TRF ⁶⁷.

4.2.3. Faktori upale

Informacije o utjecaju TRF-a na upalne citokine su jako limitirane te postoji samo jedno istraživanje koje je mjerilo takve parametre kod ljudi. Sudionici su pratili režim 4-satnog TRF-a i to svaki drugi dan tijekom 2 tjedna ⁶⁹. Nije uočena nikakva promjena u koncentraciji IL-6 ili TNF- α što nije čudno jer u ovom istraživanju nije zabilježen nikakav gubitak težine, a za smanjenje koncentracije IL-6 i TNF- α je općenito potrebno izgubit barem 5% tjelesne mase i takvi rezultati nisu bili iznenađujući ⁷².

5. ZAKLJUČCI

Mnoga istraživanja su potvrdila utjecaj prehrane na fiziologiju čovjeka. Kalorijska restrikcija i vremenski ograničeno hranjenje utječu pozitivno na fiziologiju u raznim aspektima. CR

poboljšava autofagiju čime se uklanjaju oštećeni organeli ili agregati proteina i tako usporava proces starenja, smanjuje markere tumora i kronične upale čime omogućava bolju kvalitetu života, pozitivno utječe i na oboljele od dijabetesa poboljšavajući narušenu inzulinsku rezistenciju. Svi ovi utjecaji CR-a rezultiraju i boljem kardiovaskularnom zdravlju jer faktori koji djeluju na prethodno navedene promjene, pozitivno djeluju i na zdravlje srca i krvnih žila. Unatoč manjku podataka i nedovoljnom broju istraživanja provedenih na ljudima pokazano je da CR, kao i TRF, ima pozitivne efekte na fiziologiju. TRF utječe na cirkadijarne ritmove izlučivanja različitih tvari, hormona i faktora u organizmu te može pomoći pacijentima koji imaju poremećaje u istima ili ljudima koji imaju način života koji nije u skladu s inače prirodnim cirkadijarnim ritmom organizma. Zbog malog broja istraživanja teško je reći koji omjer vremena hranjenja i posta je najoptimalniji, ali općenito pokazano je da TRF može pomoći u gubitku tjelesne mase, smanjiti kolesterol, LDL i trigliceride, a povećati HDL u krvi što pozitivno djeluje na kardiovaskularno zdravlje. Jedan od problema i kod CR-a i TRF-a je poštivanje pravila i održavanje takve prehrane kroz dulji vremenski period te bi bilo od koristi da istraživanja idu u smjeru pronalaska adekvatne i lako održive prehrane koja bi pokazala ovakve efekte na fiziologiju čovjeka. Smatram da bi trebalo više istraživati utjecaj CR-a i TRF-a na ljudski organizam i fiziologiju jer efekti koji su dosad otkriveni daju nadu da postoji adekvatna prehrana kojom bi se smanjila stopa oboljelih od različitih bolesti te u konačnici i stopa mortaliteta.

6. LITERATURA

1. Di Francesco, A. *i ostali*. A time to fast. *Science* **362**, 770–775 (2018).
2. Fontana, L. *i ostali*. Extending healthy life span—from yeast to humans. *Science* **328**, 321–326 (2010).
3. McCay, C. M. *i ostali*. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. *Nutrition* **5**, 155–71; discussion 172 (1935).
4. Fontana, L. & Partridge, L. Promoting health and longevity through diet: From model organisms to humans. *Cell* **161**, 106–118 (2015).
5. Roth, L. W. & Polotsky, A. J. Can we live longer by eating less? A review of caloric restriction and longevity. *Maturitas* **71**, 315–319 (2012).
6. Walford, R. L. *i ostali*. Calorie restriction in biosphere 2: Alterations in physiologic, hematologic, hormonal, and biochemical parameters in humans restricted for a 2-year

- period. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences* **57**, 338–349 (2002).
7. Rous, P. The influence of diet on transplanted and spontaneous mouse tumors. *The Journal of experimental medicine* **20**, 433–51 (1914).
 8. Redman, L. M. *i ostali*. Metabolic Slowing and Reduced Oxidative Damage with Sustained Caloric Restriction Support the Rate of Living and Oxidative Damage Theories of Aging. *Cell Metabolism* **27**, 805-815.e4 (2018).
 9. Fontana, L. & Klein, S. Aging, adiposity, and calorie restriction. *Journal of the American Medical Association* **297**, 986–994 (2007).
 10. Fontana, L. *i ostali*. Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 6659–6663 (2004).
 11. Woodie, L. N. *i ostali*. Restricted feeding for 9 h in the active period partially abrogates the detrimental metabolic effects of a Western diet with liquid sugar consumption in mice. *Metabolism: Clinical and Experimental* **82**, 1–13 (2018).
 12. Sherman, H. *i ostali*. Long-term restricted feeding alters circadian expression and reduces the level of inflammatory and disease markers. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **15**, 2745–2759 (2011).
 13. Hatori, M. *i ostali*. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metabolism* **15**, 848–860 (2012).
 14. Longo, V. D. & Panda, S. Fasting, Circadian Rhythms, and Time-Restricted Feeding in Healthy Lifespan. *Cell Metabolism* **23**, 1048–1059 (2016).
 15. Mattson, M. P. *i ostali*. Meal frequency and timing in health and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 16647–16653 (2014).
 16. Goodrick, C. L. *i ostali*. Effects of intermittent feeding upon body weight and lifespan in inbred mice: interaction of genotype and age. *Mechanisms of Ageing and Development* **55**, 69–87 (1990).
 17. Xie, K. *i ostali*. Every-other-day feeding extends lifespan but fails to delay many symptoms of aging in mice. *Nature Communications* **8**, 155 (2017).

18. Singh, R. *i ostali*. Late-onset intermittent fasting dietary restriction as a potential intervention to retard age-associated brain function impairments in male rats. *Age* **34**, 917–933 (2012).
19. Newman, J. C. *i ostali*. Ketogenic Diet Reduces Midlife Mortality and Improves Memory in Aging Mice. *Cell Metabolism* **26**, 547-557.e8 (2017).
20. Safdie, F. M. *i ostali*. Fasting and cancer treatment in humans: A case series report. *Aging* **1**, 988–1007 (2009).
21. Escobar, K. A. *i ostali*. Autophagy and aging: Maintaining the proteome through exercise and caloric restriction. *Aging Cell* **18**, (2019).
22. López-Lluch, G. & Navas, P. Calorie restriction as an intervention in ageing. *The Journal of Physiology* **594**, 2043–2060 (2016).
23. Finkel, T. The metabolic regulation of aging. *Nature Medicine* **21**, 1416–1423 (2015).
24. Ristow, M. & Schmeisser, K. Mitohormesis: Promoting Health and Lifespan by Increased Levels of Reactive Oxygen Species (ROS). *Dose - Response*. **12**, 288–341 (2014).
25. Qiu, X. *i ostali*. Calorie Restriction Reduces Oxidative Stress by SIRT3-Mediated SOD2 Activation. *Cell Metabolism* **12**, 662–667 (2010).
26. Madeo, F. *i ostali*. Essential role for autophagy in life span extension. *Journal of Clinical Investigation* **125**, 85–93 (2015).
27. Xu, S. *i ostali* mTOR Signaling from Cellular Senescence to Organismal Aging. *Aging And Disease* **5**, 433–51 (2014).
28. Feng, Y. *i ostali*. The machinery of macroautophagy. *Cell Research* **24**, 24–41 (2014).
29. Meijer, A. J. *i ostali*. Regulation of autophagy by amino acids and MTOR-dependent signal transduction. *Amino Acids* **47**, 2037–2063 (2015).
30. Martina, J. A. *i ostali*. MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy* **8**, 903–914 (2012).
31. Yang, L. *i ostali*. Long-Term Calorie Restriction Enhances Cellular Quality-Control Processes in Human Skeletal Muscle. *Cell Reports* **14**, 422–428 (2016).

32. Palmieri, M. *i ostali*. Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Human Molecular Genetics* **20**, 3852–3866 (2011).
33. Rubinsztein, D. C. *i ostali*. Autophagy and aging. *Cell* **146**, 682–695 (2011).
34. Jung, C. H. *i ostali*. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Letters* **584**, 1287–1295 (2010).
35. Kenyon, C. J. The genetics of ageing. *Nature* **464**, 504–512 (2010).
36. Muller, F. L. *i ostali*. Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology and Medicine* **43**, 477–503 (2007).
37. Tung, B. T. *i ostali*. Organ and tissue-dependent effect of resveratrol and exercise on antioxidant defenses of old mice. *Aging Clinical and Experimental Research* **27**, 775–783 (2015).
38. Nisoli, E. *i ostali*. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* **310**, 314–317 (2005).
39. Lin, S. J. *i ostali*. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **289**, 2126–2128 (2000).
40. Rogina, B. & Helfand, S. L. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 15998–16003 (2004).
41. Balaban, R. S. *i ostali*. Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell* **120**, 483–495 (2005).
42. Palacios, O. M. *i ostali*. Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1 α in skeletal muscle. *Aging* **1**, 771–783 (2009).
43. Baba, T. *i ostali*. Estrogen, insulin, and dietary signals cooperatively regulate longevity signals to enhance resistance to oxidative stress in mice. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 16417–16426 (2005).
44. Longo, V. D. & Fontana, L. Calorie restriction and cancer prevention: metabolic and molecular mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences* **31**, 89–98 (2010).
45. Calle, E. E. & Kaaks, R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nature Reviews Cancer* **4**, 579–591 (2004).

46. Hernández, L. G. *i ostali*. Mechanisms of non-genotoxic carcinogens and importance of a weight of evidence approach. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* **682**, 94–109 (2009).
47. Ramos-Gomez, M. *i ostali*. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 3410–3415 (2001).
48. Hursting, S. D. *i ostali*. Calorie restriction and cancer prevention: a mechanistic perspective. *Cancer & Metabolism* **1**, 10 (2013).
49. Lindsley, J. E. & Rutter, J. Nutrient sensing and metabolic decisions. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* **139**, 543–559 (2004).
50. Vaiopoulos, A. G. *i ostali*. The role of adiponectin in human vascular physiology. *International Journal of Cardiology* **155**, 188–193 (2012).
51. Rogozina, O. P. *i ostali*. Effect of Chronic and Intermittent Calorie Restriction on Serum Adiponectin and Leptin and Mammary Tumorigenesis. *Cancer Prevention Research* **4**, 568–581 (2011).
52. O'Rourke, R. W. Inflammation in obesity-related diseases. *Surgery* **145**, 255–259 (2009).
53. Saharinen, P. *i ostali*. VEGF and angiopoietin signaling in tumor angiogenesis and metastasis. *Trends in Molecular Medicine* **17**, 347–362 (2011).
54. Golbidi, S. *i ostali*. Health Benefits of Fasting and Caloric Restriction. *Current Diabetes Reports* **17**, 123 (2017).
55. Varady, K. A. & Hellerstein, M. K. Do calorie restriction or alternate-day fasting regimens modulate adipose tissue physiology in a way that reduces chronic disease risk? *Nutrition Reviews* **66**, 333–342 (2008).
56. Tran, T. T. & Kahn, C. R. Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. *Nature Reviews Endocrinology* **6**, 195–213 (2010).
57. Eshghinia, S. & Mohammadzadeh, F. The effects of modified alternate-day fasting diet

- on weight loss and CAD risk factors in overweight and obese women. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* **12**, 4 (2013).
58. Seymour, E. M. *i ostali*. Moderate calorie restriction improves cardiac remodeling and diastolic dysfunction in the Dahl-SS rat. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **41**, 661–668 (2006).
 59. Chatterjee, A. & Catravas, J. D. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascular Pharmacology* **49**, 134–140 (2008).
 60. Mattson, M. P. & Wan, R. Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems. *Journal of Nutritional Biochemistry* **16**, 129–137 (2005).
 61. Manoogian, E. N. C. & Panda, S. Circadian rhythms, time-restricted feeding, and healthy aging. *Ageing Research Reviews* **39**, 59–67 (2017).
 62. Froy, O. Circadian Rhythms, Aging, and Life Span in Mammals. *Physiology* **26**, 225–235 (2011).
 63. Reppert, S. M. & Weaver, D. R. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* **418**, 935–941 (2002).
 64. DeBruyne, J. P. *i ostali*. A Clock Shock: Mouse CLOCK Is Not Required for Circadian Oscillator Function. *Neuron* **50**, 465–477 (2006).
 65. Froy, O. & Miskin, R. Effect of feeding regimens on circadian rhythms: implications for aging and longevity. *Aging* **2**, 7–27 (2010).
 66. LeSauter, J. *i ostali*. Stomach ghrelin-secreting cells as food-entrainable circadian clocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 13582–13587 (2009).
 67. Rothschild, J. *i ostali*. Time-restricted feeding and risk of metabolic disease: a review of human and animal studies. *Nutrition Reviews* **72**, 308–318 (2014).
 68. Temizhan, A. *i ostali*. The effects of ramadan fasting on blood lipid levels. *The American Journal of Medicine* **109**, 341 (2000).
 69. Halberg, N. *i ostali*. Effect of intermittent fasting and refeeding on insulin action in healthy men. *Journal of Applied Physiology* **99**, 2128–2136 (2005).
 70. Soeters, M. R. *i ostali*. Intermittent fasting does not affect whole-body glucose, lipid, or

protein metabolism. *American Journal of Clinical Nutrition* **90**, 1244–1251 (2009).

71. Nematy, M. *i ostali*. Effects of Ramadan fasting on cardiovascular risk factors: a prospective observational study. *Nutrition Journal*. **11**, 69 (2012).
72. Heggen, E. *i ostali*. Effect of a Low-Fat Versus a Low-Glycemic-Load Diet on Inflammatory Biomarker and Adipokine Concentrations. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*. **10**, 437–442 (2012).

7. SAŽETAK

Jedan od velikih problema današnjice je starenje tj. bolesti do kojih dolazi uslijed istog. Kako bi se produljio život i kako bi se poboljšala kvaliteta istog došlo je do istraživanja utjecaja različitih okolišnih faktora koji bi mogli pomoći u prevenciji i usporavanju progresije različitih bolesti. Jedan od proučavanih čimbenika je prehrana i smatra se za jednu od jednostavnijih intervencija koje mogu biti od pomoći. U ovom završnom radu govori se o utjecajima prehrane na fiziologiju i metabolizam čovjeka. Postoji nekoliko poznatih načina hranjenja koji imaju pozitivan učinak na fiziologiju čovjeka, a to su kalorijska restrikcija (CR), vremenski-ograničeno hranjenje (TRF), periodični post (IF) i post-oponašajuća dijeta (FMD). Prve dvije navede su detaljnije razrađene u ovom završnom radu koji prikazuje dosadašnja istraživanja na ljudima i modelnim organizmima. Važno je naglasiti kako je jedan od problema istraživanja ovog područja ljudski faktor odnosno nekonzistentnost u pridržavanju ovakve prehrane tijekom duljeg perioda. Kod CR-a navedena su istraživanja i neki mehanizmi koji objašnjavaju utjecaj na starenje, tumorigenezu i angiogenezu, upalne procese te pretilost, dijabetes i kardiovaskularno zdravlje. TRF je nešto manje istražen, ali poznato je da utječe na cirkadijarni ritam organizma te da utječe na tjelesnu težinu, sastav lipida u krvi i kardiovaskularno zdravlje.

8. SUMMARY

One of the biggest problems nowadays is aging and the diseases it brings. In order to prolong and improve the quality of life there had been many experiments about influences various environmental factors have on prevention and slowing down the progression of various diseases. One environmental factor had caught the eye among scientists and it is diet which stands for the simplest intervention that might help. Thus, this paper is about effects diet has on human physiology and metabolism. There are several well-known diets which have shown the positive effects on physiology: caloric restriction (CR), time-restricted feeding (TRF), intermittent fasting (IF) and fasting-mimicking diets (FMDs). The first two diets, CR and TRF,

have been elaborated in this paper which shows researches that have been done by the present with people and animals as subjects. However, it is important to note the main problem investigating this topic is human factor and inconsistency in adhering to this diet for longer period of time. Research done about CR include some mechanisms explaining the effects it has on aging, tumorigenesis and angiogenesis, inflammatory process and obesity, diabetes and cardiovascular health. Despite a small number of reaserch published about TRF, it has been known that it has effect on cyrcadian rhythms, lipid factors, cardiovascular health and helps to reduce body weight.