UTJECAJ PREHRANE BOGATE MASTIMA NA OBUJAM I STRUKTURU KOŠTANOG TKIVA TE NA PARENHIM JETRE MUŠKIH POTOMAKA ŠTAKORA

Perić Kačarević, Željka

Doctoral thesis / Disertacija

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:732348

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

Željka Perić Kačarević

UTJECAJ PREHRANE BOGATE MASTIMA NA OBUJAM I STRUKTURU KOŠTANOG TKIVA TE NA PARENHIM JETRE MUŠKIH POTOMAKA ŠTAKORA

Doktorska disertacija

Osijek, 2016.

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Olga Cvijanović, dr.med.

Rad ima 118 stranica.

Disertacija je izrađena u laboratoriju za histologiju i embriologiju te u laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek. Histomorfometrijska analiza koštanog tkiva petog slabinskog kralješka te imunohistokemijska analiza koštanog tkiva i parenhima jetre, učinjena je u laboratoriju Zavoda za anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr.sc. Olgi Cvijanović, dr. med. na strpljivom vodstvu pri izradi disertacije te na mudrim savjetima i iskustvu koji su pomogli u oblikovanju rada te sam također zahvalna na stručnim savjetima i praktičnoj pomoći Snježani Šimac Vorkapić med.lab.ing. i Mariji Mršić lab.teh. iz laboratorija za imunohistokemiju Zavoda za anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

Zahvaljujem sumentoru prof. dr. sc. Radivoju Radiću, dr. med. na praktičnim i korisnim idejama bez kojih izrada rada ne bi bila moguća.

Zahvalna sam prof. dr. sc. Tatjani Belovari, dr. med. i kolegi dr. sc. Nikoli Bijeliću, dr.med. na mudrim savjetima i predivnoj suradnji na različitim aspektima ovog istraživanja.

Zahvalana sam i gospođi Danici Matić, med. lab. ing. za neprocjenjivu pomoć u pripremi histoloških preparata.

Zahvalna sam dr. sc. Valeriji Blažević, dr. med. na nesebičnoj pomoći pri patohistološkoj analizi dijela disertacije te na predivnoj suradnji.

Zahvalna sam kolegicama Anđeli Grgić, dr.med., Dariji Šnajder, dr.med. i dr. sc. Aniti Čosić, mag. ing. proc. za praktičnu pomoć pri provođenju pokusa nad životinjama te na nevjerojatnoj sposobnosti da radnu atmosferu pretvore u ugodno prijateljsko druženje.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima.

Hvala mojem suprugu Andreju i malom sinu Janu na podršci, ljubavi i velikom razumijevanju.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Pretilost 1

1.2. Masno tkivo 2

1.2.1. Uloga masnog tkiva u upalnim procesima kod pretilosti 3

1.3. Utjecaj majčine ishrane za vrijeme trudnoće i laktacije na razvoj pretilosti kod potomka 4

1.4. Masno tkivo i koštani sustav 6

1.4.1. Upalno djelovanje citokina na pregradnju koštanog tkiva 8

1.4.3. Utjecaj majčine ishrane i postnatalne dijete na koštani sustav 10

1.5. Masno tkivo i jetra 11

1.5.3. Upalno djelovanje citokina na jetru 12

1.6. Obrazloženje korištenja životinjskog modela u ovom istraživanju 14

2. HIPOTEZA 16

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 17

4.1. Ustroj istraživanja 18

4.2. Materijal 21

4. 2. 1. Vaganje i računanje ITM-a (indeks tjelesne mase) 21

4. 2. 2. Analiza uzorka krvi 21

4. 2. 3. Analiza petog slabinskog kralješka 22

4. 2. 4. Analiza parenhima jetre 26

4. 2. 5. Semikvantifikacija imunohistokemijskog intenziteta 28

4. 2. 6. Statistička analiza 28

5. REZULTATI 30

5.1. Tjelesna težina, ITM (indeks tjelesne mase) i težina izoliranih organa 30

5. 2. Biokemijska analiza seruma 44

5. 3. Analiza petog slabinskog kralješka 51

5. 3. 1. Histomorfometrijska analiza koštanog tkiva 52
5. 3. 2. Imunohistokemija analiza koštanog tkiva 61
5. 3 3. Povezanost između vrijednosti imunohistokemijskog obojenja TNF-alfa u koštanoj srži i histomorfometrijske paramatara petog slabinskog kralješka 65
5. 4. Analiza parenhima jetre 66
5. 4. 1. Stupanj oštećenja jetrenog parenhima 66
5. 4. 2. Imunohistokemijska analiza na TNF-alfa 68
6. RASPRAVA 72
6.1. Tjelesna težina i indeks tjelesne mase u muških potomaka štakora 72
6. 2. Analiza uzorka krvi 74
6. 3. Analiza petog slabinskog kralješka 75
6. 4. Analiza parenhima jetre 78
6.5. Nova područja istraživanja koja otvara ova disertacija 80
7. ZAKLJUČCI 82
8. SAŽETAK 84
9. SUMMARY 86
10. LITERATURA 88
11. ŽIVOTOPIS 112

KRATICE

ALT - Alanin-aminotransferaza

AP-1 – aktivator proteina 1

AST – Aspartat-aminotransferaza

B.Ar – područje kosti

BS / TV – gustoća površine kosti

BV / TV – gustoća volumena kosti

BMD – koštana mineralna gustoća (eng. bone mineral density)

CD – kontrolna dijeta, standarno hranjena skupina (eng. control diet)

CD - CD – standardno hranjeni potomci od standardno hranjenih majki

CD - HFD – standardno hranjeni potomci od masno hranjenih majki

Ct.Th – debljina kortikalne kosti

CV/TV – ukupni volumen kortikalne kosti

DAB – 3,3'-diaminobenzidin

DOHaD model – podrijetlo razvoja zdravlja i bolesti (eng. Developmental origins of health and disease)

HCC – hepatocelularni karcinom

H_2O_2 – vodikov peroksid

HFD – masna dijeta, skupina hranjena dijetom visokog udjela masnoće (eng. high fat diet)

HFD-CD – standardno hranjeni potomci od masno hranjenih majki

HFD-HFD – masno hranjeni potomci od masno hranjenih majki

HRP – peroksidaza iz hrena

IHC – imunohistokemija

IL-6 – Interleukin 6

IR – inzulinska rezistencija

ITM – indeks tjelesne mase (eng. body mass index BMI)

M-CSF – faktor stimulacije kolonije makrofaga

MMH – teorija slaganja i neslaganja (eng. match/mismatch hypothesis)

MS – metabolički sindrom

NAFLD – nealkoholna masna bolest jetre (eng. non-alcoholic fatty liver disease)

NASH – nealkoholni steatohepatitis

NF-*κB* – inhibicija nuklearnog čimbenika *kapa-B*

OPG – osteoprotegerin

PAR – prediktivni adaptivni odgovor (eng. predictive adaptive response)

PBS – fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom

PPAR – receptor aktivacije proliferacije peroksisoma (eng. peroxisome proliferator activated receptors)

Pm – opseg kompaktne ili kortikalne kosti

RANK – aktivator receptora za nuklearni faktor κB

RANKL – receptorski aktivator za nuklearni faktor κB ligand

SMK – slobodne masne kiseline (eng. free fatty acid FFA)

T.Ar – područje spužvaste ili trabekularne kosti

Tb.N – broj koštanih gredica

Tb.Sp – razdvojenost koštanih gredica

Tb.Th – debljina koštanih gredica

TLR4 – toll-like receptor 4

TNF-alpha – čimbenik nekroze tumora alfa (eng. tumor necrosis factor alpha)

WD – zapadna dijeta (eng. Western diet)

POPIS TABLICA

Tablica 4.1. Sastav hrane u standardnoj laboratoriskoj dijeti i dijeti bogatoj zasićenim masnim kiselinama.....18
Tablica 5.1. Tjelesna težina, dobivanje na tjelesnoj težini i indeks tjelesne mase kod različito hranjenih muških potomaka štakora.....38
Tablica 5.2. Udio težine ispitivanog organa u ukupnoj tjelesnoj masi izraženo u postotcima kod različito hranjenih muških potomaka.....43
Tablica 5.3. Biokemijska analiza seruma kod različito hranjenih muških potomaka štakora..50
Tablica 5.4. Histomorfometriska analiza petog slabinskog kralješka kod promatranih skupina različito hranjenih muških potomaka štakora.....59
Tablica 5.5. Spearmanov koeficijent korelacije Rho (ρ) između histomorfometrijskih parametara koštane stukture i intenziteta TNF - alfa imunohistokemijskog obojenja koštanog tkiva.....65

POPIS SLIKA

Slika 1.1. Pregradnja koštanog tkiva 9
Slika 1.2. Utjecaj visceralnog masnog tkiva na razvoj masne jetre 14
Slika 5.1. Tjelesna težina u četvrtom tjednu starosti štakora hranjenih različitom prehranom. 30
Slika 5.2. Tjelesna težina u osmom tjednu starosti štakora hranjenih različitom prehranom. . 31
Slika 5.3. Tjelesna težina u osamnaestom tjednu starosti štakora hranjenih različitom prehranom. 32
Slika 5.4. Tjelesna težina u dvadeset drugom tjednu starosti štakora hranjenih različitom prehranom. 33
Slika 5.5. Dobitak na tjelesnoj težini u osmom tjednu starosti štakora hranjenih različitom prehranom. 34
Slika 5.6. Dobitak na tjelesnoj težini u osamnaestom tjednu starosti štakora hranjenih različitom prehranom. 35
Slika 5.7. Dobitak na tjelesnoj težini u dvadeset drugom tjednu starosti štakora hranjenih različitom prehranom. 36
Slika 5.8. Indeks tjelesne mase (ITM) štakora hranjenih različitom prehranom. 37
Slika 5.9. Postotni udio težine jetre u odnosu na tjelesnu težinu štakora hranjenih različitom prehranom. 39
Slika 5.10. Postotni udio težine lijevog bubrega u odnosu na tjelesnu težinu štakora hranjenih različitom prehranom. 40
Slika 5.11. Postotni udio težine testisa u odnosu na tjelesnu težinu štakora hranjenih različitom prehranom. 41
Slika 5.12. Postotni udio težine timusa u odnosu na tjelesnu težinu štakora hranjenih različitom prehranom. 42
Slika 5.13. Koncentracija kolesterola u serumu štakora hranjenih različitom prehranom. 44
Slika 5.14. Koncentracija triglicerida u serumu štakora hranjenih različitom prehranom. 45
Slika 5.15. Koncentracija AST (aspartat-aminotransferaze) u serumu štakora hranjenih različitom prehranom. 46
Slika 5.16. Koncentracija AST-a (alanin-aminotransferaze) u serumu štakora hranjenih različitom prehranom. 47
Slika 5.17. Koncentracija interleukina-6 (IL-6) u serumu štakora hranjenih različitom prehranom. 48

Slika 5.18. Koncentracija TNF-alfe (čimbenik nekroze tumora alfa) u serumu štakora hranjenih različitom prehranom. 49
Slika 5.19. Prikaz jednog reprezentativnog prereza petog slabinskog kralješka. Zvjezdica: gredice spužvaste kosti; križić: kortikalna kost; strelica: koštana srž. Bojenje: toluidine blue. Mjerilo: 700 μm. 51
Slika 5.21. Obujam spužvaste kosti (BV/TV) štakora hranjenih različitom prehranom. 52
Slika 5.22. Površina koštanih gredica spužvaste kosti (BS/TV) štakora hranjenih različitom prehranom. 53
Slika 5.23. Debljina koštanih gredica (Tb.Th) spužvaste kosti štakora hranjenih različitom prehranom. 54
Slika 5.24. Broj koštanih gredica (Tb.N) spužvaste kosti štakora hranjenih različitom prehranom. 55
Slika 5.25. Razdvojenost koštanih gredica (Tb.Sp) spužvaste kosti štakora hranjenih različitom prehranom. 56
Slika 5.26. Debljina kortikalne kosti (C.Th) štakora hranjenih različitom prehranom. 57
Slika 5.27. Obujam kortikalne kosti (CV/TV) štakora hranjenih različitom prehranom. 58
Slika 5.20. Histološki prikaz petog slabinskog kralješka u četiri skupine muških štakora. 60
Slika 5.28. Negativna kontrola imunohistokemijskog bojenja petog slabinskog kralješka CD-HFD skupine. 61
Slika 5.29. Histološka slika petog slabinskog kralješka CD-HFD skupine. 62
Slika 5.30. Imunohistokemijska analiza TNF-alfa u petom slabinskom kralješku. 64
Slika 5.31. Intenzitet imunohistokemijskog obojenja s anti-TNF-alfa protutijelom. 64
Slika 5.32. Reprezentativni prikazi kvatifikacije stupnja oštećenja parenhima jetre 67
Slika 5.33. Prikaz rezultata patohistološkog nalaza po skupinama štakora. 67
Slika 5.34. Negativna kontrola jetrenog parenhima 68
Slika 5.35. Pozitivan signal u jetri HFD-CD štakora. 69
Slika 5.36. Reprezentativni prikazi imunohistokemijskog bojanja u jetrenom parenhimu četiriju skupina različito hranjenih potomaka štakora (jedna po svakoj skupini). 71
Slika 5.37. Intenzitet imunohistokemijskog obojenja s anti – TNF – alfa protutijelom u jetrenom parenhimu četiriju skupina različito hranjenih potomaka štakora. 71

1. UVOD

1.1. Pretilost

Pretilost je javnozdravstveni problem raširen diljem svijeta s tendencijom drastičnog povećanja tijekom posljednjih nekoliko desetljeća. Globalizacija, ubrzani način života, stres, slaba fizička aktivnost i nepravilna prehrana potiču nakupljanje masnog tkiva što vodi k pretjeranoj tjelesnoj težini. Pretilost je vrlo kompleksna bolest koja se razvija pod utjecajem genetičkih i hormonalnih faktora, okoline i određenih životnih navika (1, 2). Povećani unos visokokalorične hrane bogate mastima uz manjak fizičke aktivnosti dovodi do povećane pohrane masti u adipocitima masnog tkiva što uzrokuje hipertrofiju samih adipocita. Kod ljudi s povišenom tjelesnom težinom dolazi do nakupljanja masti i u drugim organima kao što su dijelovi lokomotornog sustava i organi poput jetre.

Prekomjerna debljina određuje se kao indeks tjelesne mase (ITM) $25 \leq$ ITM < 30, a pretilost kao ITM ≥ 30. Trećem stupnju pretilosti pripadaju osobe s ITM-om većim od 40 (3).

Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) procjenjuje da više od dvije milijarde odraslih ljudi u svijetu ima prekomjernu težinu, a jedna trećina drži se klinički pretilom pa se, u usporedbi s podatcima iz 1980. god., taj broj udvostručio (4).

Podatci Hrvatskog zdravstvenog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ) pokazali su da je 38,1% stanovnika Republike Hrvatske tada imalo prekomjernu debljinu, a 20,3 % stanovnika je pretilo. Prekomjernu debljinu imalo je procijenjenih 43,2 % muškaraca i 33,6 % žena, a pretilo je bilo 20,1 % muškaraca i 20,6 % žena (5).

Alarmantan je porast debljine među djecom (4, 5). Zabilježen je porast učestalosti pretilosti od 60% u populaciji predškolske djece u razdoblju od 1990. do 2010. god. (6). Ukoliko se takvi podatci ne promijene, do 2020. god. u svijetu bi moglo biti 60 milijuna (9,1 %) pretile predškolske djece (7). U Hrvatskoj je 23,1 % djece u dobi od 1. do 6. godina rizično za razvoj pretilosti, a 10,7 % ih je pretilo pri čemu nema značajne razlike između kontinentalnog i priobalnog dijela zemlje (8). Primarna prevencija pretilosti zapravo započinje već tijekom prenatalnog razdoblja edukacijom trudnica o utjecaju porasta njihove tjelesne mase u periodu trudnoće i laktacije na pojavu pretilosti kod djece (9).

Pretilost se određuje kao nakupljanje veće količine masnog tkiva te je povezana s nizom dodatnih poremećaja, uključujući povećan rizik od bolesti masne jetre koja nije uzrokovana alkoholom (NAFLD), ateroskleroze, otpornosti na inzulin (IR), demencije, bolesti dišnog

sustava, pa čak i neke vrste malignih bolesti (10, 11). Iako je povezanost različitih poremećaja u metabolizmu bila poznata neko vrijeme, metabolički sindrom prvi je put javno prikazao Reaven 1988. god. i nazvao ga sindrom X (12).

Upravo zbog toga pretilost i svi poremećaji vezani uz nju predstavljaju ozbiljnu prijetnju za sadašnje i buduće zdravlje populacije.

1.2. Masno tkivo

Masno tkivo, osim što predstavlja značajno skladište energije, ima odlike i vrlo aktivnoga endokrinog organa koji luči hormone adipocitokine (13). Osim što su uključeni u regulacijske signalne putove energetskog metabolizma, adipocitokini sudjeluju i u regulaciji imuniteta, reprodukcije, kardiovaskularnih mehanizama, regulaciji razmnožavanja i rasta te posredovanju sustavne upale. Adipocitokini mogu djelovati epigenetskim modifikacijama i na adaptivne mehanizme energetskog metabolizma ploda koji konačno mogu rezultirati usporavanjem intrauterinog rasta i/ili kasnijom pojavom metaboličkoga sindroma u odrasloj dobi (14). Povišen BMI i povišena adipoznost tijekom trudnoće povezani su s pretilošću potomaka (15).

Dvije su glavne vrste masnog tkiva – bijelo i smeđe – a u zadnje vrijeme neki autori opisuju novootkriveno ružičasto masno tkivo koje se pojavljuje samo kod ženki u periodu trudnoće i laktacije (16).

Bijeli adipociti sadrže jednu veliku lipidnu kapljicu koja zauzima oko 90 % volumena stanica. Jezgra je potisnuta uz periferiju stanice i s citoplazmom čini vrlo tanak obruč. Smeđi su adipociti manji od bijelih te njihova citoplazma sadrži nekoliko kapljica lipida, okrugle i brojne jezgre te veliku količinu mitohondrija. Mitohondriji sadrže jedinstveni protein *mitochondrial uncoupling proteins 1* (UCP1) koji podržava termogensku ulogu smeđih adipocita (17). Upravo različita morfologija bijelih i smeđih adipocita ukazuje i na njihove različite funkcionalne uloge: bijeli adipociti pohranjuju energiju (u obliku lipida) dok smeđi adipociti sagorjevaju lipide za proizvodnju topline (18). Bijelo masno tkivo raspoređeno je po cijelom tijelu kao visceralno i supkutano. Visceralno tkivo (centralno ili abdominalno) smješteno je oko unutarnjih organa i čini oko 20 % ukupnog masnog tkiva. Supkutano (potkožno) tkivo čini oko 80 % i raspoređeno je dominantno u dvije glavne regije – abdominalnoj i gluteofemoralnoj (19). Između ta dva tkiva postoje značajne razlike u

histološkoj strukturi, u endokrinom profilu adipocita, aktivnosti lipolize te aktivnosti na inzulin i druge hormone. Nadalje, nedavna istraživanja pokazala su da je perivaskularno masno tkivo aktivni endokrini i parakrini organ koji je važan izvor citokina i adipocitokina (20). Njihova sekrecija najviše ovisi o stanju uhranjenosti i načinu prehrane, ali nedavno se pokazalo da ovisi i o epigenetskim promjenama genoma koji se odvijaju intrauterino, oviseći o prehrani majke tijekom trudnoće.

Novootkriveno ružičasto masno tkivo raspoređeno je u potkožnom masnom tkivu ženki za vrijeme trudnoće i laktacije te dolazi do promjene bijelog masnog tkiva u ružičasto masno tkivo čija je funkcija proizvodnja i lučenje mlijeka. Prema najnovijim istraživanjima tako masno tkivo sudjeluje u formiranju mliječne žlijezde (21). Saverio Cinti i sur. Zabilježili su da takva promjena uključuje uglavnom parenhim kroz razvoj lobulo-alveolarne žljezdane strukture koje luče mlijeko, a taj dinamičan proces obično se naziva alveologeneza (16). Ružičasto masno tkivo, osim mliječne komponente, izlučuje i citokine IL-6, TNF-alpha i adipocitokine kao što je leptin za koji se drži da ima još jednu važnu ulogu u razvoju pretilosti kod djece (22, 23). Ti podatci ukazuju na neposredan utjecaj majke i majčine ishrane za vrijeme laktacije na potomstvo.

U patološkim uvjetima pretilosti mijenja se endokrina uloga perivaskularnog masnog tkiva. Smanjenjem lučenja adiponektina i IL-1 gubi se njegova protektivna uloga, kako endokrina, tako i parakrina (24). Time se ujedno pojačava i lučenje proupalnih citokina, osobito IL-6 i TNF-alfa u perivaskularnom masnom tkivu (25). Lučenje adipocitokina iz perivaskularnog masnog tkiva u pretilih osoba se mijenja, a ta promjena završava razvojem metaboličkog sindroma (26, 27).

1.2.1. Uloga masnog tkiva u upalnim procesima kod pretilosti

Tijekom zadnjih 50 godina znanstvenici i fizičari uvidjeli su jasne poveznice između metaboličkih bolesti i sustavne upale. U kontekstu metaboličkih bolesti mjesto upale, fiziološke i patološke implikacije upalnog izvora ostaju nejasne do prije dvadesetak godina.

U to vrijeme Gokhan Hotamisligil i sur. otkrili su da pretilost potiče pojavu upalnih citokina, npr. TNF-alfa u masnom tkivu glodavaca i ljudi (28). Osim toga, zabilježen porast cirkulirajućeg TNF-alfe pripisuje se masnom tkivu i pretpostavlja se da upravo TNF-alfa posreduje inzulinsku rezistenciju uzrokovanu pretilošću (29). Točna uloga TNF-alfe ostaje

neodređena, a ostale skupine istaraživača u početnim su istraživanjima pokazali da pretilost pokreže pojavu više od 50 upalnih molekula u masnom tkivu (30). Daljnja istraživanja pokazala su da dolazi do dodatne proizvodnje upalnog citokina TNF-alfe u makrofazima u masnom tkivu čija su pojava i cirkulirajuće razine pozitivno povezani s pretilošću i obrnuto povezani s gubitkom tjelesne težine (31, 32). TNF-alfa ima brojne učinke u masnom tkivu koji uključuju poticaj apoptoze (preadipocita i zrelih adipocita), smanjuje adipogenezu i povećava lipolizu (33, 34). Potiče signalnu kaskadu koja izaziva staničnu apoptozu i regulira ključne transkripcijske čimbenike koji kontroliraju adipogenezu poput receptora aktivacije proliferacije peroksisoma (PPAR) (35, 36) te tako određuje i volumen masnog tkiva. Iako takvi učinci upujuću na to da povećana serumska koncenracija TNF-alfe može biti korisna, njegova uloga u pretilosti mnogo je složenija i pokazalo se da TNF-alfa potiče upalni odgovor i doprinosi inzulinskoj rezistenciji koja je povezana s pretilošću (37). Količina TNF-alfe pozitivno je povezana s inzulinskom rezistencijom, a štakori kojima nedostaje TNF-alfa pokazuju smanjenje koncentracije glukoze, inzulina i leptina (38). Povišen TNF-alfa u pretilih subjekata potiče lučenje drugih upalnih citokina (poput IL-6) i smanjuje lučenje protuupalnih protektivnih citokina (poput adiponektina) te tako regulira ukupno upalno stanje jedinke (39). Osim njegovih metaboličkih učinaka, TNF-alfa povezan je s razvojem ateroskleroze i hipertenzije (40 - 43).

Međutim IL-6 neobičan je po tome što je pravi endokrini citokin, što znači da je većina njegovih staničnih meta udaljena od mjesta otpuštanja (44). Istraživanja o IL-6 ukazuju na njegovu uzročnu ulogu u razvoju metaboličkog sindroma jer serumske koncentracije i izraženost u masnom tkivu te polimorfizam IL-6 pozitivno korelira s pretilošću. Pokazano je da IL-6 suzbija adipogenezu i lučenje adipocitokina (45, 46). *In vitro* istraživanja pokazala su da kod promatrane jednake količine masnog tkiva supkutano masnog tkivo proizvodi više IL-6 od visceralnog masnog tkiva (47). Premda je IL-6 visoko plejotropni citokin s hormonalnim učinkom na mnoga tkiva (ovdje s posebnim naglaskom djelovanja na koštano tkivo i jetru), značajno djeluje na metaboličke učinke sustavne upale koju uzrokuje sama pretilost.

1.3. Utjecaj majčine ishrane za vrijeme trudnoće i laktacije na razvoj pretilosti kod potomka

Genetski preduvjeti jedinki uvelike djeluju na razvoj pretilosti kao što to čini i ubrzan način života te stresne situacije (48). Utjecaj okoline u mlađoj životnoj dobi imat će velik utjecaj

(*imprinting*) na odraslu jedinku. Te epigenetske promjene i epigenetski utjecaj majke na potomke zabilježeni su u mnogim znanstvenim radovima (14).

Za jednu od teorija odnosa majke i djeteta navodi se DOHaD model razvojnih osnova zdravlja i bolesti s pretpostavkom da fetus čini predvidljivu prilagodbu kao odgovor na intrauterine znakove. Takva prilagodba rezultat je stalnih promjena u homeostatskom okruženju kao pomoć za bolji trenutni opstanak i poboljšani uspjeh u nepovoljnom postnatalnom okruženju (49 - 51). Neprikladno tumačenje prenatalnih znakova ili promjene tog okruženja mogu dovesti do neusklađenosti između prenatalnog predviđanja i postnatalne stvarnosti. Te su prilagodbe poznate kao prediktivni adaptivni odgovor (PARs) (52, 53) i mogu biti nepovoljne u postnatalnom životu, dovodeći do povećanog rizika od kroničnih nezaraznih bolesti u odrasloj dobi i/ili nasljeđivanja rizičnih čimbenika. Mnoga epidemiološka istraživanja pokazala su da su fetalna ograničenja u rastu povezana s kasnijim razvojem bolesti čime je fetalna ishrana jedan od snažnih poticaja. Takva razmišljanja potaknula su sve veći broj istraživanja na životinjskim modelima s kontroliranim majčinim visokim/niskim unosom hrane u ključnom razdoblju razvoja potomka. Kao rezultat toga prekomjerna tjelesna težina i/ili pretilost u majki jedan je od najčešćih problema trudnoće u razvijenim zemljama (54 - 57). Zbog učestale pojave pretilosti u periodu trudnoće i dodatnog gestacijskog dijabetesa, trenutačno postoji veliko zanimanje za razumijevanje štetnog utjecaja majčine pretilosti i njezine prehrane s visokim postotkom masti na rizik od bolesti u dječjoj dobi i kasnijoj dobi (58 - 64).

Prehrana majke za vrijeme trudnoće i laktacije može djelovati na fenotip potomka gdje su Takasaki M. i sur. 2011. god. zabilježili da se metabolizam lipida potomaka može mijenjati ukoliko je majka hranjena dijetom s visokim postotkom masti. Ta je promjena zabilježena i nakon druge generacije (65). Hipoteza „štedljivi fenotip“ govori da prehrana majke tijekom trudnoće i laktacije vodi k promjeni metabolizma i k razvoju odraslog fenotipa potomka koji će biti prilagođen istoj prehrani te tako majka priprema potomka na sličnu okolinu u kojoj će se potomak naći nakon poroda (66). Fetalna pothranjenost vodi k promjeni metabolizma i k razvoju odraslog fenotipa prilagođenog siromašnoj prehrani, no ako se potomak prehranjuje hranom s visokim udjelom masnoće, tijekom života ima veće preduvjete za razvoj metaboličkog sindroma (67). Razni su modeli predloženi u pokušajima da se bolje objasne utjecaji majke na njezinog potomka kao što je teorija „štedljivi fenotip“, programiranje, DOHaD model, PARs (prediktivni adaptivni odgovori) i teorija slaganja ili neslaganja (*match/mismatch*) (68).

Prehranom uzrokovana pretilost kod životinja patogenetski je jako slična pretilosti kod ljudi i očitija je u istraživanju bolesti povezanih s pretilošću nego genetički izazvana pretilost u

životinjskog modela (69 - 71) pa je koristan model za istraživanje pretilosti. Količina masti u prehrani varira u različitim istraživanjma (25 % (71); 30 % (72); 33 % (73); 36 % (74-76); 60 % (70, 77)), međutim kombinacija masnoća i proteina koja oponaša prehranu zapadnog društva (WD – *Western diet*) pokazala je poražavajuće rezultate (77-80). Pretilost u zapadnom društvu nezaustavljivo raste te se takva ishrana smatra odgovarajućim krivcem. Istraživanja masne prehrane kod majke (u trenutnom istraživanju WD) klinički je relevantna i nudi dobre smjernice u rješavanju tog problema.

Ovo istraživanje osmišljeno je da bi se istražili učinci majčine prehrane masnom dijetom tijekom trudnoće i laktacije na fenotip muških potomaka u zrelijoj dobi hranjenih standarnom ili masnom prehranom u postnatalnom razdoblju. Jedan od pokazatelja moguće posljedice prehrane bogate mastima bit će razine citokina i njihov utjecaj na koštani sustav i parenhim jetre.

1.4. Masno tkivo i koštani sustav

Kost je potporno tkivo i dio lokomotornog sustava, spremnik kalcija i fosfata, mjesto primarne hematopoeze koje dinamično sudjeluje pri izmjeni tvari kroz krvotok (81, 82). Kost se prema novijim istraživanjima nalazi na samom pritisku imunološkog sustava s obzirom na to da stanice specifične imunosti stvaraju protein koji potiče koštanu razgradnju (83). U organima koštanog sustava kortikalna ili kompaktna kost čini „okvir“ unutar kojeg je smještena trabekularna ili spužvasta kost. Duge kosti izgradene su od 95 % kompaktne kosti, a preostalih 5% čini spužvasta kost. Spužvasta kost većim dijelom izgrađuje krajeve dugih kostiju, kralješke te plosnate kosti. Iako ima četverostruko manju koštanu masu, spužvasta kost zauzima dva puta veću površinu od kompaktne kosti. Izgrađena je od koštanih gredica horizontalnog i vertikalnog smjera pružanja. Funkcija je spužvaste kosti u prenošenju biomehaničkog opterećenja na zglobove i pružanje otpora silama tlaka te prilagodba na mehanička opterećenja (84). Svojom građom čini trodimenzionalnu strukturu koja može apsorbirati energiju i oduprijeti se silama tlaka bez opasnosti od napuknuća (85). Građu spužvaste kosti najbolje opisuju koštani obujam i strukturni parametri. U strukturne parametre ubrajamo: broj koštanih gredica, debljinu i orijentaciju koštanih gredica, gustoću povezanosti gredica, stupanj anizotropnosti koštanih gredica i razmak među koštanim gredicama. Iz vrijednosti navedenih parametara moguće je

indirektno promatrati kvalitetu kosti. Obujam spužvaste kosti (BV/TV) najbolje predviđa jakost kosti, i to posebno kada je riječ o slabinskom kralješku (86).

Najbolji rezultati postižu se kada se pri analizi uzorka kosti, uz koštani obujam, uzmu u obzir i strukturni parametri jer se tada mogu uočiti promjene koje utječu na jakost spužvaste kosti (87). U održavanju biomehaničke kompetencije spužvaste kosti, posebno kada je riječ o kralješku, važnu ulogu imaju poprečne gredice koje povezuju vertikalne koštane elemente u jedinstvenu trodimenzionalnu mrežu. Od brojnih promjena koje zahvaćaju spužvastu kost tijekom starenja, gubitak debljine koštanih gredica ne utječe na jakost kosti dok gubitak broja koštanih gredica značajno oslabljuje kost (87, 88).

Istraživači pretpostavljaju da je deficit kosti koji nastaje zbog stanjenih gredica reverzibilan te da se jakost kosti može u potpunosti oporaviti kompenzatornim zadebljanjem tih istih koštanih gredica. Deficit koštane mase nastao zbog gubitka koštanih elemenata posljedično ima trajno promijenjenu jakost kosti koja se može samo djelomično oporaviti zadebljanjem preostalih koštanih gredica (89). Promjene debljine kompaktne kosti utječu na njezinu kvalitetu. Kralješci imaju tanak kompaktan okvir unutar kojeg spužvasta kost nosi većinu opterećenja. Poroznost i promjena debljine kompaktne kosti utječu na biomehaničku sposobnost kralježnice (90).

Na molekularnoj razini kost je dinamičan organ koji kontinuirano prolazi značajnu pregradnju, proces koji se naziva modeliranje/remodeliranje, a uključuje koštanu resorpciju osteoklastima i formiranje osteoblastima (91). Koštana masa u danom trenutku održava ravnotežu između stvaranja i razgradnje koštanog tkiva. Broj i aktivnost osteoblasta s godinama opada, a broj osteoklasta povećan je kao i aktivnost vezana uz starenje (92, 93). Prikupljeni podatci pokazuju da pretilost šteti zdravlju kostiju unatoč mogućim pozitivnim učincima mehaničkog djelovanja povećane tjelesne težine na kost (94 - 97). Mehaničko opterećenje potiče oblikovanje koštanog tkiva tako da smanjuje apoptozu i povećava proliferaciju i diferencijaciju osteoblasta i osteocita putem Wnt/b – nin signalnog puta (98, 99). Mehaničko opterećenje zbog djelovanja tjelesne težine razlog je pretpostavke da bi pretilost mogla spriječiti gubitak koštane mase (100). Nedavna istraživanja pokazala su da prekomjerna težina ne može zaštititi ljude od osteoporoze kao što se mislilo, nego da je prekomjerno nakupljanje masnoće u pretilosti u suodnosu s manjim ukupnim mineralnim sadržajem i manjom gustoćom kosti (101 - 103). Prekomjerna tjelesna težina može biti povezana s većim rizikom od loma kostiju. Primjer je jedno kontrolirano istraživanje od 60 pacijenata s prijelomima kod ispitanika u dobi od 3 do 19 godina gdje je velika gojaznost bila povezana s povećanim rizikom distalnog prijeloma podlaktice (104).

1.4.1. Upalno djelovanje citokina na pregradnju koštanog tkiva

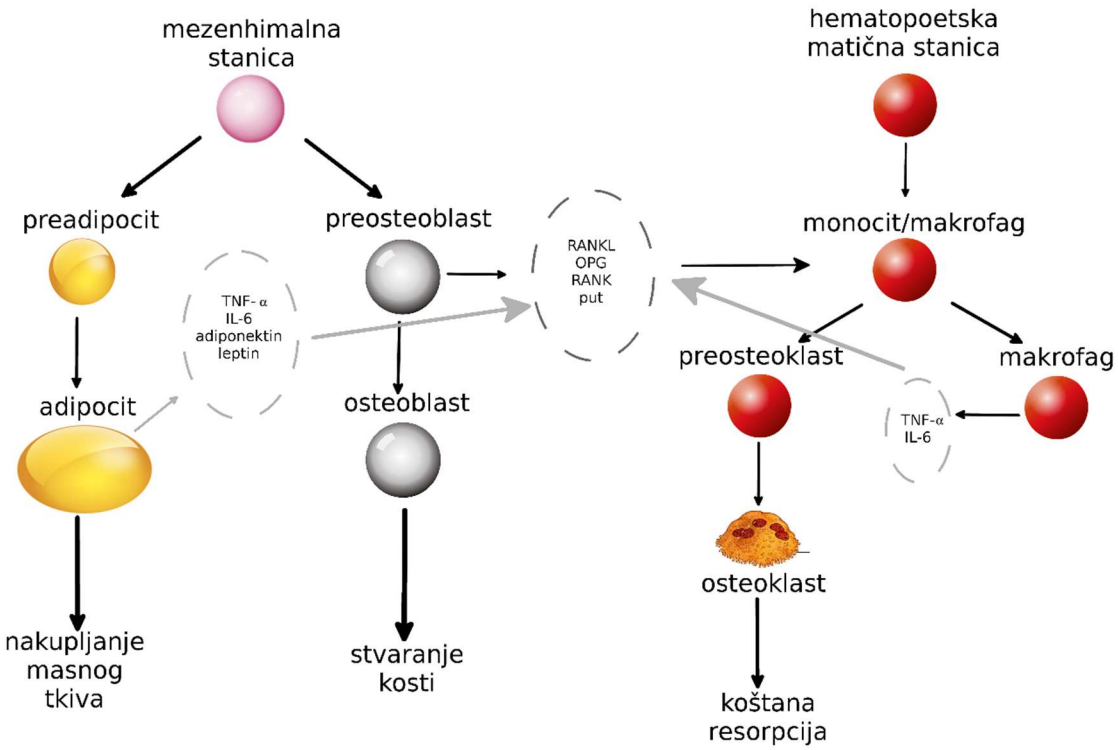
Današnje spoznaje ukazuju na to da osteoblasti reguliraju popunjavanje i djelovanje osteoklasta kroz ekspresiju RANKL-a i OPG-a. RANKL je izražen na površini osteoblasta i stromalnih stanica i vezuje se na receptor. RANKL na površini hematopoetskih progenitornih stanica potiče diferencijaciju osteoklasta i dozrijevanje u prisutnosti čimbenika stimulacije kolonije makrofaga (M-CSF). Aktivator receptora (OPG) koji izlučuju osteoblasti veže RANKL da bi spriječio njegovo aktiviranje čime se sprečava diferencijacija i aktivacija osteoklasta (105, 106). Istraživanja ukazuju na to da je povećana aktivnost osteoklasta i povećana resorpcija kosti kod žene u postmenopauzi u pozitivnoj korelaciji s pojačanom regulacijom i aktivacijom RANKL-a (92, 107) (Slika 1.1.).

Proupalni citokini, uključujući TNF-alfu, IL-1 i IL-6, ključni su posrednici u procesu diferencijacije osteoklasta i resorpciji koštanog tkiva. Kronična upala i povećani proupalni citokini izazivaju resorpciju kosti i gubitak koštane mase kod pacijenata s parodontitisom (108), izazivaju pankreatitis (108), upalnu bolest crijeva (109) i reumatoidni artritis (110). Utvrđeno je da su regulirajući proupalni citokini primarni posrednici osteopenije ili osteoporoze. Ubrzani gubitak kosti u menopauzi povezan je s povećanom proizvodnjom proupalnih citokina, uključujući TNF-alfu, IL-1, IL-6 (111). Proupalni citokini sposobni su poticati aktivnost osteoklasta utjecajem na RANKL / RANK / OPG-ov put (112).

Kod leptin – deficijentnih (ob/ob) miševa, koji su korišteni kao model pretilosti, težina je dvostruko veća od one normalnih miševa, ali je manja mineralna gustoća bedrene kosti i debljina kortikalne kosti te je manji volumen spužvaste kosti (113). Pozitivan utjecaj mehaničkog opterećenja povećanom tjelesnom težinom nije mogao prevladati štetan učinak nedostatka leptina (ili eventualno pretilosti) na kosti kod tih miševa. Rezultati istraživanja ukazuju na to da je za zdravlje kostiju, osim čimbenika tjelesne težine, ključan i upalni proces koji se javlja kod pretilosti.

Iako je istraživanje pretilosti na životinjskom modelu pokazalo negativne učinke pretilosti na metabolizam kostiju, istraživanja na humanim uzorcima i dalje su sporna. Pretilost u ljudi složeno je pitanje koje općenito uključuje i pretjeranu potrošnju hranjivih tvari kao što su proteini i minerali i za koje se zna da utječu na metabolizam kosti (114). Podatci učinka pretilosti na zdravlje kostiju kod ljudi više su temeljeni na statističkoj korelaciji ili modeliranju nego na kontroliranom praćenju. Dakle, kontrolirana istraživanja pretilosti na životinjskom

modelu i dalje se upotrebljavaju za detaljno analiziranje svih koraka mehanizama remodeliranja koštanoga tkiva i toga kako prekomjerno nakupljanje masnog tkiva utječe na metabolizam kosti. Korištenje modela pretilosti kod miševa pokazalo je da su se kod miševa hranjenih dijetom s visokim udjelom masnoće (45 % kalorijske vrijednosti dolazi iz zasićenih masnih kiselina) tijekom četrnaest (14) tjedana smanjili volumen spužvaste kosti i broj koštanih gredica u proksimalnoj tibiji unatoč znatnom povećanju tjelesne mase i markera formiranja kosti (115). Takve strukturne promjene također su zamijećene i pri povećanju serumske razine leptina, razine RANKL-a i ekspresije OPG-a u kulturi osteoblasta (116). Model pretilih životinja hranjenih visokim om masnoće pokazuje povećano nakupljanje masnog tkiva u koštanoj srži popraćeno smanjenom koštanom mineralnom gustoćom u različitim dijelovima kostura regulirano IL-6 i TNF-alfom (117). Drugi istraživači zabilježili su i povećanu aktivnost osteoklasta i upalnih citokina, a smanjenu ekspresiju proupalnog citokina IL-10 u maktofazima koštane srži pretilih životinja (118 - 120). Masne stanice koštane srži tako izravno utječu na hematopoetske stanice, preteće stanica osteoblasta (Slika 1.1.) (121).



Slika 1.1. Pregradnja koštanog tkiva

Metabolizam kostiju reguliran je adipocitima, osteoblastima i osteoklastima. Nakupljanje masnog tkiva usko je vezano za formiranje kostiju i njihov razgradnju. Osteoklasti i adipociti izvedeni su iz zajedničkih mezenhimalnih stanica. Masne stanice izlučuju nekoliko citokina kao što su TNF-alfa (čimbenik nekroze tumora alfa), IL-6 (interleukin - 6), adiponektin i leptin, koji su sposobni utjecati na nastanak osteoklasta kroz RANKL/RANK/OPG-ov put (receptorski aktivator za nuklearni faktor faktor κB ligant /osteoprotegerin).
(izvor: autorsko djelo, uz pomoć doc. dr. sc. Hrvoje Brkća, Katedra za biofiziku i radiologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku)

Pretilost može utjecati na metabolizam kostiju, izravno ili neizravno, kroz izlučivanje adipocitokina kao što su leptin i adiponektin. Povišena tjelesna težina povezana je sa značajnim povećanjem leptina u serumu (122, 123) i smanjenjem adiponektina (124). Djelovanje leptina, kako se čini, ima pozitivnu (125, 126) i negativnu stranu (127, 128) učinka na kost. Čini se da njegovo djelovanje može ovisiti o trenutačnoj serumskoj koncentraciji leptina i načinu aktivacije (središnji ili periferni učinci). Povećana proizvodnja leptina, kao što se vidi kod pretilih životinjskih modela, može imati negativne učinke na metabolizam kostiju (129).
Adiponektin je drugi adipocitokin koji luče masne stanice i djeluje protuupalno (130). Utvrđeno je kod životinjskog modela da adiponektin inhibira stvaranje osteoklasta, potiče smanjenje resorpcije kosti i povećava koštanu masu (131, 132).

Naposljetku, pokazano je da dijeta s visokim udjelom masnoće (koja je čest uzrok pretilosti) ometa crijevnu apsorpciju kalcija. Slobodne masne kiseline mogu sudjelovati u stvaranju neapsorbirajućeg, netopivog oblika kalcija i time pridonositi njegovoj niskoj apsorpciji (133-135), a protektivni učinci kalcija na metabolizam koštanog tkiva dobro su poznati (136).

1.4.3. Utjecaj majčine ishrane i postnatalne dijete na koštani sustav

Na metabolizam kosti sustavno utječu hormonski, genetski i okolišni čimbenici, a odnos između koštanog metabolizma i pretilosti istražen je u brojnim eksperimentalnim i kliničkim istraživanjima (137 - 140). Osim toga, osteoblasti i adipociti imaju zajedničku ishodišnu mezenhimalnu stanicu, što znači da promjene tijekom diferencijacije jednog tipa stanica u koštanoj srži mogu uzrokovati promjene u diferencijaciji drugog staničnog tipa (141).

Majčina prehrana jedan je od ranih i važnijih čimbenika koji utječu na razvoj koštanog sustava u potomaka. Skupina istraživača vođenih Lanhamom ispitivali su kvalitetu i razvoj kosti u potomaka masno hranjenih majki te su zaključili da povećani unos hrane tijekom trudnoće i laktacije ima utjecaj na razvoj kosti u potomaka zbog povećanog skladištenja masnoga tkiva te njegovog epigenetskog utjecaja (142).

Povećano skladištenje masnog tkiva u koštanoj srži ima sposobnost poticanja izlučivanja citokina koji u pretilosti kao stanju „sterilne upale“ utječu na koštanu pregradnju. Do smanjene koštane mase kod jedinki povišene tjelesne težine može doći zbog povećanja stvaranja masnog tkiva u koštanoj srži nauštrp stvaranja osteoblasta i/ili osteoklasta pod utjecajem proupalnih citokina. Također, do smanjene koštane mase može doći zbog i/ili prekomjernog izlučivanja leptina, smanjene proizvodnje adiponektina i/ili smanjene apsorpcije kalcija povezane s unosom visokog udjela masnoće (143, 144).

Uz nekolicinu znanstvenih radova koji govore o pozitivnim učincima mehaničkog djelovanja povećanjem tjelesne težine (100, 145, 146), važno je uočiti kako zbog pretilosti dolazi do smanjenja koštane mase.

Razumijevanje odnosa između pretilosti i metabolizma kostiju može pomoći u određivanju novih načina stvaranja osteoblasta blokiranjem stvaranja masnog tkiva i/ili smanjenjem stvaranja osteoklasta na molekularnoj razini. Naposljetku, te spoznaje mogle bi voditi k razvoju novih terapijskih intervencija s ciljem sprečavanja pretilosti i osteoporoze. Upoznavanjem s ranim uzrokom problema i utjecajem majčine ishrane i postnatalne ishrane na metabolizam koštanog tkiva otvara se put novim istraživanjima te problematike.

1.5. Masno tkivo i jetra

Najčešća kronična bolest jetre zapadne populacije, a usko povezana s metaboličkim sindromom, jest nealkoholna masna bolest jetre (147, 148). Javlja se kod ljudi koji ne konzumiraju veće količine alkohola, a može se pokazati kao masna jetra. NAFLD je bolest prekomjernog nakupljanja masti u jetri i predstavlja stanje koje se sastoji od jednostavne steatoze (SS, makrovezikularna steatoza u hepatocitima bez upale), nealkoholnog steatohepatitisa (NASH, makrovezikularna steatoza u hepatocitima zajedno s upalom i fibrozom) i ciroze. Nakupljanje masti u hepatocitima može biti reverzibilno, dakle prolazno i

benigno, čak i bez kliničkih simptoma (jednostavna steatoza (SS)) (149). Nastanak tog oboljenja nije još u potpunosti objašnjen, ali je dokazana upalna uloga masnog tkiva u patogenezi steatohepatitisa kako kod pretilih, tako i kod mršavih oboljelih jedinki (150).

NAFLD je najčešći oblik kronične bolesti jetre u pedijatrijskoj populaciji s tendencijom rasta (151 - 153). Ipak, promjene hepatocita, osobito kod pretilih osoba, čine te stanice osjetljivima na daljnja oštećenja pa mogu izazvati i njihovu apoptozu. Pri takvoj upali dolazi do infiltracije jetre makrofazima koji, izlučivanjem citokina (pretežito TNF-alfa i IL-6), pokreću upalne promjene. Nekolicina znanstvenih radova upućuje na izlučivanje adipocitokina, derivata masnih stanica koji, uz makrofage, potiču upalnu promjenu prema NASH-u (154, 155).

Konačno, zbog moguće dodatne aktivacije Kupfferovih i Itovih stanica dolazi do ciroze jetre i smrti (156 - 160). Budući da je pretilost u dječjoj dobi rastući problem, pedijatrijska nealkoholna masna bolest jetre brzo je postala jedan od najznačajnijih kroničnih bolesti jetre kod djece. Povećana pozornost na tu bolest, prevencija i brzo postavljanje dijagnoze svakako mogu doprinijeti boljem liječenju i smanjenu stope oboljelih (161, 162).

1.5.3. Upalno djelovanje citokina na jetru

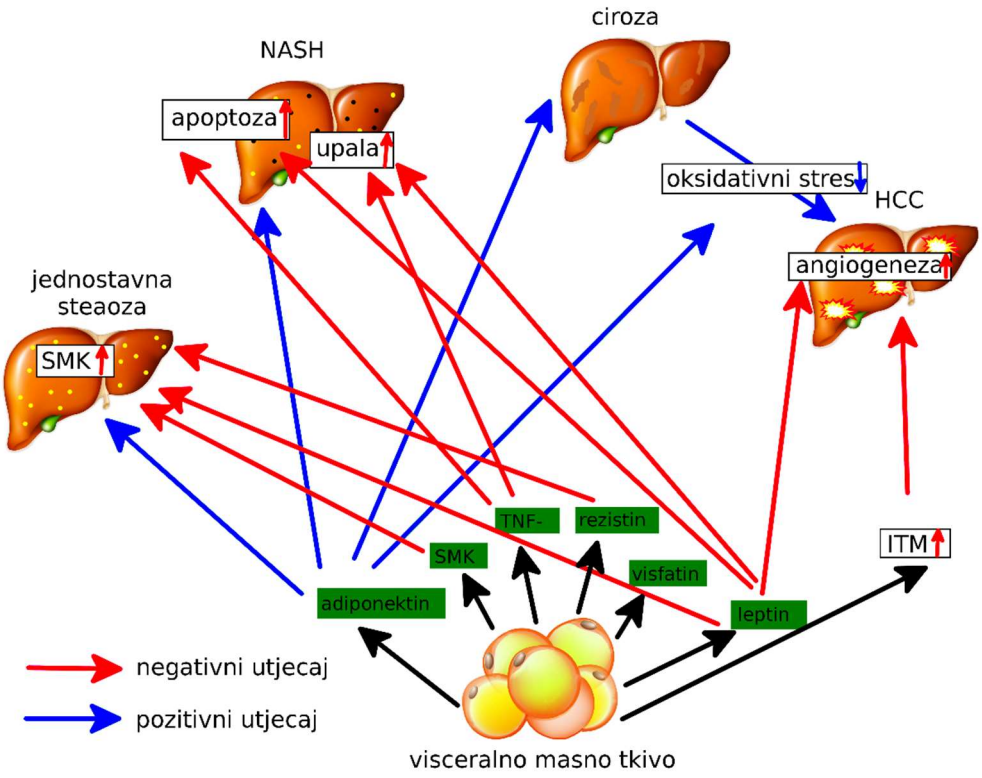
Na životinjskom je modelu utvrđeno da TNF-alfa ima važnu ulogu u pretilosti te je pokazano da je razina TNF-alfe u krvi povezana s mitohondrijskom disfunkcijom jetre koja potiče razvoj NAFLD-a u NASH-u (163). Povećana proizvodnja TNF-alfe u jetri ima ulogu u patologiji masne jetre gdje su vrijednosti mRNA TNF-alfe i TNF receptora 1 povećane kod bolesnika s NASH-om (164). Stvaranje TNF-alfe dalje inducira *de novo* lipogenezom u hepatocitima što dovodi do nakupljanja lipida. U slučaju prekida sinalizacije TNF-alfe, bilo farmakološki ili genetski, dokumentirano je smanjeno nakupljanje lipida (165). Sukladno rezultatima iz dosadašnjih istraživanja može se reći da je TNF-alfa jedan od ključnih čimbenika za stvaranje masne jetre.

Drugi citokini i adipokini kao što su IL-6 i adiponektin također su pokazali značajnu ulogu u razvoju masne jetre. Uočene su povišene serumske razine IL-6 kod životinja i bolesnika s NAFLD-om i bolestima masne jetre uzrokovane alkoholom (166, 167). Štoviše, za IL-6 nedavno je otkriveno da regulira mehanizmom razvoja NAFLD-a kod dvaju određenih mišjih modela masne jetre (168). Povišena vrijednost IL-6 kod ljudi s NAFLD-om bila je zabilježena u hepatocitima i Kupfferovim stanicama, a razine su pozitivno korelirale s razvojem upalne

aktivnosti i stupanjem fiboze (169). Iako su prethodna istraživanja ukazivala na to da IL-6 u jetri uglavnom ima antiapoptotsko djelovanje i time poboljšava regeneraciju jetre (170 - 173), dokazano je da kronična izloženost IL-6 ukida protektivni učinak, senzibilizira jetru i dovodi do apoptoze (174 - 177). Iako se držalo da su masne stanice glavni izvor cirkulirajućeg IL-6 (178), utvrđeno je da i hepatociti mogu lučiti IL-6 kao i druge proupalne citokine poput TNF-alfe (179, 180). Nadalje, nekoliko *in vitro* i *in vivo* istraživanja pokazala su da je jetra glavna meta IL-6 koji inhibira signalizaciju inzulina što rezultira povećanom glukoneogenezom jetre, naknadno hiperglikemijom i kompenzacijskom hiperinzulinemijom (181). Na tom tragu, jedno je istraživanje pokazalo da kod miševa selektivna vrijednost IL-6 u hepatocitima završava paralelno povećanim IL-6 u plazmi te je dovoljna da inducira sistemsku IR (168). Osim toga, kod bolesnika s NAFLD-om vrijednost IL-6 u jetri usko je povezana i s razinama cirkulirajućeg IL-6 (169, 182).

Trenutačno ne postoji lijek koji je dokazano učinkovit za liječenje NASH-a. S obzirom na to da citokini imaju ključnu ulogu u patogenezi masne jetre, medicinska terapija usmjerena na njihovu modulaciju možda bi omogućila bolje liječenje pacijenata s tim kliničkim stanjem. Primjena TNF-alfe inhibitora obećavajuća je kod životinjskih modela (165) i kod manjih ljudskih pilot istraživanja (183, 184). No pritom valja biti izrazito oprezan zbog djelovanja spomenutih citokina na druge organe i regulaciju upalnih procesa u organizmu.

Pravilna majčina ishrana jedan je od načina prevencije razvoja masne jetre u tako ranom stadiju. Prehrana majki koja sadržava visoki udio masnoća u trudnoći i laktaciji uvelike utječe na razvoj masne jetre u potomaka, a koja nije uzrokovana alkoholom (185 - 188).



Slika 1.2. Utjecaj visceralnog masnog tkiva na razvoj masne jetre

Masno tkivo ima sposobnost izlučivanja nekoliko citokina koji mogu djelovati upalno na razvoj bolesti masne jetre koja nije uzrokovane alkoholom – NAFLD (čimbenik nekroze tumora alfa – TNF-alfa, rezistin, visfatin, leptin) i protektivno (adiponektin). Povećanjem indexa tjelesne mase povećava se volumen adipocita, izlučuje se velika količina slobodnih masnih kiselina, potiče se upalni odgovor preko citokina koji progresivno djeluju na razvoj bolesti masne jetre od jednostavne steatoze preko nealkoholnog steatohepatitisa – NASH-a – sve do ciroze i hepatocelularnog karcinoma (HCC).
(izvor: autorsko djelo, uz pomoć doc. dr.sc. Hrvoje Brkća, Katedra za fiziku Medicinskog fakulteta u Osijeku)

1.6. Obrazloženje korištenja životinjskog modela u ovom istraživanju

Kronične bolesti poput pretilosti, dijabetesa i hipertenzije, zajedno poznate kao metabolički sindrom, uzrokuju povećanje morbiditeta i mortaliteta u ljudi. Njihova pojavnost upućuje na važnost takvog istraživanja i analizu strategija liječenja metaboličkog sindroma. Prilično je teško kod ljudi odrediti relativni utjecaj pretilosti tijekom kritičnog perioda razvoja,

a prospektivna istraživanja teško su kontolirana i zahtjevna. Važni genetički i okolišni utjecaji na razvoj pretilosti dodatno kompliciraju takva istraživanja zbog teškoće u praćenju tih ljudi. Ona zahtijevaju održive životinjske modele koji učinkovito preslikavaju sve aspekte ljudske bolesti. Mnogo su godina glodavci korišteni za modele ljudske bolesti jer dobro preslikavaju fiziološke promjene kod ljudi (189, 190), pogodni su za evaluaciju potencijalnih načina liječenja ili upravljanja ljudskom pretilosti i povezanog metaboličkog sindroma (69, 191). Fiziološki putovi, uključujući regulaciju apetita, visoko su očuvani kroz vrste sisavaca, stoga informacija dobivena kod glodavaca ima važnost i za ljude. Druga velika korist uporabe neljudske vrste jest mogućnost rigoroznog kontroliranja prehrane i drugih važnih okolišnih učinaka koji utječu na pretilost.

Štakorski model pretilosti uzrokovane visokokaloričnom prehranom trebao bi bolje objasniti patofiziologiju većine ljudskih pretilih pacijenata nego genetički modificiran model s isključenim genom za leptin. Genetički modificirani model može predstavljati defekte u signalizaciji leptina i s tim povezane patološke promjene (75) jer se upravo spomenuti prvi oslanja na genetičke promjene u induciranju simptoma pretilosti (192, 193).

Dob životinja može biti kritična u oblikovanju i analizi neurobioloških istraživanja što se ne bi smjelo previdjeti u neuroznanosti (194). Prvih 12 dana laktacijskog perioda kod štakora jednak je trećem tromjesečju ljudske gestacije (195), a cerebralni korteks 12-13 dana starog štakora jednak je novorođenčetovom u odnosu na stupanj sazrijevanja (196). Štakori dosegnu seksualnu zrelost oko pedesetog dana života (195).

Masna prehrana majke tijekom gestacije i laktacije može predodrediti potomke glodavca na hipotalamičke promjene koje mogu utjecati na regulaciju apetita i tjelesne težine tijekom vremena (197 - 199). Masna prehrana majke i potomka nakon dojenja, kako kod štakora, tako i kod ljudi, uzrokuju metaboličke promjene (200 - 203). Majčina kronična konzumacija masne hrane ili masna prehrana potomka poslije dojenja u normalnih glodavaca nudi učinkoviti pretili model glodavca koji preslikava ljudsku pretilost i metabolički sindrom pa je kao takav potencijal i za testiranje terapijskih intervencija.

2. HIPOTEZA

Prehrana majki tijekom trudnoće i laktacije te prelazak muških potomaka štakora na drugi režim prehrane utječe na koncentraciju upalnih citokina u krvi i izraženost TNF-alfa u koštanom tkivu i u parenhimu jetre. Promjene u režimu prehrane izazvat će promjene u obujmu i strukturi petog slabinskog kralješka i jetrenog parenhima.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- Ispitati promjene tjelesne težine kroz tjedne, ITM i udio mase promatranih organa u odnosu na tjelesnu težinu kod zadanih skupina ovisno o postnatalnoj prehrani muških potomaka štakora i majčinoj ishrani za vrijeme trudnoće i laktacije.
- Ispitati razlike serumske koncentracije kolesterola i triglicerida, AST-a i ALT-a kod zadanih skupina muških potomaka štakora ovisno o postnatalnoj prehrani i majčinoj ishrani za vrijeme trudnoće i laktacije.
- Ispitati razlike serumske koncentracije cirkulirajućih citokina IL-6 i TNF-alfe kod zadanih skupina muških potomaka štakora ovisno o postnatalnoj prehrani i majčinoj ishrani za vrijeme trudnoće i laktacije.
- Ispitati razlike u vrijednosti koštanog obujma i strukture petog slabinskog kralješka kod zadanih skupina muških potomaka štakora ovisno o postnatalnoj prehrani i majčinoj ishrani za vrijeme trudnoće i laktacije.
- Ispitati razlike u intenzitetu imunohistokemijskog obojenja na TNF-alfe na petom slabinskom kralješku ovisno o izmjeni intrauterine i postnatalne ishrane kod muških potomaka štakora
- Ispitati povezanost između vrijednosti imunohistokemijskog obojenja na TNF-alfi u koštanoj srži i promjene morfologije strukture i obujma petog slabinskog kralješka kod zadanih skupina muških potomaka štakora ovisno o postnatalnoj prehrani i majčinoj ishrani za vrijeme trudnoće i laktacije.
- Ispitati razlike u stupnju oštećenja parenhima jetre kod zadanih skupina muških potomaka štakora ovisno o postnatalnoj prehrani i majčinoj ishrani za vrijeme trudnoće i laktacije.
- Ispitati razlike u intenzitetu imunohistokemijskog obojenja na TNF-alfi u parenhimu jetre kod zadanih skupina muških potomaka štakora ovisno o postnatalnoj prehrani i majčinoj ishrani za vrijeme trudnoće i laktacije.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Ustroj istraživanja

Deset ženki Sprague Dawley štakora od devet tjedana starosti nasumično je podijeljeno u dvije skupine. Tijekom šest tjedana jedna skupina bila je hranjena standardnom laboratorijskom hranom (Mucedolla, Italija) (CD skupina; n = 5), a druga skupina hranom bogatom zasićenim masnim kiselinama; Žito d.o.o., Hrvatska) (HFD skupina; n = 5) (Tablica 4.1.).

U koordinaciji s prehrambenim tehnologom Tomislavom Ivankovićem iz tvrtke Žito d.o.o. osmišljena je smjesa za masnu dijetu, proizvedena je u kontroliranim uvjetima slijedeći upute o laboratorijskoj hrani koja se provodi u sklopu istraživanja na laboratorijskim životinjama, a u skladu sa zakonima EU i Republike Hrvatske (204).

Smjesa je osmišljena po uzoru na prehrambeni model zapadnih zemalja gdje je zabilježen alarmantni porast pretilosti, gdje 60 % od ukupnih kilokalorija otpada na masti (28 % ukupnih sirovih masti). Sojino ulje kod kontrolne skupine sadrži 78 % nezasićenih masnih kiselina, palmino ulje pridodano masnoj dijeti sadrži najmanje 50 % zasićenih masnih kiselina. Zbog pretežnog sadržaja zasićenih masnih kiselina masne dijete (HFD skupine), osobito palmitinske (zasićene masne kiseline), istraživanja su pokazala da u većim količinama povećavaju rizik razvoja metaboličkog sindroma u životinjskim i humanim studijama (205 - 207). Zabilježene su i velike razlike utjecaja masne prehrane po spolu (208) pa je i to jedan od razloga što je statistička analizi straživanja provedena isključivo na muškim jedinkama.

Tablica 4.1. Sastav hrane u standardnoj laboratoriskoj dijeti i dijeti bogatoj zasićenim masnim kiselinama

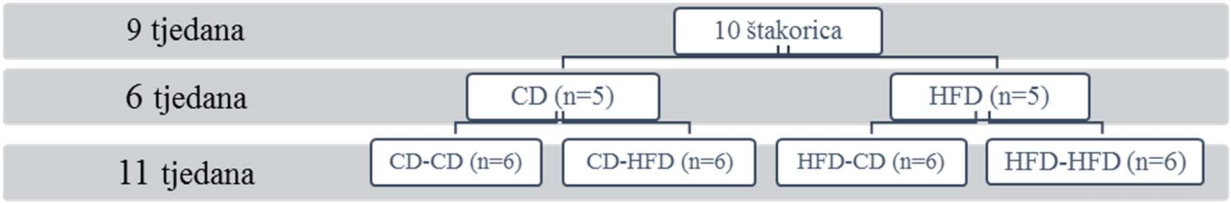
Udio vrste namirnica u dijeti			
	***CD**		**†HFD**
Vrsta namirnice (kcal /100g)	**< 14 tjedan**	**> 14 tjedna**	
Žitarice (378 kcal)	53,7	66,5	30
Proteini životinjskog porijekla (410 kcal)	4,7	3,5	27,2

Proteini biljnog porijekla (sojino brašno, kvasac) (147 kcal)	30,5	18,2	
Masti (sojino ulje) (763 kcal)	1,4	0,4	‡28
Mješavina vitamina i minerala	4,1	3,2	3,9
Stočna hrana (86 kcal)	3,0	7,5	9,7
Aminokiseline	0,1	0,1	0,1

* CD dijeta (kontrolna dijeta, standardna laboratorijska dijeta)
† HFD dijeta (dijeta bogata mastima)
‡ masnoće u obliku palminog ulja

U dobi od navršenih 15 tjedana štakorice obje skupine bile su parene s istim mužjakom da bi se smanjila genetska različitost potomaka i da se tako omogući proučavanje nezavisnih učinaka intrauterine i postnatalne promijenjene prehrane. Nakon tri tjedna gravidnosti i perioda laktacije u trajanju od trećeg tjedna muški potomci kontrolne majke (CD) i majke hranjene masnom ishranom (HFD) nasumično su podijeljeni u četiri skupine s različitim protokolom prehrane:

a) CD-CD (standardno hranjeni potomci od standardno hranjenih majki, n = 6),
b) CD-HFD (masno hranjeni potomci od standardno hranjenih majki, n = 6),
c) HFD-CD (standardno hranjeni potomci od masno hranjenih majki, n = 6) i
d) HFD-HFD (masno hranjeni potomci od masno hranjenih majki, n = 6).



Slika 4.1. Prikaz tijeka studije i ispitivane skupine muških potomaka štakora
CD (majka hranjena standardnom laboratorijskom hranom), HFD (majka hranjena dijetom bogatom mastima), CD-CD (standardno hranjeni potomci od standardno hranjenih majki), CD-HFD (masno hranjeni potomci od standardno hranjenih majki), HFD-CD (standardno hranjeni potomci od masno hranjenih majki) i HFD-HFD (masno hranjeni potomci od masno hranjenih majki).

Muški potomci štakorica smješteni su zatim u odvojene kaveze prostorija Vivarija Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku u kontroliranim uvjetima (temperatura prostorije 22 °C s dvanaestsatnim ciklusima dan – noć). Štakori hranjeni standardnom laboratorijskom hranom (CD-CD i HFD-CD skupina) imali su pristup hrani i vodi *ad libidum*. Skupinama potomaka koji su bili na masnoj prehrani (CD-HFD i HFD-HFD skupina) hrana se nudila kontrolirano – 30 g tijekom dana u 9 i u 16 sati – kako bi se prevenirao nastanak pretilosti zbog prekomjernog unosa hrane. Tako kontrolirana ishrana ipak je omogućavala dovoljan unos hrane kod masno hranjenih štakora te nije bilo restrikcijskog utjecaja izmijene režima hranjenja.

Raspodjela ispitivanih životinja temelji se isključivo na slučajnosti uporabom generatora slučajnih brojeva (www.randomizer.org) (209). Isti se postupak primjenjivao pri raspodjeli skotnih majki u dvije skupine gdje je jedna skupina primala standardnu laboratorijsku hranu, a druga masnu dijetu (CD ili HFD) te pri raspodjeli muških potomaka od navedenih skupina majki nakon perioda laktacije (CD-CD, CD-HFD, HFD-CD, HFD-HFD). Svakoj životinji pridodan je zaseban broj pomoću kojeg je označena kao jedinka, a koji služi pri uporabi generatora slučajnih brojeva. Mjeritelj opisanog istraživanja nije bio upoznat s intervencijom koju je pojedina skupina primila jer su uzorci označeni metodom šifriranja.

U dvadeset drugom tjednu starosti, štakori su žrtvovani koristeći ketamine koktel S 75 mg/kg (Ketanest S 25 mg/ml, ampule 2ml, Pfizer) i midazolama 0,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/ml, 3 ml, Torrex Chiesi Pharma). Omamljenom štakoru postupno je uzeta krv iz desnog ventrikula te ostavljena na sobnoj temperaturi 30 minuta nakon čega je centrifugirana. Serum iz krvi smrznut je na -20 °C radi biokemijske analize, a tkiva petog slabinskog kralješka i jetre izolirana i fiksirana u četiri postotnom puferiranom formaldehidu.

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek te je usklađeno prema Europskim direktivama o skrbi za laboratorijske životinje (direktiva 86/609). Poduzete sve mjere da bi se spriječila patnja životinja. Uzgoj i provođenje istraživanja vodili su znanstveni novaci - asistenti Katedre za anatomiju i neuroznanost koji posjeduju licencu za rad s laboratorijskim životinjama u znanstvene svrhe. Dozvola za obavljanje pokusa Ministarstava poljoprivrede: KLASA: UP/I-322-01/11-01/150 UR.BROJ: 525-06-1-0255/12-2, a Etičko povjerenstvo za istraživanja izdalo je suglasnost za izvođenje istraživanja: KLASA: 602-04/14-08/06, UR.BROJ: 2158-61-07-14-1

4.2. Materijal

4. 2. 1. Vaganje i računanje ITM-a (indeks tjelesne mase)

Potomci su vagani vagom Beurer KS 22, Peking, Kina. Tjelesna težina prvi put je mjerena u četvrtom tjednu života, nakon perioda laktacije i u trenutku odvajanja od majke te stavljanja u novi kavez s pristupom točno određenoj hrani / dijeti (CD ili HFD). Težina se zatim mjerila u osmom tjednu koji kod štakora predstavlja pubertet i u osamnaestom tjednu (zreli potomci). Zadnja zabilježena tjelesna težina kod štakora bila je u trenutku žrtvovanja (dvadeset drugi tjedan). Dobivanje na težini izračunato je u postotcima u odnosu na prethodnu zabilježenu tjelesnu težinu. Uz mjerenja tjelesne težine, izračune dobivanja na tjelesnoj težini tijekom spomenutih tjedana, računao se indeks tjelesne mase koristeći pojednostavljenu formulu:

$$\text{ITM} = \frac{\text{tjelesna masa (g)}}{\text{ukupna duljina goljenične kosti (mm}^2\text{)}} \qquad (4.1)$$

Duljina goljenične kosti mjerena je mikrometarskim kaliperom od hrapavosti tibije do medijalnog maleola (210, 211).

Analizirani su i vagani promatrani organi kao morfološke značajke koje sugeriraju anomalije uzrokovane masnom prehranom. Veliki organi poput srca, jetre, spolnih organa (testisa), lijevog bubrega, slezene, timusa i pluća izolirani su i vagani (Essae Digi analytical balance, ES-DIGI, USA). Težina je organa izračunata kao omjer težine organa prema tjelesnoj težini štakora (211-213).

4. 2. 2. Analiza uzorka krvi

Nakon anestezije uzeta je krv iz desnog ventrikula, ostavljena je 30 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugirana na 3000 r/min kroz 15 minuta. Prikupljeni serum je prvobitno bio čuvan na -20 °C za potrebe biokemijske analize.

Biokemijska analiza razine ALT-a, AST-a, kolesterola i triglicerida provedena je komercijalnim kitovima na Odjelu za medicinsku biokemiju KBC-a Osijek.

Koncentracije proteina iz seruma određene su ELISA setom dostupnim na tržištu za određivanje TNF-alfe, IL-6 kod štakora (BioVendor, Laboratory medicine, Czech Republic). Koncentracija proteina određivala se uz pomoć ELISA kitova prema preporuci proizvođača i njegovom protokolu. Uzorci su se mjerili u duplikatima da bi se dobili što precizniji rezultati i zatim očitavali uz pomoć čitača mikrotitarskih pločica (ELISA) – BioRad 93200 PR3100 TSC Microplate Reader u laboratoriju za imunologiju na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

4. 2. 3. Analiza petog slabinskog kralješka

Priprema uzorka

Nakon žrtvovanja štakorima se odstranjivao slabinski dio kralježnice te se pažljivo izolirao peti slabinski kralježak. Nakon postupnog uklanjanja suvišnog mekog tkiva kralješci su se stavljali u četiri postotni paraformaldehid i fiksirali deset dana. Nakon učvršćivanja, uzorci petog slabinskog kralješka su premješteni u otopinu za dekalcinaciju Osteodec (Bio-optica, Milano s.p.a., Italy) u volumenu uzorak/osteodec, 1:100 u trajanju od jednog dana. Dekalcinirani kralješci standardiziranim su protokolom uklopljeni u parafinske blokove te izrezane na mikrotomu (Reichert-Jung model 2400) u rezove debljine 5 μm. Rezovi su bojani metodom *Toluidin blue* te fotografrani digitalnim fotografskim aparatom marke Olympus®, model C-5050, spojenim na sitnozor marke Olympus®, model BX-50. Za fotografiranje je korišten QuickPHOTO Pro softver (Promicra s.r.o, Prag, Republika Češka). Izoliranje, dekalcinacija, uklapanje, rezanje i bojanje uzorka petog slabinskog kralješka provedeno je uz pomoć inžinjerke Danice Matić s Katedre za histologiju i enbriologiju Medicinskog fakulteta, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Histomorfometrijske analiza petog slabinskog kralješka

Za dobivanje histomorfometrijskih parametara uzorci su fotografirani Olympus BHA sitnozorom (Olympus, Tokyo, Japan) i Pulnix digitalnom kamerom (Pulnix, Yokohama, Japan) povezanima sa stolnim računalom pod povećanjem 40×. Izvršena mjerenja izvedena su poluautomatskim sustavom za analizu s Issa softverom (VamsTec, Zagreb, Republika Hrvatska). Proračuni su se vršili jednadžbama *American Society of Bone and Mineral Research*:

Obujam spužvaste kosti (BV/TV, izražen u postotcima) izveden je iz dvodimenzionalnih mjerenja područja koštane površine (B.Ar) i područja spužvaste kosti (T.Ar) prema Parfittovoj formuli (214-216):

$$\frac{\mathrm{BV}}{\mathrm{TV}} = 100\frac{\mathrm{Ar}}{\mathrm{T.Ar}}$$

(4.2)

Površina spužvaste kosti (BS/TV, izražena u /mm) izračunata je iz mjerenja opsega koštanih gredica (B.Pm) i područja kosti (B.Ar):

$$\frac{\mathrm{BS}}{\mathrm{TV}} = \left(\frac{\mathrm{B.Pm}}{\mathrm{B.Ar}}\right)\left(\frac{4}{\pi}\right)$$

(4.3)

Debljina koštanih gredica (Tb.Th, izražena u mm), izvedena iz mjerenja opsega koštanih gredica (B.Pm) i područja kosti (B.Ar) prema Parfittovoj formuli:

$$\mathrm{Tb.Th} = \left(\frac{\mathrm{B.Ar}}{\mathrm{B.Pm}}\right)\left(\frac{\pi}{2}\right)$$

(4.4)

Broj koštanih gredica (Tb.N, izražen u mm) izveden iz mjerenja opsega koštanih gredica (B.Pm) i područja spužvaste kosti (T.Ar) prema formuli:

$$\text{Tb.N} = \left(\frac{\text{B.Pm}}{\text{T.Ar}}\right)\left(\frac{2}{\pi}\right) \tag{4.5}$$

Razdvojenost koštanih gredica (Tb.Sp, izražena u mm) izvedena prema formuli:

$$\text{Tb.Sp} = \left(\frac{\text{T.Ar - B.Ar}}{\text{B.Pm}}\right)\left(\frac{2}{\pi}\right) \tag{4.6}$$

Mjerena je debljina kortikalne kosti (*cortical thickness*, Ct.Th, u μm) gornje i donje završne ploče trupa kralješka gdje je Pm (opseg kortikalne kosti, u μm); izvedeno prema formuli:

$$\text{Ct.Th} = 2 * \text{Pm}\ \left(\frac{\pi}{4}\right) \tag{4.7}$$

Ukupni volumen kortikalne kosti (*cortical bone volume*, CV/TV, u %) gdje je C.Ar, površina kortikalne kosti, a TV ukupna mjerena površina korteksa se izračunavala:

$$\frac{\text{CV}}{\text{TV}} = \left(\frac{\text{C.Ar}}{\text{TV}}\right) * 100 \tag{4.8}$$

Histomorfometrijska analiza uzoraka provedena je na Zavodu za anatomiju Medicinskog fakulteta u Rijeci.

Imunohistokemijska analiza tkiva slabinskog kralješka

Parafinski blokovi rezali su se na mikrotomu marke Reichert-Jung model 2400 na rezove debljine 5 μm i nanosili na adhezivna predmetna stakla Menzel-Gläser Polysine slides (Thermo Scientific, Rockford, SAD). Prije deparafiranja rezovi su držani 10 minuta u grijaču za parafin da bi se spriječilo gubljenje preparata procesom imunohistokemije koji je čest u slučaju analize koštanog tkiva. Rezovi su se zatim deparafinirali kroz niz otopina: 100 % ksilol 2 x 20 min, 100 % etilni alkohol 2 x 20 min, 70 % etilni alkohol 1x15 min, a zatim su se stavljali

u destiliranu vodu. Na preparatima je nakon toga uslijedilo dvadeset minuta blokiranja endogene peroksidaze 0,3 % -tnim vodikovim peroksidom (H_2O_2), a zatim se provelo izlaganje epitopa (antigen retrieval) u citratnom puferu (pH = 6,0) zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici tijekom približno tri minute. Blokiranje nespecifičnog vezanja učinilo se korištenjem SuperBlock® reagensa (Thermo Scientific, Rockford, SAD) tijekom najmanje četrdeset i pet minuta. Poliklonalno zečje primarno protutijelo Anti-TNF-alfa (ab6671) (abcam Cambridge, UK) nanosilo se u koncentraciji 1:500 te je uslijedila inkubacija rezova na 4 °C preko noći dok se na negativne kontrole nanosilo PBS (pH = 7,4) bez primarnog protutijela, također držano preko noći u istim uvjetima. Pozitivne kontrole (tkivo jetre) prolazile su potpuno isti postupak kao ispitivani rezovi. Nakon inkubacije s primarnim protutijelom, rezovi su se ispirali u PBS-u s dodanim Tween-om (0,05 %) (Sigma-Aldrich, St. Louis; MO, SAD) četiri puta po pet minuta. Nakon toga kao sekundarno protutijelo upotrijebilo se kozji protuzečji IgG H&L (HRP) (ab97051 abcam Cambridge, UK) u razrjeđenju 1:200. Sekundarno tijelo nanosilo se na sve rezove i te je takvo stajalo trideset minuta na sobnoj temperaturi nakon čega je uslijedilo još četiri ispiranja u PBS-u s 0,05 % Tween-a. Rezovi su inkubirani sa streptavidinom konjugiranim s peroksidazom iz hrena (Streptavidin-HRP) (Dako ili Sigma) u razrjeđenju 1:300 na sobnoj temperaturi u trajanju od trideset minuta. Uslijedilo je još četiri ispiranja u PBS-u s Tween-om nakon čega je nanesena otopina 3,3'- diaminobenzidina (DAB, supstrat) pripremljena iz seta otopina DAB Peroxidase Substrate Kit (Vector). Nakon daljnjih četiriju ispiranja u PBS-u s Tween-om preparati su se kontrastno obojili hemalaunom i dehidrirali u otopinama (96 % etilni alkohol 2x15 minuta, 100 % etilni alkohol 2x15 minuta, 100 % ksilol 2x10 minuta). Na kraju postupka nanesen je *canada* balzam (Kremer Pigmente GmbH & Co. KG) i na njega je stavljeno pokrovno staklo te su se tako dobili trajni preparati za daljnje analiziranje. Preparati su fotografirani digitalnim aparatom marke Olympus®, model C-5050 spojenim na sitnozor marke Olympus®, model BX-50. Za fotografiranje je korišten QuickPHOTO Pro softver (Promicra s.r.o, Prag, Republika Češka).

Provedba imunohistokemije i analiza uzoraka provedena je na Zavodu za Anatomiju Medicinskog fakulteta u Rijeci. Učinjena je semikvatifikacija imunohistokemijskog intenziteta pomoću Image J programa (Poglavlje 4.2.4.)

4. 2. 4. Analiza parenhima jetre

Priprema uzorka

Dio uzorka tkiva jetre izdvojilo se i stavljalo u bijele histološke kazetice. Uzorci su učvršćeni u četiri postotnom puferiranom formaldehidu tijekom pet dana. Učvršćeno tkivo jetre nakon toga dehidrirano je povećavajući koncentracije etanola (75 % etanol 10 minuta, 95 % etanol 10 minuta i apsolutni etanol 10 minuta) i uklapajući u parafinske blokove. Uzorci su rezani na 5 μm debljine Reichert-Jung modelom 2400 i stavljani na predmetna histološka stakalca te bojani standardiziranom hematoksilinom i eozinom metodom.

Proces rezanja mikrotonom provela je inžinjerka Danica Matić s Katedre za histologiju i embriologiju Medicinskog Fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Stupanj oštećenja jetre

Uzorci parenhima jetre, dehidrirani slijedom otopina (100 % ksilol 2x10 min, 100 % etilni alkohol 2x10 min, 70 % etilni alkohol 1x15 min i u H_2O) te bojani hematoksilinom i eozinom.

Preparati su pregledani svjetlosnim sitnozorom (Olimpus 460) i patohistološki semikvatificirani. Mikroskopski je oštećenje jetrenog parenhima stupnjevano korištenjem arbitrarne skale 0 – 3 kako slijedi: stupanj 0 – nema oštećenja, normalna jetra; stupanj 1 – minimalne lezije koje uključuju pojedinačne do nekoliko nekrotičnih stanica; stupanj 2 – blaga oštećenja, 10 – 25 % nekrotičnih stanica ili blage difuzne degenerativne promjene; stupanj 3 – umjerena oštećenja, 25 – 40 % nekrotičnih ili degenerativno promijenjenih stanica; stupanj 4 – značajna oštećenja, 40 – 50 % nekrotičnih ili degenerativno promijenjenih stanica; stupanj 5 – teška oštećenja, više od 50 % nekrotičnih ili degenerativno promijenjenih stanica. Jetreni režnjevi sa stupnjem oštećenja većim od dva smatrani su značajno oštećenim (217).

Analiza stupnja oštećenja jetre provedena je uz pomoć dr. sc. Valerije Blažičević, dr. med s Katedre za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Imunohistokemijska analiza tkiva jetre

Parafinski blokovi rezali su se na mikrotomu marke Reichert-Jung model 2400 na rezove debljine 5 μm i nanosili na adhezivna predmetna stakla Menzel-Gläser Polysine slides (Thermo Scientific, Rockford, SAD). Rezovi su se zatim deparafinirali kroz niz otopina: 100 % ksilol 2x20 minuta, 100 % etilni alkohol 2x20 minuta, 70 % etilni alkohol 1x15 minuta i zatim stavljali u H_2O. Na preparatima je nakon toga uslijedilo dvadeset minuta blokiranja endogene peroksidaze 0,3 %-tnim vodikovim peroksidom (H_2O_2) te se provelo izlaganje epitopa (antigen retrieval) u citratnom puferu (pH = 6,0) zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici tijekom približno tri minute. Blokiranje nespecifičnog vezanja učinilo se korištenjem SuperBlock® reagensa (Thermo Scientific, Rockford, SAD) tijekom najmanje četrdeset pet minuta. Poliklonalno zečje primarno protutijelo Anti-TNF-alfa (ab6671) (abcam Cambridge, UK) nanosilo se u koncentraciji 1:500 te je uslijedila inkubacija rezova na 4°C tijekom noći dok se na negativne kontrole nanosilo PBS (pH = 7,4) bez primarnog protutijela te se također držalo tijekom noći u istim uvjetima. Nakon inkubacije s primarnim protutijelom rezovi su se ispirali u PBS-u s dodanim Tween-om (0,05 %) (Sigma-Aldrich, St. Louis; MO, SAD) četiri puta po pet minuta. Nakon toga kao sekundarno protutijelo upotrijebilo se kozji protuzečji IgG H&L (HRP) (ab97051 abcam Cambridge, UK) u razrjeđenju 1:200. Sekundarno tijelo nanosilo se na sve rezove i stajalo je trideset minuta na sobnoj temperaturi nakon čega je uslijedilo još četiri ispiranja u PBS-u s 0,05 % Tween-a. Rezovi su inkubirani sa streptavidinom konjugiranim s peroksidazom iz hrena (Streptavidin-HRP) (Dako ili Sigma) u razrjeđenju 1:300 na sobnoj temperaturi u trajanju od trideset minuta. Uslijedilo je još četiri ispiranja u PBS-u s Tween-om nakon čega je nanesena otopina 3,3'- diaminobenzidina (DAB, supstrat) pripremljena iz seta otopina DAB Peroxidase Substrate Kit (Vector). Nakon daljnjih četiriju ispiranja u PBS-u s Tween-om, preparati su se kontrastno obojili hemalaunom i dehidrirali u otopinama (96 % etilni alkohol 2x15 minuta, 100 % etilni alkohol 2x15 minuta, 100 % ksilol 2x10 minuta). Na kraju postupka nanesen je *canada* balzam i zatim pokrovno staklo te su se tako dobili trajni preparati.

Uzorci su fotografirani uz pomoć kolege histologa dr. sc. Nikole Bijelića, dr. med. S Katedre za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

4. 2. 5. Semikvantifikacija imunohistokemijskog intenziteta

Nakon bojanja svjetlosnim sitnozorom analizirana je pozitivna reakcija na navedena protutijela semikvantitativnom analizom ImageJ programom. Na uzorku/rezu parenhima jetre i koštanog tkiva provela se kvantifikacija intenziteta imunohistokemijskog signala koji se mjerio računalnim programom ImageJ. Prvo je bilo potrebno dobiti mikrografije uzorka tkiva jetre i petog slabinskog kralješka fotoaparatom Olympus®, model C-5050, spojenim na sitnozor marke Olympus®, model BX-50. Programom imageJ uspoređivao se intenzitet imunohistokemijskog obojenja tkiva jetre i koštanog tkiva s odgovarajućim kontrolnim uzorcima. Kvantifikacija se određivala tako da se obojane slike mijenjaju u sivu nijansu, a stupanj sive boje zatim se mijenja u numeričku vrijednost. Radi točnije analize uzimalo se više vidnih polja istog uzorka čime se postiže i mogućnost statističke analize kako je to već i prikazano u znanstvenim radovima (218, 219).

Uzorci tkiva obrađivani su i analizirani na Katedri za histologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i na Zavodu za anatomiju Medicinskog fakulteta u Rijeci pod vodstvom prof. dr. sc. Roberta Domitrovića dipl. ing. med. biokem.

4. 2. 6. Statistička analiza

Kategorijski podatci bit će predstavljeni apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički podatci bit će opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju raspodjela koje slijede normalnu, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona.

Normalnost raspodjele numeričkih varijabli bit će testirana Shapiro Wilks testom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina bit će testirane Mann-Whitneyevim U testom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli među četirima nezavisnim skupinama bit će testirane analizom varijance (ANOVA), a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Kruskal-Wallisovim testom. Stupičastim grafikonom prikazani su podatci dobiveni patohistološkim promatranjem i stupnjevanjem imunohistokemijskog signala TNF-alfe. Povezanost normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli bit će ocijenjena Spearmanovim koeficijentom korelacije **ρ** (rho).

Budući da je uzorak štakora po skupini ograničen (zbog zakonskih odredbi korištenja životinja u znanstvene svrhe), analize skupina vršit će se neparametrijskim testovima. Uz

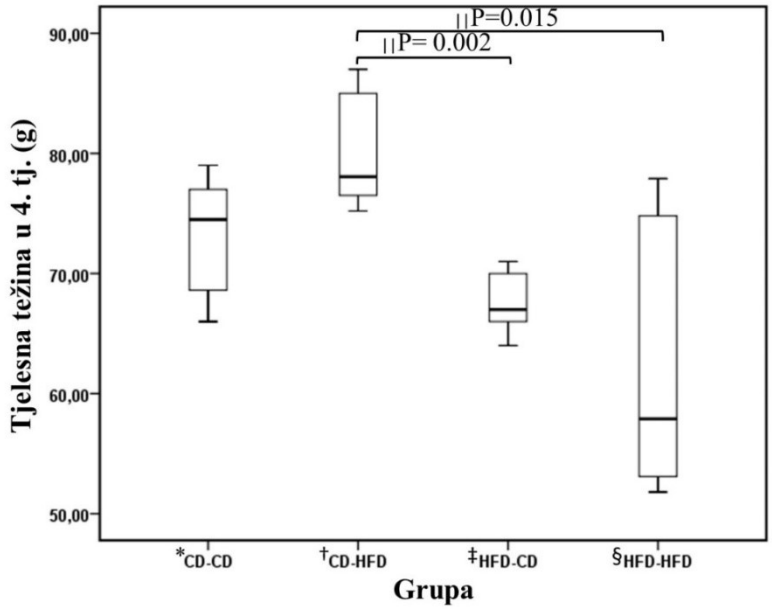
pretpostavku koeficijenta varijabilnosti od 10 % i za uočavanje razlike od 25 % potrebno je 5 životinja po skupini (220).

Sve P vrijednosti bit će dvostrane. Razina značajnosti bit će postavljena na $\alpha = 0,05$. Za statističku analizu bit će korišten statistički program MedCalc (inačica 16.2.0, MedCalc Software bvba, Ostend, Belgija).

5. REZULTATI

5.1. Tjelesna težina, ITM (indeks tjelesne mase) i težina izoliranih organa

Tjelesna težina prvi se put mjerila u njihovom četvrtom tjednu starosti, tijekom odvajanja od majke nakon laktacije gdje je zabilježena značajno viša tjelesna težina u skupini CD-HFD (78,05 [76,18-85,50] g) u usporedbi sa skupinama HFD-CD (67,00 [65,50-70,25] g) i HFD-HFD (57,90 [52,78-75,58] g), (Kruskal – Wallis test, P = 0,001) (Slika 5.1., Tablica 5.1.). Nije bilo značajnosti u tjelesnoj težini štakora u četvrtom tjednu starosti uspoređujući kontrolnu skupinu sa svim ostalim skupinama potomaka (CD-HFD, P = 0,109; HFD-CD, P = 0,064; HFD-HFD, P = 0,109, Mann – Whitney U test) kao i uspoređujući skupinu HFD-CD s HFD-HFD skupinom (P = 0,336, Mann – Whitney U test).



Slika 5.1. Tjelesna težina u četvrtom tjednu starosti štakora hranjenih različitom prehranom.

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom

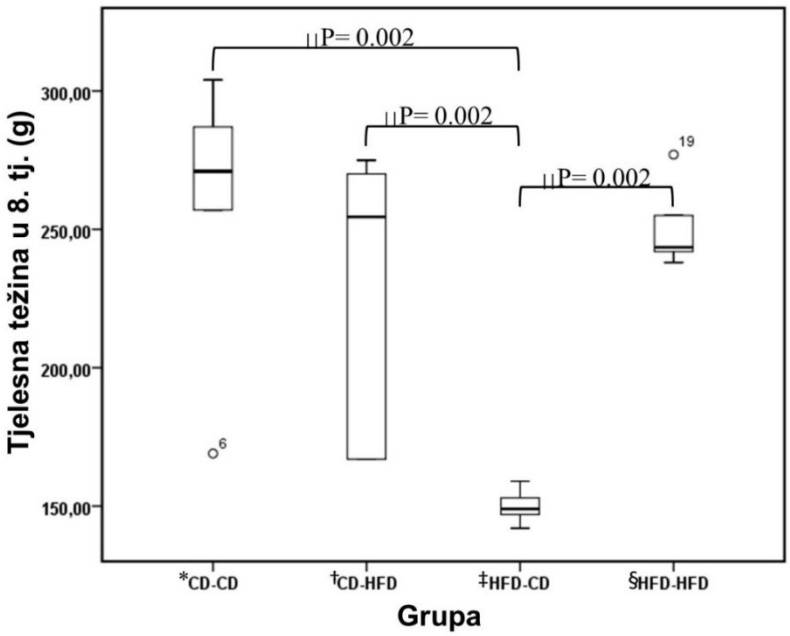
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće

‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom

§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni

|| Razlike su testirane Mann – Whitney U testom, razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$

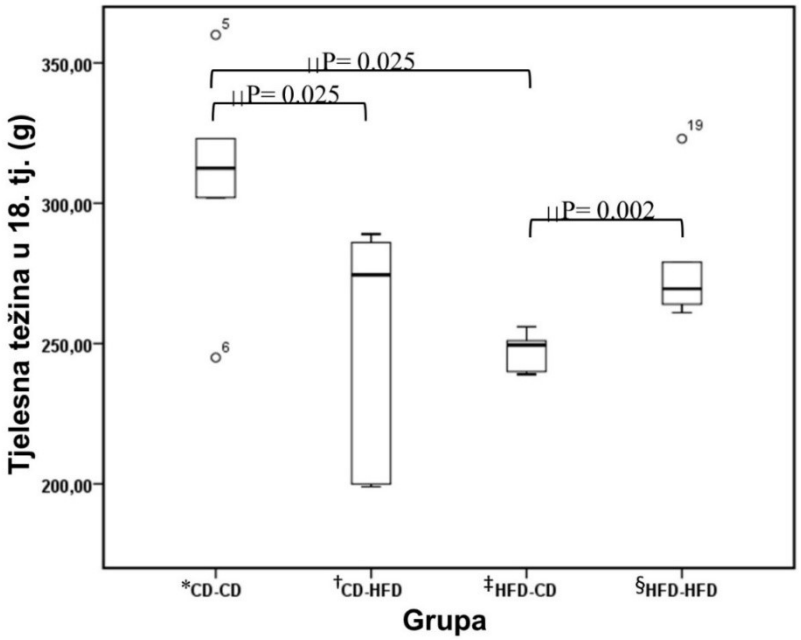
U osmom tjednu skupina HFD-CD (149,00 [145,75-154,50] g) imala je značajno nižu tjelesnu težinu u odnosu na sve druge skupine potomaka (Slika 5.2., Tablica 5.1.). Nije zabilježena značajnost u težini štakora u osmom tjednu starosti uspoređujući kontrolnu skupinu s masno hranjenim skupinama (CD-HFD, P = 0,149; HFD-HFD, P = 0,109, Mann – Whitney U test) i uspoređujući skupine CD-HFD i HFD-HFD (P = 0,873, Mann – Whitney U test).



Slika 5.2. Tjelesna težina u osmom tjednu starosti štakora hranjenih različitom prehranom.
*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni
|| Razlike su testirane Mann – Whitney U testom, razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$

Mjerenjem težine u osamnaestom tjednu skupina CD-CD (312,50 [287,75-332,25] g) imala je značajno višu težinu u usporedbi sa skupinom CD-HFD (274,50 [199,75-286,75] g) i HFD-CD (249,50 [239,75-252,25] g). Skupina HFD-CD imala je najnižu tjelesnu težinu uspoređeno sa svim drugim skupinama (Kruskal – Wallis test, P = 0,010) (Slika 5.3., Tablica 5.1.). Nije bilo značajnosti uspoređujući HFD-HFD skupinu s CD-CD skupinom (P = 0,173, Mann – Whitney U test) i s CD-HFD skupinom (P = 0,936, Mann – Whitney U test).

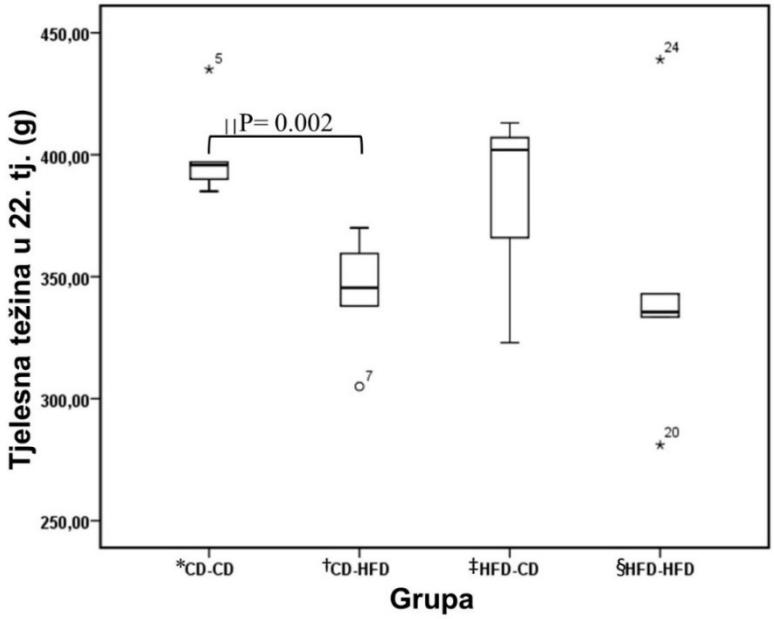
Usporedbom CD-HFD i HFD-CD skupine također nije zabilježena značajna promjena u tjelesnoj težini u osamnaestom tjednu starosti štakora (P = 0,337, Mann – Whitney U test).



Slika 5.3. Tjelesna težina u osamnaestom tjednu starosti štakora hranjenih različitom prehranom.

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni
|| Razlike su testirane Mann – Whitney U testom, razina značajnosti je postavljena na α = 0,05

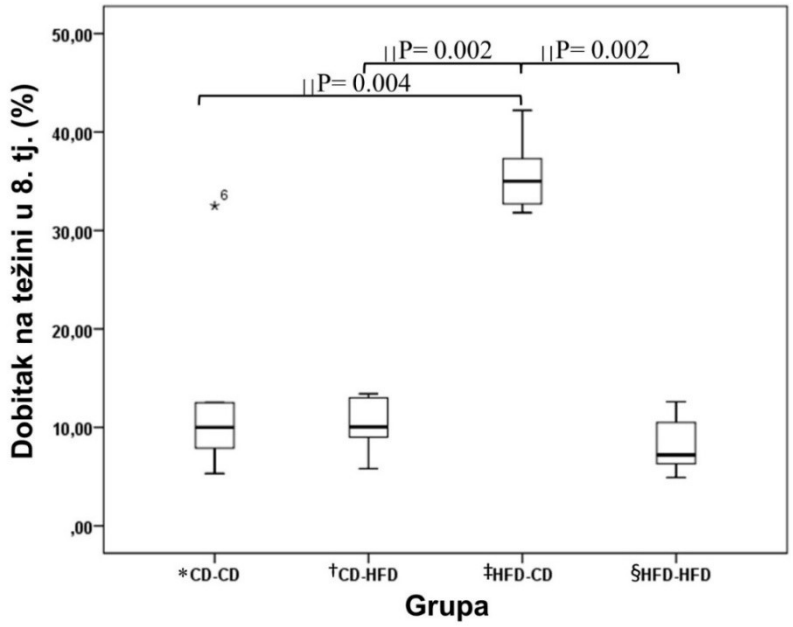
U trenutku žrtvovanja (dvadeset drugi tjedan) skupina HFD-CD (402,00 [355,25-408,50] g) ima najvišu tjelesnu težinu dok je kontrolna skupina (395,75 [388,75-406,50] g) imala značajno višu tjelesnu težinu u odnosu na skupinu CD-HFD (345,50 [329,75-362,13] g) (Slika 5.4., Tablica 5.1.). Masno hranjena skupina nije pokazala značajnu razliku u tjelesnoj težini uspoređujući s ostalim skupinama (CD-CD, P = 0,055; CD-HFD, P = 0,297; HFD-CD, P = 0,199, Mann – Whitney U test). Uspoređujući HFD-CD skupinu s CD-CD skupinom (P = 0,055, Mann – Whitney U test) i s CD-HFD (P = 0,054, Mann – Whitney U test), nije bilo značajnosti.



Slika 5.4. Tjelesna težina u dvadeset drugom tjednu starosti štakora hranjenih različitom prehranom.

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni
|| Razlike su testirane Mann – Whitney U testom, razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$

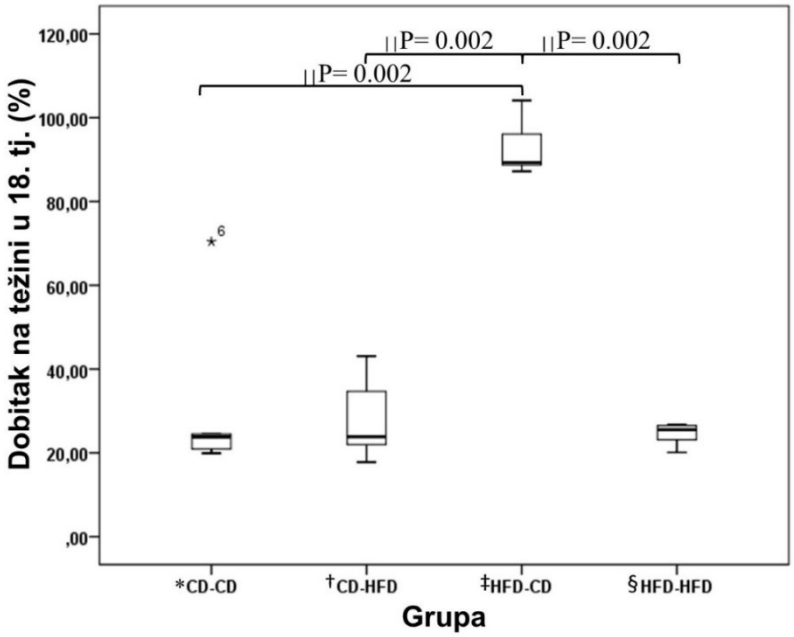
Prosječno dobivanje na težini kod HFD-CD skupine štakora bilo je značajno više u odnosu na sve ostale skupine koje su stalno gubile na težini tijekom cijelog pokusa (Kruskal – Wallis test, P = 0,001) (Slika 5.5. – 5.7., Tablica 5.1.). U osmom tjednu (Slika 5.5.) razlika u prosječnom dobivanju na težini nije bila značajna između kontrolne skupine i CD-HFD (P = 0,81, Mann – Whitney U test) i HFD-HFD skupine (P = 0,337, Mann – Whitney U test). Nije bilo značajnosti između CD-HFD i HFD-HFD skupina (P = 0,262, Mann – Whitney U test).



Slika 5.5. Dobitak na tjelesnoj težini u osmom tjednu starosti štakora hranjenih različitom prehranom.

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni
|| Razlike su testirane Mann – Whitney U testom, razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$

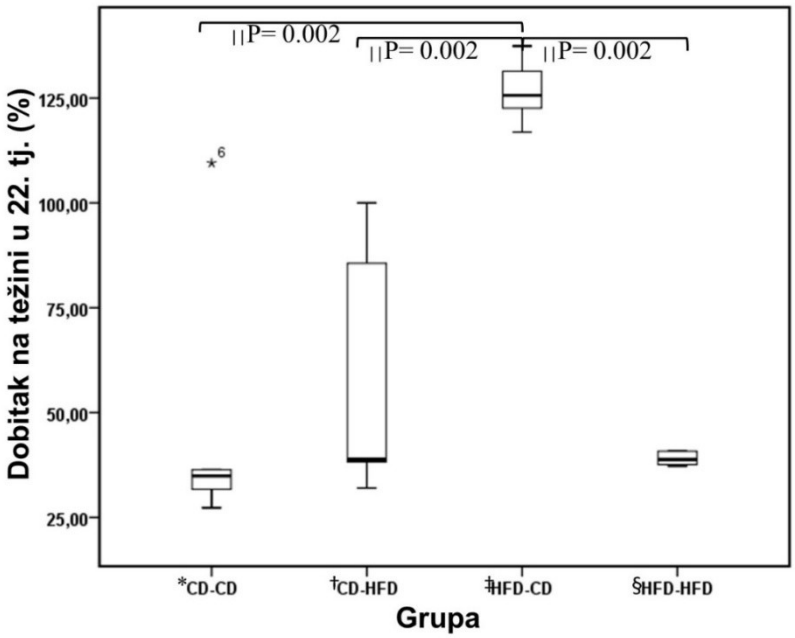
U osamnaestom tjednu (Slika 5.6.) razlika u prosječnom dobivanju na težini nije bila značajna između kontrolne skupine i CD-HFD ($P = 0,873$, Mann – Whitney U test) i HFD-HFD skupine ($P = 0,423$, Mann – Whitney U test). Nije bilo značajnosti između CD-HFD i HFD-HFD skupina ($P = 0,749$, Mann – Whitney U test).



Slika 5.6. Dobitak na tjelesnoj težini u osamnaestom tjednu starosti štakora hranjenih različitom prehranom.

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni
|| Razlike su testirane Mann – Whitney U testom, razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$

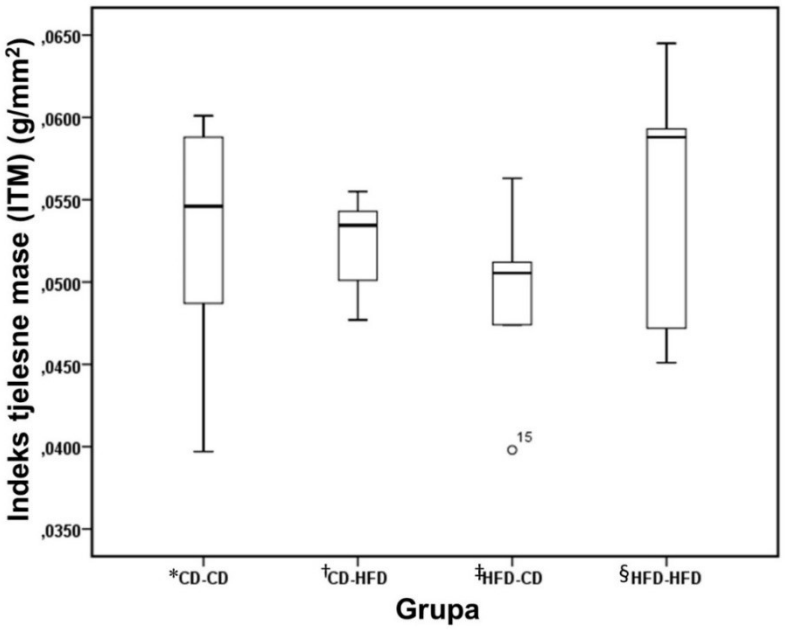
U trenutku žrtvovanja (Slika 5.7.) razlika u prosječnom dobivanju na težini nije bila značajna između kontrolne skupine i CD-HFD ($P = 0,15$, Mann – Whitney U test) i HFD-HFD skupine ($P = 0,54$, Mann – Whitney U test). Nije bilo značajnosti između CD-HFD i HFD-HFD skupina ($P = 0,748$, Mann – Whitney U test). Najmanje je zabilježeno dobivanje na tjelesnoj težini u skupinama CD-HFD (38,85 [36,65-89,20] %) i HFD-HFD (38,80 [37,50-40,80] %) za razliku od skupine HFD-CD koja je stalno najviše dobivala na tjelesnoj masi (125,65 [121,18-132,90] %).



Slika 5.7. Dobitak na tjelesnoj težini u dvadeset drugom tjednu starosti štakora hranjenih različitom prehranom.

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni
|| Razlike su testirane Mann – Whitney U testom, razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$

Povećana prehrambena potrošnja masnih kiselina nije imala utjecaja na indeks tjelesne mase (ITM) (Kruskal – Wallis test, P = 0,410) (Slika 5.8., Tablica 5.1.).



Slika 5.8. Indeks tjelesne mase (ITM) štakora hranjenih različitom prehranom.

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni

Tablica 5.1. Tjelesna težina, dobivanje na tjelesnoj težini i indeks tjelesne mase kod različito hranjenih muških potomaka štakora

Tjelesna težina, dobivanje na tjelesnoj težini i indeks tjelesne mase izražen u medijanu i granicama interkvartilnog raspona					
	*CD-CD	†CD-HFD	‡HFD-CD	§HFD-HFD	‖P
Tjelesna težina (g)					
4. tjedan	74,50 [67,95-77,50]	78,05 [76,18-85,50]	67,00 [65,50-70,25]	57,90 [52,78-75,58]	0,001
8. tjedan	271,00 [235,00-291,25]	254,50 [167,00-271,25]	149,00 [145,75-154,50]	243,50 [241,00-260,50]	0,001
18. tjedan	312,50 [287,75-332,25]	274,50 [199,75-286,75]	249,50 [239,75-252,25]	269,50 [263,25-290,00]	0,010
22. tjedan	395,75 [388,75-406,50]	345,50 [329,75-362,12]	402,00 [355,25-408,50]	335,50 [320,38-367,00]	0,019
Dobivanje na težini (%)					
8. tjedan	10,00 [7,25-17,50]	10,05 [8,20-13,10]	35,00 [32,48-38,53]	7,20 [5,95-11,03]	0,001
18. tjedan	23,80 [20,65-36,00]	23,85 [20,95-36,80]	89,30 [88,33-98,10]	25,55 [22,35-26,55]	0,001
22. tjedan	34,90 [30,60-54,68]	38,85 [36,65-89,20]	125,65 [121,18-132,90]	38,80 [37,50-40,80]	0,001
¶ITM (g/mm²)	0,055 [0,046-0,059]	0,053 [0,05-0,055]	0,05 [0,046-0,052]	0,059 [0,047-0,06]	0,410

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom

†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće

‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom

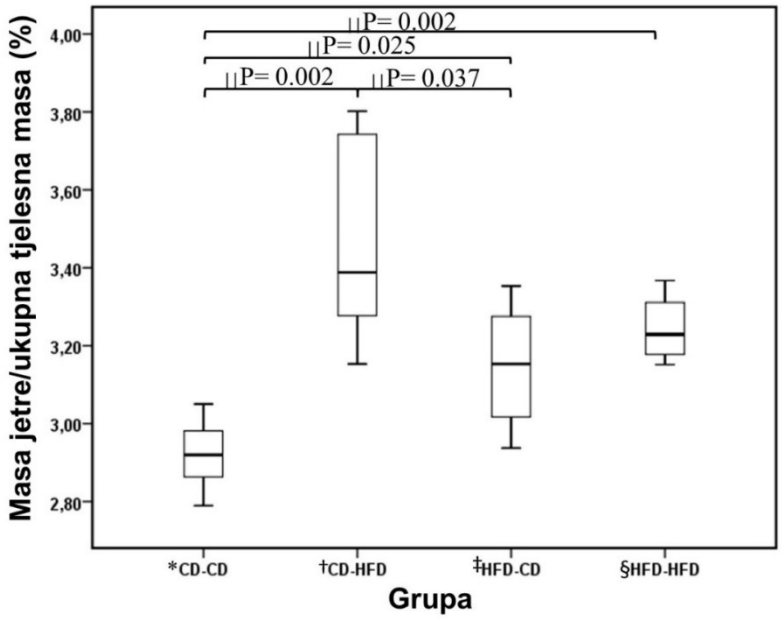
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni

‖ Razlike su testirane Kruskal – Wallisovim testom, razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$

¶ ITM indeks tjelesne mase

Nakon žrtvovanja, uzimanja krvi za analizu, izolirani organi su vagani zasebno. Udio organa u odnosu na tjelesnu težinu jedinke po skupinama pokazao je da potomci hranjeni standardnom laboratorijskom prehranom (CD-CD i HFD-CD) imaju manji udio težine promatranih organa od masno hranjenih potomaka (CD-HFD, HFD-HFD).

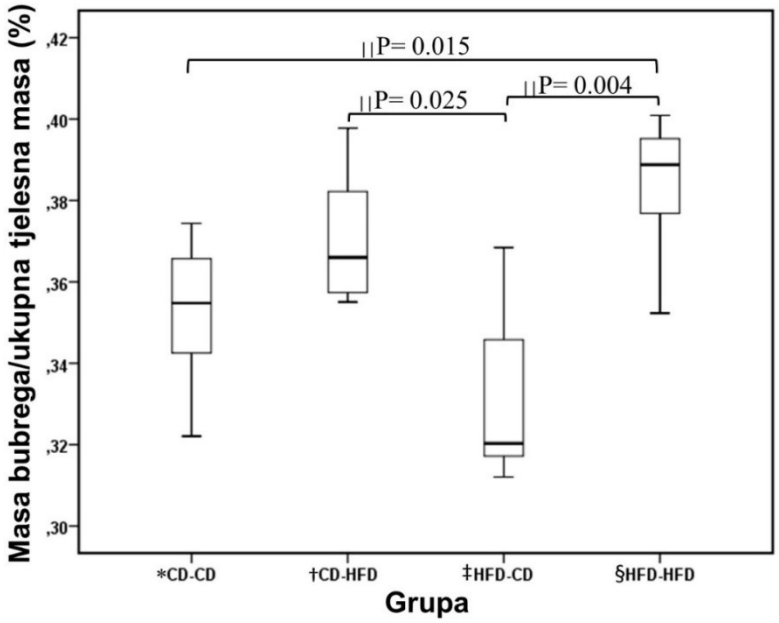
Udio mase jetre pokazao je da je CD-HFD (3,39 [3,25-3,76] %) skupina imala značajno veći postotak mase u odnosu na težinu tijela uspoređujući s CD-CD (2,92 [2,84-3,00] %) i HFD-CD (3,15 [2,99-3,29] %) skupinama. Značajno najmanji udio mase jetre zabilježen je u CD-CD skupini uspoređujući s ostalim potomcima dok je najveći udio zabilježen u CD-HFD skupini (3,39 [3,25-3,76] %) ($P < 0,001$, Kruskal – Wallis test) (Tablica 5.2., Slika 5.9.). Skupina HFD-HFD nije imala značajno različit udio mase jetre u odnosu na CD-HFD ($P = 0,337$, Mann – Whitney U test) i HFD-CD ($P = 0,15$, Mann – Whitney U test) skupinu.



Slika 5.9. Postotni udio težine jetre u odnosu na tjelesnu težinu štakora hranjenih različitom prehranom.

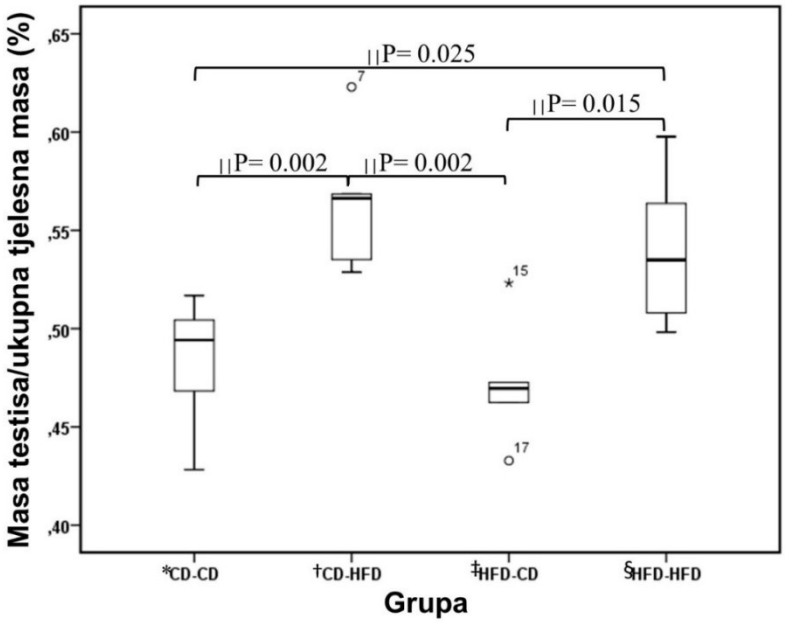
*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni
|| Razlike su testirane Mann – Whitney U testom, razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$

Udio mase lijevog bubrega i testisa pokazao se značajno višim u potomaka HFD-HFD skupine uspoređujući s kontrolno hranjenim štakorima (P < 0,001, Kruskal – Wallis test) (Tablica 5.2., Slika 5.10. i 5.11.). Značajnost kod udjela mase lijevog bubrega nije se pokazala u usporedbi kontrolne skupine s CD-HFD (P = 0,15, Mann – Whitney U test) i HFD-CD skupinom (P = 0,78, Mann – Whitney U test) te u usporedbi CD-HFD s HFD-HFD (P = 0,262, Mann – Whitney U test) skupinom. Udio mase testisa nije se pokazao značajnim u usporedbi CD-CD skupine s HFD-CD skupinom (P = 0,522, Mann – Whitney U test) i usporedbom CD-HFD s HFD-HFD skupinom (P = 0,15, Mann – Whitney U test).



Slika 5.10. Postotni udio težine lijevog bubrega u odnosu na tjelesnu težinu štakora hranjenih različitom prehranom.

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni
|| Razlike su testirane Mann – Whitney U testom, razina značajnosti je postavljena na α = 0,05



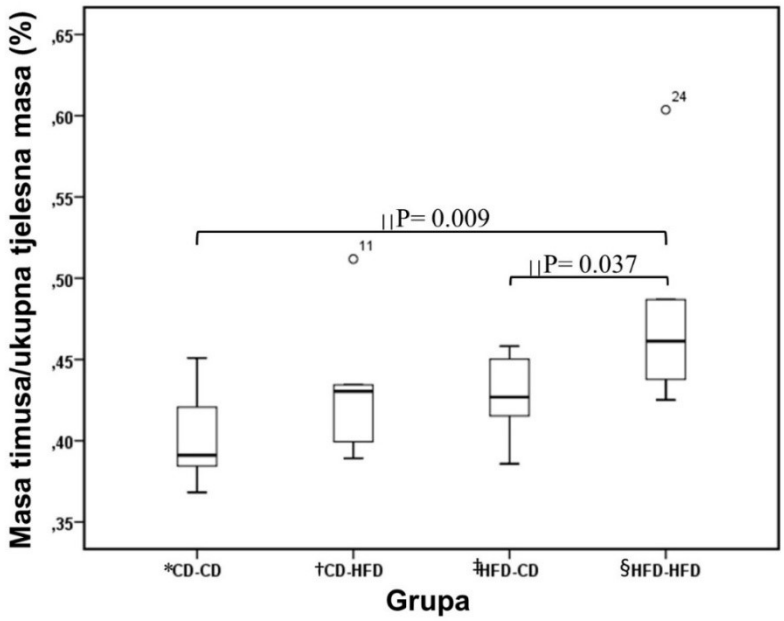
Slika 5.11. Postotni udio težine testisa u odnosu na tjelesnu težinu štakora hranjenih različitom prehranom.

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni
|| Razlike su testirane Mann – Whitney U testom, razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$

Udio mase slezene bio je najveći u HFD-HFD skupini (0,23 [0,22-0,24] %), najmanji u HFD-CD skupini (0,20 [0,19-0,21] %) što se *post hoc* analizom pokazalo značajno (P = 0,025, Mann – Whitney U test).

Udio mase timusa pokazao je da skupina HFD-HFD (0,46 [0,43-0,52] %) ima značajno viši udio uspoređujući s kontrolno hranjenim muškim štakorima (CD-CD, HFD-CD), (Kruskal – Wallis test, p = 0,040) (Tablica 5.2., Slika 5.12.). CD-HFD skupina nije pokazala značajnost u udjelu mase timusa uspoređujući ju sa svim drugim skupinama (CD-CD, P = 0,109; HFD-CD, P = 0.95; HFD-HFD, P = 0,109, Mann – Whitney U test) kao ni CD-CD skupina uspoređujući ju s HFD-CD skupinom (P = 0,2, Mann – Whitney U test).

Nije bilo značajnosti kod udjela mase srca i pluća između ispitivanih skupina.



Slika 5.12. Postotni udio težine timusa u odnosu na tjelesnu težinu štakora hranjenih različitom prehranom.

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni
|| Razlike su testirane Mann – Whitney U testom, razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$

Tablica 5.2. Udio težine ispitivanog organa u ukupnoj tjelesnoj masi izraženo u postotcima kod različito hranjenih muških potomaka

	Postotni udio težine organa u odnosu na tjelesnu težinu izraženo u medijanu i granicama interkvartilnog raspona				
Organi	*CD-CD	†CD-HFD	‡HFD-CD	§HFD-HFD	P
Srce	0,46 [0,40-0,48]	0,47 [0,43-0,47]	0,45 [0,42-0,47]	0,47 [0,43-0,53]	0,474
Jetra	2,92 [2,84-3,00]	3,39 [3,25-3,76]	3,15 [2,99-3,29]	3,23 [3,17-3,33]	<0,001
Testisi	0,49 [0,46-0,51]	0,57 [0,53-0,58]	0,47 [0,46-0,49]	0,53 [0,51-0,57]	<0,001
Lijevi bubreg	0,35 [0,34-0,37]	0,37 [0,36-0,39]	0,32 [0,32-0,35]	0,39 [0,37-0,40]	<0,001
Slezena	0,22 [0,20-0,23]	0,21 [0,20-0,23]	0,20 [0,19-0,21]	0,23 [0,22-0,24]	0,058
Timus	0,23 [0,28-0,43]	0,43 [0,40-0,45]	0,43 [0,41-0,45]	0,46 [0,43-0,52]	0,040
Pluća	0,09 [0,08-0,11]	0,10 [0,09-0,12]	0,10 [0,09-0,11]	0,11 [0,09-0,13]	0,429

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom

†CD-HFD- majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće

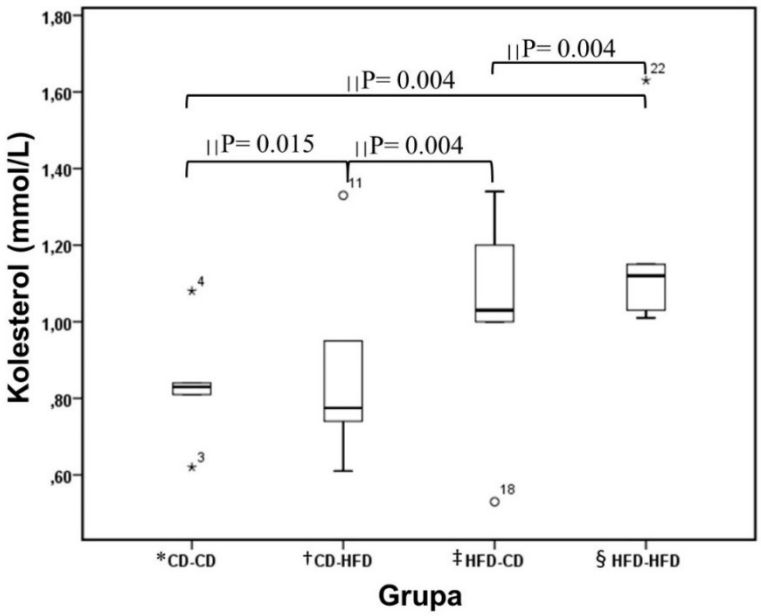
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom

§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni

|| Razlike su testirane Kruskal-Wallisovim testom, razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$

5. 2. Biokemijska analiza seruma

Najveća koncentracija kolesterola u serumu pronađena je u HFD-HFD skupini (2,45 [2,32-2,90] mmol/L), a najmanja u HFD-CD skupini (1,76 [1,60-2,00] mmol/L). Kod skupine CD-HFD (2,31 [2,08-2,56] mmol/L) zabilježena je značajno viša vrijednost kolesterola u odnosu na skupine potomaka hranjene kontrolnom dijetom (CD-CD (1,85 [1,63-2,01] mmol/L) i HFD-CD). Koncentracija kolesterola bila je značajno niža u HFD-CD skupini u usporedbi s potomcima koji su bili hranjeni masnom dijetom (CD-HFD i HFD-HFD skupine) ($P < 0,001$, Kruskal – Wallis test) (Tablica 5.3., Slika 5.13.). Značajnost nije zamijećena uspoređujući skupinu CD-CD s HFD-CD skupinom ($P = 0,810$, Mann – Whitney U test) i skupine CD-HFD i HFD-HFD ($P = 0,273$, Mann – Whitney U test).

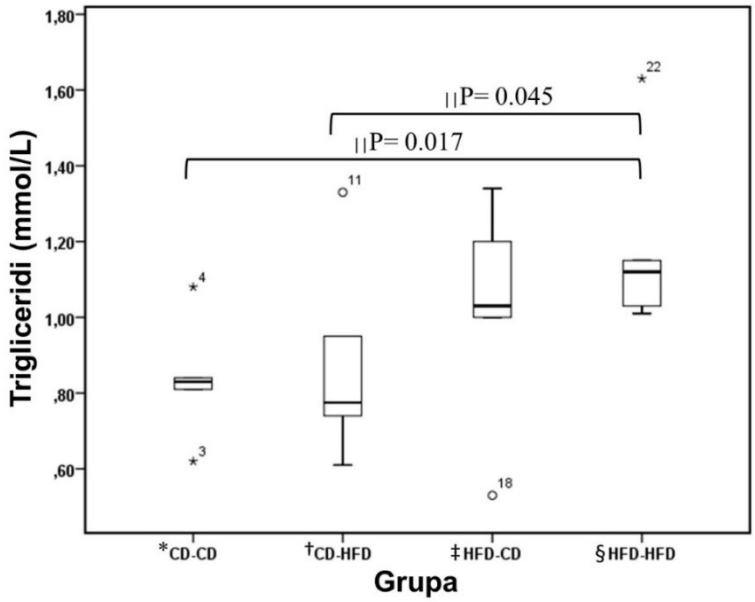


Slika 5.13. Koncentracija kolesterola u serumu štakora hranjenih različitom prehranom.

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni
|| Razlike su testirane Mann – Whitney U testom, razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$

Koncentracija triglicerida u serumu bila je značajno niža kod CD-CD (0,83 [0,76-0,90] mmol/L) i CD-HFD skupine (0,78 [0,71-1,05] mmol/L) u usporedbi s HFD-HFD skupinom

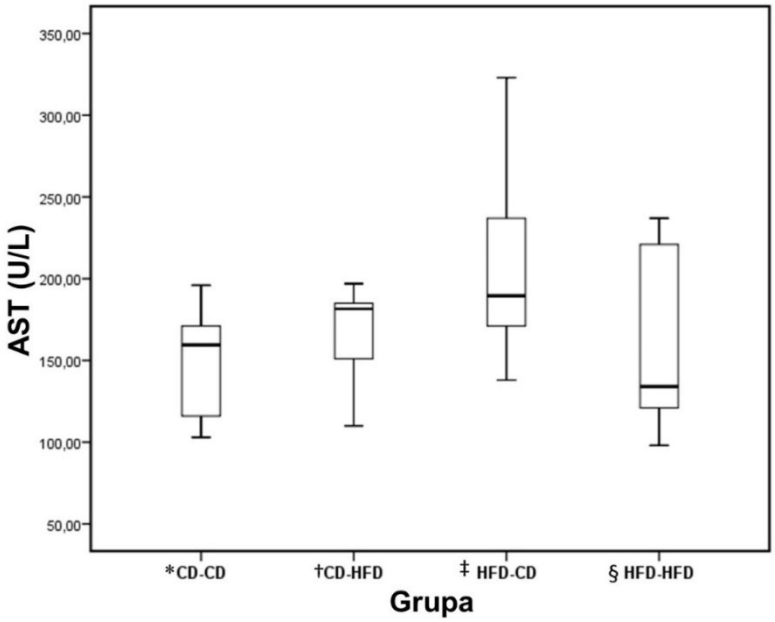
(1,12 [1.02- 1,39] mmol/L) (Tablica 5.3., Slika 5.14.). Značajnost nije zamijećena uspoređujući kontrolnu skupinu s CD-HFD (P = 0,521, Mann – Whitney U test) i HFD-CD (P = 0,148, Mann – Whitney U test) skupinama potomaka. Nije zamijećena značajna razlika u koncentraciji triglicerida uspoređujući skupinu HFD-CD s CD-HFD (P = 0,199, Mann – Whitney U test) i HFD-HFD (P = 0,360, Mann – Whitney U test) skupinama potomaka.



Slika 5.14. Koncentracija triglicerida u serumu štakora hranjenih različitom prehranom.

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni
|| Razlike su testirane Mann – Whitney U testom, razina značajnosti je postavljena na α = 0,05

Najviša vrijednost AST-a bila je zabilježena u HFD-CD grupi i izosila je 189,50 [162,75-258,50] U/L, a najniža vrijednosti bila je u HFD-HFD grupi (134,00 [109,50-229,00] U/L) (Tablica 5.3., Slika 5.15.).

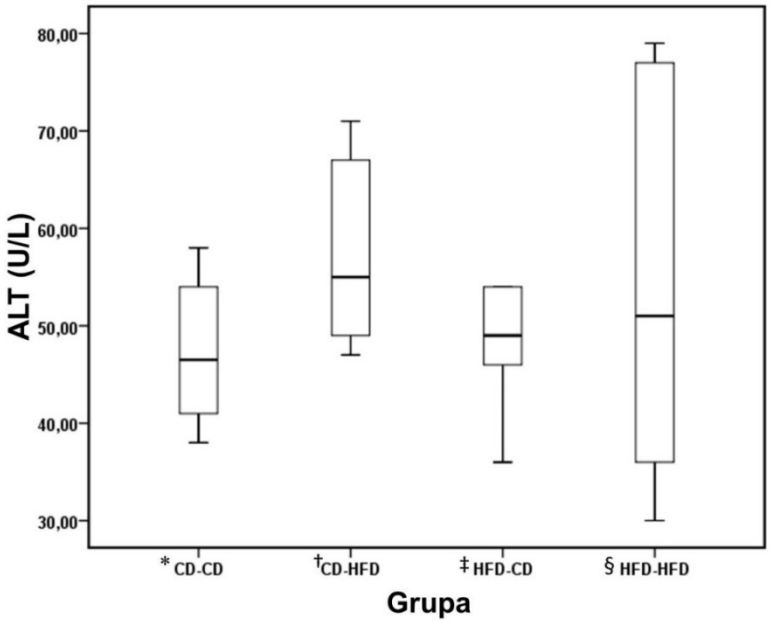


Slika 5.15. Koncentracija AST (aspartat-aminotransferaze) u serumu štakora hranjenih različitom prehranom.

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni

Najniža vrijednost ALT-a bila je u CD-CD skupini (46,50 [40,25-55,00] U/L), a najviša u CD-HFD skupini (55,00 [48,50-68,00] U/L) (Tablica 5.3., Slika 5.16.).

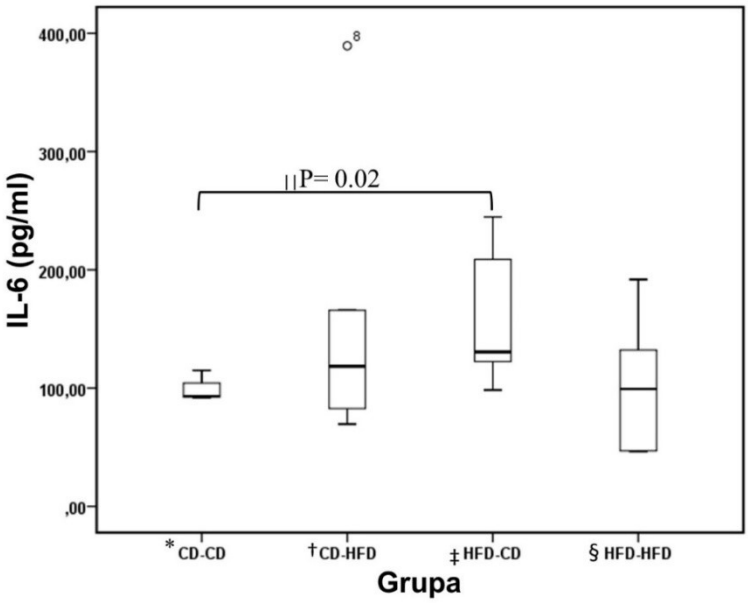
Kod AST-a i ALT-a nije zabilježena značajnost pri uspredbi skupina (AST, P = 0,621; ALT, P = 0,822, Kruskal – Wallis test).



Slika 5.16. Koncentracija AST-a (alanin-aminotransferaze) u serumu štakora hranjenih različitom prehranom.

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni

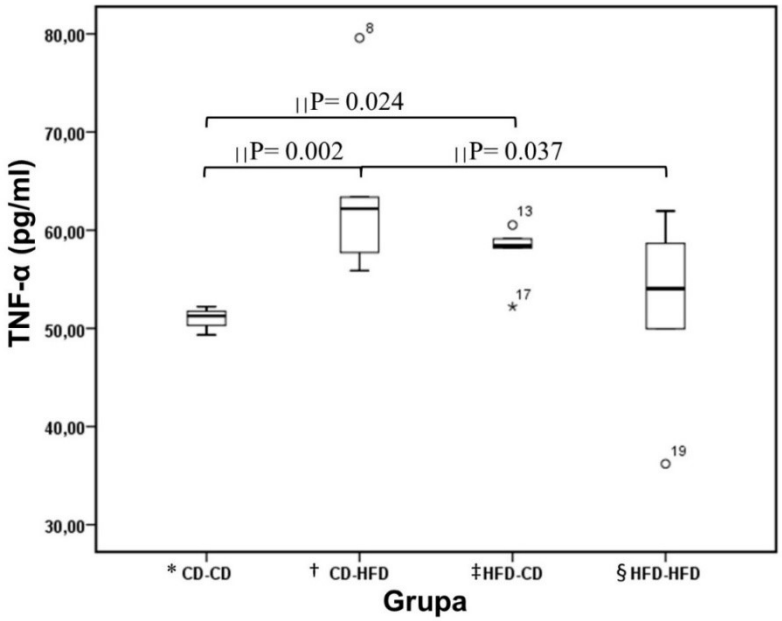
Koncentracija IL-6 u serumu bila je najmanja u CD-CD skupini potomaka (92,67 [91,90-93,67] pg/ml) koja pokazuje značajnu razliku u usporedbi s HFD-CD skupinom (130,53 [116,42-217,78] pg/ml) (Tablica 5.3., Slika 5.17.). Skupina masno hranjenih potomaka od masno hranjenih majki nije imala značajnosti u usporedbi sa svim ostalim skupinama (CD-CD; P = 0,95; CD-HFD, P = 0,423; HFD-CD, P = 0,109, Mann – Whitney U test). Značajnost nije nađena uspoređujući CD-HFD skupinu s CD-CD (P = 0,439, Mann – Whitney U test) i HFD-CD (P = 0,337, Mann – Whitney U test) skupinama.



Slika 5.17. Koncentracija interleukina-6 (IL-6) u serumu štakora hranjenih različitom prehranom.

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni
|| Razlike su testirane Mann – Whitney U testom, razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$

Koncentracija TNF-alfe u serumu bila je značajno viša u CD-HFD (62,19 [57,26-67,42] pg/ml) nego u HFD-HFD skupini (54,05 [46.52-59.48] pg/ml). Najniža zabilježena vrijednost TNF-alfe bila je u CD-CD grupi (51,27 [49,33-52,22] pg/ml) što je značajno niže u usporedbi s grupama CD-HFD i HFD-CD (58,43 [56,70-59,47] pg/ml) (P = 0,041, Kruskal – Wallis test) (Tablica 5.3., Slika 5.18.).



Slika 5.18. Koncentracija TNF-alfe (čimbenik nekroze tumora alfa) u serumu štakora hranjenih različitom prehranom.

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni
|| Razlike su testirane Mann – Whitney U testom, razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$

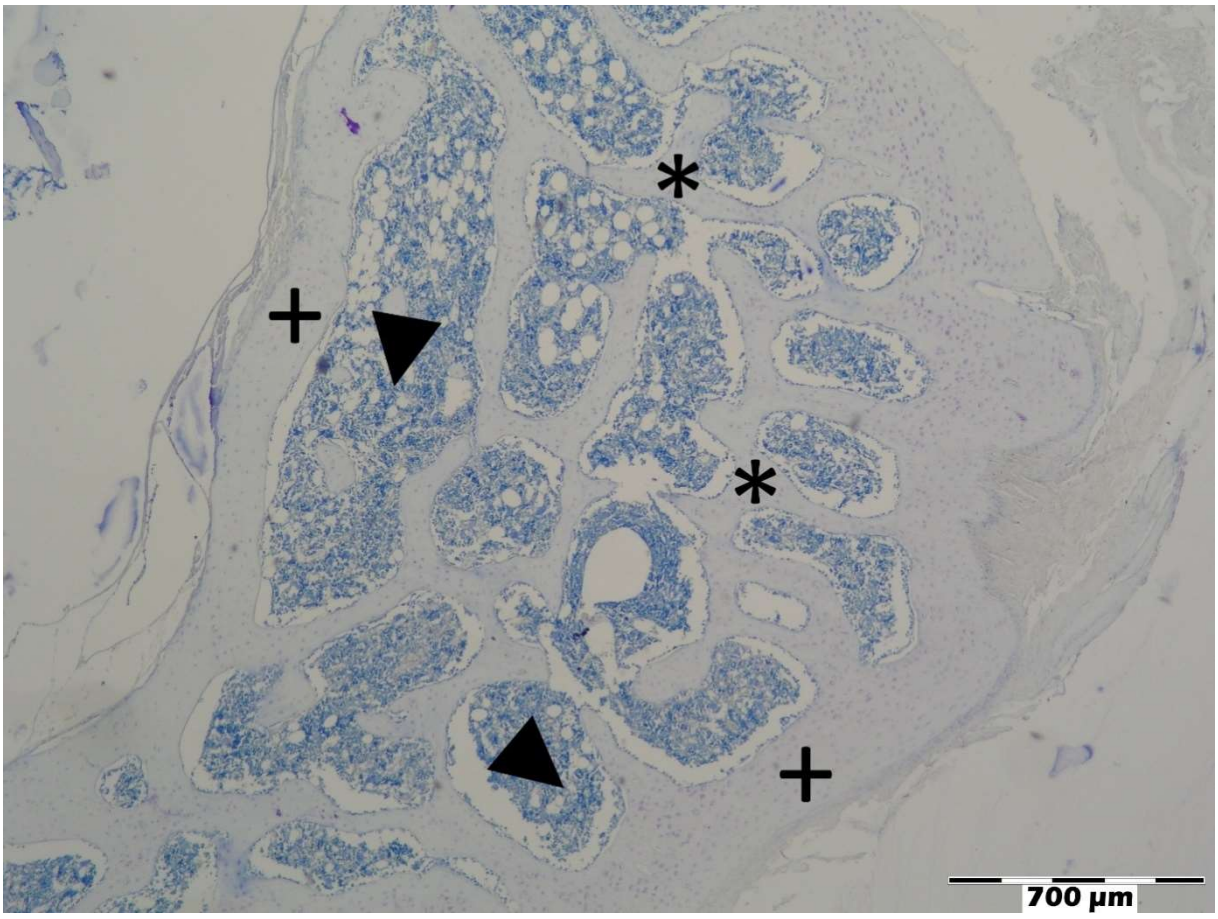
Tablica 5.3. Biokemijska analiza seruma kod različito hranjenih muških potomaka štakora

Biokemijska analiza seruma izraženo u medijanu i granicama interkvartilnog raspona					
Biokemijski parametri	*CD-CD	†CD-HFD	‡HFD-CD	§HFD-HFD	‖P
Kolesterol (mmol/L)	1,85 [1,63-2,01]	2,31 [2,08-2,56]	1,76 [1,60-2,00]	2,45 [2,32-2,90]	< 0,001
Trigliceridi (mmol/L)	0,83 [0,76-0,90]	0,78 [0,71-1,05]	1,03 [0,88-1,24]	1,12 [1.02- 1,39]	0,080
¶AST (U/L)	159,5 [112,75-177,25]	181,50 [140,75-188,00]	189,50 [162,75-258,50]	134,00 [109,50-229,00]	0,621
**ALT (U/L)	46,50 [40,25-55,00]	55,00 [48,50-68,00]	49,00 [43,50-54,00]	51,00 [33,00-78,00]	0,822
††IL-6 (pg/ml)	92,67 [91,90-93,67]	118,39 [79,41-221,78]	130,53 [116,42-217,78]	99,24 [46,78-147,08]	0,438
‡‡TNF-alfa (pg/ml)	51,27 [49,33-52,22]	62,19 [57,26-67,42]	58,43 [56,70-59,47]	54,05 [46.52-59.48]	0,041

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni
‖ Razlike su testirane Kruskal - Wallisovim testom, razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$
¶ AST aspartata-aminotransferaza
**ALT alalnin-aminotransferaza
†† IL-6 interleukin 6
‡‡ TNF-alfa čimbenik nekroze tumora alfa

5. 3. Analiza petog slabinskog kralješka

Načinjeni su histološki rezovi koštanog tkiva petog slabinskog kralješka i obojeni su Toluidine *blue* metodom. Obojani histološki rezovi kvalitativno su pregledani pod svjetlosnim sitnozorom. Promatrani su izgled i debljina kortikalne i spužvaste kosti (Slika 5.19.). Prije histomorfometrijskih mjerenja uočeno je da se u CD-HFD skupini građa koštanog tkiva znatno razlikuje od ostalih skupina. Kortikalna kost bila je tanja nego kod ostalih skupina, a koštane gredice također su bile tanke sa širokim prostorima koštane srži među njima.



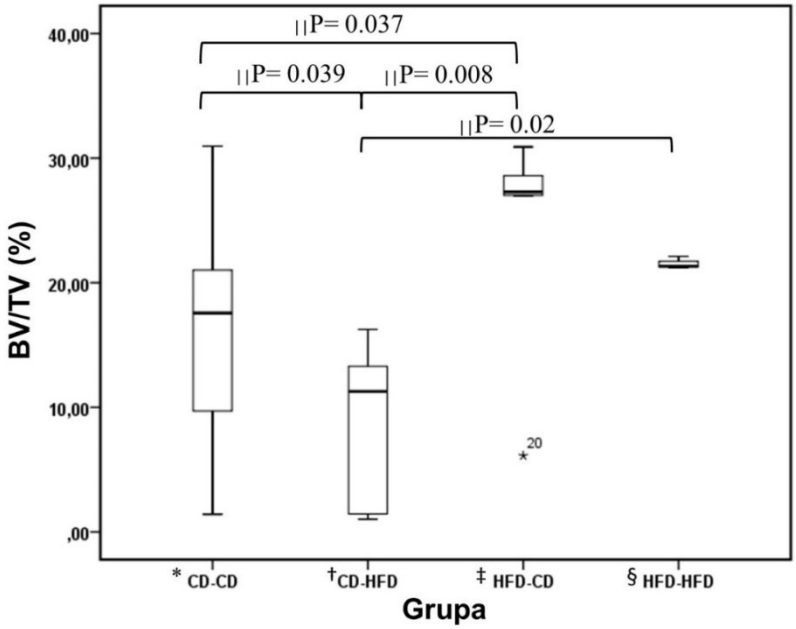
Slika 5.19. Prikaz jednog reprezentativnog prereza petog slabinskog kralješka. Zvjezdica: gredice spužvaste kosti; križić: kortikalna kost; strelica: koštana srž. Bojenje: toluidine blue. Mjerilo: 700 µm.

5. 3. 1. Histomorfometrijska analiza koštanog tkiva

Nakon bojanja rezovi koštanog tkiva debljine 5 µm pripremljeni su za histomorfometrijsku analizu na sitnozoru (Olympus BHA mikroskop, Olympus, Tokyo, Japan) i uz pomoć programa (VAMS, Zagreb, Hrvatska) (Slika 5.19. i 5.20).

Obujam i površina spužvaste kosti

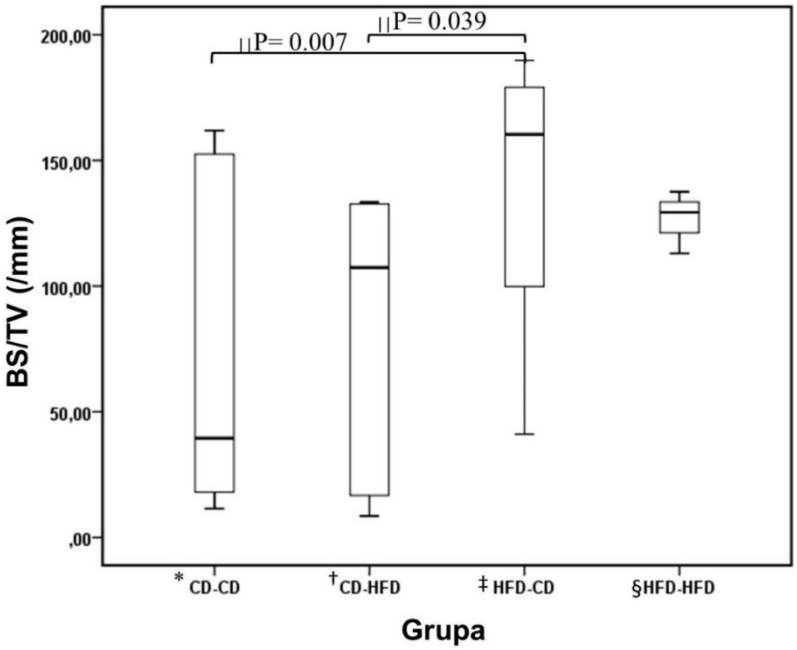
Najveće vrijednosti obujma spužvaste kosti nađene su u HFD-CD skupini potomaka (27.29 [27,00-28,90] %), a najmanje vrijednosti u CD-HFD skupini (11.28 [1,34 do 14,04] %). Značajne razlike među skupinama zabilježene su i prikazane (P = 0,008, Kruskal – Wallis test) (Tablica 5.4., Slika 5.21.). Uspoređujući HFD-HFD skupinu s CD-CD (P = 0,083, Mann – Whitney u test) i HFD-CD (P = 0,066, Mann – Whitney U test) skupinama nije bilo značajnih razlika.



Slika 5.20. Obujam spužvaste kosti (BV/TV) štakora hranjenih različitom prehranom.

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni
|| Razlike su testirane Mann – Whitney U testom, razina značajnosti je postavljena na α = 0,05

Najveća vrijednost površine koštanih gredica spužvaste kosti zabilježena je u HFD-CD skupini potomaka (160,33 [72,98-181,81] /mm) što se značajno razlikovalo od CD-CD skupine (39,5 [17,53-155,94] /mm) i CD-HFD skupine (107,39 [14,66- 132,72] /mm) (Tablica 5.4., Slika 5.22.). U skupini HFD-HFD nije bilo značajnih razlika uspoređujući sa svim ostalim skupinama (CD-CD, P = 0,386; CD-HFD, P = 0,197; HFD-CD, P = 0,221, Mann – Whitney U test). Nije bilo značajne razlike uspoređujući kontrolnu skupinu s CD-HFD skupinom (P = 0,851, Mann – Whitney U test).

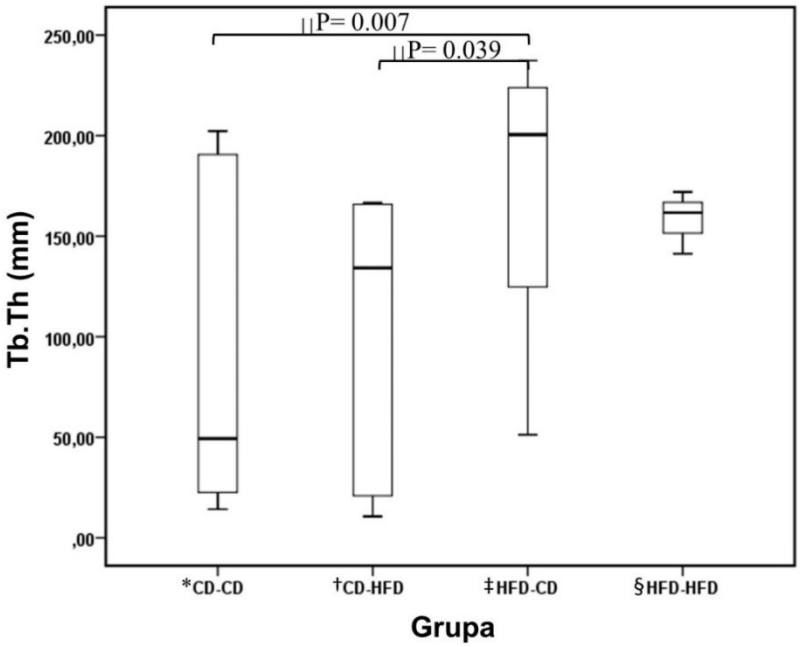


Slika 5.21. Površina koštanih gredica spužvaste kosti (BS/TV) štakora hranjenih različitom prehranom.

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni
|| Razlike su testirane Mann – Whitney U testom, razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$

Analiza mikrostrukutre spužvaste kosti

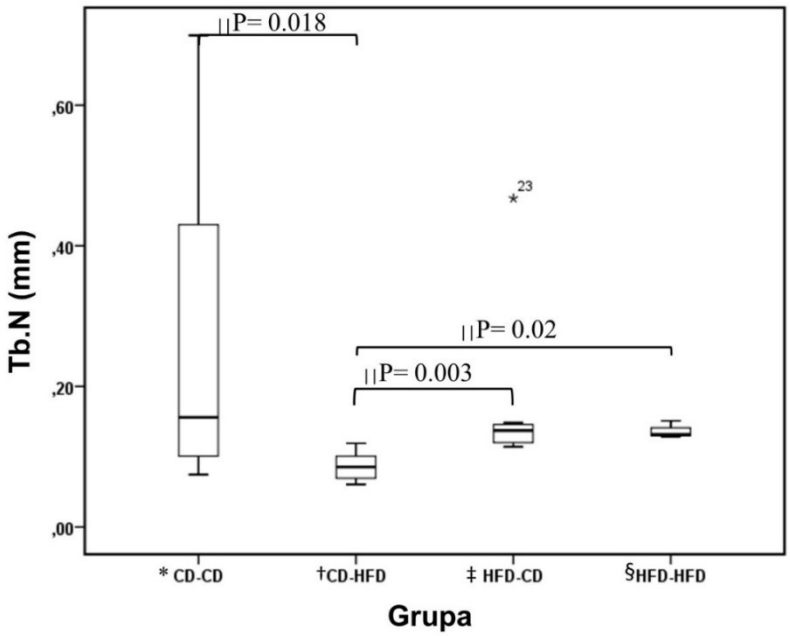
Histomorfometrijskom analizom debljine koštanih gredica nađene su značajne razlike između CD-CD skupine (49,40 [21,91-194,94] mm) i HFD-CD skupine potomaka (200.48 [91.22-227.28] mm) te između CD-HFD skupine (134,18 [18,33-166,04] mm) i HFD-CD skupine potomaka s time da su najveće vrijednosti debljine koštanih gredica zabilježene u HFD-CD skupini. Vrijednosti debljine koštanih gredica u HFD-HFD skupini iznosile su 161,68 [141,26-171,96] mm (Tablica 5.4., Slika 5.23.). Skupina masno hranjenih potomaka od masno hranjenih majki (HFD-HFD) nije imala značajno različitu debljinu koštanih gredica pri usporedbi s CD-CD skupinom (P = 0,386, Mann – Whitney U test), CD-HFD skupinom (P = 0,197, Mann – Whitney U test) i HFD-CD skupinom potomaka (P = 0,221, Mann – Whitney U test). Nije zabilježena značajna razlika uspoređujući kontrolnu skupinu s CD-HFD skupinom (P = 0,851, Mann – Whitney U test).



Slika 5.22. Debljina koštanih gredica (Tb.Th) spužvaste kosti štakora hranjenih različitom prehranom.

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni
|| Razlike su testirane Mann – Whitney U testom, razina značajnosti je postavljena na α = 0,05

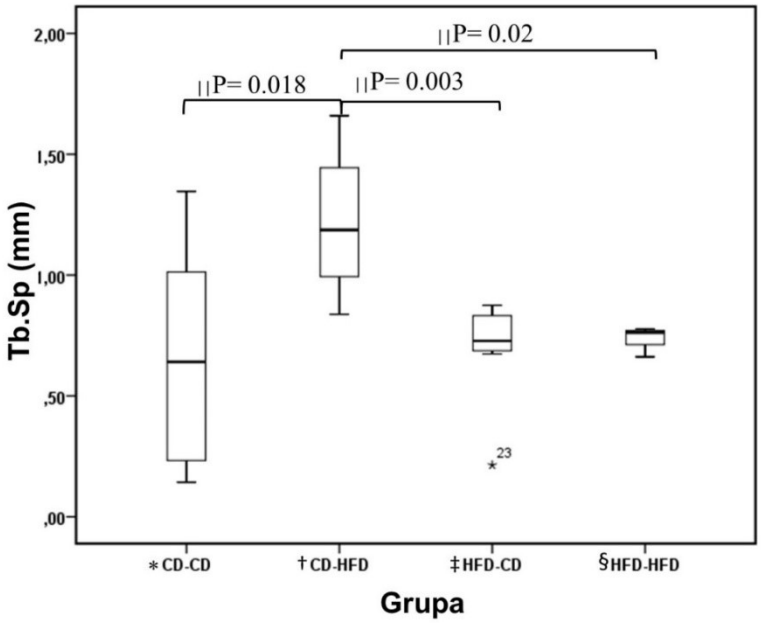
Skupina potomaka CD-HFD značajno se razlikovala u broju koštanih gredica i u razdvojenosti među njima u odnosu na sve druge skupine (P = 0,018, Kruskal – Wallis test). Najmanji broj koštanih gredica zabilježen je upravo u CD-HFD skupini i iznosio je 0,09 [0,0675-0,011] mm (Tablica 5.4., Slika 5.24.).



Slika 5.23. Broj koštanih gredica (Tb.N) spužvaste kosti štakora hranjenih različitom prehranom.

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni
|| Razlike su testirane Mann – Whitney U testom, razina značajnosti je postavljena na α = 0,05

Sukladno tome CD-HFD skupina potomaka imala je i značajno najveću razdvojenost među njima čija je vrijednost iznosila 1,19 [0,95-1,5] mm (Tablica 5.4., Slika 5.25.). U HFD-HFD skupini potomaka nije bilo značajne razlike u broju koštanih gredica i njihovoj razdvojenosti u usporedbi s kontrolnom skupinom (P = 0,665, Mann – Whitney U test) i HFD-CD skupinom potomaka (P = 0,838, Mann – Whitney U test).

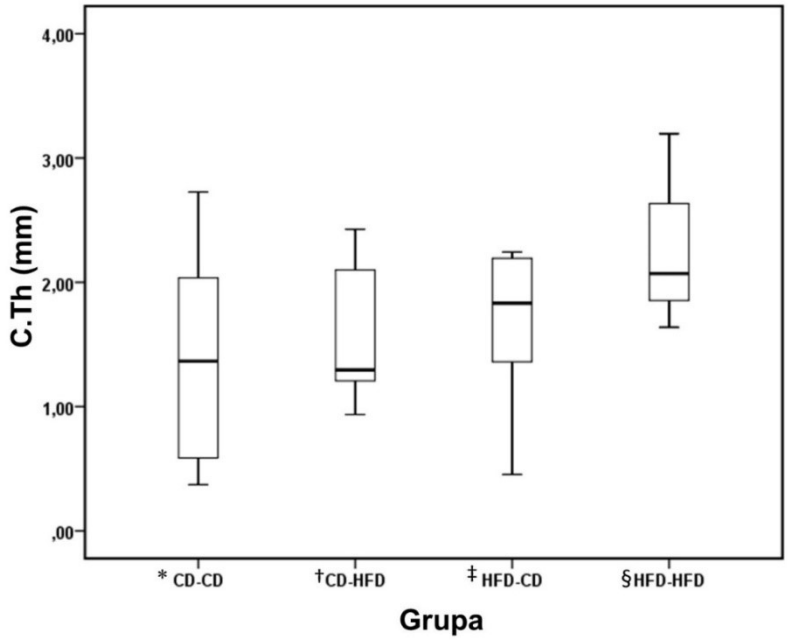


Slika 5.24. Razdvojenost koštanih gredica (Tb.Sp) spužvaste kosti štakora hranjenih različitom prehranom.

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni
|| Razlike su testirane Mann – Whitney U testom, razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$

Obujam i debljina kortikalne kosti

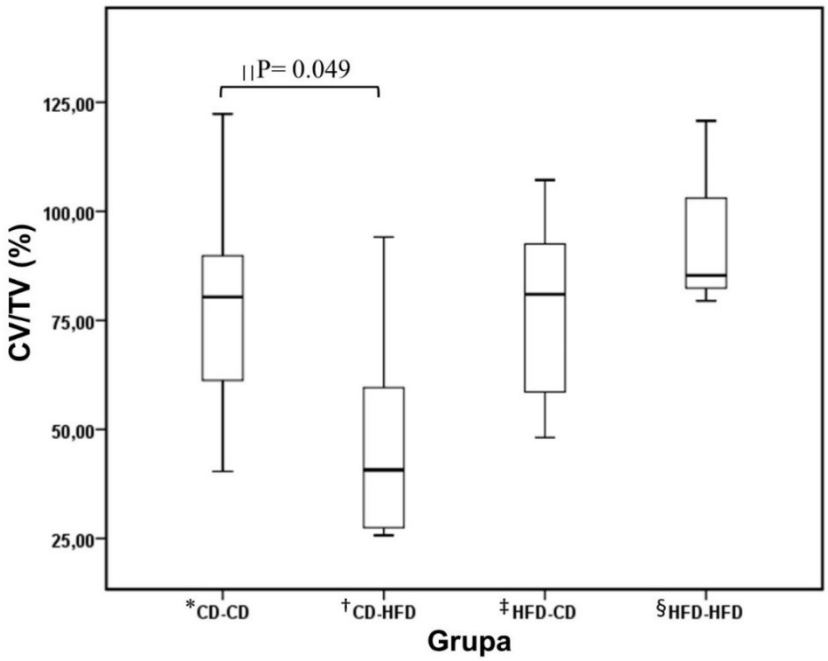
Iako nije nađena značajna razlika u debljini kortikalne kosti među pojedinim skupinama potomaka (P = 0,290, Kruskal – Wallis test) (Slika 5.26.), najviša vrijednost zabilježena je u HFD-HFD skupini (2070,72 [1637,59-3195,48] μm), a najmanja u CD-HFD skupini potomaka (1294,56 [1139,21-2180,91] μm) skupini (Tablica 5.4.).



Slika 5.25. Debljina kortikalne kosti (C.Th) štakora hranjenih različitom prehranom.

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni

Obujam kortikalne kosti bio je značajno veći u CD-CD skupini (80,36 [57,12-90,59] %) u usporedbi s CD-HFD skupinom (40.71 [27,04-68,22] %) (Tablica 5.4., Slika 5.27.). U HFD-HFD skupini potomaka nije bilo značajnih razlika u obujmu kortikalne kosti usporedbom s kontrolnom skupinom (P = 0,386, Mann – Whitney U test), CD-HFD skupinom (P = 0,071, Mann – Whitney U test) i HFD-CD skupinom potomaka (P = 0,414, Mann – Whitney U test).



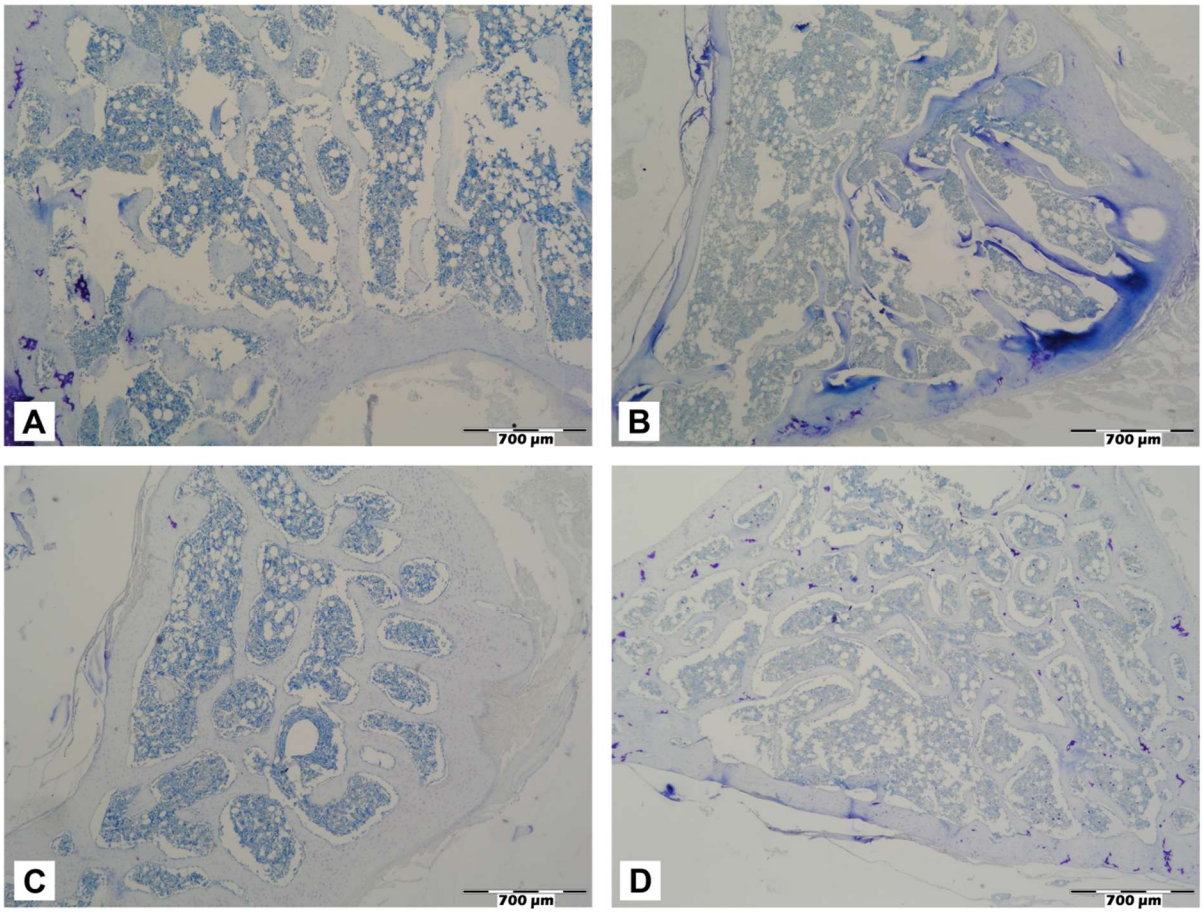
Slika 5.26. Obujam kortikalne kosti (CV/TV) štakora hranjenih različitom prehranom.

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni
|| Razlike su testirane Mann – Whitney U testom, razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$

Tablica 5.4. Histomorfometriska analiza petog slabinskog kralješka kod promatranih skupina različito hranjenih muških potomaka štakora

Histomorfometriska analiza petog slabinskog kralješka izraženo u medijanu i granicama interkvartilnog raspona					
Histomorfometriski parametri	*CD-CD	†CD-HFD	‡HFD-CD	§HFD-HFD	‖P
¶BV / TV (%)	17,56 [6,52-21,04]	11.28 [1,34-14,04]	27.29 [27,00-28,90]	21,34 [21,2-22,12]	0,008
**BS / TV (/mm)	39,5 [17,53-155,94]	107,39 [14,66- 132,72]	160,33 [72,98-181,81]	129,37 [113,04-137,53]	0,085
††Tb.Th (mm)	49,40 [21,91-194,94]	134,18 [18,33-166,04]	200.48 [91.22-227.28]	161,68 [141,26-171,96]	0,085
‡‡Tb.N (mm)	0,155 [0,0975-0,44]	0,09 [0,0675-0,011]	0,135 [0,12-0,148]	0,13 [0,13-0,15]	0,120
***Tb.Sp (mm)	0,64 [0,23-1,09]	1,19 [0,95-1,5]	0,73 [0,68-0,84]	0,76 [0,66-0,78]	0,018
†††C.Th (μm)	1,36 [5,68-2,06]	1,29 [1,13-2,18]	1,83 [1,31-2,20]	2,07 [1,63-3,19]	0,290
‡‡‡CV / TV (%)	80,36 [57,12-90,59]	40.71 [27,04-68,22]	80,99 [54,98-92,75]	85,32 [79,49-120,73]	0,031

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni
‖ Razlike su testirane Kruskal - Wallisovim testom, razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$
¶BV / TV obujam spužvaste kosti
**BS / TV površina spužvaste kosti
††Tb.Th debljina koštanih gredica
‡‡Tb.N broj koštanih gredica
***Tb.Sp razdvojenost koštanih gredica
†††C.Th debljina kortikalne kosti
‡‡‡CV / TV obujam kortikalne kosti



Slika 5.27. Histološki prikaz petog slabinskog kralješka u četiri skupine muških štakora.

(A) CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom; (B) CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće; (C) HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom; (D) HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni. U CD-HFD skupine koštane gredice su tanke, a njihova razdvojenost je najizraženija u usporedbi s ostalim skupinama. Bojanje: toluidin blue. Mjerilo: 700 µm.

5. 3. 2. Imunohistokemija analiza koštanog tkiva

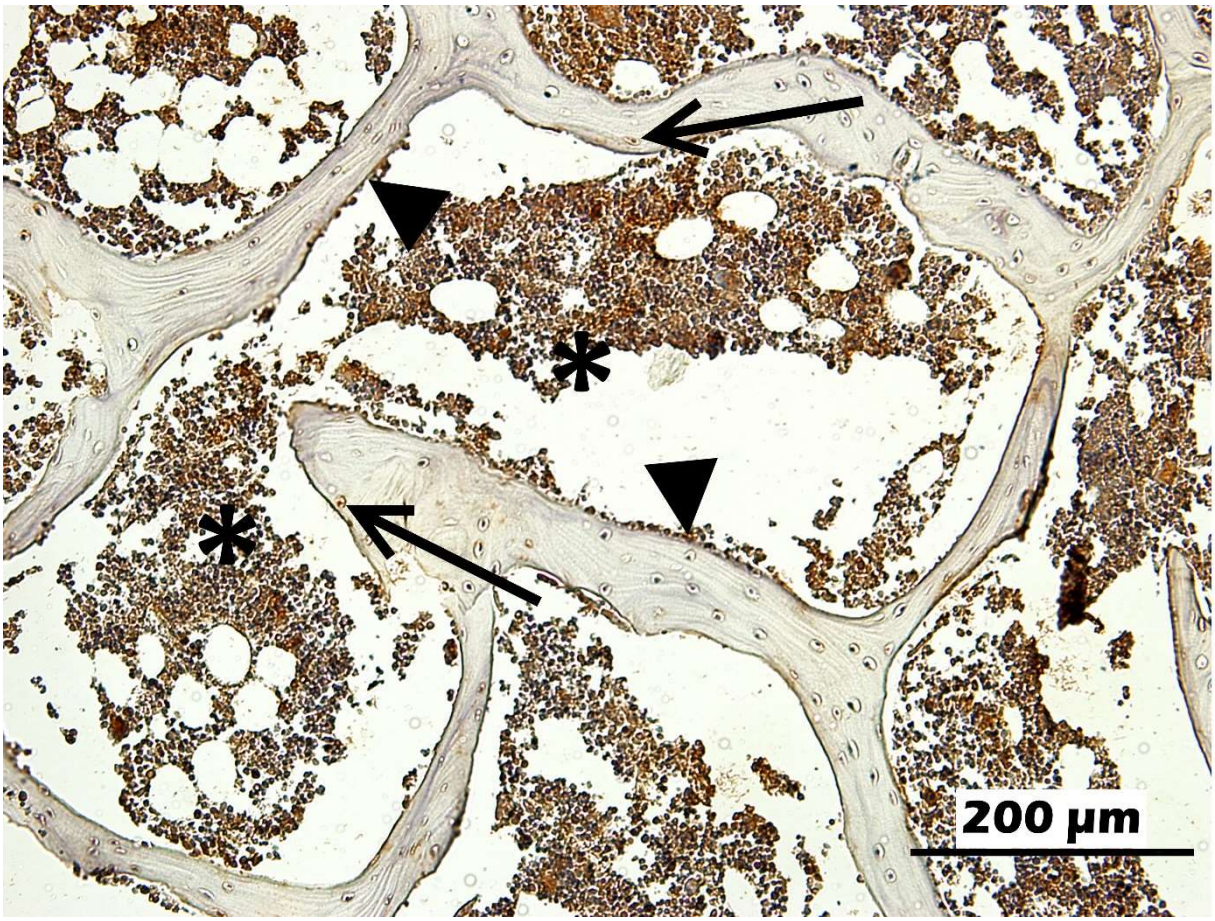
Imunokemijska reakcija s anti-TNF-alfa protutijelom pokazala je imunopozitivnu reakciju različitih stanica u koštanoj srži, uključujući adipocite i stanice krvotvorne loze. U CD-HFD, HFD-CD i HFD-HFD skupini potomaka stanice endosta također su imunopozitivne za razliku od CD-CD skupine potomaka. Mjestimično se uočava signal u citoplazmi osteocita i osteoblasta u koštanim gredicama spužvaste kosti (Slika 5.28., Slika 5.29.)

Rezultatima ImageJ analize utvrđen je najjači intenzitet imunohistokemijskog obojenja u CD-HFD skupini nakon koje slijedi HFD-CD skupina (Slika 5.30., Slika 5.31.). Najslabiji intenzitet zabilježen je u CD-CD skupini potomaka.



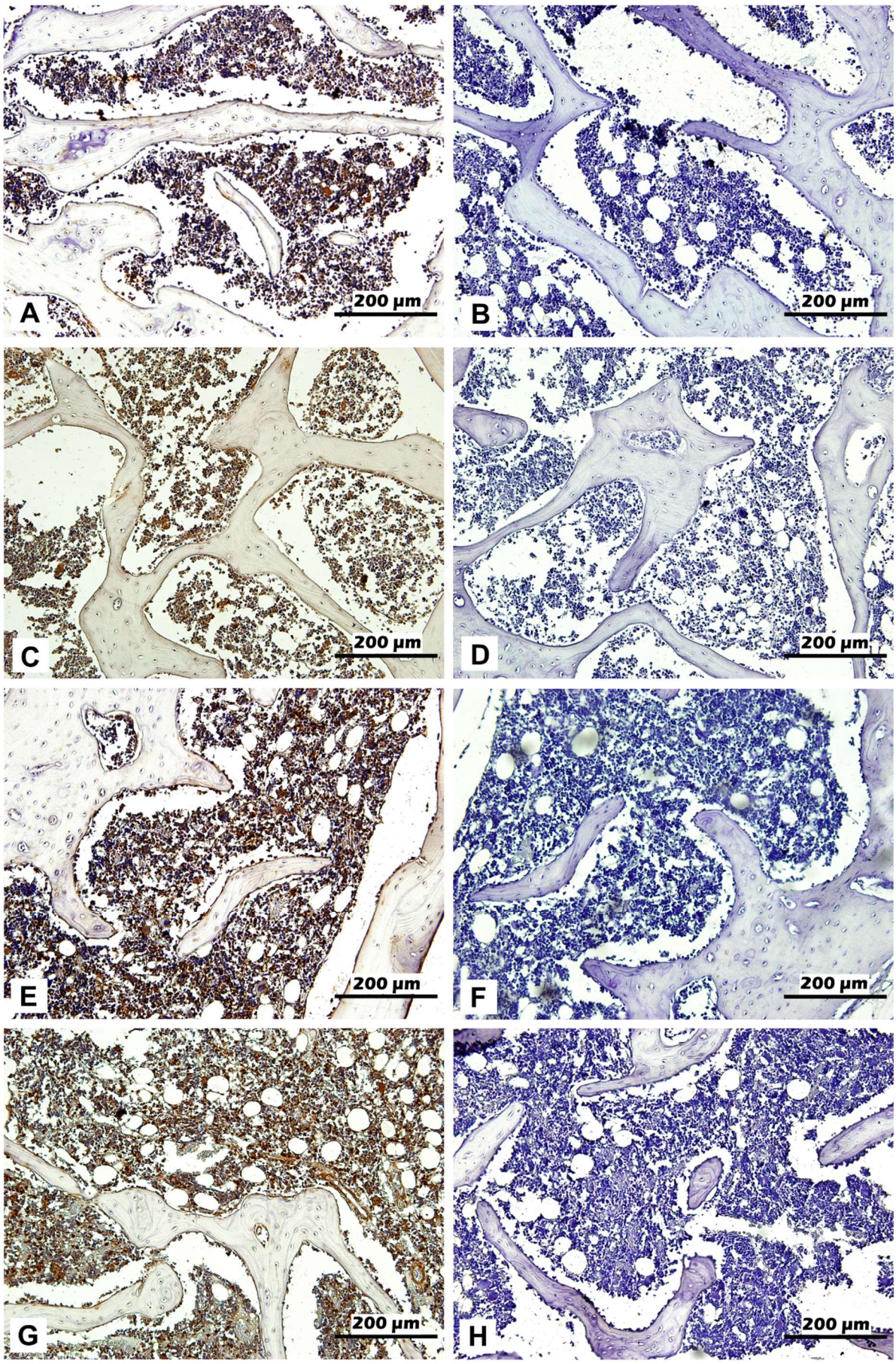
Slika 5.28. Negativna kontrola imunohistokemijskog bojenja petog slabinskog kralješka CD-HFD skupine.

CD-HFD - majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće (umjesto primarnog protutijela za TNF-alfa primijenjen je 1 x PBS). Nema imunohistokemijskog bojenja, dominira hemalaun (pozadinsko bojenje). Mjerilo: 200µm.



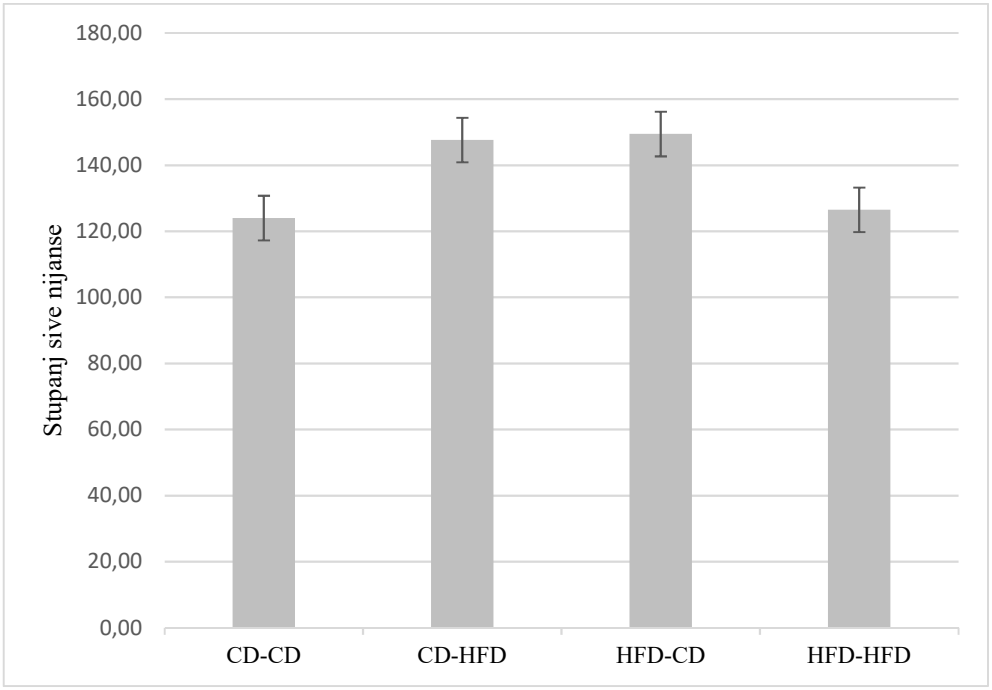
Slika 5.29. Histološka slika petog slabinskog kralješka CD-HFD skupine.

CD-HFD - majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće. Vidljiv je snažan imunohistokemijski signal u koštanoj srži (zvjezdica), a pozitivan je i endost sa stanicama koje morfološki odgovaraju osteoblastima (trokut) te osteociti (strelica). Pozadinsko bojenje: hemalaun. Mjerilo: 200µm.


A
200 µm
B
200 µm
C
200 µm
D
200 µm
E
200 µm
F
200 µm
G
200 µm
H
200 µm

Slika 5.30. Imunohistokemijska analiza TNF-alfa u petom slabinskom kralješku.

Prikazane su fotografije četiriju skupina potomaka štakora. (A) CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom, (B) fotografija negativne kontrole CD-CD skupine (C) CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće, (D) fotografija negativne kontrole CD-HFD skupine (E) HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom, (F) fotografija negativne kontrole HFD-CD skupine, (G) HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni, (H) fotografja negativne kontrole HFD-HFD skupine. Reprezentativni prikaz četiriju skupina životinja (jedna po svakoj skupini). Imunohistokemijsko obojenje najintenzivnije je u CD-HFD skupini, a najslabije u CD-CD skupini. Imunohistokemijski signal bio je najjači u koštanoj srži u različitim stanicama krvotvorne loze pozitivnim na TNF-alfu koje nije moguće precizno morfološki diferencirati. Mjerilo: 200µm.



Slika 5.31. Intenzitet imunohistokemijskog obojenja s anti-TNF-alfa protutijelom.

CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom, CD-HFD- majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće, HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom, HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni. Rezultati ImageJ analize pokazale su da je intenzitet imunohistokemijskog obojenja bio najveći u CD-HFD skupini nakon koje slijedi HFD-CD skupina. Signal u kontrolnoj (CD-CD) skupini bio je najslabiji.

5. 3 3. Povezanost između vrijednosti imunohistokemijskog obojenja TNF-alfa u koštanoj srži i histomorfometrijske paramatara petog slabinskog kralješka

Spearmanov koeficijent korelacije korišten je u statističkoj analizi povezanosti histomorfometrijskih parametara koštane stukture i intenziteta IHC obojenja s anti-TNF-alfom. Značajno i obrnuto proporcionalna korelacija nađena je između intenziteta IHC obojenja s anti-TNF-alfom i broja koštanih gredica (Tb.N) u skupini CD-HFD ($\rho = 0{,}839$, $P = 0{,}076$). Obrnuto je proporcionalna korelacija nađena između intenziteta IHC obojenja s anti-TNF-alfom i površine spužvaste kosti (BS/TV) ($\rho = - 0{,}907$, $p= 0{,}033$) te debljine koštanih gredica ($\rho= - 0{,}908$, $p = 0{,}033$) u HFD-CD skupini. U HFD-HFD skupini štakora debljina kortikalne kosti obrnuto je proporcionalao korelirala s intenzitetom IHC obojenja s anti-TNF-alfom što je bilo statistički značajno ($\rho = - 0{,}999$, $p = 0{,}014$) (Tablica 5.5).

Tablica 5.5. Spearmanov koeficijent korelacije Rho (ρ) između histomorfometrijskih parametara koštane stukture i intenziteta TNF - alfa imunohistokemijskog obojenja koštanog tkiva

*CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom

Spearmanov koeficijent korelacije Rho (ρ) (‖P)				
Skupine	*CD-CD	†CD-HFD	‡HFD-CD	§HFD-HFD
¶BV/TV	-0.338 (0.578)	-0.229 (0.711)	-0.572 (0.314)	0.819 (0.389)
**BS/TV	-0.243 (0.673)	-0.367 (0.543)	**-0.907 (0.033)**	0.104 (0.933)
††Tb.Th	-0.243 (0.693)	-0.367 (0.543)	**-0.908 (0.033)**	0.106 (0.932)
‡‡Tb.N	-0.068 (0.914)	**-0.839 (0.076)**	-0.508 (0.382)	-0.227 (0.854)
***Tb.Sp	0.188 (0.761)	0.779 (0.12)	0.454 (0.432)	0.073 (0.954)
†††C.Th	-0.164 (0.793)	-0.416 (0.476)	-0.299 (0.625)	**-0.999 (0.014)**
‡‡‡CV/TV	0.223 (0.719)	-0.497 (0.394)	-0.397 (0.508)	-0.911 (0.271)

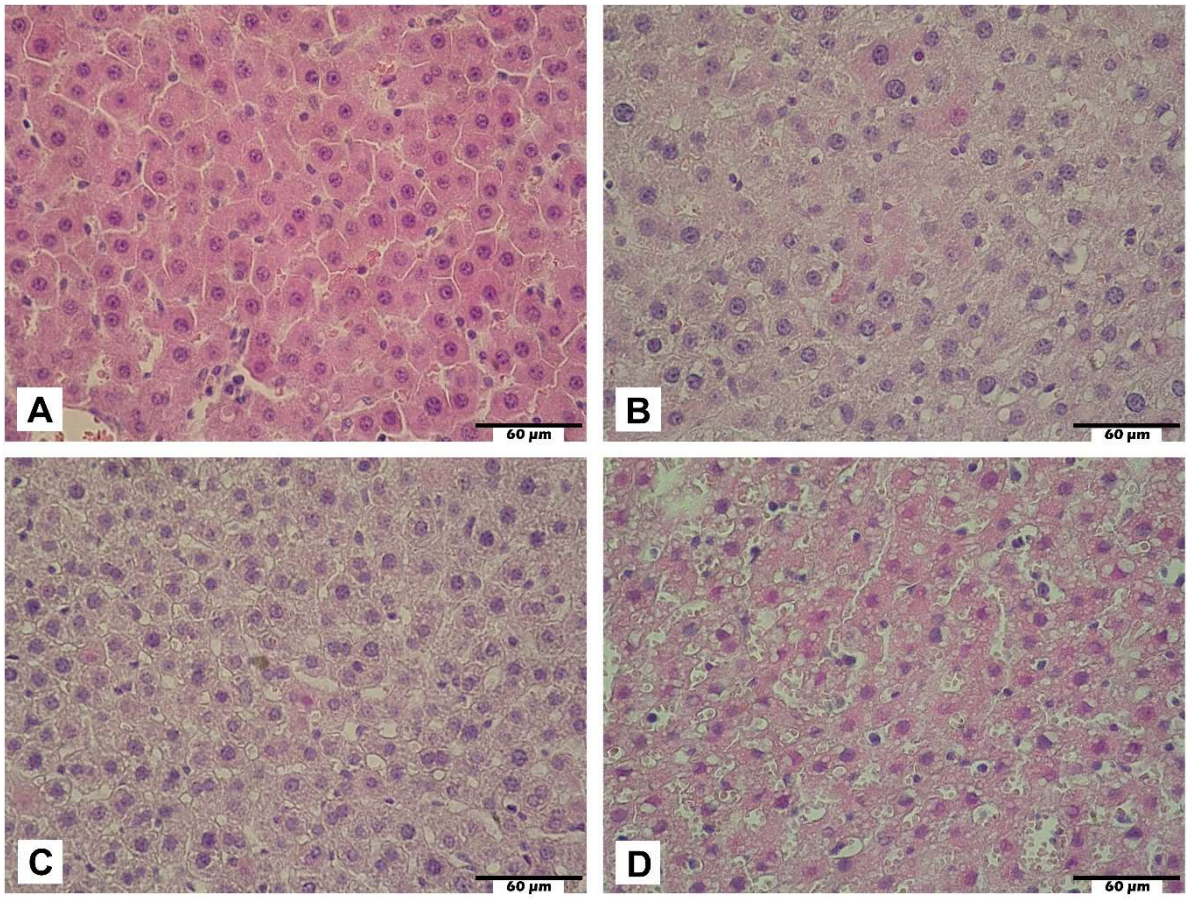
†CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće
‡HFD-CD majka masno hranjena, potomak hranjen standardnom laboratorijskom dijetom
§HFD-HFD majka i potomak masno hranjenu.
‖ razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0{,}05$
¶BV / TV gustoća volumena koštanih gredica spužvaste kosti
**BS / TV gustoća površine spužvaste kosti

††Tb.Th debljina koštanih gredica
‡‡Tb.N broj koštanih gredica
***Tb.Sp razdvojenost koštanih gredica
†††C.Th debljina kortikalne kosti
‡‡‡CV / TV volumen kortikalne kosti

5. 4. Analiza parenhima jetre

5. 4. 1. Stupanj oštećenja jetrenog parenhima

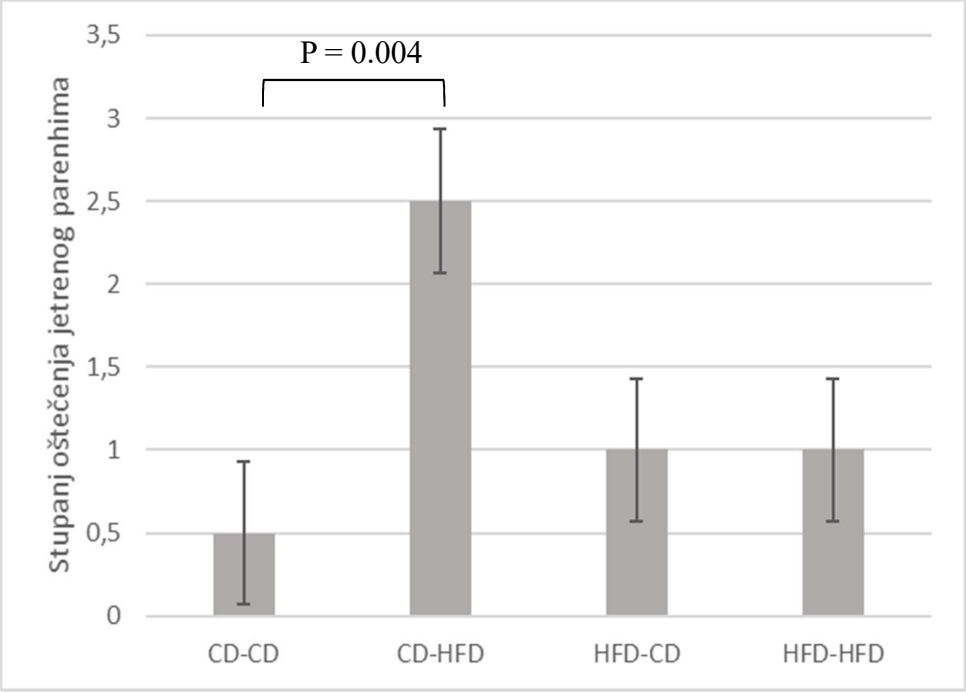
Pripremljeni 5 µm debeli tkivni rezovi jetre bojani su s hemalaun eozinom. Oštećenje jetrenog parenhima semikvantificiralo se na razini od O – nema oštećenja , 1 – malo područje masnih kapljica, 2 – veće područje ispunjeno masnim kapljicama, 3 – veliko područje (Slika 5.32.).



Slika 5.32. Reprezentativni prikazi kvatifikacije stupnja oštećenja parenhima jetre

(A) slika prikazuje zdravu jetru bez oštećenja koju smo obilježavali s 0, (B) prikaz jetre obilježavan s 1, (C) prikaz jetre obilježavan s 2 i (D) prikaz jetre obilježavan s 3. Bojenje: hemalaun-eozin, mjerilo: 60 μm.

Analiza stupnja oštećenja parenhima jetre pokazala je da skupina potomaka CD-HFD (2,5 [1,75-3]) ima značajno viši stupanj oštećenja. Sukladno tome, u spomenutoj skupini zamijećen je veći broj oštećenih uzoraka, a veća površina jetrenog režnjića bila je ispunjena nelobularnim masnim kapljicama u odnosu na kontolnu skupinu CD-CD (0,5 [0-1]), (P = 0,004, Mann Whitney - U test,). Nije zabilježena značajnost u stupnju oštećenja kod skupine HFD-CD (1 [1-2]) i HFD-HFD (1 [1-2,25]) skupine potomaka (Slika 5.33.).

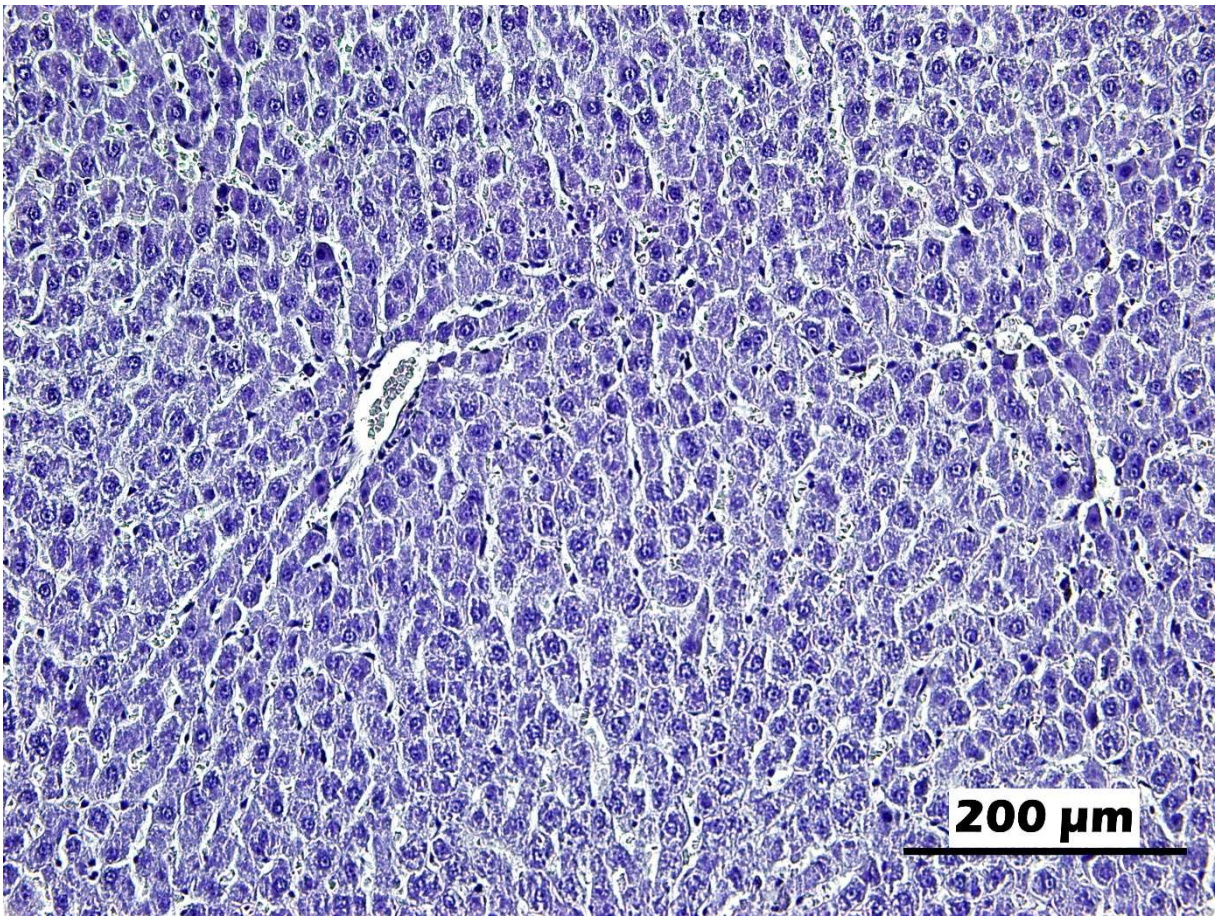


Slika 5.33. Prikaz rezultata patohistološkog nalaza po skupinama štakora.

Skupina CD-CD (majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom) imala je normalnu jetru uz neznatna mjestimična oštećenja. Skupina CD-HFD (majka standarno hranjena, a potomak masno hranjen) imala je najizraženije patološke promjene parenhima jetre u vidu masne degeneracije koja je mjestimično zahvaćala veći dio vidnog polja. U skupinama HFD-CD (majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom) i HFD-HFD (majka i potomak masno hranjeni) patološke promjene bile su nešto manje izražene nego u CD-HFD skupini, no još uvijek znatno izraženije nego u kontrolnoj skupini.

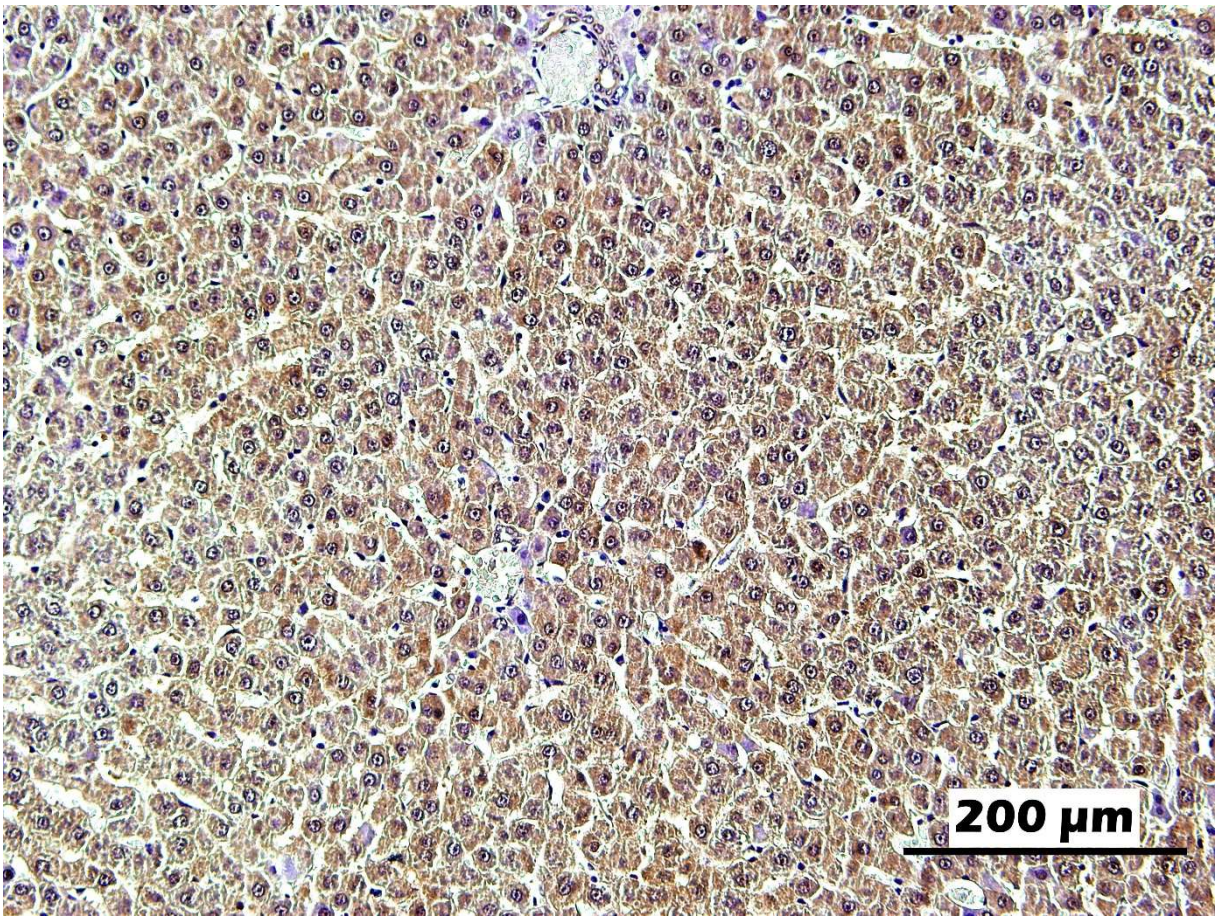
5. 4. 2. Imunohistokemijska analiza na TNF-alfa

Imunohistokemijska analiza pokazala je signal prisutan u citoplazmi dok se jezgre u pravilu nisu bojile. U CD-CD skupini signal je bio vidno najslabiji, najbolje vidljiv u području oko centralne vene dok je prema rubovima jetrenog režnjića gubio na intenzitetu. U ostalim skupinama signal je bio znatno jači, osobito u skupini CD-HFD. U tim skupinama imunohistokemijsko bojenje jetrenog parenhima bilo je ravnomjerno raspoređeno po cijelom jetrenom režnjiću. Ostale stanice koje su vidljive na preparatu (koje bi morfološki mogle odgovarati endotelu kapilara i mjestimično Itovim stanicama) nisu se bojile na anti - TNF-alfi. Na negativnim kontrolama signal nije bio vidljiv.



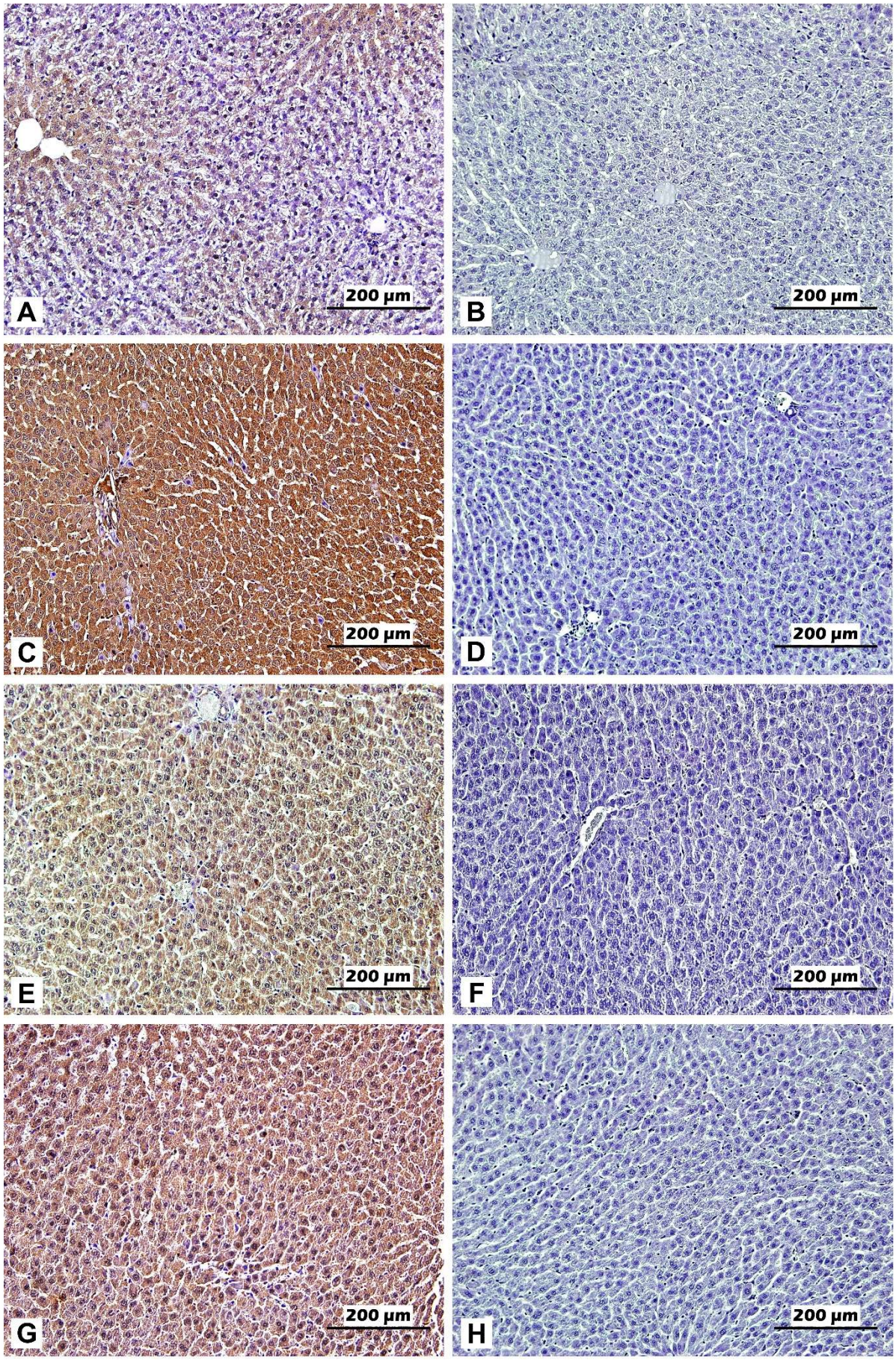
Slika 5.34. Negativna kontrola jetrenog parenhima

(umjesto primarnog protutijela za TNF-alfu primijenjen je 1xPBS) ne pokazuje imunohistokemijsko bojanje, samo plave nijanse hemalauna (pozadinsko bojanje). Mjerilo: 200µm.



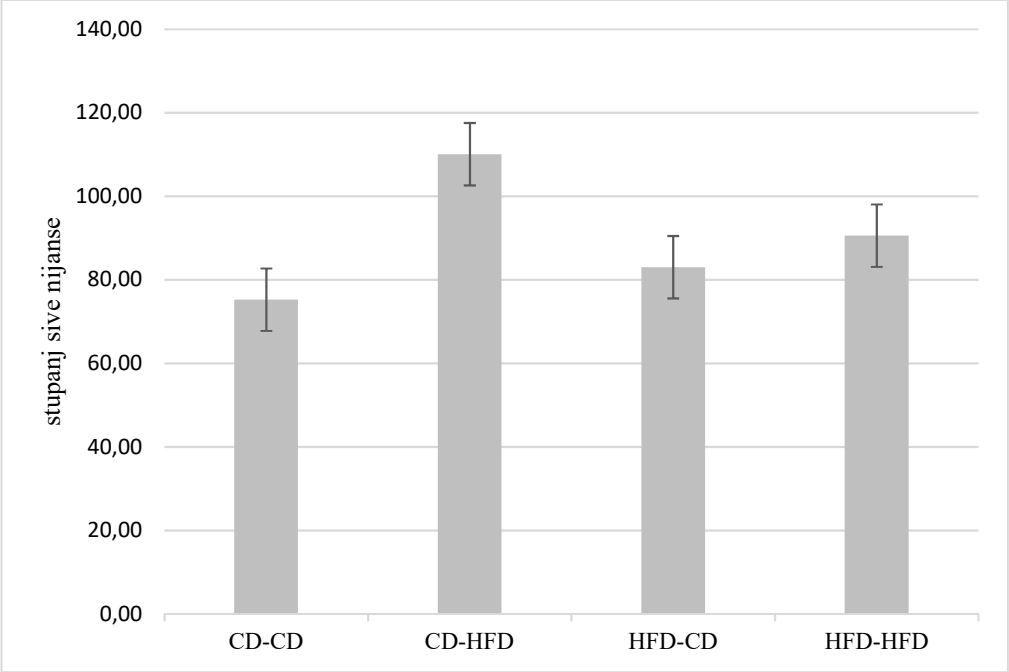
Slika 5.35. Pozitivan signal u jetri HFD-CD štakora.

Jasno se vidi signal imunokompleksa u citoplazmi gotovo svih hepatocita u vidnom polju. Sinusoidne kapilare ne sadrže pozitivne stanice. Pozadinsko bojenje: hemalaun. Mjerilo: 200µm.


A
200 µm
B
200 µm
C
200 µm
D
200 µm
E
200 µm
F
200 µm
G
200 µm
H
200 µm

Slika 5.36. Reprezentativni prikazi imunohistokemijskog bojanja u jetrenom parenhimu četiriju skupina različito hranjenih potomaka štakora (jedna po svakoj skupini).

(A) CD-CD majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom, (B) fotografija negativne kontrole CD-CD skupine, (C) CD-HFD majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće, (D) fotografija negativne kontrole CD-HFD skupine (E) HFD-CD majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom, (F) fotografija negativne kontrole HFD-CD skupine (G) HFD-HFD majka i potomak masno hranjeni, (H) fotografija negativne kontrole HFD-HFD skupine. Na preparatu jetre CD-CD skupine signal se nalazi u središtu režnjića (oko središnje vene) dok je na rubovima režnjića uglavnom slab ili ga nema. Jetra CD-HFD skupine najsnažnije se boja na TNF-alfi, a po intenzitetu ju slijede skupina HFD-HFD, a potom HFD-CD. U svim trima eksperimentalnim skupinama signal je difuzno raspoređen po jetrenim režnjićima. Pozadinsko bojenje: hemalaun. Mjerilo: 200µm.



Slika 5.37. Intenzitet imunohistokemijskog obojenja s anti – TNF – alfa protutijelom u jetrenom parenhimu četiriju skupina različito hranjenih potomaka štakora.

CD-CD (majka i potomak hranjeni standardnom laboratorijskom dijetom), CD-HFD (majka standarno hranjena, a potomak stavljen na dijetu s visokim udjelom masnoće), HFD-CD (majka masno hranjena, a potomak zatim hranjen standardnom laboratorijskom dijetom), HFD-HFD (majka i potomak masno hranjeni). Intenzitet TNF – alfa imunohistokemijskog obojenja TNF-alfe izračunat je uz pomoć programa ImageJ. Bojenje je najintenzivnije u CD-HFD skupini, a najmanje intenziteta zabilježeno je u CD-CD skupini.

6. RASPRAVA

Koncept programiranja i epigenetskog utjecaja majke za vrijeme trudnoće i laktacije, prvo je predložio Barker (221, 222) hipotezom da promjene tijekom intrauterinog života utječu na razvoj bolesti kasnije u životu. Šireći tu hipotezu, brojna ranija istraživanja pokazala su da ograničenje majčine prehrane u intrauterinom periodu uvjetuje niski rast i usporeni razvoj potomka (223-228). Ograničenje prehrane kasnije u trudnoći i/ili postnatalna pretjerana prehrana (229) povezane su s metaboličkom disfunkcijom kasnije u životu (230, 231).

Tako osmišljeno istraživanje u kojem je analiza provedana na četirima različito hranjenim skupinama potomaka i njihovih majki nudi priliku kontroliranog praćenja promjena uzrokovanih izmjenom intrauterine / postnatalne prehrane.

6.1. Tjelesna težina i indeks tjelesne mase u muških potomaka štakora

Ovim je istraživanjem utvrđeno da se tjelesne težine različito hranjenih potomaka štakora razlikuju promatrajući četvrti tjedan starosti, nakon perioda laktacije. Naime, potomci HFD majki imaju manju tjelesnu težinu od potomaka majki koje su hranjene standarnom laboratorijskom prehranom (Slika 5.1., Tablica 5.1).

Nedavno provedenim istraživanjem o ružičastim adipocitima, koji nastaju tijekom trudnoće i laktacije, a diferenciraju se iz potkožnog bijelog masnog tkiva, utvrđeno je da uz mlijeko izlučuju i leptin koji ima važnu ulogu u prevenciji pretilosti kod potomaka (23). Iako se ovim istraživanjem nije mjerila koncentracija leptina u serumu mladunčadi, moguće je da se taj adipocitokin izlučio u majčinom mlijeku što bi se moglo povezati s njihovom malom tjelesnom težinom u razdoblju nakon laktacije, i to u HFD-CD i HFD-HFD skupinama

Važno je također imati na umu da su HFD majke imale ograničen dnevni pristup hrani od 30 g po životinji dok su CD majke imale pristup *ad libidum* što je učinjeno da bi se spriječilo povećanje tjelesne mase u HFD skupinama uzrokovano prekomjernom uporabom visokokalorične hrane.

Do sada provedena istraživanja podupiru teoriju da neadekvatna prehrana majke za vrijeme trudnoće dovodi do značajnih promjena u veličini tijela i metabolizmu potomaka kako bi se potomci bolje prilagodili otežanim uvjetima nestašice hrane nakon rođenja (232).

Masno hranjeni potomci (CD-HFD i HFD-HFD skupina), iako hranjeni prehranom bogatom mastima, pokazuju manju tjelesnu težinu kroz cijeli vremenski period trajanja pokusa u odnosu na životinje koje su hranjene standardnom laboratorijskom hranom bez ograničenja. Kako bi se prevenirao nastanak pretilosti zbog prekomjernog unosa hrane, a time i utjecaj takve prehrane na koštano tkivo i jetru, ovako kontrolirana prehrana ipak je omogućavala dovoljan unos hrane kod masno hranjenih štakora te nije bilo restrikcijskog utjecaja izmijene režima hranjenja (233). Upravo tako kontrolirana prehrana najbolje oponaša prehrambene navike zapadnih zemalja gdje je pretilost u alarmantnom porastu (234 - 236).

Drži se da su ograničenja pristupa hrani i smanjeni unos masne prehrane u HFD skupinama potomaka pridonijeli njihovom manjem prirastu tjelesne težine u odnosu na druge skupine potomaka.

Djeca pretilih majki imaju veći rizik od razvoja debljine (237, 238), inzulinske rezistencije (239, 240) i metaboličkog sindroma (241) u odnosu na djecu potomke žena normalne težine.

Važno je naglasiti da se tjelesna težina potomaka mijenjala u razdolju odvajanja od majki kada su nakon laktacije stavljeni na drugi način prehrane. Tako su u skupinama kod kojih je došlo do zamjene intrauterine ili postnatalne prehrane nađene značajne razlike u kilaži, uspoređujući ih s kontrolnom skupinom i s masnom (HFD-HFD) skupinom. Primjerice, životinje iz CD-HFD skupine imale su najvišu zabilježenu tjelesnu težinu u trenutku odvajanja od majki (četvrti tjedan, 78,05 [76,18-85,50] g), da bi u razdoblju od jedanaest tjedana, kada su hranjene masnom prehranom (30 g po životinji), pokazale mali prirast tjelesne težine u usporedbi s ostalim skupinama. Suprotno tomu, kod životinja iz HFD-CD skupine početna mala tjelesna težina nakon razdoblja hranjenja kontrolnom prehranom pokazala je najveći prirast od 125,65 [121,18-132,90] po gramu (slika 5.7., Tablica 5.1).

Utvrdilo se također da se ITM potomaka nije značajno razlikovao (242) što upućuje da pronađene razlike tjelesne težine najvjerojatnije nisu uzrokovane prehrambenim ograničenjima. To je u skladu s ranije objavljenim rezultatima (203) kojima se pokazalo da nema značajne razlike između ITM majki hranjenih standardnom laboratorijskom hranom u odnosu na one hranjene prehranom visokog udjela masnoća i nisu pronađene značajne razlike u usporedbi ITM-a ženskih potomaka.

Pretpostavlja se da je promjena okoliša i prehrane nakon rođenja dovela do opisanih promjena tjelesne težine što je moglo potaknuti *catch-up* fenomen rasta i rezultirati s odgovarajućim vrijednostima ITM-a (243).

Ta su zapažanja u skladu i s hipotezom „štedljivog fenotipa“ jer upućuju na činjenicu da je majka svojom prehranom stvorila „bolju“ prilagodbu jedinke što je pomoglo tim potomcima da se bez većih oscilacija tjelesne težine prilagode, ali samo onda kada su bili hranjeni istom prehranom kao i majke (48) (Tablica 5.1.).

6. 2. Analiza uzorka krvi

Ovim istraživanjem utvrđena je najviša koncentracija triglicerida u serumu potomaka majki hranjene dijetom visokog udijela masnoće (HFD-CD 1,03 [0,88-1,24] mmol/L i HFD-HFD 1,12 [1.02- 1,39] mmol/L).

Taj rezultat u skladu je s istraživanjem Ornellasa i sur. kao jednim od prvih takvih istraživanja koje govori da povišena koncentracija lipida u mlijeku HFD majki može izazvati i visoku koncentraciju lipida u plazmi potomaka u razdoblju laktacije (244). Neka novija istraživanja također su potvrdila rezultate spomenutog istraživanja (245, 246).

Najviše razine kolesterola u serumu pronađene su u HFD-HFD skupini (2,45 [2,32-2,90] mmol/L) nakon koje slijedi CD-HFD skupina (2,31 [2,08-2,56] mmol/L). Obje skupine imale su značajno višu razinu kolesterola u odnosu na potomke hranjene standardnom laboratorijskom prehranom. Takvi rezultati upućuju na to da prehrana majki s visokim udjelom masnoća za vrijeme trudnoće i laktacije dovodi do povišene razine triglicerida i kolesterola u krvi što se kao suvišak energije vjerojatno prenosi na potomstvo kroz dojenje. Knopp i sur. pokazali su da je prva etapa metabolizma masnog tkiva obilježena porastom unosa hrane, povećanim razinama inzulina u plazmi i povećanim izmjenama jetrene glukoze u slobodne masne kiseline (247). Ukupan rezultat te metaboličke promjene primijećen je kod potomaka nakon uzimanja majčinog mlijeka. Franco i sur. upućuju da veća razina masti i proteina u majčinom mlijeku potiče ranu preuhranjenost potomaka i dovodi do dodatnog skladištenja energije u obliku masti pa ti isti potomci imaju veću zalihu glikogena i hiperglikemiju kao rezultat povećane glukoneogeneze (245).

Najveća koncentracija TNF-alfe u serumu pronađena je u CD-HFD skupini (62,19 [57,26-67,42] pg/ml) koja ima i najveće vrijednosti kolesterola te se može pretpostaviti da je izlučivanje proupalnih citokina vjerojatno potaknuto lipoproteinom male gustoće (248). Tu skupinu slijedi HFD-CD (58,43 [56,70-59,47] pg/ml) skupina također s visokom razinom TNF-

alfe što upućuje na upalni odgovor obje skupine potomaka kao i na to da su ti potomci više osjetljivi na promijenjenu prehranu.

S druge strane, najveća je razina IL-6 u serumu pronađena kod HFD-CD potomaka (130,53 [116,42-217,78] pg/ml) koji su imali stalni najveći prirast težine što upućuje na to da je povećani proupalni odgovor povezan s pretilošću (249). Spomenutu skupinu slijedi CD-HFD skupina (118,39 [79,41-221,78] pg/ml) kod koje je, kako je gore navedeno, zabilježena i najviša serumska koncentracija TNF-alfe.

Iz svega se može zaključiti da nepovoljno postnatalno okruženje, tj. izmijena režima prehrane koju je mladunčad upotrijebila nakon rođenja potiče proupalni odgovor u HFD-CD i CD-HFD skupinama.

6. 3. Analiza petog slabinskog kralješka

U pretilosti se nakuplja masno tkivo u većini organa, pa tako i u koštanoj srži. To je poticaj za aktivaciju makrofaga iz kojih se izdvajaju preosteoklasti, a na njihovo dozrijevanje i aktivnost utječe RANKL, član podobitelji TNF-alfe.

TNF-alfu i IL-6 u opisanom području koštane srži izlučuju adipociti potaknuti makrofazima (250 - 252). Kontrolirana istraživanja životinjskih modela pretilosti korisne su za proučavanje mehanizma u kojima prekomjerno nakupljanje masnoće utječe na metabolizam kostiju. Korištenjem modela pretilosti izazvanim masnom prehranom Cao i sur. pokazali su da prehrana miševa hranom visokog udjela masnoća (45 % kalorijske vrijednosti dolazi u obliku masti) dovodi do smanjenja obujma spužvaste kosti i broja koštanih gredica u proksimalnoj tibiji nakon četrnaest tjedana, i to unatoč znatnom povećanju tjelesne mase i posljedičnom biomehaničkim opterećenju kosti s postignutom tjelesnom masom (115). Neka druga istraživanja upućuju na slične mikrostrukturne promjene spužvaste koštane tvari nastale djelovanjem proupalnih citokina izlučenih od makrofaga koštane srži za koje je već rečeno da potiču aktivnost osteoklasta, ali i smanjuju ekspresiju IL-10 (253). U životinjskim modelima u kojima je pretilost izazvana masnom prehranom utvrđeno je povećano nakupljanje masnih stanica u koštanoj srži koje je popraćeno smanjenom mineralnom gustoćom kostiju na različitim mjestima u kosturu te upalnom reakcijom reguliranom *gamma* receptorom aktivacije proliferacije peroksisoma *cathepsina* K, IL-6 i TNF-alfe (117). Očekuje se da bi se budućim istraživanjima kvantificirala razina ekspresije mRNA TNF-alfe u masnim stanicama koštane srži i time razjasnilo mehanizme kojima adipocitokini utječu na koštanu remodelaciju.

Biomehaničko opterećenje potiče stvaranje nove kosti kako je dokazano u procesima koštane modelacije, remodelacije i cijeljenja (216). I dok je većina znanstvenih radova usmjerila istraživanje na goljeničnu i bedrenu kost koje podnose najveće biomehaničko opterećenje u pokusnih životinja, ovim istraživanjem želi se isključiti učinak biomehaničkog opterećenja, a to se postiglo odabirom slabinske kralježnice koja ima različitu ulogu kod čovjeka u odnosu na štakora (98, 254 - 256). Naime, važno je zamijetiti da je štakor tetrapodna životinja za razliku od čovjeka koji je bipedalan organizam pa se odabirom petog slabinskog kralješka većinom isključio fiziološki utjecaj tjelesne težine na kost čime se moglo pratiti kako masne promjene u koštanoj srži i s njima povezane upalne promjene mijenjaju obujam i strukturu koštanog tkiva.

Najveće vrijednosti koštanog obujma i površine te debljine koštanih gredica zabilježene su u HFD-CD skupini (BV/TV 27,29 [27,00-28,90] %, BS/TV 160 [72,98-181,81] /mm) što bi se moglo objasniti činjenicom da je masna prehrana majki za vrijeme trudnoće i laktacije djelovala povoljno na koštano tkivo potomaka (257).

Najmanje vrijednosti obujma spužvaste kosti pronađene su u CD-HFD skupini (11,28 [1,34-14,04] %), koju također karakterizira najmanji broj koštanih gredica (0,09 [0,0675-0,011] mm) i najveća razdvojenost među koštanim gredicama (1,19 [0,95-1,5] mm). Takav rezultat upućuje na narušenu koštanu mikrostrukturu toj skupini (Tablica 5.4., Slika 5.21., 5.24. i 5.25).

Histološka analiza govori o dobroj mineralizaciji slabinskog kralješka u dvadeset drugom tjednu starosti, ali upućuje i na određeni zastoj u razvoju koštanih gredica spužvaste kosti. Na mjestu gredica u koštanoj srži vidljive su velike površine infiltrirane masnim tkivom i upalnim stanicama (Slika 5.19.). Pretpostaviti je da u opisanom primjerku adipociti koštane srži pojačano izlučuju upalne citokine koji zatim stimulacijom osteoklastogeneze i koštane resorpcije usporavaju procese modelacije i formacije novog koštanog tkiva kod CD-HFD potomaka (258).

Imunokemijska analiza pokazala je da su različite stanice koštane srži imunopozitivne na TNF-alfu, uključujući adipocite i stanice krvotvorne loze, što donekle potvrđuje gore navedene mehanizme koji su posredovali u usporenoj modelaciji spužvaste kosti petog slabinskog kralješka. U istoj CD-HFD skupini zabilježen je i najjači intenzitet TNF-alfe imunohistokemijskog obojenja što posredno potvrđuje ulogu TNF-alfe u RANK/RANKL/OPG-ovu putu koji je dokazano najvažniji za dinamiku koštane pregradnje (259) (83). Zhang K i sur. su pokazali da u životinja s isključenim TNF-alfa genom koji su bili hranjeni masnom dijetom kroz dvanaest tjedana, broj koštanih gredica bedrene kosti značajno smanjen u kontrolnih životinja, dok je zabilježen porast u životinja s isključenim genom za

TNF-alfa (260). Nadalje, uz broj koštanih gredica zabilježen je i pad broja adipocita i osteoklasta u spomenutim genetički modificiranim životinjama. Spomenuti rad dodatno podupire rezultate ovog istraživanja i ističe kako TNF-alfa ima ključnu ulogu u koštanoj modulaciji masno hranjenih životinja.

Nalaz značajne i obrnuto proporcionalne korelacije između intenziteta IHC na TNF-alfu i broja koštanih gredica spužvaste kosti u CD-HFD skupini (Tablica 5.4.) dodatno potvrđuje sve druge ovdje prisutne nalaze koje govore u prilog činjenici da TNF-alfa potiče koštanu resorpciju što je kod tih životinja dovelo do poremećaja u razvoju koštanih gredica kao posljedica usporene koštane modelacije. Značajna i obrnuto proporcionalna korelacija nađena je u HFD-CD skupini u intenzitetu IHC na TNF-alfi i obujmu spužvaste kosti te debljini koštanih gredica. Takav rezultat govori u prilog smanjenoj koštanoj površini zbog stanjivanja koštanih gredica, a izgled je razlog resorpcija izazvana upalnim djelovanjem TNF-alfe. U skupini HFD-HFD značajna i obrnuto proporcionalna korelacija nađena je između intenziteta IHC na TNF-alfu i debljine kortikalne kosti. Budući da potomci HFD-CD i HFD-HFD skupine potječu od masno hranjenih majki, može se pretpostaviti da je majčina prehrana bogata mastima pridonijela njihovom boljem stanju koštane mase u odnosu na CD-HFD skupinu (Tablica 5.4.).

Spužvasta kost kontrolne skupine karakterizirana je s najvećim brojem koštanih gredica (0,155 [0,0975-0,44] mm) i s najmanjom razdvojenosti među njima (0,64 [0,23-1,09] mm) što upućuje na očuvanu mikrostrukturu koštanog tkiva. Debljina koštanih gredica sužvaste kosti bila je najmanja u toj skupini (49,40 [21,91-194,94] mm) i značajno se razlikovala u odnosu na HFD-CD skupinu. Može se reći da je majčina masna prehrana djelovala zaštinički, kako u najvećem prirastu tjelesne težine, tako i u najdebljim koštanim gredicama u spomenutoj skupini mladunčadi.

Vrijednosti debljine i obujma kortikalne kosti najveći su u HFD-HFD skupini nakon čega slijedi HFD-CD skupina dok su najniže vrijednosti kortikalnih parametara nađene u CD-HFD grupi.

Može se zaključiti da prehrana visokog udjela masnoća ima izravan i neizravan utjecaj na obujam i strukturu koštanog tkiva petog slabinskog kralješka. Poremećaj strukture spužvaste kosti prisutan u CD-HFD skupini može se objasniti izravnim utjecajem masne prehrane na metabolizam koštanog tkiva potomaka. S druge strane, spužvasta kost potomaka onih majki koje su uzimale hranu visokog udjela masnoća pokazuje visoke vrijednosti obujma spužvaste kosti i debljine koštanih gredica te visoke vrijednosti obujma i debljine kortikalne kosti što upućuje na djelovanje određenih zaštitničkih mehanizama iz okoliša na koštanu pregradnju u razdoblju intrauterinog razvoja i laktacije u HFD-CD i HFD-HFD skupinama.

6. 4. Analiza parenhima jetre

Rezultati ovoga istraživanja upućuju da masna prehrana majki za vrijeme trudnoće i laktacije te promijenjena postnatalna prehrana doprinose već opisanim promjenama obujma i strukture koštanog tkiva i promjenama u građi drugih organa.

Analizirajući postotni udio mase izoliranih organa u odnosu na ukupnu tjelesnu težinu štakora, značajno veću masu jetre, testisa, lijevog bubrega i timusa imaju potomci iz skupine koja je hranjena prehranom visokog udjela masnoće. To često stanje zabilježeno je kod svih genetskih ili eksperimentalno induciranih pretilih glodavaca (261 - 263). Tako je HFD-HFD skupina imala sve navedene organe značajno teže u odnosu na vlastitu tjelesnu težinu nego kontrolna skupina (Tablica 5.2.), a nakon HFD-HFD skupine težinom organa slijedi CD-HFD skupina.

Značajno veći udio mase jetre u odnosu na tjelesnu težinu imala je CD-HFD skupina (3,39 [3,25-3,76] g) kada se usporedila s drugim skupinama potomaka. Iako je spomenuta skupina potomaka pokazala gubitak tjelesne težine i nizak ITM, težina promatranih organa u CD-HFD skupini značajno je veća od kontrolne skupine što upućuje da je takvom rezultatu pridonijela prehrana visokog udjela masnoće što je utvrđeno i u nekim drugim znanstvenim istraživanjima (264-266).

Nije bilo značajnih razlika u vrijednostima ALT-a i AST-a uspoređujući četiri različito hranjene skupine potomaka što upućuje da kontrolirana masna ishrana (30 g po životinji) majke i potomka nije imala izravan utjecaj na jetrene enzime. Negativan utjecaj masne prehrane na razine ALT-a i AST-a su odveć poznate (267), zbog toga je učinjena dodatna analiza jetrenog parenhima.

Histološka analiza radi određivanja stupnja oštećenja uzrokovano masnom prehranom omogućila je bolji uvid u promijenjenu strukturu parenhima jetre. Analiza stupnja oštećenja jetrenog parenhima pokazala je nakupljanje masnih kapljica u većem području jetrenog režnjića pri čemu je najveći stupanj oštećenja zabilježen u CD-HFD skupini (2,5 [1,75-3]) (Slika 5.33.). Uz spomenuti visoki stupanj oštećenja jetrenog parenhima u CD-HFD skupini potomaka prati ga i rezultat visokog udjela težine jetre uspoređujući sa ostalim skupinama potomaka.

Naime, takvi rezultati upućuju da je negativan utjecaj izmjene majčine i postnatalne prehrane visokim udjelom masnoće prevladao utjecaj direktne prehrane. Kontrolirana istraživanja masne prehrane na životinjama (201, 268, 269) i ljudima (270, 271) pokazala su da povišene koncentracije cirkulirajućih citokina potiču kaskadu upalnih procesa. Naime, masna prehrana potiče reakciju fosforilacije na Toll-like receptoru 4 (TLR4) i promociju

transkripcijskog faktora NF-kB u jezgri koji aktiviraju transkripciju citokina IL-6 i TNF-alfu kao važne citokine upalnog odgovora (272). Nadalje, TNF-alfa izlučuje više upalnih stanica poput monocita/makrofaga, neutrofila i T-stanica te nekoliko vrsta tkiva kao što su endotel, masno tkivo i stanice živčanog tkiva. Važno je napomenuti da se spomenuti citokin izlučuje iz hepatocita i Kupfferovih stanica (273). Istraživanja su pokazala da je upravo TNF-alfa prilično upleten u evoluciji masne jetre u NASH-u kod ljudi i životinja (273 - 276).

Imunohistokemijska analiza s anti-TNF-alfa protutijelom na jetrenom parenhimu je pokazala signal prisutan u citoplazmi dok se jezgre u pravilu nisu bojile. U CD-HFD skupini potomaka IHC bojenjena TNF-alfa jetrenog parenhima bilo je ravnomjerno raspoređeno po cijelom jetrenom režnjiću. Takav rezultat upućuje na povezanost između masnih promjena u parenhimu i upalne reakcije jetre koja je potvrđena s najjačim signalom IHC na TNF-alfi u spomenutoj skupini te nadalje upućuje na sustavnu upalu u toj skupini koja je utvrđena najvećom razinom TNF-alfa (62,19 [57,26-67,42] pg/ml) u krvi. (Slika 5.18. Tablica 5.3.). Takvi rezultati prate i druga znanstvena istraživanja koja govore kako prehrana bogata mastima dovodi do promijene u metabolizmu lipida, pojačanom lučenju upalnih citokina, oksidativnom stresu i progresiji NAFLD kod ljudi i životinja (277 - 279).

Visoke razine IL-6 zabilježene su u CD-HFD (118,39 [79,41-221,78] pg/ml) i HFD-CD (130,53 [116,42-217,78] pg/ml) skupini potomaka što se značajno razlikovalo u odnosu na kontrolnu skupinu. Rezultati dosadašnjih istraživanja navode negativnu ulogu IL-6 u patogenezi masne jetre. Tako je kod štakora kojima je pretilost izazvana masnom prehranom osjetljivost jetre na inzulin poboljšana nakon terapije s anti-IL-6 protutijelom (280) te se za IL-6 drži da je marker inzulinske rezistencije i kardiovaskularnih bolesti. Nakon operacije želučane premosnice pacijenti su pokazali smanjenu koncentraciju IL-6 koja je bila direkno proporcionalna s izgubljenim kilogramima tjelesne težine i stupnjem oštećenja jetre (281).

U novijoj studiji, Chen X i sur. su pokazali u životinja s isključenim genom za IL-6 i TNF-alfa koji su koristili masnu prehranu kroz period od dvanaest tjedana, velike oscilacije tjelesne težine, hiperglikemiju i visoki stupanj oštećenja jetrenog parenhima u usporedbi s masno hranjenom kontrolnom skupinom. Nadalje, kod životinja s isključenim genom za IL-6 koji su koristili standarnu ili masnu prehranu pokazuju sličan metabolički profil kao kontrolna skupina na prehrani bogatoj mastima (282). Takva studija pokazuje da potpuna blokada IL-6 i TNF-alfa nije riješenje u liječenju pretilosti i pridruženim bolestima metaboličkog sindroma te da je izuzetno kompleksna i još uvijek slabo istražena. U skupini HFD-CD zabilježena je manja težina jetre i manji stupanj oštećenja jetrenog parenhima, kao i bolja mikrostruktura koštanih

gredica spužvaste kosti, ali najviša razina IL-6 što nam upućuje na moguću protektivnu ulogu spomenutog citokina u ovoj skupini, kako na metabolizam jetre, tako i na koštani sustav.

Promatrajući cjelokupne rezultate analize jetrenog parenhma, u skupini CD-HFD zabilježena je najviša koncentracija upalnog citokina TNF-alfa, najjači intenzitet bojanja IHC na TNF-alfe te uz težinu jetre, najveći stupanj oštećenja jetrenog parenhima, a ne u očekivanoj HFD-HFD skupini potomaka. Takvi rezultati mogu se objasniti boljom prilagodbom HFD-HFD skupine na promjene u prehrani nakon laktacije nego što se na iste promijenjene uvjete prehrane mogla prilagoditi CD-HFD skupina potomaka. Upravo izmijena intrauterine i postnatalne prehrane u toj skupini dovela do upalnog odgovora uzrokovanog dodatnom postnatalnom masnom prehranom. Znanstvenu podlogu za takvo razmišljanje nalazi se također u DOHaD modelu (283, 284) i spomenutoj hipotezi „štedljivog fenotipa“ (48, 285).

6.5. Nova područja istraživanja koja otvara ova disertacija

Ova disertacija dio je velikog projekta naziva *Utjecaj prehrane majke za vrijeme trudnoće i laktacije na ekspresiju važnih citokina na postnatnu prehranu potomaka* te je otvorila nova područja istraživanja na temu izmjene režima prehrane i nova područja istraživanja koštanog tkiva.

Analizom petog slabinskog kralješka kod različito hranjenih muških potomaka štakora došlo se do novih spoznaja utjecaja masne prehrane na obujam i strukturu koštanog tkiva. Nadalje, uspjelo se izdvojiti rizičnu skupinu potomaka štakora (CD-HFD) u kojoj su utvrđene najveće promjene koštanog tkiva te najjači upalni odgovor.

Takvo istraživanje moglo bi se proširiti na ženske potomke uz dodatnu analizu hormona estrogena (koji luči i samo masno tkivo) i koji ima protektivan učinak na koštani metabolizam (286). Također bi bilo zanimljivo proširiti istraživanje na imunohistokemijsku analizu jetrenog parenhima u ženskih potomaka kako bismo saznali kakav je učinak protektivnih adipocitokina u patogenezi nealkoholne masne jetre.

Uz postojeću suradnju s Medicinskim fakultetom Sveučilišta u Rijeci i projektom *Uloga koštanog morfogenetskog proteina-9 u akutnom i kroničnom oštećenju jetre*, očekuje se da bi se postojeće istraživanje moglo proširiti na imunohistokemijsku analizu BMP-9 u ciljnim organima (jetra i kost) jer je taj protein hepatogen (potječe iz jetre) te ima slična svojstva kao inzulin.

Nova područja također se otvaraju u ispitivanja svojstava masnog tkiva, morfologije adipocita te uloge protektivnih adipocitokina u metabolizmu kosti.

Objavljeni znanstveni radovi iz gore navedenih projekata upućuju na važnost i znanstvenu popularnost ove doktorske disertacije.

7. ZAKLJUČCI

Tjelesna težina i indeks tjelesne mase

Muški potomci iz CD-HFD i HFD-HFD skupina hranjeni prehranom bogatom mastima imaju manju tjelesnu težinu u odnosu na životinje koje su hranjene standardnom laboratorijskom hranom, moguće je zbog njihovog ograničenog pristupa hrani dok su CD-CD i HFD-CD skupine imale pristup hrani *ad libidum*.

Biokemijska analiza seruma

Najveće koncentracije kolesterola i triglicerida zabilježene su u HFD-HFD skupini dok se koncentracija jetrenih enzima nije statistički značajno razlikovala između ispitivanih skupina.

U CD-HFD i HFD-CD skupinama zabilježene su veće koncentracije upalnih citokina IL-6 i TNF-alfe, a razlog takvom nalazu vjerojatno je promijenjena postnalna prehrana u navedenim skupinama.

Analiza strukture petog slabinskog kralješka

Peti slabinski kralježak CD–HFD skupine pokazuje izrazito nakupljanje masnog tkiva u koštanoj srži, niske vrijednosti koštanog obujma i poremećaj mikrostrukture spužvaste koštane tvari. U istoj skupini nađen je i najjači intenzitet TNF-alfa imunohistokemijskog obojenja u koštanoj srži te najveća koncentracija TNF-alfe u serumu što upućuje na povezanost između proupalnih citokina i gore navedenih promjena u spužvastoj koštanoj tvari.

Analiza jetrenog parenhima

U CD-HFD skupini potomaka, uz najtežu jetru, zabilježen je i najveći stupanj oštećenja jetrenog parenhima te najjači intenzitet TNF-alfa imunohistokemijskog obojenja, koju prati i visoka koncentracija cirkulirajućih upalnih citokina (IL-6, TNF-alfa), što sve skupa potvrđuje dosadašnje spoznaje o ulozi TNF-alfe u patogenezi NAFLD-a.

Analiza povezanost strukture petog kralješka i promjena jetrenog parenhima

Našim rezultatima utvrđene su promjene koštanog tkiva u rizičnoj CD-HFD skupini, koje su karakterizirane sa niskim vrijednostima koštanog obujma te s poremećajem mikroarhitekture spužvaste koštane tvari, što je rezultiralo s nedovoljno razvijenim koštanim gredicama u dvadeset drugom tjednu života mladunčadi. Ta skupina također ima najveći stupanj oštećenja jetrenog parenhima, najveći udio mase jetre u odnosu na tjelesnu težinu štakora te najjači upalni odgovor u parenhimu jetre i u cirkulaciji. Iz svega gore navedenog može se zaključiti da nagli prelazak na masnu prehranu, nakon perioda laktacije, ne utječe povoljno na obujam i mikrostrukturu petog slabinskog kralješka te na fiziologiju jetre u CD-HFD skupini potomaka

8. SAŽETAK

Utjecaj prehrane bogate mastima na obujam i strukturu koštanog tkiva te na parenhim jetre u muških potomaka štakora

Cilj: utvrditi kako prehrana majki tijekom trudnoće i laktacije te prelazak muških potomaka štakora na drugi režim masne prehrane može utjecati na tjelesnu kilažu, indeks tjelesne mase, koncentraciju upalnih citokina u krvi te na intenzitet imunohiskemijskog obojenja TNF-alfe u koštanom tkivu i u parenhimu jetre. Nadalje, utvrditi kako masna prehrana može izazvati masnu infiltraciju u koštanoj srži i u parenhimu jetre što dodatno izaziva promjene obujama i strukture koštanog tkiva petog slabinskog kralješka.

Metode: deset ženski Sprague Dawley, devet tjedna starosti, nasumično podijeljene u dvije skupine hranjene su kontrolnom dijetom ili masnom dijetom tijekom šest tjedana nakon čega su parene s istim mužjakom. Nakon trudnoće i laktacije muški potomci obiju skupina podijeljeni su u četiri podskupine ovisno o prehrani kojom su bili hranjeni do dvadeset drugog tjedna starosti. Nakon žrtvovanja, uzimanja seruma i izolacije organa za vaganje, učvršćena su tkiva petog slabinskog kralješka i jetre radi histomorfometrije i imunohistokemijske analize na TNF-alfi.

Rezultati: tjelesna težina smanjana je kod potomaka hranjenih dijetom bogatom mastima dok je analiza težine organa pokazala veće razlike kod potomaka kojima je promijenjen intrauterin/postanatalni režim hranjenja u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod svih potomaka zabilježena je viša koncentracija serumskog kolesterola i triglicerida u odnosu na kontrolnu skupinu dok je kod potomaka sa zamjenom režima ishrane (CD-HFD, HFD-CD) zabilježena viša koncentracija upalnih citokina u krvi. Potomstvo zdravih majki hranjeno masnom dijetom pokazalo je izrazito nakupljanje masnog tkiva u koštanoj srži i narušene spužvaste koštane strukture te najveći intenzitet TNF-alfa imunohistokemijskog bojanja koštane srži i tkiva jetre kao i lošiju patohistološku analizu jetrenog parenhima.

Zaključak: skupina potomaka kojima e majka hranjena kontoliranom laboratorijskom hranom, a potomak nakon toga masnom dijetom imala je višu serumsku koncentraciju upalnih citokina u krvi i najveći intenzitet imunohistokemijski signala TNF-alfe na petom slabinskom kralješku i parenhimu jetre. Može se zaključiti da dodatna akumulacija masnog tkiva zbog ishrane

dijetom visokog udjela masnoće potiče nakupljanje masnog tkiva u koštanoj srži i jetri koje potiču upalni odgovor stimulacijom citokina, ovdje promatranog TNF-alfe koji naknado sudjeluje u patogenezi koštane remodelacije i razvoja NAFLD-a.

Ključne riječi: masno tkivo, majčina pretilost, dijeta visokog udjela masnoće, morfologija kosti, masna jetra

9. SUMMARY

The effect of high fat diet on the volume and structure of bone tissue and liver parenchyma in male offspring rats

Objective: To determine how nutrition of mothers during pregnancy and lactation, and the male offspring of rats at different regime of diet can affect body weight, body mass index, the concentration of inflammatory cytokines in the blood and the intensity of immunohistochemistry staining of TNF-alpha in bone tissue and in the liver. Furthermore, how high-fat diet can cause fat infiltration in the bone marrow and in the liver, which can additionally cause change of volume and structure of bone tissue of the fifth lumbar vertebra.

Methods: Ten female Sprague Dawley rats were at nine weeks of age randomly divided in two groups and fed either a control diet or food rich in saturated fatty acids during six weeks, and then mated with genetically similar male subjects. After gestation and lactation, male offspring from both groups were divided in four subgroups depending on the diet they were fed until 22 weeks of age. Body weight throughout the experiment was measured and body mass index was calculated, organ weight was valued after sacrifice, and total cholesterol, triglyceride, AST, ALT, IL-6 and TNF-alpha in serum were measured. Bone microstructure was analyzed in the fifth lumbar vertebra using digital photographic images. TNF-alpha expression was measured in bone and liver samples using immunohistochemistry.

Results: Body weight was lower in offspring fed a diet rich in fats and the analysis of organ weight showed greater differences in offspring with changed intrauterine/postnatal feeding regime compared with the control group. In all offspring fed high-fat diet higher serum cholesterol and triglyceride levels were observed compared to the control group while the offspring that had their diet replaced in relation to mothers' diet (CD-HFD, HFD-CD) recorded higher concentrations of inflammatory cytokines in the blood. The offspring of healthy mothers, fed with high-fat diet, showed increased accumulation of fat in the bone marrow and disturbed trabecular bone structure and the highest intensity of TNF-alpha immunohistochemical staining of bone marrow and liver tissue, and also worse histopathological analysis of liver parenchyma.

Conclusion: The group of rats whose mother was fed with controlled laboratory chow and then offspring with high-fat diet had higher serum concentration of inflammatory cytokines in and

the highest level of immunohistochemical signal of TNF-alpha in the fifth lumbar vertebra and liver parenchyma. Thus we can conclude that additional accumulation of body fat because of eating a diet with high percentage of fat stimulates the accumulation of fat in the bone marrow and liver, which can encourage the inflammatory response by stimulating cytokines, here observed TNF-alpha, which is subsequently involved in the pathogenesis of bone remodeling and development of NAFLD.

Keywords: adipose tissue, maternal obesity, high fat diet, bone morphology, fatty liver

10. LITERATURA

1. Maes HH, Neale MC, Eaves LJ. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. Behav Genet. 1997;27(4):325-51.
2. Bergin JE, Neale MC, Eaves LJ, Martin NG, Heath AC, Maes HH. Genetic and environmental transmission of body mass index fluctuation. Behav Genet. 2012;42(6):867-74.
3. Aronne LJ. Classification of obesity and assessment of obesity-related health risks. Obes Res. 2002;10(2):105S-15S.
4. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. Lancet. 2011;377(9765):557-67.
5. Šimetin IP, Mayer D. Preventivna i specifična zdravstvena zaštita djece školske dobi i mladih. Hrvatski časopis za javno zdravstvo. 2013;9(36):67-75.
6. de Onis M, Blossner M, Borghi E. Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children. Am J Clin Nutr. 2010;92(5):1257-64.
7. de Onis M, Blossner M, Borghi E. Prevalence and trends of stunting among pre-school children, 1990-2020. Public Health Nutr. 2012;15(1):142-8.
8. Bralić I, Bralic I, Labura B, Hegedus Jungvirth M. Pretilost predškolske djece u Hrvatskoj: rezultati multicentrične studije. Paediatr Croat. 2010;54(2):52-5.
9. Wrotniak BH, Shults J, Butts S, Stettler N. Gestational weight gain and risk of overweight in the offspring at age 7 y in a multicenter, multiethnic cohort study. Am J Clin Nutr. 2008;87(6):1818-24.
10. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. J Clin Invest. 2004;114(2):147-52.
11. Gil-Campos M, Canete RR, Gil A. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. Clin Nutr. 2004;23(5):963-74.
12. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. Diabetes. 1988;37(12):1595-607.
13. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2004;89(6):2548-56.
14. Guan H, Arany E, van Beek JP, Chamson-Reig A, Thyssen S, Hill DJ, et al. Adipose tissue gene expression profiling reveals distinct molecular pathways that define visceral

adiposity in offspring of maternal protein-restricted rats. American journal of physiology Endocrinology and metabolism. 2005;288(4):23.

15. Reynolds RM, Osmond C, Phillips DI, Godfrey KM. Maternal BMI, parity, and pregnancy weight gain: influences on offspring adiposity in young adulthood. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2010;95(12):5365-9.

16. Giordano A, Smorlesi A, Frontini A, Barbatelli G, Cinti S. White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. Eur J Endocrinol. 2014;170(5):13-0945.

17. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. Physiological reviews. 2004;84(1):277-359.

18. Ricquier D. Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure. Proc Nutr Soc. 2005;64(1):47-52.

19. Wisse BE. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. J Am Soc Nephrol. 2004;15(11):2792-800.

20. Wang D, Wang C, Wu X, Zheng W, Sandberg K, Ji H, et al. Endothelial dysfunction and enhanced contractility in microvessels from ovariectomized rats: roles of oxidative stress and perivascular adipose tissue. Hypertension. 2014;63(5):1063-9.

21. Ercan C, van Diest PJ, Vooijs M. Mammary development and breast cancer: the role of stem cells. Curr Mol Med. 2011;11(4):270-85.

22. Oliver P, Pico C, De Matteis R, Cinti S, Palou A. Perinatal expression of leptin in rat stomach. Dev Dyn. 2002;223(1):148-54.

23. Palou A, Sanchez J, Pico C. Nutrient-gene interactions in early life programming: leptin in breast milk prevents obesity later on in life. Adv Exp Med Biol. 2009;646:95-104.

24. Saltevo J, Laakso M, Jokelainen J, Keinanen-Kiukaanniemi S, Kumpusalo E, Vanhala M. Levels of adiponectin, C-reactive protein and interleukin-1 receptor antagonist are associated with insulin sensitivity: a population-based study. Diabetes Metab Res Rev. 2008;24(5):378-83.

25. Lazalde B, Huerta-Guerrero HM, Simental-Mendia LE, Rodriguez-Moran M, Guerrero-Romero F. Haptoglobin 2-2 genotype is associated with TNF- alpha and IL-6 levels in subjects with obesity. Dis Markers. 2014;912756(10):29.

26. Hognogi LD, Simiti LV. The cardiovascular impact of visfatin - an inflammation predictor biomarker in metabolic syndrome. Clujul Med. 2016;89(3):322-6.

27. Anastacio LR, de Oliveira MC, Diniz KG, Ferreira AM, Lima AS, Correia MI, et al. Adipokines, inflammatory mediators, and insulin-resistance parameters may not be good markers of metabolic syndrome after liver transplant. Nutrition. 2016;32(9):921-7.
28. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. Science. 1996;271(5249):665-8.
29. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science. 1993;259(5091):87-91.
30. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. Annu Rev Immunol. 2011;29:415-45.
31. Maury E, Brichard SM, Pataky Z, Carpentier A, Golay A, Bobbioni-Harsch E. Effect of obesity on growth-related oncogene factor-alpha, thrombopoietin, and tissue inhibitor metalloproteinase-1 serum levels. Obesity. 2010;18(8):1503-9.
32. Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. Mol Cell Endocrinol. 2010;314(1):1-16.
33. Cawthorn WP, Sethi JK. TNF-alpha and adipocyte biology. FEBS Lett. 2008;582(1):117-31.
34. Cawthorn WP, Heyd F, Hegyi K, Sethi JK. Tumour necrosis factor-alpha inhibits adipogenesis via a beta-catenin/TCF4(TCF7L2)-dependent pathway. Cell Death Differ. 2007;14(7):1361-73.
35. Wheatcroft SB, Kearney MT, Shah AM, Ezzat VA, Miell JR, Modo M, et al. IGF-binding protein-2 protects against the development of obesity and insulin resistance. Diabetes. 2007;56(2):285-94.
36. Stryjecki C, Mutch DM. Fatty acid-gene interactions, adipokines and obesity. Eur J Clin Nutr. 2011;65(3):285-97.
37. Picchi A, Gao X, Belmadani S, Potter BJ, Focardi M, Chilian WM, et al. Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome. Circ Res. 2006;99(1):69-77.
38. Akcilar R, Emel Kocak F, Simsek H, Akcilar A, Bayat Z, Ece E, et al. The effect of adropin on lipid and glucose metabolism in rats with hyperlipidemia. Iran J Basic Med Sci. 2016;19(3):245-51.
39. Ge Q, Maury E, Rycken L, Gerard J, Noel L, Detry R, et al. Endocannabinoids regulate adipokine production and the immune balance of omental adipose tissue in human obesity. Int J Obes. 2013;37(6):874-80.

40. Kleinbongard P, Heusch G, Schulz R. TNFalpha in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure. Pharmacol Ther. 2010;127(3):295-314.

41. Chen Y, Ding H, Wang L, Li G, Zhang P, Wang W. [Effects of Ad-FLT-1/PC on the expression of inflammatory factors in rats with diabetic nephropathy atherosclerosis]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2015;95(24):1961-5.

42. Fujii S. [Atherosclerosis, Chronic Inflammation, and Thrombosis: In Search of the Missing Link in Laboratory Medicine]. Rinsho Byori. 2015;63(5):605-11.

43. Kusters PJ, Lutgens E. Cytokines and Immune Responses in Murine Atherosclerosis. Methods Mol Biol. 2015:2929-0_2.

44. Bataille R, Klein B. Serum levels of beta 2 microglobulin and interleukin-6 to differentiate monoclonal gammopathy of undetermined significance: Blood. 1992 Nov 1;80(9):2433-4.

45. Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. Clin Chem. 2004;50(9):1511-25.

46. Kovacs D, Lovaszi M, Poliska S, Olah A, Biro T, Veres I, et al. Sebocytes differentially express and secrete adipokines. Exp Dermatol. 2016;25(3):194-9.

47. Haas P, Kubista KE, Krugluger W, Huber J, Binder S. Impact of visceral fat and pro-inflammatory factors on the pathogenesis of age-related macular degeneration. Acta Ophthalmol. 2015;93(6):533-8.

48. Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. British medical bulletin. 2001;60:5-20. Epub 2002/01/26.

49. Silveira PP, Portella AK, Goldani MZ, Barbieri MA. Developmental origins of health and disease (DOHaD). J Pediatr. 2007;83(6):494-504.

50. Ayres C, Silveira PP, Barbieri MA, Portella AK, Bettiol H, Agranonik M, et al. Exposure to maternal smoking during fetal life affects food preferences in adulthood independent of the effects of intrauterine growth restriction. J Dev Orig Health Dis. 2011;2(3):162-7.

51. Fernandes FS, Portella AK, Barbieri MA, Bettiol H, Silva AA, Agranonik M, et al. Risk factors for sedentary behavior in young adults: similarities in the inequalities. J Dev Orig Health Dis. 2010;1(4):255-61.

52. Bateson P, Gluckman P, Hanson M. The biology of developmental plasticity and the Predictive Adaptive Response hypothesis. J Physiol. 2014;592(11):2357-68.

53. Gluckman PD, Hanson MA, Spencer HG. Predictive adaptive responses and human evolution. Trends Ecol Evol. 2005;20(10):527-33.

54. Baron R, Mannien J, te Velde SJ, Klomp T, Hutton EK, Brug J. Socio-demographic inequalities across a range of health status indicators and health behaviours among pregnant women in prenatal primary care: a cross-sectional study. BMC Pregnancy Childbirth. 2015;15(261):015-0676.

55. Sullivan EA, Dickinson JE, Vaughan GA, Peek MJ, Ellwood D, Homer CS, et al. Maternal super-obesity and perinatal outcomes in Australia: a national population-based cohort study. BMC Pregnancy Childbirth. 2015;15(322):015-0693.

56. Onubi OJ, Marais D, Aucott L, Okonofua F, Poobalan AS. Maternal obesity in Africa: a systematic review and meta-analysis. J Public Health. 2015;20.

57. Vinturache AE, Chaput KH, Tough SC. Pre-pregnancy body mass index (BMI) and macrosomia in a Canadian birth cohort. J Matern Fetal Neonatal Med. 2016;6:1-8.

58. Aubuchon-Endsley N, Morales M, Giudice C, Bublitz MH, Lester BM, Salisbury AL, et al. Maternal pre-pregnancy obesity and gestational weight gain influence neonatal neurobehaviour. Matern Child Nutr. 2016;10(10):12317.

59. Hillier TA, Pedula KL, Vesco KK, Oshiro CE, Ogasawara KK. Impact of Maternal Glucose and Gestational Weight Gain on Child Obesity over the First Decade of Life in Normal Birth Weight Infants. Matern Child Health J. 2016;6:6.

60. Reuter CP, Burgos MS, Bernhard JC, Tornquist D, Klinger EI, Borges TS, et al. Association between overweight and obesity in schoolchildren with rs9939609 polymorphism (FTO) and family history for obesity. J Pediatr. 2016;3(16):30027-4.

61. Garcia-Mantrana I, Collado MC. Obesity and overweight: Impact on maternal and milk microbiome and their role for infant health and nutrition. Mol Nutr Food Res. 2016;9(10):201501018.

62. Qiao Y, Ma J, Wang Y, Li W, Katzmarzyk PT, Chaput JP, et al. Birth weight and childhood obesity: a 12-country study. Int J Obes Suppl. 2015;5(Suppl 2):8.

63. Talton OO, Pennington KA, Pollock KE, Bates K, Ma L, Ellersieck MR, et al. Maternal Hyperleptinemia Improves Offspring Insulin Sensitivity in Mice. Endocrinology. 2016;4.

64. Toemen L, Gishti O, van Osch-Gevers L, Steegers EA, Helbing WA, Felix JF, et al. Maternal obesity, gestational weight gain and childhood cardiac outcomes: Role of childhood body mass index. Int J Obes. 2016;4(10):86.

65. Takasaki M, Honma T, Yanaka M, Sato K, Shinohara N, Ito J, et al. Continuous intake of a high-fat diet beyond one generation promotes lipid accumulation in liver and white adipose tissue of female mice. J Nutr Biochem. 2012;23(6):640-5.
66. Wells JC. The thrifty phenotype as an adaptive maternal effect. Biol Rev Camb Philos Soc. 2007;82(1):143-72.
67. Segovia SA, Vickers MH, Gray C, Reynolds CM. Maternal obesity, inflammation, and developmental programming. Biomed Res Int. 2014;418975(10):20.
68. Raubenheimer D, Simpson SJ, Tait AH. Match and mismatch: conservation physiology, nutritional ecology and the timescales of biological adaptation. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2012;367(1596):1628-46.
69. Panchal SK, Brown L. Rodent models for metabolic syndrome research. J Biomed Biotechnol. 2011;351982(10):30.
70. Panchal SK, Poudyal H, Iyer A, Nazer R, Alam MA, Diwan V, et al. High-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. J Cardiovasc Pharmacol. 2011;57(5):611-24.
71. Panchal SK, Poudyal H, Arumugam TV, Brown L. Rutin attenuates metabolic changes, nonalcoholic steatohepatitis, and cardiovascular remodeling in high-carbohydrate, high-fat diet-fed rats. J Nutr. 2011;141(6):1062-9.
72. Hansen MJ, Jovanovska V, Morris MJ. Adaptive responses in hypothalamic neuropeptide Y in the face of prolonged high-fat feeding in the rat. J Neurochem. 2004;88(4):909-16.
73. Furnes MW, Zhao CM, Stenstrom B, Arum CJ, Tommeras K, Kulseng B, et al. Feeding behavior and body weight development: lessons from rats subjected to gastric bypass surgery or high-fat diet. J Physiol Pharmacol. 2009;7:25-31.
74. Chen F, Cham JL, Badoer E. High-fat feeding alters the cardiovascular role of the hypothalamic paraventricular nucleus. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology. 2010;298(3):30.
75. Moraes RC, Blondet A, Birkenkamp-Demtroeder K, Tirard J, Orntoft TF, Gertler A, et al. Study of the alteration of gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice by microarray and reverse transcription-polymerase chain reaction analyses. Endocrinology. 2003;144(11):4773-82.
76. Malheiros RD, Moraes VM, Collin A, Decuypere E, Buyse J. Free diet selection by broilers as influenced by dietary macronutrient ratio and corticosterone supplementation. 1. Diet selection, organ weights, and plasma metabolites. Poult Sci. 2003;82(1):123-31.

77. Poudyal H, Panchal SK, Waanders J, Ward L, Brown L. Lipid redistribution by alpha-linolenic acid-rich chia seed inhibits stearoyl-CoA desaturase-1 and induces cardiac and hepatic protection in diet-induced obese rats. J Nutr Biochem. 2012;23(2):153-62.
78. Jenkins TA, Nguyen JC, Hart JL. Decreased vascular HS production is associated with vascular oxidative stress in rats fed a high-fat western diet. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2016;18:18.
79. Stevenson RJ, Boakes RA, Oaten MJ, Yeomans MR, Mahmut M, Francis HM. Chemosensory Abilities in Consumers of a Western-Style Diet. Chem Senses. 2016;8.
80. Bishop CV, Xu F, Xu J, Ting AY, Galbreath E, McGee WK, et al. Western-style diet, with and without chronic androgen treatment, alters the number, structure, and function of small antral follicles in ovaries of young adult monkeys. Fertility and sterility. 2016;105(4):1023-34.
81. Boskey AL. Biomineralization: an overview. Connect Tissue Res. 2003;1:5-9.
82. Cowin SC, Cardoso L. Blood and Interstitial flow in the hierarchical pore space architecture of bone tissue: J Biomech. 2015 Mar 18;48(5):842-54. Epub 2014 Dec 31 doi:10.1016/j.jbiomech.2014.12.013.
83. Nakashima T. [RANKL Biology ~Beyond the bone biology~]. Clin Calcium. 2016;26(8):1135-42.
84. Seeman E. Bone quality. Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA. 2003;14(5):29.
85. Paschalis EP, Betts F, DiCarlo E, Mendelsohn R, Boskey AL. FTIR microspectroscopic analysis of normal human cortical and trabecular bone. Calcif Tissue Int. 1997;61(6):480-6.
86. Borah B, Dufresne TE, Chmielewski PA, Gross GJ, Prenger MC, Phipps RJ. Risedronate preserves trabecular architecture and increases bone strength in vertebra of ovariectomized minipigs as measured by three-dimensional microcomputed tomography. J Bone Miner Res. 2002;17(7):1139-47.
87. Parkinson IH, Fazzalari NL. Interrelationships between structural parameters of cancellous bone reveal accelerated structural change at low bone volume. J Bone Miner Res. 2003;18(12):2200-5.
88. Kleerekoper M, Villanueva AR, Stanciu J, Rao DS, Parfitt AM. The role of three-dimensional trabecular microstructure in the pathogenesis of vertebral compression fractures. Calcif Tissue Int. 1985;37(6):594-7.
89. Weinstein RS, Hutson MS. Decreased trabecular width and increased trabecular spacing contribute to bone loss with aging. Bone. 1987;8(3):137-42.

90. Vesterby A, Mosekilde L, Gundersen HJ, Melsen F, Holme K, Sorensen S. Biologically meaningful determinants of the in vitro strength of lumbar vertebrae. Bone. 1991;12(3):219-24.

91. Novack DV, Teitelbaum SL. The osteoclast: friend or foe? Annu Rev Pathol. 2008;3:457-84.

92. Cao JJ, Wronski TJ, Iwaniec U, Phleger L, Kurimoto P, Boudignon B, et al. Aging increases stromal/osteoblastic cell-induced osteoclastogenesis and alters the osteoclast precursor pool in the mouse. J Bone Miner Res. 2005;20(9):1659-68.

93. Perkins SL, Gibbons R, Kling S, Kahn AJ. Age-related bone loss in mice is associated with an increased osteoclast progenitor pool. Bone. 1994;15(1):65-72.

94. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Anderson JJ. Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: the Framingham study. J Bone Miner Res. 1993;8(5):567-73.

95. Hannan MT, Anderson JJ, Zhang Y, Levy D, Felson DT. Bone mineral density and knee osteoarthritis in elderly men and women. The Framingham Study. Arthritis Rheum. 1993;36(12):1671-80.

96. Reid IR, Ames R, Evans MC, Sharpe S, Gamble G, France JT, et al. Determinants of total body and regional bone mineral density in normal postmenopausal women--a key role for fat mass. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 1992;75(1):45-51.

97. Villareal DT, Apovian CM, Kushner RF, Klein S. Obesity in older adults: technical review and position statement of the American Society for Nutrition and NAASO, The Obesity Society. Obes Res. 2005;13(11):1849-63.

98. Ehrlich PJ, Lanyon LE. Mechanical strain and bone cell function: a review. Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA. 2002;13(9):688-700.

99. Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. Bone. 2008;42(4):606-15.

100. Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. Annu Rev Biomed Eng. 2006;8:455-98.

101. Goulding A, Taylor RW, Jones IE, McAuley KA, Manning PJ, Williams SM. Overweight and obese children have low bone mass and area for their weight. International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity. 2000;24(5):627-32.

102. Blum M, Harris SS, Must A, Naumova EN, Phillips SM, Rand WM, et al. Leptin, body composition and bone mineral density in premenopausal women. Calcif Tissue Int. 2003;73(1):27-32.
103. Hsu YH, Venners SA, Terwedow HA, Feng Y, Niu T, Li Z, et al. Relation of body composition, fat mass, and serum lipids to osteoporotic fractures and bone mineral density in Chinese men and women. Am J Clin Nutr. 2006;83(1):146-54.
104. Weiler HA, Janzen L, Green K, Grabowski J, Seshia MM, Yuen KC. Percent body fat and bone mass in healthy Canadian females 10 to 19 years of age. Bone. 2000;27(2):203-7.
105. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell. 1998;93(2):165-76.
106. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell. 1997;89(2):309-19.
107. Eghbali-Fatourechi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. J Clin Invest. 2003;111(8):1221-30.
108. Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. J Dent Res. 2003;82(2):82-90.
109. Bernstein CN, Leslie WD, Taback SP. Bone density in a population-based cohort of premenopausal adult women with early onset inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol. 2003;98(5):1094-100.
110. Romas E, Gillespie MT, Martin TJ. Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. Bone. 2002;30(2):340-6.
111. Mundy GR. Osteoporosis and inflammation. Nutr Rev. 2007;65(12 Pt 2):S147-51.
112. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. Endocrinology. 2001;142(12):5050-5.
113. Hamrick MW, Pennington C, Newton D, Xie D, Isales C. Leptin deficiency produces contrasting phenotypes in bones of the limb and spine. Bone. 2004;34(3):376-83.
114. Palacios C. The role of nutrients in bone health, from A to Z. Crit Rev Food Sci Nutr. 2006;46(8):621-8.
115. Cao JJ, Gregoire BR, Gao H. High-fat diet decreases cancellous bone mass but has no effect on cortical bone mass in the tibia in mice. Bone. 2009;44(6):1097-104.

116. Cao JJ, Sun L, Gao H. Diet-induced obesity alters bone remodeling leading to decreased femoral trabecular bone mass in mice. Ann N Y Acad Sci. 2010.
117. Halade GV, Rahman MM, Williams PJ, Fernandes G. High fat diet-induced animal model of age-associated obesity and osteoporosis. J Nutr Biochem. 2010;21(12):1162-9.
118. Carmo LS, Rogero MM, Cortez M, Yamada M, Jacob PS, Bastos DH, et al. The Effects of Yerba Mate (Ilex Paraguariensis) consumption on IL-1, IL-6, TNF-alpha and IL-10 production by bone marrow cells in wistar rats fed a high-fat diet. Int J Vitam Nutr Res. 2013;83(1):26-35.
119. Park JS, Bae SJ, Choi SW, Son YH, Park SB, Rhee SD, et al. A novel 11beta-HSD1 inhibitor improves diabesity and osteoblast differentiation. J Mol Endocrinol. 2014;52(2):191-202.
120. Halade GV, El Jamali A, Williams PJ, Fajardo RJ, Fernandes G. Obesity-mediated inflammatory microenvironment stimulates osteoclastogenesis and bone loss in mice. Exp Gerontol. 2011;46(1):43-52.
121. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka PV, Fahey F, Daley GQ. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. Nature. 2009;460(7252):259-63.
122. Canavan B, Salem RO, Schurgin S, Koutkia P, Lipinska I, Laposata M, et al. Effects of physiological leptin administration on markers of inflammation, platelet activation, and platelet aggregation during caloric deprivation. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2005;90(10):5779-85.
123. van Dielen FM, van't Veer C, Schols AM, Soeters PB, Buurman WA, Greve JW. Increased leptin concentrations correlate with increased concentrations of inflammatory markers in morbidly obese individuals. International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity. 2001;25(12):1759-66.
124. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. Biochem Biophys Res Commun. 1999;257(1):79-83.
125. Holloway WR, Collier FM, Aitken CJ, Myers DE, Hodge JM, Malakellis M, et al. Leptin inhibits osteoclast generation. J Bone Miner Res. 2002;17(2):200-9.
126. Burguera B, Hofbauer LC, Thomas T, Gori F, Evans GL, Khosla S, et al. Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. Endocrinology. 2001;142(8):3546-53.

127. Elefteriou F, Takeda S, Ebihara K, Magre J, Patano N, Kim CA, et al. Serum leptin level is a regulator of bone mass. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(9):3258-63.
128. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. Cell. 2000;100(2):197-207.
129. Halade GV, Rahman MM, Williams PJ, Fernandes G. High fat diet-induced animal model of age-associated obesity and osteoporosis. The Journal of nutritional biochemistry. 2010;21(12):1162-9.
130. Dayem SM, Nazif HK, Ei-Kader MA, El-Tawil M. Study of Adiponectin Level in Diabetic Adolescent Girls in Relation to Glycemic Control and Complication of Diabetes. Open Access Maced J Med Sci. 2015;3(4):613-8.
131. Lu X, Liu N, Du W, Li J, Sun Y, Luo E. [Effect of topically applied recombinant adenovirus of adiponectin on bone defect repair]. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 2015;33(4):361-5.
132. Lac G, Cavalie H, Ebal E, Michaux O. Effects of a high fat diet on bone of growing rats. Correlations between visceral fat, adiponectin and bone mass density. Lipids Health Dis. 2008;7(16):7-16.
133. Nelson SE, Frantz JA, Ziegler EE. Absorption of fat and calcium by infants fed a milk-based formula containing palm olein. J Am Coll Nutr. 1998;17(4):327-32.
134. Carnielli VP, Luijendijk IH, Van Goudoever JB, Sulkers EJ, Boerlage AA, Degenhart HJ, et al. Structural position and amount of palmitic acid in infant formulas: effects on fat, fatty acid, and mineral balance. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1996;23(5):553-60.
135. Lucas A, Quinlan P, Abrams S, Ryan S, Meah S, Lucas PJ. Randomised controlled trial of a synthetic triglyceride milk formula for preterm infants. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 1997;77(3):F178-84.
136. Zhang Y, Shao J, Wang Z, Yang T, Liu S, Liu Y, et al. Aqueous extract of pomegranate seed attenuates glucocorticoid-induced bone loss and hypercalciuria in mice: A comparative study with alendronate. Int J Mol Med. 2016;3(10).
137. Soltani S, Hunter GR, Kazemi A, Shab-Bidar S. The effects of weight loss approaches on bone mineral density in adults: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA. 2016;6:6.

138. Histing T, Andonyan A, Klein M, Scheuer C, Stenger D, Holstein JH, et al. Obesity does not affect the healing of femur fractures in mice. Injury. 2016;23(16):30134-6.
139. Palermo A, Tuccinardi D, Defeudis G, Watanabe M, D'Onofrio L, Lauria Pantano A, et al. BMI and BMD: The Potential Interplay between Obesity and Bone Fragility. Int J Environ Res Public Health. 2016;13(6).
140. Brinkworth GD, Wycherley TP, Noakes M, Buckley JD, Clifton PM. Long-term effects of a very-low-carbohydrate weight-loss diet and an isocaloric low-fat diet on bone health in obese adults. Nutrition. 2016;17(16):00129-5.
141. Bonnet N, Pierroz DD, Ferrari SL. Adrenergic control of bone remodeling and its implications for the treatment of osteoporosis. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2008;8(2):94-104.
142. Lanham SA, Roberts C, Hollingworth T, Sreekumar R, Elahi MM, Cagampang FR, et al. Maternal high-fat diet: effects on offspring bone structure. Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA. 2010;21(10):1703-14.
143. Lindenmaier LB, Philbrick KA, Branscum AJ, Kalra SP, Turner RT, Iwaniec UT. Hypothalamic Leptin Gene Therapy Reduces Bone Marrow Adiposity in ob/ob Mice Fed Regular and High-Fat Diets. Front Endocrinol. 2016;7(110).
144. Scheller EL, Khoury B, Moller KL, Wee NK, Khandaker S, Kozloff KM, et al. Changes in Skeletal Integrity and Marrow Adiposity during High-Fat Diet and after Weight Loss. Front Endocrinol. 2016;7(102).
145. Ravn P, Cizza G, Bjarnason NH, Thompson D, Daley M, Wasnich RD, et al. Low body mass index is an important risk factor for low bone mass and increased bone loss in early postmenopausal women. Early Postmenopausal Intervention Cohort (EPIC) study group. J Bone Miner Res. 1999;14(9):1622-7.
146. Reid IR, Evans MC, Ames RW. Volumetric bone density of the lumbar spine is related to fat mass but not lean mass in normal postmenopausal women. Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA. 1994;4(6):362-7.
147. Fattahi MR, Niknam R, Safarpour A, Sepehrimanesh M, Lotfi M. The Prevalence of Metabolic Syndrome In Non-alcoholic Fatty Liver Disease; A Population-Based Study. Middle East J Dig Dis. 2016;8(2):131-7.
148. Calzadilla Bertot L, Adams LA. The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Int J Mol Sci. 2016;17(5).

149. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. Am J Gastroenterol. 1999;94(9):2467-74.

150. Liao N, Pan F, Wang Y, Zheng Y, Xu B, Chen W, et al. Adipose tissue-derived stem cells promote the reversion of non-alcoholic fatty liver disease: An in vivo study. Int J Mol Med. 2016;37(5):1389-96.

151. Feldman A, Aigner E, Weghuber D, Paulmichl K. The Potential Role of Iron and Copper in Pediatric Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Biomed Res Int. 2015;287401(10):26.

152. Ozturk Y, Soylu OB. Fatty liver in childhood. World J Hepatol. 2014;6(1):33-40.

153. Rosenthal P. Nonalcoholic fatty liver disease in pediatric patients--a problem that is "enormous" and "growing"! JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2012;36(1 Suppl):0148607111423925.

154. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Adipokines in nonalcoholic fatty liver disease. Metabolism. 2015;24(15):00351-0.

155. Scheja L, Heeren J. Metabolic interplay between white, beige, brown adipocytes and the liver. J Hepatol. 2016;64(5):1176-86.

156. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. Hepatology. 2006;43(2 Suppl 1):S99-S112.

157. McCullough AJ. Update on nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Gastroenterol. 2002;34(3):255-62.

158. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. Diabetes. 2001;50(8):1844-50.

159. McCullough AJ. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. J Clin Gastroenterol. 2006;40(1):S17-29.

160. Edmison J, McCullough AJ. Pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis: human data. Clin Liver Dis. 2007;11(1):75-104.

161. Eguchi A, Povero D, Alkhouri N, Feldstein AE. Novel therapeutic targets for nonalcoholic fatty liver disease. Expert Opin Ther Targets. 2013;17(7):773-9.

162. Lobstein T, Baur L, Uauy R. Obesity in children and young people: a crisis in public health. Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity. 2004;1:4-104.

163. Manco M, Marcellini M, Giannone G, Nobili V. Correlation of serum TNF-alpha levels and histologic liver injury scores in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. Am J Clin Pathol. 2007;127(6):954-60.
164. Rector RS, Thyfault JP, Wei Y, Ibdah JA. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update. World J Gastroenterol. 2008;14(2):185-92.
165. Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, et al. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology. 2003;37(2):343-50.
166. Haukeland JW, Damas JK, Konopski Z, Loberg EM, Haaland T, Goverud I, et al. Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. J Hepatol. 2006;44(6):1167-74.
167. Hill DB, Marsano L, Cohen D, Allen J, Shedlofsky S, McClain CJ. Increased plasma interleukin-6 concentrations in alcoholic hepatitis. J Lab Clin Med. 1992;119(5):547-52.
168. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. Nat Med. 2005;11(2):183-90.
169. Wieckowska A, Papouchado BG, Li Z, Lopez R, Zein NN, Feldstein AE. Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. Am J Gastroenterol. 2008;103(6):1372-9.
170. Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, et al. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. Science. 1996;274(5291):1379-83.
171. Wen Y, Feng D, Wu H, Liu W, Li H, Wang F, et al. Defective Initiation of Liver Regeneration in Osteopontin-Deficient Mice after Partial Hepatectomy due to Insufficient Activation of IL-6/Stat3 Pathway. Int J Biol Sci. 2015;11(10):1236-47.
172. Lu S, Jiao H, Xu J, Zheng Y, Sun Y, Chen H. Downregulation of IL6 Targeted MiR-376b May Contribute to a Positive IL6 Feedback Loop During Early Liver Regeneration in Mice. Cell Physiol Biochem. 2015;37(1):233-42.
173. Kornasiewicz O, Grat M, Dudek K, Lewandowski Z, Gorski Z, Zieniewicz K, et al. Serum levels of HGF, IL-6, and TGF-alpha after benign liver tumor resection. Adv Med Sci. 2015;60(1):173-7.
174. Jin X, Zimmers TA, Perez EA, Pierce RH, Zhang Z, Koniaris LG. Paradoxical effects of short- and long-term interleukin-6 exposure on liver injury and repair. Hepatology. 2006;43(3):474-84.

175. Nieto N. Oxidative-stress and IL-6 mediate the fibrogenic effects of [corrected] Kupffer cells on stellate cells. Hepatology. 2006;44(6):1487-501.
176. Li L, Wang B, Yu P, Wen X, Gong D, Zeng Z. Medium and Long Chain Fatty Acids Differentially Modulate Apoptosis and Release of Inflammatory Cytokines in Human Liver Cells. J Food Sci. 2016;3(10):1750-3841.
177. Wang B, Li L, Fu J, Yu P, Gong D, Zeng C, et al. Effects of Long-Chain and Medium-Chain Fatty Acids on Apoptosis and Oxidative Stress in Human Liver Cells with Steatosis. J Food Sci. 2016;81(3):1750-3841.
178. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 1997;82(12):4196-200.
179. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. Hepatology. 2004;40(1):185-94.
180. Jung BD, Kimura K, Kitamura H, Makondo K, Okita K, Kawasaki M, et al. Norepinephrine stimulates interleukin-6 mRNA expression in primary cultured rat hepatocytes. J Biochem. 2000;127(2):205-9.
181. Klover PJ, Zimmers TA, Koniaris LG, Mooney RA. Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice. Diabetes. 2003;52(11):2784-9.
182. Stojsavljevic S, Gomercic Palcic M, Virovic Jukic L, Smircic Duvnjak L, Duvnjak M. Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol. 2014;20(48):18070-91.
183. Adams LA, Zein CO, Angulo P, Lindor KD. A pilot trial of pentoxifylline in nonalcoholic steatohepatitis. Am J Gastroenterol. 2004;99(12):2365-8.
184. Satapathy SK, Sakhuja P, Malhotra V, Sharma BC, Sarin SK. Beneficial effects of pentoxifylline on hepatic steatosis, fibrosis and necroinflammation in patients with non-alcoholic steatohepatitis. J Gastroenterol Hepatol. 2007;22(5):634-8.
185. Brumbaugh DE, Friedman JE. Developmental origins of nonalcoholic fatty liver disease. Pediatr Res. 2014;75(1-2):140-7.
186. Williams L, Seki Y, Vuguin PM, Charron MJ. Animal models of in utero exposure to a high fat diet: a review. Biochim Biophys Acta. 2014;3:507-19.
187. Kruse M, Seki Y, Vuguin PM, Du XQ, Fiallo A, Glenn AS, et al. High-fat intake during pregnancy and lactation exacerbates high-fat diet-induced complications in male offspring in mice. Endocrinology. 2013;154(10):3565-76.

188. dos Santos Perez G, Santana dos Santos L, dos Santos Cordeiro G, Matos Paraguassu G, Abensur Athanazio D, Couto RD, et al. Maternal and Post-Weaning Exposure to a High Fat Diet Promotes Visceral Obesity and Hepatic Steatosis in Adult Rats. Nutr Hosp. 2015;32(4):1653-8.
189. Speakman JR, Djafarian K, Stewart J, Jackson DM. Assortative mating for obesity. Am J Clin Nutr. 2007;86(2):316-23.
190. Speakman JR, Hambly C. Starving for life: what animal studies can and cannot tell us about the use of caloric restriction to prolong human lifespan. J Nutr. 2007;137(4):1078-86.
191. Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Krol E. Animal models of obesity. Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity. 2007;1:55-61.
192. Panchal SK, Poudyal H, Iyer A, Nazer R, Alam A, Diwan V, et al. High-carbohydrate high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. J Cardiovasc Pharmacol. 2011;57(1):51-64.
193. Poudyal H, Panchal SK, Diwan V, Brown L. Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: effects and emerging mechanisms of action. Prog Lipid Res. 2011;50(4):372-87.
194. McCutcheon JE, Marinelli M. Age matters. Eur J Neurosci. 2009;29(5):997-1014.
195. Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years?: Nutrition. 2005 Jun;21(6):775-7.
196. Romijn HJ, Hofman MA, Gramsbergen A. At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby? Early Hum Dev. 1991;26(1):61-7.
197. Ferezou-Viala J, Roy AF, Serougne C, Gripois D, Parquet M, Bailleux V, et al. Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology. 2007;293(3):6.
198. Chen JH, Tarry-Adkins JL, Heppolette CA, Palmer DB, Ozanne SE. Early-life nutrition influences thymic growth in male mice that may be related to the regulation of longevity. Clin Sci. 2009;118(6):429-38.
199. Gupta A, Srinivasan M, Thamadilok S, Patel MS. Hypothalamic alterations in fetuses of high fat diet-fed obese female rats. J Endocrinol. 2009;200(3):293-300.
200. Slupecka M, Romanowicz K, Wolinski J. Maternal High-Fat Diet during Pregnancy and Lactation Influences Obestatin and Ghrelin Concentrations in Milk and Plasma of Wistar Rat Dams and Their Offspring. Int J Endocrinol. 2016;5739763(10):31.

201. Ohta T, Toriniwa Y, Ryumon N, Inaba N, Hirao T, Yamanaka S, et al. Maternal high-fat diet promotes onset of diabetes in rat offspring. Anim Sci J. 2016;5(10):12606.
202. Desclee de Maredsous C, Oozeer R, Barbillon P, Mary-Huard T, Delteil C, Blachier F, et al. High-Protein Exposure during Gestation or Lactation or after Weaning Has a Period-Specific Signature on Rat Pup Weight, Adiposity, Food Intake, and Glucose Homeostasis up to 6 Weeks of Age. J Nutr. 2016;146(1):21-9.
203. Maric A, Kacarevic ZP, Cekic N, Seric V, Radic 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.
204. („Narodne novine“ broj 135/06, 37/13, 125/13, članak 40)
205. Adeyemi KD, Sabow AB, Aghwan ZA, Ebrahimi M, Samsudin AA, Alimon AR, et al. Serum fatty acids, biochemical indices and antioxidant status in goats fed canola oil and palm oil blend. J Anim Sci Technol. 2016;58(6):016-0088.
206. Janssens S, Heemskerk MM, van den Berg SA, van Riel NA, Nicolay K, Willems van Dijk K, et al. Effects of low-stearate palm oil and high-stearate lard high-fat diets on rat liver lipid metabolism and glucose tolerance. Nutr Metab. 2015;12(57):015-0053.
207. Choi SH, Park SK, Choi CW, Li XZ, Kim KH, Kim WY, et al. The Expression of Adipogenic Genes in Adipose Tissues of Feedlot Steers Fed Supplementary Palm Oil or Soybean Oil. Asian Australas J Anim Sci. 2016;29(3):404-12.
208. Varlamov O. Western-style Diet, Sex Steroids and Metabolism. Biochim Biophys Acta. 2016;2(16):30143-0.
209. Urbaniak, G. C., & Plous, S. (2013). Research Randomizer (Version 4.0) [Computer software]. Retrieved on June 22, 2013, from http://www.randomizer.org/
210. van Leeuwen BL, Kamps WA, Hartel RM, Veth RP, Sluiter WJ, Hoekstra HJ. Effect of single chemotherapeutic agents on the growing skeleton of the rat. Ann Oncol. 2000;11(9):1121-6.
211. Novelli EL, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, Mani F, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. Lab Anim. 2007;41(1):111-9.
212. Harishankar N, Kumar PU, Sesikeran B, Giridharan N. Obesity associated pathophysiological & histological changes in WNIN obese mutant rats. Indian J Med Res. 2011;134:330-40.
213. Bailey SA, Zidell RH, Perry RW. Relationships between organ weight and body/brain weight in the rat: what is the best analytical endpoint? Toxicol Pathol. 2004;32(4):448-66.

214. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. J Bone Miner Res. 2013;28(1):2-17.

215. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. J Bone Miner Res. 1987;2(6):595-610.

216. Cvijanovic O, Bobinac D, Zoricic S, Ostojic Z, Maric I, Crncevic-Orlic Z, et al. Age- and region-dependent changes in human lumbar vertebral bone: a histomorphometric study. Spine. 1976;29(21):2370-5.

217. Ferrell L. Liver pathology: cirrhosis, hepatitis, and primary liver tumors. Update and diagnostic problems. Mod Pathol. 2000;13(6):679-704.

218. Vladimir-Knežević S, Cvijanović O, Blažeković B, Kindl M, Štefan MB, Domitrović R. Hepatoprotective effects of Micromeria croatica ethanolic extract against CCl(4)–induced liver injury in mice: BMC Complement Altern Med. 2015;15:233. doi:10.1186/s12906-015-0763-8.

219. Domitrovic R, Jakovac H, Blagojevic G. Hepatoprotective activity of berberine is mediated by inhibition of TNF-alpha, COX-2, and iNOS expression in CCl(4)-intoxicated mice. Toxicology. 2011;280(1-2):33-43.

220. Beynen A, Festing M, Van Montfort M. Design of animal experiments. Principles of laboratory animal science. 1993:219-49.

221. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. Diabetologia. 1992;35(7):595-601.

222. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. 1992. Int J Epidemiol. 2013;42(5):1215-22.

223. Breier BH, Vickers MH, Ikenasio BA, Chan KY, Wong WP. Fetal programming of appetite and obesity. Mol Cell Endocrinol. 2001;185(1-2):73-9.

224. Ozanne SE, Fernandez-Twinn D, Hales CN. Fetal growth and adult diseases. Semin Perinatol. 2004;28(1):81-7.

225. Ozanne SE, Hales CN. Lifespan: catch-up growth and obesity in male mice. Nature. 2004;427(6973):411-2.

226. Bispham J, Gardner DS, Gnanalingham MG, Stephenson T, Symonds ME, Budge H. Maternal nutritional programming of fetal adipose tissue development: differential effects on

messenger ribonucleic acid abundance for uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated and prolactin receptors. Endocrinology. 2005;146(9):3943-9.

227. Burdge GC, Hanson MA, Slater-Jefferies JL, Lillycrop KA. Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? Br J Nutr. 2007;97(6):1036-46.

228. Burdge GC, Lillycrop KA, Jackson AA, Gluckman PD, Hanson MA. The nature of the growth pattern and of the metabolic response to fasting in the rat are dependent upon the dietary protein and folic acid intakes of their pregnant dams and post-weaning fat consumption. Br J Nutr. 2008;99(3):540-9.

229. Vickers A, Ohlsson A, Lacy JB, Horsley A. Massage for promoting growth and development of preterm and/or low birth-weight infants. Cochrane Database Syst Rev. 2000;2.

230. Kizirian NV, Markovic TP, Muirhead R, Brodie S, Garnett SP, Louie JC, et al. Macronutrient Balance and Dietary Glycemic Index in Pregnancy Predict Neonatal Body Composition. Nutrients. 2016;8(5).

231. Ware S, Voigt JP, Langley-Evans SC. Body composition and behaviour in adult rats are influenced by maternal diet, maternal age and high-fat feeding. J Nutr Sci. 2015;4(4).

232. Byrne CD, Phillips DI. Fetal origins of adult disease: epidemiology and mechanisms. J Clin Pathol. 2000;53(11):822-8.

233. Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. J Nutr. 2003;133(4):1081-7.

234. Frihauf JB, Fekete EM, Nagy TR, Levin BE, Zorilla EP. Maternal Western diet increases adiposity even in male offspring of obesity-resistant rat dams: early endocrine risk markers. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology. 2016;21(00023).

235. Krawczynska A, Herman AP, Antushevich H, Bochenek J, Dziendzikowska K, Gajewska A, et al. Modifications of Western-type diet regarding protein, fat and sucrose levels as modulators of steroid metabolism and activity in liver. J Steroid Biochem Mol Biol. 2016;26(16):30211-4.

236. Gregoraszczuk E, Slupecka M, Wolinski J, Hejmej A, Bilinska B, Fiedor E, et al. Maternal high-fat diet during pregnancy and lactation had gender difference effect on adiponectin in rat offspring. J Physiol Pharmacol. 2016;67(4):543-53.

237. Whitaker RC. Predicting preschooler obesity at birth: the role of maternal obesity in early pregnancy. Pediatrics. 2004;114(1):e29-36.

238. Weden MM, Brownell P, Rendall MS. Prenatal, perinatal, early life, and sociodemographic factors underlying racial differences in the likelihood of high body mass index in early childhood. Am J Public Health. 2012;102(11):2057-67.

239. Mingrone G, Manco M, Mora ME, Guidone C, Iaconelli A, Gniuli D, et al. Influence of maternal obesity on insulin sensitivity and secretion in offspring. Diabetes Care. 2008;31(9):1872-6.

240. Adamu HA, Imam MU, Ooi DJ, Esa NM, Rosli R, Ismail M. Perinatal exposure to germinated brown rice and its gamma amino-butyric acid-rich extract prevents high fat diet-induced insulin resistance in first generation rat offspring. Food Nutr Res. 2016;60(30209).

241. Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR. Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. Pediatrics. 2005;115(3):e290-6.

242. Peric Kacarevic Z, Snajder D, Maric A, Bijelic N, Cvijanovic O, Domitrovic R, et al. High-fat diet induced changes in lumbar vertebra of the male rat offsprings. Acta Histochem. 2016;27(16):002.

243. Lind MV, Larnkjaer A, Molgaard C, Michaelsen KF. Dietary protein intake and quality in early life: impact on growth and obesity. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2016;1:1.

244. Ornellas F, Mello VS, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Sexual dimorphism in fat distribution and metabolic profile in mice offspring from diet-induced obese mothers. Life Sci. 2013;93(12-14):454-63.

245. Franco JG, Fernandes TP, Rocha CP, Calvino C, Pazos-Moura CC, Lisboa PC, et al. Maternal high-fat diet induces obesity and adrenal and thyroid dysfunction in male rat offspring at weaning. J Physiol. 2012;590(21):5503-18.

246. Tamashiro KL, Terrillion CE, Hyun J, Koenig JI, Moran TH. Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. Diabetes. 2009;58(5):1116-25.

247. Knopp RH, Saudek CD, Arky RA, O'Sullivan JB. 2 phases of adipose tissue metabolism in pregnancy: maternal adaptations for fetal growth. Endocrinology. 1973;92(4):984-8.

248. Wu ZH, Chen YQ, Zhao SP. Simvastatin inhibits ox-LDL-induced inflammatory adipokines secretion via amelioration of ER stress in 3T3-L1 adipocyte. Biochem Biophys Res Commun. 2013;432(2):365-9.

249. Dulloo AG. Adipose tissue plasticity in catch-up-growth trajectories to metabolic syndrome: hyperplastic versus hypertrophic catch-up fat. Diabetes. 2009;58(5):1037-9.

250. Kudo O, Sabokbar A, Pocock A, Itonaga I, Fujikawa Y, Athanasou NA. Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. Bone. 2003;32(1):1-7.

251. Fujikawa Y, Sabokbar A, Neale SD, Itonaga I, Torisu T, Athanasou NA. The effect of macrophage-colony stimulating factor and other humoral factors (interleukin-1, -3, -6, and -11, tumor necrosis factor-alpha, and granulocyte macrophage-colony stimulating factor) on human osteoclast formation from circulating cells. Bone. 2001;28(3):261-7.

252. Silva I, Branco JC. Rank/Rankl/opg: literature review. Acta Reumatol Port. 2011;36(3):209-18.

253. Kyung TW, Lee JE, Phan TV, Yu R, Choi HS. Osteoclastogenesis by bone marrow-derived macrophages is enhanced in obese mice. J Nutr. 2009;139(3):502-6.

254. Yarrow JF, Toklu HZ, Balaez A, Phillips EG, Otzel DM, Chen C, et al. Fructose consumption does not worsen bone deficits resulting from high-fat feeding in young male rats. Bone. 2016;85:99-106.

255. Charoenphandhu N, Suntornsaratoon P, Krishnamra N, Sa-Nguanmoo P, Tanajak P, Wang X, et al. Fibroblast growth factor-21 restores insulin sensitivity but induces aberrant bone microstructure in obese insulin-resistant rats. J Bone Miner Metab. 2016;29:29.

256. da Costa CA, da Silva PC, Ribeiro DC, Pereira AD, Dos Santos Ade S, de Abreu MD, et al. Effects of diet containing flaxseed flour (Linum usitatissimum) on body adiposity and bone health in young male rats. Food Funct. 2016;7(2):698-703.

257. Chakravarthy MV, Booth FW. Eating, exercise, and "thrifty" genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases. J Appl Physiol. 1985;96(1):3-10.

258. Hardouin P, Rharass T, Lucas S. Bone Marrow Adipose Tissue: To Be or Not To Be a Typical Adipose Tissue? Front Endocrinol. 2016;7(85).

259. Brunetti G, Papadia F, Tummolo A, Fischetto R, Nicastro F, Piacente L, et al. Impaired bone remodeling in children with osteogenesis imperfecta treated and untreated with bisphosphonates: the role of DKK1, RANKL, and TNF-alpha. Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA. 2016;27(7):2355-65.

260. Zhang K, Wang C, Chen Y, Ji X, Chen X, Tian L, et al. Preservation of high-fat diet-induced femoral trabecular bone loss through genetic target of TNF-alpha. Endocr. 2015;50(1):239-49.

261. Bray GA, York DA. Genetically transmitted obesity in rodents. Physiological reviews. 1971;51(3):598-646.

262. Bray GA. The Zucker-fatty rat: a review. Fed Proc. 1977;36(2):148-53.

263. Deb S, Martin RJ. Effects of exercise and of food restriction on the development of spontaneous obesity in rats. J Nutr. 1975;105(5):543-9.

264. Handjieva-Darlenska T, Boyadjieva N. The effect of high-fat diet on plasma ghrelin and leptin levels in rats. J Physiol Biochem. 2009;65(2):157-64.

265. de Castro UG, dos Santos RA, Silva ME, de Lima WG, Campagnole-Santos MJ, Alzamora AC. Age-dependent effect of high-fructose and high-fat diets on lipid metabolism and lipid accumulation in liver and kidney of rats. Lipids Health Dis. 2013;12(136):12-136.

266. Goodman MN, Ruderman NB. Starvation in the rat. I. Effect of age and obesity on organ weights, RNA, DNA, and protein. Am J Physiol. 1980;239(4):E269-E76.

267. Salman AA, Aboelfadl SA, Heagzy MA. New Era for Usage of Serum Liver Enzymes as A Promising Horizon for the Prediction of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Open Access Maced J Med Sci. 2016;4(3):348-52.

268. Che L, Liu P, Yang Z, Hu L, Qin L, Wang R, et al. Maternal high fat intake affects the development and transcriptional profile of fetal intestine in late gestation using pig model. Lipids Health Dis. 2016;15(1):016-0261.

269. Zheng J, Xiao X, Zhang Q, Yu M, Xu J, Qi C, et al. The effects of maternal and post-weaning diet on gut microbiota and glucose metabolism in mice offspring. Biosci Rep. 2016;27.

270. Mansour M, Nassef YE, Shady MA, Aziz AA, Malt HA. Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk Factors in Obese Adolescent. Open Access Maced J Med Sci. 2016;4(1):118-21.

271. Racil G, Coquart JB, Elmontassar W, Haddad M, Goebel R, Chaouachi A, et al. Greater effects of high- compared with moderate-intensity interval training on cardio-metabolic variables, blood leptin concentration and ratings of perceived exertion in obese adolescent females. Biol Sport. 2016;33(2):145-52.

272. Pimentel GD, Lira FS, Rosa JC, Oliveira JL, Losinskas-Hachul AC, Souza GI, et al. Intake of trans fatty acids during gestation and lactation leads to hypothalamic inflammation via TLR4/NFkappaBp65 signaling in adult offspring. J Nutr Biochem. 2012;23(3):265-71.

273. Jorge AS, Andrade JM, Paraiso AF, Jorge GC, Silveira CM, de Souza LR, et al. Body mass index and the visceral adipose tissue expression of IL-6 and TNF-alpha are associated with the morphological severity of non-alcoholic fatty liver disease in individuals with class III obesity. Obes Res Clin Pract. 2016;12(16):30006-0.

274. Zhao J, Zhou G, Li M, Li W, Lu J, Xiong L, et al. A novel non-alcoholic steatohepatitis animal model featured with insulin resistance, hepatic inflammation and fibrosis. Scand J Gastroenterol. 2010;45(11):1360-71.

275. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. J Clin Invest. 1995;95(5):2409-15.

276. Liu S, Wu HJ, Zhang ZQ, Chen Q, Liu B, Wu JP, et al. The ameliorating effect of rosiglitazone on experimental nonalcoholic steatohepatitis is associated with regulating adiponectin receptor expression in rats. Eur J Pharmacol. 2011;650(1):384-9.

277. Marina A, von Frankenberg AD, Suvag S, Callahan HS, Kratz M, Richards TL, et al. Effects of dietary fat and saturated fat content on liver fat and markers of oxidative stress in overweight/obese men and women under weight-stable conditions. Nutrients. 2014;6(11):4678-90.

278. Enos RT, Velazquez KT, Murphy EA. Insight into the impact of dietary saturated fat on tissue-specific cellular processes underlying obesity-related diseases. J Nutr Biochem. 2014;25(6):600-12.

279. Andrade JM, Paraiso AF, de Oliveira MV, Martins AM, Neto JF, Guimaraes AL, et al. Resveratrol attenuates hepatic steatosis in high-fat fed mice by decreasing lipogenesis and inflammation. Nutrition. 2014;30(7-8):915-9.

280. Pedersen BK, Febbraio MA. Point: Interleukin-6 does have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis. J Appl Physiol. 1985;102(2):814-6.

281. Marra F, Gastaldelli A, Svegliati Baroni G, Tell G, Tiribelli C. Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. Trends Mol Med. 2008;14(2):72-81.

282. Chen X, Gong Q, Wang CY, Zhang K, Ji X, Chen YX, et al. High-Fat Diet Induces Distinct Metabolic Response in Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor-alpha Knockout Mice. J Interferon Cytokine Res. 2016;36(10):580-8.

283. Gonzalez-Bulnes A, Astiz S, Ovilo C, Lopez-Bote CJ, Torres-Rovira L, Barbero A, et al. Developmental Origins of Health and Disease in swine: implications for animal production and biomedical research. Theriogenology. 2016;86(1):110-9.

284. Lecoutre S, Deracinois B, Laborie C, Eberle D, Guinez C, Panchenko PE, et al. Depot- and sex-specific effects of maternal obesity in offspring's adipose tissue. J Endocrinol. 2016;27:16-0037.

285. Vaag AA, Grunnet LG, Arora GP, Brons C. The thrifty phenotype hypothesis revisited. Diabetologia. 2012;55(8):2085-8.

286. Farman HH, Windahl SH, Westberg L, Isaksson H, Egecioglu E, Schele E, et al. Female Mice lacking Estrogen Receptor alpha in Hypothalamic Pro-opiomelanocortin (POMC) Neurons Display Enhanced Estrogenic Response on Cortical Bone Mass. Endocrinology. 2016;2.

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Željka Perić Kačarević

Adresa: Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek

Katedra za Anatomiju i neuroznanost

J. Huttlera 4, 31000 Osijek, Hrvatska

tel.: +38531/512-841

mob: 091/5379798

e-mail: zperic@mefos.hr // zperickacarevic@mefos.hr //zeljkapericc@gmail.com

Datum rođenja: 25. rujna 1986.

Obrazovanje:

1993. – 2001. OŠ „Tin Ujević“, Osijek

2001. – 2005. Opća Gimnazija, Osijek

2005. – 2010. Odjel za biologiju, Sveučilište J. J. Strossmayera

2011. – danas: upisan Poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo, Medicinski fakultet u Osijeku

ZAPOSLENJE

2011. – danas: Katedra za Anatomiju i neuroznanost Medicinskog fakulteta Osijek

AKADEMSKI STUPNJEVI, NAPREDOVANJA I FUNKCIJE U SLUŽBI

2011. – znanstveni novak - asistent (Medicinski fakultet Osijek)

ZNANSTVENO I STRUČNO USAVRŠAVANJE

2010.

- zaposlena na projektu *Auditory prepulse inhibition of neuronal activity in the rat cochlear root nucleus* Departamento de Anatomia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho UNESP Botucatu, Sao Paulo, Brazil, 2010

2011.

- *Transgenic research methodology in biomedicine and biotechnology*, Medicinski fakultet Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, 15. travnja 2011.
- IPA INFO 2009 Civil Society Conference *Prilike za financiranje poduzetničkih projekata iz fondova EU*, Regional Development Agency of Slavonija and Baranja, Osijek, 16. rujna 2011.
- Applied Biosystems, Biotechnology and real time PCR, 7. – 9. studenog 2011., Osijek, Hrvatska

2012.

- Pedagoško-psihološko-didaktičko-metodička izobrazba, Učiteljski Fakultet u Osijeku, od veljače do srpnja 2012.
- RECOOP Bridges in Life Sciences 7th Annual Conference, Regional Cooperation for Health, Science and Technology (RECOOP HST) Consortium, Budapest, Hungary, 30. 3. – 1. 4. 2012.
- Poslijediplomski tečaj trajnog usavršavanja liječnika *Multipla skleroza jučer, danas, sutra,* Medicinski fakultet Osijek, 6. – 7. srpnja 2012.
- Poslijediplomski tečaj trajnog usavršavanja liječnika *Parkinsonova bolest i bolest pokreta*, Medicinski fakultet Osijek, 9. – 10. studenog 2012.
- 10. – 14. prosinca 2012. *Laboratory immunetechniques in molecular biology research*, poslijediplomski tečaj, IPA projekt prekogranične suradnje Mađarska-Hrvatska *Health Impulse*, Pečuh, Mađarska

2013.

- 4th Croatian Congress on Neurorehabilitation and Restoration Neurology with International Participation, Croatian Association for Neurorehabilitation and Restoration Neurology, Osijek, 7. – 10. travnja 2013.

2014.

- završen tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama i životinjama za proizvodnju bioloških pripravaka (kategorija C), Veterinarski Fakultet Zagreb, 23. veljače 2014.

Strani jezici: engleski jezik – aktivno

Aktivnost u znanstvenim projektima:

- Biomehanika čvrstih organskih tkiva, broj projekta: 219-2192376-2092, Ministarstvo znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske, voditelj projekta Vasilije Nikolić
- Uloga koštanog morfogenetskog proteina - 9 u akutnom i kroničnom oštećenju jetre broj projekta: 13.06.2.2.63. voditelj projekta doc. dr. sc. Olga Cvijanović, dr. med.

ZNANSTVENA I STRUČNA DJELATNOST

OBJAVLJENI ZNANSTVENI I STRUČNI RADOVI

a) Radovi koji se indeksiraju u Current Contents:

1. Perić Kačarević, Željka; Šnajder, Darija; Marić Anđela; Bijelić, Nikola; Cvijanović, Olga; Domitrović, Robert; Radić, Radivoje „High-Fat Diet Induced Changes in Lumbar Vertebra of the Male Rat Offsprings“ // Elsevier, Acta Histochemica (2016)

2. Marić, Anđela; Perić Kačarević, Željka; Čekić, Nenad; Šerić, Vatroslav; Radić, Radivoje „Effects of between generations changes in nutrition type on vaginal smear and serum lipids in Sprague–Dawley rats“ // The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine. (2015)

3. Stevanović Siniša, Radić Radivoje, Kačarević Perić Željka, Bedeković Vesna, Aras Ivana, Baudoin Tomislav, Šoš Dario, Vrselja Zvonimir, Ivkić Mirko „Proton pump (H+/K+-ATPase) expression in human larynx.“ Auris Nasus Larynx. (2015)

b) Radovi objavljeni u časopisima koji se indeksiraju u drugim međunarodnim indeksnim publikacijama:

1. Bijelić, Nikola; Perić Kačarević, Željka; Belovari, Tatjana; Radić, Radivoje; Trefoil factor family protein 3 affects cancellous bone formation in the secondary centers of ossification of mouse tibiae. // Periodicum biologorum. 117 (2015) , 1; 59-64

2. Marić, Anđela; Perić Kačarević, Željka; Selthofer, Robert; Changes in nutrition type between generations influence on bone structural changes in rat female offspring. // Periodicum biologorum. 118 (2015),

c) Sažeci kongresnih priopćenja objavljenih u časopisima koji se indeksiraju u CC-u:

1. Marić, Anđela; Perić Kačarević, Željka; Vrselja, Zvonimir; Radić, Radivoje. Changes in nutrition type between generations influence on bone structural changes in female offspring // Obesity Facts / Johannes Hebebrand (ur.).Ettlingen, Germany: Karger, 2015. 195-195 (poster,međunarodna recenzija,sažetak).

2. Perić Kačarević, Željka; Šnajder, Darija; Marić, Anđela; Bijelić, Nikola; Radić, Radivoje; Setlhofer, Robert. Structural changes on bone a in male rat offspring depending on maternal diet // Obesity Facts /Johannes Hebebrand (ur.).Ettlingen, Germany Karger, 2015. 195-195 (poster,međunarodna recenzija,sažetak).

3. Marić, Anđela; Kačarević Perić, Željka; Vrselja, Zvonimir; Perković, Romana; Radić, Radivoje.Impact of mothers nutrition and nutrition of offspring on glucose levels in male offspring // Obesity Facts / Johannes Hebebrand (ur.). Ettlingen, Germany: Karger, 2014. 148-148 (poster,međunarodna recenzija,sažetak).

4. Perić Kačarević, Željka; Marić, Anđela; Vrselja, Zvonimir; Čekić, Nenad; Radić, Radivoje. Impact of mothers nutrition and nutrition of offspring on spontaneous physical activity in male offspring // Obesity Facts / Johannes Hebebrand (ur.). Ettlingen, Germany: Karger, 2014. 118-118 (poster,međunarodna recenzija,sažetak).

5. Vrselja, Zvonimir; Ćurić, Goran; Perić Kačarević, Željka; Marić, Anđela; Radić, Radivoje. Non-Linearity between anthropometric measures, subcutaneous adipose tissue thickness and thickness of epicardial adipose tissues // Obesity Facts / Johannes Hebebrand (ur.).Ettlingen, Germany: Karger, 2014. 106-106 (poster,međunarodna recenzija,sažetak).

6. Marić, Anđela; Perić Kačarević, Željka: Vrselja, Zvonimir; Radić, Radivoje.Impact of mother's nutrition during pregnancy and lactation, and nutrition of offspring on the development of PCOS in Sprague Dawley rats // Obesity Facts / Johannes Hebebrand (ur.).Ettlingen, Germany: Karger, 2013. 91-91

7. Perić Kačarević, Željka; Marić, Anđela; Vrselja, Zvonimir; Radić, Radivoje.Association of diet type with ADIPOR2 expression in hepatic tissue of second generation of rats // Obesity Facts / Johannes Hebebrand (ur.).Ettlingen, Germany: Karger, 2013. 88-88

8. Vrselja, Zvonimir; Marić, Anđela; Perić Kačarević, Željka; Radić, Radivoje.Epicardial adipose tissue thickness as predictor for adiponectin systemic blood concentration // Obesity Facts / Johannes Hebebrand (ur.).Ettlingen, Germany: Karger, 2013. 78-78

9. Šram, Miroslav; Lekšan, Igor; Vrselja, Zvonimir; Selthofer-Relatić, Kristina; Perić Kačarević, Željka; Radić, Radivoje.Transcardiac gradients of IL6, TNF and adiponectin in CAD patients // Obesity Facts.2012.

d) Ostala kongresna priopćenja:

1. Perić Kačarević, Željka, Vrselja, Zvonimir; Marić, Anđela; Radić, Radivoje.Association of diet type with ADIPO R2 expression in hepatic tissue of second generation of rats // Biopolymers & Cell / Anna V. El' Skaya (ur.).Kijev, Ukrajina : Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine, 2013. 71-71 (poster,međunarodna recenzija,sažetak).

2. Radić, Radivoje; Perić Kačarević, Željka; Marić, Anđela; Vrselja, Zvonimir.Impact of mothers' nutrition, gend er and nutrition of offspring on motoric characteristics in Sprague Dawley rats // Biopolymers & Cell / Anna V. El' Skaya (ur.).Kijev, Ukrajina : Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine, 2013. 68-68 (poster,međunarodna recenzija,sažetak).

3. Vrselja, Zvonimir; Marić, Anđela; Perić Kačarević, Željka; Radić, Radivoje.Epicardial adipose tissue thickne ss as predictor for adiponectin systemic blood concentration // Biopolymers & Cell / Anna V. El' Skaya (ur.).Kijev, Ukrajina : Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine, 2013. 57-57 (poster,međunarodna recenzija,sažetak).

4. Nešković, Nenad; Perić Kačarević, Željka; Radić, Radivoje.Peripheral expression of adipocytokines and role of sympathetic nervous system in function of perivascular adipose tissue and vascular reactivity // Biopolymers & Cell / Anna V. El' Skaya (ur.).Kijev, Ukrajina : Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine, 2012. 91-91 (poster,međunarodna recenzija,sažetak).

5. Šnajder, Darija; Nešković, Nenad; Perić Kačarević, Željka; Radić, Radivoje.Impact of high-fat diet on fe rtility in Sprague Dawley rats // Biopolymers & Cell / Anna V. El' Skaya (ur.).Kijev, Ukrajina : Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine, 2012. 96-96 (poster,međunarodna recenzija,sažetak).

OSTALA ZNANSTVENA DJELATNOST

Rad na popularizaciji znanosti

Aktivno sudjelovanje na Tjednu mozga 2005., 2006., 2011. i 2014. godine (radionice)

Aktivno sudjelovanje na Festivalu znanosti 2005., 2012. i 2016. godine (radionice i posteri).

STRUČNA DJELATNOST

Nastavna djelatnost

Dodiplomska nastava:

2011. – danas: sudjelovanje u nastavi iz predmeta Anatomija i histologija čovjeka na Odjelu za biologiju, Sveučilišni preddiplomski studij

2012. – danas: sudjelovanje u nastavi iz predmeta Anatomija, Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike, Medicinski Fakultet Osijek

2012. – danas: sudjelovanje u nastavi iz predmeta Anatomija, Sveučilišni preddiplomski studij Sestrinstvo, Medicinski Fakultet Osijek

2014. – danas: sudjelovanje u nastavi iz predmeta Anatomija i histologija, Veleučilište Lavoslav Ružička u Vukovaru; Studij fizioterapije

2016. – danas: sudjelovanje u nastavi iz predmeta Anatomija glave i vrata, Sveučilišni preddiplomski studij Dentalne higijene, Medicinski Fakultet Osijek

Diplomska nastava:

2016. – danas: sudjelovanje u nastavi iz predmeta Kako napraviti poster i održati usmenu prezentaciju na znanstvenom skupu, Sveučilišni diplomski studij Sestrinstvo, Medicinski Fakultet Osijek

Poslijediplomska nastava:

2013. – danas: sudjelovanje u nastavi iz predmeta Kako napraviti poster i održati usmenu prezentaciju na znanstvenom skupu, Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo, Medicinski Fakultet Osijek