

Učinak visokokalorične prehrane na inzulinsku rezistenciju i oksidacijski stres u štakora

Vargek, Martin

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:116434>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Martin Vargek

**UČINAK VISOKOKALORIČNE PREHRANE NA
INZULINSKU REZISTENCIJU I OKSIDACIJSKI STRES U
ŠTAKORA**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Nade Oršolić, red. prof. u trajnom zvanju. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Najveće zahvale dugujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Nadi Oršolić koja je nesebično izdvajala vrijeme i vodila me u planiranju, izradi i pisanju ovog rada te bila neprestana podrška u svim situacijama.

Zahvaljujem se i asistentici mr. sc. Dyani Odeh koja je uskakala i pomagala oko izvođenja eksperimentalnog dijela te konstruktivnim savjetima tijekom izrade i pisanja rada pomagala u ostvarivanju istog.

Zahvaljujem se također doktorandici dr. med. Ivani Lovrić koja je pomagala u analizi uzoraka te analizi podataka. Iako rad u laboratoriju ponekad zna biti naporan uistinu je lakši i zabavniji kada imaš uz sebe nekoga tko te gura naprijed i čini ga zabavnim.

Zahvaljujem se i svim profesorima i ostalim djelatnicima Zavoda za animalnu fiziologiju koji su često ostajali duže na poslu i obavljali rad u uredu i nakon uredovnog vremena kako bi se dugotrajniji pokusi mogli dovršiti, a posebne zahvale dugujem tehničarki Mariji Potočić koja je bila od velike pomoći pri obradi životinja i izolaciji uzoraka za analizu.

Zahvaljujem se i svim prijateljima koji su vjerno pratili tijekom ovog diplomskog rada te u bili podrška u svakoj kriznoj situaciji te davali poticaj za nastavak rada.

Zahvaljujem se i mojoj obitelji, a posebice roditeljima Antunu i Ivanki koji su me pratili na mom putu školovanja te u svim poteškoćama vjerovali u mene. Teško je kada se nađeš u teškoj i naizgled ne prebrodivoj situaciji zadržati mirnu glavu, a pogotovo kada osjećaš da si sam u nečemu – hvala im što me nisu doveli u takvu situaciju jer sam ih uvijek imao pored sebe kao moralnu podršku i utjehu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

UČINAK VISOKOKALORIČNE PREHRANE NA INZULINSKU REZISTENCIJU I OKSIDACIJSKI STRES U ŠTAKORA

Martin Vargek

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Pretilost je jedna od bolesti od koje obolijeva sve veći dio ljudske populacije. Kao uzroke pretilosti, uz genetske predispozicije, navode se visokokalorična hrana (VKH) te nedostatak tjelesne aktivnosti. Cilj rada bio je istražiti učinak visokokalorične hrane (VKH) na tjelesnu težinu, inzulinsku rezistenciju, hematološke i biokemijske pokazatelje te pokazatelje oksidacijskog stresa u jetri i bubregu. Rezultati pokazuju da VKH uzrokuje porast tjelesne težine štakora, povećanje razine oksidacijskog stresa u bubregu i jetri te porast inzulinske rezistencije u krvi u odnosu na prehranu standardnom hranom (STH). Povećanje razine oksidacijskog stresa, mjereno razinom malondialdehida (MDA), krajnjeg produkta lipidne peroksidacije, prati smanjena razina staničnog antioksidansa glutaciona (GSH) te smanjena aktivnost katalaze (CAT). Razvoj inzulinske rezistencije u štakora hranjenih VKH potvrđen je testom oralne podnošljivosti glukoze mjerenjem razine glukoze u intervalima od 0, 30, 60 i 120 minuta nakon intragastričkog unosa glukoze u dozi od 3 g/kg tjelesne težine. Porast oksidacijskog stresa u životinja na VKH, prati porast inzulinske rezistencije te nastanak upalne reakcije vidljiv kroz povećanje postotka neutrofila i narušenih biokemijskih i hematoloških pokazatelja u krvi. Podaci pokazuju povećanu osjetljivost muških jedinki u odnosu na ženke što se vjerojatno može pripisati zaštitnom učinku estrogena.

(79 stranica, 18 slika, 7 tablica, 82 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: štakor, visokokalorična hrana, pretilost, inzulinska rezistencija, oksidacijski stres

Voditelj: Dr. sc. Nada Oršolić, red. prof.

Ocjenitelji:

Rad prihvaćen:

BACIS DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Graduation Thesis

Faculty of Science

Division of Biology

THE EFFECT OF HIGH-CALORIE DIET ON INSULIN RESISTANCE AND OXIDATIVE STRESS IN RATS

Martin Vargek

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Obesity is one of the fastest growing diseases in human population nowadays. The main causes of obesity, besides genetic predisposition, are high-calorie diet (HCD) and insufficient exercise. The aim of this research was to determine the effect of HCD on body weight, insulin resistance, hematological and biochemical parameters and oxidative stress markers in kidney and liver. Results show that HCD causes an increase in body weight, increased oxidative stress in tissues of kidney and liver and insulin resistance in the blood compared with a standard diet. Increased oxidative stress, measured as malondialdehyde level, one of the end products of lipid peroxidation, is followed by decreased levels of cell antioxidant glutathione and decreased catalase activity. Occurrence of insulin resistance in rats fed with HCD was established through oral glucose tolerance test by measuring blood glucose level 0, 30, 60, 90 and 120 minutes after the intragastric glucose uptake in a dose of 3 g/kg of body weight. Increase of oxidative stress in HCD animal groups is followed by an increase in insulin resistance and appearance of inflammation seen as an increase in percentage of neutrophils and impaired biochemical and hematological parameters of blood. Data show increased sensitivity of males compared to females which can be explained by the protective effect of estrogen.

(79 pages, 19 figures, 7 tables, 82 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: rats, high-calorie diet, obesity, insulin resistance, oxidative stress

Supervisor: Dr. Nada Oršolić, prof.

Reviewers:

Thesis accepted:

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Bioenergetika	1
1.2. Metabolizam ugljikohidrata	2
1.2.1. Skladištenje glukoze.....	2
1.2.2. Dobivanje energije iz glukoze.....	3
1.2.3. Pentoza fosfatni put.....	5
1.2.4. Glukoneogeneza	5
1.3. Lipidi	6
1.3.1. Trigliceridi.....	6
1.3.2. Lipoproteini	7
1.3.3. Metabolizam lipida.....	7
1.3.3.1. Beta oksidacija masnih kiselina	8
1.3.3.2. Pretvorba triglicerida u ugljikohidrate.....	9
1.3.3.3. Regulacija korištenja triglicerida kao izvora energije	9
1.4. Proteini	10
1.4.1. Proteini plazme.....	11
1.4.2. Metabolizam proteina.....	11
1.5. Masno tkivo.....	12
1.5.1. Bijelo masno tkivo	13
1.5.2. Smeđe masno tkivo	13
1.5.5.3. Histogeneza masnog tkiva	14
1.5.4. Prekursori adipocita.....	15
1.5.5. Posmeđivanje (engl. <i>browning</i>).....	15
1.5.5.1. Razlika između stanica BAT-a i bež adipocita	16
1.5.6. Pretilost.....	17
1.5.7. Lipotoksičnost	18
1.5.8. Hipertrofija i hiperplazija adipocita	19
1.5.9. Interakcija WAT i drugih tkiva	19
1.5.10. Upala u masnom tkivu.....	20
1.6. Inzulin.....	22
1.6.1. Djelovanje inzulina na metabolizam ugljikohidrata.....	22
1.6.2. Djelovanje inzulina na metabolizam masti	23
1.6.3. Djelovanje inzulina na metabolizam proteina	25
1.6.4. Mehanizmi lučenja inzulina	25
1.6.5. Inzulinska rezistencija	26
1.6.5.1. Mehanizmi inzulinske rezistencije	26

1.7. Oksidativni stres	27
1.7.1. Slobodni radikali	28
1.7.1.1. <i>Reaktivne kisikove vrste – ROS</i>	28
1.7.1.2. <i>Reaktivne dušikove vrste</i>	29
1.7.1.3. <i>Egzogeni izvori slobodnih radikala</i>	29
1.7.2. Antioksidansi.....	30
1.7.2.1. <i>Enzimski antioksidansi</i>	30
1.7.2.2. <i>Neenzimski antioksidansi</i>	31
1.7.3. Oksidacijski stres i pretilost	32
1.7.4. Oksidacijski stres i inzulinska rezistencija.....	32
1.8. Cilj istraživanja	32
2. Materijali	33
2.1. Pokusne životinje	33
2.1. Hrana za životinje.....	33
2.3. Laboratorijska oprema.....	35
3. Metode.....	36
3.1. Praćenje promjene tjelesne težine	36
3.2. Obrada životinja	36
3.3. Izolacija i priprema tkiva.....	36
3.4. Analiza hematoloških parametara krvi.....	36
3.5. Analiza biokemijskih parametara.....	37
3.6. Osmotska fragilnost eritrocita	37
3.7. Test oralne podnošljivosti glukoze.....	38
3.8. Određivanje parametara oksidacijskog stresa	38
3.8.1. Određivanje proteina po Lowry-u	38
3.8.2. Mjerenje enzimske aktivnosti katalaze	39
3.8.3. Mjerenje razine lipidne peroksidacije	39
3.8.4. Mjerenje razine ukupnog glutaciona.....	40
3.9. Statistička obrada podataka	41
4.Rezultati	42
4.1. Promjena težine životinja	42
4.2. Analiza hematoloških pokazatelja krvi	44
4.2.1. Hematološka analiza	44
4.2.2. Analiza leukocita i diferencijalne krvne slike	45
4.3. Analiza biokemijskih pokazatelja krvi.....	47
4.4. Osmotska fragilnost eritrocita	49
4.5. Test oralne podnošljivosti glukoze.....	50

4.6. Parametri oksidacijskog stresa	55
4.6.1. Ukupni proteini u uzorcima tkiva bubrega i jetre štakora	55
4.6.2. Mjerenje enzimske aktivnosti katalaze u uzorcima tkiva bubrega i jetre štakora ..	57
4.6.3. Mjerenje razine lipidne peroksidacije u uzorcima tkiva bubrega i jetre štakora	59
4.6.4. Mjerenje razine ukupnog glutationa (GSH) u uzorcima tkiva bubrega i jetre štakora	61
5. Rasprava	63
6. Zaključci	72
7. Literatura	73

POPIS KRATICA:

ADP – adenzin difosfat (engl. *Adenosine diphosphate*)

ALB – albumin (engl. *Albumin*)

ALP – alkalna fosfataza (engl. *Alkaline phosphatase*)

ALT – alanin aminotransferaza (engl. *Alanine aminotransferase*)

AMP – adenzin monofosfat (engl. *Adenosine monophosphate*)

AMY – amilaza (engl. *Amylase*)

AMPK – AMP-aktivirajuće proteinske kinaze (engl. *AMP-activated protein kinase*)

BAT – smeđe masno tkivo (engl. *Brown adipose tissue*)

BMI – indeks tjelesne mase (engl. *Body mass index*)

C/ERB - CCAAT/pojačivač – povezujući protein (engl. *CCAAT/enhancer-binding protein*)

CAT – katalaza (engl. *Catalase*)

CCR2 – C-C kemokinski receptor 2 (engl. *C-C chemokine receptor type 2*)

COA – koenzim A (engl. *Coenzim A*)

COPB – kronična obstruktivna bolest plućna (engl. *Chronic obstructive pulmonary disease*)

CRE – kreatinin (engl. *Creatinine*)

GLOB – globulin (engl. *Globuline*)

GLUT- glukozni transporter (engl. *Glucose transporter*)

GSH-Px – glutation peroksidaza (engl. *Glutathione peroxidase*)

GSH – glutation (engl. *Glutathione*)

GSSG – glutation disulfid (engl. *Glutathion disulfide*)

HDL – lipoproteini velike gustoće (engl. *High-density lipoprotein*)

HO²• – hidroperoksilni radikal (engl. *Hydroperoxyl radical*)

IDL – lipoproteini srednje gustoće (engl. *Intermediate-density lipoprotein*)

IL – interleukin (engl. *Interleukine*)

IκB – inhibitorni κB (engl. *Inhibitory κB*)

IKK - NF-κB aktivirajuća kinaza (engl. IκB kinaza)

IKK- β – inhibirajuća podjedinica NF-κB kinaze (engl. *inhibitor NF-κB kinase subunit β*)

INF-γ – interferon γ (engl. *Interferon γ*)

IRS – supstrat inzulinskog receptora (engl. *Insulin receptor substrate*)

JAK – janus kinaza (engl. *Janus kinase*)

LDL – lipoproteini male gustoće (engl. *Low-density lipoprotein*)

MAPK – mitogen aktivirane proteinske kinaze (engl. *Mitogen - activated protein kinases*)

MCP-1 – protein atraktant monocita 1 (engl. *Monocyte chemoattractant protein 1*)

MIF – inhibitorni čimbenik makrofagne migracije (engl. *Macrophage migration inhibitory factor*)

MCP - (engl. *Monocyte attractant protein 1*)

MDA – malondialdehid (engl. *Malondialdehyde*)

MMP – matriks metaloproteinaze (engl. *Matrix metalloproteinase*)

MPO – mijeloperoksidaza (engl. *Myeloperoxidase*)

Myf5 - miogeni faktor 5 (engl. *Myogen factor 5*)

NADH – nikotin adenin dinukleotid (engl. *Nicotine adenine dinucleotide*)

NADPH - nikotin adenin dinukleotid fosfat (engl. *Nicotine adenine dinucleotide phosphate*)

NEFA – dugolančane neesterificirane masne kiseline (engl. *Longchain nonesterified acids*)

NF-κB – nuklearni čimbenik κB (engl. *Nuclear factor κB*)

O₂^{•-} - superoksidni radikal (engl. *Superoxide radical*)

OGTT – test oralne podnošljivosti glukoze (engl. *Oral glucose tolerance test*)

OH• – hidroksilni radikal (engl. *Hidroxy radical*) PAX7+ - eng. *Paired box protein 7*)

ONOO⁻ peroksinitritni radikal (engl. *Peroxynitrite radical*)

p38 – p38 kinaza (engl. p38 kinase)

PPARγ – receptor za aktivaciju proliferacije peroksisoma γ (engl. *Peroxisome proliferator-activated receptor γ*)

PTEN – fosfatarni homolog tenzina (engl. *Phosphatase and tensin homolog*)

ROO[•] – peroksidni radikali (engl. *Peroxide radicals*)

ROS – reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive oxygen species*)

RNS – reaktivne dušikove vrste (engl. *Reactive nitrogen species*)

SOD – superoksid dismutaza (engl. *Superoxide dismutase*)

TLR - engl. *Tool like receptor*

TNF – α – čimbenik nekroze tumora (engl. *Tumor necrosis factor*)

XO – ksantin oksidaza (engl. *Xantine oxidaze*)

UPC – mitohondrijski proteini razdvajanja - termogenin (engl. *Uncoupling protein*)

VLDL – lipoproteini vrlo male gustoće (engl. *Very low-density lipoprotein*)

WAT – bijelo masno tkivo (engl. *White adipose tissue*)

1.Uvod

1.1. Bioenergetika

Svim je živim organizmima potrebna energija za održavanje fizioloških funkcija te upravo tu energiju dobivaju iz hrane. Kao glavne izvore energije za biološke sustave navode se 3 skupine organskih molekula: ugljikohidrati, lipidi te proteini. Prema prvom zakonu termodinamike, energija ne može nastati niti nestati već samo mijenjati svoje oblike (npr. kemijska, električna, toplinska, ...). U kemijskim vezama molekula koje sačinjavaju prehrambene proizvode, energija je pohranjena upravo u obliku kemijske energije (Bureau i sur., 2003).

Moguće je razlikovati dvije vrste kemijskih reakcija gledajući neto protok energije u sustavu. Prvi tip reakcija nazivamo egzergonim reakcijama budući da se kod njih energija oslobađa iz sustava. Takve reakcije u organizmu nazivamo kataboličkim reakcijama. S druge strane, reakcije kod kojih se energija veže su endergone reakcije; takve reakcije u organizmu nazivamo anaboličkim reakcijama. Skup svih anaboličkih i kataboličkih reakcija u organizmu nazivaju se metabolizmom (Bureau i sur., 2003).

Energija se u biološkim sustavima izražava mjernom jedinicom kalorija (engl. *calorie* – *cal*). Jedna kalorija definirana je kao energija potrebna da se pri 15 °C, temperatura jednog grama vode povisi s 14,5 °C na 15,5 °C (Bureau i sur., 2003). Zbog praktičnih razloga, koristi se jedinica kilokalorija (kcal) budući da je kalorija katkada premala jedinica za izražavanje količine energije u tijelu. Standardni sustav mjernih jedinica za energiju koristi mjernu jedinicu džul (J) odnosno kilodžul (kJ) te jedna kalorija iznosi 4,1868 kJ energije. Oksidacijom jednog grama ugljikohidrata oslobodi se 17,2 kJ energije, iz masti 38,9 kJ energije te iz jednog grama proteina 18,2 kJ energije. Stoga hranu bogatu mastima nazivamo visokokaloričnom hranom (Hall, 2011).

Zajednička je uloga svim reakcijama metabolizma da sudjeluju u pretvaranju kemijske energije iz hranjivih tvari u oblik energije koji organizam može iskoristiti. Ta se energija najčešće pohranjuje u molekuli adenzin-trifosfata (engl. *adenosine triphosphate* – ATP). ATP nastaje kao posljedica fosforilacije adenzin-difosfata uz pomoć energije nastale oksidacijom ugljikohidrata, masti te proteina u kataboličkim reakcijama. Taj se proces zbiva u mitohondrijima (Hall, 2011). Nastanak ATP-a i sam proces vezanja energije detaljnije je razjašnjen u idućim poglavljima.

1.2. Metabolizam ugljikohidrata

Naš organizam, hranom unesene složene ugljikohidrate, preraduje do jednostavnijih šećera od kojih su najčešći glukoza, fruktoza i galaktoza. Od jednostavnih ugljikohidrata u organizmu je najčešća glukoza koja čini 80%. Razlog tome je što se u stanicama jetre nalaze posebni enzimi zaduženi za konverziju fruktoze i galaktoze u glukozu uz potrošnju energije. Stoga nije neobično da je glukoza zajednički oblik u kojem se svi ugljikohidrati prenose po tijelu (Hall, 2011).

Glukoza se iz krvi u stanice prenosi olakšanom difuzijom pomoću proteinskih prijenosnika budući da zbog svoje velike molekulske mase ne može proći membranu difuzijom. U prijenosu glukoze u stanice, važnu ulogu igra inzulin. Nakon njegovog lučenja, ulazak glukoze u stanicu odvija i do deset puta brže. Olakšana difuzija odvija se u smjeru koncentracijskog gradijenta. Kako ne bi došlo do ekvilibrijuma i prestanka samog procesa, glukoza se u stanici momentalno pretvara u molekulu glukoza-6-fosfat. Taj se proces u većini tkiva postiže djelovanjem enzima glukokinaze, odnosno enzima heksokinaze u jetri. Taj enzim katalizira reakciju glukoze i fosfatnog iona. U većini stanica, taj je proces ireverzibilan. U stanicama jetre postoji enzim nazvan glukoza-fosfataza, koji kada je potrebno otpuštanje glukoze u krvotok, uklanja fosfatnu skupinu s glukoza-6-fosfata te ponovno nastaje glukoza koja može biti otpuštena u cirkulaciju (Hall, 2011).

Postoje i pojedina mjesta u organizmu gdje se glukoza prenosi aktivnim prijenosom odnosno uz koncentracijski gradijent u kotransportu s natrijem uz utrošak energije. Najznačajnija mjesta za apsorpciju što veće količine glukoze iz hrane su epitel probavnog sustava te se regeneracija glukoze iz ultrafiltrata vrši u epitelu bubrežnih kanalića (Hall, 2011).

1.2.1. Skladištenje glukoze

Glukoza se u organizmu skladišti u obliku glikogena – velikog polimera glukoze. Sve stanice organizma mogu pohraniti male količine glikogena, dok neke mogu pohraniti poprilično velike količine glikogena u sebi. To su stanice jetre i stanice mišićnog tkiva kod kojih glikogen redom može zauzimati 5-8% mase stanice odnosno 1-3% mase. Stvaranje glikogena u stanici također je bitno zbog održavanja osmotskog tlaka stanice. Polimerizacijom glukoze se omogućuje skladištenje velike količine glukoze unutar stanice bez znatnije promjene osmotskog tlaka same stanice budući da je glikogen osmotski poprilično neaktivan. U suprotnom moglo bi doći do teških poremećaja osmotske ravnoteže u stanici ako bi porasla koncentracija otopljenih monosaharida u stanici (Hall, 2011).

Sam proces nastanka glikogena naziva se glikogenezom. U taj proces mogu ući brojni monosaharidi, a i drugi spojevi kao što su mliječna kiselina, glicerol, pirogroždana kiselina te neke deaminirane aminokiseline iz kojih može nastati glukoza (Hall, 2011).

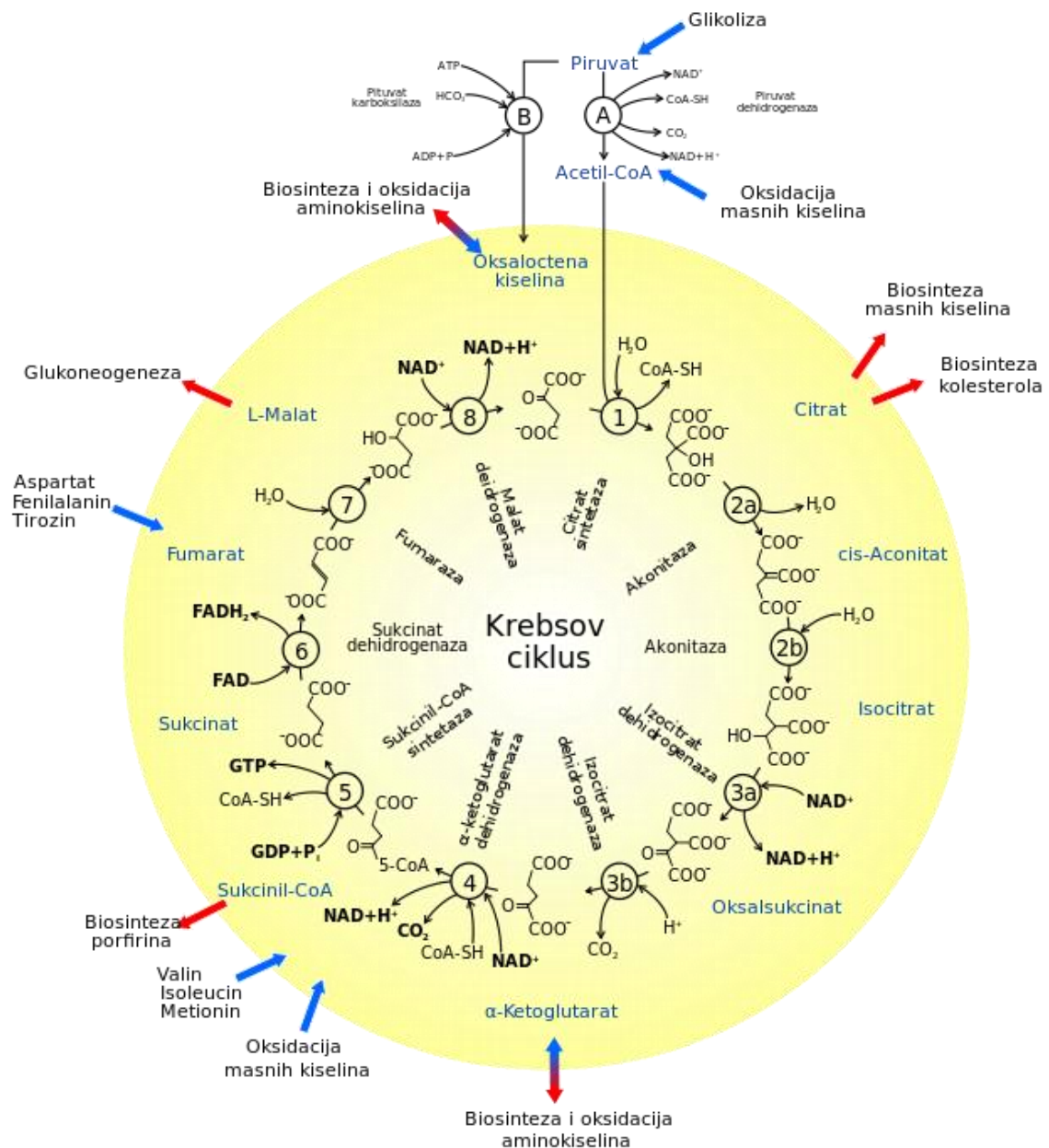
Suprotan proces glikogenezi je glikogenoliza – proces u kojem iz glikogena ponovno nastaje glukoza koja se može iskoristiti za dobivanje energije. Bitno je napomenuti da glikogenoliza nije suprotan proces glikogenezi i da je posredovan drugim enzimima te su shodno tome prisutni i drugi intermedijeri. Ovaj je proces aktivan tek kada je čovjek u pokretu odnosno kada miruje, ovaj sustav nije aktivan. Za aktivaciju ovog procesa bitna su dva hormona: adrenalin i glukagon. U njihovoj prisutnosti dolazi do brze aktivacije enzima fosforilaze koja miče fosfate s glikogena i potiče brzu glikogenolizu. Adrenalin se luči na simpatički podražaj te je njegov učinak vidljiv posebice u jetri i mišićima. Glukagon se luči na sniženu koncentraciju glukoze u krvi te tako povećava koncentraciju iste u krvi (Hall, 2011).

1.2.2. Dobivanje energije iz glukoze

Dobivanje energije iz glukoze može se podijeliti u nekoliko koraka. Oslobođanje energije se odvija postupno. Pri naglom oslobađanju energije, velik bi se dio energije gubio u obliku topline stoga se kaskadnim reakcijama postiže učinkovitost samog procesa. Ukupna energija sadržana u kemijskim vezama glukoze iznosi 2872 kJ, a za stvaranje jednog mola ATP-a je potrebno 50 kJ. U metabolizmu od svakog mola glukoze nastane 38 mola ATP-a, a ostatak se energije oslobađa u obliku topline ili ostane vezana u intermedijerima (Hall, 2011). Prvi proces u kaskadi je glikoliza. Glikoliza se odvija u citoplazmi stanice te od jedne molekule glukoze kao krajnji produkt nastaju dvije molekule pirogroždane kiseline – piruvata. U tom se procesu oslobađa neznatna količina ATP-a, svega dvije molekule. Uz ATP i piruvat, nastaju i dva vodikova iona. Energetski učinak ove reakcije je svega 43% dok se 57% energije oslobađa u obliku topline (Hall, 2011).

Idući korak u procesu metabolizma glukoze je pretvorba dviju molekula piruvata s koenzimom A (CoA) pri čemu nastaju dvije molekule acetil-CoA, 2 molekule ugljikova dioksida te 4 vodikova iona. U ovom procesu ne nastaju molekule ATP-a.

Nastale molekule ulaze u Krebsov ciklus - ciklus limunske kiseline. Ove reakcije se odvijaju u aerobnim uvjetima u matriksu mitohondrija. Ciklus limunske kiseline prikazan je na **Slici 1**. Kao rezultat ovog ciklusa nastaje 2 molekule CoA, vodikovi ioni, 4 molekule ugljikova dioksida te 2 molekule ATP-a za svaku molekulu glukoze (Hall, 2011).



Slika 1. Krebsov ciklus ili ciklus limunske kiseline (preuzeto sa stranice https://hr.wikipedia.org/wiki/Krebsov_ciklus)

Velike količine ATP-a nastaju tek u mitohondriju u procesu oksidativne fosforilacije – ukupno 90% ATP-a. Oksidacijom vodikovog iona nastalog hidrolizom NADH, oslobađaju se elektroni bogati energijom. Ti elektroni prolaze kroz kaskadu proteinskih molekula na unutarnjoj membrani mitohondrija te pomažu pri stvaranju koncentracijskog gradijenta vodika u mitohondriju. Zbog nastalog gradijenta u vanjskom prostoru mitohondrija, vodikovi ioni pasivno prolaze kroz ATP-sintazu te omogućuju regeneraciju ATP-a iz ADP-a. Vodikovi ioni potom reagiraju s kisikom te nastaje voda. ATP pasivno potom izlazi iz mitohondrija

zahvaljujući koncentracijskom gradijentu. Dva elektrona su potrebna za nastanak triju molekula ATP-a. Ovaj je metabolički put aktivan samo dok je dostupan kisik (Hall, 2011).

Sustav je reguliran fosfofruktokinazom – enzimom koji sudjeluje u glikolizi. On je inhibiran povišenom koncentracijom ATP-a u stanici ili suviškom iona citrata u ciklusu limunske kiseline (Hall, 2011).

U anaerobnim uvjetima ove se metaboličke reakcije ne mogu odvijati, osim prvog koraka – glikolize, pri kojem ne nastaje mnogo energije. Kad se koncentracija produkata glikolize povisi, metaboličke se reakcije obustavljaju. Kako organizam ne bi izgubio i taj mali dio dostupne energije dolazi do reakcije samih produkata glikolize – pirogroždane kiseline, NADH te vodikova iona pri čemu nastaje mliječna kiselina. Ona potom izlazi iz stanice sprječavajući inhibiciju glikolize kao posljedicu pretjeranog nakupljanja piruvata u stanici. Po ponovnoj uspostavi aerobnih uvjeta mliječna kiselina prelazi u piruvat. Ta se konverzija u glavnini događa u jetri, no moguća je i u nekim drugim organima. Srce je također mišić koji veliku količinu mliječne kiseline ponovno pretvara u piruvat pogotovo za vrijeme teških fizičkih napora (Hall, 2011).

1.2.3. Pentoza fosfatni put

Još je jedan metabolički put iz kojeg se dobiva energija razgradnjom glukoze koji se naziva put pentoza fosfat. Često se naziva i alternativnim metaboličkim putem jer se energija uskladištena ovim putem koristi za brojne procese sinteze u stanicama. Put se zasniva na nastanku pentoze D-ribuloze iz glukoze te oslobađanju ugljikova dioksida. Od 6 molekula glukoze koje ulaze u reakciju iz nje izlazi njih pet što govori o tome da je ciklus pentoza fosfat kružni proces. Energija se veže u molekule NADPH-a koji će kasnije biti iskorišten kao donor energijom bogatih elektrona drugim molekulama. Ta se molekula kasnije koristi za pretvorbu masti iz ugljikohidrata kada su stanice u potpunosti zasićene glikogenom (Hall, 2011).

1.2.4. Glukoneogeneza

Ugljikohidrati su od izuzetne važnosti za ljudski organizma i nužni su za njegovo funkcioniranje. To pokazuju i činjenice da mozak i eritrociti, u fiziološkim uvjetima, energiju proizvode jedino iz glukoze. Stoga organizam konstantno pokušava osigurati barem tu minimalnu količinu glukoze za živčani sustav. U nedostatku ugljikohidrata iz prehrane ili uskladištenih ugljikohidrata, organizam je u mogućnosti iz drugih molekula sintetizirati ugljikohidrate. To su prvenstveno masne kiseline i proteini. Sam metabolički proces nastanka

ugljikohidrata iz masnih kiselina i proteina naziva se glukoneogeneza. Glukoneogeneza ima ulogu u regulaciji koncentracije glukoze u krvi te sprječava da ona padne ispod fiziološkog minimuma. Proces glukoneogeneze ne odvija se u svim tkivima i organima već tu glavnu ulogu ima jetra. Ona iz dostupnog glikogena sintetizira glukozu ranije opisanim procesom glikogenolize, te u njegovom nedostatku iz laktata i aminokiselina u procesu glukoneogeneze. Za vrijeme dužeg gladovanja tu funkciju mogu preuzeti i bubrezi (Hall, 2011).

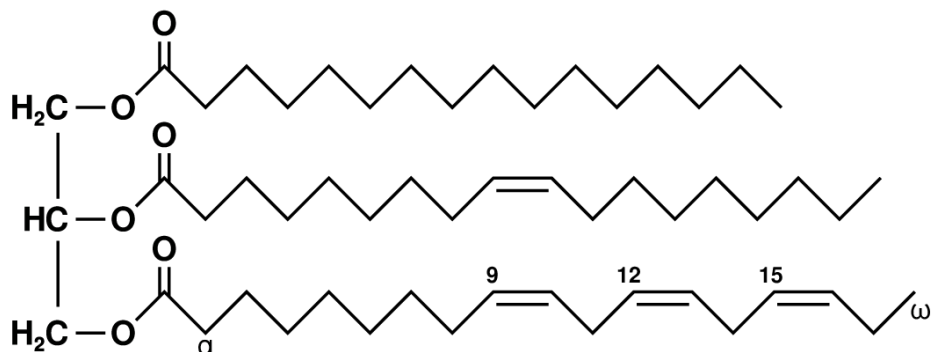
Glukoneogeneza je regulirana koncentracijom glukoze u krvi te manjkom ugljikohidrata u stanicama. Bitnu ulogu u regulaciji glukoneogeneze ima i razina kortizola u krvi (Hall, 2011).

1.3. Lipidi

Lipidi su skupina koja sadrži velik broj spojeva, a među najpoznatijima i u hrani najprisutnijima su trigliceridi (masti i ulja), fosfolipidi te kolesterol. Prvim dvjema skupinama je zajedničko to što su građene od masnih kiselina – dugolančanih organskih kiselina. Kolesterol u svom sastavu ne sadrži masne kiseline, no njegova je jezgra sintetizirana od dijelova masnih kiselina. Trigliceridi su dobili ime po tome što su to esteri glicerola i triju masnih kiselina. Upravo oni, uz ugljikohidrate, imaju ulogu u dobivanju energije i služe kao glavni spremišni oblik energije u organizmu. Fosfolipidi i kolesterol, s druge strane, sudjeluju u izgradnji staničnih membrana, ali i za druge funkcije u stanici (Hall, 2011).

1.3.1. Trigliceridi

Trigliceridi, kao što je ranije spomenuto, su esteri viših masnih kiselina i alkohola glicerola. Građa triglicerida prikazana je na **Slici 2**. Masne kiseline vezane za glicerol kod ljudi su najčešće – stearinska, palmitinska i oleinska kiselina (Hall, 2011).



Slika 2. Trigliceridi (preuzeto sa stranice <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=Gra%C4%91a+triglicerida+>)

Trigliceridi se iz hrane u crijevima razgrađuju na monogliceride i masne kiseline koje se pri apsorpciji ponovno sintetiziraju. U organizam ulaze kao raspršene kapljice nazvane hilomikroni. Na njih se apsorbiraju molekule apoproteina B koje će imati ulogu u njihovom prijenosu. Samim vezanjem apoproteina za površinu hilomikrona, povećava se sposobnost suspendiranja hilomikrona u tjelesnim tekućinama. U hilomikrone ulazi i većina fosfolipida te kolesterol. Takvi se hilomikroni prenose u krv. Prolaskom kroz tkiva, djelovanjem enzima protein - lipaze, ti se hilomikroni ponovno razgrađuju na trigliceride. Protein – lipaza je najaktivnija u masnom tkivu, tkivu skeletnih mišića te srcu. Pri toj se razgradnji oslobađaju masne kiseline i glicerol. Masne kiseline se po ulasku u stanicu difuzijom, mogu iskoristiti kao izvor energije ili ponovno pretvoriti u trigliceride te pohraniti u specijalizirane masne stanice - adipocite. Ostaci hilomikrona bogati kolesterolom se uklanjaju iz plazme vežući se za stjenke kapilara uz pomoć jetrenog proteina apolipoproteina E (Hall, 2011).

Masti se iz masnog tkiva, u potrebi organizma za energijom, hidroliziraju, te prenose do drugih tkiva u obliku slobodnih masnih kiselina. U plazmi se ogranci masnih kiselina ubrzo ioniziraju te vežu na albumin koji služi kao njihov prenositelj. Aktivacija hidrolize masnih kiselina u stanicama potaknuta je premalom koncentracijom glukoze te djelovanjem hormona (Hall, 2011).

1.3.2. Lipoproteini

Osim u obliku slobodnih masnih kiselina, lipidi se u tijelu prenose i u obliku lipoproteina. Lipoproteini su čestice puno manje od hilomikrona. Međusobno se razlikuju po svom sastavu te svojoj gustoći. Dijelimo ih na lipoproteine vrlo male gustoće (VLDL – engl. *very low density lipoproteins*) koji sadrže velike količine triglicerida; lipoproteine srednje gustoće (IDL – engl. *intermediate-density lipoproteins*) iz kojih su odstranjeni trigliceridi te su stoga bogati fosfolipidima i kolesterolom; lipoproteine male gustoće (LDL – engl. *low density lipoproteins*) koji sadrže visoke koncentracije kolesterola i niže koncentracije fosfolipida; te lipoproteine velike gustoće (HDL – engl. *high density lipoproteins*) koji sadrže veliku koncentraciju proteina te mnogo manju koncentraciju kolesterola i fosfolipida. Svi lipoproteini nastaju pretežno u jetri. Njihova funkcija je da lipidne sastojke prenose krvlju do mjesta gdje su potrebni u organizmu (Hall, 2011).

1.3.3. Metabolizam lipida

Kako je već ranije napomenuto trigliceridi su jedan od pričuvnih oblika energije u organizmu te služe za dobivanje energije pri nedostatnoj količini ugljikohidrata i kod

dugotrajnog gladovanja. Ovisno o prehrani i unesenom omjeru triglicerida i masti kod pojedinaca, omjer dobivene energije iz masti može varirati. To dokazuje da masti mogu biti podjednako bitan izvor energije kao i ugljikohidrati (Hall, 2011).

Kako bi se iz triglicerida mogla osloboditi energija potrebna je prvo njihova hidroliza na glicerol i slobodne masne kiseline. Masne kiseline prenose se do tkiva te ulaze u mitohondrij gdje oksidiraju kako bi dale energiju. Kako bi masne kiseline ušle u mitohondrij potreban je prijenosnik odnosno molekula karnitina. Tek po odvajanju masnih kiselina od karnitina nastupa oksidacija. Glicerol po ulasku u ciljanu stanicu odmah prelazi u glicerol-3-fosfat, jedan od intermedijera u glikolitičkom putu razgradnje glukoze te na taj način oslobađa energiju (Hall, 2011).

1.3.3.1. Beta oksidacija masnih kiselina

Proces razgradnje masnih kiselina u mitohondrijima naziva se beta oksidacijom masnih kiselina. Proces se zasniva na odvajanju dvaju ugljikovih atoma s masne kiseline i nastanku acetil-CoA koji potom može ući u ciklus limunske kiseline stvarajući energiju. Pri nastanku acetil-CoA nastaju i četiri vodikova iona koji sudjeluju u stvaranju kemiosmotskog gradijenta u mitohondrijima. Pri tom procesu nastaju velike količine energije vezane u molekulama ATP-a (Hall, 2011).

Najveći dio razgradnje masnih kiselina događa se u jetri. Jetra s druge strane troši vrlo malo energije nastale oksidacijom masnih kiselina. Nastali acetil-CoA u jetri često međusobno reagira, gdje dvije molekule daju acetocetenu kiselinu (aceto-acetat). Ta se acetocetena kiselina krvlju prenosi u druge dijelove organizma gdje služi za oslobađanje energije. Dio se razgradi u beta hidroksimaslačnu kiselinu te aceton. Sve tri navedene molekule mogu slobodno difundirati u krv te u perifernom tkivu obrnutom reakcijom stvoriti acetil-CoA te tako zadovoljiti potrebe za energijom. Kada nije moguć metabolizam glukoze, kao posljedica dijabetesa ili pri gladovanju te pri hranjenju isključivo mastima, njihova se koncentracija u krvi povećava nekoliko puta. To stanje nazivamo ketozom zbog toga što se radi o dvjema ketokiselinama te ketonu, a same molekule ketonskim tijelima. Prebacivanje metabolizma s ugljikohidrata na masne kiseline potaknuto je samim nedostatkom ugljikohidrata te hormonskim utjecajima glukokortikoida kore nadbubrežne žlijezde, glukagona i smanjenim lučenjem inzulina (Hall, 2011).

Metabolizam ugljikohidrata ne može u potpunosti nadomjestiti metabolizam masti jer su ugljikohidrati potrebni za regeneraciju oksaloacetata s kojim reagira acetil-CoA pri ulasku u ciklus limunske kiseline. U tom stanju može nastupiti teška acidoza u organizmu zbog

pretjeranog nakupljanja acetoctene kiseline i β -hidroksimaslačne kiseline u krvi. To se stanje može izbjeći polaganim prelaskom na masnu prehranu pri čemu se organizam prilagodi na višu stopu potrošnje acetoctene kiseline te ne dolazi do ketoze (Hall, 2011).

1.3.3.2. Pretvorba triglicerida u ugljikohidrate

Ranije je opisana pretvorba masnih kiselina do ugljikohidrata. Jednako tako iz ugljikohidrata mogu nastati i masne kiseline. Do toga dolazi kada se u organizam unose veća količina ugljikohidrata nego što je potrebno za opskrbu energijom i pohranu u obliku glikogena. Taj višak ugljikohidrata pretvara se u trigliceride (Hall, 2011).

Taj se proces odvija u jetri odakle se lipoproteinima (VLDL) transportiraju do mjesta pohrane. Ishodišna molekula za nastanak masnih kiselina iz glukoze je acetyl-CoA. Molekule acetyl-CoA polimeriziraju te nastaju dugi lanci masnih kiselina. Pri ovom procesu troši se ATP te NADPH. Glicerolni dio triglicerida nastaje iz α -glicerolfosfata, jednog od međuprodukata metabolizma glukoze. Ovaj proces je energetski vrlo učinkovit jer se 85% energije vezano u molekulama glukoze pohranjuje u trigliceridima, dok se 15% energije gubi u obliku topline (Hall, 2011).

1.3.3.3. Regulacija korištenja triglicerida kao izvora energije

Ukoliko su organizmu dostupne dovoljne količine ugljikohidrata, oni se koriste za produkciju energije. Povećanjem koncentracije α -glicerolfosfata u tkivu kao posljedica količine ugljikohidrata u organizmu, sam α -glicerolfosfat veže slobodne masne kiseline te nastaju trigliceridi. To pomiče ravnotežu slobodnih masnih kiselina i triglicerida prema trigliceridima. U suprotnom dolazi do hidrolize triglicerida u adipocitima i jetri te otpuštanju masnih kiselina u krv koje se potom mogu metabolizirati te osigurati energiju organizmu. Taj proces također može biti potaknut i smanjenim lučenjem inzulina kao posljedica smanjena koncentracije glukoze u krvi. Osim inzulina, aktivaciju hidrolize mogu potaknuti i drugi hormoni: a) adrenalin i noradrenalin na simpatički podražaj; b) kortikotropin adenohipofize koji potiče lučenje glukokortikoida iz nadbubrežne žlijezde koji pomiče metabolizam prema iskorištavanju masti aktivacijom lipaze ovisne o hormonima u tolikoj mjeri da može doći do stanja ketoze te im se često pripisuje i ketogeni učinak; c) hormon rasta aktivirajući lipazu osjetljivu na hormone, no u manjoj mjeri u odnosu na glukokortikoide; d) hormoni štitnjače povećavajući energetski metabolizam svih stanica u organizmu (Hall, 2011).

1.4. Proteini

Proteini ili bjelančevine su izrazito bitne za organizam te čine oko četvrtinu suhe mase tijela čovjeka. Prema njihovoj funkciji dijele se na strukturne proteine koji sudjeluju u izgradnji organizma, enzime, nukleoproteine, transportne proteine, kontraktilne proteine te brojne druge vrste s raznim specijaliziranim ulogama. Svim proteinima je zajedničko da su izgrađeni od aminokiselina (Hall, 2011).

Aminokiseline su molekule koje su specifične po posjedovanju karbonilne skupine na jednom kraju molekule te amino skupine na drugom kraju. Međusobno se povezuju peptidnom vezom te tako nastaju proteini. Složeniji proteini se sastoje od po nekoliko tisuća aminokiselina. Proteini se mogu sastojati i od nekoliko lanaca aminokiselina povezanih vodikovim ili drugim vezama (Hall, 2011).

Kao krajnji produkt probave, proteini se apsorbiraju u tijelo u obliku aminokiselina, rijetko kao polipeptidi ili u izvornom obliku. U krvi se u fiziološkim uvjetima, gotovo nikad ne nalaze u visokim koncentracijama, no njihova koncentracija ovisi o samoj vrsti aminokiselina. U stanice se, zbog svoje veličine, prenose posebnim proteinskim nosačima jer zbog svoje veličine ne mogu difundirati preko stanične membrane. U stanicama se aminokiseline skladište u obliku proteina tvoreći takozvane stanične proteine. Sukladno tome, koncentracija samih aminokiselina u stanicama je niska. U potrebni aminokiselina, ti se stanični proteini mogu brzo razgraditi proteolitičkim enzimima u lizosomima te prenijeti krvlju do ciljnog mjesta u organizmu. Tu su iznimka jezgri kromosomski proteini, te strukturne i kontraktilne bjelančevine. Jetra kao organ pohranjuje veću količinu proteina nego druga tkiva i organi. Uz jetru, kao mjesta pohrane, organizam koristi crijeva te bubrege (Hall, 2011).

Ukoliko se u krvi smanji koncentracija aminokiselina, dolazi do njihovog otpuštanja iz stanica. Na taj se način održava relativno stalna koncentracija aminokiselina u plazmi. Ova ravnoteža je pod utjecajem raznih hormona. Ukoliko je koncentracija aminokiselina viša od gornje granice koju organizam može skladištiti, one se upotrebljavaju za dobivanje energije ili se pretvaraju u masti ili glikogen te tako skladište (Hall, 2011).

Organizam je sam sposoban stvoriti neke aminokiseline, točnije njih 10 od ukupno dvadeset najčešćih. Aminokiseline koje organizam ne može sam stvoriti nazivamo esencijalnim ili nenadoknadivim aminokiselinama. S druge strane, ostalih 10 se naziva neesencijalnim aminokiselinama. Sam naziv esencijalne i neesencijalne ne govori o njihovoj bitnosti za organizam jer su i jedne i druge potrebne za proizvodnju tkivnih proteina.

Stvaranje aminokiselina u organizmu ovisi o ketokiselinama koje reakcijom transaminacije dobivaju amino skupinu te tako postaju aminokiselinama (Hall, 2011).

1.4.1. Proteini plazme

U plazmi se razlikuju 3 osnovne skupine bjelančevina: albumini, globulini i fibrinogen. Albumini su odgovorni za održavanje koloidno-osmotskog tlaka plazme čime se sprječava izlazak plazme iz kapilara. Globulini su povezani s imunošću. Uz to posjeduju brojne druge enzimske funkcije. Fibrinogen ima ulogu u zgrušavanju krvi ukoliko dođe do ozljede tkiva, odnosno krvnih žila i kapilara. Sve navedene molekule nastaju većinom u jetri osim globulina čije je mjesto produkcije tkivo limfnih organa (gama-globulini). Ove bjelančevine također mogu sudjelovati u nastanku energije no tek u stanjima teškog i dugotrajnog gladovanja. U tom procesu sudjeluju makrofazi u kojima se razgrade na aminokiseline te tako krvlju odašilju do drugih tkiva. Proteini su sami po sebi izuzetno metabolički dinamične molekule što pokazuje njihova reverzibilna ravnoteža među tkivima (Hall, 2011).

1.4.2. Metabolizam proteina

Razgradnja proteina do aminokiselina se uglavnom zbiva u jetri. Deaminacija je prvi korak u procesu nastanka energije iz aminokiselina pri čemu nastaju ketokiseline. Pri tom se procesu oslobađa amino skupina koja se prenosi na neku drugu skupinu ili odstranjuje u obliku amonijaka. Amonijak se iz krvi u potpunosti otklanja u obliku karbamida (ureje). Taj se proces gotovo u potpunosti događa u jetri. Amonijak je izuzetno toksičan za organizam te je bitno da se sam amonijak učinkovito odstranjuje iz krvi. Karbamid difundira iz jetrenih stanica te se iz tijela izbacuje bubrezima putem mokraće (Hall, 2011).

Nastale ketokiseline se najčešće oksidiraju čime dolazi do oslobađanja energije. Njihovom oksidacijom nastaju spojevi koji mogu ući u ciklus limunske kiseline. Energija oslobođena oksidacijom grama aminokiselina znatno je manja od energije dobivene oksidacijom grama ugljikohidrata. Proces nastanka glukoze iz aminokiselina naziva se glukoneogeneza dok se proces nastanka masnih kiselina iz aminokiselina naziva ketogeneza (Hall, 2011).

Ovi procesi su regulirani hormonima, prvenstveno hormonom rasta, inzulinom, glukokortikoidima, testosteronom, estrogenom te tiroksinom (Hall, 2011).

1.5. Masno tkivo

Masno tkivo spada u tip vezivnog tkiva u kojem prevladavaju masne stanice – adipociti. One mogu biti nasumično raspršene u vezivnom tkivu, u malim skupinama ili tvoriti velike nakupine koje čine masno tkivo. U ljudi se količina masnog tkiva u organizmu razlikuje ovisno o spolu te tako kod muškaraca zauzima 10-15% mase organizma dok kod žena 20 – 25% tjelesne mase. Masno tkivo je najveće skladište energije u organizmu gdje se energija pohranjuje u obliku triglicerida. Energija u masnom tkivu je dostupna organizmu kada energija pohranjena u obliku ugljikohidrata (glikogena) u jetri i skeletnim mišićima nije dostatna (Junqueira i Carneiro, 2007).

Uloge masnog tkiva su raznolike. Potkožno masno tkivo sudjeluje u oblikovanju površine tijela, masno tkivo u jastučićima (dlanovima i stopalima) sudjeluje u ublažavanju udaraca. Masno tkivo je također slab toplinski vodič, te ga to čini izuzetno dobrim toplinskim izolatorom. Također sudjeluje u popunjavanju praznina između pojedinih organa te pomaže pozicioniranju organa (Junqueira i Carneiro, 2007).

Osim navedenog, otkriveno je kako masno tkivo ima i sekretornu ulogu. Molekule koje se luče iz masnog tkiva nazivaju se adipokinima. Adipokini, djelujući na hipotalamus, moduliraju uzimanje hrane odnosno unošenje energije u organizam te raspodjelu energije. Pretjerano lučenje adipokina kod pretilih osoba može dovesti do sustavne inzulinske rezistencije i drugih metaboličkih bolesti. Kao najpoznatiji adipokin, prvi otkriven, spominje se leptin te je stoga i njegova uloga u organizmu najdetaljnije razjašnjena. Osim leptina češće spominjani su i adiponektin, resistin te drugi. Produkti stanica imunološkog sustava pokazuju djelovanja slična adipokinima te ih se često ubraja među njih. Tu se ističu interleukin 6 (IL-6) i čimbenik nekroze tumora α (engl. *Tumor necrosis factor*, TNF α) (Tateya i sur., 2013).

U tkivu je moguće zamijetiti dvije vrste masnog tkiva: bijelo (unilokularno) masno tkivo (engl. *white adipose tissue*, WAT) te smeđe (multilokularno) masno tkivo (engl. *brown adipose tissue*, BAT). WAT je građeno od takozvanih masnih stanica nazvanih adipocitima koje u svojoj citoplazmi sadrže velike vakuole ispunjene tekućim trigliceridima. BAT s druge strane grade stanice s brojnim kapljicama masti raspršenim po stanici te mnoštvom mitohondrija (Junqueira i Carneiro, 2007). U posljednje vrijeme spominje se još jedna vrsta masnog tkiva nazvanog bež masno tkivo (engl. *beige/brit adipose tissue*) (Giralt i Villarroya, 2013).

1.5.1. Bijelo masno tkivo

Bijelo masno tkivo (engl. *white adipose tissue*, WAT) naziva se još i unilokularnim masnim tkivom zbog specifične građe stanica od kojih je građeno. Svoje ime dobilo je po bijeloj boji na histološkim preparatima iako njegova boja može varirati od bijele do žute, ovisno o prehrani. Žuta boja potječe od karotenoida iz hrane raspršenih u masnim kapljicama. Masno se tkivo nalazi gotovo po čitavom tijelu te čini gotovo svo masno tkivo kod odraslih osoba. Kod djece je jednoliko raspoređeno po cijelom tijelu te se tijekom razvoja djeteta počinje nakupljati u pojedinim predjelima, dok se u drugim predjelima gubi. Raspodjela masnog tkiva regulirana je hormonima (Junqueira i Carneiro, 2007).

Masne stanice (adipociti) koje ga grade posjeduju veliku masnu kapljicu ispunjenu trigliceridima te je zbog iste, jezgra potisnuta uz rub stanice. Na histološkim preparatima one izgledaju kao tanki prsten s jezgrom uz rub budući da se masti otapaju u alkoholu i ksilolu kojem su prerezi podvrgnuti pri izradi histoloških preparata. Stoga se njihov oblik na histološkim preparatima često uspoređuje s prstenom. Drugi stanični organeli nalaze se uz rub citoplazme jer su kao i jezgra potisnuti lokaliziranim mastima u stanici. Masne kapljice nisu omeđene staničnom membranom, stoga nakupljena mast u stanici nije zaseban organel. Između masnih stanica nalazi se vezivno tkivo kroz koje protječu mnogobrojne krvne žile te živčani završeci (Junqueira i Carneiro, 2007).

1.5.2. Smeđe masno tkivo

Smeđe masno tkivo naziva se još i multilokularnim masnim tkivom zbog većeg broja masnih kapljica koje se nalaze u citoplazmi masnih stanica koje ga grade. Osim većeg broja masnih kapljica raspršenih po citoplazmi, stanice smeđeg masnog tkiva obiluju mitohondrijima što im daje smeđu boju po čemu su i dobili ime. Smeđoj boji pridonosi i velik broj krvnih žila kojima je smeđe masno tkivo okruženo. Svojom građom sličnije je endokrinom tkivu nego masnom tkivu zbog gusto zbijenih stanica u nakupinama. Jezgra se u stanicama, za razliku od bijelog masnog tkiva, nalazi u sredini te su ostali organeli raspoređeni po citoplazmi (Junqueira i Carneiro, 2007). Stanice smeđeg masnog tkiva su veličinom manje od stanica bijelog masnog tkiva.

Za razliku od bijelog masnog tkiva, smeđe masno tkivo nije toliko rasprostranjeno po cijelom tijelu, te je ograničeno na pojedine dijelove organizma. U ljudi je prisutno za vrijeme embrionalnog razvoja te kod novorođenčadi. Kod odraslih osoba udio se smeđeg tkiva smanjuje (Junqueira i Carneiro, 2007).

Smeđe masno tkivo, za razliku od bijelog masnog tkiva, ima kataboličku ulogu, odnosno ulogu u stvaranju topline. To je poseban način zagrijavanja organizma koji se naziva i nedrhtajuća termogeneza (engl. *nonshivering thermogenesis*). Zbog toga je obilno u organizmima koji hiberniraju te ga se često naziva i „hibernacijskom žlijezdom“ (Junqueira i Carneiro, 2007).

Termogeneza u smeđem masnom tkivu potaknuta je noradrenergičnom signalizacijom kada je organizam izložen hladnoći (Giralt i Villarroya, 2013). Vezanjem noradrenalina za $\beta 3$ noradrenergične receptore dolazi do aktivacije lipaze osjetljive na hormone što potiče hidrolizu triglicerida iz masnih kapljica. Metabolizmom masnih kiselina oslobađa se energija u obliku topline. U stanicama smeđeg masnog tkiva eksprimiran je UPC1 protein (engl. *uncoupling protein 1*) znan i kao termogenin. Taj se protein nalazi na unutarnjoj membrani mitohondrija te omogućuje povrat protoka vodikovih iona u međumembranski prostor mitohondrija bez protoka vodikovih iona kroz ATP-sintazu. Energija proizvedena metabolizmom masnih kiselina se stoga ne koristi za sintezu ATP-a već se oslobađa u obliku topline te tako zagrijava krv u mnoštvu krvnih žila koje okružuju samo tkivo. Zagrijana krv s obiljem nemetaboliziranih masnih kiselina prenosi se zatim po tijelu te zagrijava organizam (Junqueira i Carneiro, 2007).

Također je primijećena i aktivacija smeđeg masnog tkiva pri prekomjernom uzimanju kalorija – kao na primjer visokokalorične hrane. Taj se proces još naziva i hranom inducirana termogeneza (engl. *food-induced thermogenesis*) (Peirce i sur., 2016).

1.5.5.3. Histogeneza masnog tkiva

Nekad se smatralo da svo masno tkivo u organizmu potječe od mezenhimskih stanica, no danas se zna da je masno tkivo u našem organizmu (WAT i BAT) izuzetno heterogenog podrijetla (Lee i sur., 2014). Razvoj masnog tkiva započinje još za vrijeme embrionalnog razvoja. Početak razvoja masnog tkiva zavisi od vrste do vrste te tako kod ljudi započinje u drugom tromjesečju trudnoće, dok kod štakora u perinatalnom periodu. Također se masno tkivo u različitim područjima organizma razvija u drugim periodima. Tako se subkutano (potkožno) masno tkivo razvija prije visceralnog masnog tkiva. Jednako tako BAT se razvija ranije nego WAT (Giralt i Villarroya, 2013). Sam proces nastanka masnih stanica se naziva adipogeneza. To je skup visoko usklađenih procesa koji započinju za vrijeme embrionalnog razvoja te se nastavlja tijekom života. Kao i svaka organogeneza, i adipogeneza može se podijeliti u nekoliko faza koje se međusobno razlikuju po stupnju grupiranja progenitorskih stanica te diferencijaciji istih (Lee i sur., 2014).

Tkivo za koje se pretpostavlja da će postati masno tkivo, nakuplja se u vidu rahlo okupljenih stanica s oskudnim izvanstaničnim matriksom. Iako je već navedeno njihovo heterogeno podrijetlo, to tkivo se većinom sastoji od mezenhimskih stanica. Ove ishodišne nakupine stvaraju okvir za razvoj daljnjih novačenja stanica te nastavak adipogeneze. Idući korak je vaskularizacija tkiva. Taj se proces kreće od središta rahle nakupine stanica te se širi prema periferiji. To dovodi do nastanka definiranih režnjeva masnog tkiva koji su sada spojeni vezivnim tkivom. Krajnja determinacija i hipertrofija pojedinih adipocita zbiva se postnatalno. Razvoj BAT-a prilično je sličan razvoju WAT-a s razlikom što se ishodišne nakupine stanica nakupljaju u gustim nakupinama te posjeduju kompaktnija retikulinska vlakna (Baur i sur., 2006).

1.5.4. Prekursori adipocita

U posljednje se vrijeme više pažnje posvetilo molekularnim karakteristikama i diferencijacijskom potencijalu prekursorskih stanica masnog tkiva. Iako u ljudi još nisu otkrivene, na mišjim modelima su poprilično jasno određene karakteristike. Istraživanja su pokazala da i stanice WAT-a i BAT-a potječu od progenitorskih stanica paraksijalnog mezoderma koje eksprimiraju $Myf5^+$ (engl. *myogenic factor 5*) i $PAX7^+$ (engl. *paired box protein 7*) te da stanice BAT-a mogu nastati iz satelitskih stanica nalik na matične stanice koštanog tkiva kod odraslih. Također stanice BAT-a pokazuju transkripcijske čimbenike specifične za mišiće te miogene mikroRNA. Istraživanja su pokazala da od $Myf5^+$ populacije dolazi do prenakupljanja i BAT-a i WAT-a u nedostatku tumor supresorskog proteina PTEN (engl. *phosphatase and tensin homolog*). Temeljem toga, WAT nastaje i iz $Myf5^+$ i $Myf5^-$ populacije progenitorskih stanica, no primarno je to i dalje $Myf5^-$ populacija mezenhimskih stanica. Nastanak i WAT-a i BAT-a dijeli transkripcijsku kaskadu koja uključuje PPAR γ (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor γ*) i C/ERB (engl. *CCAAT/nuclear-binding protein*). PPAR je nedvojbeno uključen u diferencijaciju svih adipocita (Peirce i sur., 2016).

1.5.5. Posmeđivanje (engl. *browning*)

Već je ranije u poglavlju spomenuto než masno tkivo (engl. *baige adipose tissue*) znano i kao „brite“ masno tkivo (engl. *brown in white = brite – smeđe u bijelom*). Same stanice se stoga često nazivaju než adipocitima. Stanice toga tkiva su posebne jer histološki pripadaju stanicama WAT-a, ali metabolički građom te ekspresijom proteina nalik su na stanice BAT-a. U njima je također prisutan i aktivan termogenin (UPC1) (Peirce i sur., 2016).

Sam proces nastanka bež masnih stanica u bijelom tkivu naziva se posmeđivanjem. Sam se proces pokreće noradrenergičnom aktivacijom $\beta 3$ adrenergičnih receptora pri kroničnoj izloženosti organizma hladnoći. Bež stanice koje nastaju u WAT-u su također porijeklom od Myf5⁻ prekursorskih mezenhimskih stanica. Od njihova otkrića do danas otkriveno je preko 50 molekula koje sudjeluju u determinaciji bež adipocita, no još nije u potpunosti razjašnjen njihov nastanak. Neki navode kako je moguć i prelazak stanica WAT-a u bež stanice. Pronađene su stanice bijelog masnog tkiva koje su nazvane „poucilokularnim adipocitima“ (engl. *poucilocular adipocytes*) koje posjeduju aktivne UPC1 proteine te imaju raspodjelu masnih kapljica kao intermedijeri stanica WAT-a i BAT-a te se smatraju intermedijarnom formom između stanica WAT-a te bež adipocita. Također je otkriveno kako i Myf⁺ stanične linije mogu diferencirati u bež masno tkivo (Giralt i Villarroya, 2013).

1.5.5.1. Razlika između stanica BAT-a i bež adipocita

Razlike stanica BAT-a i bež adipocita prvenstveno se razlikuju u svome nastanku te po svojoj funkciji (Giralt i Villarroya, 2013).

U prethodnim je poglavljima prikazana determinacija stanica BAT-a i bež adipocita. Dugo se vremena smatralo da su stanice BAT-a plastičnije nego što uistinu jesu te se kao njihov biljeg koristila prisutnost UCP1 proteina u samim stanicama. Stoga se dugo vremena smatralo kako stanice BAT adipocita mogu brzo reagirati na stimulacije hladnoćom te potaknuti njihovu hipertrofiju i hiperplaziju. Smatra se da je zbog korištenja UCP1 proteina kao biljega pretjerano opisana plastičnost BAT adipocita budući da i bež adipociti imaju eksprimirane UCP1 proteine (Giralt i Villarroya, 2013).

Razlike u funkciji teško je detaljno opisati no, iako za sada nisu provedene detaljne bioenergetske analize bež adipocita, zbog slične morfologije i molekularnih karakteristika stanice oba tkiva pokazuju multilokularno nakupljanje masnih kapljica, ekspresiju UCP1 proteina te povećanu aktivnost mitohondrija. Iako su različitog postanka te razmještaja po organizmu, pretpostavlja se da obje skupine stanica imaju istu funkciju. Iako imaju iste morfološke i metaboličke aktivnosti, transkripcijski čimbenici koji pokreću slične aktivnosti, se razlikuju. Potrebna su dodatna istraživanja da bi se sa sigurnošću znalo daju li ti proteini relevantne razlike između stanica (Giralt i Villarroya, 2013).

Neki autori navode kako je moguća razlika između bež i BAT adipocita u količini triglicerida koje pohranjuju u masnim kapljicama budući da bež adipociti nastaju iz prekursora WAT adipocita ili iz njih samih. Te se razlike smatraju ne toliko bitnima budući da i sami BAT adipociti tek kratak dio vremena provode metabolizirajući trigliceride iz svoje

citoplazme te da za vrijeme velike potrebe za termogenezom oksidiraju masne kiseline i trigliceride iz krvi te glukozu. Smatra se kako su endogene količine pohranjenih lipida uskladištene kako bi se mogla provoditi termogeneza i prije dotoka dostatne koncentracije metabolita krvlju do BAT-a. Također je i u miševa sklonih pretilosti, uočena razlika u tome što je smanjena stopa posmeđivanja u odnosu na sojeve rezistentne na pretilost (engl. *obesity resistant strains*) dok aktivnost, veličina te proliferacija BAT-a ostaje ista (Giralt i Villarroya, 2013).

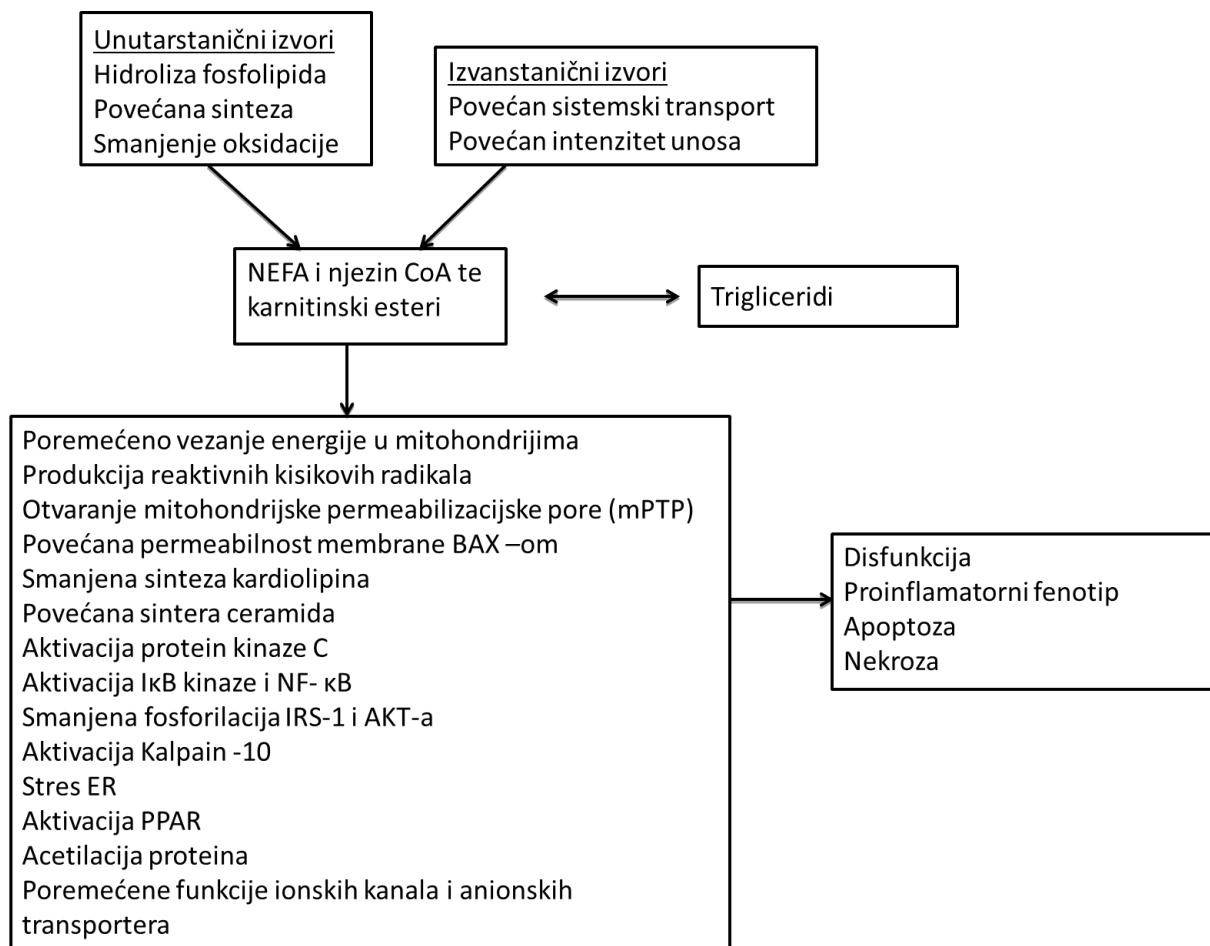
1.5.6. Pretilost

Pretilost je jedna od najčešćih suvremenih bolesti koja zahvaća sve veći dio stanovništva. Tijekom nekoliko zadnjih desetaka godina, može se reći da je broj oboljelih poprimio pandemijske razmjere (Lecoutre i sur., 2018). Nastaje kao posljedica pretjeranog unosa energije hranom, te nedostatnog trošenja iste kao posljedice sedentarnog načina života. Pretilost se može definirati kao bolest prouzrokovana viškom masti u tijelu. Sama pretilost često je popraćena i drugim patološkim stanjima organizma od kojih su najčešći dijabetes tipa 2, inzulinska rezistencija, kardiovaskularne bolesti među kojima se ističu hipertenzija i ateroskleroza, dislipidemija, kronične bubrežne bolesti, te tumori. Pored nabrojanih, brojne bolesti se pojavljuju u manjem intenzitetu. Također, pretilost je popraćena kroničnom upalom u organizmu (Tateya i sur., 2013). Pretilost također može negativno utjecati i na sposobnost regeneracije što je i istraženo na skeletnim mišićima na miševima (Werner i sur., 2018). U slučaju suvišne energije u obliku hranjivih tvari, one se skladište u obliku triglicerida kako je opisano u ranijim poglavljima. Mast se pohranjuje u potkožnom i peritonealnom masnom tkivu, no u stanjima unosa velike količine suvišne energije može i u drugim tkivima kao što je jetra (Hall, 2011).

Indeks tjelesne mase (engl. *body mass indeks*, BMI) je jedan od načina na koji se pretilost može dijagnosticirati, a izračunava se kao omjer tjelesne mase (u kg) te kvadrata visine u metrima. Za osobe čiji je BMI u rasponu od 25 – 29,9 kg/m² kažemo da imaju prekomjernu tjelesnu masu dok kod osoba kod kojih je BMI veći od 30 govorimo o pretilosti. Mora se napomenuti da povišen BMI ne mora nužno značiti da se radi o prekomjernoj tjelesnoj masi/ pretilosti, odnosno da ne mora nužno biti uzrokovana povećanom količinom masti u organizmu već može biti posljedica velike mišićne mase. Bolji način dokazivanja pretilosti je određivanje ukupnog postotka masti u tijelu pri čemu se za muškarce čijih 25% ukupne mase otpada na masti, kažemo da su pretili, te za žene ukoliko 35% njihove mase otpada na masti (Hall, 2011).

1.5.7. Lipotoksičnost

Lipotoksičnošću se naziva štetno djelovanje nakupljenih masti u organizmu. Akutna toksičnost proizlazi iz nakupljanja dugolančanih neesterificiranih masnih kiselina (engl. *longchain nonesterified fatty acids – NEFA*) u neadipoznim tkivima. Na adipocitima oboljelih od dijabetesa primijećena je zamjetno manja količina inzulinskih receptora te povećana koncentracija β -adrenergičnih receptora. To potiče lipolizu u masnim stanicama i oslobađanje masnih kiselina. Kao posljedica toga dolazi do lučenja ROS-a, indukcije inzulinske rezistencije, lučenja IL-6 i TNF- α te indukcije apoptoze β -stanica gušterače. Ove učinke zajedno nazivamo lipotoksičnošću te uzrokuju anatomske i funkcionalne ozlijede tkiva i organa (Fernández-Sánchez i sur., 2011). Lipotoksičnost je shematski prikazana na **Slici 3** (Weinberg, 2006).



Slika 3. Shematski prikaz lipotoksičnosti (preuzeto i prilagođeno prema Weinberg, 2006)

1.5.8. Hipertrofija i hiperplazija adipocita

Već je navedeno da je pretilost uzrokovana prekomjernim unosom energije te skladištenjem iste u obliku triglicerida. Kao glavno skladište triglicerida služe adipociti WAT-a te se isti u njima pohranjuju. U suvišnom dotoku energije, stanice prolaze kroz promjene kako bi se povećao prostor za skladištenje. Najistaknutija su dva načina: hipertrofija, odnosno povećanje veličine adipocita te hiperplazija tj. povećanje broja adipocita. Hipertrofija je češće prisutna u oboljelih od pretilosti te je povezana s brojnim poremećajima koji dovode do metaboličkog sindroma. Za razliku od toga, hiperplazija nije toliko česta. Ukoliko je prisutna, nije povezana s drugim patološkim promjenama te se često govori o metabolički zdravoj pretilosti (engl. *metabolically healthy obesity*) budući da kod pretilosti kao posljedice hiperplazije ne dolazi do inzulinske rezistencije. Smatra se da je hiperplazija nakon rođenja uvelike smanjena te još nisu objašnjeni mehanizmi njezina nastanka (Sun i sur., 2011).

1.5.9. Interakcija WAT i drugih tkiva

Kako je već navedeno promjene u masnom tkivu imaju utjecaj na cijeli organizam. Sam pretjeran unos kalorija ne mora nužno dovesti do razvoja pretilosti. Budući da organizam funkcionira sinergističkim djelovanjem ostalih tkiva i organa, može doći do kompenzacije pretjeranog unosa. Jednako tako, kako je i ranije navedeno, može doći do razvoja pretilosti. To ovisi o sudbini triglicerida nastalih od suvišno unesene energije. Stoga ćemo u ovom poglavlju razmotriti nekoliko mogućih sudbina adipocita te tkiva jetre, slezene i skeletnih mišića pri unosu prekomjerne količine energije (Lelliott i Vidal-Puig, 2004).

U fiziološkim uvjetima unesena energija se troši za sintezu ATP-a te se višak skladišti u masnom tkivu u obliku triglicerida, te u jetri i skeletnim mišićima u obliku glikogena. Promjene u toj ravnoteži dovode do patoloških promjena jer tkiva kojima nije primarna funkcija skladištenje masti poprimaju tu funkciju (Lelliott i Vidal-Puig, 2004). Patološke promjene su navedene kako slijedi:

(I.) Do prvog patološkog stanja može doći ukoliko dolazi do poremećaja u skladištenju masti u WAT-u kao posljedice povećanog unosa energije. Tada dolazi do porasta razine slobodnih masnih kiselina u krvi te se iste skladište u tkivima jetre, slezene i skeletnih mišića. Zbog nemogućnosti navedenih organa da metaboliziraju nakupljene masne kiseline dolazi do kroničnog nakupljanja masnih kiselina što može dovesti do inzulinske rezistencije, masne jetre i prestanka lučenja inzulina iz gušterače. Ovaj slučaj je povezan s lipodistrofičkim poremećajem kada masne stanice ne mogu skladištiti dovoljne količine triglicerida (Lelliott i Vidal-Puig, 2004).

(II.) U drugom slučaju, kao posljedice prekomjernog unosa energije, može doći do hiperplazije adipocita s ciljem povećanja skladišnog prostora WAT-a. Hiperetrofični adipociti pokazuju veću razinu rezistencije na inzulin te luče velik broj adipokina koji i u drugim tkivima potiču rezistenciju na inzulin. Adipociti u jednom trenutku prestaju biti u mogućnosti uskladištiti toliku količinu masti te suprimiraju aktivnost lipaze ovisne o hormonima zbog inzulinske rezistencije. To dovodi do povećane koncentracije masnih kiselina u cirkulaciji te pri kroničnoj izloženosti perifernih tkiva velikoj količini masnih kiselina do lipotoksičnosti i razvoju metaboličkih sindroma (Lelliott i Vidal-Puig, 2004).

(III.) U trećem slučaju organizam bi povećanu potrebu za skladištenjem masnih kiselina stvorio hiperplazijom adipocita. Hiperplastični adipociti pokazuju senzitivnost na inzulin te ne dolazi do poremećaja signalizacije. Iako manji, brojniji adipociti uspijevaju uskladištiti sve trigliceride te ne dolazi do lipotoksičnosti u perifernim tkivima. Iako dolazi do povećanja mase masnog tkiva (pretilosti) ona nije popraćena metaboličkim sindromom u perifernim tkivima. Na mišjim je modelima pokazano kako obrada tiazodilindionima pogoduje hiperplastičnoj promjeni WAT-a (Lelliott i Vidal-Puig, 2004).

Posljednja dva stanja povezana su s povećanim metabolizmom masnih kiselina u skeletnim mišićima.

(IV.) U ovom slučaju raspravlja se o rješavanju viška energije unesene u organizam oksidacijom masnih kiselina u mišićima. To se može postići genskom terapijom ili farmakološkim intervencijama. Ovo je stanje primijećeno na transgениčnim miševima s prekomjernom ekspresijom UCP3 proteina u skeletnom mišićnom tkivu. Tada ne dolazi do razvoja pretilosti jer se višak masnih kiselina ne skladišti u adipocitima već metabolizira u mišićima (Lelliott i Vidal-Puig, 2004).

(V.) Peti i posljednji slučaj je povezan sa sprječavanjem nakupljanja masnih kiselina u adipocitima te njihovom povećanom oksidacijom u skeletnim mišićima. U ovom slučaju također ne dolazi do lipotoksičnosti u perifernim tkivima niti do razvoja metaboličkog sindroma (Lelliott i Vidal-Puig, 2004).

1.5.10. Upala u masnom tkivu

Kronična upala povezana je s pretilošću induciranim metaboličkim sindromom. Upala je uzrokovana prodorom stanica imunološkog sustava u masno tkivo te lučenjem upalnih medijatora. Makrofazi su jedni od glavnih medijatora remodeliranja masnog tkiva. U pretilih je osoba primijećena povećana količina rezidentnih makrofaga u tkivu (Sun i sur., 2011). Oni potiču nastanak upalnog procesa lučenjem čimbenika tumorske nekroze α (engl. *tumor*

necrosis factor α – TNF- α). TNF- α prisutan, u masnom tkivu, ima brojna štetna djelovanja među kojima se ističe nastanak inzulinske rezistencije. Neki smatraju da ovaj proces prethodi nastanku sustavne inzulinske rezistencije (Tateya i sur., 2013).

Kao posljedica pretilosti dolazi do promjene fenotipa rezidentnih makrofaga. Pri normalnom unosu energije makrofazi pokazuju protuupalni M2 fenotip. M2 fenotip potiče lučenje čimbenika koji pogoduju angiogenezi te popravku tkiva što pogoduje adipocitima. Pretilost potiče transformaciju makrofaga u upalni M1 fenotip koji je povezan s lučenjem upalnih medijatora te razvojem inzulinske rezistencije (Sun i sur., 2011).

Do inicijacije makrofaga u masnom tkivu dolazi kao posljedica promjena u masnom tkivu. Kao uzroci inicijacije navode se stanična smrt, lučenje kemokina, tkivna hipoksija te nereguliran dotok masnih kiselina. Ovi su uzroci međusobno povezani i mogu se međusobno inicirati (Sun i sur., 2011).

Makrofazi kao fagocitne stanice dolaze do masnog tkiva da bi odstranili ostatke stanica nakon nekroze ili masne kapljice u tkivu nastale kao posljedica nekroze i apoptoze. Istraživanja su pokazala kako velika stopa nekroze u masnom tkivu potiče značajnu infiltraciju makrofaga. Makrofazi okružuju ostatke nekrotičnih stanica tvoreći strukturu nalik na krunu te fagocitiraju velike ostatke hipertrofičnih nekrotičnih adipocita tvoreći strukturu nalik na sincicij koju potom otklanjaju iz tkiva. Iako apoptoza ostavlja manje neželjenih ostataka u tkivu, za njom također ostaju masne kapljice čija prisutnost potiče aktivaciju makrofaga i njihovo otklanjanje. Oba procesa su izuzetno spora te mogu trajati po nekoliko dana do nekoliko tjedana (Sun i sur., 2011).

Kao posljedica upale u masnom tkivu adipociti počinju lučiti specifične molekule nazvane kemokinima koji imaju ulogu u novačenju makrofaga. To se odvija preko MCP-1/CCR2 signalnog puta te potiče prodor monocita iz koštane srži i njihovo novačenje u makrofage (Sun i sur., 2011).

Hipertrofija adipocita često izaziva lokaliziranu tkivnu hipoksiju pri nagloj hipertrofiji. Istraživanja su pokazala kako je masno tkivo u osoba oboljelih od pretilosti slabo oksigenirano. Kao posljedica hipoksije dolazi do povišenog lučenja brojnih adipokina kao što su čimbenik inhibicije makrofagne migracije – MIF (engl. *macrophage migration inhibitory factor*), matriks metaloproteinaze MMP2 i MMP9, IL-6 te drugih koji pogoduju razvoju tkivne upale (Sun i sur., 2011).

Povećan promet masnih kiselina također može sudjelovati u novačenju makrofaga. Slobodne masne kiseline mogu biti ligandi za TLR4 (engl. *tool like receptors 4*). Vežanjem liganda za TLR4 kompleks, potiče se upalni odgovor zbog čega dolazi do nakupljanja

rezidentnih makrofaga kao posljedice povišene koncentracije slobodnih masnih kiselina (Sun i sur., 2011).

Osim makrofaga, primijećena je prisutnost i utjecaj drugih imunoloških stanica na upalu. Sve subpopulacije stanica T su također primijećene u masnom tkivu. U fiziološkom stanju dominantna je prisutnost T_{H2} i T_{reg} limfocita. T_{H2} stanice, lučenjem IL-4 i IL-13 podržavaju M2 subpopulaciju makrofaga. T_{H1} stanice pokazuju povećanje prije infiltracije makrofaga te se istodobno smanjuje koncentracija T_{reg} . Svojim lučenjem INF- γ potiču snažnu aktivaciju M1 makrofaga. T_{reg} su pokazale kako imaju ulogu u snižavanju razine kronične upale u masnom tkivu (Tateya i sur., 2013).

Primijećeno je i nakupljanje B stanica u miševa hranjenih visokokaloričnom hranom prije akumulacije stanica T i makrofaga. Bez nakupljenih B stanica, pretili miševi nisu pokazali razvoj metaboličkog sindroma iako se njihova masa povećala. B stanice, produkcijom IgG, potiču aktivaciju proupalnih T_{H1} te M1 makrofaga i dovode do razvoja upale (Sun i sur., 2011).

1.6. Inzulin

Inzulin je peptidni hormon koji luče β -stanice gušterača. Građen je od dva lanca aminokiselina međusobno povezanih disulfidnim vezama. Poluvrijeme života inzulina u plazmi je oko 6 minuta te se u roku 10-15 minuta od izlučivanja sav odstrani iz krvi. Razgrađuje se u jetri djelovanjem enzima inzulinaze. Inzulin djeluje na stanice vezanjem za inzulinske receptore u staničnoj membrani. Inzulinski se receptori nalaze na gotovo svim stanicama u organizmu te je moguće razlikovati više različitih vrsta receptora ovisno o stanicama, odnosno tkivu u kojem se nalaze. Ti su receptori građeni od više podjedinica te povezani s tirozin kinazom u stanici koja potiče unutarstaničnu kaskadu fosforilacije te tako pokreće u stanici događaje koji rezultiraju odgovarajućim metaboličkim odgovorom (Hall, 2011).

1.6.1. Djelovanje inzulina na metabolizam ugljikohidrata

Inzulin se izlučuje u velikim količinama nakon obroka koji obiluje ugljikohidratima. Njegovo lučenje pospešuje ulazak glukoze u mišićne stanice. Mišićna su vlakna nepropusna za glukozu tijekom većine dana, te za proizvodnju energije koriste uskladištene masne kiseline. Glukoza u mišiće može dospjeti u dva slučaja: pri teškom fizičkom naporu kada se mijenja propusnost vlakana pri njihovoj kontrakciji te glukoza može ući u vlakna, te nakon obroka bogatog ugljikohidratima kada stanice gušterače luče velike količine inzulina što

mijenja propusnost membrane mišićnih vlakana. Iako mišići nakon obroka nisu aktivni, pod utjecajem inzulina, dolazi do ulaska glukoze u njih te se ne koristi za nadoknađivanje energetske potrebe organizma, već za sintezu pričuvnog oblika ugljikohidrata – glikogena. Glikogeneza je također aktivirana inzulinom (Hall, 2011).

Slična je situacija zabilježena u jetri. Velike količine glukoze, pod utjecajem inzulina, ulaze u jetrene stanice te se pohranjuju u obliku glikogena. Taj se glikogen koristi kao izvor energije dok nema dostupne glukoze, a masne kiseline nisu uskladištene u stanici. Taj se proces događa kao posljedica inaktivacije jetrene fosforilaze, koja ima ulogu u razgradnji glikogena, te aktivacijom jetrene glukokinaze – enzima zaduženog za fosforilaciju glukoze u prisutnosti inzulina. Također, inzulinom je potaknuta aktivnost glukogen-sintaze, enzima odgovornog za sintezu glikogena. Nakon obroka, kada su niže koncentracije glukoze u krvi, prestaje lučenje inzulina te se proces odvija u drugom smjeru. Počinje potrošnja glikogena s ciljem dobivanja energije (Hall, 2011).

Kada razine glikogene u stanicama jetre i skeletnim mišićima dostignu svoj maksimum, inzulin potiče pretvorbu suviška glukoze u masne kiseline. Masne kiseline se u obliku triglicerida, lipoproteinima pohranjuju u masno tkivo. Također, inzulin inhibira glukoneogenezu smanjenjem aktivnosti jetrenih enzima koji sudjeluju u tom procesu ili smanjenjem mobilizacije aminokiselina i masnih kiselina iz stanica te u jetri nema prekursora za proces glukoneogeneze (Hall, 2011).

Zanimljivo je istaknuti kako stanice mozga nemaju receptore za inzulin te on ne djeluje na unos i iskorištavanje glukoze u samom tkivu. Razlog je tome što je većina stanica središnjeg živčanog sustava sama po sebi propusna za glukozu. Možda se stanice po svom metabolizmu razlikuju od ostalih stanica jer energiju mogu dobivati samo iz glukoze (te iz ketonskih tijela pri dugotrajnom gladovanju). Stoga je potrebno koncentraciju glukoze uvijek održavati iznad kritične razine (Hall, 2011).

1.6.2. Djelovanje inzulina na metabolizam masti

Učinci inzulina na metabolizam masti nisu toliko značajni kao njegov akutni utjecaj na ugljikohidrate no regulacija metabolizma masti inzulinom je od izuzetne važnosti. Zapravo na metabolizam masti djeluje nedostatak inzulina budući da povišena koncentracija inzulina u krvi uzrokuje skladištenje masti te smanjuje razinu njihova metabolizma (Hall, 2011).

Akutno inzulin snižava metabolizam što je pogotovo izraženo pri većem unosu ugljikohidrata. Osim toga, inzulin pospješuje sintezu masnih kiselina iz suvišnih ugljikohidrata unesenih prehranom. Taj je proces gotovo u potpunosti ograničen na jetru iz

koje se potom masne kiseline lipoproteinima prenose do masnih stanica gdje se pohranjuju; popunjenjem zaliha glikogena inhibira se njegova daljnja sinteza. Glukoza se oksidira do piruvata te potom do acetil koenzima A (acetil-CoA). Inzulin aktivira enzim acetil-CoA-karboksilazu te nastaje malonil-CoA – prvi intermedijer u sintezi masnih kiselina. Do sinteze masnih kiselina u jetri može doći i zbog pretjerane upotrebe glukoze za dobivanje energije. Nakupljanjem citrata i izocitrata dolazi do aktivacije acetil-CoA-karboksilaze te ponovno nastaje malonil-CoA. U jetri zatim dolazi do sinteze triglicerida koji se prenose lipoproteinima do adipocita. Inzulin aktivira lipoprotein lipazu na stijenkama kapilara WAT-a te iz triglicerida nastaju masne kiseline koje potom ulaze u adipocite gdje ponovno tvore trigliceride (Hall, 2011).

Inzulin u masnim stanicama inhibira aktivnost lipaze osjetljive na hormone te tako ne dopušta mobilizaciju masti pri povišenoj koncentraciji glukoze u krvi i pridonosi njihovom pohranjivanju. Jednako tako, inzulin pospješuje ulazak glukoze u adipocite gdje se ona metabolizira do α -glicerolfosfata, molekule potrebne za sklapanje triglicerida. Ukoliko nema inzulina, mast se ne pohranjuje u masnim stanicama, pa čak ni lipoproteinima prenesene masne kiseline iz jetre ne mogu ući u masne stanice (Hall, 2011).

Inzulin, odnosno manjak inzulina, ima izuzetno bitan učinak na oslobađanje masnih kiselina. U nedostatku inzulina dolazi do aktivacije lipaze osjetljive na hormone te dolazi do hidrolize triglicerida u adipocitima na glicerol i masne kiseline. Te masne kiseline postaju glavni izvor energije za organizam u nedostatku ugljikohidrata. Višak se masnih kiselina, u nedostatku inzulina u jetri pretvara u fosfolipide i kolesterol te se oni zajedno s trigliceridima otpuštaju u krv vezani na lipoproteine. Visoka koncentracija kolesterola u krvi može uzrokovati nastanak ateroskleroze (Hall, 2011).

Kada se masne kiseline koriste kao glavni izvor energije može doći do stanja ketoze i acidoze u organizmu. Oba su stanja uzrokovana nastankom ketokiselina kao posljedice oksidacije masnih kiselina. U jetri se, karnitinskim mehanizmom, masne kiseline prenose u mitohondrije gdje započinje proces beta-oksidacije masnih kiselina pri čemu nastaju velike količine acetil-CoA-a. Kondenzacijom acetil-CoA nastaje acetocetna kiselina koja se otpušta u krv. Acetocetna kiselina se zatim prenosi do perifernih stanica gdje dolazi do regeneracije acetil-CoA-a koji se može iskoristiti za oslobađanje energije. U nedostatku inzulina, smanjuje se mogućnost organizma da koristi acetocetnu kiselinu kao izvor energije te dolazi do povišenja njezine koncentracije u krvi što dovodi do teške acidoze. Acetocetna kiselina se može hidrolizirati na β -hidroksimaslačnu kiselinu i aceton te se sva tri spoja zajedno nazivaju

ketonskim tijelima. Kada se povisi njihova koncentracija u krvi govorimo o stanju ketoze (Hall, 2011).

1.6.3. Djelovanje inzulina na metabolizam proteina

Povišene količine inzulina u krvi pogoduju skladištenju proteina u stanicama. To se postiže poticanjem prijenosa aminokiselina iz krvi u stanice. Među aminokiselinama se u najvećoj mjeri pohranjuju valin, leucin, izoleucin, tirozin i fenilalanin. Iako i hormon rasta ima sličan utjecaj na aminokiseline kao i inzulin, njihovo se djelovanje razlikuje po unosu pojedinih aminokiselina. Inzulin u stanicama također potiče transkripciju RNA te tako dolazi do sinteze proteina na ribosomima. Kada nema inzulina, nema ni translacije proteina. Inzulin također djeluje i kao transkripcijski čimbenik te potiče transkripciju gena koji kodiraju enzime potrebne za skladištenje ugljikohidrata, masti i bjelančevina. U prisutnosti inzulina ne dolazi do katabolizma proteina te nema oslobađanja aminokiselina djelovanjem preko staničnih lizosoma. Također, inzulin u jetri inhibira glukoneogenezu tako da ne dolazi do nastanka energije oksidacijom masnih kiselina. Sve opisano pogoduje skladištenju bjelančevina te sprječava njihovu razgradnju (Hall, 2011).

1.6.4. Mehanizmi lučenja inzulina

Dugo se vremena smatralo da se inzulin luči jedino na povišenu koncentraciju glukoze u krvi no danas se zna da lučenje inzulina mogu potaknuti i drugi čimbenici. Ipak, koncentracija glukoze je jedan od glavnih mehanizama (Hall, 2011).

Signal β -stanicama gušterače na povišenu koncentraciju glukoze dolazi kao posljedica ulaska glukoze u stanice gušterače putem GLUT 2 nosača glukoze. Glukoza se po ulasku u β -stanice, djelovanjem enzima heksokinaze, fosforilira u molekulu glukoza-6-fosfata. Povišena koncentracija glukoza-6-fosfata u stanicama gušterače, koju stanice gušterače ne mogu lako metabolizirati, je jedan od glavnih signala povišene koncentracije glukoze te one počinju ispuštati inzulin u krv. Metabolizmom glukoza-6-fosfata nastaje velika količina ATP-a te dolazi do inhibicije kalijevih kanala što dovodi do depolarizacije stanične membrane i otvaranja kalcijevih kanala induciranih naponom. Kalcij potom ulazi u stanicu te omogućuje nastanak mjehurića s inzulinom koji se potom ispušta u stijenke krvnih žila. Zapravo nastanak ATP-a u stanici može nastati i oksidacijom masnih kiselina i proteina te tako, istim putem dolazi do lučenja inzulina u krv. Također i neki hormoni kao što su glukagon, inzulinotropni peptid ovisan o glukozi (želučani inhibicijski peptid) te acetilkolin mogu potaknuti lučenje inzulina direktnim djelovanjem na kalcijeve kanale povećavajući unutarstaničnu razinu

kalcija. Drugi pak hormoni kao što su somatostatin i noradrenalin (vezanjem za α – noradrenergične receptore) suprimiraju lučenje inzulina. Lučenje inzulina potiču i brojni drugi gastrički hormoni te aktivacija autonomnog živčanog sustava (Hall, 2011).

1.6.5. Inzulinska rezistencija

Inzulinska rezistencija je poremećaj koji uzrokuje dijabetes tipa II, a povezan je s drugim patofiziološkim procesima kao što su hipertenzija, hiperlipidemija, ateroskleroza (metabolički sindrom) te policistični jajnici (Kahn i sur., 2000). Kao posljedica inzulinske rezistencije javlja se hiperglikemija kao posljedica nakupljanja glukoze u krvi zbog nemogućnosti ulaska u stanicu. Jetra također sudjeluje u povišavanju koncentracije glukoze u krvi svojom glukoneogenetskom aktivnošću; nedostatkom glukoze proizvodi velike količine glukoze iz masnih kiselina i proteina. Pomicanjem metabolizma s ugljikohidrata na masti dolazi do dislipidemije što vodi poremećaju homeostaze metabolizma ugljikohidrata, masti i proteina. U posljednjih desetak godina istražuje se mehanizam nastanka inzulinske rezistencije zbog pandemijske prisutnosti pretilosti u populaciji te sve većeg broj oboljelih od dijabetesa tipa II. Brojni upalni i hormonski čimbenici te adipokini kao i nakupljanje produkata metabolizma u jetri i skeletnim mišićima utječu na razvoj inzulinske rezistencije (Muoio i Newgard, 2008).

1.6.5.1. Mehanizmi inzulinske rezistencije

Danas se zna da inzulinska rezistencija nije isključivo posljedica prenakupljanja glukoze, štetnih metabolita masti i proteina u tkivima nego i drugih brojnih čimbenika uključujući hormone, adipokine i upalne čimbenike (Muoio i Newgard, 2008).

Adipokini su molekule koje luči masno tkivo; pored leptina otkriven je velik broj molekula koje utječe na metaboličke funkcije. Primijećeno je da neki citokini također pokazuju djelovanje slično adipokinima. Među najpoznatijim adipokinima su leptin, adiponektin, rezistin te brojni drugi proteinski čimbenici kao RBP-4 (engl. *retinol-binding peptide-4*), IL-6 te TNF- α . Leptin i adiponektin se često nazivaju „antidijabetogenim“ (engl. *anti-diabetogenic*) jer smanjuju sintezu triglicerida, stimuliraju β -oksidaciju masnih kiselina te pojačavaju utjecaj inzulina u jetri i skeletnim mišićima. Njihovo se djelovanje može objasniti njihovom mogućnošću aktivacije AMP-aktivirajuće proteinske kinaze (AMPK – engl. *AMP-activated protein kinase*) koja potiče metabolizam glukoze i masnih kiselina pri sniženim koncentracijama ATP-a odnosno povišenim koncentracijama AMP-a. Kod inzulinske rezistencije, razina leptina je povišena dok se razina adiponektina smanjuje što

govori kako dolazi do nesenzitivnosti stanica na leptin. U lipodistrofičnih miševa, koji nemaju dostatno WAT-a te pohranjuju masti u mišićima i jetri, vidljiva je visoka stopa inzulinske rezistencije. Ukoliko se u takve organizme transplantira „zdravo“ masno tkivo dolazi do ponovnog uspostavljanja senzitivnosti na inzulin te se pokazalo kako važnu ulogu u tome ima upravo leptin. Također dodatak leptina lipodistrofičnim miševima ublažava inzulinsku rezistenciju. Pokazano je također i da transplantacija masnog tkiva iz leptin-deficijentnih miševa ne pridonosi povratnoj senzitivnosti stanica na inzulin. Taj je učinak primijećen i kod ljudi te se leptin često koristi u terapiji lipodistrofičnih osoba pri čemu dolazi do parcijalnog povratka inzulinske senzitivnosti te se smanjuje stopa hiperlipidemije (Muoio i Newgard, 2008).

Upalni medijatori su također povezani s inzulinskom rezistencijom. Već je davno otkriveno kako acetilsalicilna kiselina (aspirin) smanjuje inzulinsku rezistenciju u oboljelih od dijabetesa tipa II djelujući zaštitno na β -stanice gušterače i na inhibiciju nastanka prostaglandina. Pokazalo se kako i visokokalorična prehrana potiče aktivaciju transkripcijskog čimbenika NF- κ B što dovodi do upalnog odgovora. Aktivnost acetyl salicilne kiseline također može suprimirati aktivnost NF- κ B. Hiperekspresija NF- κ B aktivirajuće kinaze I κ B, odnosno njezine β katalitičke podjedinice (IKK- β) dovodi do inzulinske rezistencije u tkivu jetre. Pokazalo se da i visokokalorična hrana i aktivacija IKK- β dovodi do pretjeranog lučenja citokina u jetri kao što su IL-6, IL-1 β i TNF- α pri čemu neutralizacija IL-6 antitijelima potpomaže ponovnom uspostavljanju osjetljivosti stanica na inzulin. Pokazalo se također na mišjim modelima da utišavanjem IKK- β dolazi do sprječavanja nastanka inzulinske rezistencije u jetri, no da ne utječe na inzulinsku rezistenciju u masnom tkivu te skeletnim mišićima. Pokazalo se i kako visokokalorijska prehrana potiče adipocite na lučenje MCP1 koji potiče aktivaciju monocita iz krvi te razvoj upale te se smatra da je to glavni mehanizam komunikacije s okolnim tkivima. Iz ovog je vidljivo da povišena koncentracija glukoze u krvi i skladištenje masti nisu jedni mehanizmi indukcije inzulinske rezistencije (Muoio i Newgard, 2008).

1.7. Oksidativni stres

Oksidativni stres je stanje organizma nastalo kao posljedica neravnoteže nastanka slobodnih radikala u organizmu te smanjene antioksidativne sposobnosti organizma. To stanje je povezano s brojnim bolestima i patološkim stanjima kao što su: tumori, neurološki poremećaji, ateroskleroza, hipertenzija, ishemija/reperfuzija, dijabetes, akutni plućni distress

sindrom, idiopatska plućna fibroza, kronične opstruktivne bolesti pluća te astma (Birben i sur., 2012).

1.7.1. Slobodni radikali

Slobodni radikali su atomi i molekule koje posjeduju nesparene elektrone što ih čini izrazito reaktivnim vrstama. Iz tog razloga, slobodni radikali reagiraju s drugim molekulama te kao produkt nastaju neradikali i manje reaktivni radikali. Reakcijom dvaju slobodnih radikala najčešće nastaju neradikali. Stabilnost samih atoma/molekula ovisi o energiji koju pohranjuju. Najčešće se susrećemo s dvije skupine slobodnih radikala, a to su reaktivne kisikove vrste - ROS (engl. *reactive oxygen species*) i reaktivne dušikove vrste – RNS (engl. *reactive nitrogen species*) koji imaju brojne fiziološke uloge u organizmu, no kada njihove koncentracije prijeđu fiziološke granice pokazuju štetne učinke na organizam (Birben i sur., 2012; Gasparovic i sur., 2016). Povišena koncentracija slobodnih radikala uzrokuje oštećenja staničnih proteina, membranskih lipida te nukleinskih kiselina i može dovesti do stanične smrti (Maritim i sur., 2003).

1.7.1.1. Reaktivne kisikove vrste – ROS

ROS u organizmu nastaju iz elementarnog kisika (O_2) u reakcijama metabolizma. Možemo ih podijeliti u dvije skupine: radikale i neradikale. Glavnina ROS-a otpada na 3 značajna radikala, a to su superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilni radikal ($\cdot OH$) i vodikov peroksid (H_2O_2).

Superoksidni anion nastaje dodatkom jednog elektrona na elementarni kisik. Radikali mogu nastati enzimskim djelovanjem enzima nikotin adenin dinukleotid fosfat (NAD(P)H) oksidaze ili ksantin oksidaze (XO). Neenzimski nastaje u mitohondriju pri sustavu prijenosa elektrona na unutarnjoj membrani mitohondrija u procesu redukcije kisika za nastanak vode. Najveći postotak radikala nastaje u mitohondrijima jer dio elektrona izlazi iz sustava te tako nastaju superoksidni radikali. NAD(P)H oksidaza je enzim prisutan u polimorfonuklearnim leukocitima, monocitima i makrofagima gdje tijekom fagocitoze vode pojačanoj potrošnji kisika i glukoze stvaranjem metaboličkog, oksidativnog ili respiracijskog praska ključnog za baktericidno djelovanje ovih stanica. Superoksidni anioni mogu biti pretvoreni u vodikov peroksid djelovanjem enzima superoksid-dismutaze (SOD) (Birben i sur., 2012).

Vodikov peroksid, osim dismutacijom $O_2^{\cdot-}$, SOD-om može nastati i djelovanjem XO, oksidaze aminokiselina, i NAD(P)H oksidaze te u peroksisomima iz kisika. U nizu reakcija koje se nazivaju Haber-Weissove reakcije i Fentonove reakcije iz superoksida može nastati

OH⁻. Za Haber-Weissovu i Fentonovu reakciju potrebni su ioni željeza (Fe³⁺) ili bakra (Cu²⁺) (Birben i sur., 2012).

Hidroksilni ioni mogu nastati razgradnjom H₂O₂ u prisutnosti dvovalentnih metalnih iona bakra i željeza kako je vidljivo iz prethodne reakcije. Jednako tako OH⁻ oni mogu nastati reakcijom superoksidnih aniona i vodikova peroksida (Birben i sur., 2012).

Reaktivnost se vodikova peroksida može uvelike povećati djelovanjem granulocitnih enzima mijeloperoksidaze (MPO) te eozinofilne peroksidaze. U aktiviranim neutrofilima u prisutnosti kloridnih iona stvaraju hipokloritnu kiselinu koja djeluje na patogene. Hipokloritna kiselina je izuzetno reaktivna te može reagirati s DNA (Birben i sur., 2012). Među kisikove vrste spadaju peroksilni radikali (ROO[·]) od kojih je najjednostavniji hidroperoksi radikal (HOO[·]) koji nastaje u reakciji superoksida s vodom. Hidroperoksi radikal ima ulogu u peroksidaciji masnih kiselina. Peroksidacija masnih kiselina započinje uklanjanjem vodika s metilenske kupine pri čemu lipid reagira s kisikom i tvori peroksi radikal. Peroksil radikal zatim potiče lančanu reakciju oksidacije pri čemu masne kiseline postaju hidroperoksidi. Te su molekule nestabilne te se ubrzo raspadaju na aldehide (4-hidroksi-2,3-nonenal) te malondialdehid (MDA) koji su stabilne molekule te ih se koristi kao biljege lipidne peroksidacije u organizmu. Još jedni produkti lipidne peroksidacije su izoprostani, nastali lipidnom peroksidacijom arahidonske kiseline. Lipidna peroksidacije dovodi do promjena u membrani te remeti njezinu cjelovitost (Birben i sur., 2012).

1.7.1.2. Reaktivne dušikove vrste

Uz reaktivne dušikove vrste veže se dušikov oksid (NO). To je molekula od iznimne fiziološke važnosti za organizam. Najčešće u organizmu djeluje kao glasnik, ima protuupalnu ulogu kao antioksidans (Patel i sur., 1999). NO u reakciji sa superoksidnim radikalom daje molekulu nazvanu peroksinitrit (ONOO[·]), visoko reaktivnu dušikovu vrstu. Peroksinitriti lako stupaju u reakciju s proteinima te dolazi do nitriranja ili nitrizacije. Budući da je snažan oksidans može doći i do oksidacije i deaminacije DNA, sulfoksidacije metionina, te lipidne oksidacije i peroksidacije (Gasparovic i sur., 2016).

1.7.1.3. Egzogeni izvori slobodnih radikala

Slobodni radikali osim djelovanjem metabolizma mogu dospjeti i iz egzogenih izvora. To mogu biti prvenstveno neke loše navike kao što su pušenje budući da dim cigareta sadrži brojne oksidanse i slobodne radikale kao što su superoksid i dušična kiselina. Također udisanje samog dima dovodi do nakupljanja stanica imunološkog sustava koje tada također

stvaraju slobodne radikale. Egzogeni izvor oksidacijskog stresa može biti i izloženost ozonu koji u vrlo kratkom vremenu može inicirati lipidnu peroksidaciju. Budući da oksidativni stres nastaje u oksidativnom metabolizmu, sama hipoksija može dovesti do povišene razine oksidativnog stresa. Produkciji oksidativnog stresa u organizmu pridonose i razne vrste zračenja te unošenje teških metala (Haber-Weissova i Fentonova reakcija) (Birben i sur., 2012).

1.7.2. Antioksidansi

Antioksidanse (reducenci) nazivamo molekulama koje imaju sposobnost vezati na sebe elektrone te tako smanjiti negativne učinke slobodnih radikala. Razlikujemo dvije vrste antioksidansa u tkivu: enzimske i neenzimske (Birben i sur., 2012).

1.7.2.1. Enzimski antioksidansi

Enzimskim antioksidansima nazivamo enzime koji su prisutni u tkivima i stanicama i koji sudjeluju u uklanjanju slobodnih radikala iz stanica. To su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT – engl. *catalase*), glutation peroksidaza (GSH-Px). Osim tih glavnih enzima postoje i hem oksidaza-1, te redoks proteini poput tioredoksina, peroksiredoksina, glutaredoksini te brojnih drugi (Birben i sur., 2012).

SOD je enzim zadužen za dismutaciju superoksidnih aniona kao primarnog ROS-a te je SOD eksprimirana u svim stanicama, a pogotovo u metabolički aktivnim stanicama. Postoje 3 forme SOD-a, CuZnSOD ovisna o bakru i cinku, MnSOD ovisna o manganu te izvanstanična SOD – EC-SOD. CuZnSOD i Mn su smještene u stanici (MnSOD u mitohondrijima), dok je EC-SOD smještena u izvanstaničnom prostoru. Kao posljedica dismutacije superoksidnih aniona nastaje vodikov peroksid (Birben i sur., 2012).

Vodikov peroksid koji nastaje posredstvom SOD-a ili ksantin oksidaze (XO) se reducira pomoću katalaze ili glutation peroksidaze. Posredstvom katalaze, vodikov se peroksid reducira do vode (Birben i sur., 2012). Katalaza je enzim koji se nalazi poglavito u peroksisomima. Pokazalo se da je aktivnost katalaze povišena u jetri i bubrezima štakora oboljelih od dijabetesa (Maritim i sur., 2003).

Glutation peroksidaza i reduktaza su enzimi koji sudjeluju u eliminaciji vodikova peroksida te produkata lipidne peroksidacije. Učinak se postiže uzimanjem vodika s molekule glutaciona te koristeći NADPH kao donor elektrona. Glutation se oksidira te nastaje disulfid glutation koji potom enzim glutation reduktazu ponovno reducira do glutaciona. NADPH se regenerira u pentoza fosfatnom ciklusu (Maritim i sur., 2003). Opisane su četiri skupine

različitih glutation peroksidaza. Glutation peroksidaza 1 je zadužena za uklanjanje peroksida i produkata lipidne peroksidacije (Birben i sur., 2012). Kod štakora oboljelih od dijabetesa primijećena je povećana aktivnost glutation peroksidaze u jetri, bubrezima, gušterači, krvi te aorti dok je smanjena u retini i srcu (Maritim i sur., 2003).

1.7.2.2. Neenzimski antioksidansi

Postoje brojne skupine spojeva koje mogu djelovati kao antioksidansi, a to su najčešće molekule male molekularne mase poput vitamina, karotenoida, flavonoida, mokraćne kiseline, glutationa (GSH) te brojne druge molekule (Birben i sur., 2012).

Vitamini su poznati po svom antioksidativnom djelovanju te se često preporučuju za borbu protiv slobodnih radikala. Vitamin C (askorbinska kiselina) je topljiv u vodi te je prisutan u citoplazmi i izvanstaničnom matriksu. Sudjeluje u redukciji ROS-a te potpomaže regeneraciju radikala vitamina E. Vitamin E (α -tokoferol) je topljiv u lipidima te je uronjen u staničnu membranu te se smatra jednim od najaktivnijih antioksidanasa stanične membrane. On služi kao donor elektrona peroksidnim radikalima koji nastaju za vrijeme lipidne peroksidacije te tako održava cjelovitost stanične membrane. Također pokazuje antitumorsko djelovanje potičući apoptozu u stanicama tumora (Birben i sur., 2012).

Glutation je jedan od glavnih, u vodi topljivih, antioksidanasa prisutnih u svim staničnim odjeljcima. Pokazuje antioksidativne učinke na više načina. Pomaže uklanjanju vodikova peroksida te produkata lipidne peroksidacije preko glutation peroksidaze. GSH donira elektron vodikovu peroksidu te ga reducira do vode i kisika. Oksidirani se oblik glutationa (GSSH – disulfid glutation) potom enzimom GSH reduktaze regenerira do glutationa pri čemu kao elektron donor služi molekula NADPH-a nastala u pentoza-fosfatnom ciklusu. Na sličan način glutation donira elektrone produktima lipidne peroksidacije te se on sam oksidira. Omjer GSH/GSSH je jedan od glavnih pokazatelja oksidativnog stresa u organizmu (Birben i sur., 2012).

Karotenoidi su skupina biljnih pigmenata te je među poznatijim karotenoidima β -karoten. Pokazalo se da β -karoten reagira s peroksidnim radikalima te hidroksilnim i superoksidnim anionima. Pokazuju svoju antioksidativnu sposobnost i pri niskim parcijalnim tlakovima kisika u tkivu, no s druge strane pokazuju prooksidativna svojstva pri povišenim parcijalnim tlakovima kisika. β -karoten, kao i njihov spremišni oblik retinoična kiselina, inhibiraju aktivaciju NF- κ B potaknutu oksidansima te lučenje IL6 i TNF- α . Pokazalo se da retinoična kiselina ima i antiproliferativno djelovanje na tumore (Birben i sur., 2012).

1.7.3. Oksidacijski stres i pretilost

ROS se pojavljuje kao posljedica brojnih bolesti i stanja te direktno ili indirektno utječe na brojne organe. Smatra se da pretilost može prouzročiti sustavni oksidativni stres te da je povezana s nepravilnim lučenjem adipokina. Navedene značajke pogoduju razvoju metaboličkog sindroma. Dokazano je također kako su kod osoba oboljelih od pretilosti povišeni svi parametri oksidativnog stresa te da koreliraju s povećanjem BMI-a, kao i postotkom masti u tijelu, oksidacijom masnih kiselina te koncentracijom triglicerida. Jednako tako razina antioksidanasa se smanjuje (Kahn i sur., 2000).

1.7.4. Oksidacijski stres i inzulinska rezistencija

ROS je u organizmu prisutan u fiziološkim uvjetima te mogu imati ulogu kao drugi glasnici. Njegova se razina znatno povećava pri drugim patološkim stanjima što može dovesti do patoloških promjena u organizmu. Smatra se da ROS potiče inzulinsku rezistenciju tako što remeti signalni put sinteze inzulinskih receptora. Reaktivni radikali mogu potaknuti aktivnost serin/treonin kinaza osjetljive na stres te signalnih putova kao što su JAK, NF- κ B, p38, MAPK te druge putove koji potiču daljnju fosforilaciju inzulinskih receptora fosforilacijom IRS proteina. IRS nije u mogućnosti dalje prenijeti signale u stanicu te dolazi do njegove degradacije (Fernández-Sánchez i sur., 2011).

1.8. Cilj istraživanja

Temeljni cilj rada jest procijeniti učinak visokokalorične hrane na tjelesnu težinu, inzulinsku rezistenciju, hematološke i biokemijske pokazatelje te pokazatelje oksidacijskog stresa u jetri i bubregu.

2. Materijali

2.1. Pokusne životinje

U istraživanju su korišteni mužjaci i ženke visokosrodnih štakora soja LEWIS iz uzgoja Zavoda za animalnu fiziologiju. Istraživanje je provedeno na 24 jedinke štakora soja LEWIS podijeljenih u 4 skupine s obzirom na spol i način prehrane (STH ili VKH). Životinjama je uvijek bila dostupna hrana te voda – *ad libitum*. Životinje su držane pri standardnim uvjetima s dnevnim ritmom od 12 sati (12 sati dana i 12 sati mraka) pri konstantnoj temperaturi od 24°C te kontroliranom vlažnošću zraka.

Istraživanje je provedeno prema etičkim načelima važećima u Republici Hrvatskoj (Zakon o zaštiti životinja, NN 102/2017) i prema Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHHS (NIH) Publ # 86-23).

2.1. Hrana za životinje

Životinje su hranjene dvjema različitim vrstama hrane za glodavce: standardnom hranom i visokokaloričnom hranom. Kontrolna se skupina hranila standardnom hranom (STH), odnosno kompletnom repeletiranom hranom za miševе i štakore 4RF21 (engl. *Complete food for MICE and RATS 4RF21 Repelleted*). Druga se skupina hranila visokokaloričnom hranom (VKH) odnosno kompletnom hranom za glodavce – 45% energije iz masti (engl. *Complete feed for RODENTS PURIFIED Diet 45% ENERGY FROM FATS*). Sastav standardne i visokokalorijske hrane prikazan je u **Tablici 1**.

Tablica 1. Prikaz sastava standardne hrane (STH) i visokokalorične hrane (VKH)

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

2.3. Laboratorijska oprema

Centrifuga: Centrifuga 5702 (proizvođač: Eppendorf, Njemačka)

UV-Vis spektrofotometar: UV-160 (proizvođač: Shimadzu, Japan) i Libra S22 (proizvođač: Biochrom, UK)

Mikrotitarski čitač: Microplate reader Model 550 Bio-Rad i iEMS Reader MF (proizvođač: Labsystems, Finska)

Vaga: ABS 220 – 4 (proizvođač: Kern & Sohn, Njemačka)

Vortex: Vortex Genius 3 (proizvođač: IKA, SAD)

Homogenizator: Sonopuls mini (proizvođač: Bandelin, Njemačka)

Glukometar: Accuchek Advantage II (proizvođač: Roche, Njemačka)

3. Metode

3.1. Praćenje promjene tjelesne težine

Prije početka samog pokusa životinje su izvagane te razvrstane u skupine prema približno istoj tjelesnoj težini. Životinje su hranjene standardnom ili visokokaloričnom hranom u periodu od mjesec dana te se njihova težina mjerila u razmacima od 7 - 10 dana, vaganjem digitalnom vagom.

3.2. Obrada životinja

Životinje su podijeljene u 4 skupine – mužjake i ženke koji su hranjeni standardnom ili visokokaloričnom hranom. Prva se skupina sastojala od ženki koje su hranjene sa STH. Drugu skupinu su činile ženke štakora koje su hranjene s VKH. Treća skupina se sastojala od mužjaka koji su hranjeni sa STH dok se četvrta skupina sastojala od mužjaka štakora koji su hranjeni s VKH. Sve su jedinice imale hranu *ad libitum*.

Nakon 30 dana obrade, životinje su anestetizirane i analgenizirane *ip* injiciranjem kombinacije Narketana® (Vetoquinol S.A. BP 189 Lure Cedex, Francuska) i Xylapana® (Vetoquinol Biowet Sp., Gorzow, R. Poljska), te žrtvovane u svrhu prikupljanja tkiva i organa za daljnju analizu.

3.3. Izolacija i priprema tkiva

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

3.4. Analiza hematoloških parametara krvi

Uzorci krvi za biokemijsku i hematološku analizu uzeti su iz aksilarnog spleta krvnih žila svih jedinki zasebno. Uzorci krvi za hematološku analizu stavljeni su u heparinizirane staklene vacutainere s dodatkom EDTA (Becton Dickinson, Plymouth, UK) te pohranjeni na temperaturi od 4°C do analize. Od hematoloških parametara analiziran je broj leukocita, diferencijalna krvna slika, postotak hemoglobina (Hgb), hematokrit (H), prosječan volumen eritrocita (MCV), prosječna količina hemoglobina u eritrocitima (MCH), prosječna

koncentracija hemoglobina u eritrocitima (MCHC) te raspodjela eritrocita prema veličini (RDW).

Hematološki parametri određivani su na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu preporučenim analitičkim metodama na elektronskom brojaču Horiba ABX169 (Micros, Francuska).

3.5. Analiza biokemijskih parametara

Uzorci krvi za analizu biokemijskih parametara prikupljeni su u vacutainere bez antikoagulansa. Za određivanje biokemijskih parametara korišten je serum. Analiza je određena pomoću VetScan® kompleta (engl. *Comprehensive Diagnostic Profile reagent rotor*) na uređaju VetScan® VS2 (Abaxis, UK). Analizirana je koncentracija albumina (ALB – g/L), alkalne fosfataze (ALP - U/L), alanin aminotransferaze (ALT – U/L), amilaze (AMY – U/L), ukupnog bilirubina (TBIL - $\mu\text{mol/L}$), dušika uree u krvi (BUN – mmol/L), kalcija (CA – mmol/L), fosfati (PHOS – mmol/L), kreatinina (CRE – $\mu\text{mol/L}$), glukoze (GLU – mmol/L), natrija (Na^+ - mmol/L), kalija (K^+ - mmol/L), ukupnih proteina (TP – g/L) te globulina (GLOB – g/L).

3.6. Osmotska fragilnost eritrocita

Stanične membrane koje okružuju svaku stanicu selektivno su propusne s ciljem stvaranja osmotskog gradijenta između stanične i izvanstanične tekućine. Razlika u koncentraciji nedifuzibilnih iona je upravo ta koja određuje jačinu osmotskog tlaka. Osmoza je proces pri kojem voda prelazi s mjesta više koncentracije na mjesto niže s ciljem izjednačavanja koncentracija. Otopine u kojima se stanica nađe možemo podijeliti na hipoosmotske, izoosmotske te hiperosmotske. Hipoosmotske su otopine koje imaju manju koncentraciju nedifuzibilnih iona nego u samoj stanici te stoga voda ulazi u stanicu u većoj mjeri nego što iz nje izlazi sve dok se ne izjednači osmotski tlak s obje strane membrane. S druge strane, kod hiperosmotskih otopina, koncentracija nedifuzibilnih iona je veća nego u stanici te stoga voda osmozom izlazi iz stanice u većoj mjeri nego što ulazi sve dok se ne izjednači osmotski tlak s obje strane membrane. Izoosmotskom otopinom nazivamo otopinu kod koje su koncentracije nedifuzibilnih iona u stanici i u okolnoj otopini jednake te će doći do uspostavljanja osmotske ravnoteže i neto promet vode će biti 0.

Osmotska se fragilnost analizira tako što se 100 μL uzorka krvi dodaje u epruvete s 900 μL otopine NaCl-a rastućih koncentracija (0,9%; 0,8%; 0,7%; 0,6%; 0,5%; 0,4%; 0,3%; 0,2%; 0,1% i 0,0%). Epruvete se pokrivaju parafilmom te se uzorak pomiješa okretanjem

eprovete nekoliko puta. Uzorci se ostave stajati kroz 30 minuta. Nakon 30 minuta okom je vidljivo je li došlo do hemolize budući da se hemoglobin iz hemoliziranih eritrocita otopi u otopini te daje karakteristično crveno obojenje te se već na temelju toga može zaključiti je li došlo do potpune ili djelomične hemolize (ovisno o intenzitetu obojenja) te je li hemoliza izostala. Uzorci se tada centrifugiraju 10 minuta pri 2200 okretaja/min. Nakon centrifugiranja, spektrofotometrijski se mjeri apsorbanija hemoglobina u supernatantu pri 540 nm. Kao negativna kontrola uzima se otopina koncentracije 0,9% jer se radi o izoosmotskoj otopini pri kojoj ne dolazi do hemolize te je apsorbanija 0.

3.7. Test oralne podnošljivosti glukoze

Test oralne podnošljivosti glukoze (engl. *oral glucose tolerance test* – OGTT) je test koji pokazuje sposobnost preuzimanja glukoze u organizmu te služi za otkrivanje poremećaja metabolizma šećera. Koncentracija glukoze u krvi se mjerila glukometrom s odgovarajućim test - trakicama.

Za provođenje OGTT-a štakori su preko noći držani bez hrane. Natašte je izvršeno mjerenje glikemijskom analizom krvi iz repne vene štakora u intervalima od 0, 30, 60 i 120 minuta nakon intragastričkog unosa glukoze u dozi od 3 g/kg (30% otopine) po jedinci. Koristeći lancete, formirana je kapljica krvi bez prejakog istiskivanja krvi te je na kapljicu krvi uronjena test – trakica i izmjerena je koncentracija glukoze u krvi.

3.8. Određivanje parametara oksidacijskog stresa

3.8.1. Određivanje proteina po Lowry-u

Proteini, u prethodno pripremljenim homogenatima tkiva jetre i bubrega, određeni su metodom po Lowrey i sur., (1951). Metoda se zasniva na biuretskoj reakciji – redukciji bivalentnog bakrova iona u reakciji s peptidnom vezom u bazičnim uvjetima pri čemu nastaje monovalentni bakrov ion. Dolazi i do oksidacije aromatskih bočnih ogranaka (triptofana, tirozina i cisteina) koji reagiraju s Folinovim reagensom te nastaje nestabilan produkt koji se polako reducira stvarajući plavo obojenje reakcijske smjese.

U 100 μ L uzoraka tkiva jetre i bubrega razrijeđenih 10 puta dodano je 2 mL otopine D (**Tablica 2**). Reakcijska smjesa inkubirana je na sobnoj temperaturi kroz 10 minuta te je dodano 200 μ L otopine E. Nakon dodatka otopine E reakcijska je smjesa vorteksirana te stavljena na inkubaciju u zatamnjenu komoru na 30 minuta. Zatim je mjerena apsorbanija uzoraka pri valnoj duljini od 600 nm. Kao standard uzimaju se poznate serijske koncentracije

(2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,015625 mg/mL) goveđeg serumskog albumina (engl. *Bovine Serum Albumine* – BSA) na temelju kojih se izradi baždarni pravac. Vrijednosti proteina dobivene su korištenjem standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji BSA iz koje je prvo izračunat nagib pravca. Na temelju baždarnog pravca kasnije su izračunate koncentracije proteina u samim uzorcima (u mg/mL uzorka) korištenjem sljedeće formule: $c = \left(\frac{A_{uzorka} - b_{st.krivulje}}{nagib\ pravca\ st.krivulje} \right) \times razrjeđenje$.

Tablica 2. Priprema otopina korištenih u određivanju proteina metodom po Lowryu

Otopina	Priprema otopina (za 100 uzoraka)
Otopina A: 2% (w/v) Na ₂ CO ₃ u 0,1M NaOH	9,6 g Na ₂ CO ₃ + 480 mL 0,1M NaOH
Otopina B: 1% (w/v) natrij-kalij tartarat u dH ₂ O	0,1 g Kalijev - natrijev tartarat + 10 mL dH ₂ O
Otopina C: 0,5% (w/v) CuSO ₄ × 5H ₂ O u dH ₂ O	0,05 g CuSO ₄ × 5H ₂ O + 10 mL dH ₂ O
Otopina D	Otopine A, B i C u omjeru A:B:C = 48:1:1
Otopina E: Folin-Ciocalteu reagens	pomiješati Folin & Ciocalteu's phenol reagens i dH ₂ O u omjeru 2:1 (npr. 14 mL Folin & Ciocalteu's phenol reagens + 7 mL dH ₂ O)

3.8.2. Mjerenje enzimske aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze u tkivima određena je metodom po Aebi-ju (1984). U toj se metodi aktivnost katalaze određuje preko količine potrošenog vodikovog peroksida.

Za mjerenje su korišteni uzorci tkiva bubrega razrijeđeni 40x te uzorci jetre razrijeđeni 100x. U kivetu je dodano 20 μL uzorka te 980 μL 10 mM H₂O₂ prethodno pripremljenog od 113 μL 30% H₂O₂ te 99,887 mL PBS-a. Aktivnost katalaze mjerena je spektrofotometrijski, praćenjem smanjenja količine vodikova peroksida tijekom jedne minute pri valnoj duljini od 240 nm. Kao standard koristio se 10 mM H₂O₂. Aktivnost katalaze izračunata je prema formuli $CAT = 500 \times \frac{U}{mg\ proteina/mL\ uzorka}$, gdje je $U (mM) = \frac{A \times 1000}{\epsilon}$, ekstinkcijski koeficijent iznosi $\epsilon = 39,4$ po m/Mcm. Koncentracija katalaze izražena je u U/mg proteina što je proporcionalno μmol razgrađenog H₂O₂ u 60 sekundi po mg proteina.

3.8.3. Mjerenje razine lipidne peroksidacije

Malondialdehid (MDA) jedan je od stabilnih produkata u kaskadi reakcija slobodnih radikala s nezasićenim masnim kiselinama u procesu lipidne peroksidacije te je njegova koncentracija u tkivu proporcionalna s razinom lipidne peroksidacije. Metoda mjerenja razine

lipidne peroksidacije u tkivu zasniva se na reakciji MDA s 2-tiobarbituratnom kiselinom (TBA) stvarajući kompleks MDA – (TBA)₂ koji daje crveno obojenje te je njegova koncentracija spektrofotometrijski mjerljiva pri valnoj duljini od 532 nm. Reakcija se odvija pri pH nižem od 7 (kiseli uvjeti) te pri povišenoj temperaturi.

Za mjerenje razine lipidne peroksidacije korišteni su homogenati tkiva. U 100 µL uzorka dodano je 1,6 mL otopine A (**Tablica 3**) te su Eppendorf epruvete stavljene u vodenu kupelj na inkubaciju pri temperaturi od 95°C na 60 minuta. Nakon inkubacije epruvete s uzorcima stavljene su na led 10 minuta kako bi se uzorci ohladili. Uzorci su zatim 15 minuta centrifugirani na 5000 okretaja kako bi se nastale folikule odvojile od supernatanta. Potom se supernatant stavlja u spektrofotometar te se mjeri apsorbancija pri 532 nm. Koncentracija MDA u uzorku računa se pomoću formule $c = \frac{A_{uzorka} \times V_{reakcijske\ smjese(mL)}}{\epsilon \times V_{uzorka(mL)} \times c_{proteina\ u\ uzorku(\frac{mg}{mL})}}$ pri čemu je A dobivena apsorbancija, a ε ekstinkcijski koeficijent MDA te iznosi ε=0,156 mL/mol. Koncentracija MDA u uzorku izražena je u nmol MDA po mg proteina.

Tablica 3. Priprema otopine A

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

3.8.4. Mjerenje razine ukupnog glutaciona

Ukupna količina glutaciona mjerena je pomoću modificirane Tietzeove metode (1969). Metoda se temelji na reakciji slobodnog glutaciona (GSH) u tkivu s tiolnim reagensom 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoične kiseline (DTNB – Ellmanov reagens) čiji produkt je kromofor 5 – tionitrobenzoična kiselina (TNB) čija se koncentracija može spektrofotometrijski mjeriti pri valnoj duljini od 412 nm. Reakcijom GSH i DTNB-a stvara se kompleks GS-TNB. Dodanim enzimom GSH reduktaze i NADPH-a dolazi do regeneracije slobodnog GSH te se u

reakcijsku smjesu otpušta TNB. Brzina nastanka TNB-a je proporcionalna koncentraciji GSH u uzorku tkiva.

Za mjerenje GSH u tkivu korištene su mikrotitarske pločice. Koncentracija GSH mjerena je u uzorcima tkiva jetre i bubrega (razrjeđenje 10x). U svaku jažicu dodano je 40 μ L 35 mM HCl, 40 μ L 10 mM DTNB te 20 μ L uzorka. Kao standard, na temelju kojeg je napravljen baždarni pravac, korištene su sljedeće koncentracije reduciranog glutationa (GSH): 60; 30; 15; 7,5; 6; 3,25; 3; 1,875; 1,5; 0 μ g/mL. Mikrotitarske pločice su stavljene u spektrofotometar te je mjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 412 nm. Nakon toga je dodan enzim GSH reduktaza te je apsorbancija mjerena tijekom 5 minuta. Na temelju rezultata, za sve standarde su nacrtani pravci te je na temelju koeficijenata nagiba pravaca napravljen baždarni graf kao ovisnost nagiba o koncentraciji GSH u uzorku. Iz tog su grafa određene koncentracije glutationa u tkivu prema formuli:

$$c = \frac{\text{nagib pravca} - \text{nagib slijepe probe}}{\text{nagib pravca standarda}} \times \text{razrjeđenje}$$

Koncentracija GSH izražena je u μ M GSH po mL proteina u uzorku.

3.9. Statistička obrada podataka

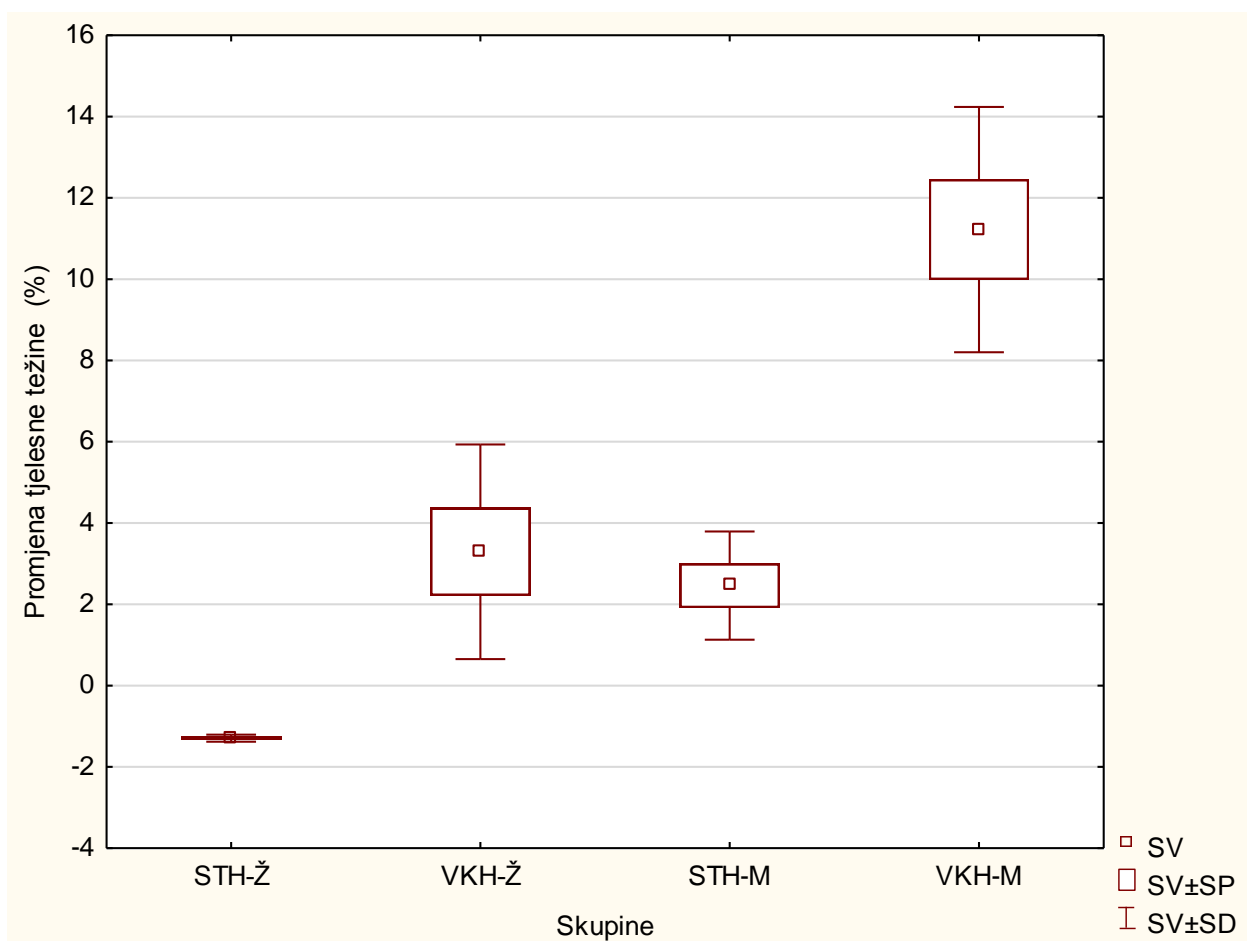
Podaci su statistički obrađeni pomoću programa STATISTICA 13 (StatSoft, Tulsa, OK, USA), a statistička točnost je određena s $P < 0,05$. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SV \pm SD). Podaci su analizirani Kruskal-Wallisovim ANOVA-a testom. Razlike među pojedinim skupinama napravljene su višestrukom usporedbom srednjih vrijednosti svih skupina. Rezultati su prikazani grafički pomoću box-plot prikaza te tablično. Za pripremu podataka korišten je računalni program Microsoft Excel 2016.

4.Rezultati

Kako bi se istražio učinak visokokalorične prehrane na promjenu tjelesne težine, hematološke i biokemijske parametre, osmotsku otpornost eritrocita, inzulinsku rezistenciju te na parametre oksidativnog stresa, po šest je mužjaka i ženki štakora hranjeno standardnom hranom te po šest visokokaloričnom hranom kroz 30 dana. Nakon obrade porvedene su analize te su rezultati istih prikazani u ovom poglavlju.

4.1. Promjena težine životinja

Rezultati mjerenja promjene težine životinja tijekom obrade prikazani su na **Slici 4**. Životinje su izvagane prije početka obrade te nakon obrade koja je trajala 30 dana. Na temelju razlike težine, promjena težine je izražena u %, te su rezultati prikazani grafički. Usporedbom rezultata nije primijećeno statistički značajna promjena težine niti kod mužjaka niti kod ženki hranjenih visokokaloričnom hranom u odnosu na jednike hranjene standardnom hranom.



Slika 4. Promjena težine štakora hranjenih standardnom (STH) i visokokaloričnom hranom.

Ženke (Ž) i mužjaci (M) štakora (N=6) su hranjeni standardnom hranom (STH) i visokokaloričnom hranom bogatom mastima (VKH) u periodu od 30 dana. Dobiveni su rezultati prikazani kao $SV \pm SD$ (SP).

Kratice: **STH** – standardna hrana; **VKH** – visokokalorična hrana; **Ž** – ženke; **M** – mužjaci; **SV** – srednja vrijednost; **SV±SP** – srednja vrijednost + standardna pogreška; **SV±SD** – srednja vrijednost + standardna devijacija.

4.2. Analiza hematoloških pokazatelja krvi

Nakon 30 dana obrade štakora standardnom i visokokaloričnom hranom jedinkama je analizirana krv. Ispitani su parametri: hemoglobin (Hgb), hematokrit (H), prosječni volumen eritrocita (MCV), prosječna količina hemoglobina u eritrocitima (MCH), prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima (MCHC), raspodjela eritrocita prema veličini (RDW), ukupni leukociti te diferencijalna krvna slika.

4.2.1. Hematološka analiza

Rezultati hematološke analize prikazani su u **Tablici 4**. Promjena u svim hematološkim parametrima zapažena je jedino u skupini mužjaka hranjenih visokokaloričnom hranom gdje je razina hemoglobina značajno smanjena u odnosu na skupinu mužjaka hranjenih standardnom hranom. U rezultatima analize ukupnog broja eritrocita ne postoji statistički značajna razlika između skupina hranjenih različitom hranom, stoga rezultati nisu prikazani.

Tablica 4. Analiza hematoloških pokazatelja u krvi štakora hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom

Skupine ^a	Hematološki pokazatelji (SV ± SD)					
	Hgb (g/L)	H (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/L)	RDW (%)
STH-Ž	153 ± 3,90	41 ± 1,55	54,83 ± 0,98	20 ± 0,89	374 ± 3,90	14 ± 0,89
VKH-Ž	144,33 ± 12,72	39,67 ± 2,88	52,5 ± 1,05	19 ± 0,89	366,5 ± 5,82	12,83 ± 0,75
STH-M	171,33 ± 4,93	47 ± 1,79	50,67 ± 0,81	18 ± 0,89	366 ± 8,53	13,83 ± 0,98
VKH-M	157,33 ± 4,59*	44,67 ± 0,52	50,33 ± 1,37	18 ± 0,89	352,67 ± 6,28	14,33 ± 0,81

^a Ženke (Ž) i mužjaci (M) štakora (N=6) su hranjeni standardnom (STH) i visokokaloričnom hranom bogatom mastima (VKH) u periodu od 30 dana. Dobiveni su rezultati prikazani kao SV ± SD (SP).

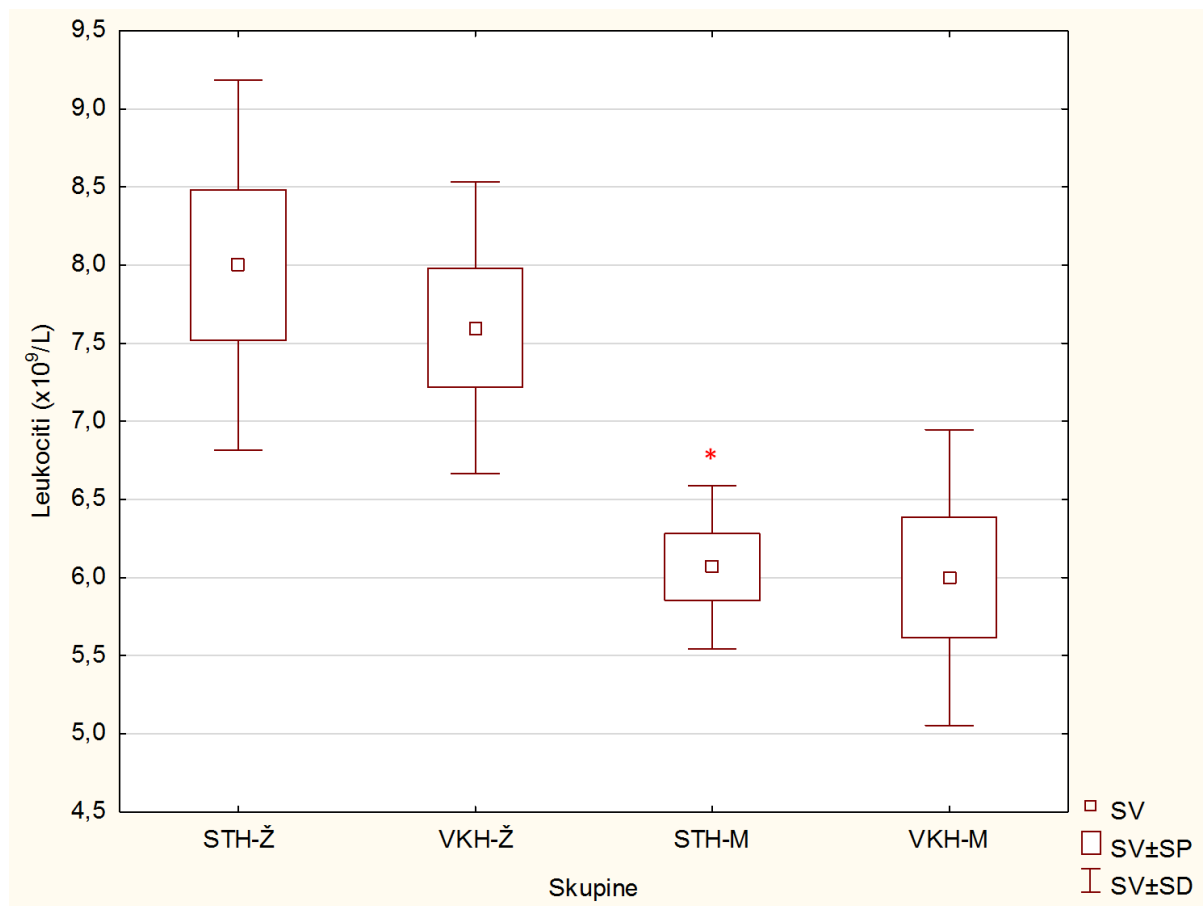
* Statistički značajna razlika u odnosu na STH-M (* $P < 0,05$).

Kratice: **STH** – standardna hrana; **VKH** – visokokalorična hrana; **Ž** – ženke; **M** – mužjaci; **Hgb** – hemoglobin; **H** – hematokrit; **MCV** – prosječni volumen eritrocita; **MCH** – prosječna količina hemoglobina u eritrocitima; **MCHC** – prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima; **RDW** – raspodjela eritrocita po veličini; **SV ± SP** – srednja vrijednost ± standardna pogreška.

4.2.2. Analiza leukocita i diferencijalne krvne slike

4.2.2.1. Analiza ukupnog broja leukocita

Iz dobivenih rezultata (**Slika 5**) vidljivo je da nema statistički značajne razlike u ukupnom broju leukocita usporedbom ženki i mužjaka štakora hranjenih standardnom hranom s jedinkama hranjenih visokokaloričnom hranom



Slika 5. Ukupan broj leukocita kod štakora hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom

Ženke (Ž) i mužjaci (M) štakora (N=6) su hranjeni standardnom (STH) i visokokaloričnom hranom bogatom mastima (VKH) u periodu od 30 dana. Dobiveni su rezultati prikazani kao $SV \pm SD$ (SP).

* Statistički značajna razlika u odnosu na STH-Ž (* $P < 0,05$).

Kratice: **STH** – standardna hrana; **VKH** – visokokalorična hrana; **Ž** – ženke; **M** – mužjaci, **SV±SP** – srednja vrijednost + standardna pogreška; **SV±SD** – srednja vrijednost + standardna devijacija.

4.2.2.2. Analiza diferencijalne krvne slike

Rezultati diferencijalne krvne slike prikazani su u **Tablici 5**, gdje je vidljivo da postoji statistički značajnih razlika između ženki hranjenih visokokaloričnom hranom i mužjaka hranjenih visokokaloričnom hranom ($P < 0,01$).

Tablica 5. Analiza diferencijalne krvne slike štakora hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom

Skupine ^a	Diferencijalna krvna slika štakora hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom (SV ± SD)		
	Limfociti (%)	Neutrofilni (%)	Monociti (%)
STH-Ž	67,33 ± 2,25	31,33 ± 2,25	1
VKH-Ž	77 ± 2,37	22,33 ± 2,58	1
STH-M	72,33 ± 5,37	27 ± 2,19	2
VKH-M	67,67 ± 8,59	32,33 ± 3,51 ^{##}	-

^a Ženke (Ž) i mužjaci (M) štakora (N=6) su hranjeni standardnom (STH) i visokokaloričnom hranom bogatom mastima (VKH) u periodu od 30 dana. Dobiveni su rezultati prikazani kao SV ± SD (SP).

[#] Statistički značajna razlika u odnosu na VKH-Ž (^{##} $P < 0,01$).

Kratice: **STH** – standardna hrana; **VKH** – visokokalorična hrana; **Ž** – ženke; **M** – mužjaci; **SV ± SP** – srednja vrijednost ± standardna pogreška.

4.3. Analiza biokemijskih pokazatelja krvi

Biokemijska analiza seruma iz krvi štakora pokazala je značajne razlike u koncentraciji enzima i proteina između različito hranjenih skupina životinja (**Tablica 6**). U **Tablici 6** vidljivo je povećanje koncentracije alkalne fosfataze kod skupine ženki hranjenih visokokaloričnom hranom u odnosu na ženke hranjene standardnom hranom ($P < 0,001$). Također, postoji statistički značajna razlika između aktivnosti amilaze ($P < 0,05$) i razine albumina ($P < 0,05$) između mužjaka hranjenih visokokaloričnom hranom i ženki hranjenih visokokaloričnom hranom.

Tablica 6. Vrijednosti analize enzima i proteina u serumu štakora hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom

Skupine ^a	Biokemijski parametri – enzimi i proteini u krvi (SV ± SD)					
	Alkalna fosfataza (g/L)	Alanin aminotransferaza (U/L)	Amilaza (U/L)	Albumini (g/L)	Globulini (g/L)	Ukupni proteini (g/L)
STH-Ž	103,67 ± 7,81	25,67 ± 1,12	607 ± 34,04	46,67 ± 2,43	18,67 ± 1,17	65,33 ± 3,14
VKH-Ž	250,67 ± 26,97 ^{***}	23 ± 0,37	485 ± 5,74	46,67 ± 0,76	14,33 ± 1,52	61,33 ± 3,61
STH-M	137,33 ± 6,54	24,33 ± 1,12	757 ± 31,41	45,33 ± 0,55	23 ± 1,3	67,67 ± 1,87
VKH-M	184,67 ± 27,78	20,67 ± 1,12	673,67 ± 42,65 [#]	42,33 ± 0,21 [#]	18,33 ± 0,92	60,33 ± 0,92

^a Ženke (Ž) i mužjaci (M) štakora (N=6) su hranjeni standardnom (STH) i visokokaloričnom hranom bogatom mastima (VKH) u periodu od 30 dana. Dobiveni su rezultati prikazani kao SV ± SD (SP).

* Statistički značajna razlika u odnosu na STH-Ž (^{***} $P < 0,001$).

Statistički značajna razlika u odnosu na VKH-Ž ([#] $P < 0,05$).

Kratice: **STH** – standardna hrana; **VKH** – visokokalorična hrana; **Ž** – ženke; **M** – mužjaci; **SV ± SP** – srednja vrijednost ± standardna pogreška.

Vrijednosti metabolita i supstrata prikazane su u **Tablici 7**. Statistički je značajna razlika primijećena u koncentraciji kalcija u krvi između mužjaka hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom ($P<0,01$). Vidljiva je i statistički značajna razlika u koncentraciji natrija između mužjaka i ženki hranjenih visokokaloričnom hranom ($P<0,05$). Statistički je značajna razlika u koncentraciji kalija između ženki i mužjaka hranjenih standardnom hranom ($P<0,01$) te ženki i mužjaka hranjenih visokokaloričnom hranom ($P<0,05$). Postoji i značajna razlika u koncentraciji dušika uree u krvi između mužjaka hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom ($P<0,05$).

Tablica 7. Vrijednosti analize metabolita i supstrata u serumu štakora hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom

Skupine ^a	Biokemijski parametri – ioni i metaboliti (SV ± SD)						
	Kalcij (mmol/L)	Fosfati (mmol/L)	Natrij (mmol/L)	Kalij (mmol/L)	TBIL (μmol/L)	BUN (mmol/L)	Kreatinin (μmol/L)
STH-Ž	2,5 ± 0,02	1,94 ± 0,06	133 ± 0	4,37 ± 0,11	5 ± 0	4,2 ± 0,33	47,67 ± 4,20
VKH-Ž	2,41 ± 0,01	2,04 ± 0,11	130,33 ± 0,21	4,5 ± 0,07	4,67 ± 0,21	4,13 ± 0,34	41 ± 0,63
STH-M	2,63 ± 0,11	2,58 ± 0,30	135,67 ± 1,73	5,83 ± 0,50 ^{**}	5 ± 0	5,2 ± 0,17	42 ± 6,08
VKH-M	2,36 ± 0,01 ^{**}	2,17 ± 0,06	133,67 ± 0,55 [#]	5,37 ± 0,14 [#]	5,33 ± 0,21	3,63 ± 0,22 [•]	28,33 ± 5,61

^aŽenke (Ž) i mužjaci (M) štakora (N=6) su hranjeni standardnom (STH) i visokokaloričnom hranom bogatom mastima (VKH) u periodu od 30 dana. Dobiveni su rezultati prikazani kao SV± SD (SP).

* Statistički značajna razlika u odnosu na STH-Ž (^{**} $P<0,01$)

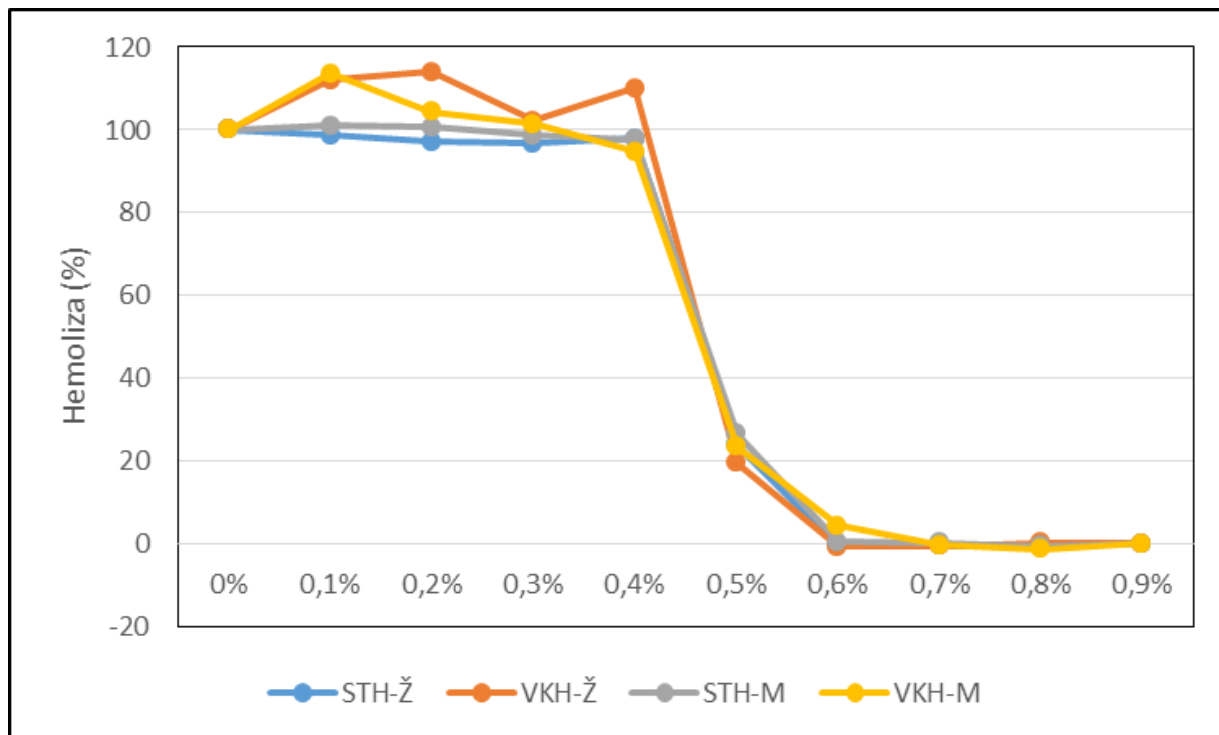
Statistički značajna razlika u odnosu na VKH-Ž ([#] $P<0,05$)

• Statistički značajna razlika u odnosu na STH-M ([•] $P<0,05$; ^{**} $P<0,01$)

Kratice: **STH** – standardna hrana; **VKH** – visokokalorična hrana; **Ž** – ženke; **M** – mužjaci; **SV±SP** – srednja vrijednost ± standardna pogreška; **TBIL** – ukupni bilirubin; **BUN** – dušik uree u krvi.

4.4. Osmotska fragilnost eritrocita

Analizom rezultata hemolize eritrocita (Slika 6) vidljivo je kako se kod svih skupina 100 %-tna hemoliza eritrocita dogodila pri koncentraciji 0,3 % NaCl-a. U svim skupinama, 50%-tna hemoliza dogodila se pri koncentraciji 0,4% NaCl-a.



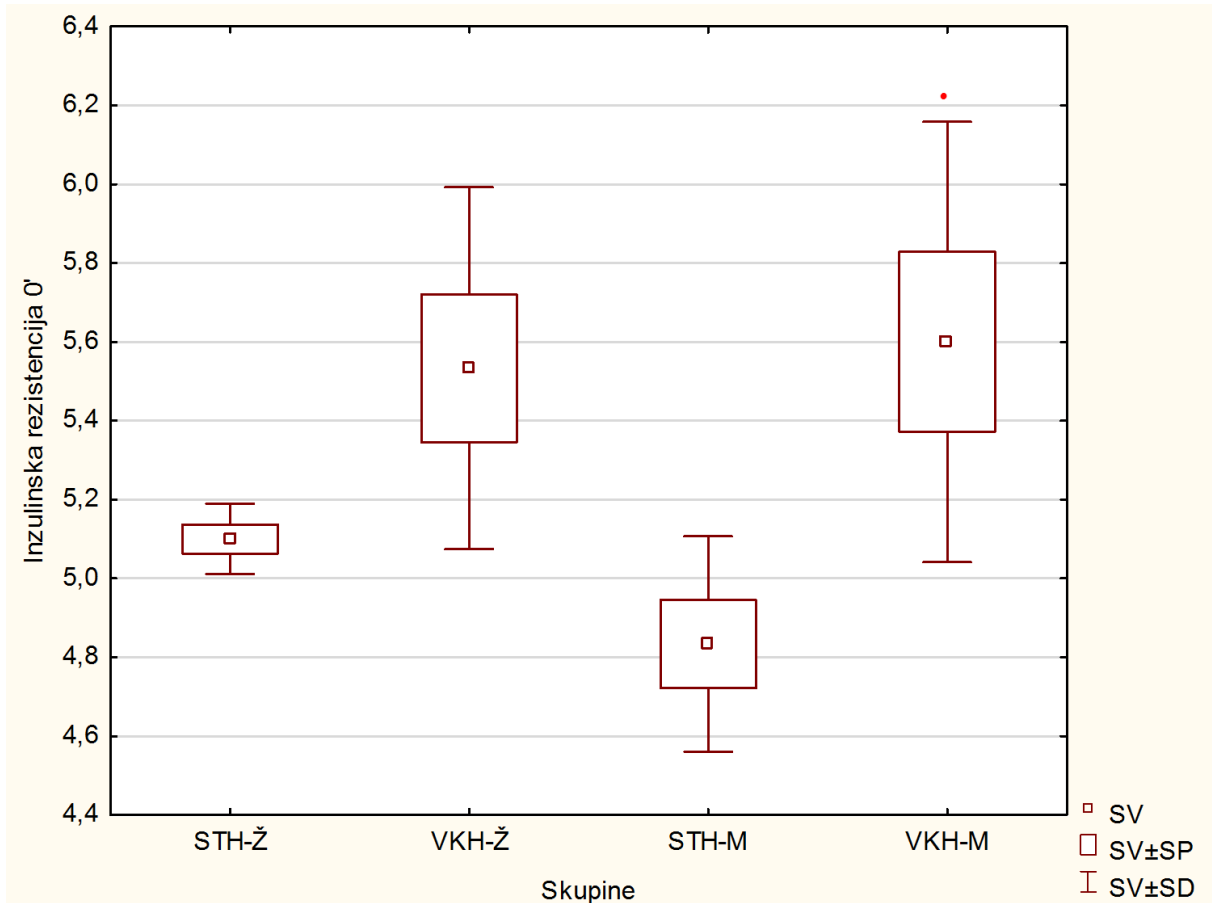
Slika 6. Analiza postotka hemolize eritrocita štakora hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom

Ženke (Ž) i mužjaci (M) štakora (N=6) su hranjeni standardnom (STH) i visokokaloričnom hranom bogatom mastima (VKH) u periodu od 30 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

Kratice: **STH** – standardna hrana; **VKH** – visokokalorična hrana; **Ž** – ženke; **M** – mužjaci, **SV** – srednja vrijednost; **SV \pm SP** – srednja vrijednost + standardna pogreška; **SV \pm SD** – srednja vrijednost + standardna devijacija.

4.5. Test oralne podnošljivosti glukoze

Rezultati mjerenja oralne podnošljivosti glukoze prije intragastričkog unosa glukoze prikazuje **Slika 7**. Iz dobivenih rezultata vidljiva je povišena vrijednost glukoze u skupini mužjaka hranjenih visokokaloričnom hranom ($P < 0,05$) u odnosu na skupinu mužjaka hranjenih standardnom hranom.



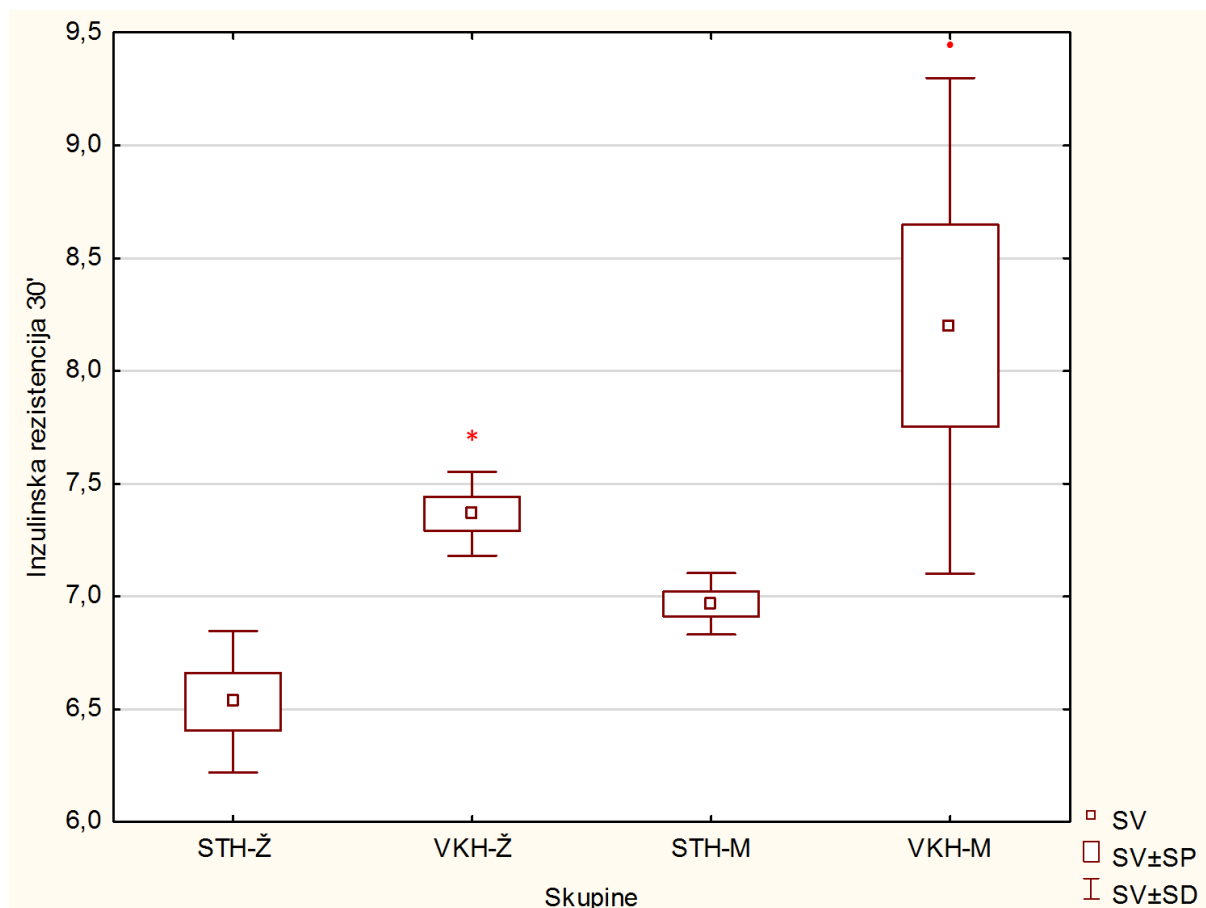
Slika 7. Razina glukoze prije intragastričkog unosa glukoze u štakora hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom

Ženke (Ž) i mužjaci (M) (N=6) su hranjeni standardnom hranom (STH) i visokokaloričnom hranom bogatom mastima (VKH) u periodu od 30 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

* Statistički značajno u odnosu na STH – M ($P < 0,05$).

Kratice: **STH** – standardna hrana; **VKH** – visokokalorična hrana; **Ž** – ženke; **M** – mužjaci; **SV** – srednja vrijednost; **SV±SP** – srednja vrijednost + standardna pogreška; **SV±SD** – srednja vrijednost + standardna devijacija.

Rezultate nakon 30 minutnog intragastričnog unosa glukoze prikazuje **Slika 8** iz koje je vidljiva povišena vrijednost glukoze u skupini ženki ($P<0,05$) hranjenih visokokaloričnom hranom u odnosu na skupinu ženki hranjenih standardnom hranom. Razlika u vrijednosti glukoze postoji i između skupine mužjaka hranjenih visokokaloričnom hranom i skupine mužjaka hranjenih standardnom hranom ($P<0,05$).



Slika 8. Razina glukoze nakon 30 minutnog intragastričnog unosa glukoze u štakora hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom

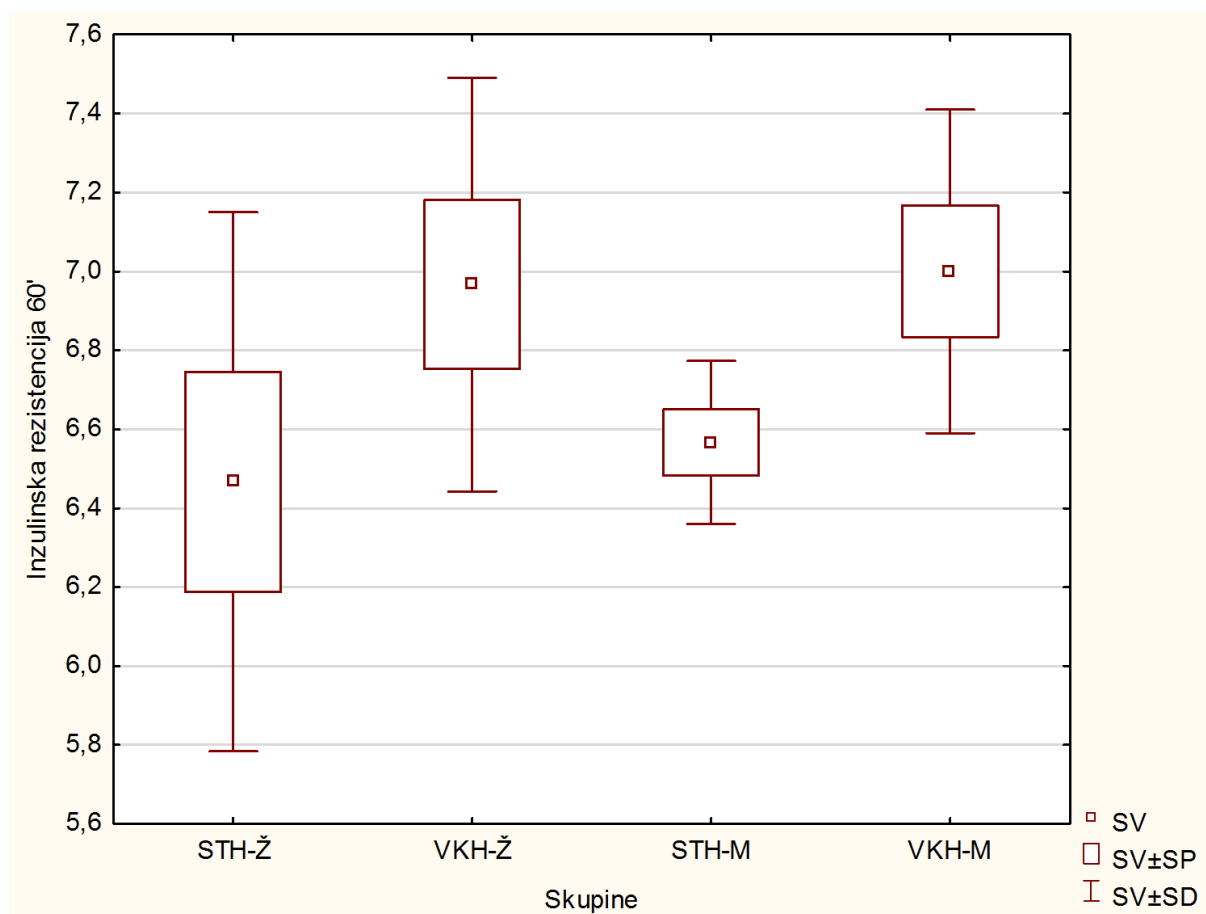
Ženke (Ž) i mužjaci (M) (N=6) su hranjeni standardnom hranom (STH) i visokokaloričnom hranom bogatom mastima (VKH) u periodu od 30 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

* Statistički značajno u odnosu na STH-Ž ($P<0,05$).

* Statistički značajno u odnosu na STH – M ($P<0,05$).

Kratice: **STH** – standardna hrana; **VKH** – visokokalorična hrana; **Ž** – ženke; **M** – mužjaci; **SV** – srednja vrijednost; **SV±SP** – srednja vrijednost + standardna pogreška; **SV±SD** – srednja vrijednost + standardna devijacija.

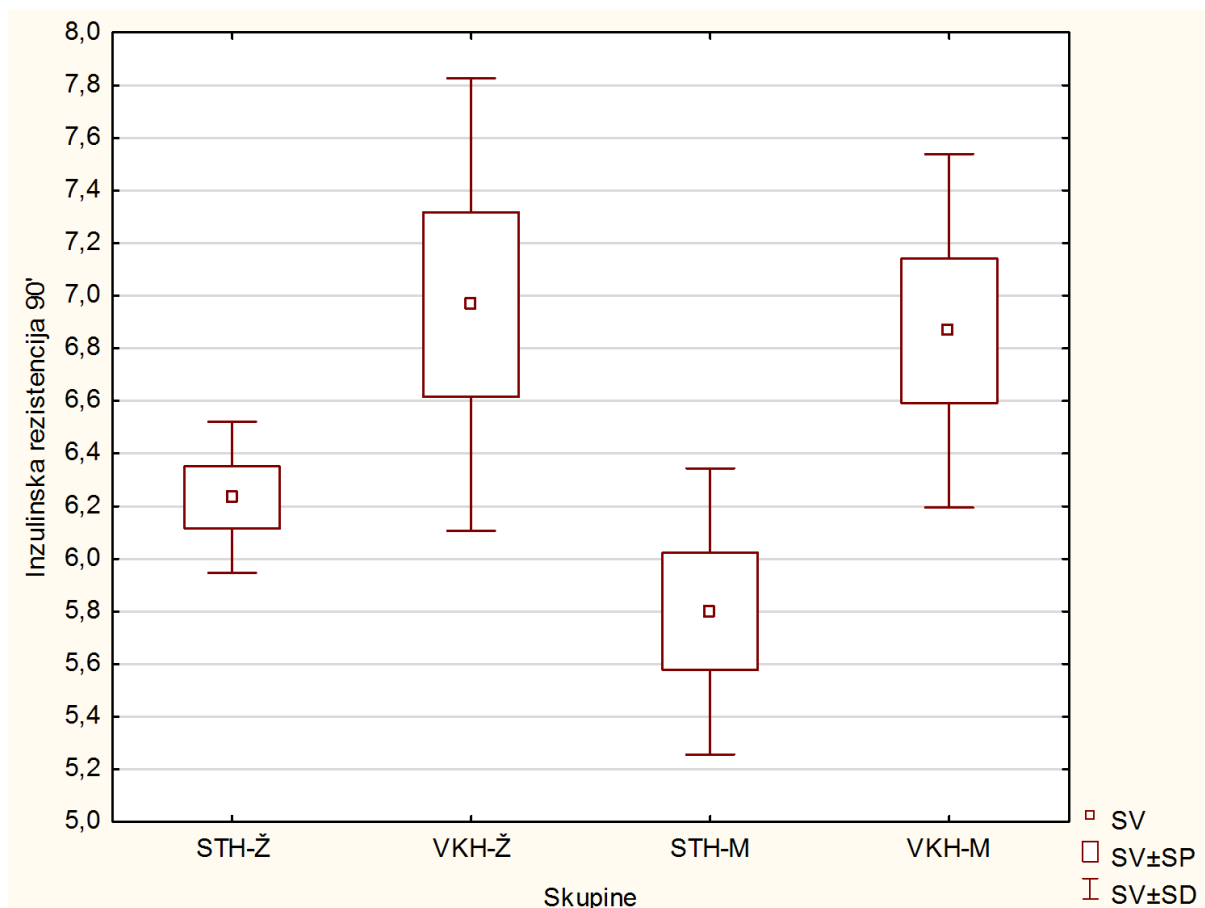
Rezultati mjerenja oralne podnošljivosti glukoze nakon 60 minutnog intragastričnog unosa glukoze prikazuje **Slika 9**. Nakon 60 minutnog intragastričnog unosa glukoze nije uočena statistički značajna razlika između ispitivanih skupina.



Slika 9. Razina glukoze nakon 60 minutnog intragastričnog unosa glukoze u štakora hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom. Ženke (Ž) i mušjaci (M) (N=6) su hranjeni standardnom hranom (STH) i visokokaloričnom hranom bogatom mastima (VKH) u periodu od 30 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

Kratice: **STH** – standardna hrana; **VKH** – visokokalorična hrana; **Ž** – ženke; **M** – mušjaci; **SV** – srednja vrijednost; **SV±SP** – srednja vrijednost + standardna pogreška; **SV±SD** – srednja vrijednost + standardna devijacija.

Rezultate nakon 90 minutnog intragastričnog unosa glukoze prikazuje **Slika 10**. Iz rezultata je vidljivo je kako niti nakon 90 minuta po unosu glukoze nema statistički značajnih razlika usporedbom ispitivanih skupina.

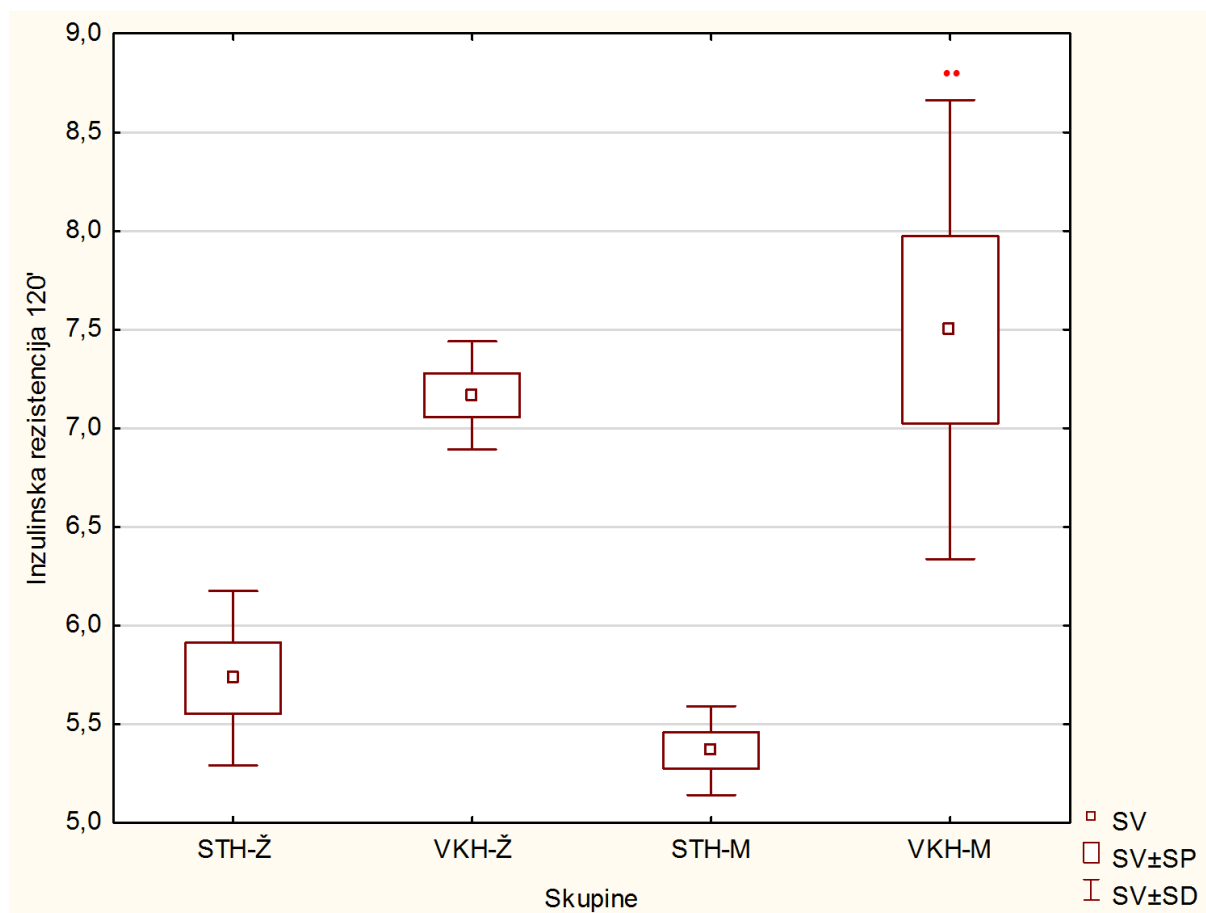


Slika 10. Razina glukoze nakon 90 minutnog intragastričnog unosa glukoze u štakora hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom

Ženke (Ž) i mužjaci (M) (N=6) su hranjeni standardnom hranom (STH) i visokokaloričnom hranom bogatom mastima (VKH) u periodu od 30 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

Kratice: **STH** – standardna hrana; **VKH** – visokokalorična hrana; **Ž** – ženke; **M** – mužjaci; **SV** – srednja vrijednost; **SV±SP** – srednja vrijednost + standardna pogreška; **SV±SD** – srednja vrijednost + standardna devijacija.

Slika 11 prikazuje rezultate mjerenja oralne podnošljivosti glukoze nakon 120 minutnog intragastričnog unosa glukoze. Iz slike je vidljivo da postoji statistički značajna razlika mužjaka ($P < 0,01$) hranjenih visokokaloričnom hranom u odnosu na skupinu mužjaka hranjenih standardnom hranom.



Slika 11. Razina glukoze nakon 120 minutnog intragastričnog unosa glukoze u štakora hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom

Ženke (Ž) i mužjaci (M) (N=6) su hranjeni standardnom hranom (STH) i visokokaloričnom hranom bogatom mastima (VKH) u periodu od 30 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

* Statistički značajno u odnosu na STH-M (** $P < 0,01$).

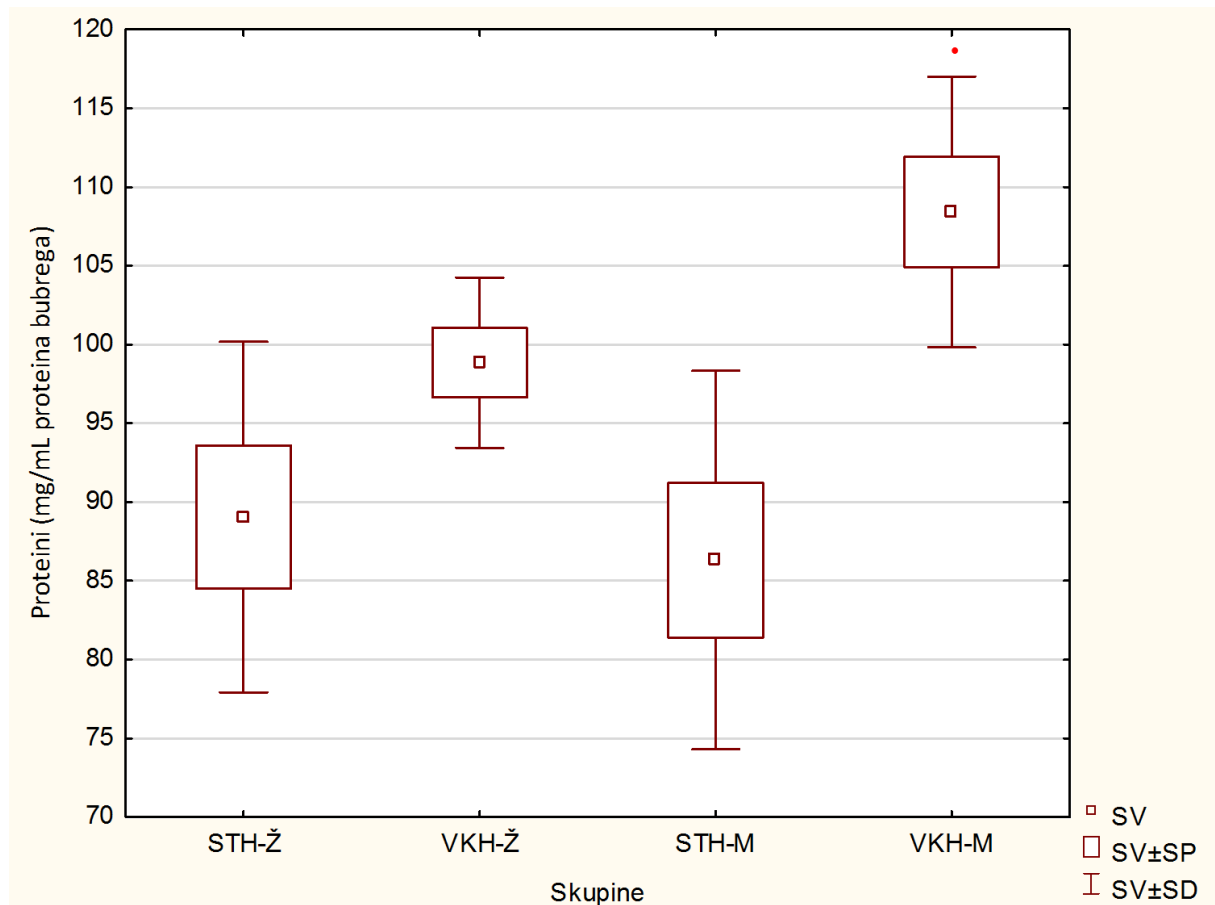
Kratice: **STH** – standardna hrana; **VKH** – visokokalorična hrana; **Ž** – ženke; **M** – mužjaci; **SV** – srednja vrijednost; **SV±SP** – srednja vrijednost + standardna pogreška; **SV±SD** – srednja vrijednost + standardna devijacija.

4.6. Parametri oksidacijskog stresa

Kod štakora hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom nakon 30 dana provedene su analize parametara oksidacijskog stresa u tkivima jetre i bubrega.

4.6.1. Ukupni proteini u uzorcima tkiva bubrega i jetre štakora

Rezultati mjerenja ukupnih proteina u tkivu bubrega štakora (**Slika 12**) pokazuju statistički značajno veću količinu proteina u skupini mužjaka hranjenih visokokaloričnom hranom ($P < 0,05$) u odnosu na skupinu mužjaka hranjenih standardnom hranom.



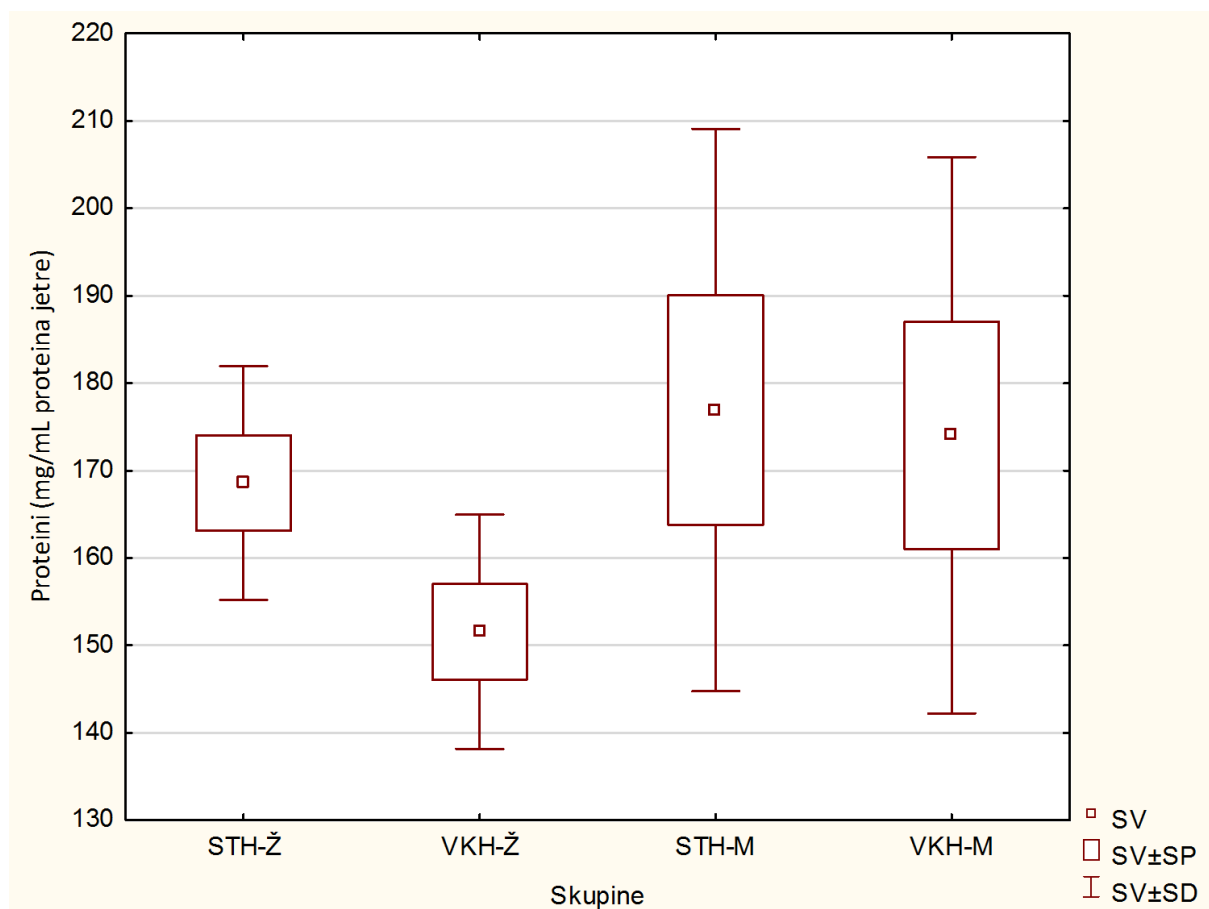
Slika 12. Koncentracija ukupnih proteina u uzorcima tkiva bubrega štakora hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom

Ženke i mužjaci štakora (N=6) su hranjeni standardnom hranom i visokokaloričnom hranom bogatom mastima u periodu od 30 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

* Statistički značajno u odnosu na STH-M ($P < 0,05$).

Kratice: **STH** – standardna hrana; **VKH** – visokokalorična hrana; **Ž** – ženke; **M** – mužjaci, **SV** – srednja vrijednost; **SV±SP** – srednja vrijednost + standardna pogreška; **SV±SD** – srednja vrijednost + standardna devijacija.

Rezultati mjerenja ukupnih proteina u tkivu jetre štakora (**Slika 13**) ne pokazuju statistički značajnu razliku između skupina.



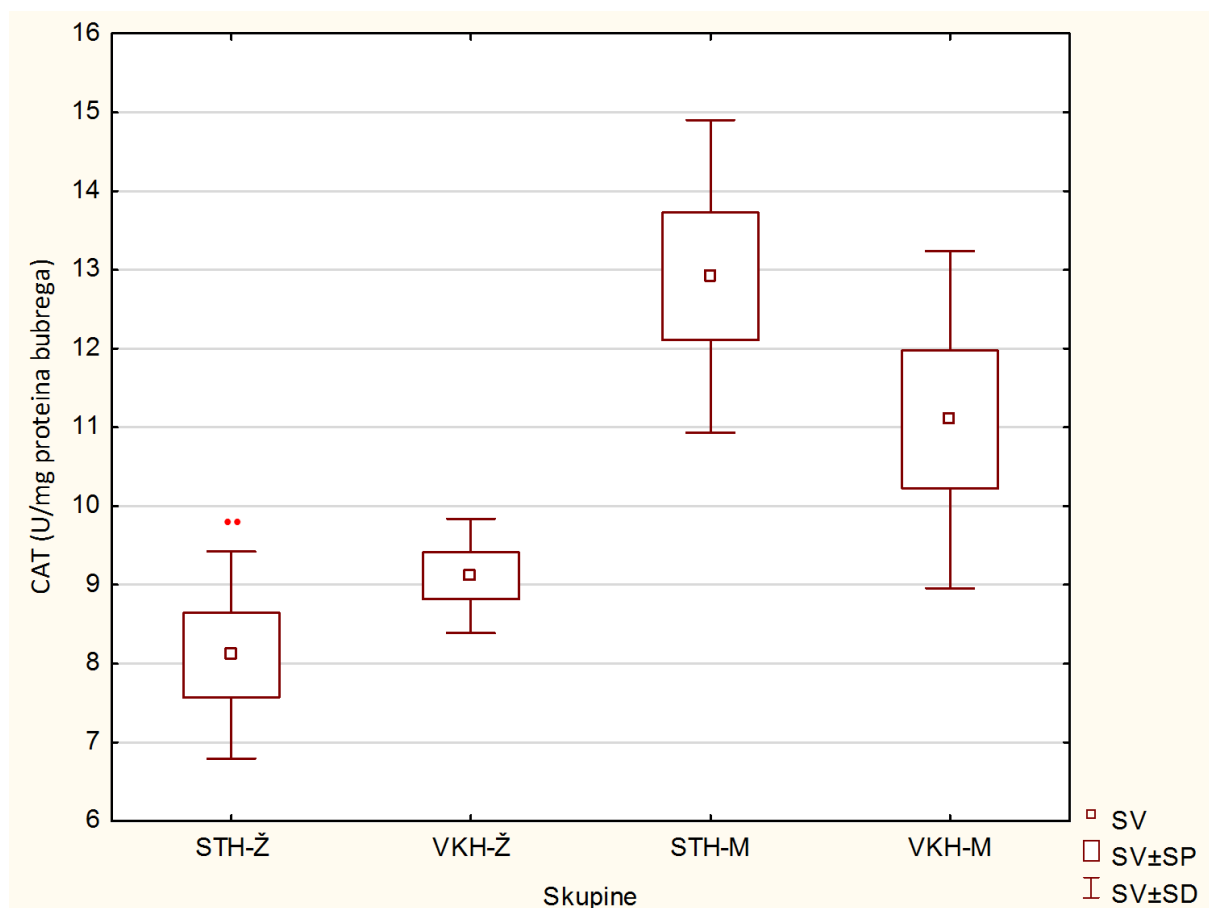
Slika 13. Koncentracija ukupnih proteina u uzorcima tkiva jetre štakora hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom.

Ženke (Ž) i mužjaci (M) štakora (N=6) su hranjeni standardnom hranom (STH) i visokokaloričnom hranom bogatom mastima (VKH) u periodu od 30 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

Kratice: **STH** – standardna hrana; **VKH** – visokokalorična hrana; **Ž** – ženke; **M** – mužjaci, **SV** – srednja vrijednost; **SV±SP** – srednja vrijednost + standardna pogreška; **SV±SD** – srednja vrijednost + standardna devijacija.

4.6.2. Mjerenje enzimske aktivnosti katalaze u uzorcima tkiva bubrega i jetre štakora

Rezultati određivanja aktivnosti CAT (**Slika 14**) u uzorcima tkiva bubrega pokazali su kako nema statistiki značajnih razlika između skupina hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom.



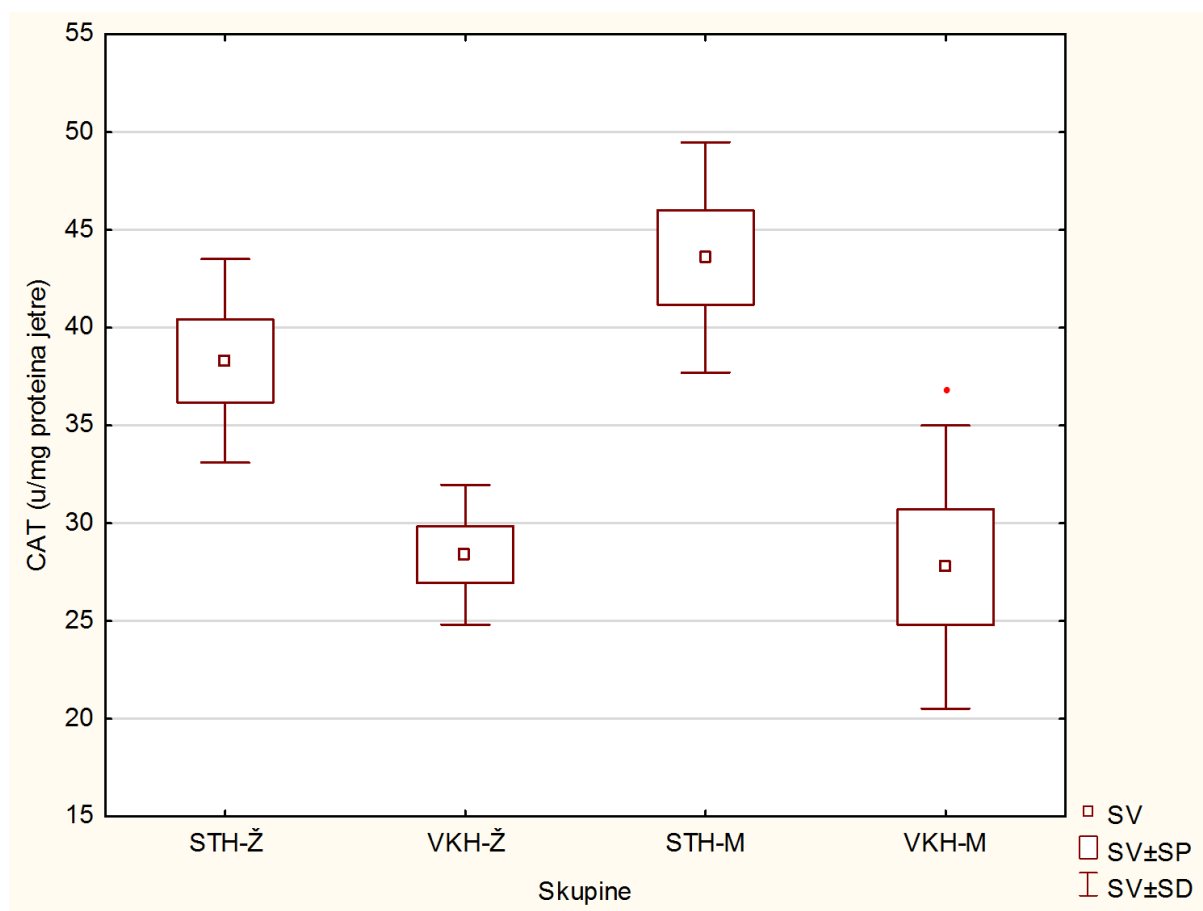
Slika 14. Koncentracija CAT u uzorcima tkiva bubrega štakora hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom

Ženke i mužjaci štakora (N=6) su hranjeni standardnom hranom i visokokaloričnom hranom bogatom mastima u periodu od 30 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

* Statistički značajno u odnosu na STH-M (** $P < 0,01$).

Kratice: **STH** – standardna hrana; **VKH** – visokokalorična hrana; **Ž** – ženke; **M** – mužjaci; **SV** – srednja vrijednost; **CAT** – katalaza; **SV±SP** – srednja vrijednost + standardna pogreška; **SV±SD** – srednja vrijednost + standardna devijacija.

Rezultati određivanja aktivnosti CAT (**Slika 15**) u uzorcima tkiva jetre pokazali su nižu aktivnost CAT u skupini mužjaka hranjenih visokokaloričnom hranom ($P < 0,05$) u odnosu na mužjake hranjenih standardnom hranom.



Slika 15. Koncentracija CAT u uzorcima tkiva jetre štakora hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom

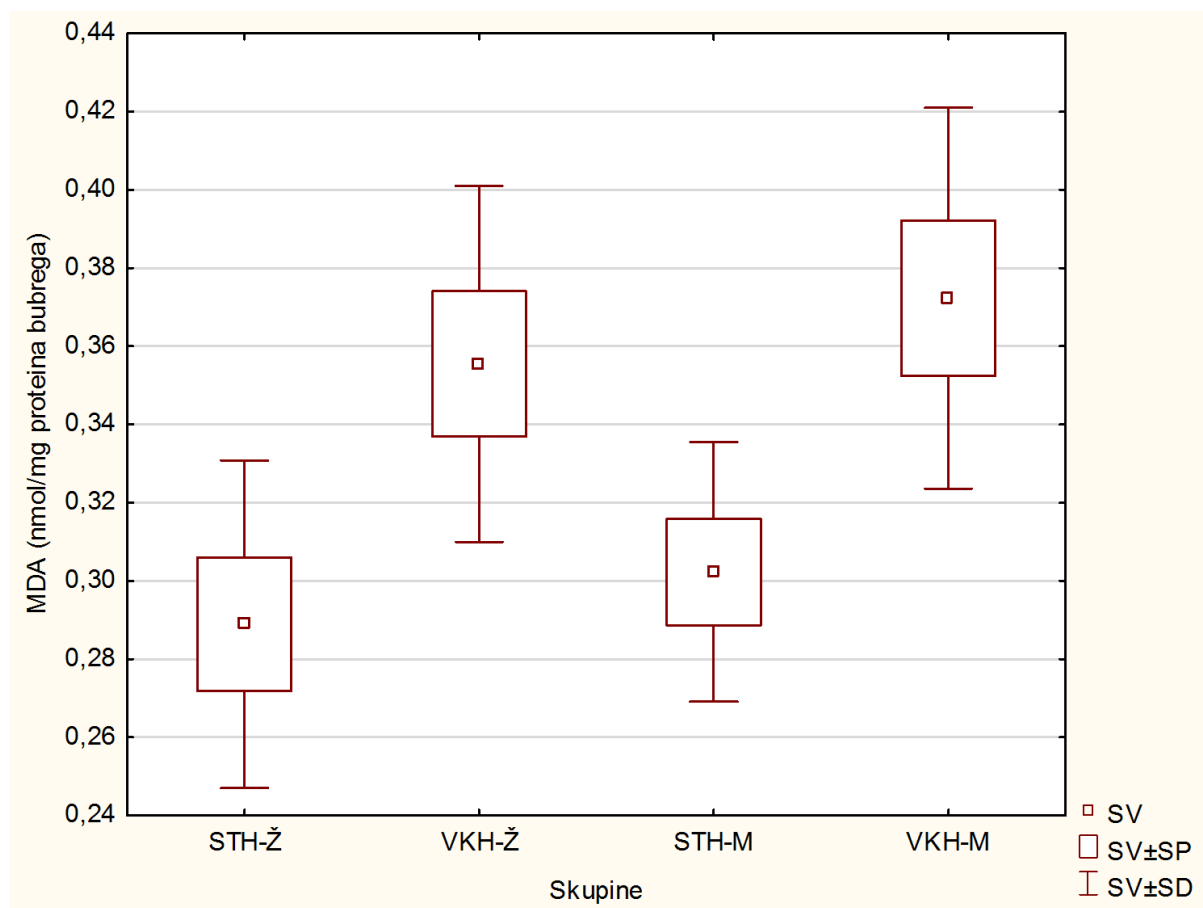
Ženke i mužjaci (N=6) su hranjeni standardnom hranom i visokokaloričnom hranom bogatom mastima u periodu od 30 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

* Statistički značajno u odnosu na STH-M ($P < 0,05$).

Kratice: **STH** – standardna hrana; **VKH** – visokokalorična hrana; **Ž** – ženke; **M** – mužjaci; **SV** – srednja vrijednost; **CAT** – katalaza; **SV±SP** – srednja vrijednost + standardna pogreška; **SV±SD** – srednja vrijednost + standardna devijacija.

4.6.3. Mjerenje razine lipidne peroksidacije u uzorcima tkiva bubrega i jetre štakora

Rezultati mjerenja MDA u tkivu bubrega štakora (**Slika 16**) ne pokazuju statističku značajnu razliku između skupina hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom.

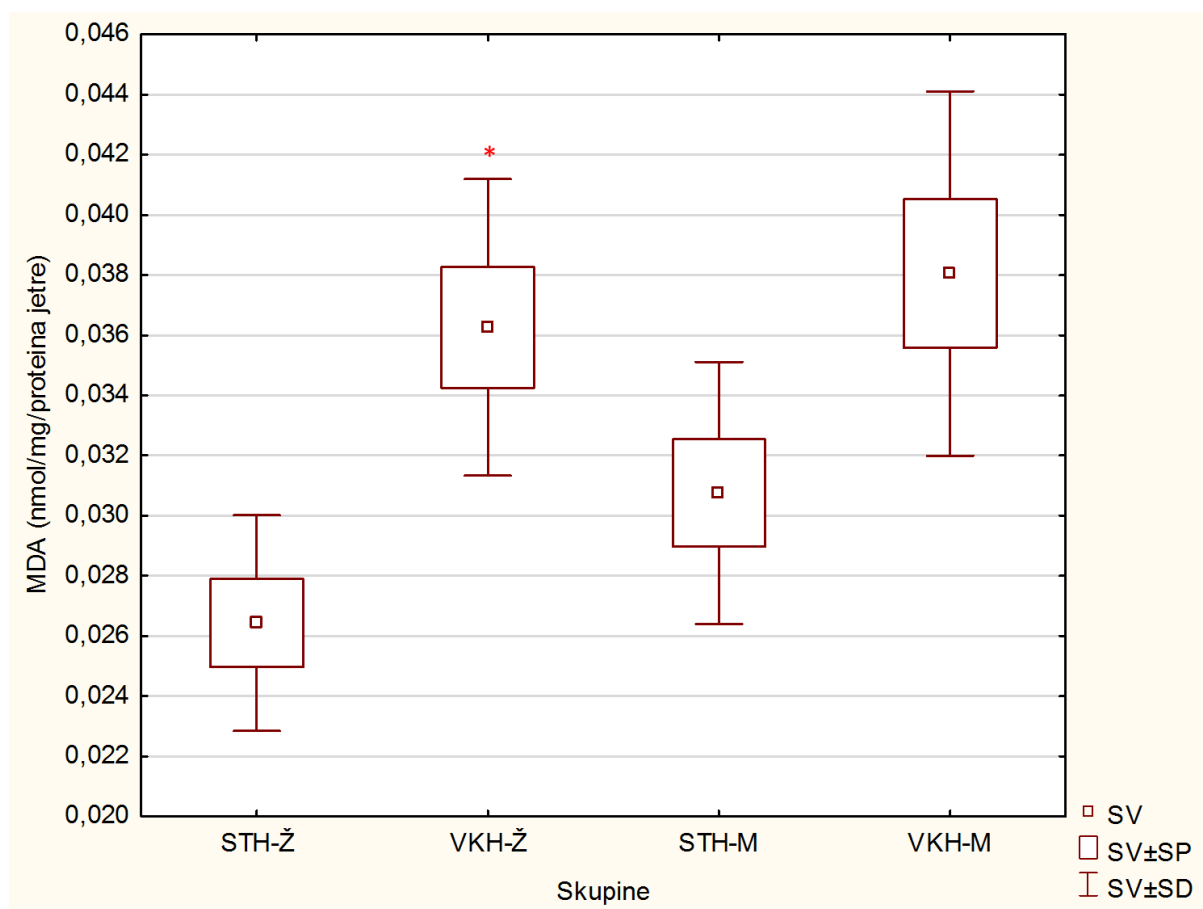


Slika 16. Koncentracija MDA u uzorcima tkiva bubrega štakora hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom

Ženke i mušjaci (N=6) su hranjeni standardnom hranom i visokokaloričnom hranom bogatom mastima u periodu od 30 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

Kratice: **STH** – standardna hrana; **VKH** – visokokalorična hrana; **Ž** – ženke; **M** – mušjaci; **SV** – srednja vrijednost; **MDA** – malondialdehid; **$SV \pm SP$** – srednja vrijednost + standardna pogreška; **$SV \pm SD$** – srednja vrijednost + standardna devijacija.

Rezultati mjerenja MDA u tkivu jetre štakora (**Slika 17**) pokazuju veću vrijednost u skupini ženki ($P < 0,05$) hranjenih visokokaloričnom hranom u odnosu skupinu ženki hranjenih standardnom hranom.



Slika 17. Koncentracija MDA u uzorcima tkiva jetre štakora hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom

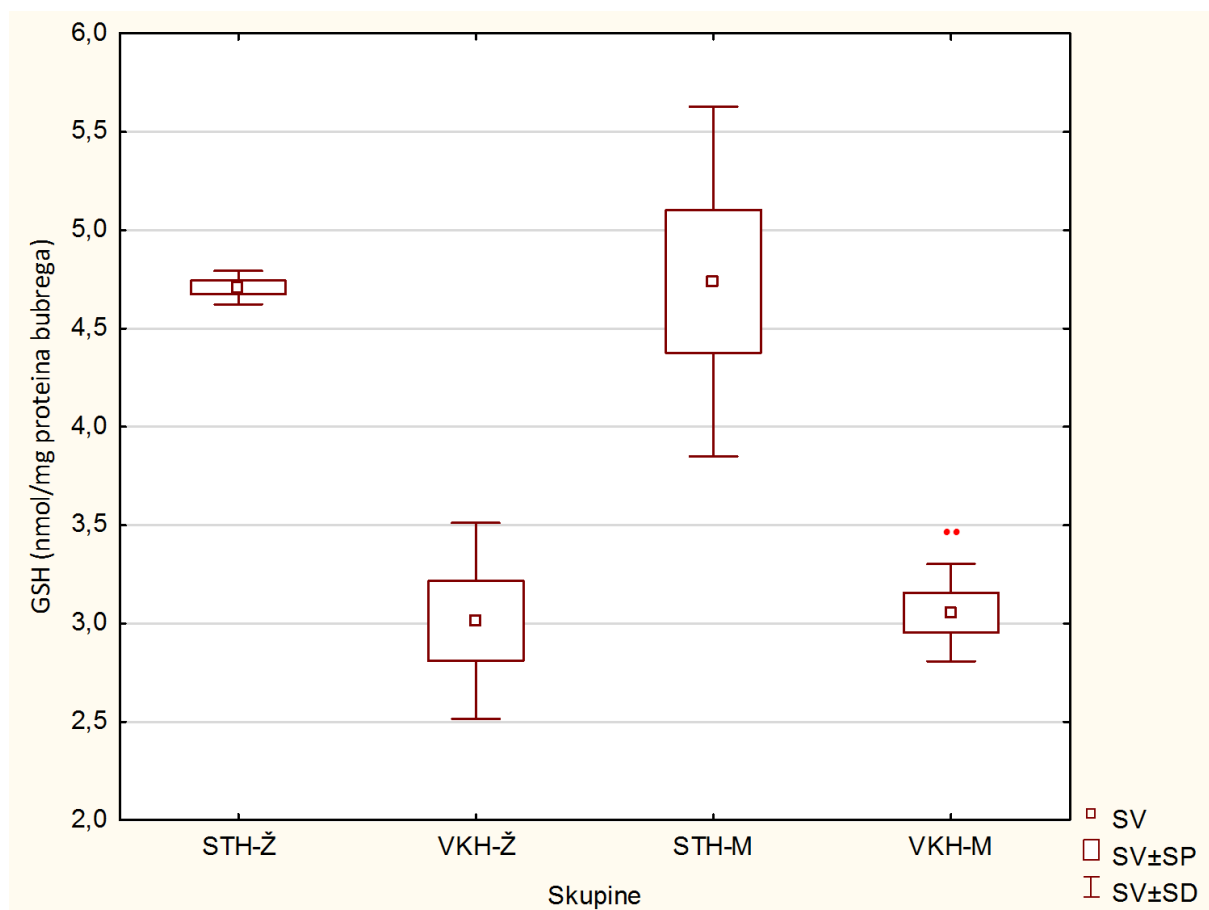
Ženke i mužjaci (N=6) su hranjeni standardnom hranom i visokokaloričnom hranom bogatom mastima u periodu od 30 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

* Statistički značajno u odnosu na STH-Ž ($P < 0,05$).

Kratice: **STH** – standardna hrana; **VKH** – visokokalorična hrana; **Ž** – ženke; **M** – mužjaci; **SV** – srednja vrijednost; **MDA** – malondialdehid; **SV±SP** – srednja vrijednost + standardna pogreška; **SV±SD** – srednja vrijednost + standardna devijacija.

4.6.4. Mjerenje razine ukupnog glutationa (GSH) u uzorcima tkiva bubrega i jetre štakora

Rezultati određivanja koncentracije ukupnoga glutationa (**Slika 18**) u tkivu bubrega štakora ukazuju na pad koncentracije GSH u skupini mužjaka ($P < 0,01$) hranjenih visokokaloričnom hranom u odnosu na skupinu mužjaka hranjenih standardnom hranom.



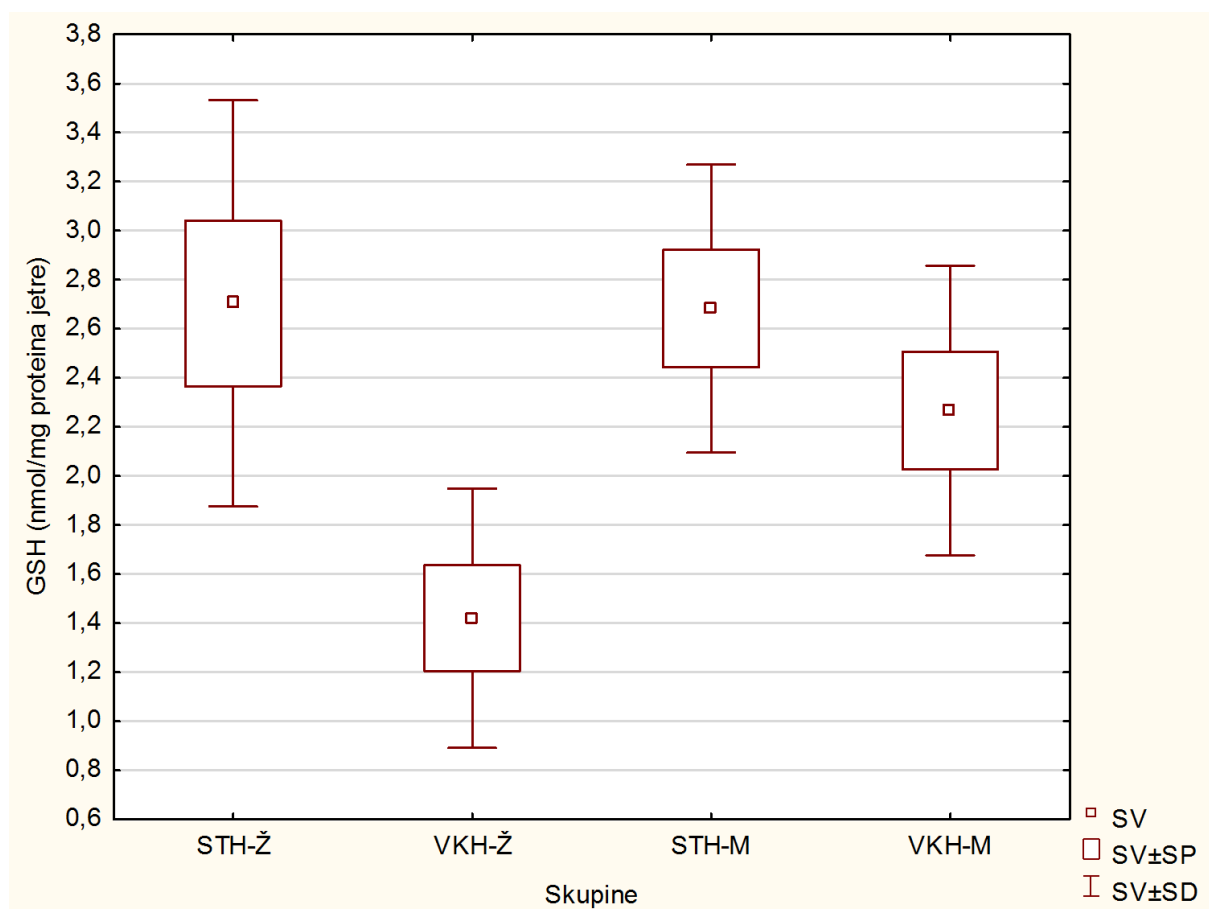
Slika 18. Koncentracija GSH u uzorcima tkiva bubrega štakora hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom

Ženke i mužjaci i ženke štakora (N=6) su hranjeni standardnom hranom i visokokaloričnom hranom bogatom mastima u periodu od 30 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

* Statistički značajno u odnosu na STH-M ($**P < 0,01$).

Kratice: **STH** – standardna hrana; **VKH** – visokokalorična hrana; **Ž** – ženke; **M** – mužjaci; **SV** – srednja vrijednost; **GSH** – glutation; **SV±SP** – srednja vrijednost + standardna pogreška; **SV±SD** – srednja vrijednost + standardna devijacija.

Rezultati određivanja koncentracije ukupnoga glutationa (**Slika 19**) u tkivu jetre štakora ne pokazuju statistički znaajnu razliku između skupina hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom.



Slika 19. Koncentracija GSH u uzorcima tkiva jetre štakora hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom

Ženke i mužjaci (N=6) su hranjeni standardnom hranom i visokokaloričnom hranom bogatom mastima u periodu od 30 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

Kratice: **STH** – standardna hrana; **VKH** – visokokalorična hrana; **Ž** – ženke; **M** – mužjaci; **SV** – srednja vrijednost; **GSH** – glutation; **SV±SP** – srednja vrijednost + standardna pogreška; **SV±SD** – srednja vrijednost + standardna devijacija.

5. Rasprava

Cilj rada bio je istražiti učinak visokokalorične prehrane bogate mastima na mužjake i ženke štakora te usporediti sa skupinama koje su hranjene standardnom prehranom. Praćeni su sljedeći čimbenici: promjena tjelesne težine, hematološke i biokemijske značajke krvi, inzulinska rezistencija, parametri oksidacijskog stresa te osmotska fragilnost eritrocita.

Iz rezultata promjene tjelesne težine prikazanih na **Slici 4** vidljivo je kako je došlo do povećanja promjene tjelesne težine jedinki hranjenih visokokaloričnom hranom u odnosu na jedinke hranjene standardnom hranom no nije primijećena statistički značajna razlika u postotku promjene tjelesne mase. Kako je opisano u uvodu, porast tjelesne težine može biti jedan od glavnih pokazatelja razvoja pretilosti; statistički značajan porast težine između skupina hranjenim standardnom hranom i visokokaloričnom hranom navode brojni autori (Akiyama i sur., 1996; Noeman i sur., 2011; Barbier i sur., 2015; Beutler i sur., 2018; Chung i sur., 2018; Woods i sur., 2018). Naši rezultati pokazuju veći postotak promjene tjelesne težine u mužjaka hranjenih visokokaloričnom hranom u odnosu na ženke. Ovaj neočekivani rezultat možemo pojasniti protektivnim učinkom estrogena, ali i drugih hormona, primjerice hormona rasta, glukokortikoida, prolaktina, hormona štitnjače i inzulina koji mogu djelovati na adipocite koji prevladavaju unutar masnog tkiva. Rezultati drugih autora ukazuju da su dva tjedna dostatna za vidljivu razliku u porastu tjelesne težine između skupina hranjenih standardnom hranom i skupina hranjenih visokokaloričnom hranom te kako bi statistički značajna razlika trebala biti uočljiva nakon svega četiri tjedna (Buettner i sur., 2007), dok drugi ukazuju da je potreban duži period unosa visokokalorične hrane za vidljive razlike u tjelesnoj težini (Nagy i Einwallner, 2018; Woods i sur., 2018). Međutim moguće razlike u prirastu težine mogu se temeljiti i na genetskim razlikama različitih sojeva životinja, načinu unosa hrane, kalorijskoj vrijednosti hrane, dobi, hormonalnom i reproduktivnom ciklusu, ali i razlikama u njihovu ponašanju. Kod nekih istraživanja na miševima nije došlo do statistički značajnog porasta mase između skupina hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom čak ni nakon obrade u trajanju od 12 tjedana (Toita i sur., 2017). Promjena težine ne mora biti nužan pokazatelj pretilosti već to može biti porast postotka masti u tkivu koji nije popraćen značajnim porastom tjelesne težine (Woods i sur., 2018). Naša istraživanja su u skladu s istraživanjem (Dalderup, 1969) koje je također pokazao da je porast tjelesne težine veći kod mužjaka nego kod ženki štakora. Moguće je da bi duža primjena visokokalorične hrane ukazala na veću statističku razliku porasta težine između jedinki hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom.

Hrana bogata mastima se smatra jednim od glavnih uzročnika pretilosti i dijabetesa, a njen se štetan utjecaj može ispoljiti i u vidu nakupljanja triglicerida u tkivima i organima. Povećana razina nakupljanja triglicerida u tkivima može dovesti do lipotoksičnosti. Njihovo nakupljanje u ne- spremišnim tkivima i organima kao što su skeletni mišići, bubrezi, gušterača te mezenhimsko tkivo, može dovesti do stanične disfunkcije te oštećenja pojedinih tkiva. Tako lipotoksični učinak nakupljanja triglicerida u β -stanicama gušterače može dovesti do disfunkcije β -stanica gušterače te inzulinske rezistencije. Lipotoksični učinci triglicerida primijećeni su i u tkivu jetre (Weinberg, 2006), a lipotoksičnost je ključna poveznica između visokokalorične prehrane, razvoja pretilosti i kardiovaskularnih poremećaja (Lelliott i Vidal-Puig, 2004).

Pretilost se povezuje i s brojnim drugim poremećajima kao što su inzulinska rezistencija (Akiyama i sur., 1996; Barbier i sur., 2015; Chung i sur., 2018; Indumathy i sur., 2018; Woods i sur., 2018), dijabetes tipa 2 (Buettner i sur., 2007; Fernández-Sánchez i sur., 2011; Woods i sur., 2018), promjena crijevne mikroflore (de La Serre i sur., 2010; Barbier i sur., 2015), metabolički poremećaji (Fernández-Sánchez i sur., 2011) te razvoj tumora (Fernández-Sánchez i sur., 2011). Pretilost prati i stanje tkivne hipoksije u bijelom masnom tkivu što uzrokuje produkciju slobodnih radikala i nastanak stanja oksidacijskog stresa (Milagro i sur., 2006). Nadalje, primijećena je i poveznica između pretilosti i brojnih psihičkih poremećaja uključujući depresiju (Luppino i sur., 2010), PTSP, ADHD te anksiozne poremećaje (Fuemmeler i sur., 2011; Cortese i Tessari, 2017). Uz pretilost se učestalo veže i upala u cijelom organizmu (Mangge i sur., 2010; Tateya i sur., 2013) te brojni kardiovaskularni poremećaji kao što je ateroskleroza (Mangge i sur., 2010; Fernández-Sánchez i sur., 2011; Indumathy i sur., 2018).

Analizom učinka standardne i visokokalorične hrane na hematološke pokazatelje štakora vidljivo je kako je došlo do gotovo neznatnog smanjenja broja ukupnih leukocita u krvi jedinki obrađenih visokokaloričnom hranom u odnosu na jedinke obrađene standardnom hranom; vidljiva je statistički značajna razlika između mužjaka hranjenih standardnom hranom i ženki hranjenih standardnom hranom ($P < 0,05$) (**Slika 5**). Rezultati drugih istraživanja pokazuju porast broja leukocita u štakora hranjenih s visokokaloričnom hranom bogatom mastima kao odgovor na upalu koja se javlja kao posljedica pretilosti (Mahmoud, 2013; Hussain, 2015; Chandra i sur., 2018). Broj leukocita može biti znatno povećan u prisutnosti lokalne/sustavne i akutne/kronične upale. Primijećena razlika između skupina vjerojatno je posljedica fiziološki povišenog broja leukocita u ženki štakora što je vidljivo usporedbom relativne količine leukocita kod ženki i mužjaka (**Tablica 5**). Nadalje,

nedovoljno dugi unos visokokalorične hrane nije prouzročio razvoj upale koja bi rezultirala značajnim povećanjem broja leukocita u krvi.

Diferencijalna krvna slika leukocita prikazana je u **Tablici 5** te je iz nje vidljivo kako je došlo do statistički značajnih promjena u postotku neutrofila između mužjaka hranjenih visokokaloričnom hranom te ženki hranjenih visokokaloričnom hranom ($P < 0,01$). Neutrofili su jedne od prvih stanica koje reagiraju na postojeću upalu te potiču upalu novačenjem drugih stanica imunološkog sustava kao što su makrofagi te limfociti (Talukdar i sur., 2012). Limfociti su također stanice imunološkog sustava koje pokazuju specifično djelovanje te se njihov broj povećava pri brojnim patološkim stanjima. Neka istraživanja navode kako visokokalorična hrana dovodi do poremećaja funkcije limfocita (Sato-Mito i sur., 2009) što rezultati našeg istraživanja nisu pokazali. To je moguće objasniti trajanjem obrade visokokaloričnom hranom gdje je kod Sato-Mito i sur. (2009.) obrada trajala 9 tjedana, dok je naša obrada trajala 30 dana.

U **Tablici 4** prikazani su hematološki pokazatelji te je vidljivo kako su vrijednosti hemoglobina (Hgb), hematokrita (H), prosječnog volumena eritrocita (MCV), prosječne količine hemoglobina u eritrocitima (MCH) te prosječne koncentracije hemoglobina u eritrocitima (MCHC) sniženi u skupinama hranjenim visokokaloričnom hranom te je statistički značajno smanjenje vidljivo usporedbom koncentracije hemoglobina u krvi mužjaka hranjenih visokokaloričnom hranom u odnosu na mužjake hranjenih standardnom hranom ($P < 0,05$) (**Tablica 4**). Podaci dobiveni u našem istraživanju podudaraju se s podacima drugih istraživanja gdje je također primijećeno smanjenje hematoloških pokazatelja kod jedinki hranjenih visokokaloričnom hranom (Edozien i Switzer, 1977).

Nadalje, istražili smo kako visokokalorična prehrana utječe na biokemijske pokazatelje u krvnom serumu štakora u odnosu na standardnu hranu. **Tablica 6** prikazuje rezultate gdje je vidljivo značajno povećanje koncentracije enzima alkalne fosfataze kod ženki hranjenih visokokaloričnom hranom u odnosu na ženke hranjene standardnom hranom ($P < 0,001$). Alkalna fosfataza (ALP) je enzim čija je koncentracija i aktivnost najizraženija u koštanom tkivu, jetri te u probavilu. Postoji više izoformi ALP-a ovisno o tkivu u kojem su prisutne. Povišena koncentracija ALP povezana je s poremećajima jetre te osteogenezom (Sharma i sur., 2014), ali i s crijevnom mikroflorom, prehranom te probavilom. Intestinalna ALP ima ulogu u defosforilaciji bakterijskih toksina posebice lipopoliproteina koji mogu imati toksično djelovanje na organizam. Endotoksemija u probavnom sustavu vodi razvoju metaboličkog sindroma (Kaliannan i sur., 2013). Povećana koncentracija ALP-a prisutna je kod upalnih stanja te infektivnih bolesti probavnog sustava (Estaki i sur., 2014). Također pokazano je

kako je neaktivnost ALP-a u probavnom sustavu izravno povezana s razvojem pretilosti i metaboličkog poremećaja popraćenog inzulinskom rezistencijom, upalom kardiovaskularnih te ostalih bolesti pridruženih poremećajima kardiovaskularnog sustava (Bilski i sur., 2017). Povećanje ALP u našem istraživanju moguće je objasniti oštećenjem jetre, upalom te promjenama crijevne mikroflore (de La Serre i sur., 2010), posljedično nastale pretilošću. Druga istraživanja pokazuju kako visokokalorična hrana smanjuje aktivnost ALP-a u organizmu (de La Serre i sur., 2010).

Iz **Tablice 6** također je vidljivo da nije došlo promjena koncentracije alanin aminotransferaze (ALT) između pokusnih skupina. ALT je jedan od češće korištenih biomarkera poremećaja funkcije i strukture jetre; visoka koncentracija u citoplazmi hepatocita vodi povećanom oslobađanju ovog enzima pri oštećenjima tkiva jetre (Liu i sur., 2014; Toita i sur., 2017). ALT je povezan s povećanjem abdominalne mase te metaboličkim poremećajima kao što su pretilost i dijabetes, mišićna distrofija te ostalim poremećajima mišića (Liu i sur., 2014; Toita i sur., 2017). Također se pretpostavlja kako je smanjenje koncentracija ALT-a u tkivu povezano sa starenjem (Liu i sur., 2014). U istraživanju Toita i sur. (2017) koncentracija ALT-a u plazmi nije pokazala značajnu promjenu između skupina hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom te autori navode kako statistički neznčajna razlika ne znači da nije prisutna upala u tkivu jetre što se podudara s našim rezultatima.

Statistički značajne promjene u koncentraciji amilaze (**Tablice 6**) su primjećene usporedbom ženki hranjenih visokokaloričnom hranom te mužjaka hranjenih visokokaloričnom hranom ($P < 0,05$). Amilaza je enzim koji sudjeluje u razgradnji škroba na jednostavnije šećere koji mogu ući u proces glikolize. Luče je gušterača, žlijezde slinovnice te djelomično jetra, a ovaj enzim koristi se kao pokazatelj poremećaja rada gušterače (Afsartala i sur., 2016; Eldin i Abdelsalam, 2015). Istraživanja navode kako je primijećeno smanjenje koncentracije amilaze gušterače u krvnom serumu pretilih osoba (Kondo i sur., 1988; Nakajima, 2016; Bonnefond i sur., 2017) i kod štakora (Bruzzzone i sur., 1984), dok druga pak istraživanja navode povećanu razinu amilaze kod osoba oboljelih od dijabetesa i pretilih osoba (Eldin i Abdelsalam, 2015) te štakora (Saravanan i sur., 2014).

Iz **Tablice 7** vidljivo je statistički značajno smanjenje koncentracije albumina u plazmi kod ženki hranjenih visokokaloričnom hranom u odnosu na mužjake hranjene visokokaloričnom hranom ($P < 0,05$). Albumini su jedni od najčešćih proteina koji se nalaze u krvnom serumu sisavaca i imaju bitnu ulogu u regulaciji koloidno-osmotskog tlaka te prijenosu brojnih molekula kao što su hormoni, slobodne masne kiseline, metaboliti te brojne druge molekule. Albumini se sintetiziraju u jetri (Hall, 2011), a njihova povećana

koncentracija u krvi može služiti kao biljeg upale jedne od značajki pretilosti (Marques i sur., 2015), što potvrđuje usku povezanost između visokokalorične hrane, pretilosti i nastanka upale. Statistički značajna razlika nije uočena ni kod koncentracije globulina u krvnoj plazmi između jedinki hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom (**Tablica 7**). Globulini su također krvni proteini koji se sintetiziraju u jetri i imaju važnu prijenosnu ulogu te ulogu u imunološkom sustavu (Hall, 2011).

Primijećeno je i statistički značajno smanjenje koncentracija kalcijevih iona (Ca^{2+}) u plazmi mužjaka hranjenih visokokaloričnom hranom u odnosu na mužjake hranjene standardnom hranom ($P < 0,01$) (**Tablica 7**). Druga istraživanja također navode smanjenje u koncentraciji kalcija u plazmi pretilih štakora (Paradis i Cabanac, 2005) te smanjenje porasta tjelesne težine kod štakora hranjenih hranom bogatom kalcijem (Papakonstantinou i sur., 2003). Kalcij je bitan u organizmu, posebice jer sudjeluje u izgradnji koštanog tkiva, a promjene koncentracije kalcija u izvanstaničnim tekućinama mogu dovesti do kardioloških i neuroloških poremećaja (Hall, 2011).

Rezultati nisu pokazali statistički značajnu razliku u koncentraciji fosfora usporedbom svih skupina (**Tablici 7**), ali je vidljivo statistički značajno smanjenje natrija (Na^+) kod ženki hranjenih visokokaloričnom hranom u odnosu na mužjake hranjene visokokaloričnom hranom ($P < 0,05$). Zapaženo je i statistički značajno povećanje koncentracije kalija kod mužjaka hranjenih standardnom hranom ($P < 0,01$) u odnosu na ženke hranjene standardnom hranom, te mužjaka hranjenih visokokaloričnom hranom u odnosu na ženke hranjene visokokaloričnom hranom ($P < 0,05$). Natrijev je ion prisutan u velikoj koncentraciji u izvanstaničnom prostoru dok je koncentracija kalijevih iona veća u stanicama (Hall, 2011). Povišene koncentracije natrija povezuju se s hipertenzijom, kardiovaskularnim bolestima, smanjenjem funkcije bubrega koji mogu dovesti i do smrti (Oh i sur., 2017). Također se navodi kako pretjerani unos natrija može dovesti do povećanja mase bijelog masnog tkiva te povećanja koncentracije adipokina leptina u krvnoj plazmi (Fonseca-Alaniz i sur., 2007). Stanja hiperkalijemije povezana su pretjeranim unosom kalija u organizam te s neučinkovitim uklanjanjem viška kalija u bubrezima, dok je hipokalijemija povezana s nedovoljnim unosom kalija ili nepravilnim radom bubrega. Narušavanje homeostaze kalija u organizmu potencijalno je opasno te dovodi do raznih patoloških stanja (Palmer i sur., 2008; Zacchia i sur., 2016).

Razina ukupnog bilirubina (TBIL) i kreatina (CRE) u serumu nije pokazala statistički značajne razlike među skupinama (**Tablica 7**). TBIL se koristi kao jedan od biokemijskih pokazatelja metabolizma bilirubina te pokazatelja oštećenja tkiva jetre (Jie i sur., 2018). **Tablica 7** pokazuje statistički značajno smanjenje koncentracije dušik uree u krvi (BUN) kod

mužjaka hranjenih visokokaloričnom hranom u odnosu na mužjake hranjene standardnom hranom ($P < 0,05$). BUN i CRE su pokazatelji promjena na bubrezima (Somsak i sur., 2013).

Također nisu uočene promjene niti u osmotskoj fragilnosti eritrocita (**Slika 6**) budući da je kod svih skupina hemoliza započela pri koncentraciji od 0,5% NaCl-a te iznosila oko 20%, a do potpune hemolize došlo je pri koncentraciji NaCl-a od 0,3%. Rezultati se podudaraju s rezultatima drugih istraživanja gdje nema statistički značajnih razlika u osmotskoj otpornosti eritrocita nakon desetotjednog unosa visokokalorične hrane bogate mastima, ali je hemoliza započela pri koncentraciji NaCl-a od 0,5% te je potpuna hemoliza primijećena pri 0,3%-tnoj otopini NaCl-a (Kempaiah i Srinivasan, 2006). Osmotska otpornost eritrocita pokazatelj je promjena na eritrocitima, posebice oksidacijskih oštećenja te nazočnosti toksičnih metabolita koji mogu narušiti osmotsku cjelovitost eritrocita. Eritrociti su osobito osjetljivi na oksidacijska oštećenja, budući da su nosioci kisika (izloženi su visokoj zasićenosti kisikom), nemaju sposobnost samoobnavljanja, eritrocitna membrana podložna je peroksidaciji lipida, a hemoglobin je sklon autooksidaciji. Osjetljivost eritrocita na peroksidaciju lipida povezana je s nazočnošću visokog sadržaja polinezasićenih masnih kiselina u membrani eritrocita (Foot i sur., 1982) te stalnoj izloženosti stanica kisiku uz nazočnost reaktivnog željeza u hemoglobinu što posljedično vodi stvaranju slobodnih radikala i slabljenju antioksidacijske obrane eritrocita.

Zbog toga Kusmic i sur. (2000) i Alicigüzel i sur., (2001) smatraju da su eritrociti odgovarajući model za istraživanje oksidacijskog stresa. Odnos GSSG/GSH u eritrocitima može poslužiti kao rani i osjetljivi pokazatelj oksidacijske neravnoteže i važan cilj za praćenje brojnih bolesti posljedično nastalih povećanom razinom oksidacijskog stresa (COPB, dijabetes, preeklampsija, astma...) te praćenjem stanja nakon primjene antioksidanasa. Povećana liza eritrocita rezultat je oksidacijskog oštećenja eritrocitne membrane te smanjene fluidnosti membrane i njene sposobnosti otpora osmotskim promjenama (osmotskoj rezistenciji). Unutarstanični glutation u eritrocitima oksidira se u većoj mjeri, povećanje GSSG i MDA u eritrocitima te nedostatak GSH aktivira proteolitičke mehanizme na membrani vodeći otpuštanju sijaloglikopeptida i nastanku promjena na površini eritrocita što omogućuje lakše odstranjivanje oštećenih eritrocita iz krvotoka u jetri i slezeni.

Neka istraživanja pokazala su kako visokokalorična prehrana kod sisavaca može dovesti do promjene sastava stanične membrane eritrocita te tako dovesti do smanjene osmotske otpornosti eritrocita, promjene fluidnosti odnosno hemolize eritrocita (Abbott i sur., 2012). Eritrociti su izuzetno osjetljivi na promjene zbog visokog postotka polinezasićenih masnih kiselina u membrani te nazočnosti hema i željeza (Fe) što ih čini izuzetno osjetljivima

na prisutnost slobodnih radikala (Abdelhalim, 2010). Istraživanja na kunićima pokazala su da visokokalorična prehrana vodi povećanju osmotske osjetljivosti eritrocita te njihove hemolize pri višim koncentracijama u odnosu na kontrolu nakon osmotjednog unosa visokokalorične hrane (Abbott i sur., 2012). Očito, iz navedenog možemo zaključiti da kod različitih vrsta, unos visokokalorične hrane nema jednak učinak na eritrocite.

Rezultati testa oralne tolerancije glukoze (OGTT) prikazani su na **Slikama 7-11** te je temeljem rezultata vidljivo da visokokalorična hrana vodi povećanoj koncentraciji glukoze u krvi u odnosu na jedinke hranjene standardnom hranom; točnije došlo je do povećanja inzulinske rezistencije. Prije intragastričkog unosa 30%-tne otopine glukoze (**Slika 7**), vidljivo je statistički značajno povećanje u koncentraciji glukoze u krvi mužjaka ($P < 0,05$) hranjenih visokokaloričnom hranom u odnosu na mužjake hranjene standardnom hranom. Nakon 30 minuta od intragastričkog unosa 30%-tne otopine glukoze (**Slika 8**) vidljivo je statistički značajno povećanje koncentracije glukoze u krvi ženki ($P < 0,05$) hranjenih visokokaloričnom hranom u odnosu na ženke hranjene standardnom hranom te mužjaka hranjenih visokokaloričnom hranom ($P < 0,05$) u odnosu na mužjake hranjene standardnom hranom. Slična opažanja u razini glukoze vidljiva su i nakon 120 minuta intragastričkog unosa 30%-tne otopine glukoze; razina glukoze je statistički značajno povećana u krvi mužjaka ($P < 0,01$) hranjenih visokokaloričnom hranom u odnosu na mužjake hranjene standardnom hranom. Nakon 60 i 90 minuta od unosa 30%-tne otopine glukoze nisu primjećene statistički značajne razlike razine glukoze u krvi usporedbom skupina hranjenih standardnom i visokokaloričnom hranom. Rezultati su u skladu s drugim istraživanjima (Nagy i Einwallner, 2018). Iz navedenog je moguće zaključiti da štakori hranjeni visokokaloričnom hranom razvijaju inzulinsku rezistenciju (Huang i sur., 2004; Flanagan i sur., 2008) smanjujući broj inzulinskih receptora na stanicama (Huang i sur., 2004) te broj glukoznih receptora - GLUT2 na β stanicama gušterače što uvjetuje smanjen ulazak glukoze u stanice te smanjeno lučenje inzulina (Kim i sur., 1995).

Inzulinska rezistencija je usko povezana s razvojem dijabetesa tipa 2 te preti lošću i razvojem inzulinske rezistencije kao jednim od najrizičnijih čimbenika razvoja dijabetesa tipa 2 (Nagy i Einwallner, 2018). Dijabetes tipa 2 povezan je s brojnim drugim patološkim stanjima kao što su retinopatija i gubitak vida, oštećenja bubrega čime se povećava stopa smrtnosti u oboljelih (Afkarian i sur., 2013).

Rezultati analize ukupnih proteina u tkivu bubrega (**Slika 12**) pokazuju povećanje koncentracije proteina u tkivu bubrega kod mužjaka hranjenih visokokaloričnom hranom u odnosu na mužjake hranjene standardnom hranom ($P < 0,05$). Za razliku od tkiva bubrega,

analiza koncentracije ukupnih proteina u tkivu jetre (**Slika 13**) nije pokazala statistički značajne razlike između pojedinih skupina.

Analizom pokazatelja oksidacijskog stresa u tkivu bubrega vidljivo je statistički značajno smanjenje aktivnosti enzima katalaze u tkivu bubrega kod ženki hranjenih standardnom hranom u odnosu na mužjake hranjene standardnom hranom ($P < 0,05$) (**Slika 14**). U tkivu jetre vidljivo je smanjenje aktivnosti enzima katalaze kod mužjaka hranjenih visokokaloričnom hranom ($P < 0,05$) u odnosu na mužjake hranjene standardnom hranom (**Slika 15**). Katalaza je enzim koji u stanicama katalizira razgradnju vodikova peroksida na molekule vode i kisika koje nisu štetne za biogene molekule kao što su proteini, DNA i lipidi. Aktivnost katalaze se sukladno tome povećava kako dolazi do pomaka ravnoteže u oksido-redukcijskom sustavu u korist slobodnih radikala. Jednako tako, antioksidativni sustavi nisu u mogućnosti dugotrajno vraćati sustav u ravnotežu te zbog kronične izloženosti slobodnim radikalima aktivnost katalaze pada. Druga istraživanja također pokazuju kako je aktivnost katalaze smanjena u tkivima jetre i bubrega štakora hranjenih visokokaloričnom hranom (Vijayakumar i sur., 2004), dok neki tvrde kako dolazi do povećanja aktivnosti katalaze u tkivu jetre, a smanjenja u tkivu bubrega (Noeman i sur., 2011).

Iz rezultata je vidljivo i povećanje koncentracije malondialdehida (MDA) u tkivima bubrega no nije uočena statistički značajna razlika (**Slika 16**) dok je u tkivu jetre (**Slika 17**) primijećena statistički značajna razlika kod ženki hranjenih visokokaloričnom hranom ($P < 0,05$) u odnosu na ženke hranjene standardnom hranom. MDA je stabilni produkt lipidne peroksidacije, kaskadne reakcije slobodnih radikala s lipidima koja vodi destabilizaciji stanične membrane. Podaci iz literature također potvrđuju da visokokalorična hrana bogata mastima vodi povećanju koncentracije MDA u tkivima jetre i bubrega štakora (Vijayakumar i sur., 2004; Milagro i sur., 2006; Noeman i sur., 2011).

Povećanje MDA prati smanjenje koncentracije staničnog glutaciona (GSH) u tkivu bubrega (**Slika 18**) i jetre (**Slika 19**). Statistički je značajno smanjenje ukupnog glutaciona u tkivima bubrega mužjaka hranjenih visokokaloričnom hranom ($P < 0,01$) u odnosu na mužjake hranjene standardnom hranom. Rezultati također pokazuju pad koncentracije ukupnog glutaciona skupina hranjenih visokokaloričnom hranom u tkivu jetre no nema statistički značajnih razlika. Dobiveni podaci podudaraju se s podacima iz literature koji također tvrde kako dolazi do smanjenja razine staničnog GSH u tkivu bubrega i jetre kod štakora hranjenih visokokaloričnom hranom (Vijayakumar i sur., 2004; Hsu i Yen, 2007; Noeman i sur., 2011). Glutation je tripeptid koji ima ulogu u metabolizmu nutrijenata, antioksidativnoj zaštiti te u

unutarstaničnoj signalizaciji (Aquilano i sur., 2014). Iscrpljivanje staničnog GSH je jedan od pokazatelja oksidacijskog stresa u organizmu.

Oksidativni stres je stanje koje prati brojne patološke poremećaje te se često povezuje uz pretilost, inzulinsku rezistenciju te dijabetes tipa 2 (Fernández- Sánchez i sur., 2011; Chung i sur., 2018), ali i proces starenja (Dröge, 2002) te neplodnosti u muškaraca i žena (Adeoye i sur., 2018). Oksidativni stres osim patoloških uloga ima i brojne fiziološke uloge te je bitan za održavanje homeostaze, u staničnoj signalizaciji, ubijanju patogena i zacjeljivanju rana (Bhattacharyya i sur., 2014).

Temeljem dobivenih podataka vidljivo je da pretilost dovodi do narušavanja cjelokupne homeostaze organizma i da bi uravnotežena i pravilna prehrana bogata antioksidansima te tjelovježba uvelike mogla pomoći u uspostavljanju narušene homeostaze organizma. Tako, primjerice brojni podaci pokazuju na djelotvorne učinke flavonoida na dijabetes i pretilost, posebice njihove regulatorne učinke na prijenosnike šećera u krvi kroz povećanje izlučivanja inzulina i povećanje osjetljivosti inzulinskih receptora, smanjenje apoptoze te poticanje proliferacije i regeneracije stanica gušterače, te smanjenje inzulinske rezistencije, upale i oksidativnog stresa u mišićima i cjelokupnom organizmu. Učestalost pretilosti i dijabetesa u svijetu raste kao i potreba za sigurnim, učinkovitim, funkcionalnim biotvarima koje učinkovito smanjuju posljedice dijabetesa i pretilosti. Istraživanje molekularnih mehanizama flavonoida uključenih u metabolizam glukoze i lipida u pretilosti i dijabetesu zasigurno će dati novi uvid u području razvoja biološki aktivnih djelotvornih lijekova te potaknuti razvoj prehrane flavonoidima u cilju sprječavanja nastanka bolesti kao i liječenja pretilosti, dijabetesa i njihovih komplikacija.

6. Zaključci

Temeljem dobivenih rezultata moguće je zaključiti da obrada štakora visokokaloričnom prehranom tijekom 30 dana:

- ne uzrokuje povećanje tjelesne težine, no uz produljenje trajanja obrade može dovesti do razvoja pretilosti
- vodi narušavanju hematoloških i biokemijskih pokazatelja
- kod mužjaka vodi razvoju upalne reakcije kroz povećanje postotka neutrofila
- nema utjecaja na hemolizu eritrocita
- vodi razvoju inzulinske rezistencije
- povećava razinu lipidne peroksidacije (MDA) u tkivu jetre ženki te smanjuje razinu ukupnog glutationa (GSH) u tkivu bubrega mužjaka
- smanjuje aktivnost katalaze (CAT) u tkivu jetre te u tkivu bubrega mužjaka
- mužjaci pokazuju veću osjetljivost na visokokaloričnu prehranu u odnosu na ženke što možemo pripisati zaštitnom učinku estrogena
- obzirom na povećanu učestalost pretilosti i dijabetesa u svijetu, nužno je i potrebno istražiti učinkovitost funkcionalno aktivnih bioloških sastavnica na metabolizam lipida i glukoze u cilju smanjenja posljedica dijabetesa i pretilosti.

7. Literatura

- Abbott SK., Else PL., Atkins TA., Hulbert AJ (2012): Fatty acid composition of membrane bilayers: Importance of diet polyunsaturated fat balance. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1818**: 1309–1317.
- Adeoye O., Olawumi J., Opeyemi A., Christiania O (2017): Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. *JBRA Assist Reprod* **22**: 61–66.
- Aebi H (1984): Catalase in Vitro. *Methods Enzymol* **105**: 121–126.
- Afkarian M., Sachs MC., Kestenbaum B., Hirsch IB., Tuttle KR., Himmelfarb J. (2013): Kidney Disease and Increased Mortality Risk in Type 2 Diabetes. *J Am Soc Nephrol* **24**: 302–308.
- Afsartala Z., Savabkar S., Mojarad EN., Assadollahi V., Tanha S., Bijangi K. (2016): Expression of liver alpha-amylase in obese mouse hepatocytes. *Gastroenterol Hepatol from Bed to Bench* **9**: 278–285.
- Akiyama T., Tachibana I., Shirohara H., Watanabe N., Otsuki M (1996): High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. *Diabetes Res Clin Pract* **31**: 27–35.
- Alicigüzel Y., Özdem SN., Özdem SS., Karayalçın Ü., Siedlak SL., Perry G. (2001): Erythrocyte, plasma, and serum antioxidant activities in untreated toxic multinodular goiter patients. *Free Radic Biol Med* **30**: 665–670.
- Aquilano K., Baldelli S., Ciriolo MR (2014): Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front Pharmacol* **5**: 1–12.
- Baur JA., Pearson KJ., Price NL., Jamieson HA., Lerin C., Kalra A. (2006): Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* **444**: 337–342.
- Beutler E., Kuhl W., West C. (1982): The Osmotic Fragility Storage. *Blood J* **59**: 1141–1147.
- Bhattacharyya A., Chattopadhyay R., Mitra S., Crowe SE (2014): Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. *Physiol Rev* **94**: 329–354.
- Biff F Palmer., Robert J Alpern., Donald W Seldin (2008). *Physiology and Pathophysiology of Sodium Retention and Wastage Seldin and Giebisch's The Kidney* doi:P088488_1005-1050.
- Bilski J., Mazur-Bialy A., Wojcik D., Zahradnik-Bilska J., Brzozowski B., Magierowski M. (2017): The Role of Intestinal Alkaline Phosphatase in Inflammatory Disorders of Gastrointestinal Tract. *Mediators Inflamm* **2017**: 1–9.

- Birben E., Sahiner UM., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O (2012): Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J* **5**: 9–19.
- Bonnefond A., Yengo L., Dechaume A., Canouil M., Castelain M., Roger E. (2017): Relationship between salivary/pancreatic amylase and body mass index: a systems biology approach. *BMC Med* **15**: 37.
- Bruzzone R., Trimble ER., Gjinovci A., Renold AE (1984): Changes in content and secretion of pancreatic enzymes in the obese Zucker rat. *Biochem J* **219**: 333–336.
- Buettner R., Schölmerich J., Bollheimer LC (2007): High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* **15**: 798–808.
- Bureau DP., Kaushik SJ., Cho CY (2003): Bioenergetics. *Fish Nutr* 1–59
- Chung APYS., Gurtu S., Chakravarthi S., Moorthy M., Palanisamy UD (2018): Geraniin Protects High-Fat Diet-Induced Oxidative Stress in Sprague Dawley Rats. *Front Nutr* **5**: 1–14.
- Cipak Gasparovic A., Zarkovic N., Zarkovic K., Semen K., Kaminsky D., Yelisyeyeva O. (2017): Biomarkers of oxidative and nitro-oxidative stress: conventional and novel approaches. *Br J Pharmacol* **174**: 1771–1783.
- Cortese S., Tessari L (2017): Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) and Obesity: Update 2016. *Curr Psychiatry Rep* **19**: 4.
- Dalderup LM (1969): Body weight ratio of male and female rats reared on various diets in relation to food efficiency ratio and longevity. *Lab Anim* **3**: 119–127.
- Dröge W (2002): Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* **82**: 47–95.
- Edozien JC., Switzer BR (1977): Effects of Dietary Protein, Fat and Energy on Blood Hemoglobin and Hematocrit in the Rat. *J Nutr* **107**: 1016–1021.
- Eldin K., Abdelsalam A (2015): Lipoprotein Lipase , Amylase and Triglyceride Alteration : Lean Diabetic and Obese (Non-Diabetic) Patients. *Int J Sci Basic Appl Res* **23**: 95–103.
- Estaki M., DeCoffe D., Gibson DL (2014): Interplay between intestinal alkaline phosphatase, diet, gut microbes and immunity. *World J Gastroenterol* **20**: 15650–15656.
- Fernández-Sánchez A., Madrigal-Santillán E., Bautista M., Esquivel-Soto J., Morales-González Á., Esquivel-Chirino C. (2011): Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. *Int J Mol Sci* **12**: 3117–3132.
- Flanagan AM., Brown JL., Santiago CA., Aad PY., Spicer LJ., Spicer MT (2008): High-fat diets promote insulin resistance through cytokine gene expression in growing female rats. *J Nutr Biochem* **19**: 505–513.

- Fonseca-Alaniz MH., Brito LC., Borges-Silva CN., Takada J., Andreotti S., Lima FB (2007): High Dietary Sodium Intake Increases White Adipose Tissue Mass and Plasma Leptin in Rats. *Obesity* **15**: 2200–2208.
- Foot M., Cruz TF., Clandinin MT (1982): Influence of dietary fat on the lipid composition of rat brain synaptosomal and microsomal membranes. *Biochem J* **208**: 631–640.
- Fuemmeler BF., Østbye T., Yang C., McClernon FJ., Kollins SH (2011): Association between attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms and obesity and hypertension in early adulthood: a population-based study. *Int J Obes* **35**: 852–862.
- Giralt M., Villarroya F (2013): White, Brown, Beige/Brite: Different Adipose Cells for Different Functions? *Endocrinology* **154**: 2992–3000.
- Hall JE (2011). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology (12e)2011*
- Hsu CL., Yen GC (2007): Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. *Br J Nutr* **98**: 727–735.
- Huang B-W., Chiang M-T., Yao H-T., Chiang W (2004): The effect of high-fat and high-fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats. *Diabetes, Obes Metab* **6**: 120–126.
- Indumathy J., Pal GK., Pal P., Ananthanarayanan PH (2018): Contribution of insulin resistance to decreased baroreceptor sensitivity & cardiometabolic risks in pre-obesity & obesity. 151–158
- Junqueira L., Carneiro J (2007). *Basic Histology: Text & AtlasMcGraw-Hill Co*
- K. Abdelha MA., Abdelmotta S (2010): Biochemical Changes of Hemoglobin and Osmotic Fragility of Red Blood Cells in High Fat Diet Rabbits. *Pakistan J Biol Sci* **13**: 73–77.
- Kahn BB., Flier JS., Kahn BB., Flier JS (2000): Obesity and insulin resistance Find the latest version : Obesity and insulin resistance. **106**: 473–481.
- Kaliannan K., Hamarneh SR., Economopoulos KP., Nasrin Alam S., Moaven O., Patel P. (2013): Intestinal alkaline phosphatase prevents metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci* **110**: 7003–7008.
- Kempaiah RK., Srinivasan K (2006): Beneficial influence of dietary curcumin, capsaicin and garlic on erythrocyte integrity in high-fat fed rats. *J Nutr Biochem* **17**: 471–478.
- Kim Y., Iwashita S., Tamura T., Tokuyama K., Suzuki M (1995): Effect of high-fat diet on the gene expression of pancreatic GLUT2 and glucokinase in rats..pdf. *Biochem Biophysical Reserch Commun* **208**: 1092–1098.
- Kondo T., Hayakawa T., Shibata T., Sato Y., Toda Y (1988): Serum levels of pancreatic enzymes in lean and obese subjects. *Int J Pancreatol* **3**: 241–248.

- Kumar Chandra H., Mishra G., Sahu N., Kumar Nirala S., Bhadauria M (2018): Effect of rutin against high-fat diet and alcohol-induced alterations in hematological variables of rats. *Asian J Pharm Clin Res* **11**: 186.
- Kusmic C (2000): The antioxidant drug dipyridamole spares the vitamin E and thiols in red blood cells after oxidative stress. *Cardiovasc Res* **47**: 510–514.
- La Serre CB de., Ellis CL., Lee J., Hartman AL., Rutledge JC., Raybould HE (2010): Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Liver Physiol* **299**: G440–G448.
- Lecoutre S., Petrus P., Rydén M., Breton C (2018): Transgenerational Epigenetic Mechanisms in Adipose Tissue Development. *Trends Endocrinol Metab* **29**: 675–685.
- Lee Y-H., Mottillo EP., Granneman JG (2014): Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* **1842**: 358–369.
- Lelliott C., Vidal-Puig AJ (2004): Lipotoxicity, an imbalance between lipogenesis de novo and fatty acid oxidation. *Int J Obes* **28**: 22–28.
- Liu Z., Que S., Xu J., Peng T (2014): Alanine Aminotransferase-Old Biomarker and New Concept: A Review. *Int J Med Sci* **11**: 925–935.
- Lowrey OH., Rosebrough NJ., Farr AL., Randall RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265–275.
- Luppino FS., Wit LM de., Bouvy PF., Stijnen T., Cuijpers P., Penninx BWJH. (2010): Overweight, Obesity, and Depression. *Arch Gen Psychiatry* **67**: 220.
- Mahmoud AM (2013): Hematological alterations in diabetic rats - role of adipocytokines and effect of citrus flavonoids. *Excli j* **12**: 647–657.
- Mangge H., Almer G., Truschnig-Wilders M., Schmidt A., Gasser R., Fuchs D (2010): Inflammation, Adiponectin, Obesity and Cardiovascular Risk. *Curr Med Chem* **17**: 4511–4520.
- Maritim AC., Sanders RA., Watkins JB. (2003): Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *J Biochem Mol Toxicol* **17**: 24–38.
- Marques C., Meireles M., Norberto S., Leite J., Freitas J., Pestana D. (2016): High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte* **5**: 11–21.
- Milagro FI., Campión J., Martínez JA. (2006): Weight Gain Induced by High-Fat Feeding Involves Increased Liver Oxidative Stress. *Obesity* **14**: 1118–1123.
- Muoio DM., Newgard CB. (2008): Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 193–205.

- Nagy C., Einwallner E. (2018): Study of In Vivo Glucose Metabolism in High-fat Diet-fed Mice Using Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) and Insulin Tolerance Test (ITT). *J Vis Exp* 1–12
- Nakajima K. (2016): Low serum amylase and obesity, diabetes and metabolic syndrome: A novel interpretation. *World J Diabetes* **7**: 112.
- Noeman SA., Hamooda HE., Baalash AA. (2011): Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetol Metab Syndr* **3**: 17.
- Oh SW., Koo HS., Han KH., Han SY., Chin HJ (2017): Associations of sodium intake with obesity, metabolic disorder, and albuminuria according to age. *PLoS One* **12**: e0188770.
- Papakonstantinou E., Flatt WP., Huth PJ., Harris RBS (2003): High Dietary Calcium Reduces Body Fat Content, Digestibility of Fat, and Serum Vitamin D in Rats. *Obes Res* **11**: 387–394.
- Paradis S., Cabanac M. (2005): Calcium deficiency cannot induce obesity in rats. *Physiol Behav* **85**: 259–264.
- Patel RP., McAndrew J., Sellak H., White CR., Jo H., Freeman BA. (1999): Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* **1411**: 385–400.
- Peirce V., Carobbio S., Vidal-Puig A (2014): The different shades of fat. *Nature* **510**: 76–83.
- Saravanan G., Ponmurugan P., Deepa MA., Senthilkumar B (2014): Anti-obesity action of gingerol: effect on lipid profile, insulin, leptin, amylase and lipase in male obese rats induced by a high-fat diet. *J Sci Food Agric* **94**: 2972–2977.
- Sato-Mito N., Suzui M., Yoshino H., Kaburagi T., Sato K (2009): Long term effects of high fat and sucrose diets on obesity and lymphocyte proliferation in mice. *J Nutr Heal Aging* **13**: 602–606.
- Shabbir F., Hussain MM., Rajput TA. (2015): Obesity; effect of high fat diet followed by atorvastatin administration on serum interleukin-6, white blood cell and platelet count in male and female sprague-dawley rats. *Prof Med J* **22**: 683–688.
- Sharma U., Pal D., Prasad R (2014): Alkaline Phosphatase: An Overview. *Indian J Clin Biochem* **29**: 269–278.
- Somsak V., Jaihan U., Srichairatanakool S., Uthaiyibull C. (2013): Protection of renal function by green tea extract during Plasmodium berghei infection. *Parasitol Int* **62**: 548–551.
- Sun K., Kusminski CM., Scherer PE (2011): Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* **121**: 2094–2101.

- Talukdar S., Oh DY., Bandyopadhyay G., Li D., Xu J., McNelis J. (2012): Neutrophils mediate insulin resistance in high fat diet fed mice via secreted elastase. *Nat Med* **18**: 1407–1412.
- Tateya S., Kim F., Tamori Y. (2013): Recent Advances in Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* **4**: 1–14.
- Tietze F. (1969): Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione: Application to Mammalian Blood and Other Tissues. *Anal Biochem* **27**: 502–522.
- Toita R., Kawano T., Fujita S., Murata M., Kang J-H. (2017): Increased hepatic inflammation in a normal-weight mouse after long-term high-fat diet feeding. *J Toxicol Pathol* **31**: 43–47.
- Vijayakumar RS., Surya D., Nalini N. (2004): Antioxidant efficacy of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. *Redox Rep* **9**: 105–110.
- Weinberg JM. (2006): Lipotoxicity. *Kidney Int* **70**: 1560–1566.
- Werner J-U., Tödter K., Xu P., Lockhart L., Jähnert M., Gottmann P. (2018): Comparison of Fatty Acid and Gene Profiles in Skeletal Muscle in Normal and Obese C57BL/6J Mice before and after Blunt Muscle Injury. *Front Physiol* **9**: 1–14.
- Woods SC., Seeley RJ., Rushing PA., D'Alessio D., Tso P. (2003): A Controlled High-Fat Diet Induces an Obese Syndrome in Rats. *J Nutr* **133**: 1081–1087.
- Yu J., Yang J., Li M., Yang X., Wang P., Xu J. (2018): Protective effects of Chinese Fenggang zinc selenium tea on metabolic syndrome in high-sucrose-high-fat diet-induced obese rats. *Sci Rep* **8**: 3528.
- Zacchia M., Abategiovanni ML., Stratigis S., Capasso G. (2016): Potassium: From Physiology to Clinical Implications. *Kidney Dis* **2**: 72–79.

Životopis

Ime i prezime:

Martin Vargek

Datum rođenja:

9. svibnja, 1994., Zagreb (Hrvatska)

Obrazovanje:

2001. – 2009. – OŠ Braće Radića, Zagreb

2009. – 2013. – V. Gimnazija Zagreb

2013. – 2016. – Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, Biološki odsjek:
preddiplomski studij Biologije

2016. – 2019. – Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu - Biološki odsjek:
diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul: Fiziologija i imunologija

Laboratorijska stručna praksa:

2017. Biološki odsjek - Zoologijski zavod (pod vodstvom prof.dr.sc. Gordana Lacković
- Venturin)

Noć biologije:

2014. (Zavod za animalnu fiziologiju), 2015. (Zavod za molekularnu biologiju), 2016.
(Zavod za animalnu fiziologiju), 2017. (Zavod za animalnu fiziologiju), 2018. (Zavod
za animalnu fiziologiju)

Radno iskustvo:

2014.-2019. – edukator u Zoološkom vrtu Grada Zagreba (studentski posao)

2016.,2017.,2018. – demonstrator na kolegiju „Histologija i embriologija“