# UTJECAJ PREHRANE MAJKI I POTOMAKA NA MORFOLOŠKE ZNAČAJKE JAJNIKA, POTKOŽNOG I PERIGONADALNOG MASNOG TKIVA POTOMAKA SPRAGUE DAWLEY ŠTAKORA

**Čekić, Nenad**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2022**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:433893

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Nenad Čekić

# UTJECAJ PREHRANE MAJKI I POTOMAKA NA MORFOLOŠKE ZNAČAJKE JAJNIKA, POTKOŽNOG I PERIGONADALNOG MASNOG TKIVA POTOMAKA SPRAGUE DAWLEY ŠTAKORA

Doktorska disertacija

Osijek, 2022.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Nenad Čekić

# UTJECAJ PREHRANE MAJKI I POTOMAKA NA MORFOLOŠKE ZNAČAJKE JAJNIKA, POTKOŽNOG I PERIGONADALNOG MASNOG TKIVA POTOMAKA SPRAGUE DAWLEY ŠTAKORA

Doktorska disertacija

Osijek, 2022.

Mentorica rada: doc. dr. sc. Anđela Grgić, dr. med.

Komentor rada: izv. prof. dr. sc. Antonio Kokot, dr. med.

Rad ima 70 listova.

Zahvaljujem mentorici i komentoru na vođenju kroz proces izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem kolegama i suradnicima na pomoći.

Zahvaljujem obitelji na svesrdnoj podršci.

**SADRŽAJ**

**SADRŽAJ** ..... I
**Popis kratica** ..... III
**1. UVOD** ..... 1
1.1. Prehrana ..... 1
1.2. Pretilost ..... 2
1.2.1. Metabolički zdrava pretilost ..... 3
1.3. Masno tkivo ..... 4
1.3.1. Vrste masnog tkiva ..... 4
1.3.2. Tjelesna raspodjela bijelog masnog tkiva ..... 6
1.3.3. Metabolička i imunološka funkcija masnog tkiva ..... 7
1.3.4. Ekspanzija masnog tkiva ..... 8
1.4. Utjecaj masne prehrane na nastanak metaboličkih bolesti ..... 10
1.5. Utjecaj masne prehrane na reprodukciju ..... 12
1.6. Utjecaj majke na potomke – fetalno programiranje ..... 13
1.7. Životinjski modeli u istraživanju utjecaja prehrane na organizam ..... 14
**2. HIPOTEZA** ..... 15
**3. CILJ** ..... 16
**4. MATERIJALI I METODE** ..... 17
4.1. Ustroj studije ..... 17
4.2. Izolacija jajnika, potkožnog i perigonadalnog masnog tkiva te priprema za histološke analize ..... 20
4.3. Utvrđivanje cističnosti jajnika ..... 20
4.4. Utvrđivanje zastupljenosti kolagena u jajnicima ..... 21
4.5. Imunohistokemijsko bojenje jajnika na CD68 ..... 21
4.6. Imunohistokemijsko bojenje jajnika na TNF – α ..... 22
4.7. Histomorfometrija potkožnog i perigonadalnog masnog tkiva ..... 23
4.8. Statistička analiza ..... 24
**5. REZULTATI** ..... 26
5.1. Masa jajnika ..... 26
5.2. Cističnost jajnika ..... 27
5.3. Kolagen u stromi jajnika ..... 28
5.4. Imunohistokemijsko bojenje jajnika na CD68 ..... 30
5.5. Imunohistokemijsko bojenje na TNF-α ..... 32
5.6. Histomorfometrija potkožnog masnog tkiva ..... 34

5.7. Histomorfometrija perigonadalnog masnog tkiva ..... 36
**6. RASPRAVA** ..... 38
6.1. Masa jajnika ..... 38
6.2. Cističnost jajnika ..... 39
6.3. Kolagen u jajnicima potomaka ..... 40
6.4. CD68 i TNF-α u tkivu jajnika ..... 41
6.5. Histomorfometrija supkutanog i perigonadalnog masnog tkiva ..... 42
6.6. Intervencije koje smanjuju utjecaj masne prehrane na organizam te mogućnosti daljeg istraživanja ..... 45
**7. ZAKLJUČCI** ..... 47
**8. SAŽETAK** ..... 48
**9. SUMMARY** ..... 49
**10. LITERATURA** ..... 50
**11. ŽIVOTOPIS** ..... 69

## Popis kratica

| | |
|---|---|
| 17βHSD | 17 beta hidroksisteroid dehidrogenaza |
| CD | standardna laboratorijska hrana (prema engl. *control diet*) |
| CD68 | klaster diferencijacije 68 (prema engl. *cluster of differentiation* 68) |
| HDL | lipoprotein visoke gustoće (prema engl. *high density lipoprotein*) |
| HFD | hrana bogata zasićenim masnim kiselinama (prema engl. *high fat diet*) |
| IL6 | interleukin 6 |
| ITM | indeks tjelesne mase |
| Kiss 1 | kispeptin (prema engl. *kisspeptine*) |
| MAP kinaza | mitogenom aktivirana protein kinaza (prema engl. *mitogen – activated protein kinase*) |
| MCP 1 | monocitni kemotaktični protein 1 (prema engl. *monocyte chemoattractant protein 1*) |
| mRNA | glasnička ribonukleinska kiselina (prema engl. *messenger ribonucleic acid* ) |
| PCOS | sindrom policističnih jajnika (prema engl. *policystic ovary syndrome*) |
| PI3K | fosfoinozitid – 3 – kinazom (prema engl. *phosphoinositide 3 – kinase*) |
| PPARγ | agonist aktiviranog proliferiranog peroksisoma gama (prema engl. *peroxisome proliferator – activated receptor gamma*) |
| TLR | receptor sličan tollu (prema engl. *toll like receptor*) |
| TNF – α | faktor nekroze tumora alfa (prema engl. *tumor necrosis factor alpha*) |
| UCP1 | mitohondrijski protein razdvajanja 1 (prema engl. *uncoupling protein 1*) |

# 1. UVOD

## 1.1. Prehrana

Prehrana je biokemijski i fiziološki proces u kojem organizam koristi hranu za održavanje života. Uključuje unos, apsorpciju, asimilaciju, biosintezu, katabolizam i izlučivanje (1). Iako je tisućljećima poznato da je prehrana vrlo važna za ljudsko zdravlje, znanost o ljudskoj prehrani relativno je mlada. Otkrićem esencijalnih nutrijenata u prehrani ubrzano je znanstveno razumijevanje biokemijskih procesa i kompleksnih interakcija povezanih s tim nutrijentima. Klinička prehrana počela se razvijati kako bi pokazala utjecaje prehrane na sve organske sustave te pomogla u prevenciji i liječenju bolesti, uključujući kardiovaskularne bolesti, zloćudne bolesti, bolesti jetre, dijabetes, osteoporozu, plućne bolesti te brojne druge (2). Nakon što je nedvojbeno utvrđeno da način prehrane utječe na razvoj različitih bolesti, brojne znanstvene i stručne organizacije diljem svijeta počele su razvijati algoritme za javnozdravstveno djelovanje u cilju smanjivanja negativnih utjecaja nepravilne prehrane na zdravlje (3). U navedene aktivnosti bilo je potrebno uključiti genetska, mikrobiološka, epidemiološka, biokemijska, ekonomska i druga istraživanja, budući da je problem vrlo složen i multidisciplinaran. Nutritivna genomika je znanstvena disciplina koja na molekularnoj razini pokušava objasniti kako nutrijenti i druge bioaktivne komponentne hrane stupaju u interakciju s genima te kakav utjecaj ta interakcija ima na zdravlje pojedinca (4). Novije studije naglašavaju povezanost mikrobiote u crijevima s utjecajem prehrane na organizam (nutriepigenomika) (5).

Ovisno o regionalnoj raspodjeli, namirnicama koje prevladavaju u prehrani te navikama stanovništva, poznati su različiti tipovi prehrane. Primjerice, mediteranska prehrana sastavljena je većinom od ribe, mononezasićenih masnih kiselina iz maslinovog ulja, voća, povrća, cjelovitih žitarica, orašastih plodova te umjerene konzumacije alkoholnih pića. Dokazano je da mediteranska prehrana prevenira nastanak ili smanjuje posljedice srčanožilnih bolesti, karcinoma dojke, psihijatrijskih bolesti, karcinoma debelog crijeva, dijabetesa, pretilosti, astme, poremećaja spolne funkcije te brojnih drugih. Također, mediteranska prehrana poboljšava lipidni status, snižava razinu upalnih markera te odnos struka i bokova kao načina kvantifikacije pretilosti, a samim time i mjere ishoda u srčanožilnih incidenata kako u opservacijskim, tako i u randomiziranim kontroliranim studijama (6 – 8). Nasuprot mediteranskoj prehrani, tzv. zapadnjačka prehrana (engl. *Western diet*) sadrži veliku količinu zasićenih masnih kiselina i jednostavnih šećera. Osim toga sadrži i malu količinu voća i povrća, a veliku količinu natrija iz kuhinjske soli. Porcije su velike s velikom energetskom vrijednošću (9). Takav način prehrane

vodi u pretilost, a posljedično se razvijaju srčanožilne bolesti, maligne bolesti, šećerna bolest tipa 2, poremećaji reproduktivne funkcije, kognitivni poremećaji, poremećaji imunološkog sustava (10 – 12).

U razvijenim društvima uvriježeno je mišljenje da su negativni utjecaji prehrane na organizam samo posljedica prekomjernog unosa određenog tipa nutritivnog izvora energije. Međutim, brojni su negativni utjecaji manjkavog kalorijskog unosa. On može biti posljedica svjesnog gladovanja koje za cilj ima smanjenje prekomjerne tjelesne težine (13), ali može biti i posljedica psihičke bolesti (bulimija, anoreksija) (14), tjelesne bolesti (15) ili niskih socijalnih uvjeta (16,17). Nedovoljno zadovoljavanje nutritivnih potreba može se očitovati kroz glad, malnutriciju, hiponutriciju, majčinsku pothranjenost, dječje zaostajanje u rastu, dječje gladovanje ili deficijenciju mikronutrijenata (18). Posljedice nedovoljne prehrane vidljive su na svim organskim sustavima. Narušava se crijevna mikrobiota, dolazi do propadanja mišićnog tkiva, smanjuje se organska i mineralna gustoća kosti, razvijaju se hematološki poremećaji poput anemije. Katabolizam vodi u nakupljanje kiselih metabolita, narušena je imunološka obrana organizma te su osobe sklonije infekcijama (19,20). Problem gladi nije ekskluzivno vezan samo za ekonomski nerazvijene zemlje Afrike, nego se s istim problemom suočava i sve veći broj siromašnih stanovnika ekonomski razvijenih zemalja Zapada (19).

Javnozdravstvenim aktivnostima pokušavaju se ustrojiti smjernice za pravilnu prehranu. One sadržavaju savjete o uravnoteženom unosu prehrambenih namirnica, pravilan vremenski tijek njihovog unosa te redovitu tjelovježbu (21, 22). U siromašnim zemljama razvijaju se inicijative za borbu protiv gladi i malnutricije, posebno u djece, čime se značajno smanjuje pobol i mortalitet (23).

## 1.2. Pretilost

Pretilost možemo definirati kao stanje prekomjernog ili ekstremnog nakupljanja masnog tkiva s posljedičnim narušavanjem zdravlja jedinke (24). Prekomjerna tjelesna masa (engl. *overweight*) i pretilost (engl. *obesity*) pripadaju skupini najvećih javnozdravstvenih problema današnjice. Posljednjih godina neprestano se primjećuje povećanje njihove učestalosti pa se smatra da u razvijenim zapadnim zemljama čak 40 % stanovnika ima prekomjernu tjelesnu masu, a 13 % je pretilo (25).

Pretilost nije jedinstven poremećaj, već predstavlja heterogenu skupinu stanja različitih uzroka koji rezultiraju pretilim fenotipom. Pretilost uključuje složene etiološke veze između genetskih, metaboličkih i neuralnih karakteristika s jedne strane te ponašanja, prehrambenih navika, tjelesne aktivnosti i socijalno – kulturnih činitelja s druge strane (26, 27). Također,

predstavlja i podlogu za razvoj kroničnih bolesti s najvećom prevalencijom u modernom društvu, poput koronarne srčane bolesti, hipertenzije, hiperlipidemije, različitih vrsta zloćudnih bolesti te drugih poremećaja zdravlja. Endokrinološke promjene povezane su s metaboličkim bolestima i neplodnošću, a respiratorni problemi rezultiraju apnejom u snu, hipoventilacijom, aritmijama i ponekad posljedičnim srčanim zatajenjem. Pretilost, dakle, nije samo socijalna stigma nego i bolest s teškim posljedicama za pojedinca i velikim troškovima za društvo (28). Višak makronutrijenata u masnom tkivu služi kao poticaj za oslobađanje upalnih medijatora poput faktora nekroze tumora alfa (TNF-α) i interleukina 6 (IL-6) te smanjuje proizvodnju adiponektina, predisponirajući upalno stanje i oksidativni stres. Prevencija nastanka pretilosti trebala bi biti prioritet djelovanja javnog zdravstva, a ona mora započeti još od ranog djetinjstva, pa čak i prije toga, kako bi se što ranije spriječila pojava svih posljedica na zdravlje pojedinca i cijele zajednice.

### 1.2.1. Metabolički zdrava pretilost

Koncept metabolički zdrave pretilosti razvio se iz zapažanja Jeana Vaguea iz 1950 – ih da pojedinci s pretilošću imaju različitu predispoziciju za dijabetes i aterosklerozu, što bi moglo biti povezano s raspodjelom tjelesne masti (29). Metabolički zdrava pretilost podrazumijeva da podskupina pretilih pojedinaca može biti lišena srčanožilnih i metaboličkih čimbenika rizika koji obično prate pretile osobe s disfunkcijom masnog tkiva i inzulinskom rezistencijom, poznatom kao metabolički sindrom ili fenotip metabolički nezdrave pretilosti.

Među autorima postoje različiti stavovi o pojedinim fenotipskim parametrima koji definiraju ovaj poremećaj. Međutim, većina njih prihvatila je da se radi o pacijentima s indeksom tjelesne mase (ITM) > 30kg/m$^2$, sistoličkom tlaku nižem od 140 mmHg, dijastoličkom tlaku nižem od 90 mmHg, glukozom u krvi nižom od 7 mmol/l, koncentracijom triglicerida nižom od 1,7 mmol/l, vrijednostima lipoproteina velike molekularne mase (engl. *high density lipoprotein*, HDL) većom od 1 mmol/l te isključivanjem korištenja antihipertenziva, antidijabetika i hipolipemika iz redovite terapije (30,31). Metabolički zdrave pretile osobe također imaju manji volumen visceralne masti, manju količinu masti u jetri, veću količinu masti na ekstremitetima te su tjelesno aktivnije (32). Čini se da pojedinci s metabolički zdravom pretilošću imaju bolju funkciju masnog tkiva i osjetljiviji su na inzulin, što naglašava središnju ulogu funkcije masnog tkiva u metaboličkom zdravlju (33,34). Dok odsutnost metaboličkih abnormalnosti može smanjiti rizik od dijabetesa tipa 2 i srčanožilnih bolesti kod metabolički zdravih osoba u usporedbi s nezdravim osobama s pretilošću, on je još uvijek veći u usporedbi sa zdravim osobama normalne tjelesne mase.

Čini se da je metabolički zdrava pretilost prijelazni fenotip između urednih metaboličkih funkcija i metaboličkog sindroma u nezdravoj pretilosti. Većina metabolički zdravih pretilih osoba kroz vrijeme razviju barem neke od bolesti iz skupine metaboličkog sindroma (35). Osobe s metabolički zdravom pretilošću mogu se naći u bilo kojoj dobnoj skupini, ali s porastom dobi pokazalo se da je prevalencija metabolički zdrave pretilosti sve niža (31). Čak 30 % žena u predmenopauzi s metabolički zdravom pretilošću razvit će metaboličke i srčanožilne bolesti do postmenopauze. Taj podatak sugerira da promjene u spolnim hormonima mogu igrati ulogu u prijelazu između metabolički zdrave u metabolički nezdravu pretilost (36). Muškarci su skloniji ranijoj tranziciji ka metabolički nezdravoj pretilosti, vrlo vjerojatno zbog izostanka zaštitnog učinka ženskih spolnih hormona. U mlađih osoba moguće je dugotrajnije održati stanje metabolički zdrave pretilosti. Također, manje izražena pretilost ima bolje prognostičke karakteristike (37). Metabolički zdrava pretilost predstavlja model za proučavanje mehanizama koji povezuju pretilost s kardiometaboličkim komplikacijama. Osim toga, može poslužiti i kao jedan od ciljeva u tijeku liječenja pretilosti, budući da je poznato da je liječenje pretilosti vrlo složeno i mukotrpno te zahtijeva multidisciplinarni pristup (38). Cilj liječenja pretilosti ne bi trebao biti samo gubitak na tjelesnoj težini nego bi trebalo težiti poboljšanju metaboličkih parametara. Kod metabolički zdravih pretilih osoba samo umjereni gubitak tjelesne težine može metaboličke parametre dugotrajno održavati urednima (34).

### 1.3. Masno tkivo

Znanstvenici su tijekom povijesti masno tkivo dugo smatrali samo pasivnim skladištem energije, bez važnije metaboličke funkcije. Unazad nekoliko desetljeća, intenziviranjem istraživanja u području histologije i fiziologije masnog tkiva, postalo je jasno da je ono aktivan metabolički i endokrini organ (39). Iako masne stanice, odnosno adipociti, čine više od 90 % volumena masnog tkiva, u ukupnom broju stanica unutar masnog tkiva sudjeluju s manje od 50 % . Ostatak stanica u masnom tkivu čine prekursori adipocita, endotelne stanice, imunološke stanice, fibroblasti te brojne druge stanice (40). Sve te komponente funkcioniraju zajedno kao dobro regulirani sustav.

#### 1.3.1. Vrste masnog tkiva

Na temelju mikroskopskih karakteristika, masno tkivo možemo podijeliti na bijelo, smeđe, bež i ružičasto masno tkivo (41). Osim temeljem morfologije, navedena tkiva međusobno se razlikuju i svojim funkcionalnim karakteristikama.

Bijelo masno tkivo najzastupljeniji je tip masnog tkiva. Svoj naziv duguje makroskopskom izgledu vrlo svijetlog žutog tkiva (42). Kada se općenito govori o masnom

tkivu, u pravilo se misli na bijelo masno tkivo. Karakteristike masnog tkiva opisane u daljim odjeljcima ove disertacije odnosit će se na bijelo masno tkivo i isto će se nazivati samo masnim tkivom osim ako nije drukčije naglašeno. Ostale vrste masnog tkiva bit će spomenute te ukratko opisane radi razumijevanja histologije i fiziologije masnog tkiva u cjelini.

Adipociti bijelog masnog tkiva su stanice s unilokularnim masnim kapljicama u citoplazmi. Oni su velike sferične stanice različitog promjera (od 10 μm do više od 100 μm u ljudi, a u glodavaca oko 30 % manje). Jezgra stanice potisnuta je periferno. Citoplazma čini samo uski rub oko masne kapljice te sadrži organele. Najvidljivija organela je mitohondrij (41).

Smeđi adipociti imaju manju površinu nego bijeli, njihova citoplazma sadrži više masnih vakuola, okruglu jezgru i mnogobrojne, velike, sferične mitohondrije. U njihovim mitohondrijima nalazi se mitohondrijski protein razdvajanja 1, UCP1 (engl. *uncoupling protein 1*), koji osigurava termogenetsku ulogu smeđih adipocita, što i jest primarna uloga smeđeg masnog tkiva (43). Smeđe masno tkivo najzastupljenije je u malih sisavaca u interskapularnoj, subskapularnoj, aksilarnoj i cervikalnoj regiji, a također i u ingvinalnoj, periaortalnoj i interrenalnoj regiji (44).

Zbog anatomskih posebnosti ljudskog tijela (različitih odnos veličine i površine tijela nego kod malih sisavaca) u ljudi nalazimo manji postotak smeđeg masnog tkiva (45). Novorođenčad posjeduje relativno veću količinu smeđeg masnog tkiva zbog većih zahtjeva za termogenezom te se ono većinom nalazi interskapularno, na vratu, aksilarnim regijama te nešto manje retrosternalno te duž kralježnice (46). U odrasloj dobi dolazi do smanjenja relativne količine smeđeg masnog tkiva te ono ostaje nazočno u malim količinama perivaskularno, oko srca, traheje i bronha te u plućnom hilusu, oko jednjaka, poprečnog mezokolona te u velikom omentumu. Potkožno smeđe masno tkivo nalazi se između prednjih mišića vrata te u supraklavikularnim udubinama, infraklavikularno, u aksilama, ingvinalnim regijama te na prednjoj trbušnoj stijenci (47) . Svakako valja napomenuti da jasne anatomske granice između smeđeg i masnog tkiva ne postoje pa se tako u mnogim regijama tijela mogu mikroskopski identificirati pomiješani bijeli i smeđi adipociti (48).

Bež adipociti su inducibilni oblik termogenih adipocita koji se sporadično nalaze unutar depoa bijelog masnog tkiva. Slično kao smeđi adipociti, bež adipociti posjeduju obilne mitohondrije i multilokularne kapljice lipida (48). Nastanak bež adipocita u bijelom masnom tkivu snažno je induciran uvjetima okoline i vanjskim poticajima, uključujući kronično privikavanje na hladnoću, tjelovježbu, dugotrajno liječenje agonistima aktiviranog proliferiranog peroksisoma gama (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* PPARγ) ili agonistima β3 – adrenergičkih receptora, kaheksija kod malignih bolesti i ozljeda

tkiva. Taj se fenomen često naziva „posmeđenjem“ bijelog masnog tkiva (49). Bež masno tkivo privuklo je pozornost znanstvenika iz dva razloga. Prvo, njegovi razvojni procesi služe kao jedinstveni model za bolje razumijevanje načina na koji čimbenici okoliša kontroliraju sudbinu stanice. Drugi razlog leži u njegovoj važnosti u odraslih jedinki, tj. njegovog obećavajućeg potencijala za razvoj novih terapeutskih ciljeva u liječenju pretilosti i drugih metaboličkih poremećaja (50).

Za vrijeme trudnoće te tijekom dojenja, potkožni bijeli adipociti u dojci pretvaraju se u žlijezde koje proizvode mlijeko formirane od elemenata bogatih lipidima te se mogu definirati kao ružičasti adipociti. Dakle, bijeli adipociti u ovom procesu poprimili su karakteristike visokosecernirajućih stanica, dobili nove organele, morfološki se značajno izmijenili. Postali su primjer alveolarnih žljezdanih stanica kakve je moguće vidjeti i u mnogih drugih žlijezda s vanjskim izlučivanjem. Nakon dojenja, ružičasti adipociti podliježu apoptozi te bivaju zamijenjeni bijelim adipocitima (51). Opisani prelazak iz jedne forme adipocita u drugu najbolji je primjer plastičnosti masnog tkiva.

### 1.3.2. Tjelesna raspodjela bijelog masnog tkiva

Kod ljudi postoje tri glavna anatomska depoa masnog tkiva: potkožni depo gornjeg dijela tijela, potkožni depo donjeg dijela tijela te visceralni depo. Visceralni depo može se dalje podijeliti na omentalni, mezenterijalni, retroperitonealni, perigonadalni te perikardijalni. Potkožni depo gornjeg dijela tijela kategorizira se ovisno nalazi li se površinski ili dublje od površinske potkožne fascije (lat. *fascia superficialis*) i on se prvenstveno nalazi u području trbuha. Stražnjica i bedra čine potkožno masno tkivo depoa donjeg dijela tijela koji se još naziva i gluteofemoralnim depoom (52).

Poput ljudi, masno tkivo kod glodavaca je organ s više depoa. Za razliku od ljudi, potkožno masno tkivo kod glodavaca čine dva potkožna masna jastučića smještena sprijeda i straga. Prednji jastučić nalazi se između lopatica, na vratu i u aksilama. Stražnji jastučić naziva se još i ingvinalnim jastučićem te se nalazi u području lumbalne i glutealne regije (48). Položajem je ingvinalni masni jastučić usporediv s gluteofemoralnim depoom kod ljudi. Između potkožnog i kožnog masnog tkiva kod glodavaca nalazi se tanki sloj glatkih mišića, dok je kod ljudi ono u kontinuitetu s kožnim masnim tkivom (53).

U glodavaca je visceralno masno tkivo raspodijeljeno u perigonadalnoj regiji (epididimalno kod mužjaka i periovarijsko u ženki), oko bubrega te u mezenteriju. Mezenterijalno masno tkivo u glodavaca smatra se najsličnijim intraabdominalnom masnom tkivu u ljudi po lokalizaciji i biologiji. Taj depo nije dobro proučen zbog otežane kirurške

manipulacije te velike količine krvnih žila koje otežavaju istraživanje (53) . Perigonadalno masno tkivo najdostupnije je te se zbog toga ono najčešće koristi u istraživanjima visceralnog masnog tkiva u glodavaca. Ljudi nemaju analogno masno tkivo perigonadalnom te postoje sugestije da se ovo tkivo treba smatrati „perivisceralnim“ masnim tkivom. Također, u glodavaca ne postoji ili je tek neznatno razvijeno omentalno masno tkivo (52,54).

Povećana količina visceralnog masnog tkiva povezana je s nastankom dijabetesa, poremećaja lipidnog metabolizma i drugih metaboličkih bolesti (55). Normalna količina potkožnog masnog tkiva povezana je s očuvanom osjetljivošću na inzulin i smanjenim rizikom razvoja dijebetesa tipa 2 i ostalih metaboličkih bolesti (56).

Zaključno, iako je masno tkivo organ s više depoa i kod ljudi i kod glodavaca, postoje anatomske razlike koje treba uzeti u obzir.

### 1.3.3. Metabolička i imunološka funkcija masnog tkiva

Masno tkivo kao vrlo aktivan endokrini organ luči mnoštvo različitih tvari koje sudjeluju u metaboličkim, endokrinim i imunološkim procesima u organizmu (39). Općenito ih možemo podijeliti na proteine koji imaju metaboličke efekte na udaljene stanice i tkiva te na enzime uključene u metabolizam steroidnih hormona (57).

Prvi protein za kojeg je dokazano da je produkt lučenja masnog tkiva bio je leptin. Leptin se luči proporcionalno masi masnog tkiva i prehrambenom statusu, ali je njegovo lučenje regulirano i preko brojnih drugih sustava. Njegovo lučenje povećavaju inzulin, glukokortikoidi, TNF-α i estrogeni, a smanjuju androgeni, slobodne masne kiseline, beta adrenergička aktivnost, hormon rasta i drugi (58). Najvažnije je djelovanje leptina održavanje energetske homeostaze. Preko centralnih sustava kontrole on je zapravo signal dostatnosti energije i u stanjima sitosti njegovo se lučenje smanjuje (59). Osim toga, leptin sudjeluje u regulaciji menstruacijskog ciklusa, regulira razinu lučenja glukokortikoida, djeluje na imunološki sustav, hematopoezu, angiogenezu i izgradnju kosti (39). Zbog svog iznimno važnog djelovanja na mnoge sustave u organizmu, leptin predstavlja prototip za sve endokrine hormone porijekla masnog tkiva (60). Nadalje, važni proteinski derivati masnog tkiva su proupalni citokini TNF-α i IL-6. U masnom tkivu luče ih adipociti i stromovaskularne stanice. Njihove koncentracije koreliraju s pretilošću i smatra se da su važni činitelji u nastanku inzulinske rezistencije i pretilosti. Koncentracije im opadaju sa smanjenjem tjelesne mase (61). Oni su dokaz tzv. tihe upale u organizmu koja je jedna od osnovnih karakteristika pretilosti (62). Sljedeći važan protein kojega luče zreli, diferencirani adipociti je adiponektin. Lučenje adiponektina veće je u supkutanom nego u visceralnom masnom tkivu. Koncentracija adiponektina snižena je kod pretilih osoba i

dijabetičara pa se smatra da hipoadiponektinemija sudjeluje u patofiziologiji ovih stanja (61). Ukupno gledano, adiponektin je jedini hormon porijekla masnog tkiva s antidijabetičkim, protuupalnim i antiaterogenim djelovanjem (63). Opisani su i brojni drugi proteinski hormoni porijekla masnog tkiva uključeni u homeostatske endokrinološke mehanizme (rezistin, adipsin, renin, angiotenzin, inhibitor aktivatora plazminogena i mnogi drugi), ali njihova detaljna analiza prelazi okvire ovog rada.

Iako nadbubrežna žlijezda i gonade služe kao primarni izvor cirkulirajućih steroidnih hormona, masno tkivo sadrži pregršt enzima za aktivaciju, pretvorbu i inaktivaciju steroidnih hormona. Budući da masno tkivo zauzima veliki postotak tjelesne mase, ono pridonosi velikim udjelom sintezi steroidnih hormona pa tako masno tkivo sintetizira 100 % estrogena postmenopauzalnih žena i 50 % testosterona u premenopauzalnih žena (60). Spolni steroidi također su uključeni u postojanje dismorfične raspodjele masnog tkiva kod muškaraca i žena te raspodjele masnog tkiva ovisno o dobi. Tako premenopauzalne žene teže nakupljanju u donjim dijelovima tijela i to u potkožnom skladištu masnog tkiva, a muškarci i postmenopauzalne žene imaju povećanu količinu masnog tkiva u području abdomena (64). Dva su najvažnija enzima uključena u metabolizam steroidnih hormona citokrom P450 – ovisna aromataza i 17β-hidroksisteroid dehidrogenaza (17 – βHSD). Oba ova enzima dobro su eksprimirana u stromalnim stanicama masnog tkiva i preadipocitima. Citokrom P450 – ovisna aromataza katalizira konverziju androgena u estrogene: androstendion u estron i testosteron u estradiol. Enzim 17 – βHSD katalizira konverziju slabijih androgena i estrogena u njihove potentnije produkte: androstendion u testosteron i estron u estradiol (60). Poremećaji u funkciji ovih enzima porijeklom iz masnog tkiva ubrajaju se u najvažnije patofiziološke čimbenike nastanka kroničnih hiperandrogenih anovulacija, od kojih je najčešći sindrom policističnih jajnika (PCOS) i vode u posljedičnu neplodnost (65).

### 1.3.4. Ekspanzija masnog tkiva

Količina masnog tkiva može se povećavati na dva načina: rastom broja masnih stanica ili hiperplazijom te porastom volumena postojećih masnih stanica ili hipertrofijom. Ravnoteža između ova dva načina porasta količine masnog tkiva odražava njegovu morfologiju. Masno tkivo s manjim brojem adipocita većeg volumena naziva se hipertrofičnim, dok se masno tkivo s većim brojem adipocita malog volumena naziva hiperplastičnim (66). Genetika i prehrana doprinose prevagi jednog od ovih dvaju oblika ekspanzije (67). Hipertrofično masno tkivo povezuje se s nastankom poremećaja osjetljivosti na inzulin, dijabetesa i srčanožilnih bolesti (68). Nasuprot tome, hiperplastično masno tkivo povezano je s povoljnijim metaboličkim

parametrima (69). Centralni tip pretilosti karakteriziran je većom količinom hipertofičnih adipocita, dok je periferni tip pretilosti karakteriziran većim brojem adipocita normalnog volumena, što je dokaz da se ekspanzija masnog tkiva događa hiperplazijom (70). Te spoznaje sugeriraju da morfologija masnog tkiva ima važan utjecaj za rizik od razvoja bolesti.

Hiperplazija adipocita predstavlja nastanak novih adipocita iz progenitornih stanica. Sposobnost stvaranja novih masnih stanica putem adipogeneze kritična je determinanta zdrave distribucije i remodeliranja masnog tkiva (71). Nuklearni hormonski receptor PPARγ je glavni regulator diferencijacije adipocita. On se eksprimira u stanicama prekursorima adipocita ili preadipocitima. U istraživanju na miševima, jedinke kojima nedostaje PPARγ imale su smanjenu ili odsutnu mogućnost akumulacije triglicerida u stanice te su bili rezistentni na inzulin. PPARγ može pokrenuti diferencijaciju adipocita iz fibroblasta ili drugih stanica mezenhimalnog podrijetla (72,73).

De novo adipogeneza povezana je s dobi, načinom prehrane i trajanjem prehrane, a također i s depoom masnog tkiva. Kim i sur. tijekom istraživanja na miševima dokazali su da je kod mladih miševa povećan unos hrane povećao adipogenezu, a kod odraslih miševa hiperplazija je dokazana samo u visceralnom masnom tkivu i to nakon dugotrajnog hranjenja hranom s visokim udjelom masti (74).

Hipertrofija adipocita dominantan je mehanizam ekspanzije masnog tkiva u odrasloj dobi. U slučaju povećanog energetskog unosa, dolazi do akumulacije lipida unutar adipocita te do povećanja njihovog volumena. Osim što akumuliraju višak lipida, adipociti hipertrofijom štite ostatak organizma od lipotoksičnosti (75). Korelacija između hipertrofije adipocita i metaboličke bolesti ovisi o prethodnim uvjetima u organizmu. Tako mršave jedinke s adipocitima manjeg volumena eksprimiraju lošiji metabolički odgovor na prekomjerno hranjenje što sugerira da kod mršavih ljudi krupniji adipociti djeluju zaštitno i mjera su kapaciteta za akumulaciju lipida. Međutim, kod pretilih osoba adipociti rastu preko tzv. hipertofičnog praga iznad kojeg je prekoračen kapacitet adipocita da akumulira lipide što dovodi do ektopičnog taloženja lipida u perifernim tkivima (76). Dakle, ekstremna hipertrofija adipocita u pretilosti povezana je metaboličkim bolestima kako u laboratorijskih životinja, tako i u ljudi. Ukoliko adipociti narastu na promjer veći od 100 μm, difuzija kisika u adipocite postaje otežana, aktivira se oksidativni stres te lokalna upala i posljedična metabolička disfunkcija (77). Hipertrofija adipocita visceralnog masnog tkiva povezana je s dislipidemijom neovisno o tjelesnoj konstituciji i distribuciji masnog tkiva u žena (78). Sami procesi koji reguliraju hipertrofiju adipocita nedovoljno su razjašnjeni.

Prekomjerno taloženje ekstracelularnog matriksa u obliku fibroze obilježje je masnog tkiva u pretilosti, a nekoliko istraživanja pokazalo je obrnutu srazmjernost između veličine adipocita i fibroze. Navedeno otkriće sugerira ulogu fibroze u negativnoj regulaciji hipertrofije adipocita (74). Točnu ulogu fibroze masnog tkiva u metaboličkim bolestima potrebno je dodatno istražiti. Muir i sur. svojim istraživanjem postavili su model po kojem je smanjena fibroza u metaboličkoj bolesti povezana s arhitektonikom tkiva koja dopušta hipertrofiju adipocita i ograničava hiperplaziju preadipocita, što rezultira rastom postojećih adipocita koji postaju metabolički oštećeni (79).

### 1.4. Utjecaj masne prehrane na nastanak metaboličkih bolesti

Posljednjih je godina kronična prekomjerna prehrana, poput konzumacije hrane s visokim udjelom masti, prepoznata kao značajan rizični faktor za bolesti poput dijabetesa i određene vrste malignih bolesti. Mehanizmi kojima masna prehrana uzrokuje negativne učinke još uvijek nisu potpuno objašnjeni.

Masna prehrana inducira upalu niskog intenziteta u cijelom organizmu. Razine endotoksina (primjerice lipopolisaharida), cirkulirajućih slobodnih masnih kiselina i medijatora upale su povišene kao odgovor na masnu prehranu, rezultirajući sustavnom upalom niskog intenziteta i izmijenjenom homeostazom u mnogim organima poput masnog tkiva, pankreasnih otočića, mišića, mozga, krvnih žila, jetre, crijeva (80,81). Promjene u crijevnoj mikrobioti uzrokovane masnom prehranom te izravni učinci slobodnih masnih kiselina na stanice sluznice crijeva mogle bi biti prvi korak u razvoju kronične sustavne upale (82). Pojedinci čija su crijeva bogatija bakterijskom florom manje izražavaju pretili fenotip te je kod njih razina mastima inducirane upale niža nego u onih sa siromašnijom bakterijskom florom u crijevima (83). Promjena u crijevnoj mikrobioti aktivira signalni put receptora sličnih Tollu (engl. *Toll – like receptors*, TLR) što vodi većoj propusnosti stanica sluznice crijeva za endotoksine i posljedično translokaciji endotoksina u cirkulaciju (84). Dodatno, povećana količina slobodnih masnih kiselina izravno djeluje na intestinalne stanice. Povišena razina endotoksina i slobodnih masnih kiselina potiče pojačanu proizvodnju proupalnih citokina (IL – 1β, IL – 6, i TNF – α) u crijevu. Drugi korak u razvoju sustavne upale moguće je da se sastoji od ulaska navedenih tvari u sustavnu i portalnu cirkulaciju te konačno do sustavne upale niskog intenziteta (85). Povišene plazmatske koncentracije slobodnih masnih kiselina i lipopolisaharida mogu povisiti regulacijski prag TLR-a u cirkulirajućih makrofaga omogućujući njihovu aktivaciju (M1 fenotip) i proizvodnju proupalnih citokina u cirkulaciji (84).

Masna prehrana vodi u inzulinsku rezistenciju (86). Čak i kratkotrajna izloženost masnoj prehrani mijenja prag inzulinske osjetljivosti te vodi u slabiju toleranciju glukoze (87). Poremećaj se događa i na razini beta stanica gušterače gdje proupalni citokini negativno djeluju na lučenje inzulina (88). Sve navedeno vodi nastanku dijabetesa tipa 2.

Unos hrane bogate mono- i polinezasićenim masnim kiselinama povezane su s nižim rizikom od srčanožilnih bolesti i smrti, dok unos trans – masti i zasićenih masnih kiselina značajno povećava rizik od srčanožilnih bolesti (89). Masna prehrana u kombinaciji s povećanim unosom ugljikohidrata još više povećava rizik od smrti kao posljedice srčanožilnih bolesti (90). Aterosklerotske promjene inducirane masnom prehranom događaju se kako na koronarnim arterijama, tako i na aorti i perifernim arterijama (91,92). U stijenkama krvnih žila te u perivaskularnom masnom tkivu dolazi do nakupljanja efektorskih T stanica (93). Time sustavna upala doprinosi i patološkim promjenama stijenke krvnih žila. Dolazi i do smanjenja funkcije dušikovog oksida (NO) te smanjenja elastičnosti krvnih žila (94).

Masna prehrana povezana je i s višom incidencijom upalnih bolesti crijeva. Razvoju upalnih bolesti crijeva ne doprinosi samo sustavna upala niskog intenziteta nego i lokalna disfunkcija tkiva (95). Povećana učestalost Crohnove bolesti u razvijenim zemljama razmjerna je povećanju potrošnje masti u prehrani (96). Dolazi do upale stijenke crijeva te do poremećaja u crijevnoj mikrobioti u smislu prerastanja sluznice crijeva bakterijama koje podržavaju upalu kao što su rodovi *Firmicutes* i *Proteobacteria* (97). Također, masna prehrana povećava rizik od razvoja sindroma iritabilnog crijeva kao najčešćeg funkcionalnog poremećaja crijeva u modernom društvu (98).

Upala u mnogim moždanim strukturama poput hipotalamusa, hipokampusa, amigdale, moždane kore i moždanog debla povezana je s masnom prehranom. To dovodi do kognitivnog slabljenja, poremećaja u ponašanju pa čak i Alzheimerove bolesti (99). Kognitivni deficit induciran masnom prehranom može biti povezan i s oksidativnim stresom (100). Također, inzulinska rezistencija ima za posljedicu nepravilno iskorištavanje glukoze u mozgu (101).

Dokazana je povezanog masne prehrane s razvojem različitih vrsta malignih bolesti. Čak i bez razvoja pretilog fenotipa, osim sustavne upale, tumorigenezu potiče i lokalno i sustavno povećana ekspresija faktora rasta (102). Masna prehrana povećava rizik od pojave nealkoholnog steatohepatitisa koji može rezultirati razvojem hepatocelularnog karcinoma (103). U istraživanjima nastanka karcinoma dojke, povećan unos masti u prehrani rezultirao je povišenom razinom proangiogenog faktora monocitnog kemotaktičnog proteina I (engl. *Monocyte chemotactic protein* I, MCP – 1). Time je povećana mikrovaskularna gustoća u tkivu dojke što uzrokuje proliferaciju stanica tkiva dojke uz rizik za nekontrolirano dijeljenje i

nastanak karcinoma (104). Epidemiološka istraživanja pokazala su da je mast iz prehrane kritični čimbenik rizika za rak želuca (105,106). Akumulacija masti u stanicama sluznice želuca te disregulacija staničnog ciklusa stanicama sluznice želuca daje karakteristike matičnih stanica koje se nekontrolirano dijele. Za ovakav scenarij karcinogeneze u sluznici želuca odgovorni su signalni putovi regulirani leptinom, beta kateninom i fosfoinozitid – 3 – kinazom (engl. *Phosphoinositide 3 – kinase,* PI3K) (107).

### 1.5. Utjecaj masne prehrane na reprodukciju

Masna prehrana utječe na reproduktivnu funkciju u oba spola. Za istraživanje utjecaja načina prehrane na reproduktivnu funkciju korišteni su različiti životinjski modeli, poput štakora, ovaca, zečeva ili čovjekolikih majmuna (108,109). Vrlo često u istraživanjima korišten je model PCOS koji uključuje kronične anovulacije, hiperandrogenizam te sliku cističnosti u tkivu jajnika (110). U ovoj doktorskoj disertaciji težište je stavljeno na histološku sliku jajnika te se nisu istraživale hormonske karakteristike PCOS. Patel i sur. su istraživali utjecaj masne prehrane na indukciju PCOS u štakorica te su dokazali da su štakorice hranjene masnom hranom imale manji broj žutih tijela, velik broj velikih, cističnih folikula te zadebljanje folikularnog zida. Sve navedeno za posljedicu ima nepravilne i izostale ovulacije (111,112).

Masna prehrana neovisno o kalorijskom unosu interferira s normalnim reproduktivnim ciklusom i uzrokuje funkcionalnu insuficijenciju žutog tijela (113). U miševa je masna prehrana reducirala folikulogenezu u fazi primordijalnog i Graafovog folikula i oštetila kvalitetu oocite (114). U našem ranijem istraživanju dokazali smo da je masna prehrana rezultirala nepravilnim reproduktivnim ciklusom, težim zanošenjem, smanjenim brojem živorođenih potomaka te lošijim preživljenjem potomaka (115). Svi navedeni rezultati studija konzistentni su u zaključcima da iza poremećaja reproduktivne funkcije u jedinki hranjenih masnom hranom stoji sustavna upala niskog intenziteta. Skaznik – Wikiel i sur. pokazali su na štakorskom modelu povišene razine proupalnih citokina, povećanu infiltraciju makrofaga u tkivu jajnika neovisno o pretilosti (116). Hohos i sur. pronašli su brojne gene koji su pokazali sniženu ekspresiju, a uključeni su u normalnu funkciju jajnika, uključujući ovulaciju, luteinizaciju i luteolizu (117). Unutar jajnika opisana je povećana infiltracija imunoloških stanica i ekspresija gena za proupalne citokine (118). Gao i sur. pokazali su da je u jajnicima miševa hranjenih masnom hranom ekspresija TNF – α značajno veća nego u kontrolnoj skupini te navedeno povezali s pojačanom aktivacijom signalizacije posredovane s nuklearnim faktorom kB i mitogenom aktiviranom protein kinazom (engl. *mitogen – activated protein kinase*, MAP) (119). I istraživanja povezanosti prehrambenih navika u ljudi s reproduktivnom funkcijom pokazala su

da žene koje u prehrani koriste više masti imaju veću pojavnost funkcionalnih cista jajnika te je na temelju toga izdana javnozdravstvena preporuka za smanjivanje prehrambenog unosa masti kod žena reproduktivne dobi (120).

### 1.6. Utjecaj majke na potomke – fetalno programiranje

Prenatalni razvoj prepoznat je kao kritično razdoblje u etiologiji ljudskih bolesti (121). To je osobito tako kada je nepovoljna okolina u interakciji s genetskom predispozicijom. Koncept fetalnog programiranja sugerira da nutritivna neravnoteža majke i metabolički poremećaji mogu imati trajni i međugeneracijski učinak na zdravlje potomstva i na rizik od bolesti kao što su pretilost, dijabetes i kardiovaskularne bolesti (122). Barkerova hipoteza postulira da niz organa i njihovih funkcija podliježe programiranju tijekom embrionalnog i fetalnog života, što predstavlja polaznu točku za fiziološke i metaboličke odgovore koji se prenose u odraslu dob (123). Stoga, svaki podražaj ili ozljeda u kritičnom razdoblju embrionalnog i fetalnog razvoja može rezultirati razvojnim prilagodbama koje proizvode trajne strukturne, fiziološke i metaboličke promjene, čime pojedinca predisponiraju na kardiovaskularne, metaboličke i endokrine bolesti u odraslom životu (124).

Promjene endokrinih, nutritivnih i kardiovaskularnih uvjeta u placenti majke utječu na ekspresiju fetalnog genoma tako da se isti može prilagoditi tijekom razvoja. Fetalni genom tako određuje potencijal za intrauterini rast, ali stvarni rast određen je prvenstveno učincima okoliša (što kod fetusa čini placenta) od kojih je najbitnija prehrana (125). Fetalno programiranje može utjecati na gensku ekspresiju na više razina, a Cunningham i sur. raspodjeljuju navedene utjecaje u nekoliko skupina (126):

1. Genski utisak (metilacija DNA/remodelacija kromatina)
2. Promjena u gustoći receptora na i u stanici
3. Promjene u strukturi organa i tkiva
4. Ponovno postavljanje hormonskih osovina
5. Promijenjen odgovor na stres

U raspravi o fetalnom programiranju, većinom se spominje malnutricija majke zbog manjka energetskog unosa. No, fetalno programiranje može biti potaknuto i prevelikim energetskim unosom čime se bavi sve više novih istraživanja, posebno na životinjskim modelima (127,128), a takav primjer je i ova doktorska disertacija.

U današnje vrijeme zdravlje fetusa smatra se važnijim nego ikad zbog trendova niske stope nataliteta i kasnog rađanja. Razumijevanje uloge i mehanizma fetalnog programiranja, što

ima negativan utjecaj na fetalno zdravlje kao i na zdravlje u budućnosti, ima veliku akademsku važnost za pronalaženje strategija intervencije u populaciji.

### 1.7. Životinjski modeli u istraživanju utjecaja prehrane na organizam

Prospektivno istraživanje utjecaja promjene prehrane roditelja na metaboličke karakteristike potomaka u ljudi problematično je iz više razloga. Prvo, nemoguće je kontrolirano hraniti velike skupine ljudi. Nadalje, potrebno je previše vremena da bi se mogle vidjeti promjene nastale kao posljedica promjene prehrane. Također, etički je neprihvatljivo na ljudima raditi istraživanja koja bi im uskraćivala osnovna prava na redovitu i raznovrsnu prehranu. Stoga, kod istraživanja pretilosti u pravilu se koriste animalni modeli, najčešće štakorski. Štakori imaju prosječan životni vijek od dvije do tri godine pa su promjene inducirane prehranom brzo vidljive (129). Također, moguće je fleksibilno planirati studije u skladu s etičkim načelima i normama te kontrolirati broj jedinki.

Pri istraživanju takozvane zapadnjačke prehrane, obično se životinje hrane putem dva pristupa. U prvom se koristi prehrana s visokim udjelom masnoća, dok se u drugom životinje hrane hranom s visokim udjelom masnoća i ugljikohidrata. Oba ova načina prehrane dizajnirana su kako bi u životinja „imitirali“ prehrambene navike ljudi u modernim kulturama. (130).

Također, koriste se i mišji modeli u kojima je muturan gen za leptinski receptor i to najčešće u obliku heterozigota. U tih miševa nema centralne kontrole uzimanja hrane u mozgu, a ženke su tijekom trudnoće sklonije razvoju pretilosti. Tjelesna masa njihovih potomaka također je veća nego tjelesna masa u kontrolnim skupinama zbog promjena u genotipu (131). Ovakve su mutacije rijetke kod čovjeka pa se rezultati ovakvih studija teže mogu translatirati na ljudsku vrstu. Stoga je u istraživanjima utjecaja prehrane i pretilosti na zdravlje bolje koristiti modifikaciju načina prehrane koji rezultiraju poremećajima koji se u ljudi klasificiraju kao metabolički sindrom (132).

# 2. HIPOTEZA

Masna prehrana majki Sprague Dawley štakora te izmjena tipa prehrane među generacijama utječu na histološke i imunohistokemijske promjene jajnika, potkožnog i perigonadalnog masnog tkiva potomaka.

# 3. CILJ

Cilj ovog istraživanja je ispitati postoje li razlike u niže navedenim obilježjima ženskih potomaka štakora ovisno o prehrani majki i međugeneracijskoj promjeni prehrane:

- masi jajnika
- pojavnosti cističnih formacija u jajnicima
- količini kolagena u jajnicima
- izražaju TNF – α i CD68 u tkivu jajnika
- veličini i broju adipocita po jedinici površine potkožnog i perigonadalnog masnog tkiva

# 4. MATERIJALI I METODE

## 4.1. Ustroj studije

Istraživanje je provedeno u obliku randomiziranog kontroliranog pokusa (133).

Deset ženki Sprague Dawley štakora (lat. *Rattus norvegicus*) nasumično je podijeljeno u dvije skupine u dobi od devet tjedana. Za jednostavnu randomizaciju korišten je generator slučajnih brojeva dostupan na mrežnim stranicama te je tim postupkom svaka štakorica imala jednaku priliku pripasti jednoj od dviju skupina (134). Svaka životinja označena je kombinacijom slova i brojeva što je činilo jedinstven kod koji je korišten pri randomizaciji, kao i u ostatku istraživanja.

Nakon podjele, za ishranu jedne skupine štakorica korištena je standardna mješavina hrane za laboratorijske životinje (Mucedolla, Italija) (CD skupina, n = 5), a za ishranu druge skupine štakorica korištena je hrana s većim udjelom zasićenih masnih kiselina (Žito d. o. o., Hrvatska) (HFD skupina, n = 5). U izradi dijete bogate zasićenim masnim kiselinama tehničkim savjetima i podrškom sudjelovao je prehrambeni tehnolog Tomislav Ivanković iz tvrtke Žito d. o. o. . Navedena hrana proizvedena je u skladu s uputama o proizvodnji laboratorijske hrane uz kontrolirane uvjete proizvodnje. Također, poštovani su standardi izrade propisani zakonima Europske Unije i Republike Hrvatske (Narodne novine br. 135/06, 37/13, 125/13, članak 40). Smjesa hrane korištena kao hrana bogata zasićenim masnim kiselinama kreirana je po uzoru na tzv. „zapadnjačku“ prehranu s visokim udjelom masti (35 % – 58 %). Pažljivo je učinjen i izbor samih masnih kiselina kojima je u kreiranoj masnoj dijeti izvor palmino ulje (koje sadrži i do 50 % zasićenih masnih kiselina), dok im je u kontrolnoj dijeti izvor sojino ulje sa znatno većim udjelom nezasićenih masnih kiselina (gotovo 60 %). Zasićene masne kiseline iz prehrane u ranije objavljenim studijama jedan su od osnovnih uzroka pretilosti i inzulinske rezistencije te bolesti koje se javljaju kao posljedica iste (135).

Sastav prehrane korištene u istraživanju naveden je u tablici 4. 1.

U dobi od 15 tjedana štakorice su sparene s istim mužjakom. Tim postupkom u najvećoj mogućoj mjeri smanjen je utjecaj mužjaka na rezultate studije te je postignuta veća genetska sličnost među potocima. Nakon skotnosti koja u štakora traje 21 dan te poroda, legla svake štakorice smanjena su na jednak broj potomaka (n = 12). Time je smanjen utjecaj brojnosti legla na rezultate istraživanja.

Tablica 4.1. Sastav prehrane kod hranjenja štakora korištenih u istraživanju

| **Udio namirnice u hrani (%)** | **CD*** | | **HFD†** |
|---|---|---|---|
| | Do 14. tjedna starosti | Od 14. tjedna starosti | |
| **Složeni ugljikohidrati** | 53,7 | 66,5 | 30 |
| **Biljni proteini** | 30,5 | 18,2 | 27,2 |
| **Životinjski proteini** | 4,7 | 3,5 | |
| **Mješavina stočne hrane** | 3,0 | 7,5 | 9,7 |
| **Vitamini i minerali** | 4,1 | 3,2 | 3,9 |
| **Masti (sojino ulje)** | 1,4 | 0,4 | 28 |
| **Aminokiseline** | 0,1 | 0,1 | 0,1 |

* Standardna laboratorijska hrana
† Hrana bogata zasićenim masnim kiselinama

U većini štakorskih modela laktacija je ograničena na tri tjedna (136). Nakon laktacije u navedenom vremenu, učinjena je randomizacija potomaka unutar skupina majki i to tako da su potomci unutar svake skupine majki podijeljeni u dvije podskupine gdje je jedna podskupina potomaka hranjena standardnom laboratorijskom hranom, a druga podskupina hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama:

1) Skupina CD – CD – majka i potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom
2) Skupina CD – HFD – majka hranjena standardnom laboratorijskom hranom, a potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama
3) Skupina HFD – CD – majka hranjena hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama, a potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom
4) Skupina HFD – HFD – majka i potomci hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama

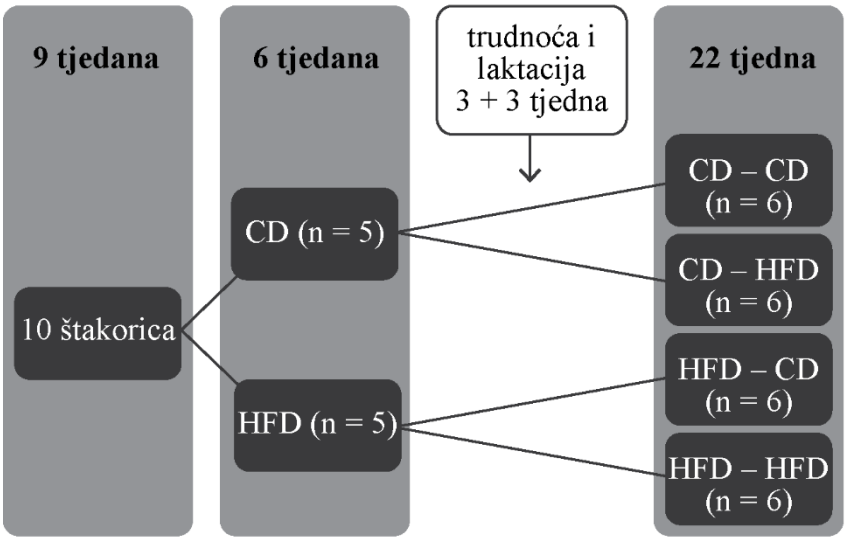
Svaka štakorica bila je smještena u odvojenom kavezu u prostorima Vivarija Medicinskog fakulteta Osijek. Uvjeti držanja bili su kontrolirani uz temperaturu u prostoriji od 22°C i pravilnu izmjenu svjetla i tame u ciklusima od 12 sati. Štakorice hranjene standardnom laboratorijskom hranom imale su neograničen pristup hrani i svježoj vodi dok su skupine majki i potomaka koji su hranjeni hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama hranjene

kontrolirano dva puta dnevno, u 9 i 16 sati, u cilju sprječavanja nastanka pretilog fenotipa kao posljedice povećanog kalorijskog unosa (137).

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/21-08/07, Ur. broj: 2158-61-07-21-179) i Ministarstava poljoprivrede (klasa: UP/I-322-01/11-01/150, Ur. broj: 525-06-1-0255/12-2). Poštovane su Europske direktive o skrbi o laboratorijskim životinjama. Uzgoj životinja i istraživanje proveli su asistenti Katedre za anatomiju i neuroznanost Medicinskog fakulteta Osijek licencirani za istraživanja na životinjskim modelima. Istraživanje je provedeno uz poštivanje svih načela zaštite dobrobiti laboratorijskih i pokusnih životinja te su istraživači odgovorno i maksimalno za životinje poštedno (koliko načela istraživanja toleriraju) pristupali laboratorijskim životinjama, a sve s ciljem smanjivanja nepotrebne boli i patnje. Životinje su prema konceptu „5 sloboda“ bile lišene gladi i žeđi, neudobnosti, ozljeda, straha i stresa.

U dobi od 22 tjedna učinjeno je žrtvovanje životinja. Za tu namjenu korištena je injekcija kombinacije ketamina u dozi 75 mg/kg i midazolama u dozi od 0,5mg/kg.

Na Slici 4.1. shematski je prikazan protokol uzgoja štakora za ovo istraživanje.




**Slika 4.1**. Shematski opis protokola uzgoja štakora. 10 štakorica u dobi 9 tjedana podijeljeno je u dvije skupine (CD – štakorice hranjene standardnom laboratorijskom hranom te HDF – štakorice hranjene masnom hranom) te su hranjene pripadajućim tipom prehrane. Nakon trudnoće, okota i laktacije potomci su podijeljeni u 4 skupine ovisno o tipu prehrane (CD – CD – majka i potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom; CD – HFD – majka hranjena standardnom laboratorijskom hranom, a potomci hranjeni masnom hranom; HFD – CD – majka hranjena masnom hranom, a potomci hranjeni standardnom laboratorijskim hranom; HFD – HFD – majka i potomci hranjeni masnom hranom. Potomci su žrtvovani u dobi od 22 tjedna.

### 4.2. Izolacija jajnika, potkožnog i perigonadalnog masnog tkiva te priprema za histološke analize

Nakon žrtvovanja štakora na prethodno opisan način, isti su položeni na podlogu za izvođenje kirurških procedura. Korišten je čist, ali nesterilan kirurški pribor i instrumenti. U položaju životinje na leđima, učinjena je medijana laparotomija. Preparacijom kroz slojeve trbušne stijenke pristupilo se u trbušnu šupljinu. U području donjeg dijela trbušne šupljine identificirani su lijevi i desni jajnik, izolirani, vagani su vagom (Beurer KS, Peking, NR Kina) i stavljeni u fiksativ, 4 %-tni paraformaldehid.

Potkožno masno tkivo izolirano je iz ingvinalne regije. Nakon reza na koži, izoliran je blok masnog tkiva dimenzija oko 3 x 3 x 3 mm te stavljen u fiksativ – 4 %-tnom paraformalidehidu.

Perigonadalno masno tkivo izolirano je iz periovarijalnog prostora. Nakon izolacije jajnika, ispreparirano je i u bloku izuzeto periovarijalno masno tkivo dimenzija oko 3 x 3 x 3 mm. Isto je nakog toga pohranjeno u fiksativ – 4 %-tni paraformaldehid.

Nakon fiksacije učinjen je standardni postupak obrade i pripreme histoloških preparata koji se sastojao u dehidraciji tkiva pomoću rastućih koncentracija etanola kroz određeno vrijeme: 70 %-tni etanol kroz 10 minuta, 80 %-tni etanol kroz 10 minuta, 96 %-tni etanol kroz 10 minuta te 100 %-tni etanol kroz 10 minuta. Nakon što je provedena dehidracija slijedilo je uklapanje preparata u parafinske blokove.

### 4.3. Utvrđivanje cističnosti jajnika

Parafinski blokovi s tkivom jajnika rezani su mikrotomom Leica RM550 (Leica, Beč, Austrija) na rezove debljine 6 µm. Uzimani su prvi i drugi rez jajnika te je nakon devet odbačenih serijskih rezova uzet deseti rez, a nakon toga svaki deseti rez do kraja preparata. Prilikom rezanja mikrotomom, dio preparata nanesen je i na adhezivna predmetna stakalca (DAKO, Glostrup, Danska) za predstojeće imunohistokemijske analize jajnika. Preparati su postavljeni na predmetna stakalca te je učinjena deparafinizacija i rehidracija potapanjem preparata u sljedeće otopine: 100 %-tni ksilol dva puta kroz 10 minuta, 100 %-tni etanol dva puta kroz 10 minuta, 70 %-tni etanol kroz 15 minuta, destilirana voda kroz 10 minuta. Tako pripremljeni preparati premješteni su u kadice te je provedeno standardno histološko bojenje hemalaunom i eozinom. Uz pomoć specijalista patologije pregledani su histološki preparati obojani hemalaunom i eozinom te je utvrđivana pojavnost cista u jajnicima. Cistom jajnika proglašena je histološka slika šupljine omeđene jednim slojem granuloza stanica bez prisutnosti jajne stanice na serijskim rezovima istog jajnika (138). Nalazi na rezovima jajnika tumačeni su binarno, opservirana je prisutnost ili odsutnost cističnih formacija u jajnicima.

### 4.4. Utvrđivanje zastupljenosti kolagena u jajnicima

Za utvrđivanje zastupljenosti fibroze u jajnicima korišteno je histološko bojenje pikrosirijus crvenilo. Navedeno bojenje specifično crvenom bojom boji kolagen u histološkom preparatu. Parafinski blokovi rezani su i deparafinizirani i rehidrirani na način kao i kod pripreme za bojenje hemalaun eozin koji je prethodno opisan. Zatim su preparati uronjeni u Pikrosirijus otopinu za bojenje (0,1 %-tni Sirius Red F3BA u zasićenoj vodenoj otopini pikrinske kiseline) 1 sat na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, stakalca su isprana tri puta u otopini 0,5 %-tne hladne octene kiseline. Zatim su preparati dehidrirani korištenjem 100 %-tnog etanola, uronjene u histolen i fiksirani. Stakalca su sušena preko noći. Za potrebe procjene zastupljenosti kolagena u stromi jajnika, učinjene su mikrofotografije četiriju nasumično odabranih područja strome jajnika pomoću svjetlosnog mikroskopa Zeiss Axioskop 2 MOT (Carl Zeiss Microscopy, NY, SAD) te kamere Olympus DP70 (Olympus, Tokyo, Japan) pričvršćene na mikroskop. Sve su slike snimljene pod povećanjem 200 x. Program ImageJ (NIH, LOCI, Unversity of Wisconsin) korišten je za kvantificiranje područja pozitivno obojenog tkiva jajnika iznad praga koji je postavljen na temelju najintenzivnijeg obojenja kolagena u snimljenim fotografijama. U računalnom programu ručno su isključena iz kvantifikacije područja veziva u krvnim žilama. Rezultati su prikazani kao postotak površine tkiva strome jajnika koje je zahvaćen kolagenom (139).

### 4.5. Imunohistokemijsko bojenje jajnika na CD68

CD68 je jako glikozilirani protein visoko izražen u makrofagima i drugim mononuklearnim fagocitima. Tradicionalno, CD68 se koristi kao vrijedan citokemijski marker za imunobojenje monocita/makrofaga u histokemijskoj analizi upaljenih tkiva, tumorskih tkiva te u drugim imunohistopatološkim pretragama. CD68 se uglavnom nalazi u endosomskom/lizosomskom odjeljku, ali se može naći i na površini stanice (140).

Imunistokemijsko bojenje na CD68 provedeno je na Katedri za patologiju i sudsku medicinu Medicinskog fakulteta Osijek u uređaju Ventana Benchmark Ultra (Ventana Medical System inc., Arizona, SAD). Navedeni sustav automatizirano provodi bojenje tkiva na način sličan onom kod ručnog bojenja kapilarno automatski nakapavajući sve potrebne otopine i protutijela. Sav postupak bojenja računalno je kontroliran i pogreška pri bojenju pritom je smanjena na minimum. Za bojenje na CD68 korišten je Ultra View Universal DAB Detection kit (LOT GR3230929-1) kompatibilan s uređajem. U kitu se nalaze sljedeće otopine koje se u pojedinačnim dispenzorima umeću u aparat: UltraView Universal DAB Inhibitor (3 %-tni

$H_2O_2$), UltraView Universal HRP Multimer, UltraView Universal DAB Chromogen (0,2 %-tni DAB), UltraView BAB $H_2O_2$ (0,4 %-tni $H_2O_2$) te UltraView Universal DAB Copper.

Na početku postupka svako je stakalce obilježeno posebnim barkodom koji je pridružen ranije izabranim oznakama pojedine životinje. Parafinski rezovi postavljeni na predmetno stakalce automatizirano su deparafinizirani uz pomoć EZ Prep koncentrata razrijeđenog u omjeru 1:10, postavljenog u spremnik i u uređaju pumpom nanesenog na preparat. Nakon deparafinizacije preparati su ispirani razrijeđenim puferom za reakcije. Reakcijski pufer razrijeđen je destiliranom vodom u omjeru 1:9 te je uliven u spremnik iz kojeg je uređaj povlačio otopinu. UltraView Universal DAB Inhibitor korišten je za inhibiciju endogene peroksidaze kroz 10 minuta nakon čega su preparati isprani puferom. Kako bi razotkrio antigene (mjesta vezivanja protutijela u tkivu) uređaj automatski nakapava Ultra Cell conditioner 1 kroz pola sata nakon čega se preparat ponovno ispire puferom. Na tako pripremljene preparate ukapano je primarno monoklonalno IgG protutijelo miša anti – CD68 (Confirm anti – CD68, Ventana Medical System, Inc., Arizona, SAD) razrijeđeno u omjeru 1 : 200 u trajanju od 30 minuta. Ponovno su preparati isprani puferom. Kako si se pojačalo razotkrivanje veznih mjesta antigen – protutijelo korišten je Ultraview Universal HRP Multimer, a potom je preparat još jednom ispran u puferu. Vezna mjesta markirana su pomoću Ultra View DAB Chromogena i Ultra View Universal DAB Coppera kroz 6 minuta, a zatim je ponovno uslijedilo ispiranje u puferu. Tako pripremljeni preparati obojeni su hemalaunom, isprani destiliranom vodom, rehidrirani rastućim nizom alkohola od 70 %-tnog do apsolutnog alkohola, izbistreni zamjenom ksilena i pokriveni pokrovnim stakalcima.

Za potrebe utvrđivanja broja CD68 pozitivnih stanica po kvadratnom milimetru preparata, učinjene su mikrofotografije šest nasumično odabranih područja jajnika pomoću svjetlosnog mikroskopa Zeiss Axioskop 2 MOT (Carl Zeiss Microscopy, NY, SAD) te kamere Olympus DP70 (Olympus, Tokyo, Japan) pričvršćene na mikroskop. Sve su slike snimljene pod povećanjem 400x. Jedno vidno polje pokrivalo je površinu od približno 0,17 $mm^2$.

### 4.6. Imunohistokemijsko bojenje jajnika na TNF – α

Faktor nekroze tumora alfa (TNF–α) je proupalni citokin koji stvaraju monociti/makrofagi za vrijeme upalnog procesa te sudjeluje u brojnim signalnim događajima unutar stanica, koji dovode do nekroze ili apoptoze. Protein je također važan za otpornost na infekcije i malignu transformaciju (141). Dokazano je da TNF–α u jajnicima uzrokuje apoptozu oocite i smanjenje broja zdravih folikula (142).

Imunohistokemijsko bojenje na TNF–α provedeno je na Katedri za patologiju i sudsku medicinu Medicinskog fakulteta Osijek na istom uređaju i po istim načelima kao i bojenje na CD68. Za samo dokazivanje TNF–α korišteno je primarno poliklonalno zečje anti – TNF–α protutijelo (ab66579, Abcam Cambridge, Ujedinjeno kraljevstvo) te sekundarno konjugirano kozje anti – zečje IgG H&L (HRP) protutijelo (ab97051, Abcam Cambridge, Ujedinjeno kraljevstvo).

Za utvrđivanje intenziteta bojenja TNF–α, učinjene su mikrofotografije šest nasumično odabranih područja jajnika pomoću svjetlosnog mikroskopa Zeiss Axioskop 2 MOT (Carl Zeiss Microscopy, NY, SAD) te kamere Olympus DP70 (Olympus, Tokyo, Japan) pričvršćene na mikroskop. Sve su slike snimljene pod povećanjem 400x.

Intenzitet imunohistokemijskog bojanja na TNF–α prikazan je semikvantitativnom metodom. Upotrijebljena je skala intenziteta od rasponu od 0 do 3 gdje je s 0 označen izostanak imunohistokemijskog obojenja, brojem 1 je označen slab intenzitet obojenja, brojem 2 srednji intenzitet, a brojem 3 jak intenzitet obojenja. Pomoću svjetlosnog mikroskopa preparati su analizirani od strane tri istraživača, a statistička analiza izvršena na temelju srednje vrijednosti mjerenja.

### 4.7. Histomorfometrija potkožnog i perigonadalnog masnog tkiva

Parafinski blokovi su rezani na rezove debljine 6 μm mikrotomom Leica RM550 (Leica, Vienna, Austrija). Preparati su naneseni na predmetna stakalca te bojani histološkom bojom hemalaun i eozin. Preparati su zatim mikroskopirani pomoću svjetlosnog mikroskopa Olympus BX-50 (Olympus, Tokio, Japan) te snimljeni kamerom Olympus C-5050 (Olympus, Tokyo, Japan) pričvršćenom za mikroskop i povezanom s računalom. Analiza je izvršena na mikroskopskim fotografijama s povećanjem od 200 x.

Analiza je provedena na standardnim histološkim rezovima pomoću besplatnog softvera za analizu fenotipa i morfometriju tkiva i stanica CellProfiler v.4.2.1. (Anne E. Carpenter, Thouis R. Jones, Lee Kamentsky). Cijela analiza pomoću navedenog softvera sastoji se od nekoliko faza, s ciljem izdvajanja rubnih obrisa pojedinih adipocita te mjerenja površine svake stanice.

U prvoj fazi slika histološkog preparata u boji pretvara se u sliku u skali sivih tonova. Ukoliko nakon te faze pojedine susjedne stanice imaju jednak intenzitet sive boje, intezitet boje u jednoj od njih se dodatno pojačava.

U drugoj fazi slijedila je identifikacija adipocita. Program sadrži modul „*Primary Object Identification*“ unutar kojeg je moguće podesiti parametre za prepoznavanje određenog objekta, prag intenziteta i promjer.

Preliminarnim mjerenjem utvrđeno je da su dimenzije adipocita u rasponu između 20 i 220 piksela te su te vrijednosti uzete kao prag za promjer. Svi objekti izvan tog raspona nisu ulazili u analizu. Za prag intenziteta određeni su intenziteti za pozadinu i za prvi plan da bi se isključilo vezivo, krvne žile te tkivo koje se ne sastoji samo od adipocita. U slučaju da je program prepoznao pojedinačni adipocit kao dva ili više, posebnim programskim modulom „dvodijelni“ i „trodijelni“ adipociti spojeni su u jedan.

U završnoj fazi izvršeno je mjerenje pojedinih adipocita pomoću modula „*Object Size/Shape Measurement*“. Primarno su rezultati mjerenja izraženi u pikselima, a zatim su pomoću izvornog mikrografa s mikrometrom pretvoreni u kvadratne mikrometre ($\mu m^2$). Dijeljenjem ukupnog broja adipocita na pojedinom preparatu s ukupnom površinom adipocita dobiven je broj adipocita po jedinici površine.

Na kraju su adipociti podijeljeni u 10 skupina po rasponu površine na sljedeći način:

1. Površina do 1999 $\mu m^2$
2. Površina od 2000 – 2999 $\mu m^2$
3. Površina od 3000 – 3999 $\mu m^2$
4. Površina od 4000 – 4999 $\mu m^2$
5. Površina od 5000 – 5999 $\mu m^2$
6. Površina od 6000 – 6999 $\mu m^2$
7. Površina od 7000 – 7999 $\mu m^2$
8. Površina od 8000 – 8999 $\mu m^2$
9. Površina od 9000 – 9999 $\mu m^2$
10. Površina $\geq$10000 $\mu m^2$

Za potkožno i perigonadalno masno tkivo izračunat je postotak adipocita koji se nalazi u pojedinoj od navedenih skupina.

### 4.8. Statistička analiza

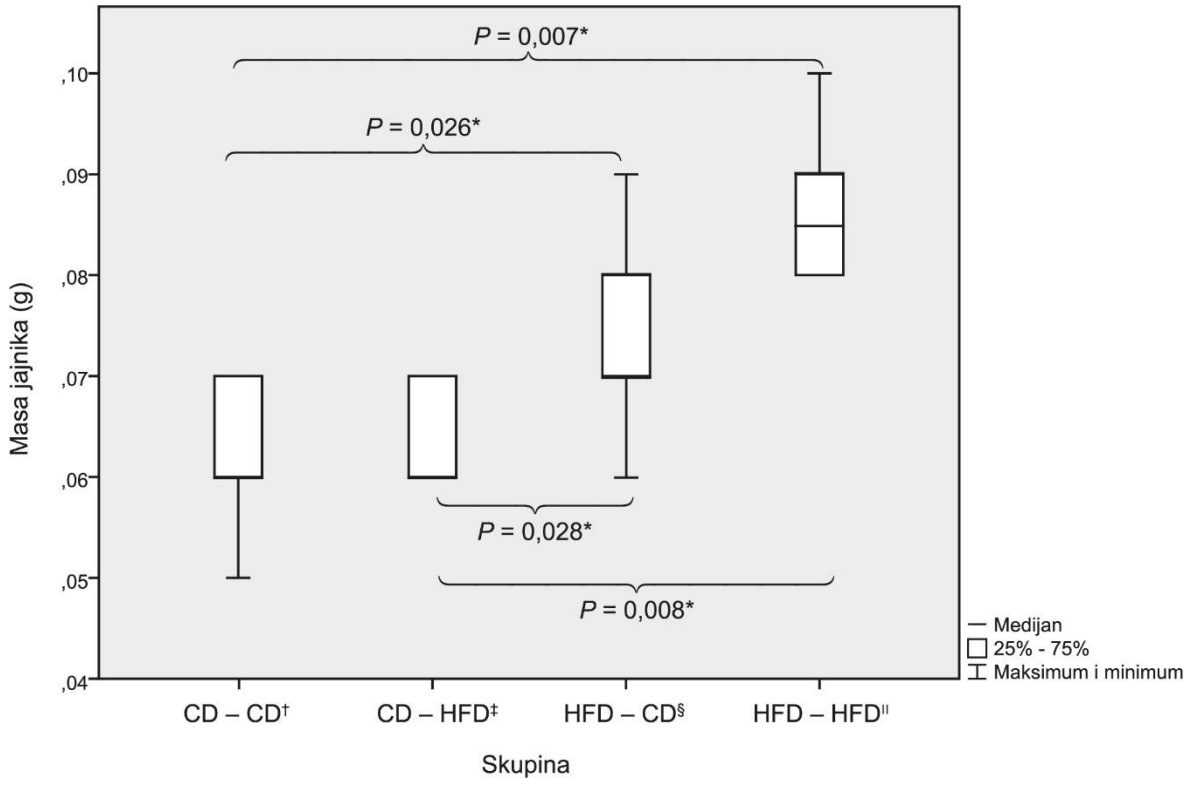
Za uočavanje efekta od 0,25+/-0,1 uz $\alpha$ = 0,05 i snagu testa 0,8 izračunata je veličina uzorka od najmanje 5 životinja po skupini. Za tu namjenu korišten je besplatno dostupan računalni program (Sigma Plot inačica 11.0, Systat Software, Inc., San Jose, CA 95110 USA). Za testiranje normalnosti raspodjele korišten je Shapiro – Wilkov test. Numerički podaci

prikazani su medijanom i interkvartilnim rasponom, a za grafički prikaz korišteni su Whisker – bar grafovi. Raspodjela veličina adipocita u razredima i skupinama prikazana je stupičastim grafikonom. Zbog malog uzorka i asimetrične raspodjele, za analizu podataka korišteni su neparametrijski testovi. Mann – Whitnijev U test upotrijebljen je za testiranje dviju nezavisnih skupina. Za usporedbu triju ili više nezavisnih uzoraka korišten je s Kruskal – Wallisov test. Razina statističke značajnosti određena je za vrijednosti $P < 0.05$. Za analizu podataka korišten je računalni program IBM SPSS Statistics v25.0.

# 5. REZULTATI

## 5.1. Masa jajnika

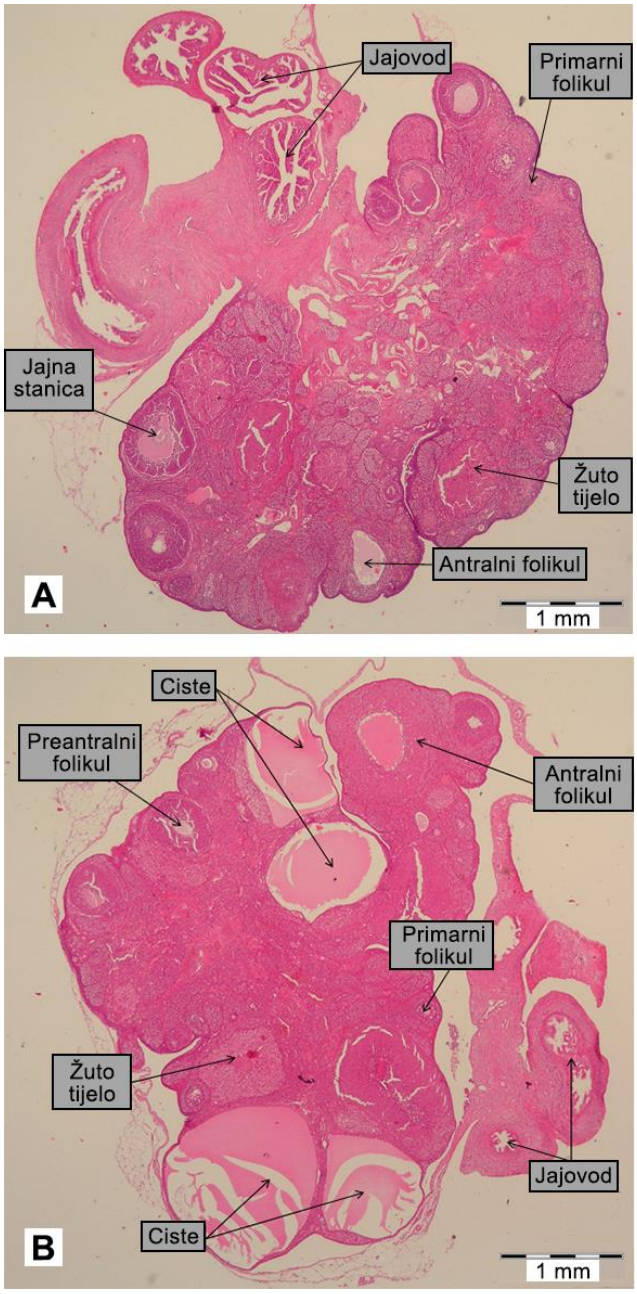
Najveća masa jajnika izmjerena je u skupini HFD – HFD (0,085 (0,075 – 0,0925) g). Najmanja masa jajnika izmjerena je u skupini CD – CD (0,06 (0,0575 – 0,070) g). U skupini CD – HFD masa jajnika je iznosila 0,06 (0,06 – 0,07) g. U skupini HFD – CD masa jajnika je iznosila 0,08 (0,0675 – 0,0825) g. Kruskal – Wallisovim testom pokazana je statistički značajna razlika u masama jajnika među skupinama ($P$ = 0,004). *Post hoc* analizom utvrđeno je da je masa jajnika u skupinama CD – CD i CD – HFD statistički značajno manja nego u skupinama HFD – CD i HFD – HFD. Slika 5.1.




**Slika 5.1**. Mase jajnika ženskih potomaka štakora
* Mann – Whitneyjev U test
† potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom hranjeni standardnom laboratorijskom hranom
‡ potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom hranjeni masnom hranom
§ potomci majki hranjenih masnom hranom hranjeni standardnom laboratorijskom hranom
‖ potomci majki hranjenih masnom hranom hranjeni hranom masnom hranom

## 5.2. Cističnost jajnika

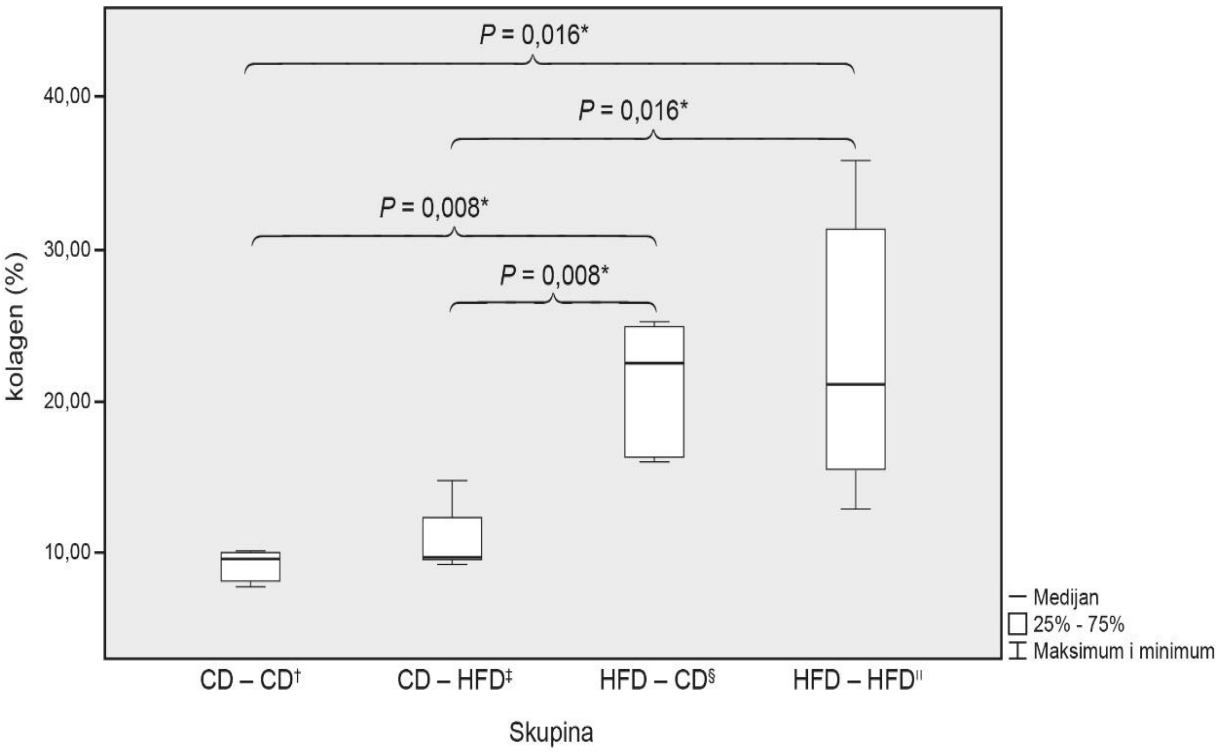
Kod svih štakorica čije su majke hranjene masnom hranom (skupine HFD – CD i HFD – HFD) nađene su cistične formacije u jajnicima, dok u jajnicima niti jedne štakorice čija je majke hranjena standardnom laboratorijskom hranom (skupine CD – CD i CD – HFD) nisu nađene cistične formacije. Razlika je bila statistički značajna, $P < 0,01$. Slika 5.2.



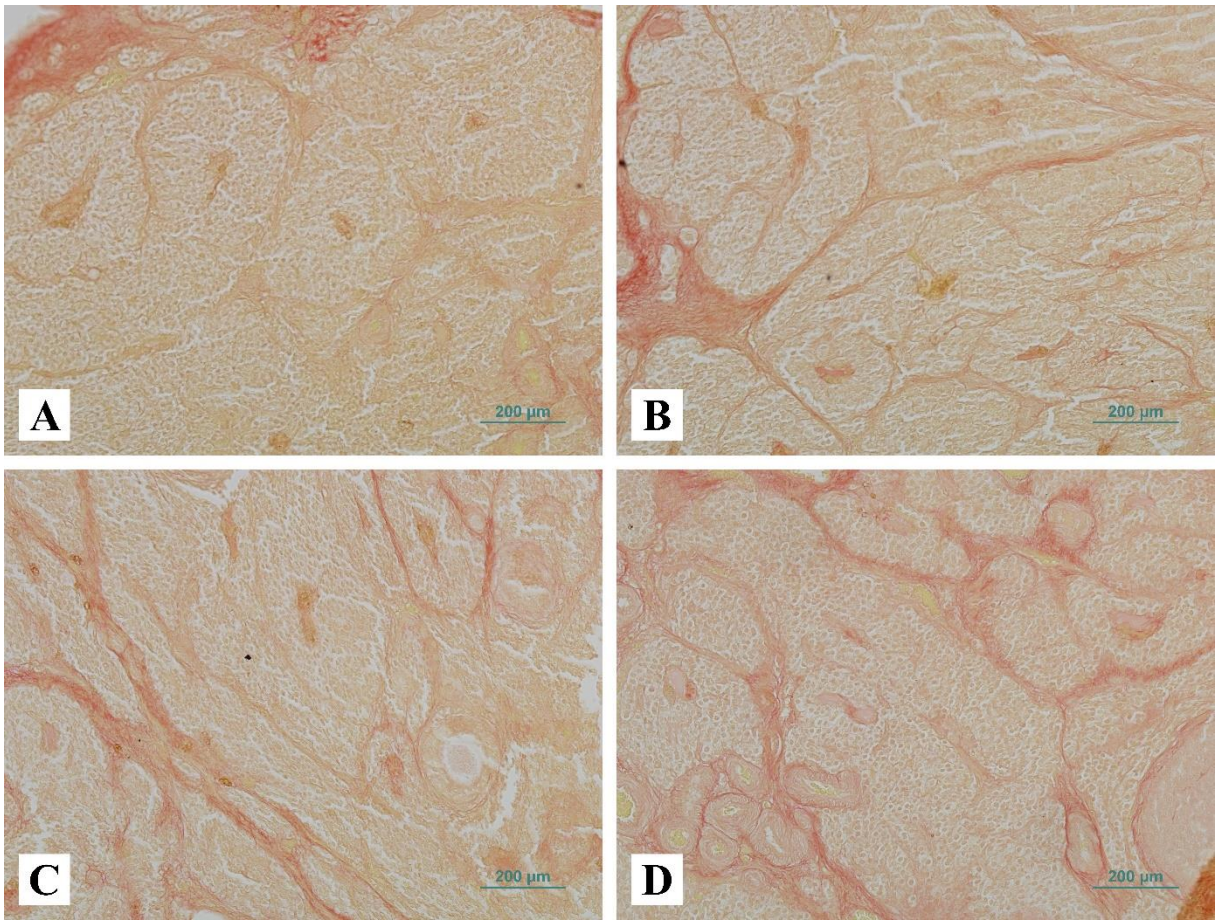

**Slika 5.2**. Reprezentativna histološka slika jajnika ženskih potomaka štakora. (A) bez cističnih formacija, skupina CD – CD (potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom), (B) s cističnim formacijama, skupina HFD – HFD (potomci majki hranjenih masnom hranom hranjeni masnom hranom) Bojenje: hemalaun eozin. Povećanje 20x. Mjerilo: 1 mm.

### 5.3. Kolagen u stromi jajnika

Veći postotak kolagena u stromi jajnika izmjeren je u potomaka majki hranjenih masnom hranom. Najveći postotak kolagena nađen je u stromi jajnika u skupini HFD – CD (22,4 (16,08-24,96) %), dok je najniži postotak kolagena nađen u stromi jajnika u skupini CD – HFD (9,6 (9,37-13,52) %). U stromi jajnika u skupini HFD – HFD nađeno je 20,98 (14,18-33,39) % kolagena. U stromi jajnika u skupini CD – CD nađeno je 9,61 (7,94 – 11,6) % kolagena. Kruskal – Wallisovim testom utvrđena je statistički značajna razlika u postotku kolagena u stromi jajnika među skupinama ($P$<0,01). Post hoc analizom utvrđeno je da je postotak kolagena u stromi jajnika u skupinama CD – CD i CD – HFD statistički značajno manji nego u skupinama HFD – CD i HFD – HFD. ($P$<0.05, Mann – Whitneyjev U test) Slika 5.3. i Slika 5.4.



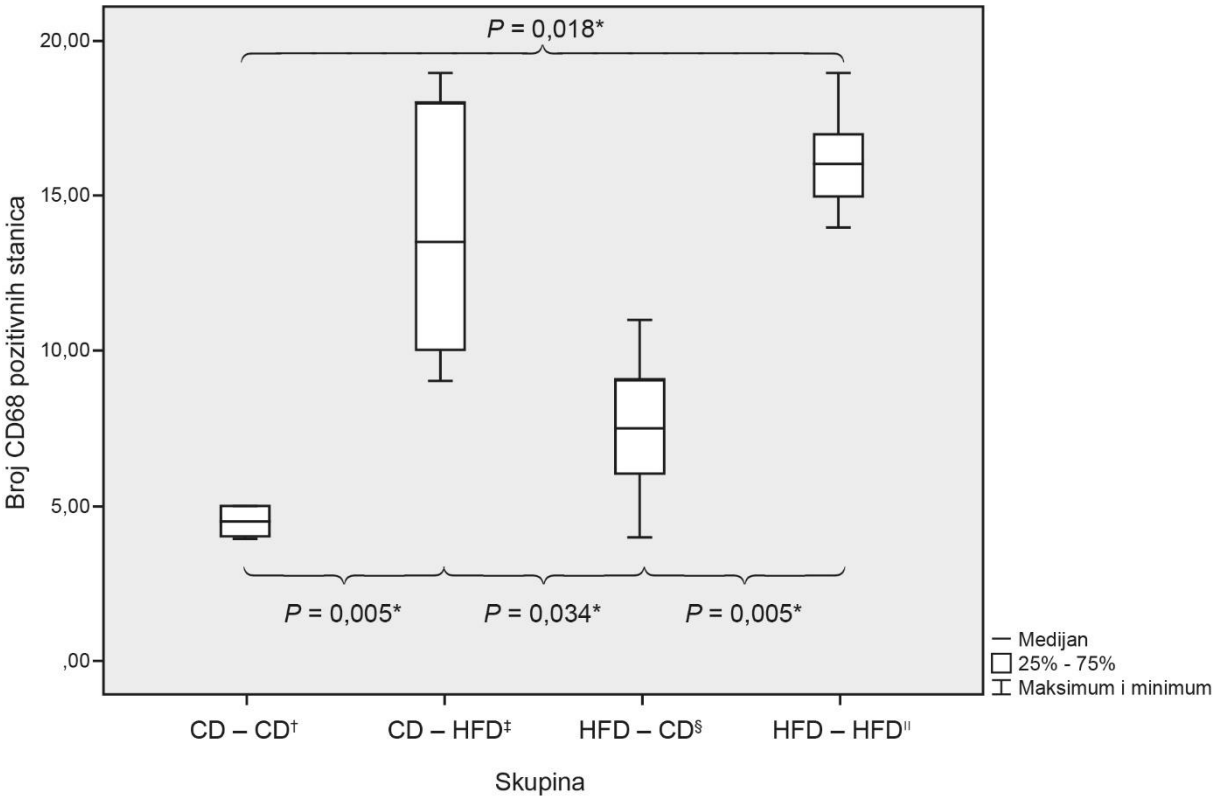

**Slika 5.3**. Postotak kolagena u stromi jajnika ženskih potomaka štakora
* Mann – Whitneyjev U test
† potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom hranjeni standardnom laboratorijskom hranom
‡ potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom hranjeni masnom hranom
§ potomci majki hranjenih masnom hranom hranjeni standardnom laboratorijskom hranom
‖ potomci majki hranjenih masnom hranom hranjeni masnom hranom



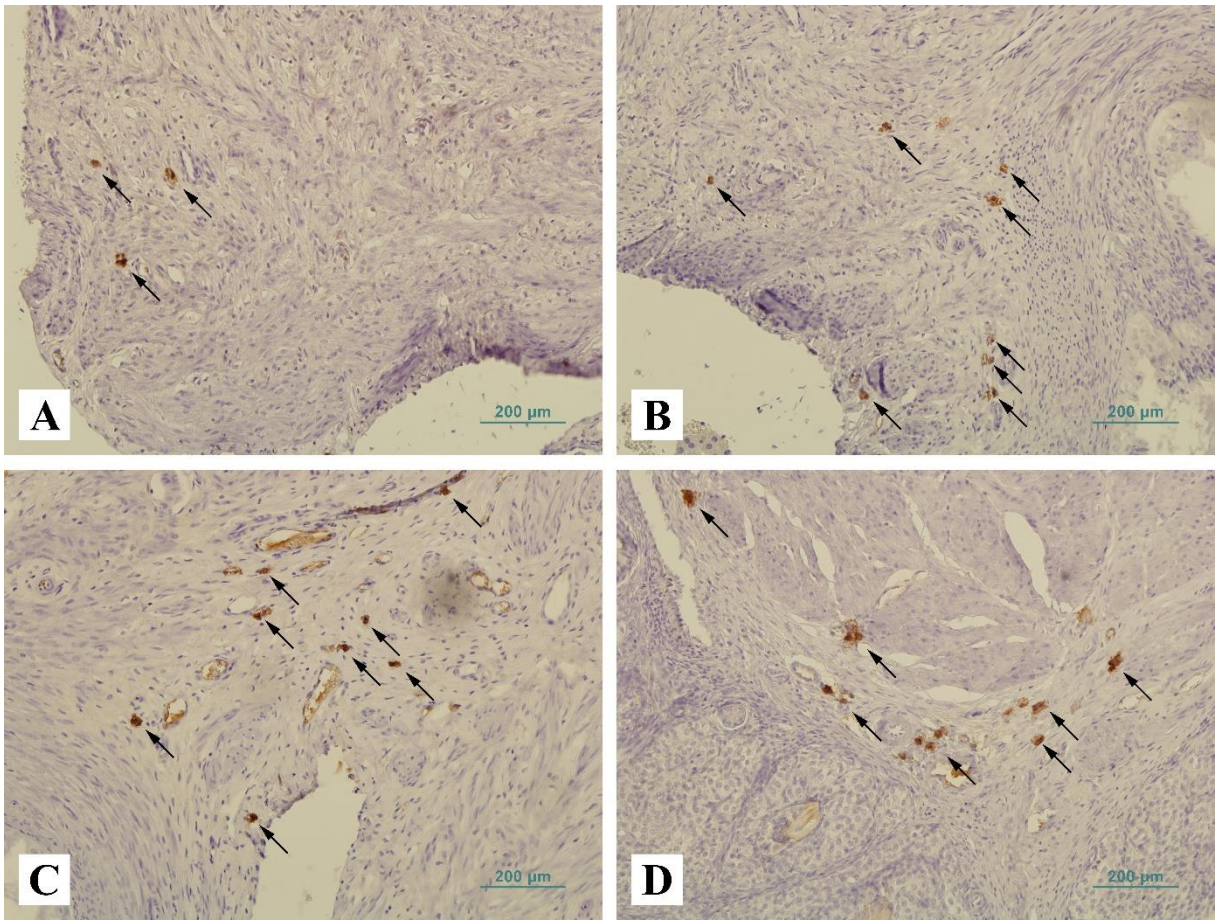

**Slika 5.4**. Reprezentativni prikaz infiltracije strome jajnika kolagenom u ženskih potomaka štakora. Prikaz jedne životinje po skupini. (A) CD – CD potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom hranjeni standardnom laboratorijskom hranom, (B) CD – HFD potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom hranjeni masnom hranom, (C) HFD - CD potomci majki hranjenih masnom hranom hranjeni standardnom laboratorijskom hranom, (D) HFD – HFD potomci majki hranjenih masnom hranom hranjeni masnom hranom. Bojenje: pikrosirijus crvenilo. Povećanje 200 x. Mjerilo 200 µm.

## 5.4. Imunohistokemijsko bojenje jajnika na CD68

Utvrđen je broj stanica pozitivnih na imunohistokemijsko bojanje CD68 u milimetru kvadratnom tkiva jajnika. Potomci hranjeni masnom hranom imali su veći broj CD68 pozitivnih stanica u 1 $mm^2$ tkiva jajnika. Najveći broj CD68 pozitivnih stanica nađen je u skupini HFD – HFD (16(14,75 – 17,5) / $mm^2$ ). Najmanji broj CD68 pozitivnih stanica nađen je u skupini CD – CD (4,5 (4-6) / $mm^2$ ). Utvrđena je statistički značajna razlika među skupinama (Kruskal – Wallisov test, $P = 0,01$). Post hoc analizom utvrđeno je da je u skupinama HFD – HFD i CD – HFD veći broj CD68 pozitivnih stanica nego u skupinama CD – CD i HFD – CD (Mann – Whineyev U test, $P < 0,05$). Slika 5.5. i Slika 5.6.



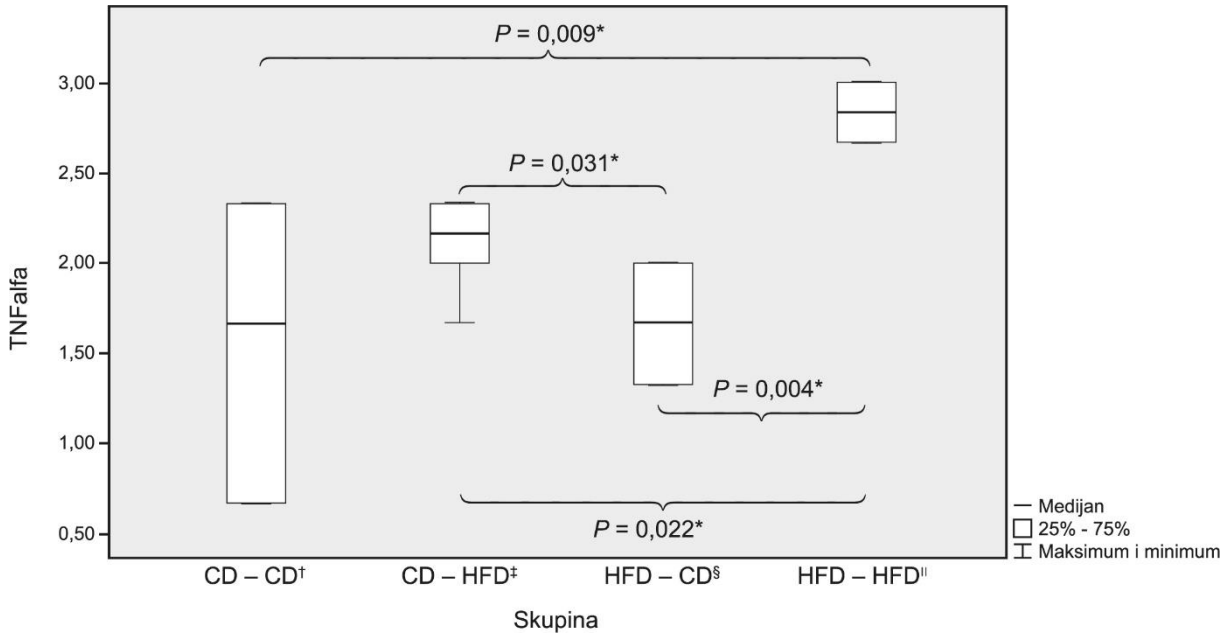

**Slika 5.5.** Broj CD68 pozitivnih stanica u tkivu jajnika ženskih potomaka
* Mann – Whitneyjev U test
† potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom hranjeni standardnom laboratorijskom hranom
‡ potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom hranjeni masnom hranom
§ potomci majki hranjenih masnom hranom hranjeni standardnom laboratorijskom hranom
‖ potomci majki hranjenih masnom hranom hranjeni masnom hranom



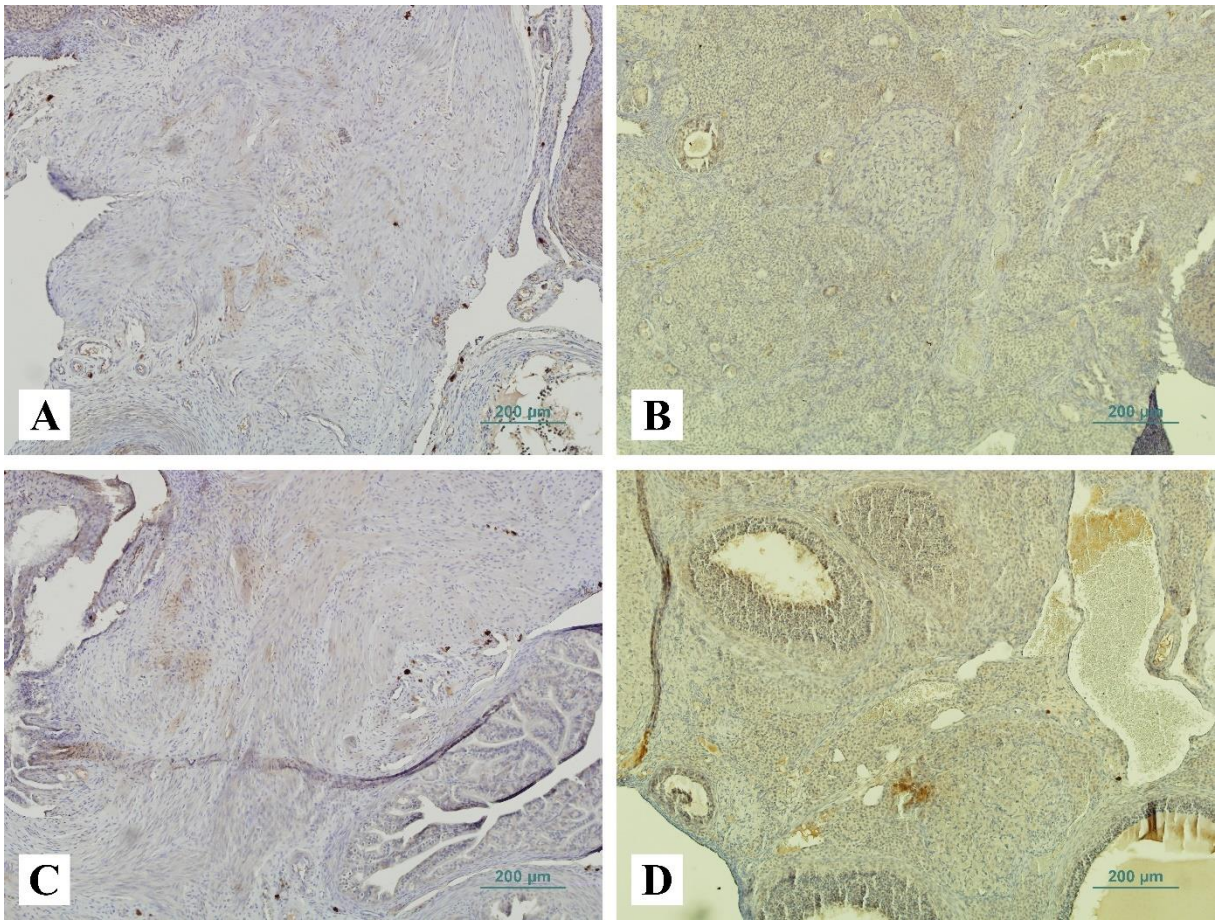

**Slika 5.6**. Reprezentativni prikaz imunohistokemijskog bojenja jajnika ženskih potomaka na CD68. Prikaz jedne životinje po skupini. (A) CD – CD potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom hranjeni standardnom laboratorijskom hranom, (B) CD – HFD potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom hranjeni masnom hranom, (C) HFD - CD potomci majki hranjenih masnom hranom hranjeni standardnom laboratorijskom hranom, (D) HFD – HFD potomci majki hranjenih masnom hranom hranjeni masnom hranom. Strelicom su prikazane CD68 pozitivne stanice. Pozadinsko bojenje: hemalaun. Povećanje 200x. Mjerilo 200 µm.

## 5.5. Imunohistokemijsko bojenje na TNF-α

Intenzitet bojanja na TNF – α utvrđen semikvantifikacijom bio je veći u potomaka hranjenih masnom hranom. Najjači intenzitet bojanja zabilježen je u skupini HFD – HFD (2,84 (2,5-3,0)), a najniži u skupini CD – CD (1,67 (0,67-2,33). Nađena je statistički značajna razlika među skupinama (Kruskal – Wallisov test, $P = 0,006$). *Post hoc* analizom, u skupini HFD – HFD utvrđen je statistički značajno jači intenzitet bojanja na TNF – α nego u skupinama CD – CD, CD – HFD i HFD – CD (Mann Whitneyjev U test, $P < 0,05$). U skupini CD – HFD utvrđen je statistički značajno jači intenzitet bojanja na TNF – α nego u skupini HFD – CD (Mann – Whitneyev U test, $P < 0,05$). Slika 5.7. i Slika 5.8.




**Slika 5.7.** Intenzitet imunohistokemijskog bojenja tkiva jajnika na TNF – α u ženskih potomaka
* Mann – Whitneyjev U test
† potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom hranjeni standardnom laboratorijskom hranom
‡ potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom hranjeni masnom hranom
§ potomci majki hranjenih masnom hranjeni standardnom laboratorijskom hranom
‖ potomci majki hranjenih masnom hranom hranjeni masnom hranom




**Slika 5.8.** Reprezentativni prikaz imunohistokemijskog bojenja jajnika ženskih potomaka na TNF – α. Prikaz jedne životinje po skupini. (A) CD – CD potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom hranjeni standardnom laboratorijskom hranom, (B) CD – HFD potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom hranjeni masnom hranom, (C) HFD - CD potomci majki hranjenih masnom hranom hranjeni standardnom laboratorijskom hranom, (D) HFD – HFD potomci majki hranjenih masnom hranom hranjeni masnom hranom. Pozadinsko bojenje: hemalaun. Povećanje 200 x. Mjerilo 200 µm.

### 5.6. Histomorfometrija potkožnog masnog tkiva

Adipociti u skupinama potomaka majki hranjenih masnom hranom (HFD – HFD i HFD – CD) imali su veću srednju vrijednost površine od adipocita u skupinama potomaka majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom (CD – CD i CD – HFD). Najveću srednju vrijednost površine imali su adipociti u skupini HFD – CD, a najmanju u skupini CD – HFD. Među skupinama nije utvrđena statistički značajna razlika (Kruskall – Wallisov test, $P$ = 0,18). (Tablica 5.1., Slika 5.9.).

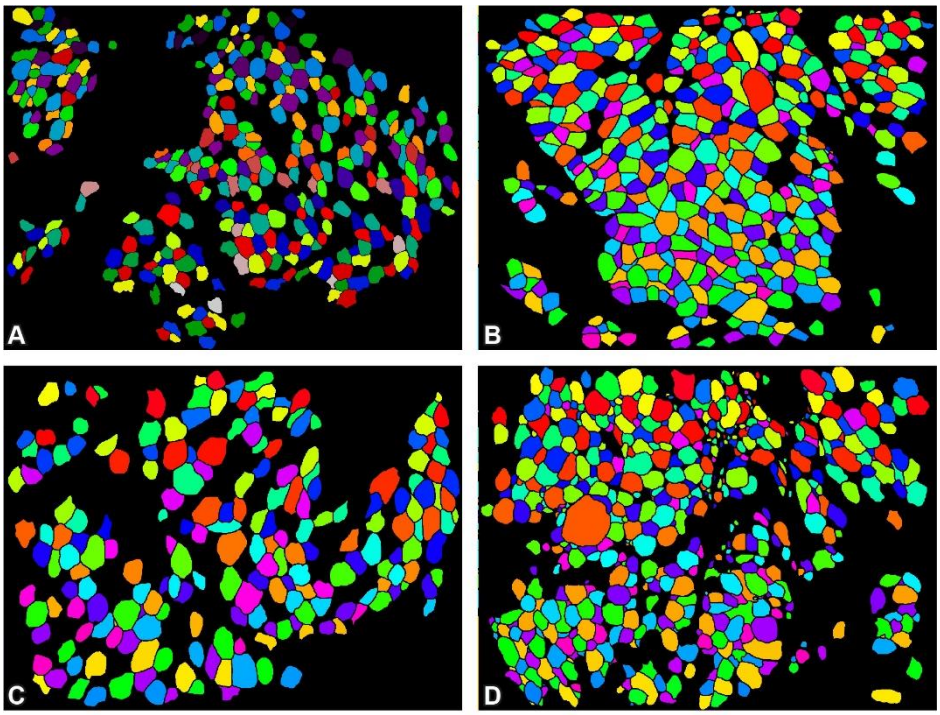
Broj adipocita po jedinici površine bio je obrnuto proporcionalan površini adipocita. Najveći broj adipocita po jedinici površine utvrđen je u skupini CD – HFD, a najmanji broj u skupini HFD – CD. Među skupinama nije utvrđena statistički značajna razlika (Kruskall – Wallisov test, $P$ = 0,08). (Tablica 5.1.)

**Tablica 5.1**. Srednja vrijednost površine i broja adipocita po jedinici površine potkožnog masnog tkiva

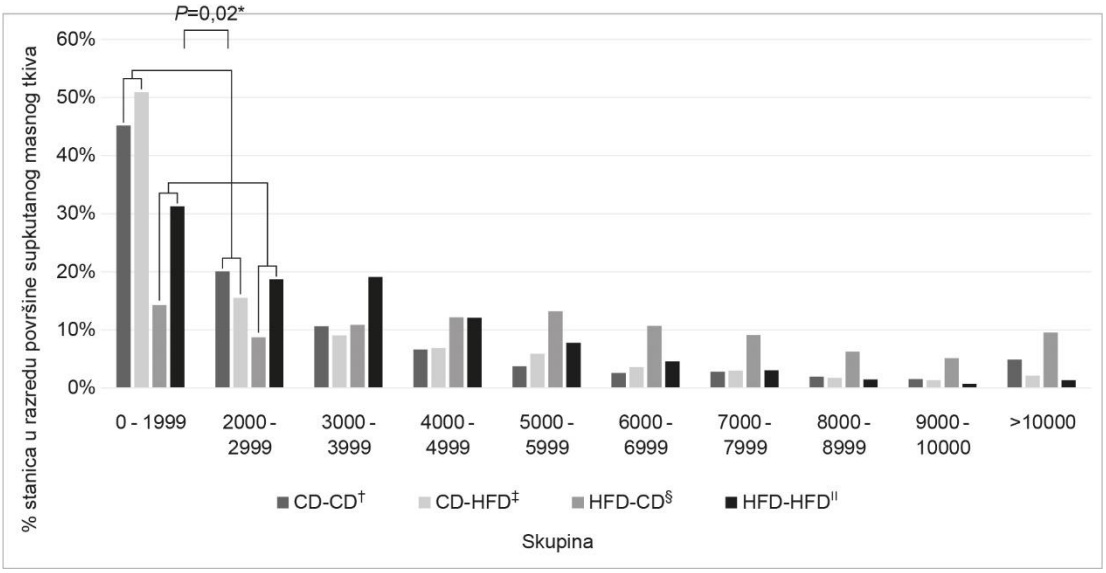
| | **Medijan (poluinterkvartilno raspršenje)** | |
|---|---|---|
| | Površina adipocita ($\mu m^2$) | Broj adipocita po jedinici površine ($x\ 10^{-4}/\mu m^2$) |
| **CD – CD†** | 2077 (1798,75 – 4957,25) | 3,73 (2,48 – 4,40) |
| **CD – HFD‡** | 2060,5 (1506,75 – 5024,13) | 4,04 (1,92 – 5,48) |
| **HFD – CD§** | 5792,5 (3747,5 – 6913) | 1,47 (1,31 – 2,56) |
| **HFD – HFD‖** | 3790 (2183 – 4115,75) | 1,64 (1,36 – 2,31) |
| ***P**** | 0,18 | 0,08 |

* Kruskall Wallisov test
† potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom hranjeni standardnom laboratorijskom hranom
‡ potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom hranjeni masnom hranom
§ potomci majki hranjenih masnom hranom hranjeni standardnom laboratorijskom hranom
‖ potomci majki hranjenih masnom hranom hranjeni masnom hranom

U skupinama potomaka majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom (CD – CD i CD – HFD) nađen je statistički značajno veći broj adipocita površine 0 – 2999 $\mu m^2$ nego u skupinama potomaka majki hranjenih hranom bogatim zasićenim masnim kiselinama (HFD – HFD i HFD – CD). (Mann – Whitneyev U test, $P$ = 0,02) (Slika 5.10.).




**Slika 5.9**. Reprezentativni prikaz morfometrije adipocita potkožnog masnog tkiva u programu Cell Profiler 4.2.1. Prikaz po jedne životinje po skupini. (A) CD – CD potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom hranjeni standardnom laboratorijskom hranom, (B) CD – HFD potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom hranjeni masnom hranom, (C) HFD - CD potomci majki hranjenih masnom hranom hranjeni standardnom laboratorijskom hranom, (D) HFD – HFD potomci majki hranjenih masnom hranom hranjeni masnom hranom.




**Slika 5.10**. Raspodjela površine adipocita po razredima u potkožnom masnom tkivu ženskih potomaka štakora

* Mann – Whitneyev U test

†potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom hranjeni standardnom laboratorijskom hranom

‡ potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom hranjeni masnom hranom

§ potomci majki hranjenih masnom hranom hranjeni standardnom laboratorijskom hranom

‖ potomci majki hranjenih masnom hranom hranjeni masnom hranom

### 5.7. Histomorfometrija perigonadalnog masnog tkiva

Adipociti u skupinama potomaka majki hranjenih masnom hranom (HFD – HFD i HFD – CD) imali su veću srednju vrijednost površine od adipocita u skupinama potomaka majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom (CD – CD i CD – HFD). Najveću srednju vrijednost površine imali su adipociti u skupini HFD – CD, a najmanju u skupini CD – CD. Među skupinama nije utvrđena statistički značajna razlika (Kruskall – Wallisov test, $P$ = 0,47). (Tablica 5.2., Slika 5.11.).

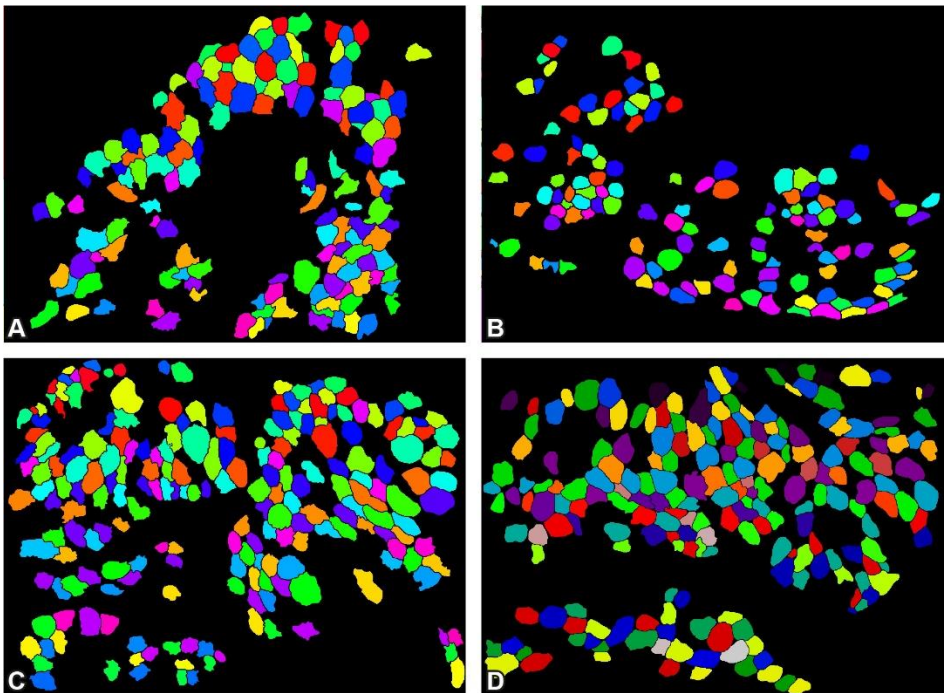
Broj adipocita po jedinici površine bio je obrnuto proporcionalan površini adipocita. Najveći broj adipocita po jedinici površine utvrđen je u skupini CD – CD, a najmanji broj u skupini HFD – CD. Među skupinama nije utvrđena statistički značajna razlika (Kruskall – Wallisov test, $P$ = 0,51). (Tablica 5.1.)

**Tablica 5.2.** Srednja vrijednost povšine i broja adipocita po jedinici površine perigonadalnog masnog tkiva

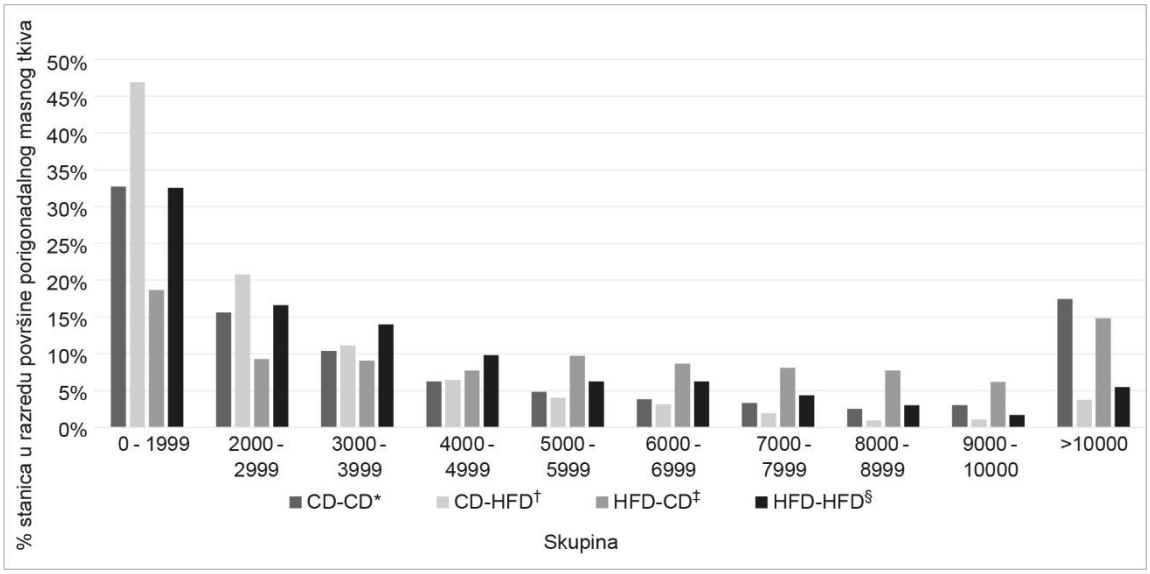
| | **Medijan (poluinterkvartilno raspršenje)** | |
|---|---|---|
| | Površina adipocita ($\mu m^2$) | Broj adipocita po jedinici površine ($x\ 10^{-4}/\mu m^2$) |
| **CD – CD†** | 2312,5 (2134,5 – 10687,75) | 3,03 (1,58 – 3,76) |
| **CD – HFD‡** | 2368 (1960,25 – 2563) | 2,99 (0,96 – 3,21) |
| **HFD – CD§** | 6297,5 (3802 – 7473,75) | 1,47 (1,31 – 2,56) |
| **HFD – HFD‖** | 2896,5 (2182,75 – 6167,5) | 2,85 (2,62 – 3,90) |
| ***P**** | 0,47 | 0,51 |

* Kruskall Wallisov test
† potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom hranjeni standardnom laboratorijskom hranom
‡ potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom hranjeni masnom hranom
§ potomci majki hranjenih masnom hranom hranjeni standardnom laboratorijskom hranom
‖ potomci majki hranjenih masnom hranjeni masnom hranom

U skupinama potomaka majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom nađen je veći broj adipocita manje površine (od 0 – 2999 $\mu m^2$). U skupinama u kojima su potomci hranjeni standardnom laboratorijskom hranom nađen je veći broj adipocita velike površine. Razlike među skupinama nisu bile statistički značajne (Kruskall Wallisov test, $P$ = 0,44) (Slika 5.12.)




**Slika 5.11**. Reprezentativni prikaz morfometrije adipocita perigonadalnog masnog tkiva u programu Cell Profiler 4.2.1. Prikaz po jedne životinje po skupini. (A) CD – CD potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom hranjeni standardnom laboratorijskom hranom, (B) CD – HFD potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom hranjeni masnom hranom, (C) HFD – CD potomci majki hranjenih masnom hranom hranjeni standardnom laboratorijskom hranom, (D) HFD – HFD potomci majki hranjenih masnom hranom hranjeni masnom hranom.




**Slika 5.12**. Raspodjela površine adipocita po razredima u perigonadalnom masnom tkivu.ženskih potomaka štakora

* potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom hranjeni standardnom laboratorijskom hranom

† potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom hranjeni masnom hranom

‡ potomci majki hranjenih masnom hranom hranjeni standardnom laboratorijskom hranom

§ potomci majki hranjenih masnom hranom hranjeni masnom hranom

# 6. RASPRAVA

Promjena tipa prehrane između generacije roditelja i potomaka ima različite učinke na organske sustave potomaka. Masna prehrana roditelja ima većinom negativne učinke, dok zdrava prehrana roditelja u pravilu djeluje zaštitno na zdravlje potomaka. Trudnoća i laktacija ključna su razdoblja u kojima se događa fenomen fetalnog programiranja (121). Jasno je da i prehrana jedinke uvelike utječe na organizam. Ova studija istraživala je utjecaje prehrane majke na karakteristike jajnika i masnog tkiva potomaka, uz dodatan utjecaj prehrane potomaka na buduće ishode.

## 6.1. Masa jajnika

Najveća masa jajnika izmjerena je kod masno hranjenih potomaka masno hranjenih majki, dok je najniža masa jajnika izmjerena kod zdravo hranjenih potomaka zdravo hranjenih majki. Masa jajnika zdravo hranjenih potomaka masno hranjenih majki bila je statistički značajno veća nego u masno hranjenih potomaka zdravo hranjenih majki. Dakle, masna prehrana majke imala je veći utjecaj na masu jajnika potomaka nego sama prehrana potomaka.

Prethodnim istraživanjem unutar istog projekta dokazano je da potomci majki hranjenih hranom s visokim udjelom zasićenih masnih kiselina nisu imali statistički značajno veću tjelesnu masu niti povećan ITM, ali su imali povišene koncentracije cirkulirajućih proupalnih citokina IL–6 i TNF–α, povišenu koncentraciju triglicerida u serumu, a sniženu koncentraciju adiponektina. U navedenom istraživanju pristup prehrani s visokim udjelom masti bio je omogućen dva puta dnevno kako bi se spriječio prekomjerni unos hrane i posljedična pretilost, budući da je cilj bio proučavati učinak vrste prehrane, a ne pretilosti (115). Prema tome, tjelesna masa nije imala ključan utjecaj na masu jajnika.

Masna prehrana je bez ekspresije fenotipa pretilosti uzrokovala patološke metaboličke promjene u organizmu koje su rezultirale, među ostalim, i patološkim promjenama jajnika. Poznat je fenomen metabolički pretilih normalno teških osoba (engl. *metabolic obesity with normal body weight*) (143). U istraživanju Zhou i sur. dokazano je da je masa jajnika u potomaka majki hranjenih masnom hranom veća nego u potomaka majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom. Također, veći je bio i odnos između mase jajnika i tjelesne mase, budući da se tjelesna masa među skupinama nije značajno razlikovala (144). Potomci s dokazanim cističnim tvorbama u jajnicima imali su teže jajnike. Ciste jajnika su ispunjene tekućinom, a tekućina ima veću gustoću od tkiva. Stoga je masa cističnih jajnika veća. Također, povećana zastupljenost fibroze u jajnicima povećava masu jajnika (145,146).

Masa jajnika dosad nije istraživana kao potencijalno mjerilo metaboličkog učinka prehrane na reproduktivnu funkciju na životinjskim modelima, a sada su jasno utvrđene poveznice između mase jajnika i nepovoljnih metaboličkih markera utjecaja masne prehrane.

### 6.2. Cističnost jajnika

Pojava cističnih formacija u jajnicima, bez jajne stanice unutar istih, utvrđena je u svih potomaka majki hranjenih masnom hranom, dok ista nije utvrđena niti kod jednog potomka majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom. Potomci masno hranjenih majki također su imali poremećenu izmjenu faza reproduktivnog ciklusa i abnormalne citološke karakteristike briseva rodnice, što smo objavili u rezultatima prethodnog istraživanja. U istom istraživanju dokazano je da su majke hranjene visokim udjelom zasićenih masnih kiselina imale smanjen broj potomaka, manji postotak uspješnog začeća, te da su potomci imali nepravilne izmjene u fazama reproduktivnog ciklusa, bilo u smislu produljenog ciklusa ili izostanka nekih faza. Takvi su ciklusi anovulatorni i stoga začeće nije bilo moguće (115).

Kalem i sur. pokazali su da majčina masna prehrana rezultira smanjenim brojem primordijalnih folikula, pojavom cističnih folikula, a time i smanjenom reproduktivnom rezervom jajnika (147). Istraživanje provedeno na kunićima pokazalo je pojavu atretičnih folikula i cističnih formacija u jajnicima potomaka majki hranjenih masnom hranom (148). Nekoliko mogućih mehanizama dovodi do ovih patoloških promjena, od oksidativnog stresa do sterilne upale u perifernom potkožnom ili perigonadalnom masnom tkivu, s posljedično povećanim izlučivanjem proupalnih citokina (149). Jedno istraživanje na svinjama pokazalo je da majčina masna prehrana utječe na zdravlje jajnika potomaka smanjenjem broja zdravih folikula i poticanjem apoptoze oocita, povećanjem oksidativnog stresa i stanjem sterilne upale jajnika (150). Velika metaanaliza koja se bavila utjecajem međugeneracijske izmjene masne prehrane pokazala je da potomci majki koje su bile izložene masnoj prehrani imaju povećan broj cističnih folikula i smanjen broj sekundarnih i antralnih folikula u usporedbi sa skupinama gdje su majke hranjene standardnom laboratorijskom hranom. To je u konačnici umanjilo fertilitet majki i ženskih potomaka (151).

Connor i sur. su istraživali utjecaj masne prehrane majke i porasta mase tijekom trudnoće na funkcionalne i morfološke karakteristike jajnika u Whistar štakora. Dokazali su da masna prehrana majke rezultira lošijom brigom za potomke, rađanjem potomaka koji u prepubertalnom stadiju razvoja imaju veću tjelesnu masu, imaju poremećenu reproduktivnu funkciju u smislu produženog ili trajnog estrusa. Također je dokazan i manji broj funkcionalnih folikula te oocita normalne morfologije u jajnicima potomaka majki hranjenih masnom hranom

(152). Izmjerena je manja koncentracija estradiola uz uredne koncentracije FSH i LH, što implicira da masna prehrana majke uzrokuje smanjenu osjetljivost jajnika na gonadotropine, a to je glavni čimbenik odabira folikula (153). Osim toga, inzulin je jedan od osnovnih čimbenika rasta folikula, a prehranom uzrokovana inzulinska rezistencija narušava signalizaciju u folikulima (154).

Unatrag dvadesetak godina aktivno se istražuje uloga kispeptina (*kiss1*), koji se eksprimira u neuronima anteroventralne periventrikularne jezgre te arkuatne jezgre te djeluje kao regulator hipotalamično – hipofizno – ovarijske osovine u glodavaca i ljudi. On ima ulogu u reprodukciji, uključujući spolnu diferencijaciju u mozgu, regulira nastup puberteta, sekreciju gonadotropnih hormona, ovulaciju te metaboličku regulaciju plodnosti (155). Dokazano je da su kispeptin i njegov receptor izraženi u različitim tkivima, uključujući reproduktivni sustav. U jajniku sudjeluju u razvoju folikula, maturaciji oocite, ovulaciji i steroidogenezi, ali i u patološkim stanjima poput preuranjenog gubitka funkcije jajnika, PCOS i endometrioze (156).

### 6.3. Kolagen u jajnicima potomaka

Bojenjem tkiva jajnika pikrosirijus crvenilom utvrđeno je da je količina kolagena u stromi jajnika potomaka majki hranjenih masnom hranom statistički značajno veća nego u potomaka majki hranjeni standardnom laboratorijskom hranom. Masna prehrana uzrokuje stanje sterilne upale u organizmu koja je karakterizirana infiltracijom jajnika makrofagima, a povećan je i izražaj proupalnih citokina i povećana pojavnost fibroze jajnika (157).

Pojavnost fibroze je obilježje starenja jajnika i jajnik je prvi organ koji pokazuje morfološke znakove starenja. Zbog toga je on osnovni model za istraživanje staničnih mehanizama nastanka fibroze, ali i potencijalnih antifibrotskih agenata koji će se koristiti u liječenju poremećaja povezanih s fibrozom jajnika.

Tijekom fibroze jajnika, u stromi dolazi do nakupljanja kolagena I i III, ali i do smanjenja količine glukozaminoglikana (od kojih je najzastupljenija hijaluronska kiselina) koji „čuvaju“ jajnik od prekomjerne fibroze. Pojačana fibroza jajnika opisana je u više patoloških stanja, poput dijabetesa, pretilosti, PCOS. Sve su to stanja periferne inzulinske rezistencije. Dokazano je da terapija metforminom, čiji je zadatak povećati perifernu inzulinsku osjetljivost, usporava nakupljanje kolagena I i III u jajnicima (158).

Istraživanje Briley i sur. pokazalo je da fibroza jajnika povezana s reproduktivnom starosti ima karakterističnu histološku sliku u kojoj dominiraju kolagen tipa I i III, ali su prisutni i krupni makrofagi. Također, bojenje piksrosirijus crvenilom s povećanjem reproduktivne dobi postaje intenzivnije. U jajnicima mlađih štakorica u dobi od 6 tjedana, intenzitet je vrlo slab ili

se kolagen čak niti ne detektira, a u reproduktivno starih štakorica u dobi od 22 mjeseca intenzitet crvene boje je vrlo jak (159). Navedeni podaci objašnjavaju relativno slab intenzitet obojenja pikrosirijus crvenilom u našem istraživanju budući da su štakorice žrtvovane u dobi od 22 tjedna. Iako je postotak kolagena u jajnicima ovisio o prehrani potomaka, intenzitet obojenja kod potomaka masno hranjenih majki bio je nešto jači nego u potomaka majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom.

### 6.4. CD68 i TNF-α u tkivu jajnika

Imunohistokemijskim bojenjem tkiva jajnika utvrđen je veći broj CD68 pozitivnih stanica kao i intenzivniji signal bojenja TNF – α u skupinama potomaka hranjenih masnom hranom, neovisno o prehrani majke. Makrofagi u jajnicima reguliraju staničnu proliferaciju, apoptozu i steroidogenezu i stoga su najvažnije pomoćne stanice za optimalnu reproduktivnu funkciju. Također, brojnost makrofaga i izražaj TNF – α u tkivu jajnika pokazuju intenzitet upale (160).

U istraživanju Hohos i sur. utvrđeno je da je masna prehrana dovela do značajno veće infiltracije tkiva jajnika makrofagima. Uz to, u istoj skupini životinja dokazan je i produžen reproduktivni ciklus, smanjen broj folikula i žutih tijela te je pronađen oštećen izražaj čak 24 gena u jajniku u odnosu na skupinu hranjenu standardnom laboratorijskom hranom. Kada je u prehranu uz hranu bogatu mastima dodana dokozaheksaenska kiselina, došlo je do oporavka izražaja čak 22 od 24 aberantna gena. Dakle, dodatak omega – 3 nezasićenih masnih kiselina djelovao je pozitivno na izražaj gena za regulaciju funkcije jajnika te je došlo do djelomičnog oporavka funkcije jajnika u skupinama hranjenim masnom ishranom (161).

Mehanizmi kojima masna prehrana uzrokuje pojačanu infiltraciju jajnika makrofagima još uvijek nisu potpuno jasni. Jedan od potencijalnih uzroka je porast sustavne koncentracije MCP – 1. MCP – 1 je normalno prisutan u jajnicima gdje ima fiziološku ulogu u normalnoj ovulaciji tako što privlači monocite iz krvnih žila u jajnik. U sustavnoj upali uzrokovanoj masnom prehranom koncentracija MCP – 1 je povišena, a broj oocita nakon superovulacije u masno hranjenih miševa smanjen je. U miševa kojima je isključen gen za MCP – 1, masna prehrana nije rezultirala smanjenjem broja oocita (162). Skaznik – Wikiel i sur. dokazali su da je infiltracija mišjih jajnika makrofagima posljedica masne prehrane neovisno o tjelesnoj masi (116). Ovaj rezultat konzistentan je s rezultatima naših ranijih istraživanja budući da su štakorice hranjene hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama u našem prethodnom istraživanju također imale veći broj makrofaga, a nisu pokazale pretili fenotip (115).

Imunohistokemijskim bojenjem na TNF – α pokazano je da potomci hranjeni masnom hranom u jajnicima imaju statistički značajno jači intenzitet bojenja. Iste skupine imale su i

značajno veći broj makrofaga u jajnicima, što potvrđuje utjecaj masne prehrane na nastanak lokalne upale u jajnicima. Dokazano je da TNF – α u jajnicima stimulira proizvodnju progesterona, regulira diferencijaciju u jajnicima, proliferaciju i apoptozu, a u većim koncentracijama djeluje destruktivno pojačavajući intenzitet lokalne upale (163).

Već je više puta spomenuto da masna prehrana uzrokuje sustavnu upalu te su kao posljedica masne prehrane povišene i serumske koncentracije TNF – α. Vignera i sur. dokazali su povećanu količinu TNF – α u folikularnoj tekućini jajnika, masnom tkivu, mišićima masno hranjenih žena (164). TNF – α može biti jedan od važnih uzroka poremećaja plodnosti. Mehanizam kojim TNF – α utječe na plodnost može biti preko poremećaja unosa glukoze u tkiva, odnosno pogoršanja inzulinske rezistencije, a upravo su neplodnost i inzulinska rezistencija neke od osnovnih metaboličkih karakteristika PCOS. Istraživanje Ntteba i sur. pokazalo je povišen izražaj markera oksidativnog stresa (poput sintetaze dušikovog oksida) u jajnicima u kojima je povišen izražaj mRNA TNF – α. Povećan oksidativni stres negativno utječe na funkciju jajnika i kompromitira reproduktivni potencijal ženke (118,165). Pojačan izražaj TNF – α uz IL6 u jajnicima može potaknuti i malignu transformaciju (166).

Da bi pojačan izražaj TNF – α bio vidljiv u tkivu jajnika, potrebna je dugotrajnija izloženost masnoj prehrani. Serumske koncentracije TNF – α porastu već nakon šest tjedana izloženosti masnoj prehranu, dok se izražaj TNF – α u tkivu jajnika nije vidio ni nakon 120 dana (167). U istraživanju Hohos i sur. učinak masne prehrane na izražaj TNF – α u tkivu jajnika bio je imunhostokemijski jasno vidljiv nakon 180 dana izloženosti (168). U našem istraživanju štakorice su masnoj prehrani bile izložene kroz 22 tjedna te je to mogući razlog slabijem intenzitetu obojenja u svim preparatima.

### 6.5. Histomorfometrija supkutanog i perigonadalnog masnog tkiva

U potkožnom masnom tkivu mjerene su veće površine adipocita u skupinama HFD – HFD i HFD – CD nego u skupinama CD – HFD i CD – CD. Najveći broj adipocita po jedinici površine izračunat je u skupini CD – HFD, a najmanji u skupini HFD – HFD. Također, skupine CD – HFD i CD – CD imale su značajno veći postotak adipocita male površine (0 - 2999 $mm^2$). Kod potomaka majki hranjenih hranom s visokim udjelom masti došlo je do ekspanzije masnog tkiva hipertrofijom, iako ti potomci nisu imali veću tjelesnu težinu. Kao što je već navedeno, hipertrofija je povezana s upalom i inzulinskom rezistencijom, a posljedično i s raznim negativnim zdravstvenim učincima. Također, ovi rezultati koreliraju s našom prethodnom studijom u kojoj smo pokazali da potomci majki hranjenih masnom hranom imaju više koncentracije proupalnih citokina u serumu (115). Osim toga, hipertrofični adipociti su skloniji

nekrozi, što povećava lokalnu upalu u masnom tkivu putem serinske fosforilacije supstrata inzulinskog receptora – 1 putem nuklearnog faktora κB i Jun N – terminalne kinazne signalizacije što rezultira razvojem inzulinske rezistencije. Aktivacija stanica imunološkog sustava, posebno makrofaga i T – limfocita, također je pojačana (169). Hipertrofija adipocita povećava lokalne potrebe za kisikom, što dovodi do hipoksije i regulacije proangiogenih čimbenika, a posljedično do lokalne fibroze, kronične upale i smanjenja lučenja adiponektina (170).

Masna prehrana majke na različite načine metabolički programira ekspanziju masnog tkiva i metaboličke posljedice iste u muških i ženskih potomaka miševa. U ranoj fazi razvoja potomaka dolazi do porasta količine masnog tkiva u oba spola, s tim što je u ženskih potomaka porast neznatno više izražen. Također je u ranoj fazi razina upalnih parametara u ženskih potomaka viša. U muških potomaka već u ranoj fazi razvoja dolazi do smanjenja broja preadipocita koji su temelj za razvoj novih adipocita i ekspanziju masnog tkiva zdravijom hiperplazijom. U kasnijim fazama razvoja (u dobi od 120 dana) proporcionalna količina masnog tkiva nije se znatno promijenila, ali se u ženskih potomaka smanjio sustavni upalni odgovor. Također, kod ženskih potomaka došlo je i do smanjenja površine pojedinih adipocita (171). To je jedno od mogućnih objašnjenja manje značajnih razlika u veličini adipocita u ovom istraživanju za razliku od istraživanja na mužjacima gdje je površina adipocita u štakora odrasle dobi pokazala značajnije razlike ovisno o načinu prehrane majke (172).

Sellayah i sur. istraživali su kako majčina masna prehrana te pretilost majke utječu na ekspanziju masnog tkiva. Potomci masno hranjenih majki imali su veću sklonost hipertrofiji adipocita (tzv. obesogena adipogeneza) dok nije primijećen de novo nastanak adipocita (tzv. razvojna adipogeneza), čak ni u jedinki starih samo četiri tjedna (173). U našem istraživanju znatno veći postotak adipocita manje površine nađen je kod potomaka majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom. U tim skupinama ekspanzija masnog tkiva prvenstveno je bila posredovana hiperplazijom. Tijekom hiperplazije, stanice prekursora adipocita diferenciraju se u adipocite, što je proces posredovan s nekoliko hormona i čimbenika transkripcije. Najvažniji od njih je PPARγ (174). Koh i sur. su dokazali da manji adipociti održavaju zadovoljavajuću razinu inzulinske osjetljivosti i tako smanjuju negativne metaboličke učinke pretilosti. Takvi su adipociti karakteristični u „metabolički zdravih“ pojedinaca (175). Iako nisu sve razlike među skupinama bile statistički značajne, ipak se može zaključiti da je prehrana majke imala značajniji učinak na model ekspanzije masnog tkiva od prehrane samog potomstva.

U perigonadalnom, kao i u potkožnom masnom tkivu, krupniji adipociti su pronađeni u skupini HFD – HFD i HFD – CD, a više adipocita manje površine nađeno je u skupini CD – CD i CD – HFD. U istraživanju Se i sur. dokazano je da se hipertrofija perigonadalnih adipocita događa rano pri poticaju masnom hranom, čak i prije dokazane inzulinske rezistencije. Moguće je da hipertrofija adipocita te hipoksija i inicijacija upalnog procesa u masnom tkivu aktiviraju sustavnu upalu koja za posljedicu ima inzulinsku rezistenciju (176). U perigonadalnom masnom tkivu potomaka majki hranjenih masnom hranom dokazana je veća količina leptina kao i pojačan izražaj leptinskih receptora nego u potomaka majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom (59). U visceralnom masnom tkivu na prehrambeni poticaj veći je postotak hiperplazije. Stoga je površina adipocita perigonadalnog masnog tkiva u skupini HFD – HFD manja u odnosu na površinu u istoj skupini u potkožnom masnom tkivu (177).

Perigonadalno masno tkivo ženki miševa pokazuje više koncentracije proangiogenih čimbenika i bolje izraženu angiogenezu od mužjaka kao odgovor na prehranu s visokim udjelom masti. Ovaj fenotip je povezan s očuvanom metaboličkom homeostazom i na tkivnoj i na sustavnoj razini (178). Dakle, negativan utjecaj masne prehrane na ekspanziju masnog tkiva u žena može biti manji nego u muškaraca, ali to je prostor za nova istraživanja.

U štakorskom modelu dijabetesa, dijabetičke ženke hranjene masnom hranom imale su periovarijalne adipocite značajno veće površine nego dijabetičke ženke hranjene standardnom laboratorijskom hranom. Dakle, dodatak masne prehrane majkama s dijabetesom pogoršao je negativne učinke dijabetesa na površinu adipocita u potomaka (179).

Butruille i sur. dokazali su da masna prehrana majke tijekom dojenja potomstva uzrokuje porast količine masnog tkiva u potomaka, a u odrasloj dobi u perigonadalnom masnom tkivu porast količine masnog tkiva je najvećim dijelom uzrokovan hiperplazijom. Hiperplazija perigonadalnog masnog tkiva povezana je s pojačanim izražajem i aktivnošću stearoil koenzim – A desaturaze – 1, ključnog enzima za metabolizam masnih kiselina. Navedeni enzim katalizira pretvorbu zasićenih masnih kiselina (primjerice palmitinske i stearinske) u mononezasićene masne kiseline (palmitinsku i oleinsku) koje su predominantni supstrati za sintezu triglicerida (180) .

Dugotrajna tranzicija majčine prehrane bogate zasićenim masnim kiselinama na standardnu laboratorijsku hranu rezultirala je normalizacijom metaboličkih karakteristika u navedenih majki. Također, potomci tih majki pokazali su normalne metaboličke karakteristike. Za razliku od ovih skupina majki i potomaka, potomci majki kod koji je tranzicija s masne za standardnu prehranu trajala kraće, pokazali su hipertrofiju adipocita, pojačan izražaj gena

odgovornih za nakupljanje masti, povećanu infiltraciju makrofagima te pojačan izražaj gena za proupalne citokine (181).

### 6.6. Intervencije koje smanjuju utjecaj masne prehrane na organizam te mogućnosti daljeg istraživanja

Istraživanja utjecaja prehrane majke i potomaka na fiziološke i patološke procese u potomaka imaju za cilj razumijevanje molekularnih mehanizama koji reguliraju odgovor na prehrambene poticaje iz prethodne generacije, a tako i u aktualnoj generaciji ispitanika ili laboratorijskih životinja. Sve to će rezultirati kreiranjem algoritama za liječenje negativnih posljedica koje prehrana može ostaviti na jedinku.

Većina danas dostupnih lijekova za liječenje metaboličkog sindroma ima kao krajnju metu smanjivanje razine sustavne upale u organizmu. Tako djeluje veći dio dostupnih antidijabetika (metformin, tiazolidindioni) kao i lijekova koji snižavaju razinu cirkulirajućih lipida (statini) (182–184).

Već i samom nutritivnom intervencijom mogu se prevenirati, umanjiti, usporiti ili prekinuti negativni učinci masne prehrane na organizam. Jedna studija na 48 pretilih pojedinaca dokazala je da kalorijska restrikcija od 25 % uz redovito vježbanje kroz šest mjeseci rezultira smanjenjem tjelesne mase, smanjenjem površine potkožnih adipocita, boljom inzulinskom osjetljivošću, snižavanjem razine glukoze na testu opterećenja glukozom (185). Maslinovo ulje kao dodatak masnoj prehrani rezultiralo je smanjenjem tjelesne mase, smanjenjem površine epididimalnih adipocita, inhibicijom oksidativnog stresa i sniženjem koncentracije pankreasne lipaze u štakora hranjenih masnom hranom (186). Vitamin C inhibirao je hipertrofiju visceralnih adipocita i snizio razine glukoze u masno hranjenih pretilih miševa putem smanjenja izražaja gena uključenih u lipogenezu u visceralnom masnom tkivu (187). Dokazano je da papaja ima antioksidativno, antihipertenzivno i hepatoprotektivno djelovanje. U istraživanju na masno hranjenim štakorima, u skupinama kojima je u masnu hranu dodavan sok od papaje došlo je do snižavanja serumskih trigrlicerida i ukupnog kolesterola. Također je u istim skupinama izmjerena manja površina adipocita te je dokazan smanjenen izražaj PPARγ.

Barijatrijska kirurgija dokazano rezultira smanjenjem površine adipocita abdominalnog potkožnog masnog tkiva. Također je nakon barijatrijske operacije došlo do poboljšanja inzulinske osjetljivosti. U operiranih pojedinaca došlo je do smanjenja koncentracije proupalnih citokina i povišenja koncentracije adiponektina (188).

Cijeli je spektar mogućnosti putem kojih se negativni učinci masne prehrane na jedinku mogu umanjiti. Nastojanja znanstvenika u smjeru dodatnog rasvjetljavanja mehanizama djelovanja masne prehrane na organizam zasigurno će još proširiti raspon tih mogućnosti.

Razvoj preventivnih metoda i javnozdravstveno djelovanje sigurno su najproduktivnije mjere koje će u populaciji smanjiti potrebe za složenijim, dugotrajnijim i skupljim intervencijama.

Ova doktorska disertacija dala je odgovore na pitanja kako prehrana majke i potomaka modulira neke od morfoloških karakteristika u jajnicima kao i ekspresiju markera upale. Također je prikazala utjecaj prehrane majke i potomaka na obrazac količine potkožnog i perigonadalnog masnog tkiva. Ovo su male karike u cijelom lancu složenih događaja kojima masna prehrana modulira upalni proces u organizmu kao cjelini.

U daljem tijeku istraživanja bilo bi dobro ispitati eventualnu korelaciju između upalnog procesa u masnom tkivu i upalnog procesa u jajniku budući da je disfunkcija masnog tkiva jedan od dokazanih uzroka inzulinske rezistencije sa svim poznatim posljedicama. Tako bi se moglo kombinirano djelovati na uzroke patoloških procesa koji vode metaboličkoj disfunkciji na više razina u organizmu.

# 7. ZAKLJUČCI

Nakon provedenog istraživanja i temeljem dobivenih rezultata moguće je izvesti sljedeće zaključke:

- Masa jajnika bila je veća u potomaka majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama, neovisno o prehrani potomaka.
- U jajnicima svih potomaka majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama nađene su cistične formacije, dok u jajnicima niti jednog potomka majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom nisu nađene cistične formacije. Majčina prehrana uzrokovala promjenu morfologije jajnika što je za posljedicu imalo i poremećaj reproduktivne fiziologije.
- Postotak kolagena u stromi jajnika bio je veći u potomaka majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama. Prehrana majke ubrzala je starenje jajnika te je funkcionalni parenhim jajnika zamijenjen vezivom.
- Broj makrofaga bio je veći, a signal imunohistokemijskog bojenja TNF – α bio je intenzivniji u potomaka hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama. Za poticaj lokalne upale u jajniku bitnija je prehrana potomaka nego prehrane majke.
- Potomci majki hranjenih standardom laboratorijskom hranom u potkožnom masnom tkivu imali su značajno veći broj adipocita manje površine. Zdrava prehrana majke stvorila je uvjete za ekspanziju masnog tkiva hiperplazijom.

# 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja**: Utvrditi kako prehrana majki i potomaka utječe na morfološke karakteristike jajnika, potkožnog i perigonadalnog masnog tkiva potomaka.

**Nacrt studije**: Deset Sprague Dawlaey štakorica bilo je podijeljeno u dvije skupine. Jedna skupina hranjena je standardnom laboratorijskom hranom, a druga hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama. Sve su štakorice nakon toga parene s istim mužjakom. Nakon trudnoće i dojenja, ženski potomci obje skupine majki podijeljeni su u dvije skupine, tako da je jedna skupina hranjena standardnom laboratorijskom hranom, a druga hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama u trajanju od 22 tjedna.

**Materijal i metode**: Štakorice su žrtvovane te su izdvajani i vagani jajnici, potkožno i perigonadalno masno tkivo. U jajnicima je utvrđivana prisutnost cističnih formacija, postotak kolagena u stromi jajnika te je nakon imunohistokemijskog bojenja utvrđivan broj makrofaga i intenzitet imunohistokemijskog bojenja na TNF – α u tkivu jajnika. Na histološkim preparatima supkutanog i perigonadalnog masnog tkiva učinjena je histomorfometrija u računalnom programu Cell Profiler 4.3.1. radi utvrđivanja površine i broja adipocita.

**Rezultati**: Masa jajnika bila je veća u potomaka majki hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama. Iste su skupine pokazale i pojavnost cističnih formacija te veći postotak kolagena u jajnicima. Na broj makrofaga i intenzitet imunohistokemijskog singala TNF – α više je utjecala prehrana potomaka pa je veći broj makrofaga te jači intenzitet imunohistokemijskog bojenja na TNF – α dokazan u potomaka hranjenih hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama. Nisu nađene statistički značajne razlike i veličini adipocita među skupinama. Potomci majki hranjenih standardnom laboratorijskim hranom imali su značajno veći broj adipocita male površine u supkutanom masnom tkivu.

**Zaključak**: Prehrana majke utječe na masu jajnika, pojavnost cističnih formacija u jajnicima te fibrozu jajnika. Prehrana majke utječe na veličinu adipocita supkutanog masnog tkiva. Prehrana potomaka utječe na broj makrofaga i intenzitet imunohistokemijskog singala TNF – α.

Ključne riječi: histomorfometrija, jajnik, masna ishrana, masno tkivo, štakori

## 9. SUMMARY

**Objectives**: To determine how the diet of mothers and offspring affects the morphological characteristics of ovaries, subcutaneous and perigonadal adipose tissue.

**Study design**: Ten female Sprague Dawlaey rats were divided into two groups. One group fed standard laboratory food and the other group fed food rich in saturated fatty acids. All rats were then mated with the same male. After pregnancy and lactation, female offspring of both groups of mothers were divided into two groups, so that one group was fed standard laboratory food and the other food rich in saturated fatty acids for 22 weeks.

**Material and methods**: Rats were sacrificed, and their ovaries were weighed, subcutaneous and perigonadal adipose tissue were isolated. The presence of cystic formations, the percentage of collagen in the ovarian stroma was determined in the ovaries, and after immunohistochemical staining, the number of macrophages and the intensity of immunohistochemical staining for TNF-α in ovarian tissue were determined. Histomorphometry was performed on histological sections of subcutaneous and perigonadal adipose tissue in the software Cell Profiler 4.2.1. to determine the surface area and number of adipocytes.

**Results**: Ovarian weight was higher in the offspring of the mothers fed food rich in saturated fatty acids. The same groups also showed the occurrence of cystic formations and a higher percentage of collagen in the ovaries. The number of CD68 positive cells and the intensity of the immunohistochemical signal of TNF - α were more influenced by the diet of the offspring, so a higher number of macrophages and a stronger intensity of immunohistochemical staining for TNF - α was demonstrated in offspring fed food rich in saturated fatty acids. No statistically significant differences in adipocyte size were found between the groups. The offspring of mothers fed standard laboratory food had a significantly higher number of small - area adipocytes in the subcutaneous adipose tissue.

**Conclusion**: Maternal nutrition affects ovarian weight, the incidence of cystic formations in the ovaries and ovarian fibrosis. The mother's diet affects the adipocyte surface area in subcutaneous adipose tissue. The diet of the offspring affects the number of macrophages and the intensity of the immunohistochemical signal TNF - α.

**Key words**: high – fat diet, histomorphometry, ovary, adipose tissue, rat

# 10. LITERATURA

1. Chen Y, Michalak M, Agellon LB. Importance of Nutrients and Nutrient Metabolism on Human Health. Yale J Biol Med. 2018;91(2):95-103.

2. Ross AC, Caballero BH, Cousins RJ, Tucker KL, Ziegler TR. Modern nutrition in health and disease: Eleventh edition. Wolters Kluwer Health Adis (ESP) 2012.

3. Kaput J, Kussmann M, Mendoza Y, Le Coutre R, Cooper K, Roulin A. Enabling nutrient security and sustainability through systems research. Genes Nutr. 2015 May;10(3):462.

4. Gil Hernández Á. Current challenges of nutrition applied research: Person or population?. Nutr Hosp. 2018 Jun;35(Spec No4):39–43.

5. Putignani L, Dallapiccola B. Foodomics as part of the host-microbiota-exposome interplay. J Proteomics. 2016 Sep;147:3–20.

6. Geisler BP. Cardiovascular Benefits of the Mediterranean Diet Are Driven by Stroke Reduction and Possibly by Decreased Atrial Fibrillation Incidence. Vol. 129, The American journal of medicine. United States; 2016. p. e11.

7. Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Estruch R, Corella D, Fitó M, Ros E. Benefits of the Mediterranean Diet: Insights From the PREDIMED Study. Prog Cardiovasc Dis. 2015;58(1):50–60.

8. Chiva-Blanch G, Badimon L, Estruch R. Latest evidence of the effects of the Mediterranean diet in prevention of cardiovascular disease. Curr Atheroscler Rep. 2014 Oct;16(10):446.

9. Rakhra V, Galappaththy SL, Bulchandani S, Cabandugama PK. Obesity and the Western Diet: How We Got Here. Mo Med. 2020;117(6):536–8.

10. Kopp W. How Western Diet And Lifestyle Drive The Pandemic Of Obesity And Civilization Diseases. Diabetes Metab Syndr Obes. 2019;12:2221–36.

11. Carrera-Bastos P, Fontes-Villalba M, O'Keefe J, Lindeberg S, Cordain L. The Western diet and lifestyle and diseases of civilization. Res Reports Clin Cardiol. 2011 Mar

1;2:2–15.

12. Myles IA. Fast food fever: reviewing the impacts of the Western diet on immunity. Nutr J. 2014;13(1):61.

13. Ruden DM, Rasouli P, Lu X. Potential long-term consequences of fad diets on health, cancer, and longevity: lessons learned from model organism studies. Technol Cancer Res Treat. 2007 Jun;6(3):247–54.

14. O'Brien KM, Whelan DR, Sandler DP, Hall JE, Weinberg CR. Predictors and long-term health outcomes of eating disorders. PLoS One. 2017;12(7):e0181104.

15. Jensen GL, Mirtallo J, Compher C, Dhaliwal R, Forbes A, Grijalba RF, et al. Adult starvation and disease-related malnutrition: a proposal for etiology-based diagnosis in the clinical practice setting from the International Consensus Guideline Committee. Clin Nutr. 2010 Apr;29(2):151–3.

16. Sidel VW. The public health impact of hunger. Am J Public Health. 1997 Dec;87(12):1921–2.

17. Ke J, Ford-Jones EL. Food insecurity and hunger: A review of the effects on children's health and behaviour. Paediatr Child Health. 2015 Mar;20(2):89–91.

18. Webb P, Stordalen GA, Singh S, Wijesinha-Bettoni R, Shetty P, Lartey A. Hunger and malnutrition in the 21st century. BMJ. 2018 Jun 13;361:2238–2239.

19. Pollard CM, Booth S. Food Insecurity and Hunger in Rich Countries-It Is Time for Action against Inequality. Int J Environ Res Public Health. 2019 May;16(10).

20. Decker D, Flynn M. Food Insecurity and Chronic Disease: Addressing Food Access as a Healthcare Issue. R I Med J (2013). 2018 May;101(4):28–30.

21. Cena H, Calder PC. Defining a Healthy Diet: Evidence for The Role of Contemporary Dietary Patterns in Health and Disease. Nutrients. 2020 Jan;12(2):334

22. Stockley L. Toward public health nutrition strategies in the European Union to implement food based dietary guidelines and to enhance healthier lifestyles. Public Health Nutr. 2001 Apr;4(2A):307–24.

23. Delisle H, Faber M, Revault P. Evidence-based strategies needed to combat malnutrition in Sub-Saharan countries facing different stages of nutrition transition. Public Health Nutr. 2021 Aug;24(12):3577–80.

24. Panuganti KK, Nguyen M, Kshirsagar RK. Obesity. In Treasure Island (FL); 2022.

25. Han SJ, Lee SH. Nontraditional Risk Factors for Obesity in Modern Society. J Obes Metab Syndr. 2021;30(2):93-103.

26. Nammi S, Koka S, Chinnala KM, Boini KM. Obesity: an overview on its current perspectives and treatment options. Nutr J. 2004 Apr;3:3.

27. Loos RJF, Yeo GSH. The genetics of obesity: from discovery to biology. Nat Rev Genet. 2022;23(2):120–33.

28. De Lorenzo A, Gratteri S, Gualtieri P, Cammarano A, Bertucci P, Di Renzo L. Why primary obesity is a disease? J Transl Med. 2019 May;17(1):169.

29. VAGUE J. The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. Am J Clin Nutr. 1956;4(1):20–34.

30. Lavie CJ, Laddu D, Arena R, Ortega FB, Alpert MA, Kushner RF. Healthy Weight and Obesity Prevention: JACC Health Promotion Series. J Am Coll Cardiol. 2018 Sep;72(13):1506–31.

31. van Vliet-Ostaptchouk J V, Nuotio M-L, Slagter SN, Doiron D, Fischer K, Foco L, et al. The prevalence of metabolic syndrome and metabolically healthy obesity in Europe: a collaborative analysis of ten large cohort studies. BMC Endocr Disord. 2014 Feb;14:9.

32. Kim J-Y, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. J Clin Invest. 2007 Sep;117(9):2621–37.

33. Tsatsoulis A, Paschou SA. Metabolically Healthy Obesity: Criteria, Epidemiology, Controversies, and Consequences. Curr Obes Rep. 2020 Jun;9(2):109–20.

34. Blüher M. Metabolically Healthy Obesity. Endocr Rev. 2020 May;41(3).

35. Lin H, Zhang L, Zheng R, Zheng Y. The prevalence, metabolic risk and effects of lifestyle intervention for metabolically healthy obesity: a systematic review and meta-analysis: A PRISMA-compliant article. Medicine (Baltimore). 2017 Nov;96(47):e8838.

36. Kabat GC, Wu WY-Y, Bea JW, Chen C, Qi L, Stefanick ML, et al. Metabolic phenotypes of obesity: frequency, correlates and change over time in a cohort of postmenopausal women. Int J Obes (Lond). 2017 Jan;41(1):170–7.

37. Moussa O, Arhi C, Ziprin P, Darzi A, Khan O, Purkayastha S. Fate of the metabolically healthy obese-is this term a misnomer? A study from the Clinical Practice Research Datalink. Int J Obes (Lond). 2019 May;43(5):1093–101.

38. Magkos F. Metabolically healthy obesity: what's in a name? Am J Clin Nutr. 2019 Sep;110(3):533–9.

39. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. Proc Nutr Soc. 2001 Aug;60(3):329–39.

40. Corvera S. Cellular Heterogeneity in Adipose Tissues. Annu Rev Physiol. 2021 Feb;83:257–78.

41. Cinti S. White, brown, beige and pink: A rainbow in the adipose organ. Curr Opin Endocr Metab Res. 2019 Feb 1;4:29–36.

42. Henry SL, Bensley JG, Wood-Bradley RJ, Cullen-McEwen LA, Bertram JF, Armitage JA. White adipocytes: more than just fat depots. Int J Biochem Cell Biol. 2012 Mar;44(3):435–40.

43. Richard MA, Pallubinsky H, Blondin DP. Functional characterization of human brown adipose tissue metabolism. Biochem J. 2020 Apr;477(7):1261–86.

44. Zhang F, Hao G, Shao M, Nham K, An Y, Wang Q, et al. An Adipose Tissue Atlas: An Image-Guided Identification of Human-like BAT and Beige Depots in Rodents. Cell Metab. 2018;27(1):252-262.e3.

45. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, et al.

Functional brown adipose tissue in healthy adults. N Engl J Med. 2009 Apr;360(15):1518–25.

46. Lidell ME. Brown Adipose Tissue in Human Infants. Handb Exp Pharmacol. 2019;251:107–23.

47. Sacks H, Symonds ME. Anatomical locations of human brown adipose tissue: functional relevance and implications in obesity and type 2 diabetes. Diabetes. 2013 Jun;62(6):1783–90.

48. Cinti S. The adipose organ. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2005 Jul;73(1):9–15.

49. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. Nat Med. 2013 Oct;19(10):1252–63.

50. Gaspar RC, Pauli JR, Shulman GI, Muñoz VR. An update on brown adipose tissue biology: a discussion of recent findings. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2021 Mar 1;320(3):E488-E495

51. Cinti S. Pink Adipocytes. Trends Endocrinol Metab. 2018 Sep;29(9):651–66.

52. Bjørndal B, Burri L, Staalesen V, Skorve J, Berge RK. Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. J Obes. 2011;2011:490650.

53. Chusyd DE, Wang D, Huffman DM, Nagy TR. Relationships between Rodent White Adipose Fat Pads and Human White Adipose Fat Depots. Front Nutr. 2016 Apr 19;3:10.

54. Kleinert M, Clemmensen C, Hofmann SM, Moore MC, Renner S, Woods SC, et al. Animal models of obesity and diabetes mellitus. Nat Rev Endocrinol. 2018 Mar;14(3):140-162

55. Wajchenberg BL, Giannella-Neto D, da Silva ME, Santos RF. Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. Horm Metab Res = Horm und Stoffwechselforsch = Horm Metab. 2002;34(11–12):616–21.

56. Snijder MB, Zimmet PZ, Visser M, Dekker JM, Seidell JC, Shaw JE. Independent and opposite associations of waist and hip circumferences with diabetes hypertension and dyslipidemia: the AusDiab Study. Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes. 2004 Mar;28(3):402–9.

57. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. Arch Med Sci. 2013/02/10. 2013 Apr 20;9(2):191–200.

58. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. Trends Endocrinol Metab. 2000 Oct;11(8):327–32.

59. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature. 1998 Oct;395(6704):763–70.

60. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. J Clin Endocrinol Metab. 2004 Jun;89(6):2548–56.

61. Trayhurn P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. Acta Physiol Scand. 2005 Aug;184(4):285–93.

62. Scarpellini E, Tack J. Obesity and metabolic syndrome: an inflammatory condition. Dig Dis. 2012;30(2):148–53.

63. Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. Clin Endocrinol (Oxf). 2006 Apr;64(4):355–65.

64. Aaron P. Frank, Roberta de Souza Santos, Biff F. Palmer, Deborah J. Clegg, Determinants of body fat distribution in humans may provide insight about obesity-related health risks, Journal of Lipid Research, 60, 10, 2019, 1710-1719.

65. Pasquali R, Gambineri A, Pagotto U. The impact of obesity on reproduction in women with polycystic ovary syndrome. BJOG. 2006 Oct;113(10):1148–59.

66. Stenkula KG, Erlanson-Albertsson C. Adipose cell size: importance in health and disease. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2018 Aug 1;315(2):284-295.

67. Jo J, Gavrilova O, Pack S, Jou W, Mullen S, Sumner AE, et al. Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. PLoS Comput Biol. 2009

Mar;5(3):e1000324.

68. Yang J, Eliasson B, Smith U, Cushman SW, Sherman AS. The size of large adipose cells is a predictor of insulin resistance in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. Obesity (Silver Spring). 2012 May;20(5):932–8.

69. Hoffstedt J, Arner E, Wahrenberg H, Andersson DP, Qvisth V, Löfgren P, et al. Regional impact of adipose tissue morphology on the metabolic profile in morbid obesity. Diabetologia. 2010;53(12):2496–503.

70. Dulloo AG, Jacquet J, Solinas G, Montani J-P, Schutz Y. Body composition phenotypes in pathways to obesity and the metabolic syndrome. Int J Obes (Lond). 2010 Dec;34 Suppl 2:S4-17.

71. Vishvanath L, Gupta RK. Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity. J Clin Invest. 2019 Oct 1;129(10):4022–31.

72. Wang F, Mullican SE, DiSpirito JR, Peed LC, Lazar MA. Lipoatrophy and severe metabolic disturbance in mice with fat-specific deletion of PPARγ. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Nov;110(46):18656–61.

73. Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, et al. Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. Nature. 1999 Dec;402(6764):880–3.

74. Kim SM, Lun M, Wang M, Senyo SE, Guillermier C, Patwari P, et al. Loss of White Adipose Hyperplastic Potential Is Associated with Enhanced Susceptibility to Insulin Resistance. Cell Metab. 2014;20(6):1049–58.

75. Landgraf K, Rockstroh D, Wagner I V, Weise S, Tauscher R, Schwartze JT, et al. Evidence of early alterations in adipose tissue biology and function and its association with obesity-related inflammation and insulin resistance in children. Diabetes. 2015 Apr;64(4):1249–61.

76. Arner E, Westermark PO, Spalding KL, Britton T, Rydén M, Frisén J, et al. Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. Diabetes. 2010 Jan;59(1):105–9.

77. Cotillard A, Poitou C, Torcivia A, Bouillot J-L, Dietrich A, Klöting N, et al. Adipocyte size threshold matters: link with risk of type 2 diabetes and improve insulin resistance after gastric bypass. J Clin Endocrinol Metab. 2014 Aug;99(8):E1466-70.

78. Veilleux A, Caron-Jobin M, Noël S, Laberge PY, Tchernof A. Visceral adipocyte hypertrophy is associated with dyslipidemia independent of body composition and fat distribution in women. Diabetes. 2011 May;60(5):1504–11.

79. Muir LA, Neeley CK, Meyer KA, Baker NA, Brosius AM, Washabaugh AR, et al. Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: Correlations with diabetes in human obesity. Obesity (Silver Spring). 2016 Mar;24(3):597–605.

80. Duan Y, Zeng L, Zheng C, Song B, Li F, Kong X, et al. Inflammatory Links Between High Fat Diets and Diseases. Vol. 9, Frontiers in Immunology . 2018.

81. Carneiro L, Pellerin L. Nutritional Impact on Metabolic Homeostasis and Brain Health. Front Neurosci. 2021;15:767405.

82. Antonioli L, Pellegrini C, Fornai M, Tirotta E, Gentile D, Benvenuti L, et al. Colonic motor dysfunctions in a mouse model of high-fat diet-induced obesity: an involvement of A(2B) adenosine receptors. Purinergic Signal. 2017 Dec;13(4):497–510.

83. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. Nature. 2013;500(7464):541–6.

84. Bleau C, Karelis AD, St-Pierre DH, Lamontagne L. Crosstalk between intestinal microbiota, adipose tissue and skeletal muscle as an early event in systemic low-grade inflammation and the development of obesity and diabetes. Diabetes Metab Res Rev. 2015 Sep;31(6):545–61.

85. Konrad D, Wueest S. The gut-adipose-liver axis in the metabolic syndrome. Physiology (Bethesda). 2014 Sep;29(5):304–13.

86. Kumar A, Sundaram K, Mu J, Dryden GW, Sriwastva MK, Lei C, et al. High-fat diet-induced upregulation of exosomal phosphatidylcholine contributes to insulin resistance. Nat Commun. 2021;12(1):213.

87. Lee YS, Li P, Huh JY, Hwang IJ, Lu M, Kim JI, et al. Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet-inducedi nsulin resistance. Diabetes. 2011 Oct;60(10):2474–83.

88. Nordmann TM, Dror E, Schulze F, Traub S, Berishvili E, Barbieux C, et al. The Role of Inflammation in β-cell Dedifferentiation. Sci Rep. 2017 Jul;7(1):6285.

89. Guasch-Ferré M, Babio N, Martínez-González MA, Corella D, Ros E, Martín-Peláez S, et al. Dietary fat intake and risk of cardiovascular disease and all-cause mortality in a population at high risk of cardiovascular disease. Am J Clin Nutr. 2015 Dec;102(6):1563–73.

90. Korakas E, Dimitriadis G, Raptis A, Lambadiari V. Dietary Composition and Cardiovascular Risk: A Mediator or a Bystander? Nutrients. 2018 Dec;10(12).211-221

91. Zhao Y, Xiang L, Liu Y, Niu M, Yuan J, Chen H. Atherosclerosis Induced by a High-Cholesterol and High-Fat Diet in the Inbred Strain of the Wuzhishan Miniature Pig. Anim Biotechnol. 2018 Apr;29(2):110–8.

92. Willett WC. Dietary fats and coronary heart disease. J Intern Med. 2012 Jul;272(1):13–24.

93. Mauro C, Smith J, Cucchi D, Coe D, Fu H, Bonacina F, et al. Obesity-Induced Metabolic Stress Leads to Biased Effector Memory CD4(+) T Cell Differentiation via PI3K p110δ-Akt-Mediated Signals. Cell Metab. 2017 Mar;25(3):593–609.

94. Martins MA, Catta-Preta M, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB, Brunini TCM, Mendes-Ribeiro AC. High fat diets modulate nitric oxide biosynthesis and antioxidant defence in red blood cells from C57BL/6 mice. Arch Biochem Biophys. 2010 Jul;499(1–2):56–61.

95. Gulhane M, Murray L, Lourie R, Tong H, Sheng YH, Wang R, et al. High Fat Diets Induce Colonic Epithelial Cell Stress and Inflammation that is Reversed by IL-22. Sci Rep. 2016 Jun;6:28990.

96. Li X, Wei X, Sun Y, Du J, Li X, Xun Z, et al. High-fat diet promotes experimental colitis by inducing oxidative stress in the colon. Am J Physiol Gastrointest Liver

Physiol. 2019 Oct;317(4):G453–62.

97. Wang B, Kong Q, Li X, Zhao J, Zhang H, Chen W, et al. A High-Fat Diet Increases Gut Microbiota Biodiversity and Energy Expenditure Due to Nutrient Difference. Nutrients. 2020 Oct;12(10).

98. Cozma-Petruţ A, Loghin F, Miere D, Dumitraşcu DL. Diet in irritable bowel syndrome: What to recommend, not what to forbid to patients! World J Gastroenterol. 2017 Jun;23(21):3771–83.

99. Duffy CM, Hofmeister JJ, Nixon JP, Butterick TA. High fat diet increases cognitive decline and neuroinflammation in a model of orexin loss. Neurobiol Learn Mem. 2019 Jan;157:41–7.

100. Hou J, Jeon B, Baek J, Yun Y, Kim D, Chang B, et al. High fat diet-induced brain damaging effects through autophagy-mediated senescence, inflammation and apoptosis mitigated by ginsenoside F1-enhanced mixture. J Ginseng Res. 2022;46(1):79–90.

101. Kothari V, Luo Y, Tornabene T, O'Neill AM, Greene MW, Geetha T, et al. High fat diet induces brain insulin resistance and cognitive impairment in mice. Biochim Biophys acta Mol basis Dis. 2017 Feb;1863(2):499–508.

102. Zhao Y, Tan YS, Aupperlee MD, Langohr IM, Kirk EL, Troester MA, et al. Pubertal high fat diet: effects on mammary cancer development. Breast Cancer Res. 2013;15(5):R100. 654-662

103. Pedersen KB, Pulliam CF, Patel A, Del Piero F, Watanabe TTN, Wankhade UD, et al. Liver tumorigenesis is promoted by a high saturated fat diet specifically in male mice and is associated with hepatic expression of the proto-oncogene Agap2 and enrichment of the intestinal microbiome with Coprococcus. Carcinogenesis. 2019 Apr;40(2):349–59.

104. Cowen S, McLaughlin SL, Hobbs G, Coad J, Martin KH, Olfert IM, et al. High-Fat, High-Calorie Diet Enhances Mammary Carcinogenesis and Local Inflammation in MMTV-PyMT Mouse Model of Breast Cancer. Cancers (Basel). 2015 Jun;7(3):1125–42.

105. Toorang F, Sasanfar B, Hekmatdoost A, Narmcheshm S, Hadji M, Ebrahimpour-Koujan S, et al. Macronutrients Intake and Stomach Cancer Risk in Iran: A Hospital-based Case-Control Study. J Res Health Sci. 2021 Jan;21(1):e00507.

106. Hu J, La Vecchia C, Negri E, de Groh M, Morrison H, Mery L. Macronutrient intake and stomach cancer. Cancer Causes Control. 2015 Jun;26(6):839–47.

107. Arita S, Kinoshita Y, Ushida K, Enomoto A, Inagaki-Ohara K. High-fat diet feeding promotes stemness and precancerous changes in murine gastric mucosa mediated by leptin receptor signaling pathway. Arch Biochem Biophys. 2016 Nov;610:16–24.

108. Abbott DH, Dumesic DA, Eisner JR, Colman RJ, Kemnitz JW. Insights into the development of polycystic ovary syndrome (PCOS) from studies of prenatally androgenized female rhesus monkeys. Trends Endocrinol Metab. 1998;9:62–7.

109. Recabarren SE, Padmanabhan V, Codner E, Lobos A, Duran C, Vidal M, et al. Postnatal developmental consequences of altered insulin sensitivity in female sheep treated prenatally with testosterone. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2005;289:E801–6.

110. Osuka S, Nakanishi N, Murase T, Nakamura T, Goto M, Iwase A, et al. Animal models of polycystic ovary syndrome: A review of hormone-induced rodent models focused on hypothalamus-pituitary-ovary axis and neuropeptides. Reprod Med Biol. 2018 Dec 28;18(2):151–60.

111. Patel R, Shah G. High-fat diet exposure from pre-pubertal age induces polycystic ovary syndrome (PCOS) in rats. Reproduction. 2018;155(2):139–49.

112. Hilal G, Fatma T, Ferruh Y, Sabire G, Yüksel A. Effect of high-fat diet on the various morphological parameters of the ovary. Anat Cell Biol. 2020/03/03. 2020 Mar;53(1):58–67.

113. Hussain MA, Abogresha NM, Hassan R, Tamany DA, Lotfy M. Effect of feeding a high-fat diet independently of caloric intake on reproductive function in diet-induced obese female rats. Arch Med Sci. 2016;12(4):906–14.

114. Sohrabi M, Roushandeh AM, Alizadeh Z, Vahidinia A, Vahabian M, Hosseini M.

Effect of a high fat diet on ovary morphology, in vitro development, in vitro fertilisation rate and oocyte quality in mice. Singapore Med J. 2015 Oct;56(10):573–9.

115. Marić A, Kačarević ŽP, Čekić N, Šerić V, Radić R. Effects of between generations changes in nutrition type on vaginal smear and serum lipids in Sprague-Dawley rats. J Matern neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet. 2016;29(9):1491–7.

116. Skaznik-Wikiel ME, Swindle DC, Allshouse AA, Polotsky AJ, McManaman JL. High-Fat Diet Causes Subfertility and Compromised Ovarian Function Independent of Obesity in Mice. Biol Reprod. 2016 May;94(5):108.

117. Hohos NM, Cho KJ, Swindle DC, Skaznik-Wikiel ME. High-fat diet exposure, regardless of induction of obesity, is associated with altered expression of genes critical to normal ovulatory function. Mol Cell Endocrinol. 2018 Jul;470:199–207.

118. Nteeba J, Ortinau L, Perfield J, Keating A. Diet-Induced Obesity Alters Immune Cell Infiltration and Expression of Inflammatory Cytokine Genes in Mouse Ovarian and Peri-Ovarian Adipose Depot Tissues. Mol Reprod Dev. 2013 Nov 1;80.

119. Gao X, Li Y, Ma Z, Jing J, Zhang Z, Liu Y, et al. Obesity induces morphological and functional changes in female reproductive system through increases in NF-κB and MAPK signaling in mice. Reprod Biol Endocrinol. 2021 Sep 24;19(1):148.

120. Tafazoli M, Fazeli E, Dadgar S, Nematy M. The Association of the Dietary Fat and Functional Ovarian Cysts in Women of Reproductive Age Referring to Three Hospitals in Mashhad, Iran, 2014. Int J community based Nurs midwifery. 2016 Apr;4(2):148–56.

121. Colombo J, Gustafson KM, Carlson SE. Critical and Sensitive Periods in Development and Nutrition. Ann Nutr Metab. 2020/06/18. 2019;75 Suppl 1(Suppl 1):34–42.

122. Marciniak A, Patro-Małysza J, Kimber-Trojnar Ż, Marciniak B, Oleszczuk J, Leszczyńska-Gorzelak B. Fetal programming of the metabolic syndrome. Taiwan J Obstet Gynecol. 2017;56(2):133–8.

123. Barker DJ. In utero programming of chronic disease. Clin Sci (Lond). 1998

Aug;95(2):115–28.

124. Kwon EJ, Kim YJ. What is fetal programming?: a lifetime health is under the control of in utero health. Obstet Gynecol Sci. 2017 Nov;60(6):506–19.

125. Jansson T, Powell TL. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. Clin Sci (Lond). 2007 Jul;113(1):1–13.

126. Cunningham S, Cameron IT. Consequences of fetal growth restriction during childhood and adult life. Curr Obstet Gynaecol. 2003;13(4):212–7.

127. Akhaphong B, Gregg B, Kumusoglu D, Jo S, Singer K, Scheys J, et al. Maternal High-Fat Diet During Pre-Conception and Gestation Predisposes Adult Female Offspring to Metabolic Dysfunction in Mice. Front Endocrinol (Lausanne). 2021;12:780-787.

128. Nicholas LM, Ozanne SE. Early life programming in mice by maternal overnutrition: mechanistic insights and interventional approaches. Philos Trans R Soc London Ser B, Biol Sci. 2019 Apr;374(1770):201-209

129. Preguiça I, Alves A, Nunes S, Fernandes R, Gomes P, Viana SD, et al. Diet-induced rodent models of obesity-related metabolic disorders-A guide to a translational perspective. Obes Rev an Off J Int Assoc Study Obes. 2020 Dec;21(12):e13081.

130. Hintze KJ, Benninghoff AD, Cho CE, Ward RE. Modeling the Western Diet for Preclinical Investigations. Adv Nutr. 2018 May;9(3):263–71.

131. Sullivan EL, Grove KL. Metabolic imprinting in obesity. Forum Nutr. 2010;63:186–94.

132. Speakman JR. Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. Int J Obes. 2019;43(8):1491–2.

133. McCarthy CM. Randomized controlled trials. Plast Reconstr Surg. 2011 Apr;127(4):1707–12.

134. Fron Chabouis H, Chabouis F, Gillaizeau F, Durieux P, Chatellier G, Ruse ND, et al. Randomization in clinical trials: stratification or minimization? The HERMES free

simulation software. Clin Oral Investig. 2014 Jan;18(1):25–34.

135. Kim Y, Je Y, Giovannucci EL. Association between dietary fat intake and mortality from all-causes, cardiovascular disease, and cancer: A systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. Clin Nutr. 2021 Mar;40(3):1060–70.

136. Ventrella D, Ashkenazi N, Elmi A, Allegaert K, Aniballi C, DeLise A, et al. Animal Models for In Vivo Lactation Studies: Anatomy, Physiology and Milk Compositions in the Most Used Non-Clinical Species: A Contribution from the ConcePTION Project. Animan open access J from MDPI. 2021;11(3):1-20.

137. Dickerson RN, Patel JJ, McClain CJ. Protein and Calorie Requirements Associated With the Presence of Obesity. Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr. 2017 Apr;32(1_suppl):86-93.

138. Cruz G, Fernandois D, Paredes AH. Ovarian function and reproductive senescence in the rat: role of ovarian sympathetic innervation. Reproduction. 2017;153(2):59–68.

139. Shiroma ME, Damous LL, Cotrim FP, Roa CL, Cipolla-Neto J, Reiter RJ, et al. Pretreatment with melatonin improves ovarian tissue cryopreservation for transplantation. Reprod Biol Endocrinol. 2021;19(1):17.

140. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev Y V. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. Lab Invest. 2017 Jan;97(1):4–13.

141. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). Microsc Res Tech. 2000 Aug;50(3):184–95.

142. Morrison LJ, Marcinkiewicz JL. Tumor Necrosis Factor α Enhances Oocyte/Follicle Apoptosis in the Neonatal Rat Ovary1. Biol Reprod. 2002;66(2):450–7.

143. Pluta W, Dudzińska W, Lubkowska A. Metabolic Obesity in People with Normal Body Weight (MONW)—Review of Diagnostic Criteria. Vol. 19, International Journal of Environmental Research and Public Health. 2022;9:214-218.

144. Zhou Z, Lin Q, Xu X, Illahi GS, Dong C, Wu X. Maternal high-fat diet impairs follicular development of offspring through intraovarian kisspeptin/GPR54 system. Reprod Biol Endocrinol. 2019;17(1):13.

145. Pampanini V, Jahnukainen K, Sahlin L, Germani D, Puglianiello A, Cianfarani S, et al. Impact of uteroplacental insufficiency on ovarian follicular pool in the rat. Reprod Biol Endocrinol. 2019;17(1):10.

146. Mannerås L, Cajander S, Holmäng A, Seleskovic Z, Lystig T, Lönn M, et al. A New Rat Model Exhibiting Both Ovarian and Metabolic Characteristics of Polycystic Ovary Syndrome. Endocrinology. 2007 Aug 1;148(8):3781–91.

147. Kalem Z, Namlı Kalem M, Anadol E, Bakırarar B, Yılmaz C, Elmas Ç, et al. Maternal nutrition and reproductive functions of female and male offspring. Reproduction. 2018;156(4):353–64.

148. Léveillé P, Tarrade A, Dupont C, Larcher T, Dahirel M, Poumerol E, et al. Maternal high-fat diet induces follicular atresia but does not affect fertility in adult rabbit offspring. J Dev Orig Health Dis. 2014;5(2):88–97.

149. Yan S, Wang F, Shi Q. The effect of maternal high-fat-diet mediated oxidative stress on ovarian function in mice offspring. Exp Ther Med. 2020 Dec;20(6):135-42.

150. Xu M, Che L, Yang Z, Zhang P, Shi J, Li J, et al. Effect of High Fat Dietary Intake during Maternal Gestation on Offspring Ovarian Health in a Pig Model. Nutrients 2016;8(8):498-516.

151. Paula VG, Vesentini G, Sinzato YK, Moraes-Souza RQ, Volpato GT, Damasceno DC. Intergenerational high-fat diet impairs ovarian follicular development in rodents: a systematic review and meta-analysis. Nutr Rev. 2022 Mar;80(4):889–903.

152. Connor KL, Vickers MH, Beltrand J, Meaney MJ, Sloboda DM. Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function. J Physiol. 2012 May;590(9):2167–80.

153. Hsueh AJW, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BCJM. Intraovarian control of early folliculogenesis. Endocr Rev. 2015 Feb;36(1):1–24.

154. Chang RJ, Cook-Andersen H. Disordered follicle development. Mol Cell Endocrinol. 2013 Jul;373(1–2):51–60.

155. Zeydabadi Nejad S, Ramezani Tehrani F, Zadeh-Vakili A. The Role of Kisspeptin in

Female Reproduction. Int J Endocrinol Metab. 2017 ;15(3): 443-57.

156. Hu K-L, Zhao H, Chang H-M, Yu Y, Qiao J. Kisspeptin/Kisspeptin Receptor System in the Ovary. Front Endocrinol (Lausanne). 2017;8:365-379

157. Araújo JFP de, Podratz PL, Sena GC, Merlo E, Freitas-Lima LC, Ayub JGM, et al. The obesogen tributyltin induces abnormal ovarian adipogenesis in adult female rats. Toxicol Lett. 2018;295-313.

158. McCloskey CW, Cook DP, Kelly BS, Azzi F, Allen CH, Forsyth A, et al. Metformin Abrogates Age-Associated Ovarian Fibrosis. Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res. 2020 Feb;26(3):632–42.

159. Briley SM, Jasti S, McCracken JM, Hornick JE, Fegley B, Pritchard MT, et al. Reproductive age-associated fibrosis in the stroma of the mammalian ovary. Reproduction. 2016 Sep;152(3):245–60.

160. Wu R, der Hoek KH, Ryan NK, Norman RJ, Robker RL. Macrophage contributions to ovarian function. Hum Reprod Update. 2004;10(2):119–33.

161. Hohos NM, Elliott EM, Cho KJ, Lin IS, Rudolph MC, Skaznik-Wikiel ME. High-fat diet-induced dysregulation of ovarian gene expression is restored with chronic omega-3 fatty acid supplementation. Mol Cell Endocrinol. 2020;499:110-115.

162. Asemota O, Thornton K, Merhi Z, Berger DS, Williams L, Seki Y, et al. Monocyte chemotactic protein-1 plays a role in ovarian dysfunction related to high-fat diet-induced obesity. Syst Biol Reprod Med. 2020 Jul 3;66(4):236–43.

163. Roby KF, Weed J, Lyles R, Terranova PF. Immunological evidence for a human ovarian tumor necrosis factor-alpha. J Clin Endocrinol Metab. 1990;71(5):1096–102.

164. La Vignera S, Condorelli R, Bellanca S, La Rosa B, Mousaví A, Busà B, et al. Obesity is associated with a higher level of pro-inflammatory cytokines in follicular fluid of women undergoing medically assisted procreation (PMA) programs. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2011 Mar;15(3):267–73.

165. Biswas SK. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:569-575.

166. Kulbe H, Thompson R, Wilson JL, Robinson S, Hagemann T, Fatah R, et al. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells. Cancer Res. 2007 Jan;67(2):585–92.

167. Akamine EH, Marçal AC, Camporez JP, Hoshida MS, Caperuto LC, Bevilacqua E, et al. Obesity induced by high-fat diet promotes insulin resistance in the ovary. J Endocrinol. 2010;206(1):65–74.

168. Hohos NM, Skaznik-Wikiel ME. High-Fat Diet and Female Fertility. Endocrinology. 2017 Aug 1;158(8):2407–19.

169. Makki K, Froguel P, Wolowczuk I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. ISRN Inflamm. 2013 Dec;2013:139239. 222-229

170. Ye J, Gao Z, Yin J, He Q. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2007 Oct;293(4):E1118-28.

171. Litzenburger T, Huber E-K, Dinger K, Wilke R, Vohlen C, Selle J, et al. Maternal high-fat diet induces long-term obesity with sex-dependent metabolic programming of adipocyte differentiation, hypertrophy and dysfunction in the offspring. Clin Sci (Lond). 2020 Apr;134(7):921–39.

172. Šnajder D, Perić Kačarević Ž, Grgić A, Bijelić N, Fenrich M, Belovari T, et al. Effect of different combination of maternal and postnatal diet on adipose tissue morphology in male rat offspring. J Matern neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet. 2019 Jun;32(11):1838–46.

173. Sellayah D, Thomas H, Lanham SA, Cagampang FR. Maternal Obesity During Pregnancy and Lactation Influences Offspring Obesogenic Adipogenesis but Not Developmental Adipogenesis in Mice. Nutrients. 2019 Feb 27;11(3):495.

174. Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, et al. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. Mol Cell. 1999 Feb;3(2):151–8.

175. Koh YJ, Park B-H, Park J-H, Han J, Lee I-K, Park JW, et al. Activation of PPAR gamma induces profound multilocularization of adipocytes in adult mouse white adipose tissues. Exp Mol Med. 2009 Dec;41(12):880–95.

176. He M-Q, Wang J-Y, Wang Y, Sui J, Zhang M, Ding X, et al. High-fat diet-induced adipose tissue expansion occurs prior to insulin resistance in C57BL/6J mice. Chronic Dis Transl Med [Internet]. 2020;6(3):198–207.

177. Bilal M, Nawaz A, Kado T, Aslam MR, Igarashi Y, Nishimura A, et al. Fate of adipocyte progenitors during adipogenesis in mice fed a high-fat diet. Mol Metab. 2021;54:101-13

178. Rudnicki M, Abdifarkosh G, Rezvan O, Nwadozi E, Roudier E, Haas TL. Female Mice Have Higher Angiogenesis in Perigonadal Adipose Tissue Than Males in Response to High-Fat Diet. Front Physiol. 2018;9:14-22.

179. Saullo CM, Sinzato YK, Paula VG, Gallego FQ, Corrente JE, Iessi IL, et al. Exposure to maternal hyperglycemia and high-fat diet consumption after weaning in rats: repercussions on periovarian adipose tissue. J Dev Orig Health Dis. 2021;1–8.

180. Butruille L, Marousez L, Pourpe C, Oger F, Lecoutre S, Catheline D, et al. Maternal high-fat diet during suckling programs visceral adiposity and epigenetic regulation of adipose tissue stearoyl-CoA desaturase-1 in offspring. Int J Obes (Lond). 2019 Dec;43(12):2381–93.

181. Summerfield M, Zhou Y, Zhou T, Wu C, Alpini G, Zhang KK, et al. A long-term maternal diet transition from high-fat diet to normal fat diet during pre-pregnancy avoids adipose tissue inflammation in next generation. PLoS One. 2018;13(12):233-245

182. Proute MC, Kothur N, Georgiou P, Serhiyenia T, Shi W, Kerolos ME, et al. The Effect of Statin Therapy on Inflammatory Biomarkers: A Systematic Review. Cureus. 2021 Sep 25;13(9):18273–78

183. Karbalaee-Hasani A, Khadive T, Eskandari M, Shahidi S, Mosavi M, Nejadebrahimi Z, et al. Effect of Metformin on Circulating Levels of Inflammatory Markers in Patients With Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized

Controlled Trials. Ann Pharmacother. 2021 Sep;55(9):1096–109.

184. McLaughlin TM, Liu T, Yee G, Abbasi F, Lamendola C, Reaven GM, et al. Pioglitazone increases the proportion of small cells in human abdominal subcutaneous adipose tissue. Obesity (Silver Spring). 2010 May;18(5):926–31.

185. Larson-Meyer DE, Heilbronn LK, Redman LM, Newcomer BR, Frisard MI, Anton S, et al. Effect of calorie restriction with or without exercise on insulin sensitivity, beta-cell function, fat cell size, and ectopic lipid in overweight subjects. Diabetes Care. 2006 Jun;29(6):1337–44.

186. Samba Garba M, Bouderbala S. Olive cake reduces obesity by decreasing epididymal adipocyte size, inhibiting oxidative stress and pancreatic lipase, in rat fed high fat diet. Nutr Food Sci. 2022; 55:218-226;

187. Wong SK, Chin K-Y, Ima-Nirwana S. Vitamin C: A Review on its Role in the Management of Metabolic Syndrome. Int J Med Sci. 2020 Jun 27;17(11):1625–38.

188. Hoffstedt J, Andersson DP, Eriksson Hogling D, Theorell J, Näslund E, Thorell A, et al. Long-term Protective Changes in Adipose Tissue After Gastric Bypass. Diabetes Care. 2017 Jan;40(1):77–84.

# 11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Nenad Čekić

Datum i mjesto rođenja: 30. ožujka 1990.

Adresa: Mirogojska 27, 32000 Vukovar, Republika Hrvatska

Elektronička pošta: nenadcekic90@gmail.com

ŠKOLOVANJE

1996. – 2004. – IV. Osnovna škola Vukovar

2004. – 2008. – Gimnazija Vukovar

2008. – 2014. – Medicinski fakultet Osijek, Sveučilišni integrirani preddiplomski i diplomski studij medicine

2020./21. – Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Poslijediplomski specijalistički studij Opća kirurgija

2015. – 2022. – Medicinski fakultet Osijek – Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo

RADNO ISKUSTVO

Listopad 2014. – ožujak 2015. – Liječnik pripravnik – Dom zdravlja Vukovar

ožujak 2015. – ožujak. 2021. – Naslovni asistent na Katedri za anatomiju i neuroznanost, Medicinski fakultet Osijek

03.2018. – Naslovni asistent na Katedri za anatomiju, histologiju, embriologiju, patološku anatomiju i patološku fiziologiju Fakulteta za Dentalnu medicinu i zdravstvo Osijek

svibanj 2015. – ožujak 2021. - Specijalizant opće kirurgije, Nacionalna memorijalna bolnica Vukovar

Ožujak 2021. – Specijalist opće kirurgije, Nacionalna memorijalna bolnica Vukovar

NAGRADE

2018. – Dekanova nagrada, Medicinski fakultet Osijek

OBJAVLJENI RADOVI:

**Čekić N**, Grgić A, Kokot A, Mujkić R, Šnajder Mujkić D, Bijelić N, Sablić M. Influence of Maternal Diet and Intergenerational Change in Diet Type on Ovarian and Adipose Tissue Morphology in Female Rat Offspring. Medicina. 2022; 58(7):854.

Marić A, Kačarević ŽP, **Čekić N**, Šerić V, Radić R. Effects of between generations changes in nutrition type on vaginal smear and serum lipids in Sprague-Dawley rats. J Matern Fetal Neonatal Med. 2016;29(9):1491-7

Manojlović D, **Čekić N**, Palinkaš M. Left paraduodenal hernia - A diagnostic challenge: Case report. Int J Surg Case Rep. 2021 Aug;85:106138