

# Utjecaj sastava i udjela masnih kiselina na odlaganje lipida i regulaciju otpuštanja glukoze iz jetre u štakora na visokomasnoj prehrani

---

**Marolt Banek, Iva**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Dental Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:127:485912>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial 3.0 Unported / Imenovanje-Nekomercijalno 3.0](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-28**



*Repository / Repozitorij:*

[University of Zagreb School of Dental Medicine Repository](#)





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Iva Marolt Banek

**UTJECAJ SASTAVA I UDJELA MASNIH  
KISELINA NA ODLAGANJE LIPIDA I  
REGULACIJU OTPUŠTANJA GLUKOZE IZ  
JETRE U ŠTAKORA NA VISOKOMASNOJ  
PREHRANI**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Iva Marolt Banek

**UTJECAJ SASTAVA I UDJELA MASNIH  
KISELINA NA ODLAGANJE LIPIDA I  
REGULACIJU OTPUŠTANJA GLUKOZE IZ  
JETRE U ŠTAKORA NA VISOKOMASNOJ  
PREHRANI**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Prof. dr. sc. Jagoda Roša

Prof. dr. sc. Davor Ježek

Zagreb, 2018.



ZAGREB UNIVERSITY  
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Iva Marolt Banek

**INFLUENCE OF DIETARY FATTY ACID  
COMPOSITION AND LEVEL ON LIVER  
ADIPOSIITY AND GLUCOSE PRODUCTION**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Prof. dr. sc. Jagoda Roša

Prof. dr. sc. Davor Ježek

Zagreb, 2018.

Rad je izrađen na Katedri za fiziologiju Stomatološkoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Mentorica: prof. dr. sc. Jagoda Roša , dr. med., redovita profesorica i pročelnica Katedre za fiziologiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Komentor: prof. dr. sc Davor Ježek, dr. med., redoviti profesor na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Lektor hrvatskoga jezika: Zlatko Čičak, profesor kroatologije

Lektor engleskog jezika: Ivan Sertić, profesor engleskog jezika i književnosti

Sastav povjerenstva za obranu doktorskog rada:

1. Prof.dr.sc. Hrvoje Banfić - predsjednik
2. Prof.dr.sc. Gordana Jurić Lekić - član
3. Prof.dr.sc. Floriana Bulić Jakuš – član
4. Prof.dr.sc. Jasna Lovrić – član
5. Doc.dr.sc. Tomislav Kelava - član
6. Prof.dr.sc. Zrinka Tarle - zamjena.

Datum obrane rada: 20. srpnja 2018.

## SAŽETAK

### UTJECAJ SASTAVA I UDJELA MASNIH KISELINA NA ODLAGANJE LIPIDA I REGULACIJU OTPUŠTANJA GLUKOZE IZ JETRE U ŠTAKORA NA VISOKOMASNOJ PREHRANI

Nealkoholna bolest jetre (NAFLD) je najčešća bolest jetre. Sastav masnih kiselina može doprinijeti akumulaciji masnoća, a neke masne kiseline mogu imati blagotvoran utjecaj na NAFLD. Oksidacijski stres i otpornost na inzulin u jetri glavni su čimbenici u razvoju jetrene steatoze i progresije na NASH (bezalkoholni steatohepatitis). MUFA (mononezasićena masna kiselina) iz prehrane stvara čestice lipoproteina otporne na oksidativnu modifikaciju, a PUFA (polinezasićena masna kiselina) značajno povećava peroksidaciju lipida. Za procjenu utjecaja različitih nezasićenih masnih kiselina u razvoju NAFLD-a u našem eksperimentu korišteno je maslinovo ulje bogato MUFA-om, suncokretovo ulje s visokim udjelom PUFA i bučino ulje s umjerenom količinom obje vrste ulja. Nedavne studije o sjemenkama i ulju buče pokazale su hepatoprotektivni učinak. Štakori Wistar, muški, dva mjeseca stari, podijeljeni su u četiri skupine. Štakori su bili 21 dan na standardnoj prehrani (SD) ili visokomasnoj dijeti (HFD). HFD pripremljene su miješanjem 30 % suncokretova ulja (MDS skupina) ili 30 % maslinova ulja (MDM) ili 30 % bundevina ulja u standardnu prehranu (MDB). Nakon eksperimentalnog razdoblja životinje su anestetizirane i žrtvovane. Određivana je masa, masa jetre, količina konzumirane hrane i lipidi u plazmi te je rađena histološka analiza jetre. Dodatno, životinje SD i MDB korištene su za pokuse *in vitro*. Nije bilo statistički značajnih razlika u tjelesnoj masi, masi jetre i lipidnom statusu između skupina. Unos hrane u gramima značajno se razlikovao između životinja SD i HFD, ali u kJ razlike nije bilo. Histološki, u MDS-u steatoza je bila teška, u MDB-u umjerena, a u MDM-u blaga. U ranijim istraživanjima, naš laboratorij je prikazao neosjetljivost hepatocita na inzulin kod štakora hranjenih HFD-om sa suncokretovim uljem. U hepatocitima od štakora na HFD-u s maslinovim uljem, inzulin je značajno smanjio proizvodnju glukoze u usporedbi s kontrolnom skupinom. Bučino ulje nije promijenilo inzulinsku osjetljivost hepatocita. Omjer PUFA/MUFA u prehrani utjecao je na razinu nakupljanja lipida u hepatocitima.

**Ključne riječi:** visokomasna prehrana, NAFLD, MUFA, PUFA, inzulinska osjetljivost, otpuštanje glukoze, lipidi u plazmi.

## **SUMMARY**

### **INFLUENCE OF DIETARY FATTY ACID COMPOSITION AND LEVEL ON LIVER ADIPOSITY AND GLUCOSE PRODUCTION**

#### **Introduction**

The liver is the central metabolic organ for the processing and storage of nutrients and glycemic homeostasis and has a central role in the development of metabolic syndrome. Metabolic syndrome consists of a cluster of risk factors that greatly increase a probability of developing the atherosclerotic cardiovascular disease and type two diabetes mellitus (DM2). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is not included in defining criteria for metabolic syndrome, but it is considered the hepatic manifestation of the syndrome. NAFLD consists of an array of conditions from simple benign steatosis to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. It is the main cause of dyslipidemia and is closely related to insulin resistance. The prevalence of NAFLD in the western world is about 30 %, and in the population, with DM2 the prevalence of fatty liver is up to 70 %. Chemical modification of biological molecules can be directly poisonous to liver cells or can stimulate the response of the host that is translated into inflammation, collagen production and progression of NAFLD. A composition of fatty acids can contribute to fat accumulation, and some fatty acids may have a beneficial influence on NAFLD. Vegetable oils with high content of unsaturated fatty acids were considered as “healthier” lipids because of their beneficial effects on metabolic syndrome. Polyunsaturated fatty acids from  $\omega$ -6 (n-6) and  $\omega$ -3 (n-series are precursors to potent lipid mediator signaling molecules, termed "eicosanoids", which have important roles in the regulation of inflammation. The main fatty acid in sunflower oil is linoleic acid (C18:2, n-6). Linoleic acid is not synthesized by the body and is, therefore, an essential fatty acid. In the olive oil, the prevalent fatty acid is monounsaturated oleic acid (C18:1, n-9). MUFA fatty acids have a strong positive effect on cardiovascular health. However, only olive oil and its main component, oleic acid, seem to be associated with this effect. Oxidative stress and insulin resistance in the liver are interdependent and are major factors in the development of liver steatosis and its progression to NASH (Non-alcoholic steatohepatitis) and cirrhosis. MUFA from diets generates lipoprotein particles that are resistant to oxidative modification. Diet rich in PUFA increases lipid peroxidation significantly and may raise the susceptibility of tissues to injury. The Mediterranean diet, although having a very high energy intake from fat (30-40 %), is considered to have a

beneficial effect on health, by protecting the vascular system and reducing the factors that affect the occurrence of metabolic syndrome. To evaluate the influence of different unsaturated fatty acids in the development of NAFLD in our experiment used three types of unsaturated fatty acids sources, olive oil rich in MUFA, sunflower oil with high content of polyunsaturated fatty acids (PUFA) and pumpkin seed oil with the moderate amount of both oils. In recent years pumpkin seed oil gained attention as "healthy " oil and even sold as a supplement. In our region of central Europe, pumpkin seed oil is traditional oil for consumption along with olive and sunflower oil. Recent studies on pumpkin seed and pumpkin seed oil have shown promising results on glycaemia and dyslipidemia and even showed hepatoprotective effect. To our knowledge, there was no study on the impact of high-fat diet (HFD) with pumpkin seed oil on liver or plasma lipid profile on healthy laboratory animals. We used an animal model which is the closest to the pathogenesis of NAFLD in humans.

### **Animals and methods**

The experiments were carried out according to the guidelines on the use of animals for biomedical research (Croatian Animal Welfare Regulation Acts NN135/06; NN 37/13; NN55/13) and were approved by Ethical committees of Zagreb University School of Dental Medicine and School of Medicine. We used animals from the University of Zagreb, School of Medicine.

24 male Wistar rats, two months old, weighing  $265 \pm 27$  g, were randomly divided into four groups. Rats were housed individually, to monitor individual feed consumption, at constant room temperature of  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , with 12-h light-dark cycle, and ad libitum access to diet and water. Diet consumption and body mass were monitored daily by the same trained handler at the end of the light cycle. The rats were 21 days on the standard diet (diet #4RF21-GLP certificate, Mucedola, Milan, Italy) as Control Diet group (SD). According to certificate standard food energy density was 11.17 kJ per gram and composition was carbohydrate 53.5 %, fat 3 %, and protein 18.5 %. The high-fat diets (HFD) were prepared by mixing 30 % sunflower oil to the standard diet (MDS group) or 30 % olive oil (MDM) or 30 % of pumpkin seed oil to the standard diet (MDB). Edible oils were from the same manufacturer (Zvijezda, Zagreb, Croatia). After three weeks of the experimental period, animals were anesthetized by an intraperitoneal administration of sodium thiopental and sacrificed by bleeding from v. cava inferior. Three mL of venous blood from v. cava inferior was collected in EDTA test tubes to determine lipid profile. The concentrations of



triacylglycerol (TG), total cholesterol (Total-CH), and HDL- cholesterol (HDL) were measured enzymatically using commercial kits. LDL-cholesterol (LDL) was calculated using formula by Friedewald and Non-HDL-cholesterol was used as suggested by Sánchez-Muniz and Bastida. The liver was washed with saline, dried with filter paper and weighed, and then cut into small sections for histological procedures. Immediately after cutting the liver, samples were put in the Carnoy fixative and after an appropriate time the samples were set in paraffin blocks, cut and stained with hematoxylin and eosin stain (HE) and Masson's trichrome stain. We used Kleiner's grading system of NAFLD modified for rodents as proposed by Liang. Steatosis was expressed as the percentage of the hepatocytes with fatty infiltration in random slides, in twelve fields at 200 x magnification per group, against 25 x 33 grid.

Primary hepatocytes cultures were obtained from SD and MDB animals via modified collagenase perfusion technique via cannulation of vena Porte. After suspending cells in the medium, trypan blue viability test was performed, and cells were counted and suspended in the concentration of one million per liter. Three ml of suspension was put in a petri dish and incubated for four hours. After four hours, the medium was replaced, and culture put in incubation for further 20 hours. After 24 hours in incubation, incubation medium was removed, cultures were washed three times with Hanks Hepes medium and incubated with glucose free Hanks Hepes with addition of 10 mmol/l pyruvate and without added hormones or with insulin (80 nmol/l), or glucagon (200 nmol/l) or both hormones. Samples were taken every hour over three-hour period. Glucose production and protein content of dish were determined enzymatically. Results were expressed as nmol of glucose per mg of protein

Results are shown as mean  $\pm$  SD unless stated otherwise and values of  $p \leq 0.05$  were considered statistically significant. Statistical analyses were performed by Student's t-test or ANOVA one-way analysis of variance followed by the Tukey HSD test.

## **Results**

Body mass gain was stable in all groups through 21 days of the experimental period. There were no statistically significant differences in the final body mass and body mass gain between the HFD groups at in comparison to SD group. Liver mass and liver/body mass ratio didn't differ significantly between groups. Daily diet intake differed significantly between animals on standard diets and those on HFD diets but no differences between HFD groups were found. However, daily and total energy intake was similar for control and high-fat diet groups. Macroscopically, there was an accumulation of visceral fat which was prominent in MDS and MDB groups while in MDM group fat accumulation was mild. Livers from HFD groups were slightly yellowish in comparison to a rich dark color of SD liver. There was no difference in plasma lipid status between control and high-fat diet groups.

Histological examination of livers slides from SD groups and HFD groups of animals revealed that NAFLD developed in livers from HFD rats without evidence for nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Livers from SD group showed normal histological acinar organization without fat infiltration in hepatocytes. Livers from MDM group developed mild microvesicular hepatic steatosis, with infiltration predominantly in the periportal zone (grade 1). In MDS group the microvesicular steatosis was severe and observed predominantly in zones one and two and reaching zone three (grade 3) with some mild hepatocyte hypertrophy. In MDB group microvesicular steatosis was moderate and in zones one and two (grade 2). No evidence of inflammation or progression to NASH was observed in SD or HFD groups. Trichrome staining showed no periportal or perisinusoidal fibrosis in SD or HFD groups. There was no differences in basal and glucagone stimulated glucose production and insulin sensitivity in hepacotites obtained from animals on high fat diet with pumpkin seed oil and from animals on standard diet.

## **Discussion**

In the previous studies, our laboratory demonstrated hepatic insulin resistance in rats fed HFD with sunflower oil and raw sunflower seeds. In hepatocytes from rats fed the HFD with dietary intake of olive oil, insulin significantly and strongly decreased glucose production compared to control group. In a murine model olive oil and pumpkin seed oil had a positive effect on serum

lipid concentrations. That effect was greater in the group receiving olive oil. A daily dose of 0.2 mL of olive or pumpkin seed oil per animal lowered LDL cholesterol and TG levels. HDL levels in groups receiving oils were higher in comparison to control indicating a protective role of olive oil and pumpkin seed oil on cardiovascular health. We didn't find that effect of olive oil and pumpkin seed oil in our study, but that may be due to a very high intake of fats in our high-fat diets groups. In a study on rats, MUFA from olive oil decrease lipid content in NASH caused by methionine choline-deficient diet, while PUFA from fish oil showed no protective effect on fat accumulation in the liver. Olive oil, in the high-fat diet, manages to prevent excessive fat accumulation in the liver as seen in sunflower oil group. Hepatocytes from MDB group showed preserved glucagon and insulin sensitivity, and in contrast to olive oil, which showed increased insulin sensitivity, had a mild effect on preventing lipid accumulation.

## **Conclusion**

In conclusion, high-fat diet, without increased caloric intake, weight gain, or lipid abnormality, plays a role in the pathogenesis of the nonalcoholic fatty liver disease. The study findings suggested the association between the amount of lipid accumulation in hepatocytes and the composition and ratio of fatty acids in the diet. The ratio and composition of fatty acids found in sunflower oil showed the highest risk factor that led to severe lipid accumulation in the liver cells. There is no expected evidence of beneficial effects of the pumpkin seed oil. The free fatty acid composition and ratio in the pumpkin seed oil led to moderate liver steatosis. By contrast, olive oil was the most favorable and led to a mild accumulation of lipids in hepatocytes, indicating that the ratio and composition of fatty acids in olive oil may delay or prevent the development of NAFLD.

**Keywords:** High-fat diet, NAFLD, MUFA, PUFA, insulin sensitivity, glucose production, plasma lipids.

## POPIS KRATICA

ALD – Alkoholna bolest jetre (engl. *Alcoholic Liver Disease*)

ALT – Alanin-aminotransferaza

DM2 – Dijabetes melitus tipa II

EDTA – Etilendiamintetraoctena kiselina

HDL – Lipoproteini velike gustoće (engl. *High Density Lipoproteins*)

HE – Hemitoksilin-eozin boja

HFD – Visokomasna dijeta (engl. *High Fat Diet*)

ITM – Indeks tjelesne mase

LDL – Lipoproteini male gustoće (engl. *Low Density Lipoproteins*)

MUFA – Mononezasićena masna kiselina (engl. *Monounsaturated Fatty Acid*)

NAFLD – Nealkoholna bolest jetre (engl. *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*)

NASH – Nealkoholni steatohepatitis (engl. *Non-Alcoholic Steatohepatitis*)

PUFA – Polinezasićena masna kiselina (engl. *Poliunsaturated Fatty Acid*)

SFA – Zasićena masna kiselina (engl. *Saturated Fatty Acid*)

VLDL – Lipoproteini vrlo male gustoće (engl. *Very Low Density Lipoproteins*)

WHO – Svjetska Zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*)

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Jetra kao organ.....	2
1.1.1. Građa jetre.....	2
1.1.1.1. Makroskopska građa.....	2
1.1.1.2. Histološka građa.....	2
1.1.1.3. Krvotok jetre.....	3
1.1.2. Metaboličke funkcije jetara.....	3
1.1.2.1. Metabolizam masti.....	4
1.1.2.2. Metabolizam bjelančevina.....	5
1.1.2.3. Metabolizam ugljikohidrata.....	6
1.2. Masna promjena jetre.....	7
1.2.1. Epidemiologija masne promjene jetre.....	10
1.2.2. Dijagnostički kriterij.....	10
1.2.3. Patohistološka analiza.....	11
1.2.4. Patogeneza NAFLD-a.....	13
1.2.5. Čimbenici rizika.....	14
1.2.5.1. Stres.....	14
1.2.5.2. Pretilost.....	15
1.2.5.3. Inzulinska rezistencija.....	15
1.2.5.4. Dislipidemija.....	16
1.2.5.5. Prehrana kao čimbenik rizika.....	17
<b>2. CILJ I SVRHA RADA .....</b>	<b>21</b>
2.1. CILJ .....	22

2.2. HIPOTEZA.....	22
<b>3. ŽIVOTINJE I METODE .....</b>	<b>23</b>
3.1. Materijali .....	24
3.2. Životinje.....	24
3.2.1. Etička dozvola .....	24
3.2.2. Životinje i smještaj .....	25
3.3. Metode .....	26
3.3.1. Pokusi <i>in vivo</i> .....	26
3.3.1.1. Priprema dijete .....	26
3.3.1.2. Uzimanje uzoraka za biokemijsku i histološku analizu .....	28
3.3.1.2.1. Anestezija .....	28
3.3.1.2.2. Uzimanje uzoraka krvi .....	28
3.3.1.2.3. Uzimanje uzoraka za histološku analizu .....	28
3.3.1.3. Određivanje lipida u plazmi .....	28
3.3.1.4. Histološki postupci.....	29
3.3.1.4.1. Priprema i bojanje preparata.....	29
3.3.1.4.2. Određivanje stupnja steatoze.....	29
3.3.1.4.3. Utvrđivanje upalnih promjena i hipertrofije.....	31
3.3.1.4.4. Utvrđivanje fibrotičnih promjena .....	32
3.3.2. Pokusi <i>in vitro</i> u primarnoj kulturi hepatocita .....	32
3.3.2.1. Priprema životinja .....	32
3.3.2.2. Perfuzija jetre .....	32
3.3.2.3. Nasađivanje hepatocita .....	34
3.3.2.4. Pokus otpuštanja glukoze iz hepatocita .....	35
3.3.2.5. Parametri .....	36

<b>3.4. Statistička analiza.....</b>	<b>36</b>
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>37</b>
4.1. Pokusi <i>in vivo</i> .....	38
4.1.1. Unos hrane.....	38
4.1.2. Dobivanje na masi.....	40
4.1.3. Masa jetre i makroskopski izgled jetre.....	43
4.1.4. Lipidni profil plazme.....	46
4.1.5. Histološka analiza i usporedba.....	47
4.1.5.1. Histološka analiza kontrolne skupine .....	48
4.1.5.2. Histološka analiza skupine tretirane maslinovim uljem .....	50
4.1.5.3. Histološka analiza skupine tretirane suncokretovim uljem.....	53
4.1.5.4. Histološka analiza skupine tretirane bučnim uljem .....	56
4.2. Pokusi <i>in vitro</i> – ispitivanje inzulinske osjetljivosti u primarnoj kulturi jetrenih stanica.....	60
4.2.1. Bazalno otpuštanje glukoze.....	60
4.2.1. Utjecaj inzulina .....	61
4.2.2. Utjecaj glukagona.....	63
4.2.3. Utjecaj inzulina i glukagona.....	64
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>67</b>
5.1. Utjecaj visokomasne prehrane na unos hrane.....	68
5.2. Utjecaj visokomasne prehrane na dobivanje na masi .....	69
5.3. Utjecaj visokomasne prehrane na masu jetre i makroskopski izgled jetre .....	70
5.4. Utjecaj visokomasne prehrane na lipidni status.....	70
5.5. Utjecaj visokomasne prehrane na histološku sliku jetre.....	71
5.6. Utjecaj visokomasne prehrane na otpuštanje glukoze i jetrenu osjetljivost na inzulin ...	72
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>73</b>

<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>76</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>89</b>



# 1. UVOD

---

## 1.1. Jetra kao organ

### 1.1.1. Građa jetre

#### 1.1.1.1. Makroskopska građa

Jetra su drugi najveći organ u tijelu čineći oko 2 - 5 % ukupne tjelesne mase u prosječna odrasla čovjeka<sup>1</sup>. Smještena je najvećim dijelom ispod desne kupole ošita, a njezin se donji rub poklapa s desnim rebrenim lukom. Makroskopski na jetri razlikujemo dvije površine. Konveksnu površinu okrenutu prema ošitu (*facies diaphragmatica*) koja je podijeljena podvostručenjem potrbušnice (*ligamentum falciforme*) na desni (*lobus hepatis dexter*) i lijevi režanj (*lobus hepatis sinister*), te površinu okrenutu prema unutrašnjosti (*facies visceralis*) koja je podijeljena brazdama i gdje se nalaze vrata jetre (*porta hepatis*). Lijeva sagitalna brazda dijeli lijevi od desnog režnja, a desnom sagitalnom brazdom odjeljuju se od desnog režnja kvadratni (*lobus quadratus*) i kaudatni režanj (*lobus caudatus*)<sup>2, 3, 4</sup>.

Funkcionalno i po grananju intrahepatičkih žila i vodova jetra se dijele na jetrene segmente. Oni su varijabilni i njihove granice ne odgovaraju točno granicama režnjeva i temeljno ih možemo podijeliti na desni sabirni put (*pars hepatic dextra*) i lijevi sabirni put (*pars hepatic sinistra*) koji se nadalje dijeli na medijalni i lateralni dio<sup>2</sup>.

#### 1.1.1.2. Histološka građa

Vezivno tkivo, hepatociti, žučni kanalići i krvne žile tvore građevne jedinice jetre, jetrene režnjiće (*lobuli hepatis*) koji su ujedno i temeljna funkcionalna jedinica jetre<sup>3</sup>. U središtu režnjića nalazi se centralna vena (*v. centralis*) iz koje krv utječe u jetrene vene, a iz njih u donju šuplju venu. Režnjić je sastavljen od grečica hepatocita koje se radijalno šire od centralne vene. Između susjednih stanica leže mali žučni kanalići koji se uljevaju u žučni kanal (*ductus interlobularis*) koji se nalazi u vezivnoj pregradi koji razdvajaju dva režnjića i zajedno s granom vene vratarice

(*v. interlobularis*) i jednom granom arterije *a. hepatica propria* (*a. interlobularis*) čini Glissonov trijas. Između gredica nalaze se sinusoidne kapilare. U njih se ulijevaju grane *a. hepatica propria* i grane *v. portae* i te tako sinusoidne kapilare primaju krv bogatu kisikom i bogatu hranjivim tvarima koja nakon izmjene tvari s hepatocitima putem *v. centralis* odlazi u *vv. hepaticae*. Osim hepatocita, sinuse oblažu endotelne stanice, a između stijenke sinusa i hepatocita nalazi se perisinusoidalni prostor (Disseov prostor) koji sadrži Itove stanice. Endotel sinusa je fenestriran s velikim porama te sadržava Kupfferove stanice. Disseovi prostori spojeni su limfnim žilama u pregradama između režnjica<sup>2</sup>.

### 1.1.1.3. Krvotok jetre

Iako jetra čini samo oko 2,5 % ukupne mase u tijelu, u jetrene sinuse svake minute utječe oko 1050 ml krvi iz portalne vene i 300 ml iz jetrene arterije što je ukupno oko 27 % srčanoga minutnog volumena<sup>3</sup>. Jetra ima dva aferentna krvna sistema (portalnu venu i hepatičku arteriju) i jedan eferentni krvotok (hepatičke vene). *V. portae* preko tri korijena prima krv iz neparnih trbušnih organa (*v. mesenterica inferior*, *v. mesenterica superior* i *v. splenica*) te izravno iz okolnih manjih vena (*v. cystica*, *vv. gastrica dextra et sinistra*, *v. prepylorica*, *vv. paraumbilicalia*). *V. portae* u jetru ulazi sa stražnje strane (*facies visceralis*) kroz vrata jetre gdje se grana u *ramus dexter* i *ramus sinister* koje se granaju sve do *vv. interlobulares*. Krv koja dolazi preko vene porte u jetru donosi apsorbirane nutritivne ali i toksičke tvari. Iz *v. portae* krv se ulijeva u sinusoidne prostore preko *v. interlobularis* gdje ima izravan dodir s hepatocitima i s Kupfferovim stanicama koji fagocitiraju bakterije i ostale strane tvari iz krvi jetrenih sinusa. Arterijsku krv jetra prima iz *a. hepatica propriae* koja se grana na lijevu i desnu granu. Oksigenirana krv ulazi u sinusoidne prostore preko *aa. intralobulares*, grana *a. hepatica propria*. Venska krv iz sinusoidnih prostora skuplja *v. centralis* i preko *vv. hepatica* otječe u donju šuplju venu<sup>2,3</sup>.

### 1.1.2. Metaboličke funkcije jetara

Jetra ima brojne metaboličke funkcije. Uz metabolizam hranjivih tvari jetra su mjesto za pohranjivanje vitamina, željeza te imaju ulogu metaboliziranja i uklanjanja lijekova, toksina, hormona i drugih tvari te sintetiziranju fibrinogena, protrombina, faktora VII i nekoliko drugih čimbenika koagulacijskog procesa<sup>3</sup>.

### **1.1.2.1. Metabolizam masti**

U jetrima se odvija oksidacija masnih kiselina i stvaranje energije za druge funkcije u tijelu, sinteza velikih količina kolesterola, fosfolipida i većine lipoproteina i odvija se gotovo cjelokupna sinteza masti iz ugljikohidrata i bjelančevina.

Masti se apsorbiraju iz crijeva u crijevnu limfu kao hilomikroni. Osnovni građu hilomikrona čine trigliceridi, a sadrže i fosfolipide, kolesterol i apoprotein B. Hilomikroni se zatim prenose torakalnim vodom i izljevaju u krv kod spoja jugularne i potključne vene. Najveći dio hilomikrona uklanja se iz krvotoka dok prolaze kroz kapilare različitih tkiva. Masno tkivo, skeletni mišići i srce imaju enzim lipoprotein-lipazu koji hidrolizira hilomikrone na masne kiseline i glicerol čim dođu u doticaj s endotelnom stijenkom. Masne kiseline brzo difundiraju u stanice masnog tkiva i mišića gdje se mogu iskoristiti za energiju ili ponovno ugraditi u trigliceride. Da bi se dobila energija iz masti, masti se razgrađuju na glicerol i masne kiseline. Masne kiseline se  $\beta$ -oksidacijom razgrade na acetilne radikale od kojih nastaje acetil-koenzim koji može u ciklusu limunske kiseline oksidacijom dati veliku količinu energije.  $\beta$ -oksidacija se brzo odvija u jetri, ali jetra ne mogu iskoristiti sav acetil-koenzim A koje stvore, već ga kondenziraju u acetoctenu kiselinu koja se iz jetre prenosi i apsorbira po cijelom tijelu. Tkiva ponovno pretvaraju acetoctenu kiselinu u acetil-koenzim A, koji se onda oksidira .

Jetra stvaraju i lipoproteine i fosfolipide i kolesterol potrebne za sintezu membrana, struktura i tvari važnih za staničnu funkciju

Osnovne funkcije jetara u metabolizmu lipida su razgradnja masnih kiselina na male spojeve upotrebljive za dobivanje energije, stvaranje triglicerida iz ugljikohidrata te stvaranje drugih lipida iz masnih kiselina.

Ukupnu količinu triglicerida u jetri u normalnim okolnostima uglavnom kontrolira veličina iskorištavanja masti za energiju. Velike količine masti u jetri pojavljuju se u početnoj fazi gladovanja, pri šećernoj bolesti, pri bilo kojem stanju kada se umjesto ugljikohidrata za energiju iskorištavaju masti. U tim slučajevima mobiliziraju se trigliceridi iz masnog tkiva do jetre gdje se ponovno odlažu da bi se započeo proces dobivanja energije<sup>3</sup>.

### **1.1.2.2. Metabolizam bjelančevina**

Najvažnija je jetrena funkcija u metabolizmu bjelančevina deaminacija aminokiselina, stvaranje ureje čime se iz tjelesnih tekućina odstranjuje amonijak, stvaranje bjelančevina plazme te pretvorba i sinteza različitih tvari iz aminokiselina.

Bjelančevine se iz probavnog sustava apsorbiraju kao aminokiseline. Aminokiseline ulaze u stanice olakšanom difuzijom ili aktivnim prijenosom. Čim uđu u stanice aminokiseline se pomoću glasničke RNA i ribosoma povezuju peptidnim vezama tvoreći stanične bjelančevine. Stanične bjelančevine mogu se pomoću staničnih enzima u lizosomima ponovno razgraditi u aminokiseline i pustiti natrag u krv. Jetra mogu pohraniti veliku količinu tih brzo izmjenjivih bjelančevina. Postane li koncentracija aminokiselina u krvi manja od normalne, one se ispuštaju iz stanica. A kad postoji višak aminokiselina i dosegnuta je granica pohrane, jetra mogu aminokiseline upotrijebiti za donivanje energije ili pretvoriti u glikogen ili mast. Taj proces odvija se u jetri a započinje deaminacijom. Tim procesom oslobađa se amonijak koji se uklanja pretvorbom u ureju koja se odvija u jetri. Ureja difundira u tjelesne tekućine i izlučuje bubrezima. Ketokiselina stvorena deaminacijom aminokiseline mijenja se u prikladan spoj za ciklus limunske kiseline te se u ciklusu taj spoj razgradi i upotrijebi za tvorbu energije na isti način kao i acetil-koenzim A. Deaminacijom nekih aminokiselina, npr. alanina, u jetri nastaje pirogroždana kiselina (piruvat) koja se može nastati glukoza i glikogen (glukoneogeneza). Može se i pretvoriti u acetil-koenzim A koji se može polimerizirati u masne kiseline ili kondenzirati u acetocetenu kiselinu (ketogeneza)<sup>3</sup>.

### **1.1.2.3. Metabolizam ugljikohidrata**

U metabolizmu ugljikohidrata jetra ima funkciju pohranjivanja velikih količina glikogena, pretvaranje galaktoze i fruktoze u glukozu, glukoneogenezu i stvaranje brojnih kemijskih spojeva iz međuproizvoda ugljikohidratnog metabolizma<sup>3</sup>.

Konačni produkti probave ugljikohidrata u probavnom sustavu je glukoza (80 %) i fruktoza i galaktoza (20 %). Ubrzo nakon apsorpcije iz probavnoga sustava velik dio fruktoze i gotovo sva galaktoza se u jetrima pretvaraju u glukozu. Obično više od 95 % monosaharida u krvi čini glukoza. Ulaskom u stanicu glukoza se fosforilira. U jetrama reakciju pospješuje enzim glukokinaza, a u ostalim tkivima heksokinaza. Fosforilacija glukoze ireverzibilna je u svim tkivima osim u jetri, bubrezima i u stanicama crijevnog epitela u kojima ima glukoza-fosfataze. To sprečava da glukoza difundira natrag u krvotok iz stanice osim iz posebnih stanica koje imaju fosfatazu (osobito jetrenih stanica). Pošto je glukoza ušla u stanicu može se odmah iskoristiti za energiju (glikoliza) ili pohraniti u obliku glikogena glikogenezom. Gotovo sve stanice u tijelu mogu pohraniti malo glikogena, ali jetra mogu pohraniti i veće količine koje mogu doseći i 8 % stanične mase. Glikogenolizom, postupkom fosforilacije pomoću enzima fosforilaza, može se osloboditi pohranjena glukoza iz glikogena kada postoji potreba za energijom. Jetra imaju pufersku funkciju održavanja normalne koncentracije glukoze u krvi (5,5 mmol/L). Ako se koncentracija glukoze smanji, glukagon potiče stvaranje cikličkog adenozin-monofosfata u jetrenim stanicama koji aktivira enzim fosforilazu potrebnu za glikogenolizu. Ujedno pri smanjenju koncentracije glukoze u krvi u jetrima se stvara glukoza glukoneogenezom iz bjelančevina i glicerola koji nastaje hidrolizom iz neutralnih masti. Kada se koncentracija glukoze povisi, glukoza se sprema u jetrenim stanicama u obliku glikogena do zasićenja, a nakon toga, glukoza se u jetri iskoristi za sintezu triglicerida koji se pohranjuju u jetrenim i masnim stanicama<sup>3,4</sup>.

#### **1.1.2.3.1. Glukoneogeneza**

Primarno je mjesto glukoneogeneze jetra. Glukoneogeneza je proces sinteze glukoze iz neugljikohidratnih prekursora. Prekursori glukoze prvo se pretvaraju u piruvat, a glukoneogeni

put pretvara piruvat u glukozu. Kontrola glukoneogeneze posredovana je glukagonom koji potiče glukoneogenezu te inzulinom koji je inhibira<sup>5</sup>.

Glukagon je hormon koji luče  $\alpha$ -stanice Langerhansovih otočića gušterače kada se smanji koncentracija glukoze u krvi. Glukagon aktivira enzim fosforilazu potreban za fosforilaciju glikogena stvaranjem cikličkog adenzin-monofosfata u jetrenim stanicama, što pospješuje pretvaranje jetrenog glikogena u glukozu i njeno ispuštanje u krv. On također pojačava ulazak aminokiselina i jetrene stanice koja onda te aminokiseline pretvara glukoneogenezom u glukozu<sup>3, 4</sup>.

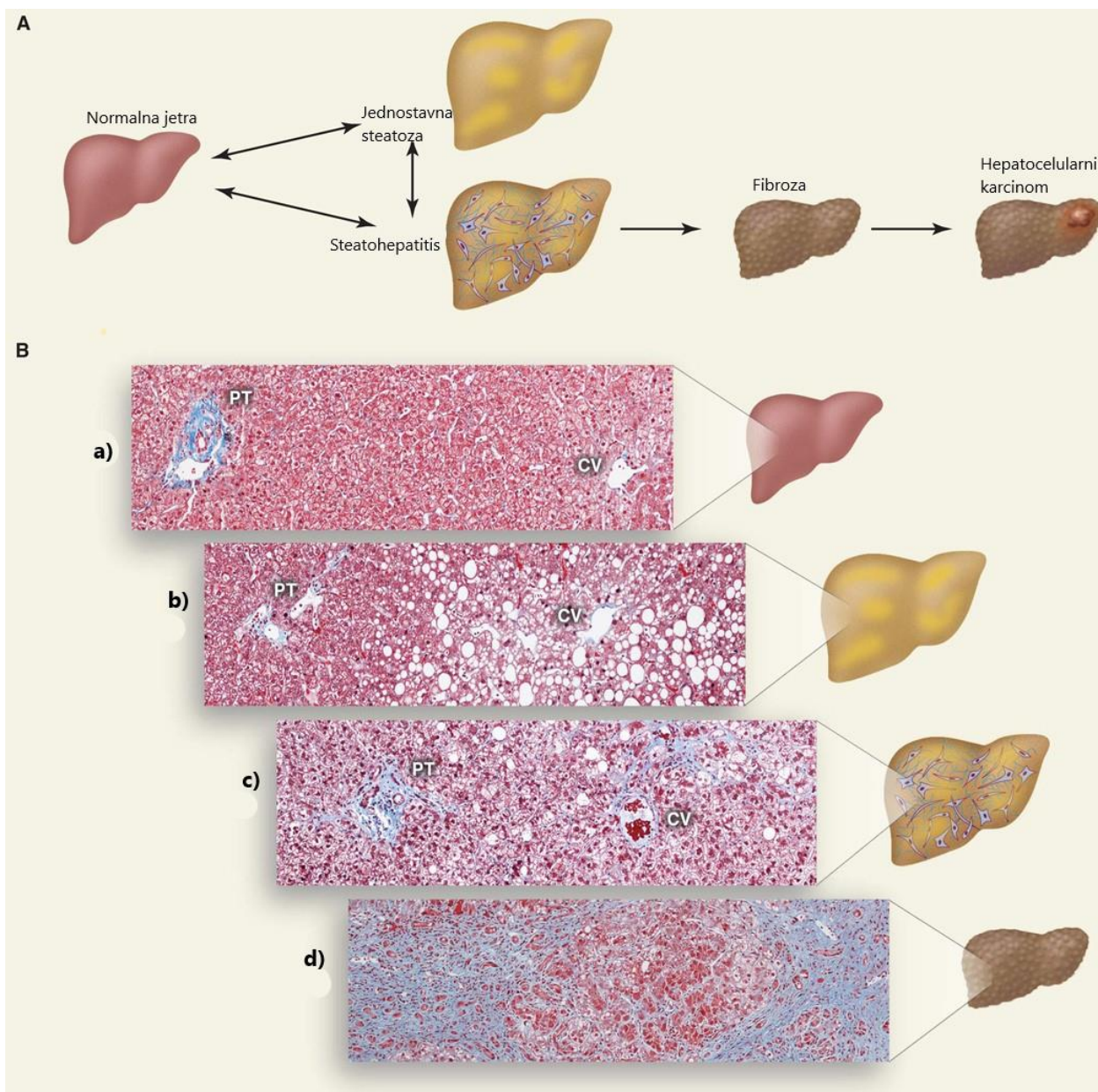
Inzulin je peptidni hormon koji luče  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića gušterače. On održava normalnu razinu glukoze u krvi olakšavajući unos glukoze u stanicu te regulirajući metabolizam bjelancevina i lipida. Inzulin djeluje na više sustava u metabolizmu ugljikohidrata. Inzulin se veže za  $\alpha$ -podjedinicu inzulinskog receptora što dovodi do autofosforilacije  $\beta$ -podjedinice što aktivira tirozin-kinazu koja fosforilira druge enzime uljučujući i supstrate inzulinskog receptora (IRS). Nakon vezanja inzulina na receptor, membrane postaju propusne za glukozu. Glukoza se koristi za dobivanje energije ili pohranjuje u jetri i mišićima u obliku glikogena. Inzulin inaktivira jetrenu fosforilazu pa se sprečava glikogenoliza i otpuštanje glukoze iz jetre. Inzulin aktivira jetrenu glukokinazu koja potiče fosforilaciju glukoze koja se bez jetrene fosforilaze ne može otpustiti u krv te povećava aktivnost enzima glikogen-sintaze. Inzulin potiče pretvorbu glukoze u masne kiseline te inhibira glukoneogenezu smanjujući aktivnost jetrenih enzima<sup>3, 4</sup>.

## 1.2. Masna promjena jetre

Masna promjena jetre definirana je kao nakupljanje masnih kapljica unutar hepatocita. Uz neke genetske bolesti i toksine masna promjena vezana je uz pretjerano konzumiranje alkohola kod alkoholne promjene jetre te ostale čimbenike kao što su stres ili nebalansirana prehrana kod nealkoholne promjene jetre (NAFLD). Definicija NAFLD-a zahtijeva da postoje dokazi o jetrenoj steatozi bilo histološkim prikazom ili nekom drugom tehnikom prikaza (UZV, CT, MR) i da nema uzroka sekundarne akumulacije masti kao što je značajna konzumacija alkohola, uporaba steatogenih lijekovi, izloženost toksinima, nasljedni poremećaji, izgladnjivanje ili

trudnoća<sup>6,7</sup>. Nadalje, NAFLD može se podijeliti u jednostavnu steatozu i steatohepatitis. Kod steatohepatitisa, uz nakupljanje masti u hepatocitima koje je obilježje steatoze, imamo i upalne promjene te različite znakove oštećenja hepatocita<sup>8</sup>. Steatozu jetre obično ne prate nikakvi klinički znaci, a čak i pri progresiji steatoze u steatohepatitis ne trebaju se javiti neki znakovi (dislipidemije, povišene jetrene transaminaze) koji inače prate jetrene bolesti<sup>7</sup>. Steatozu i steatohepatitis je jedino moguće sa sigurnošću utvrditi putem biopsije i patohistološkog nalaza<sup>9</sup>. Pošto je incidencija nealkoholne bolesti jetre u društvu sve veća, i već je poprimila razmjere eandemije<sup>10</sup>, ulažu se naponi da se odrede faktori rizika. Za tu svrhu koriste se životinjski modeli, gdje se u kontroliranim uvjetima mogu ispitati ti faktori. Kod ispitivanja utjecaja prehrane i različitih nutrijenata na razvoj masne jetre, ako ne želimo imati metabolički izmijenjene modele, koriste se modeli sa štakorima. Zbog toga sam u svrhu ispitivanja utjecaja različitog sastava masnih kiselina u prehrani izabrala model na štakoru.





Slika 1. A Progresija NAFLD-a; B Histološki prikaz jetre a) normalna jetra; b) jednostavna steatoza; c) steatohepatitis; d) ciroza. CV, centralna vena; PT, portalna trijada. Preuzeto iz Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights<sup>8</sup>.

### **1.2.1. Epidemiologija masne promjene jetre**

Danas je NAFLD najraširenija kronična bolest jetre. Procjenjuje se da je u Europi tim stanjem zahvaćeno 52 milijuna ljudi . Po geografskim je područjima NAFLD najrašireniji na Bliskom istoku (32 %) te Južnoj Americi (31 %), potom u Aziji (27 %), u Sjevernoj Americi (24 %) i Europi (23 %) dok je u Africi slabije zastupljen nego u ostatku svijeta (14 %)⁹. Mora se naglasiti da su sve te procijene temeljene su na različitim kriterijima i neinvazivnim testovima koji mogu podcijeniti raširenost masne promjene jetre, tako da konačne brojke mogu biti veće. Prilikom sistematskog pregleda, ultrazvučnim pregledom utvrđeno je da 10,6 % mladih, zdravih odraslih muškaraca ima masnu promjenu na jetri. Tu skupinu činili su samo pacijenti koji su bili normalne tjelesne težine te imali normalne parametre jetrenih transferaza, glukoze te lipida u krvi. Dijagnoza se postavila temeljem ultrazvučnog pregleda, koja nije dovoljno specifična za manji stupanj steatoze⁹. Procjenjuje se da do 15 % populacije koja je normalne težine u zapadnom svijetu ima masnu jetru¹¹. Prevalencija kod pretilih je 80 - 90 %¹², 30 - 70 % odraslih s dijabetesom¹³ i do 90 % odraslih s dislipidemijom¹⁴,¹⁵.

### **1.2.2. Dijagnostički kriterij**

NAFLD u svojoj najčešćoj neprogresivnoj varijanti nema izraženih kliničkih simptoma i znakova koje bi oboljele uputili liječniku. Mali broj ima nelagode u gornjem desnom kvadratu abdomena. Sumnja na prisutnost NAFLD-a stoga se najčešće postavlja slučajno tijekom posjeta liječniku zbog nekog drugog razloga ili pri sistematskom pregledu⁷. Prilikom progresije bolesti i pojave steatohepatitisa javljaju se klinički znakovi bolesti jetre, ali ni tada nije moguće točno utvrditi o kojem stupnju bolesti se radi i je li je riječ o nealkoholnoj bolesti jetre ili je bolest nastala zbog neke druge etiologije.

Da bi se postavila dijagnoza NAFLD-a moraju se zadovoljiti sljedeći uvjeti:

1. dokaz steatoze jetre slikovnim metodama ili patohistološki
2. izostanak konzumacije značajnijih količina alkohola
3. izuzeće ostalih mogućih uzroka steatoze jetre
4. izuzeće drugih uzroka kronične bolesti jetre

Dokaz steatoze jetre slikovnim metodama kao što je ultrazvučna metoda ima neka ograničenja<sup>16</sup>. Nije dovoljno specifičan u osoba koja imaju manji stupanj steatoze ili imaju morbidnu pretilost. Kompjutorizirana tomografija i magnetska rezonanca pokazuju isti stupanj specifičnosti u detekciji masne infiltracije jetrenog parenhima, a za razliku od UZV-a nisu ograničene u detekciji kod pretilih osoba, ali njihova negativna strana je cijena same pretrage i dostupnost.

Vrlo je teško odrediti je li masna jetra nastala zbog konzumacije značajnijih količina alkohola ili neke druge etiologije ili je nastala promjena NAFLD. Anamnestički podaci mogu nam samo ukazati na to je li bilo konzumacije alkohola ili ne, a biokemijski i serološki testovi mogu isključiti neku drugu etiologiju steatoze. Da bi se postavila točna dijagnoza i utvrdio stupanj bolesti, još uvijek je zlatni standard biopsija jetre i patohistološka analiza<sup>17</sup>.

### **1.2.3. Patohistološka analiza**

Patohistološka analiza tkiva dobivenog biopsijom jetre još je uvijek važeći „zlatni standard“ u dijagnostici NAFLD-a. To je jedina metoda kojom je moguće definitivno potvrditi dijagnozu NAFLD-a i odrediti i sam stupanj NAFLD-a<sup>18,19</sup>.

Osnova za histološku dijagnozu NAFLD-a smatra prisutnost  $\geq 5$  % masno promijenjenih hepatocita, a stupanj steatoze procjenjuje se semikvantitativno, dijeleći parenhim acinusa na trećine, te se ocjenjuje kao postotak parenhima zahvaćenog steatozom: do 5 %, 5 % - 33 % (blaga steatoza), 33 % - 66 % (umjerena steatoza), ili  $> 66$  % (izražena steatoza). Kod ljudi steatoza u NAFLD-u je pretežito makrovesikularna. Hepatociti sadrže samo jednu veliku kapljicu masti koja pomiče jezgru na periferiju. Steatoza u NAFLD-u kod ljudi obično počinje perivenularno u

3. acinarnoj zoni. Minimalni kriteriji za postavljanje dijagnoze nealkoholnog steatohepatitisa uključuju prisutnost steatoze, znakove oštećenja hepatocita te lobularnu upalu. Da bi se lakše odredio stupanj steatoze, predložene su semikvantitativne gradacije. U današnje vrijeme koriste se sustavi ocjenjivanja i gradacija po Bruntu<sup>20</sup> koju je modificirao Kliner<sup>21</sup> (tablica 1.). Ta tablica promatra steatozu, lobularnu upalu i baloniranje te zasebno fibrozu, i svakoj kategoriji daje određeni broj. Zbroj bodova (skorova) steatoze, upale i baloniranja daje nam sliku aktivnosti NAFLD-a gdje zbroj 0 - 2 govori u prilog da NASH-a nema, 3 - 4 da je moguć, a skor 5 - 8 govori u prilog prisutnosti steatohepatitisa. Konačnu dijagnozu postavlja patolog, a tablica služi samo kao pomoćno sredstvo u dijagnostici.

Tablica 1. SUSTAV OCJENJIVANJA NAFLD-a PO KLINERU.

Steatoza	S – skor	Lobularna upala	L – skor	Baloniranje hepatocita	B – skor
≤ 5%	0	-	0	-	0
5 – 33	1	< 2	1 (200 x)	Nekoliko baloniranih hepatocita	1
34 – 66	2	2 – 4	2 (200 x)	Puno baloniranih hepatocita	2
≥ 66	3	> 4	3 (200 x)		
<b>NASH stadij fibroze</b>			<b>Stadij</b>		
Bez fibroze			0		
Blaga, perisinusoidna fibroza u zoni 3			1a		
Srednja, perisinusoidna fibroza u zoni 3			1b		
Portalna/periportalna fibroza			1c		
Portalna/periportalna i perisinusoidna fibroza u zoni 3			2		
Premošćujuća fibroza			3		
Ciroza			4		

Preuzeto iz Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease<sup>21</sup>. S+L+B 0-2 nije NASH; 3 - 5 moguć NASH; 5 - 8 vjerojatan NASH. U lobularnoj fibrozi ne gledaju se upalne stanice blizu portalnih krvnih žila. U zagradi (200 x) je uvećanje pri kojem se promjena promatra.

Kod životinja histopatološka slika NAFLD-a može se razlikovati od one viđene kod ljudi. Ne samo vrsta životinje, nego i soj te vrsta prehrane može izmijeniti histološku prezentaciju NAFLD-a<sup>22</sup>. Zbog toga je predložena drugačija gradacija NAFLD-a<sup>23</sup> u glodavaca gdje su izostavljeni neki tipični znaci oštećenja hepatocita (baloniranje, Malorijeva tjelešca i sl.) koja se ne nalaze kod NAFLD-a u svim vrstama i sojevima laboratorijskih miševa i štakora.

#### 1.2.4. Patogeneza NAFLD-a

NAFLD se razvija kada brzina sinteze jetrenog triglicerida, zbog povećanog prihvaćanja masnih kiselina i esterifikacije u trigliceride, kao i od *de novo* sinteze triglicerida iz ugljikohidrata i metabolizma bjelančevina, premašuje brzinu katabolizma triglicerida u jetri<sup>24</sup>.

Jedna od najranijih prihvaćenih teorija u životinjskim modelima NAFLD-a i njegovo napredovanje od jednostavne steatoze hipoteza je „*Two hit*“<sup>25</sup>. Prvi udarac „*hit*“ uključuje akumulaciju neutralnih masti u jetri, što uzrokuje jednostavnu jetrenu steatozu koja sama dovodi do otpornosti na inzulin u jetri (IR) aktivirajući protein kinazu i c-Jun N-terminalne kinaze koji ometaju fosforilaciju tirozina na inzulin receptoru supstrat 1 (IRS-1) i 2 (IRS-2), kao i na djelovanje inzulina u hepatocitima<sup>26</sup>. Nakon što se dođe do jetrene steatoze, napredovanje u steatohepatitis uključuje „drugi udarac“, a smatra se da oksidativni stres igra ključnu ulogu. Masna jetra podložnija je oksidativnoj ozljedi. Oksidacijski stres proizlazi iz neravnoteže prooksidansa i antioksidansa i dovodi do lipidne peroksidacije. Kemijska modifikacija bioloških molekula može biti izravno otrovna za stanice ili može stimulirati odgovor domaćina koji se prevodi u upalu, proizvodnju kolagena i daljnje napredovanje bolesti<sup>27</sup>. Otpornost na inzulin može biti predispozicija za oksidativni stres poticanjem mikrosomalnih lipidnih peroksidaza i smanjenjem mitohondrijske  $\beta$ -oksidacije<sup>28</sup>. Posljednjih godina prihvaćeno je teorija „*Multiple hit*“ ili „*Paralelne hit*“, otkrivajući da jednostavna teorija „*Two Hit*“ ne objašnjava napredovanje NAFLD-a u svim slučajevima<sup>29-31</sup>, a sugerira se da je prvi udarac inzulinska rezistencija i povezani metabolički poremećaj. Hiperinzulinemija uzrokovana inzulinskom rezistentnošću rezultira povećanom *de novo* lipogenezom jetre i smanjenom inhibicijom lipolize adipoznog tkiva koja u konačnici dovodi do povećanog izbacivanja slobodnih masnih kiselina iz adipoznog tkiva

u jetru Nakon početnog infiltracije, jetra postaje ranjiva na niz udaraca koji mogu slijediti, što dovodi do ozljede hepatocita i napredovanja od jednostavne steatoze do NASH-a i fibroze<sup>32</sup>.

### **1.2.5. Čimbenici rizika**

Suvremeno društvo donijelo je duboke promjene u načinu života koje vode poteškoćama i situacijama koje rezultiraju pretjeranim i neizbalansiranim unosom nutrijenata, sjedilačkim načinom života i dugotrajnim, kroničnim stresom. NAFLD- se smatra jetrenom manifestacijom metaboličkog sindroma<sup>33, 34</sup>. Pretilost, dislipidemija i inzulinska rezistencija smatraju se čimbenicima metaboličkog sindroma koji imaju ulogu u nastanku masne promjene jetre ili su rezultat masne promjene jetre. Metabolički sindrom skup je tri ili više stanja koja uključuju različite metaboličke poremećaje kao što su pretilost, povišena koncentracija triglicerida u plazmi, povišena koncentracija glukoze u plazmi, smanjena koncentracija HDL-a i hipertenzija je povezan s rizikom razvoja kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa tipa 2<sup>35</sup>. Prije 20 godina procjena je bila da jedna četvrtina odrasle populacije Sjedinjenih Američkih Država (SAD) ima zadovoljene kriterije za dijagnozu metaboličkog sindroma, a današnja procjena je da trećina odrasle populacije ispunjava te kriterije<sup>36</sup>.

#### **1.2.5.1. Stres**

Stres aktivira obrasce ponašanja i fiziološke reakcije kao što su reakcije "obrane" i "poraza" koje su korisne za opstanak pojedinca i vrste, ali kada je stres kroničan može imati loše posljedice na zdravlje koje povezujemo s metaboličkim sindromom<sup>37</sup>. Kod ljudi je dovedena povezanost kroničnog stresa sa stanjima koja možemo povezati s metaboličkim poremećajima. Stres ima negativan učinak na lipide u plazmi<sup>38</sup> i hipertenziju<sup>39</sup>, povećavajući rizik od krvožilnih bolesti<sup>40</sup>. Također, dokazano je da kroničan stres može uzrokovati i nastanak NAFLD-a. Kod miša<sup>41</sup> stres u trajanju od dvanaest tjedana doveo je do masne promjene jetre i povišenih jetrenih triglicerida te jetrenih transaminaza.

### **1.2.5.2. Pretilost**

Pretilost se definira kada je indeks tjelesne mase 30 ili veći<sup>42</sup>. Indeks tjelesne mase (ITM) omjer je kvadrata mase u kilogramima i kvadrata visine u centimetrima i služi nam za određivanje uhranjenosti.

U SAD-u više od trećine odrasle populacije po tom je kriteriju pretilo<sup>43</sup>, ali procjeni pretilosti postalo je očito da nije samo veličina povećanja mase važna već i mjesto distribucije masnog tkiva.

Visceralno nakupljanje masti jedan je od najvažnijih čimbenika u metaboličkom sindromu i po definiciji IDF-a ključan kriterij za dijagnozu metaboličkog sindroma. Za razliku od supkutanog nakupljanja masti, abdominalno ili visceralno nakupljanje masti povezano je s povećanim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti i usko je povezano s inzulinskom rezistencijom i dislipidemijom<sup>44</sup>. ITM-om ne možemo utvrditi distribuciju masnog tkiva i zato moramo izmjeriti opseg struka da bismo utvrdili postojanje masne pretilosti jer ITM može navesti i na krive zaključke kao kod osoba koje imaju veću mišićnu masu<sup>45</sup>. Kriterij za dijagnozu abdominalne pretilosti opseg je struka veći od 102 cm za muškarce i 88 cm za žene. Po tom kriteriju više od polovica odrasle populacije SAD-a ima abdominalnu pretilost po kriteriju<sup>46</sup> (Ford, 2014.) abdominalne pretilosti ako je opseg struka veći od 102 cm za odrasle muškarce i 88 cm za odrasle žene.

### **1.2.5.3. Inzulinska rezistencija**

Inzulinska rezistencija definirana je kao smanjena sposobnost tkiva da reagira na djelovanje inzulina. Masno tkivo jedno je od tkiva koje reagiraju na inzulini, a inzulini stimulira pohranu triglicerida u masnom tkivu pomoću višestrukih mehanizama, uključujući promicanje diferencijacije pred adipocita u adipocite, povećavajući unos glukoze i masnih kiselina dobivenih iz cirkulirajućih lipoproteina i lipogeneze u zrelih adipocitima i inhibiran lipolizu<sup>47</sup>.

Masno tkivo metabolički je i endokrino aktivni organ<sup>48</sup>. Kod ekscesivnog nakupljanja masnog tkiva, ali i kod stanja mršavosti i lipidopatija, dolazi do niza poremećaja. Visceralno masno tkivo

povezano je s nastankom inzulinske rezistencije<sup>49, 50</sup>. Kako je točno povezano još se ne zna ali ono može izlučivati adipokine koji umanjuju osjetljivost inzulina u tkivima poput jetre i mišića. Druga je mogućnost ta da je nakupljanje visceralne masti paralelni pokazatelj akumulacije lipida koji se javljaju u jetri i mišiću, uzrokujući, zbog lipotoksičnosti, otpornost na inzulin u tim tkivima. Visceralno masno tkivo akumulira makrofage koji oslobađaju upalne citokine koji mogu djelovati na inzulinsku osjetljivost, a postoji i mogućnost da i lipotoksičnost u perifernom tkivu i visceralna proizvodnja citokina u masnom tkivu može doprinijeti sistemskoj inzulinskoj rezistenciji<sup>51</sup>. Visceralno masno tkivo izlučuje TNF- $\alpha$  i IL-6. TNF- $\alpha$  je citokin koji pokreće lučenje slobodnih masnih kiselina (FFA) iz masnog tkiva u krvotok. Kod pretilih osoba ispuštaju se velike količine TNF- $\alpha$  koji je barem djelomice odgovoran za razvoj inzulinske rezistencije i dislipidemije kod pretilosti. Još jedan važan čimbenik je da te oslobođene masne kiseline i citokini iz visceralnog masnog tkiva ulaze putem portalnog krvotoka direktno u jetru gdje mogu izazvati masnu promjenu jetre i inzulinsku rezistenciju jetre<sup>52</sup>. Interleukin 6 ima važnu ulogu u kontroli glikemije kod mišićnog rada<sup>53</sup> ali kronično povećanje IL-6, kao što je nađeno u mnogih ispitanika s metaboličkim poremećajima, može dovesti do otpornosti na inzulin u jetrenim i masnim stanicama te tako može pogoršati sindrom<sup>54</sup>.

Ima više teorija o nastanku i razvoju NAFLD-a, ali smatra se da inzulinska osjetljivost jetre ima ključnu ulogu u nastajanju i/ili progresiji NAFLD-a<sup>25</sup>. Jetrena rezistencija na inzulin može nastati već samo nakon 3 dana visokomasne prehrane<sup>26, 55</sup>. Smatra se da je ona odgovorna za daljnju kaskadu događaja koja dovodi do metaboličkih poremećaja kao što je dislipidemija te povezana stanja metaboličkog sindroma<sup>25, 56-58</sup>.

#### **1.2.5.4. Dislipidemija**

Dislipidemija je poremećaj koncentracije lipida u krvi. Kod nje dolazi do povećane koncentracije triglicerida u i LDL-kolesterola u plazmi i smanjenje koncentracije HDL-a u plazmi.

Najznačajniji faktor koji pridonosi dislipidemiji povezanoj s pretilosti je nekontrolirano oslobađanje slobodnih masnih kiselina iz masnog tkiva, osobito visceralnog masnog tkiva, pomoću lipolize, što uzrokuje povećanu emisiju masnih kiselina u jetru i sintezu lipoproteina vrlo



male gustoće. Hipertrigliceridemija može biti glavni uzrok ostalih abnormalnih lipida jer će dovesti do odgođenog uklanjanja lipoproteina bogatih trigliceridima i stvaranja LDL-a. Povećano oslobađanje slobodnih masnih kiselina dovodi do akumulacije triglicerida (TG) u jetri. To dovodi do povećane sinteze jetre velikih lipoproteina vrlo niske gustoće (VLDL) koji smanjuju lipolizu hilomikrona. Lipoliza je dodatno oštećena u pretilosti smanjenjem razine ekspresije mRNA lipoproteinske lipaze (LPL) u adipoznom tkivu i smanjenom aktivnošću LPL u skeletnom mišiću. Hipertrigliceridemija dodatno inducira povećanu razmjenu kolesterola i triglicerida između VLDL i HDL i lipoproteina niske gustoće (LDL) pomoću kolesterol ester-transfer-proteina (CETP). To dovodi do smanjenja koncentracije HDL i smanjenja sadržaja TG u LDL-u. Osim toga, jetrena lipaza (HL) uklanja trigliceride i fosfolipide iz LDL-a za konačnu tvorbu trigliceridima osiromašenog malog gustog LDL-a koji ima vrlo veliku aterogensku ulogu<sup>50, 59</sup>. Snižena koncentracija HDL-a u uskoj je vezi s kardiovaskularnim poremećajima bez obzira na to imaju li pacijenti povišenje triglicerida<sup>60</sup>.

#### **1.2.5.5. Prehrana kao čimbenik rizika**

Zapadnjačka prehrana bogata mesom, zasićenim mastima i prerađenim ugljikohidratima povezuje se s pretilošću, dijabetesom tipa II, metaboličkim sindromom i razvojem masne promjene jetre, dok mediteranska dijeta bogata mastima iz maslinova ulja te voćem i povrćem povoljno utječe na jetru i metabolički status<sup>61-63</sup>. U zapadnom svijetu konzumiranje bezalkoholnih pića bogatih fruktozom i rafiniranim šećerima<sup>64, 65</sup> te konzumiranje SFA masnih kiselina povezano je s epidemijom pretilosti i masne jetre te njezinom progresijom do NASH-a<sup>66-68</sup>. To dolazi do izražaja ako se poklope svi elementi zapadnjačke dijete gdje imamo više prehrambenih čimbenika koji dovode do steatoze ili NASH-a<sup>69</sup>. Mediteranska prehrana značajno je povezana s manjim stupnjem jetrene steatoze te manjim postotkom steatohepatitisa, kako je procijenjena biopsijom jetre<sup>70</sup>. Štoviše, u istom istraživanju veća privrženost mediteranskoj prehrani bila je povezana s nižim stupnjem rezistencije na inzulin, za koji se smatra da je glavni patogeni mehanizam u NAFLD-u. Koristan učinak mediteranske prehrane potječe od mononezasićenih masnih kiselina, uglavnom iz maslinova ulja. Od slobodnih masnih kiselina u maslinovu ulju dominira mononezasićena oleinska kiselina koje ima oko 72 %, dok su manje zastupljene

polinezasićena n-6 linolna (13 %) i zasićene palmitinska (11 %) i stearinska masna kiselina (2 %). Ima i oko 0,5 % n-3 linooleinske i otprilike isti postotak palmitoleinske kiseline<sup>71, 72</sup>. Dijeta bogata maslinovim uljem smanjuje nakupljanje TG-a u jetri, poboljšava postprandijalni lipidni status, glukozu kod subjekata otpornih na inzulin i poboljšava ekspresiju glukoze transporter-2 u jetri<sup>73</sup>. Suncokretovo ulje bogato je polinezasićenom linolnom kiselinom (63 %). Oleinske kiseline ima oko 26 %, a zasićene palmitinske 6 %. Ima samo oko 0,2 posto n-3 PUFA<sup>72</sup>. Ulje bučinih koštica ima nešto veću količinu mononezasićene kiseline od suncokretova ulja (35 %), linolne kiseline ima oko 47 %, a palmitinske oko 12 % te stearinske 5 %. Za razliku od maslinova i suncokretova ulja sadrži i margarinsku kiselinu (0,7 %)<sup>74</sup>. Prosječni sastav slobodnih masnih kiselina u ta tri ulja prikazan je u tablici 2. Podaci su preuzeti iz radova rađenih na našem području s uljima naših proizvođača<sup>71,72,74</sup>.

Količina i sastav slobodnih masnih kiselina može imati ključnu ulogu u razvoju NAFLD-a, neovisno o unosu kalorija<sup>75,76</sup>. U usporedbi s izokaloriskim i izolipidnim unosom SFA, n-6 PUFA smanjuju jetreno nakupljanje lipida i poboljšavaju metabolički status bez gubitka težine kod osoba s visceralnom pretilošću. Visoki unos PUFA n-6 na račun SFA ne uzrokuje nikakve znakove upale ili oksidativnog stresa<sup>77</sup>. Postojeći dokazi kod ljudi, iako ograničeni, ne pokazuju vezu između većeg unosa linolne kiseline i upale *in vivo*<sup>78</sup>. Dokazano je da visokomasna izokalorična dijeta u zdravih muških osoba nakon samo jednog tjedna uzrokuje nakupljanje masti u jetri<sup>79</sup>. Kod pretilih, inače zdravih ženskih osoba, visokomasna izokalorična prehrana u trajanju od dva tjedna izazvala je nakupljanje lipida u jetri<sup>80</sup>.

Tablica 2. SASTAV MASNIH KISELINA U BUČINU, MASLINOVI I SUNCOKRETOVI  
ULJU (g u 100g)

		<b>Bučino ulje</b>	<b>Maslinovo ulje</b>	<b>Suncokretovo ulje</b>
<b>C14:0</b>	miristinska	0,1	0,01	0,04
<b>C16:0</b>	palmitinska	12,01	11,3	5,8
<b>C16:1</b>	palmitoleinska	0,13	0,7	0,1
<b>C17:0</b>	margarinska	0,07	0	0
<b>C18:0</b>	Sterainska	5,25	2,2	3
<b>C18:1</b>	Oleinska	35,12	71,6	26,1
<b>C18:2</b>	Linolna	46,58	12,7	63,2
<b>C18:3</b>	linolenska	0,25	0,6	0,2
<b>C20:0</b>	Arahidna	0,32	0,4	0,2
<b>C20:1</b>	gadoleinska	0,09	0,3	0,2
<b>C22:0</b>	Behenska	0,08	0,1	0,7
<b>C24:0</b>	lignocerinska	/	0,1	0,3

Preuzeto i prilagođeno iz Žanetić M, Gugić M. Health values of olive oil<sup>71</sup>, Škevin D. Kraljić K, Miletić L, Obranović M, Neđeral S, Petričević S. Adulteration of Oblica virgin olive oil with edible sunflower and refined olive pomace oil<sup>71</sup>, Nakić S, Rade D, Škevin D, Štrucelj D, Mokrovčak Ž, Bartolić M. Chemical characteristics of oils from naked and husk seeds of Cucurbita pepo L<sup>74</sup>.

U tablici 3. preuzetoj i prilagođenoj iz preglednog rada<sup>67</sup> o utjecaju prehrane i dijete na NAFLD , prikazani su svi nutritivni faktori koji djeluju negativno na jetru (faktor rizika), pozitivno ( protektivni faktor) ili je uloga nedovoljno istražena s oprečnim rezultatima (sporan faktor). Iz te se tablice vidi da je povećani unos SFA na račun nezasićenih jedan od faktora rizika za nastanak NAFLD-a, a takav unosu obilježje je suvremene zapadnjačke prehrane.

Tablica 3. PREHRAMBENI FAKTORI RIZIKA ZA NASTANAK NAFLD-A.

<b>Faktor rizika</b>	<b>Protektivni faktor</b>	<b>Sporan faktor</b>
Visokomasna dijeta	Konзумacija kave,	Ukupan unos kalorija
Visoki unos SFA,	zelenog čaja	Ukupan unos bjelančevina
transmasnih kiselina,	Umjerena konzumacija	Povećani unos n-6 PUFA
kolesterola, ugljikohidrata,	alkohola	Antioksidanti (vitamini,
jednostavnih	Konзумacija MUFA i n-3	đumbir, ginseng)
ugljikohidrata, fruktoze ,	PUFA masnih kiselina	Probiotici
saharoze	Konзумiranje namirnica	
Smanjeni unos PUFA	niskog glikemijskog	
Smanjeno konzumiranje	indeksa	
voća	Konзумacija bjelančevina	
	soje i sirutke	
	Konзумacija vlakana	

Preuzeto i prilagođeno iz Fan JG, Cao HX. Role of diet and nutritional management in non-alcoholic fatty liver disease<sup>67</sup>.

## 2. CILJ I SVRHA RADA

---

## **2.1. CILJ**

Cilj je ovog istraživanja ispitati utjecaj visokomasne prehrane različitog sastava i omjera masnih kiselina, kakve nalazimo u bučinu, suncokretovu i maslinovu ulju u trajanju od 3 tjedna, na tjelesnu masu, na nakupljanje masnoća u jetri, na fiziološku regulaciju otpuštanja glukoze iz jetre i osjetljivosti na inzulin, s ciljem da se pronađe omjer i sastav slobodnih masnih kiselina koji bi djelovao povoljno na jetru i jetreni metabolizam.

Napravila sam histološku analizu jetara životinja hranjenih visokomasnom prehranom te lipidni status plazme uz praćenje mase životinja i konzumiranja hrane. Opuštanje glukoze iz kulture hepatocita dobivenih od štakora hranjenih visokomasnom prehranom maslinovim i suncokretovim uljem već je objavljeno<sup>81</sup> pa sam za ovo istraživanje odabrala isti model visokomasne prehrane s bučnim uljem za dobivanje kulture hepatocita.

## **2.2. HIPOTEZA**

Povećani udio polinezasićenih masnih kiselina u prehrani dovodi do masne promjene u jetri i nepovoljnijeg metaboličkog učinka na regulaciju otpuštanja glukoze iz jetre i inzulinsku osjetljivost, dok povećanje udjela mononezasićenih kiselina djeluje povoljnije.

### 3. ŽIVOTINJE I METODE

---

### **3.1. Materijali**

U svom radu koristit ću sljedeće materijale:

suncokretovo ulje, ekstra djevičansko maslinovo ulje, ulje bučinih koštica (Zvijezda, Zagreb, Hrvatska). Standardna hrana za male laboratorijske životinje Mucedola srl. (Settimo Milanese (MI) Italija). Swim's S-77 medij (MyBiosource, Inc., San Diego, CA, USA), kolagen R (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Njemačka). Glukagon, kolagenaza, inzulin, Hepes, penicilin, albumin i M-199 medij (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA), natrijev tiopental Rotemexmedica (Trittau, Njemačka). Koristit ću komercijalno dostupne kitove za određivanje glukoze (Human Diagnostics, Wiesbaden, Njemačka ) i lipida iz plazme (Herbos Dijagnostika plc., Sisak, Croatia).

### **3.2. Životinje**

#### **3.2.1. Etička dozvola**

Istraživanja sam provodila prema pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u pokusima ili druge znanstvene svrhe (NN13/55), a radi se o uzorkovanju za koje već postoji dozvola od Ministarstva poljoprivrede Klasa:UP/I-322-01/14-01/11. UrBroj: 525-10/0255-14-2 od 15. 05.2014., uz dozvolu za nastambu za laboratorijske životinje registriranoj i oglašenoj na službenim stranicama Ministarstva poljoprivrede, Uprave za veterinarstvo i zavedene u upisnik pravnih osoba odobrenih i registriranih za provođenje pokusa i uzgoj laboratorijskih životinja pod brojem HR-POK-010. Etičko odobrenje dobila sam od Povjerenstva za dobrobit životinja Medicinskog fakulteta Klasa: 641-01/17-04/01 UrBroj: 380-59-10106-17-100/216 od 13.07.2017. i Etičkog odbora Stomatološkog fakulteta Broj:05-PA-15-10/2017 od 19.10. 2010. Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade sa pokusnim životinjama položila sam na Prirodoslovnom-matematičkom fakultetu 14.02.2014. broj potvrde 90.3-14, HR 191/02/P.



### 3.2.2. Životinje i smještaj

Za ovo istraživanje korišteni su zdravi muški štakori soja Wistar stari 2 mjeseca. Životinje su bile smještene pojedinačno u polikarbonatne kaveze u standardnim i kontroliranim uvjetima na temperaturi  $21 \pm 2$  °C na 12 satnom ciklusu svijetla i tame. Niti jedna životinja nije uginula ili pokazivala znakove bolesti ili stresa tijekom trajanja pokusnog hranjenja. Svakodnevno sam vagala masu životinja i količinu konzumirane hrane.

Za ovo istraživanje koristila sam 30 štakora.

Za pokuse *in vivo* koristila sam :

- 6 životinja za kontrolu (SD)
- 6 životinja za visokomasnu prehranu (suncokretovo ulje, MDS)
- 6 životinja za visokomasnu prehranu (bučino ulje, MDB)
- 6 životinja za visokomasnu prehranu (maslinovo ulje, MDM).

Ostale životinje podijelila sam u dvije grupe (SD i MDB) i koristila sam za pokuse *in vitro*. Grupe MDM i MDS nisam koristila za pokus *in vitro* budući da je istraživanje već ranije napravljeno i objavljeno<sup>81</sup>.

### 3.3. Metode

#### 3.3.1. Pokusi *in vivo*

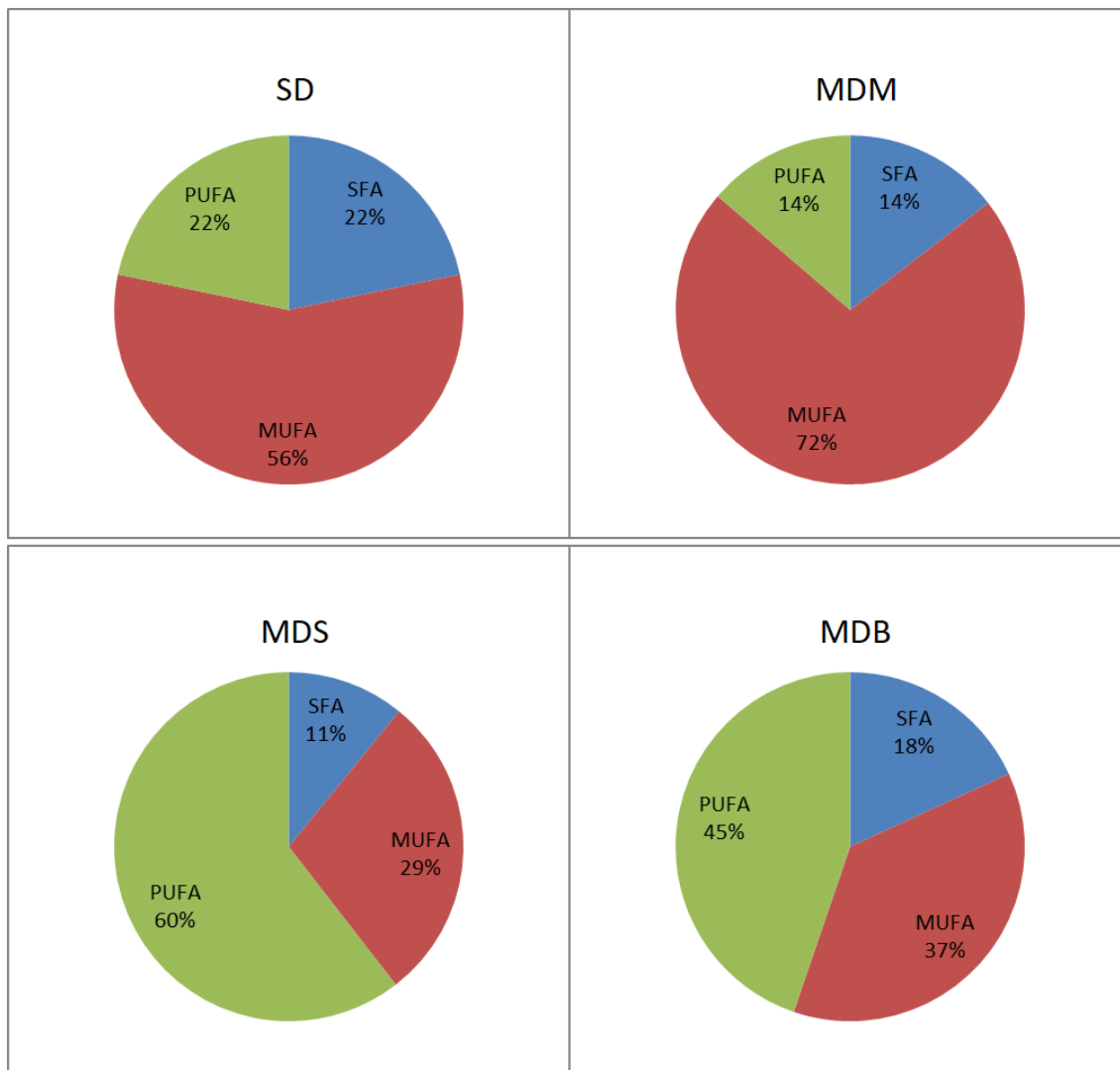
##### 3.3.1.1. Priprema dijete

Standardna dijeta za kontrolnu skupinu (SD) sadržavala je samo usitnjenu standardnu hranu. Skupina hranjena visokomasnom prehranom maslinovim uljem imala je dodatak usitnjenoj standardnoj hrani od 30 % maslinova ulja (MDM). Skupina hranjena visokomasnom prehranom suncokretovim imala je dodatak od 30% suncokretova ulja (MDS), a skupina hranjena visokomasnom prehranom bučnim uljem imala je dodatak od 30 % bučina ulja (MDB). Približan sastav makronutrijenata u standardnoj prehrani i u pripremljenim HFD dijetama prikazan je u tablici 4. Omjer PUFA, MUFA i SFA masnih kiselina u standardnoj dijeti (SD) i HFD dijetama prikazani je na slici 2.

Tablica 4. SASTAV SD I HFD DIJETA (g u 100g)

	<b>SD</b>	<b>MDM</b>	<b>MDS</b>	<b>MDB</b>
<b>BJELANČEVINE</b>	18,5	14,2	14,2	14,2
<b>UGLJIKOHIDRATI</b>	53,5	41,2	41,2	41,2
<b>MASTI</b>	2,3 – 3	24,8	24,8	24,8

SD, standardna dijeta; MDM, visokomasna dijeta s dodatkom maslinovog ulja; MDS, visokomasna dijeta s dodatkom suncokretovog ulja; MDB, visokomasna dijeta s dodatkom ulja bučinih sjemenki



Slika 2. Omjer slobodnih masnih kiselina u dijetama. SD, standardna dijeta; MDM, visokomasna dijeta s dodatkom maslinovog ulja; MDS, visokomasna dijeta s dodatkom suncokretovog ulja; MDB, visokomasna dijeta s dodatkom ulja bučinih sjemenki.

### **3.3.1.2. Uzimanje uzoraka za biokemijsku i histološku analizu**

#### **3.3.1.2.1. Anestezija**

Životinje sam nakon 21 dana pokusa anestezirala putem intraperitonealne injekcije natrijevim thiopentalom, 10 mg/100 g mase životinje. Postupku uzimanja uzoraka pristupila sam nakon što sam utvrdila da životinja nema refleks uklanjaanja i da je u prikladnom stupnju anestezije.

#### **3.3.1.2.2. Uzimanje uzoraka krvi**

Premazala sam trbušnu stjenku 75 %-tnim alkoholom i po *linei albi* otvorila trbušnu šupljinu te prikazala visceralne organe i donju šuplju venu iz koje sam pomoću igle i šprice uzela uzorak od 3 ml krvi. Krv sam odmah prebacila u epruvetu s EDTA i 10 puta nježno, bez miješanja, okrenula za 90°. Nakon toga prerezala sam šuplju venu i pričekala da životinja iskrvari.

#### **3.3.1.2.3. Uzimanje uzoraka za histološku analizu**

Nakon iskrvarenja odstranila sam jetru koju sam odmah oprala u fiziološkoj otopini te izvagala. Odmah potom jetra sam izrezala na kockice sa stranicama od 5 mm i fiksirala u fiksativu Carnoy.

### **3.3.1.3. Određivanje lipida u plazmi**

Određena je koncentracija ukupnog kolesterola, triglicerida i HDL-kolesterola po standardnim enzimatskim postupcima s komercijalnim testovima.

LDL-kolesterol odredila sam po direktnoj Friedewaldaovoj metodi<sup>83</sup> pomoću jednadžbe  $LDL = TOT-CH - (TG / 2,2) - HDL$ , a Non-HDL kolesterol po indirektnoj metodi koju su predložili Sánchez-Muniz i Batista<sup>83</sup> pomoću formule  $Non-HDL = TOT-CH - HDL$ .

### **3.3.1.4. Histološki postupci**

#### **3.3.1.4.1. Priprema i bojanje preparata**

Fiksirani preparati uklopljeni su u parafin i izrezani na polutanke rezove pomoću mikrotoma. Dobiveni uzorci bojeni su rutinskim histološkim metodama bojenja hemalaun eozinom (HE) te bojom Masson trikrom (TRIKROM).

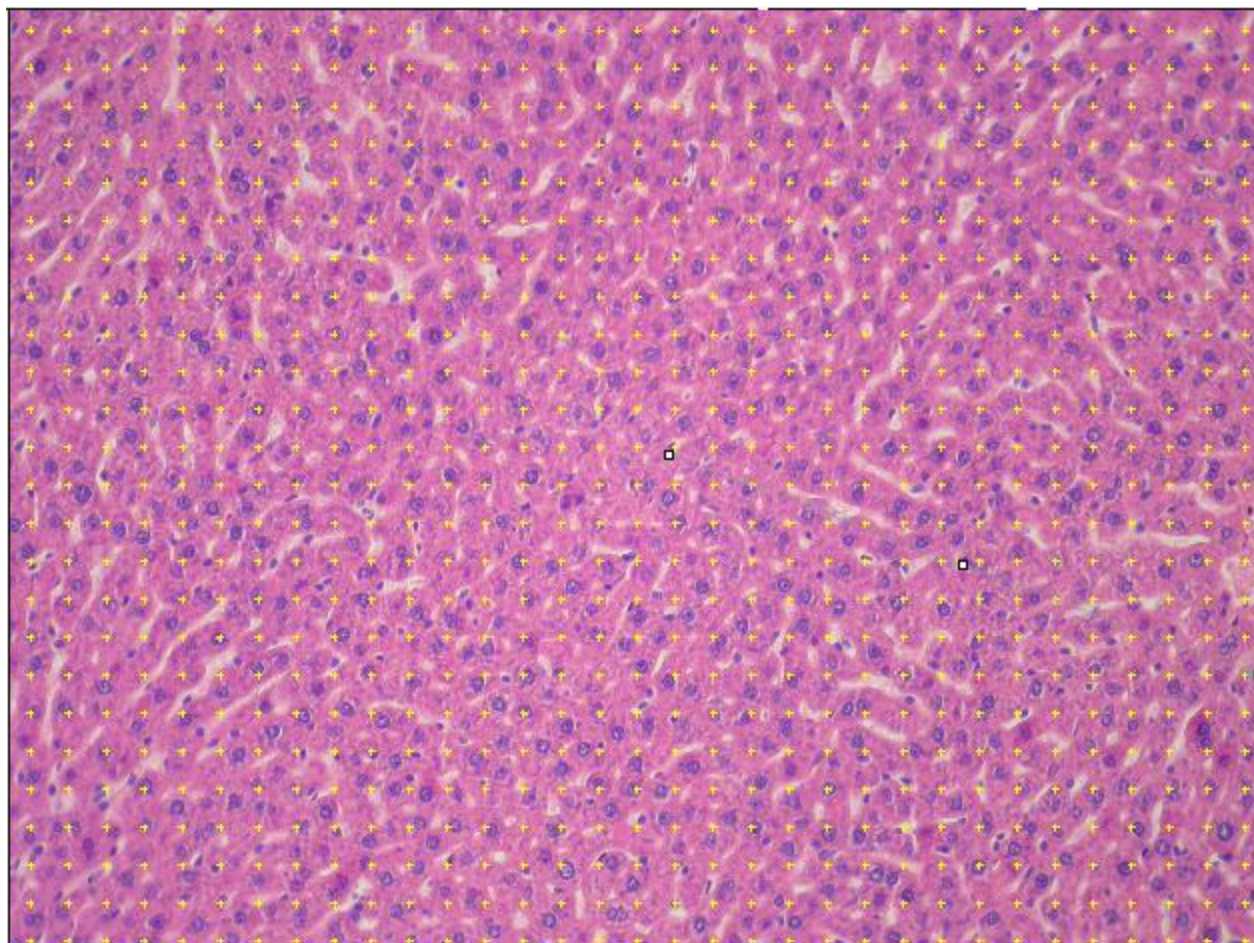
#### **3.3.1.4.2. Određivanje stupnja steatoze**

Pomoću svjetlosnog mikroskopa pregledala sam preparate (HE) i odredila im stupanj steatoze semikvantativnom metodom predloženom po Bruntu i Klineru<sup>20</sup> te koju je Liang potvrdio i modificirao za životinjske modele<sup>23</sup>. Stupanj steatoze procijenila sam po području zahvaćenosti nakupljanjem masnih kapljica u hepatocitima. Stupanj I, 5 - 33 % ili zahvaćenost hepatocita samo u jednom acinarnom području; od 33 do 66 % , steatoza prisutna u dva acinarna područja i stupanj III s više od 66 % hepatocita zahvaćenih masnom promjenom ili u sva tri acinarna područja. Budući da je to semikvantitativna metoda, da bih potvrdila rezultate, preparate sam fotografirala i na uvećanju od 200 x na 12 slučajno odabranih fotografija po grupi, pomoću programa ImageJ , koristeći se brojačem stanica i rešetkom s 25 x 33 točaka izbrojila hepatocite s masnim kapljicama (slika 3.).

Tablica 5. HISTOLOŠKO PROCJENJIVANJE NAFLD-A KOD GLODAVACA PO LIANGU

	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>STEATOZA</b>				
Makrovesikularna	< 5 %	5–33 %	33–66 %	> 66 %
Mikrovezikularna	< 5 %	5–33 %	33–66 %	> 66 %
Hipertrofija	< 5 %	5–33 %	33–66 %	> 66 %
<b>UPALA</b>				
Broj upalnih žarišta po vidnom polju (uvećanje 100 x)	< 0,5	0,5–1,0	1,0–2,0	> 2,0

Preuzeto iz Liang W, Menke AL, Driessen A, et al. Establishment of a General NAFLD Scoring System for Rodent Models and Comparison to Human Liver Pathology<sup>23</sup>. Hipertrofija označava hepatocite koji imaju promjer 1,5 x veći od normalnih, okolnih hepatocita. Žarište upale je nakupina od 5 ili više upalnih stanica, koje nisu poredane u tračke, te nisu u blizini krvnih žila.



Slika 3. Histološki prikaz preparata HE s rešetkom 33 x 25 točaka (žuti križići). Iz ukupnog broja stanica izuzela sam sve križiće koji nisu padali na hepatocit, a ako su padali na hepatocit s kapljicom masti zabilježila sam ga kao masno promijenjenog, bez obzira na veličinu masne kapljice (u ovom prikazu preparat iz grupe SD).

#### 3.3.1.4.3. Utvrđivanje upalnih promjena i hipertrofije

Pregledala sam preparate (HE) na uvećanju 200 x radi utvrđivanja upalnih promjena prema predloženoj metodi. Upalno sam žarište odredila kao nakupinu od pet ili više upalnih stanica u jetrenom parenhimu. Isključila sam stanice poslagane u tračcima i u blizini velikih krvnih žila. Na uvećanju od 400 x gledala sam i baloniranje i hipertrofiju stanica. Hipertrofiranu stanicu odredila sam kao stanicu koja je uvećana za 1,5 x od okolnih stanica.

#### 3.3.1.4.4. Utvrđivanje fibrotičnih promjena

Fibrozu sam utvrđivala pomoću preparata obojanih Masson trikrom bojom.

### 3.3.2. Pokusi *in vitro* u primarnoj kulturi hepatocita

Za dobivanje primarne kulture hepatocita koristila sam životinje iz grupe SD i MDB.

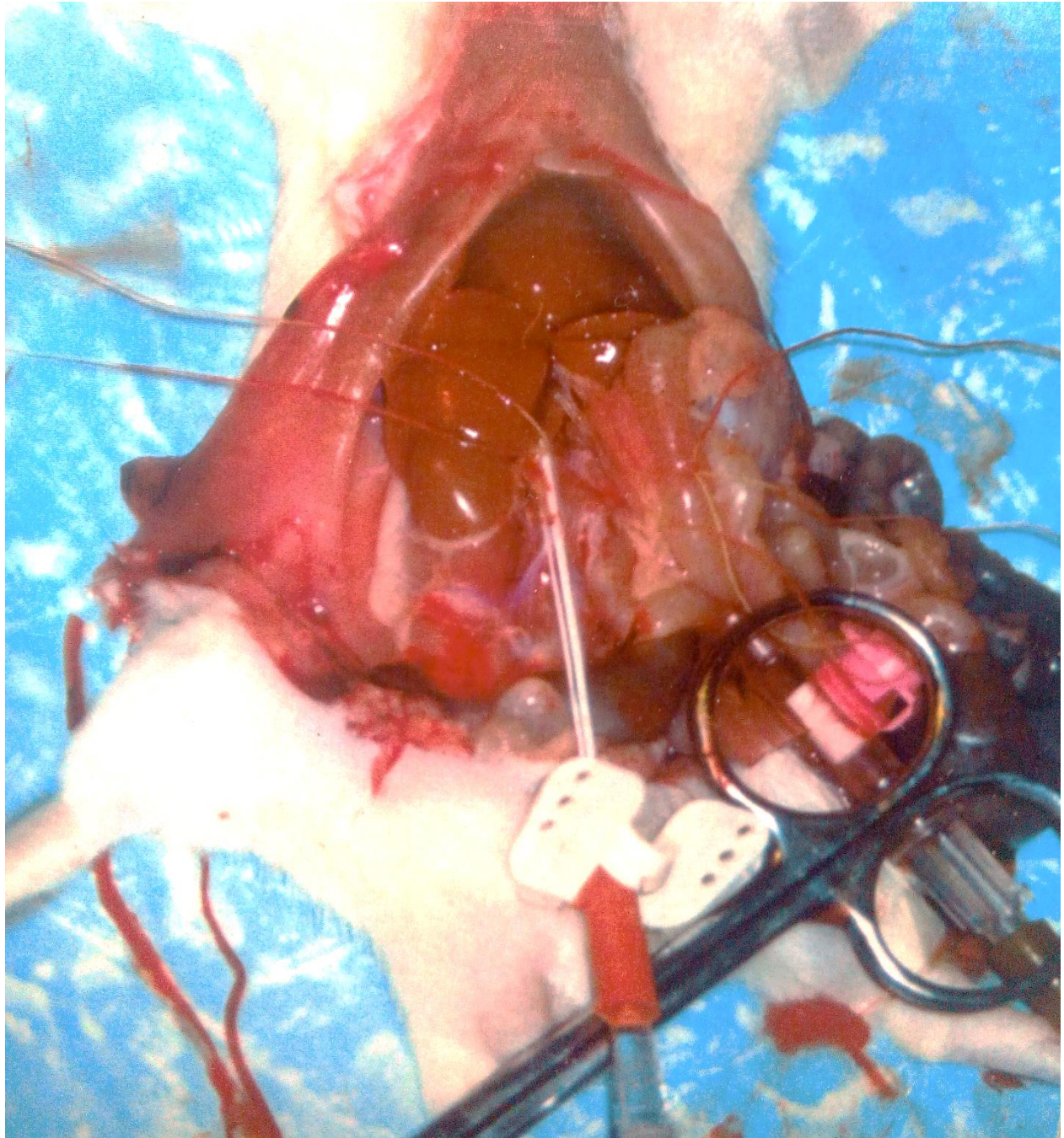
#### 3.3.2.1. *Priprema životinja*

Nakon 21 dana pokusa, štakore sam anestetizirala prethodno opisanim postupkom. Nakon što su životinje bile u dubokoj anesteziji, postavila sam ih na operacijski stolić i premazala trbušnu i prsnu šupljinu 75 %-tnim alkoholom.

#### 3.3.2.2. *Perfuzija jetre*

Otvorila sam trbušnu šupljinu te prikazala jetru, portalnu venu te donju šuplju venu. Uvela sam braunilu u portalnu venu te je podvezala, a donju šuplju venu sam zarezala. Perfundirala sam jetru s medijem Swim's S-77. Nakon što su se jetra isprala, uvela sam braunilu u donju šuplju venu koju sam i podvezala iznad ošita (slika 4.). Jetru sam perfundirala kolagenazom, modificiranom tehnikom po Berryu i Friendu<sup>84</sup>. Za perfuziju sam koristila peristaltičku pumpu MasterFlex (Cole Palmer, Vernon Hills, Illinois, SAD).

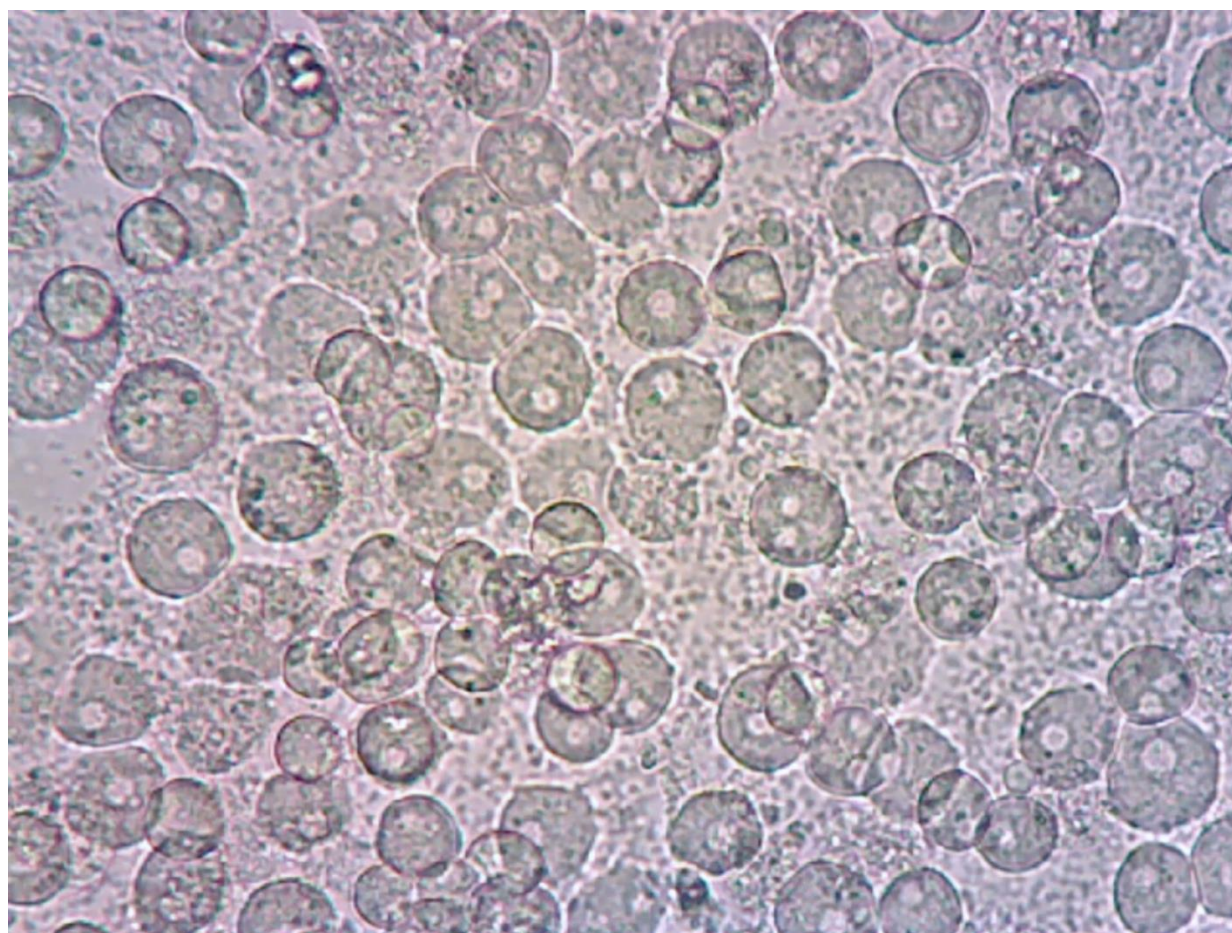




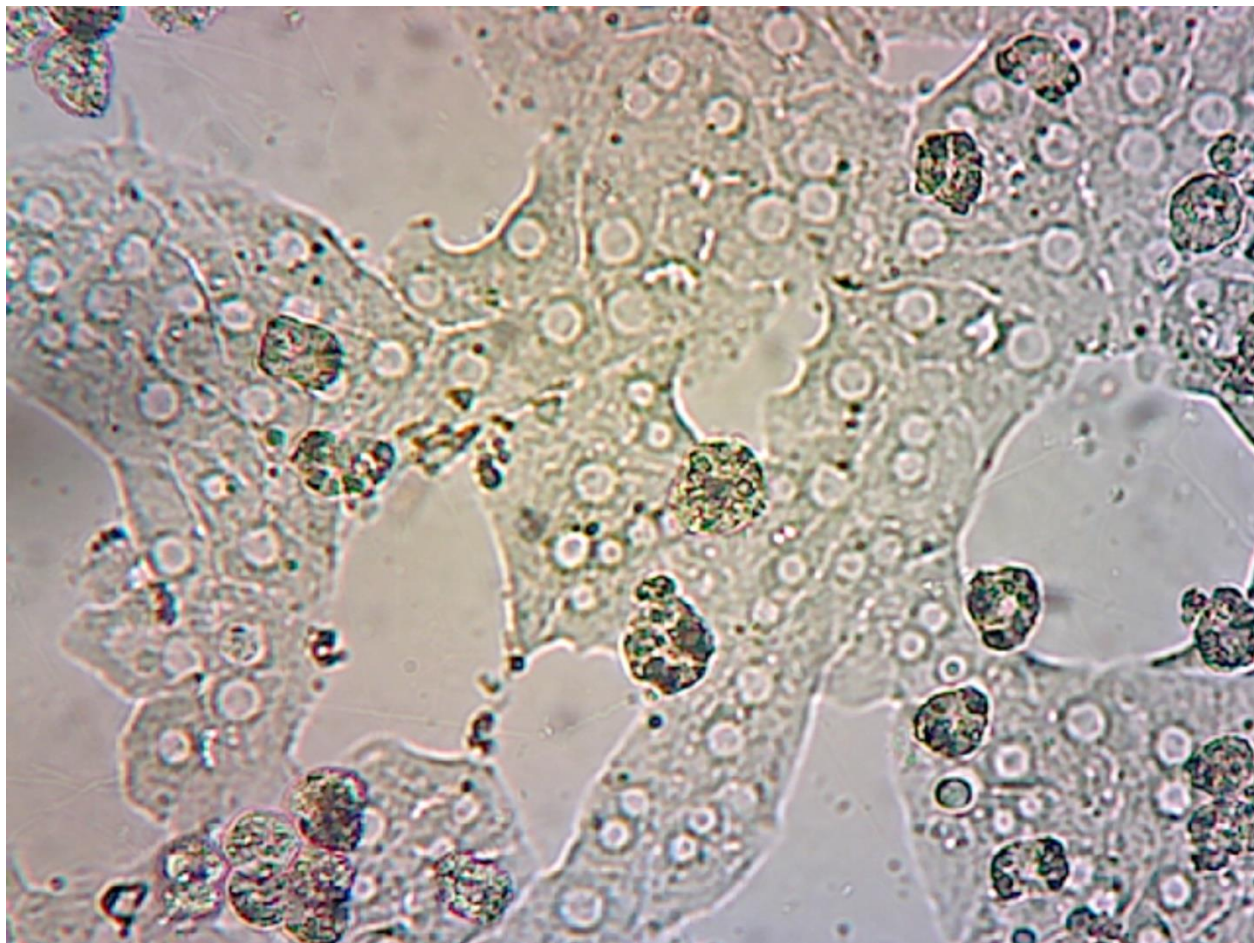
Slika 4. Perfuzija jetre *in situ*.

### 3.3.2.3. *Nasađivanje hepatocita*

Jetru sam pažljivo secirala te suspendirala hepatocite u mediju bez kolagenaze. Hepatocite sam ispirala 2 x u mediju bez kolagenaze. Nakon što se kolagenaza isprala, hepatocite sam suspendirala na koncentraciju od 1 milijun stanica po mL u mediju M-199 s dodanih 2 g govedeg albumina, 900 µg L-glutamina and 2.2 g NaHCO<sub>3</sub> po litri. Vijabilnost stanica odredila sam pomoću plave boje Tripan, koristila sam samo one koje su imale viabilitet veći od 95 %. Tri mL suspenzije stavila sam u petrijevke promjera 60 mm i inkubirala 24 sata u CO<sub>2</sub> inkubatoru (Heraeus, Hanau, Njemačka) na 37 °C i mješavini zraka i 5 % CO<sub>2</sub>. Nakon 4 sata inkubacije, medij sam izmjerila da bih odstranila mrtve i neprihvaćene hepatocite (slika 5.) a potom ponovno inkubirala 20 sati do pokusa (slika 6.).



Slika 5. Hepatociti štakora nakon četiri sata inkubacije, prije izmjene medija. Hepatociti su okrugli, i većina ih je prihvaćena za podlogu.



Slika 6. Hepatociti nakon 24 sata inkubacije, neposredno prije pokusa. Većina hepatocita se oporavila i ima karakterističan romboidan izgled. Hepatociti nakon 24 sata u kulturi organiziraju tračke, kakve nalazimo u jetri. Crne stanice su mrtve stanice koje plutaju u mediju i koje će se prilikom ispiranja odstraniti.

#### **3.3.2.4. Pokus otpuštanja glukoze iz hepatocita**

Nakon 24 sata u inkubatoru, medij sam odstranila i dodala 2 mL Hanks Hepesa bez glukoze s dodatkom 10 mmol/L piruvata bez dodatka hormona (SD ili MDB), s dodatkom od 80 nmol/l inzulina (SD(I) ili MDB(I)) s dodatkom 200 nmol/l glukagona (SD(G) ili MDB(G)) te s dodatkom oba hormona (SD(GI) ili MDB(GI)). Nakon 0., 60., 120. i 180. minute inkubacije 100  $\mu$ L uzorka uzela sam iz svake petrijevke za određivanje glukoze. Uzorke sam odmah po uzimanju

zamrznula. Nakon tri sata inkubacije medij sam odstranila i isprala kulture fiziološkom otopinom te ih smrznula u tekućem dušiku.

### **3.3.2.5. Parametri**

#### **3.3.2.5.1. Glukoza**

Za određivanje glukoze koristila sam se enzimatskom metodom GOD-PAP (Glucose Liquicolor set).

#### **3.3.2.5.2. Proteini**

Hepatocyte sam digestirala u 0.2 M otopini NaOH te enzimatskom metodom po Lowry-ju<sup>85</sup> određivala sadržaj proteina.

Rezultate sam prikazala kao nmol glukoze/ mg proteina.

## **3.4. Statistička analiza**

Rezultati statističkih analiza prikazani su u obliku tablica i slika. Promatrane varijable su prikazane srednjom vrijednošću i standardnom devijacijom. Za uspoređivanje promatranih varijabli između odabranih skupina koristili smo se testom One-Way ANOVA uz *post hoc* Tukey testom, a za uspoređivanje promatranih vrijednosti između dviju skupina, korišteni je t-test.

*P-vrijednost* postavljena je na  $\leq 0,05$ .

Broj životinja odredili smo, poštujući "3R" pristup, metodom "Resource Equation" pomoću formule :

$$E = (\text{Ukupni broj životinja u pokusu}) - (\text{broj grupa})$$

Gdje nam je E broj stupnjeva slobode u testu ANOVA i trebao bi biti između 10 i 20<sup>86</sup>.

## 4. REZULTATI

---

## 4.1. Pokusi *in vivo*

### 4.1.1. Unos hrane

U praćenih životinja analizirani je dnevni unos i ukupni unos hrane u gramima i kilodžulima.

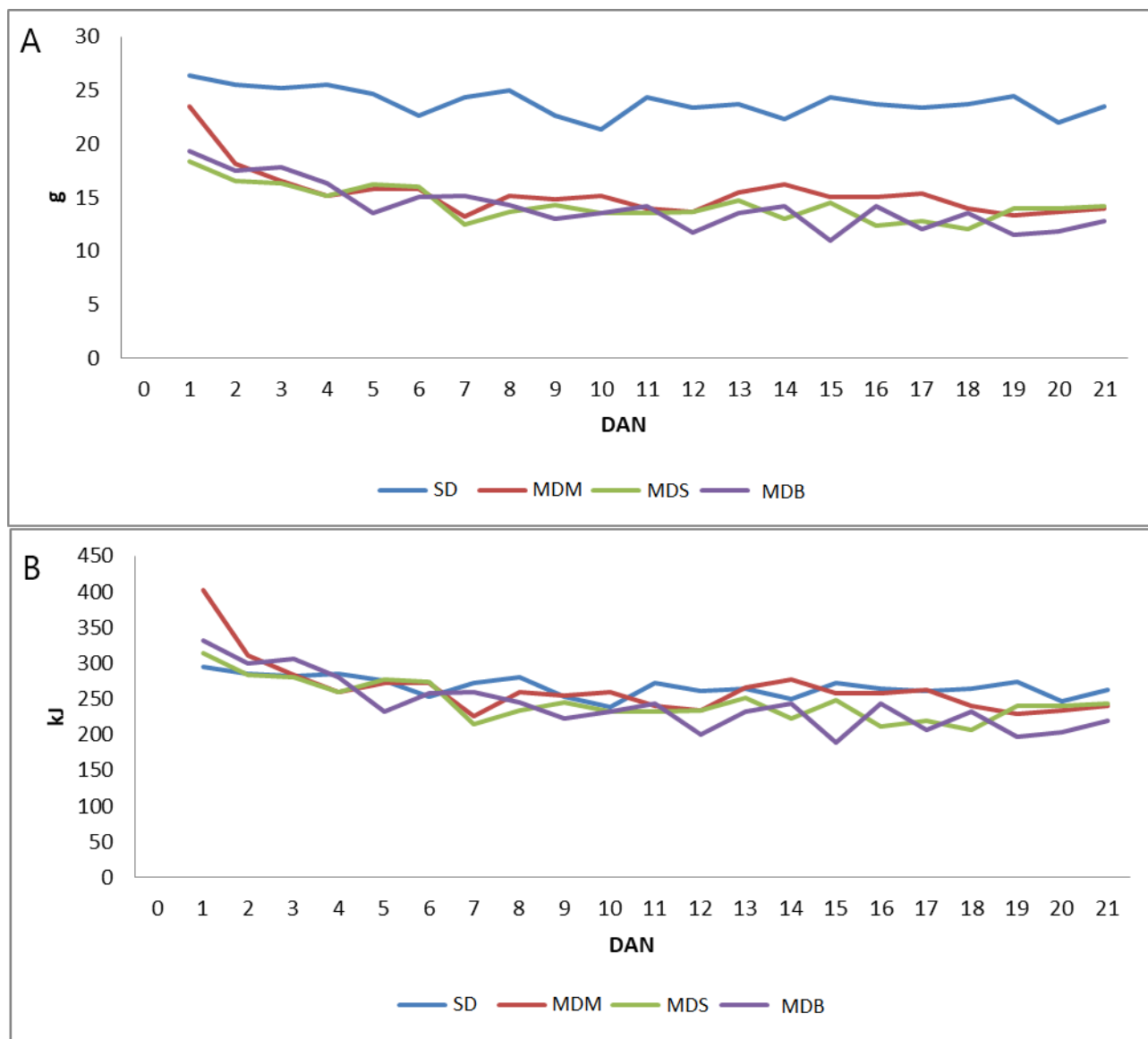
U tablici 6. navedene su srednje vrijednosti i standardne devijacije dnevnog unosa hrane u gramima (g) i kilodžulima (kJ) te ukupnog unosa hrane u gramima (g) i kilodžulima (kJ). Statistički značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) između kontrolne skupine SD i svih skupina hranjenih visokomasnom prehranom označene su u tablici s \* ispred vrijednosti.

Tablica 6. DNEVNI I UKUPNI UNOS HRANE U (g) i (kJ)

	<b>SD</b>	<b>MDM</b>	<b>MDS</b>	<b>MDB</b>
Dnevni unos hrane (g)	23,90 ± 1,73	*15,38 ± 0,51	*14,34 ± 1,03	*14,08 ± 1,53
Dnevni unos hrane (kJ)	266,9 ± 19,3	263,5 ± 8,7	245,6 ± 17,6	241,2 ± 26,2
Ukupni unos hrane (g)	501,8 ± 36,3	*323,0 ± 10,7	*301,2 ± 23,2	*295,8 ± 32,1
Ukupni unos hrane (kJ)	5605,5 ± 505,1	5618,6 ± 183,5	5159,6 ± 397,4	5067,1 ± 549,9

Vrijednosti prikazane kao srednje vrijednosti uz pripadajuću aritmetičku sredinu. Vrijednosti označene \* statistički se razlikuju od skupine SD ( $p \leq 0,05$ ).

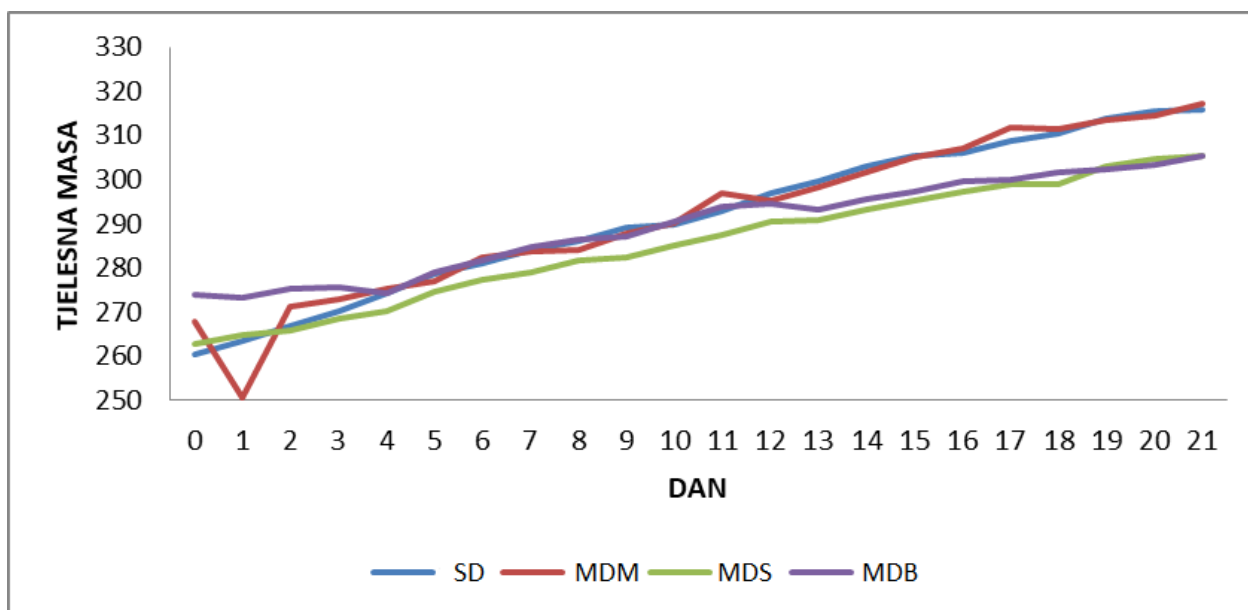
Unos hrane u sve četiri grupe životinja bio je stabilan kroz cijeli eksperiment što se može vidjeti na slici 7. (7.A unos hrane u gramima; 7.B unos hrane u kilodžulima). Životinje u kontrolnoj grupi konzumirale su značajno više hrane u gramima nego životinje hranjene visokomasnom prehranom, i to u dnevnom i ukupnom unosu, ali razlike u energetske unosu između životinja na standardnoj hrani i visokomasnoj prehrani nije bilo, kao što je prikazano na slici 7.



Slika 7. Dnevni unos hrane u gramima A i kilodžulima B . Standardna hrana (SD) ili visokomasna prehrana s dodatkom maslinovog ulja (MDM) ili visokomasnom prehrana s dodatkom suncokretovog ulja (MDS) ili visokomasna prehrana s dodatkom ulja bučinih koštica.

#### 4.1.2. Dobivanje na masi

Na slici 8. prikazana je dnevna promjena u masi životinje kroz tri tjedna. Prikazane vrijednosti su srednje vrijednosti mase u gramima. Nije bilo statistički značajne razlike u masi životinja na početku pokusa niti kroz sva tri tjedna pokusa. Životinje su gotovo pravilno, linearno, dobivale na masi. Jedino je skupina hranjena bučnim uljem oko dvanaestog dana stagnirala, ali bez značajnog utjecaja na razliku između skupina, da bi nastavila dobivati nakon toga pravilno na masi. Najveća razlika bila je prvi dan pokusa kada su životinje hranjene maslinovim uljem izgubile na masi, ali taj gubitak nije bio značajan da bi bilo razlike u masi životinja na taj dan između skupina.



Slika 8. Masa životinja u gramima po danima pokusa. Nije bilo statistički značajne razlike u masi životinja između skupina. Standardna hrana (SD) ili visokomasna prehrana s dodatkom maslinova ulja (MDM) ili visokomasna prehrana s dodatkom suncokretova ulja (MDS) ili visokomasna prehrana s dodatkom ulja bučinih koštica.

Na kraju pokusa nije bilo statističke razlike u masi životinja niti u postotku dobivene mase (tablica 7.). Životinje iz skupine MDB, zbog blage stagnacije u dobivanju na masi oko dvanaestog dana pokusa dobile su ukupno nešto manje mase od ostalih skupina, ali ta razlika nije bila statistički značajna ni u završnoj masi između grupa niti u postotku dobivene mase.



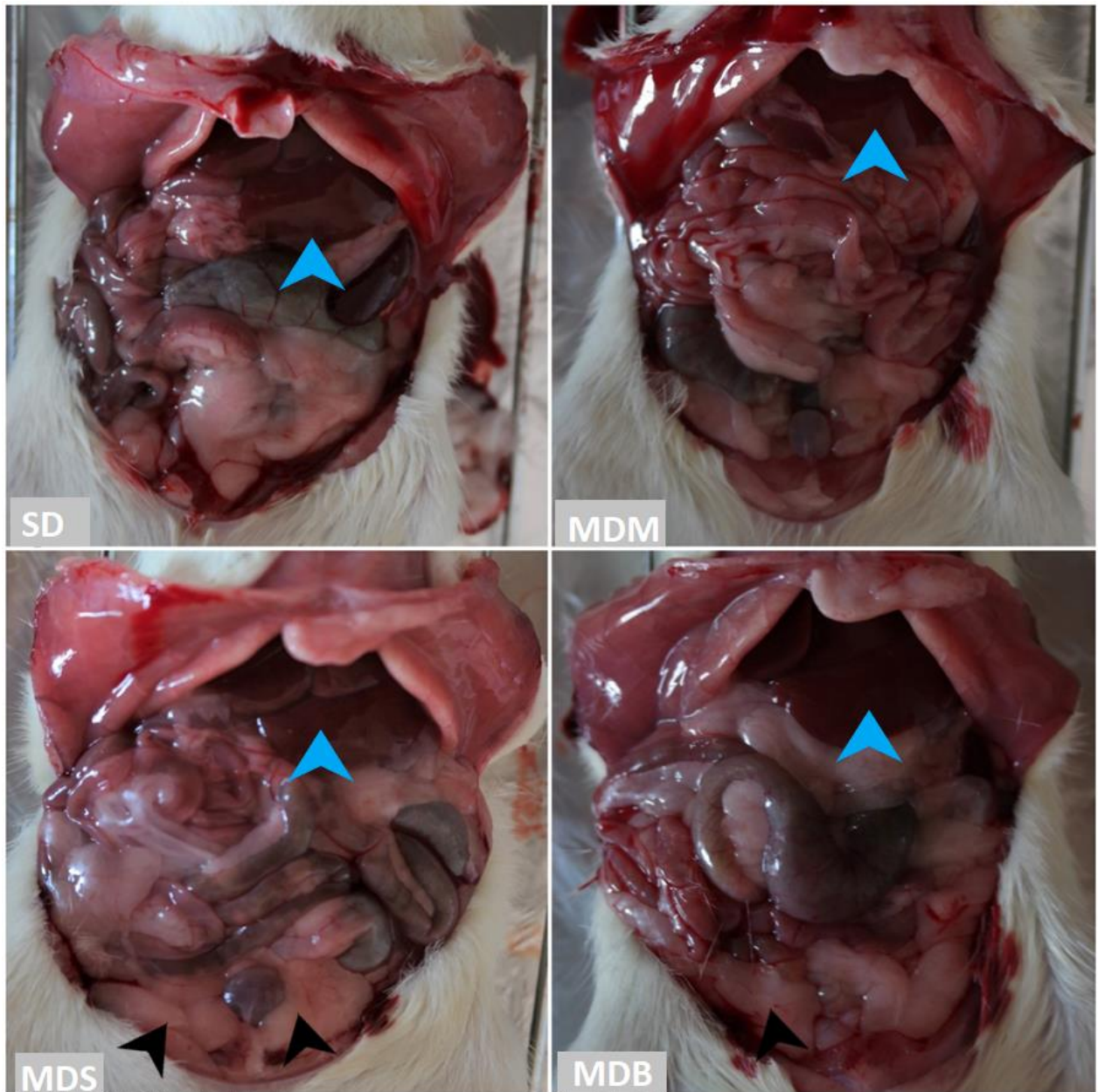
Tablica 7. MASA ŽIVOTINJA NA POČETKU TE NA KRAJU POKUSA

	<b>SD</b>	<b>MDM</b>	<b>MDS</b>	<b>MDB</b>
Inicijalna masa (g)	268 ± 29	268 ± 38	252 ± 11	274 ± 23
Finalna masa (g)	324 ± 21	317 ± 33	297 ± 11	305 ± 20
Ukupno dobiveno na masi (%)	21,7 ± 9,1	19,1 ± 5,4	18,1 ± 5,2	11,8 ± 4,9

Inicijalna masa u gramima na početku pokusa. Finalna masa nakon 21 dana dijete. Standardna hrana (SD) ili visokomasna prehrana s dodatkom maslinova ulja (MDM) ili visokomasnom prehrana s dodatkom suncokretova ulja (MDS) ili visokomasna prehrana s dodatkom ulja bučinih koštica. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Iako nije bio zabilježen značajan porast mase kod životinja hranjenih visokomasnom prehranom u odnosu na kontrolu koji bi govorio u prilog debljini i pretilosti, kod otvaranja trbušne šupljine, štakori koji su hranjeni visokomasnom prehranom s dodatkom suncokretova ili bučina ulja imali su makroskopski evidentno visceralno nakupljanje masnoga tkiva kao što je prikazano na slici 9.

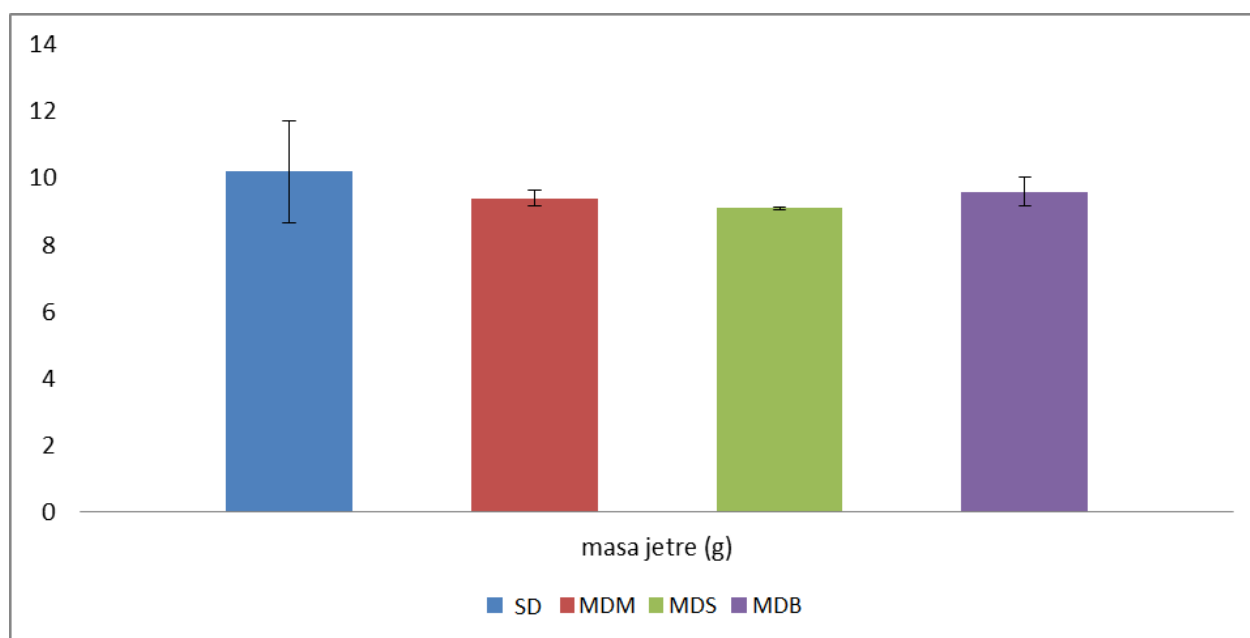
Štakori hranjeni maslinovim uljem imali su vizualno neznatno veću količinu visceralnog tkiva u odnosu na kontrolu. Štakori hranjeni suncokretovim uljem imali su obilje visceralnoga masnog tkiva, a to je povećanje bilo osobito evidentno u području epididimalnoga masnog tkiva( na slici označeno crnom strelicom). Štakori hranjeni bučnim uljem imali su povećanu količinu visceralnoga masnog tkiva, ali ne tako obilnu kao kod suncokretova ulja.



Slika 9. Organi viscere *in situ* nakon 21 dana prehrane standardnom hranom (SD) ili visokomasnom prehranom s dodatkom maslinova ulja (MDM) ili visokomasnom prehranom s dodatkom suncokretova ulja (MDS) ili visokomasnom prehranom s dodatkom ulja bučinih koštica. Plava strelica označuje jetru, a crna strelica u MDS i MDB grupama označuje epididimalno masno tkivo.

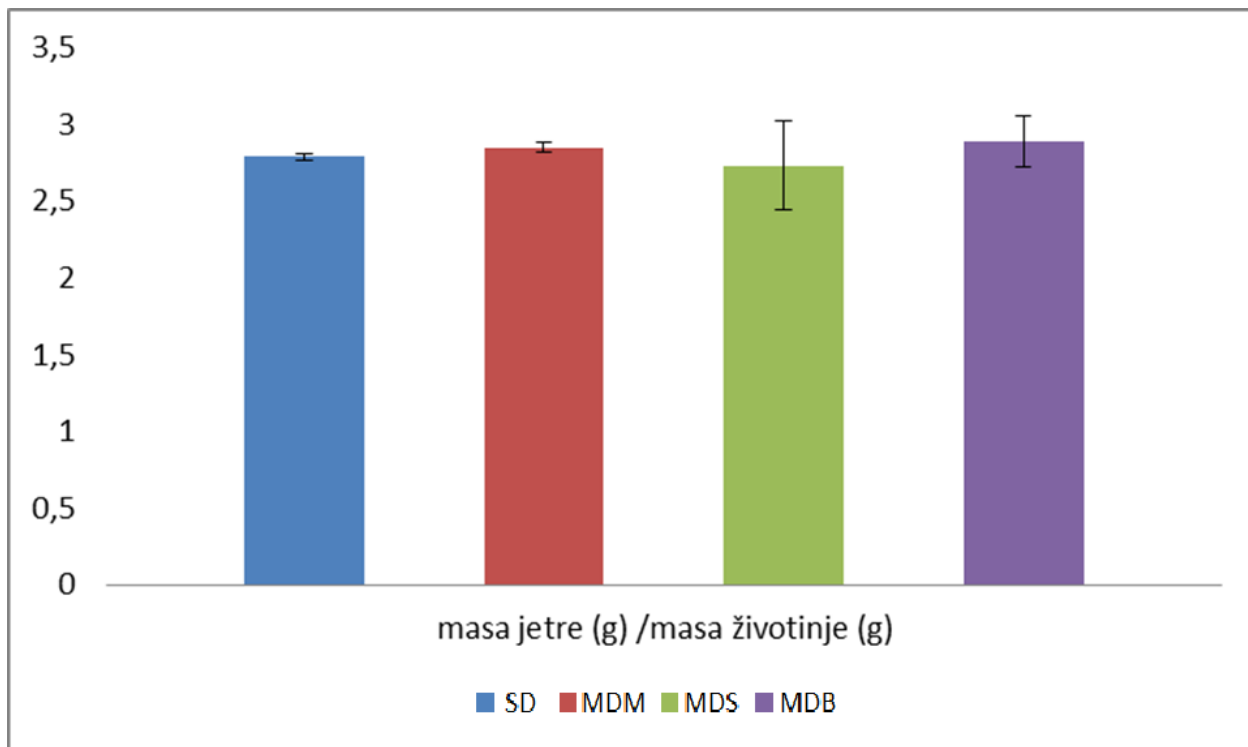
### 4.1.3. Masa jetre i makroskopski izgled jetre

Masa jetre kod svih skupina nije se značajno statistički razlikovala. Na slici 10. prikazane su srednje vrijednosti mase jetre u gramima s pripadajućom standardnom devijacijom.



Slika 10. Masa jetre nakon 21 dana prehrane standardnom hranom (SD) ili visokomasnom prehranom s dodatkom maslinova ulja (MDM) ili visokomasnom prehranom s dodatkom suncokretova ulja (MDS) ili visokomasnom prehranom s dodatkom ulja bučinih koštica. Prikazane vrijednosti su srednje vrijednosti uz pripadajuću standardnu devijaciju.

Omjer mase jetre i mase životinje, kao što je prikazano na slici 11. bio je bez značajne razlike između grupa.



Slika 11. Omjer mase jetre i mase životinje nakon 21 dana prehrane standardnom hranom (SD) ili visokomasnom prehranom s dodatkom maslinova ulja (MDM) ili visokomasnom prehranom s dodatkom suncokretova ulja (MDS) ili visokomasnom prehranom s dodatkom ulja bučinih koštica. Prikazane vrijednosti su srednje vrijednosti uz pripadajuću standardnu devijaciju.

Makroskopski (slika 12.), jetra iz kontrolne skupine imala su tamnu, bogatu boju. Jetra iz skupina hranjenih visokomasnom prehranom bila su nešto svjetlije boje koja je najočitija bila u grupi hranjenoj dodatkom suncokretova ulja, a najmanje u grupi hranjenoj dodatkom maslinova ulja. U grupi hranjenoj suncokretovim uljem, iako nije bilo značajne razlike u težini jetre, jetreni režnjevi izgledali su otečeno. Kod svih skupina jetra su na dodir bila glatka.



Slika 12. Makroskopski prikaz jetre nakon 21 dana prehrane standardnom hranom (SD) ili visokomasnom prehranom s dodatkom maslinova ulja (MDM) ili visokomasnom prehranom s dodatkom suncokretova ulja (MDS) ili visokomasnom prehranom s dodatkom ulja bučinih koštica.

#### 4.1.4. Lipidni profil plazme

Životinjama iz skupina SD, MDM, MDS i MDB enzimatski je određivana koncentracija ukupnog kolesterola, triglicerida, HDL-kolesterol, a računski LDL-kolesterol i Non-HDL-kolesterol. U tablici 8. navedene su srednje vrijednosti i pripadne vrijednosti standardne devijacije u kontrolnoj skupini i skupinama hranjenih visokomasnom prehranom.

Tablica 8. LIPIDNI PROFIL PLAZME ŠTAKORA NAKON 21 DANA STANDARDNE ILI EKSPERIMENTALNE DIJETE

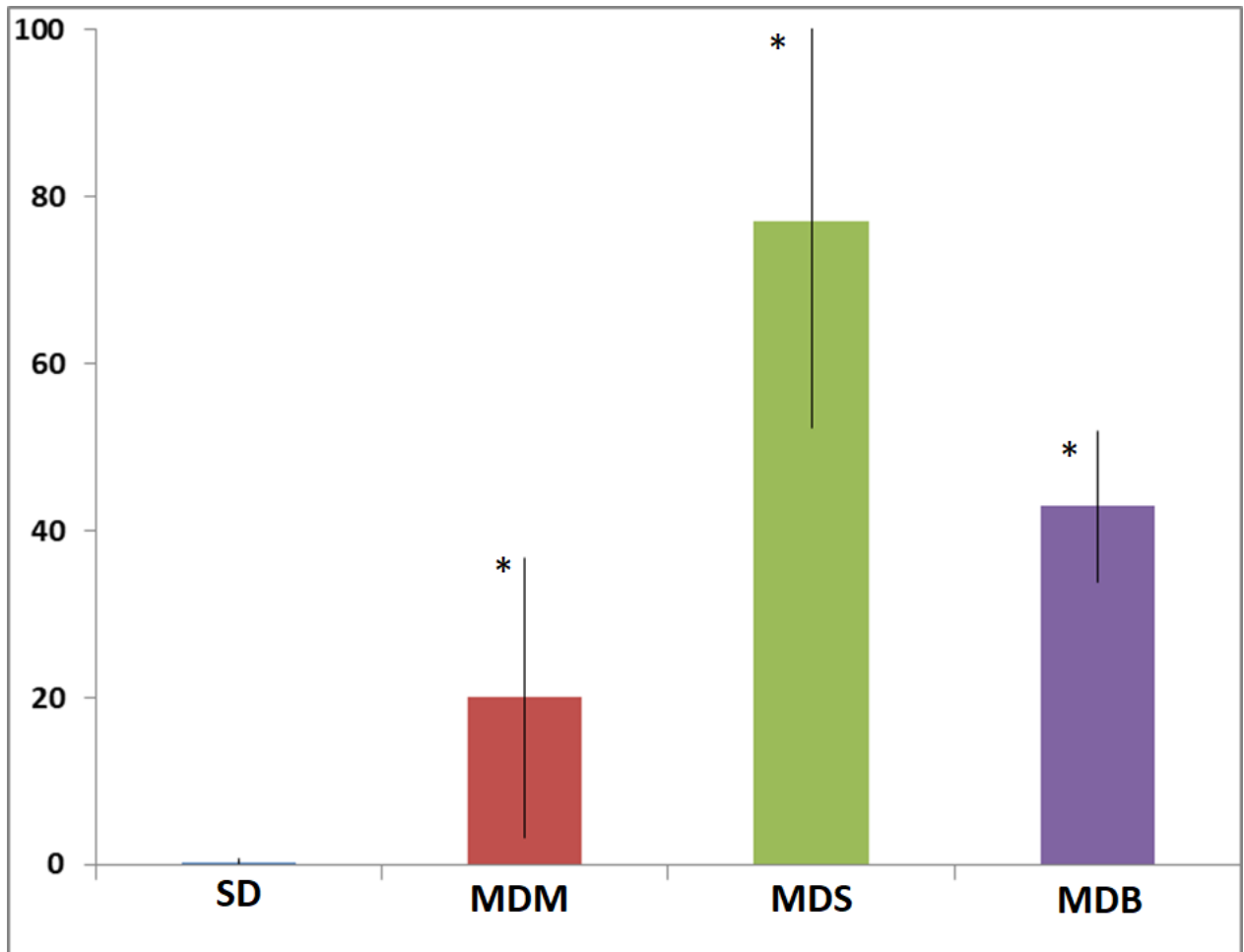
	<b>SD</b>	<b>MDM</b>	<b>MDS</b>	<b>MDB</b>
TG (mmol/L)	0,43 ± 0,18	0,63 ± 0,40	0,41 ± 0,18	0,46 ± 0,20
Total-CH (mmol/L)	0,94 ± 0,10	0,95 ± 0,09	0,97 ± 0,03	0,94 ± 0,09
HDL (mmol/L)	0,49 ± 0,13	0,41 ± 0,06	0,46 ± 0,12	0,48 ± 0,17
LDL (mmol/L)	0,26 ± 0,16	0,25 ± 0,14	0,32 ± 0,19	0,25 ± 0,16
Non-HDL (mmol/L)	0,45 ± 0,13	0,54 ± 0,07	0,51 ± 0,12	0,46 ± 0,21

Prehrana standardnom hranom (SD) ili visokomasnom prehranom s dodatkom maslinova ulja (MDM) ili visokomasnom prehranom s dodatkom suncokretova ulja (MDS) ili visokomasnom prehranom s dodatkom ulja bučinih kostica. TG, trigliceridi; Total-CH, ukupni kolesterol; HDL, lipoprotein velike gustoće; LDL, lipoprotein male gustoće, Non-HDL, ukupni lipoproteini koji nisu velike gustoće.

U odnosu na kontrolnu skupinu SD, koncentracija TG, totalnog kolesterola i HDL-kolesterola statistički se ne razlikuju. Izračunate vrijednosti LDL-kolesterola i Non-HDL-kolesterola također ne pokazuju razliku u odnosu na kontrolnu skupinu.. Nije bilo razlike u mjerenim i izračunatim parametrima između skupina hranjenih visokomasnom prehranom s dodatkom različitih ulja.

#### 4.1.5. Histološka analiza i usporedba

Na slici 13. prikazani su postoci masno infiltriranih hepatocita dobiveni brojenjem pomoću rešetke. Prikazane vrijednosti su srednja vrijednost po grupama uz standardnu devijaciju.



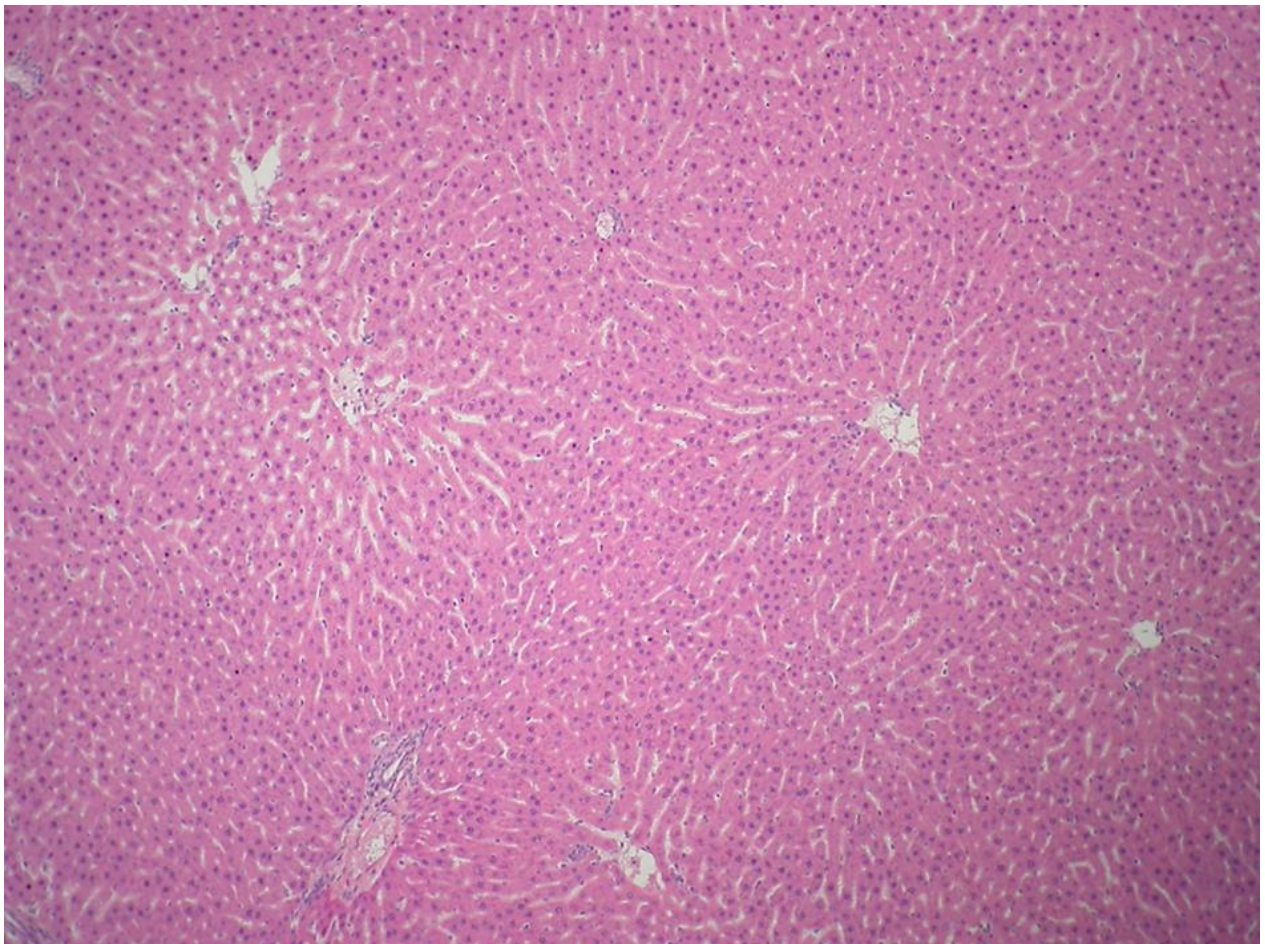
Slika 13. Postotak hepatocita s masnim kapljicama nakon 3 tjedna hranjenja standardnom prehranom (SD) ili visokomasnom prehranom s maslinovim uljem (MDM), suncokretovim uljem (MDS) ili bučnim uljem (MDB). Navedene vrijednosti su srednja vrijednost uz pripadajuću standardnu devijaciju dobivena brojenjem hepatocita iz 12 nasumično odabranih polja po grupi životinja. Vrijednosti označene \* statistički se razlikuju od skupine SD ( $p \leq 0,05$ ).

Postotak hepatocita u grupi SD odgovara stupnju 0. i statistički se značajno razlikuje ( $p \leq 0,05$ ) od grupe MDM, MDS i MDB. MDM pokazuje 1. stupanj steatoze i značajno ( $p \leq 0,05$ ) i se razlikuje od grupe SD, MDS i MDB. MDS pokazuje 3. stupanj steatoze i razlikuje se ( $p \leq$

0,05) od grupe SD, MDM i MDB. Grupa MDB ima 2. stupanj steatoze i značajno se razlikuje od grupe SD, MDM i MDS.

#### **4.1.5.1. Histološka analiza kontrolne skupine**

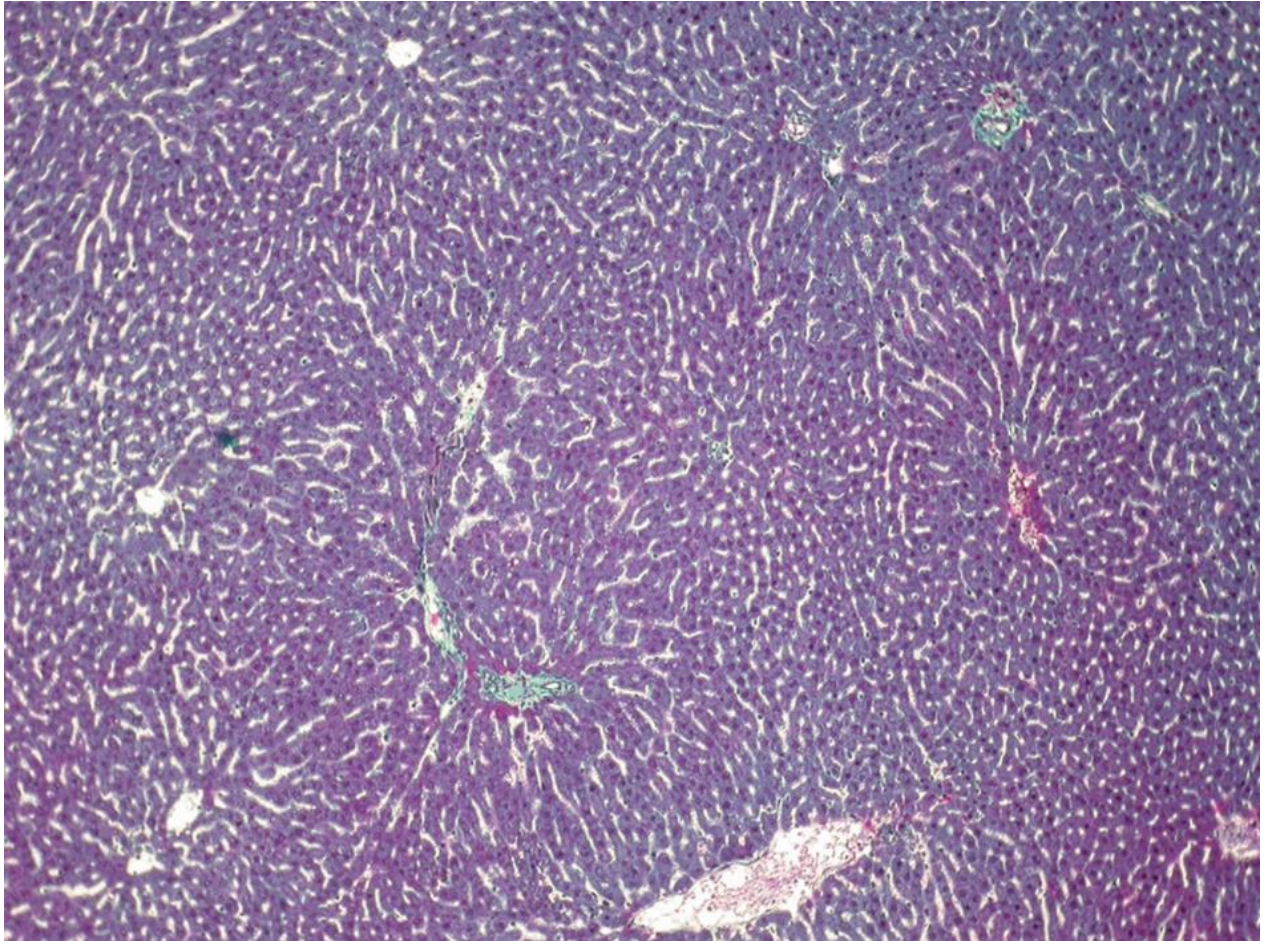
Histološka analiza HE (slika 14.) i Masson trikrom (slika 15. i slika 16.) obojenih preparata u kontrolnoj grupi pokazuju normalnu histološku građu jetre. Stupanj steatoze je 0. Hepatociti su poslagani u tračke koji se protežu od centralne zone s centralnom venom prema portalnoj zoni s jasno vidljivim sinusoidnim prostorima.



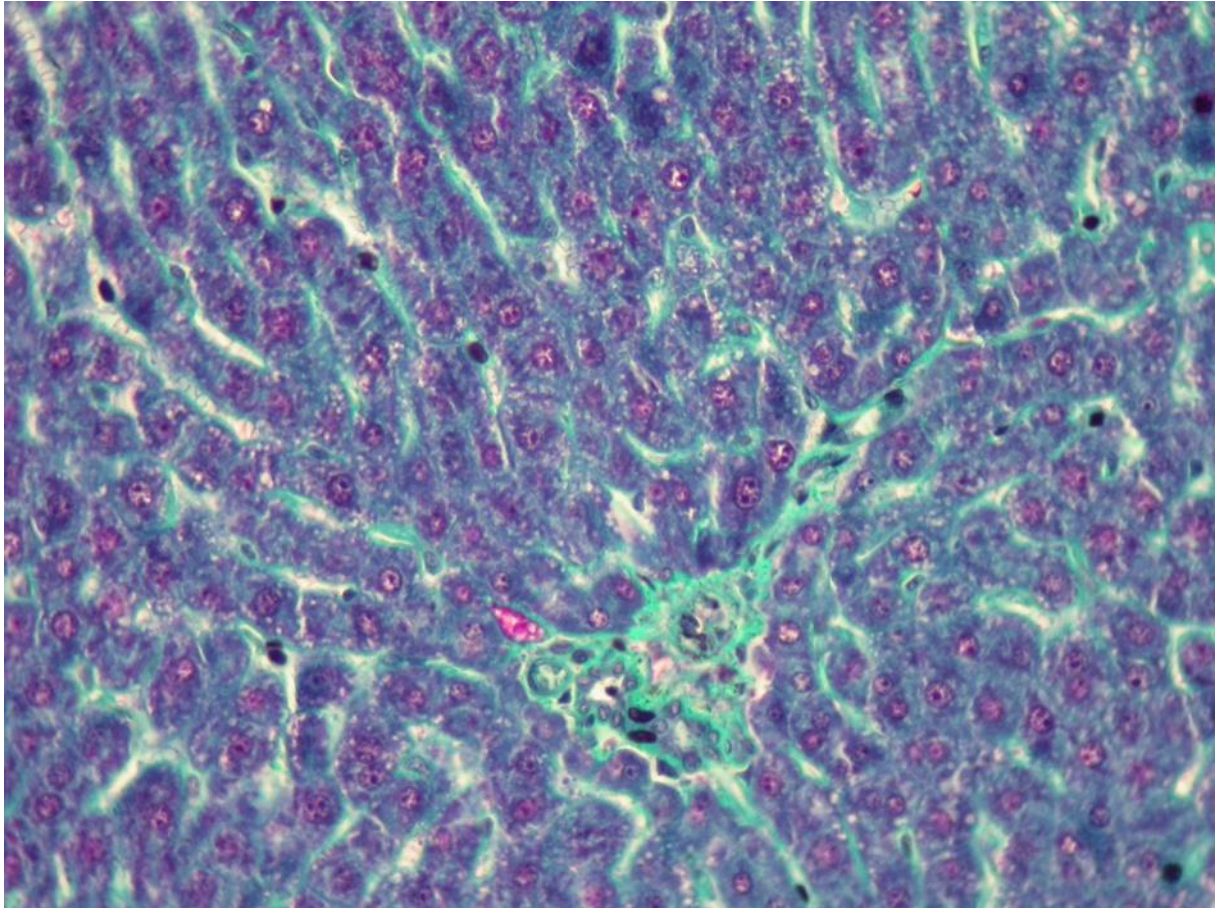
Slika 14. HE, 100 x uvećanje histološkog preparata skupine SD. Nisu vidljive promjene koje bi odgovarale NAFLD-u.

Na preparatima nema vidljivih upalnih žarišta ili znakova baloniranja ili hipertrofije hepatocita. Na trikrom obojenim preparatima nisu vidljive fibrotične promjene.





Slika 15. Preparat obojen Massonovom trikrom bojom za prikazivanje fibrotičnih promjena, uvećanje 100 x. Normalna građa jetre u skupini SD nakon 21. dana prehrane standardnom hranom.

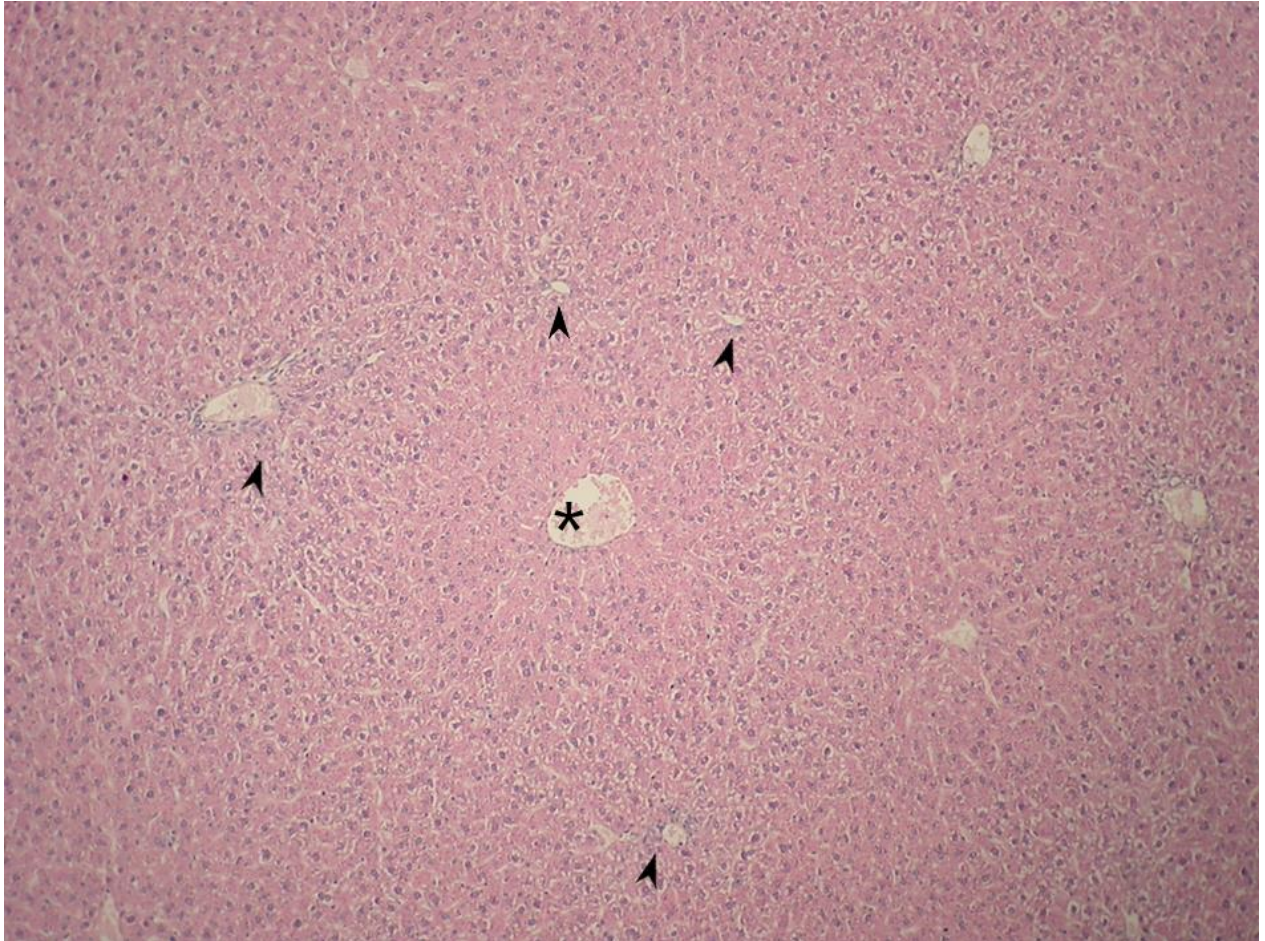


Slika 16. Preparat obojen Massonovom trikrom bojom za prikazivanje fibrotičnih promjena, uvećanje 400 x. Prikaz portalnog trijasa. Normalna građa jetre u skupini SD nakon 21. dana prehrane standardnom hranom.

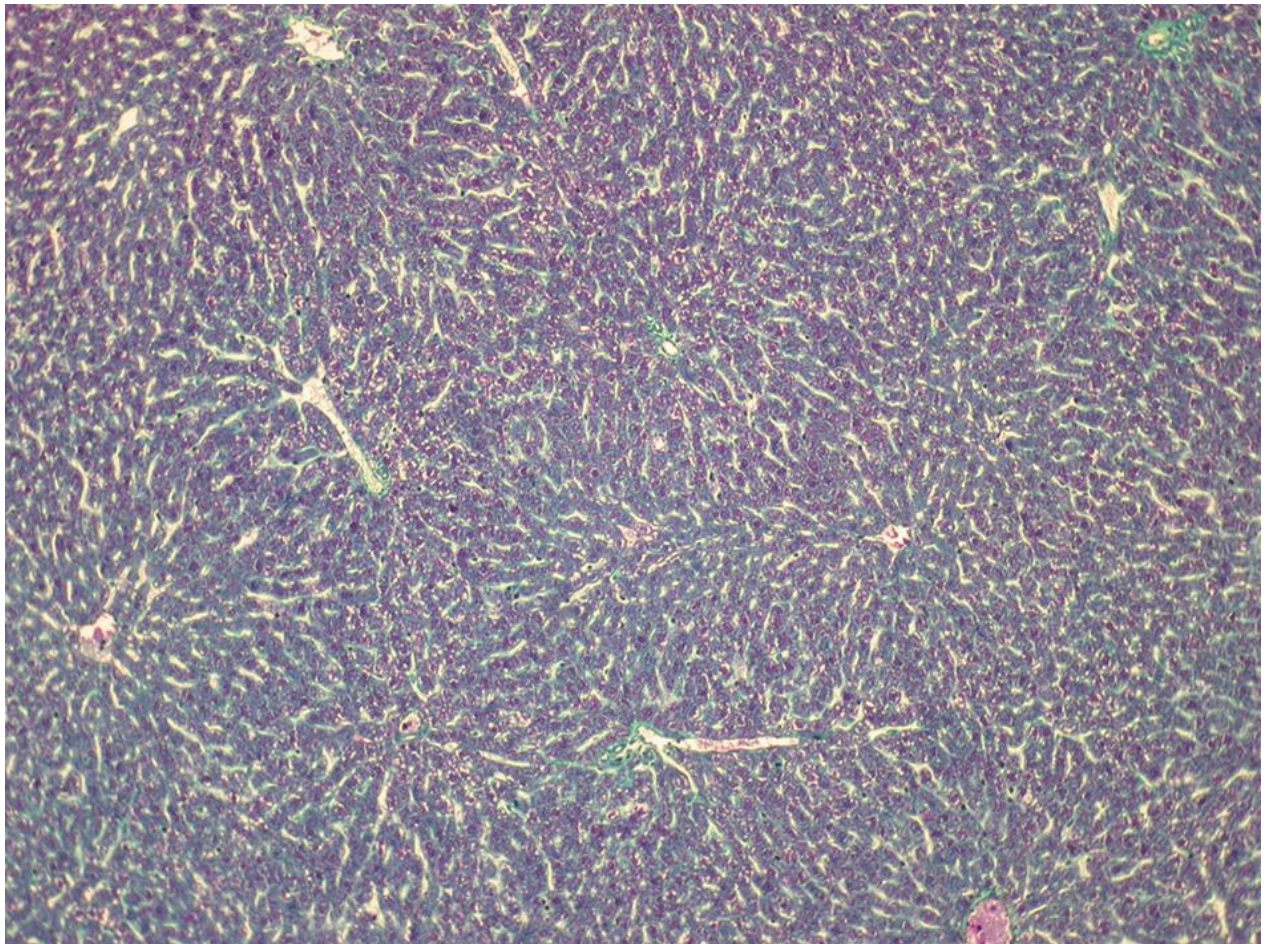
#### **4.1.5.2. Histološka analiza skupine tretirane maslinovim uljem**

Skupina hranjena visokomasnom prehranom s maslinovim uljem imala je blagu steatozu (slika 17.) što odgovara 1.stupnju.

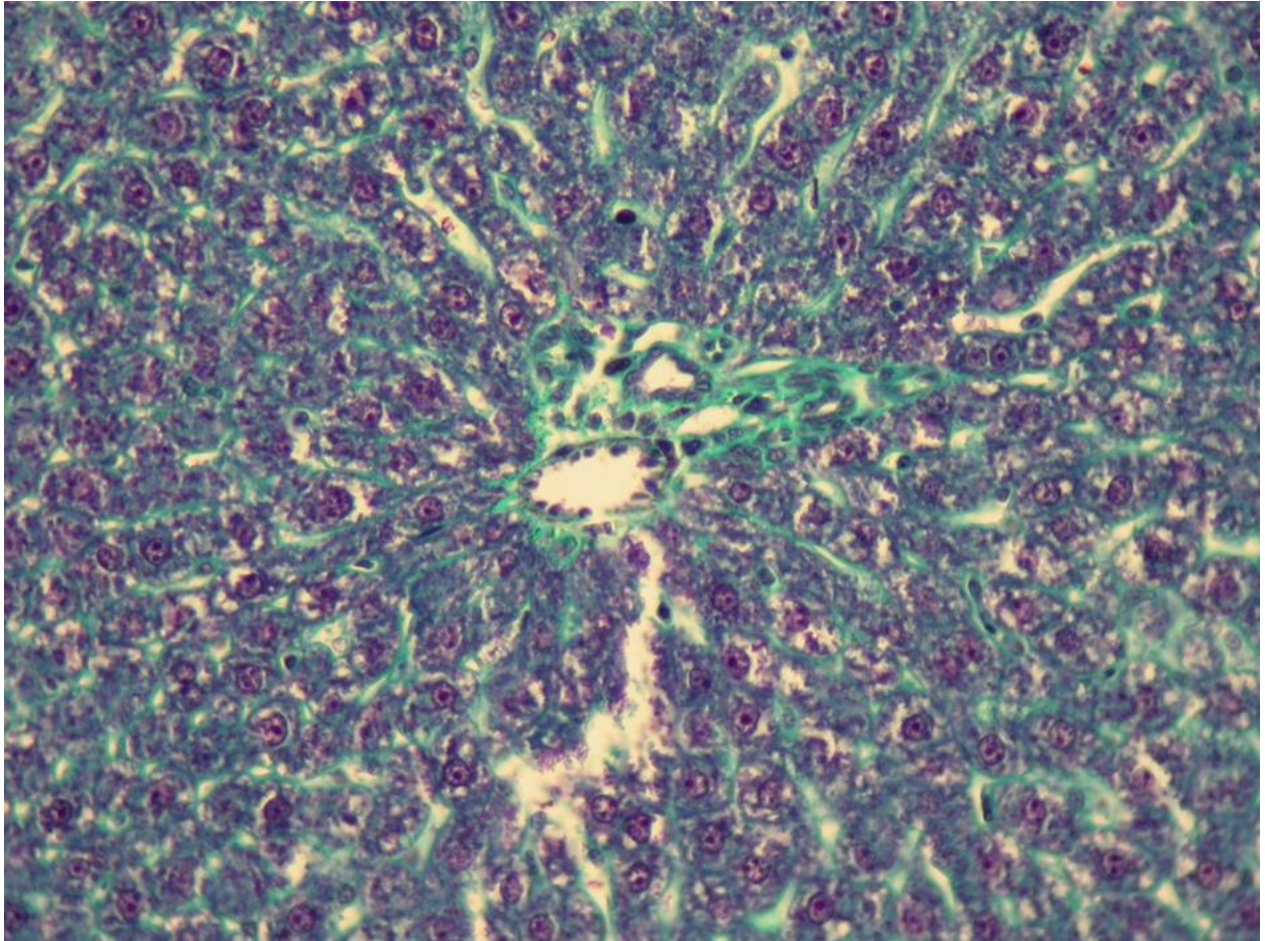
Kod skupine MDM prisutna je steatoza samo u periportalnoj zoni. Hepatociti u toj zoni pokazuju mikrovesikularnu steatozu gdje jezgra hepatocita nije potisnuta u stranu. Hepatociti su poslagani u vidljive tračke s normalno istaknutim sinusoidama. Nema znakova upale, baloniranja niti značajne hipertrofije hepatocita. Također nema naznaka fibroze (slike 18. i 19.).



Slika 17. HE, 100 x uvećanje histološkog preparata skupine MDM nakon 21 dana dijete. Vidljiva blaga steatoza u portalnom području. Na slici je označen jedan acinus; strelice označuju portalne trijase, a centralna vena označena je \*.



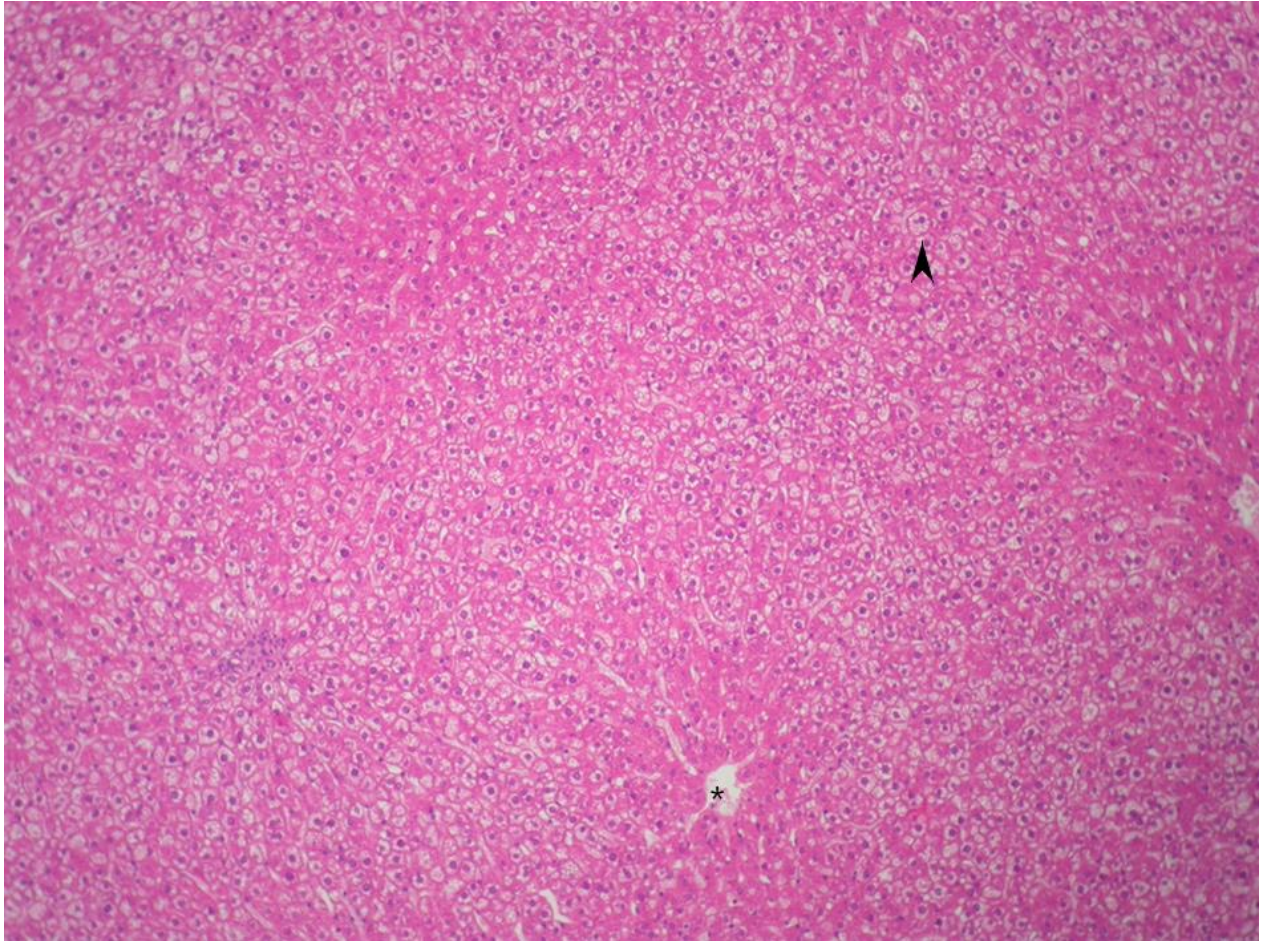
Slika 18. Preparat obojen Massonovom trikrom bojom za prikazivanje fibrotičnih promjena u skupini MDM nakon 21 dana dijete (uvećanje 100 x). Nema vidljivih fibrotičnih promjena.



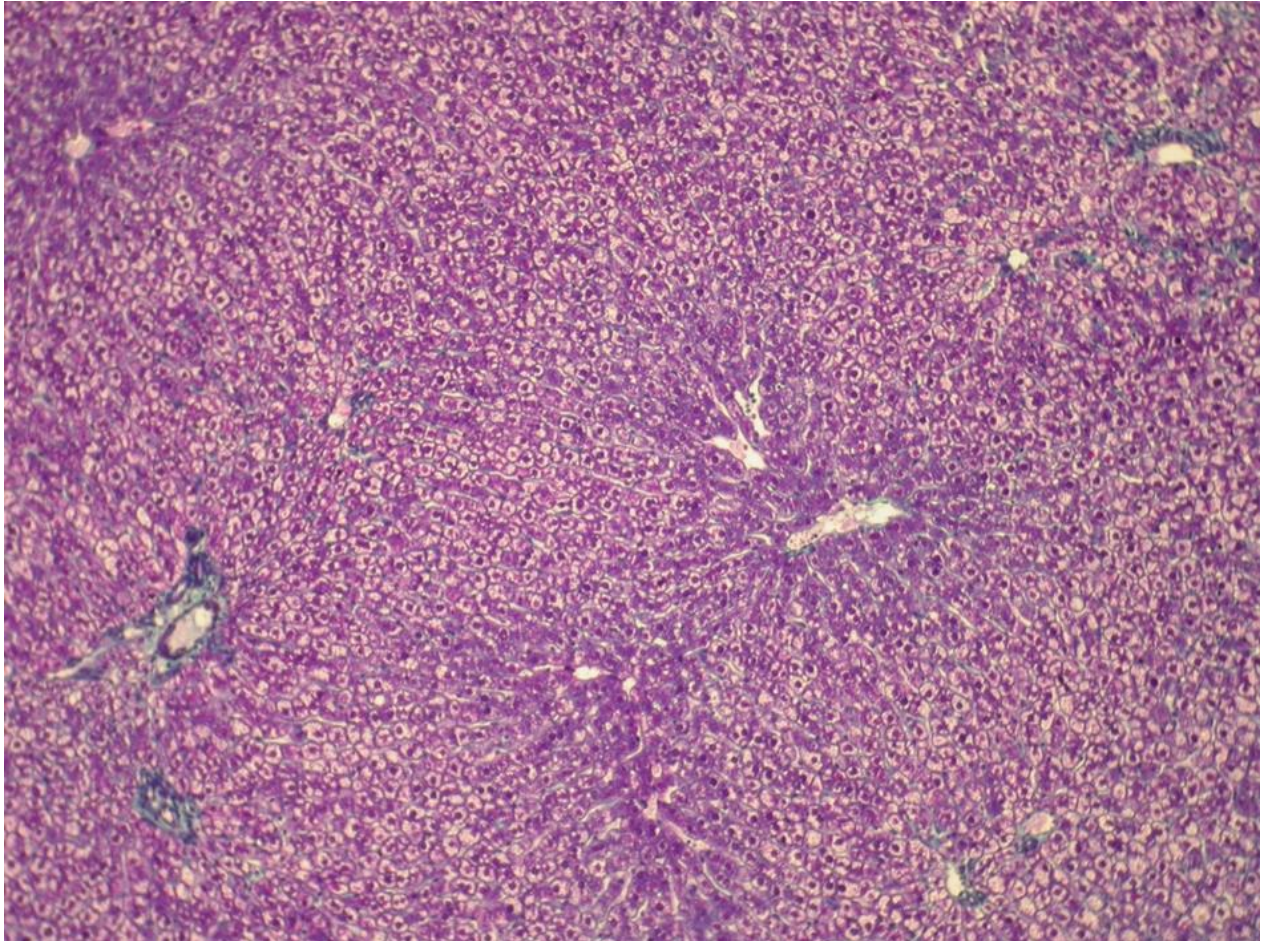
Slika 19. Preparat obojen Massonovom trikrom bojom za prikazivanje fibrotičnih promjena, uvećanje 400 x. Prikaz portalnog trijasa 21. dan visokomasne prehrane s dodatkom maslinova ulja nije uzrokovalo fibrotičke promjene u periportalnom prostoru.

#### ***4.1.5.3. Histološka analiza skupine tretirane suncokretovim uljem***

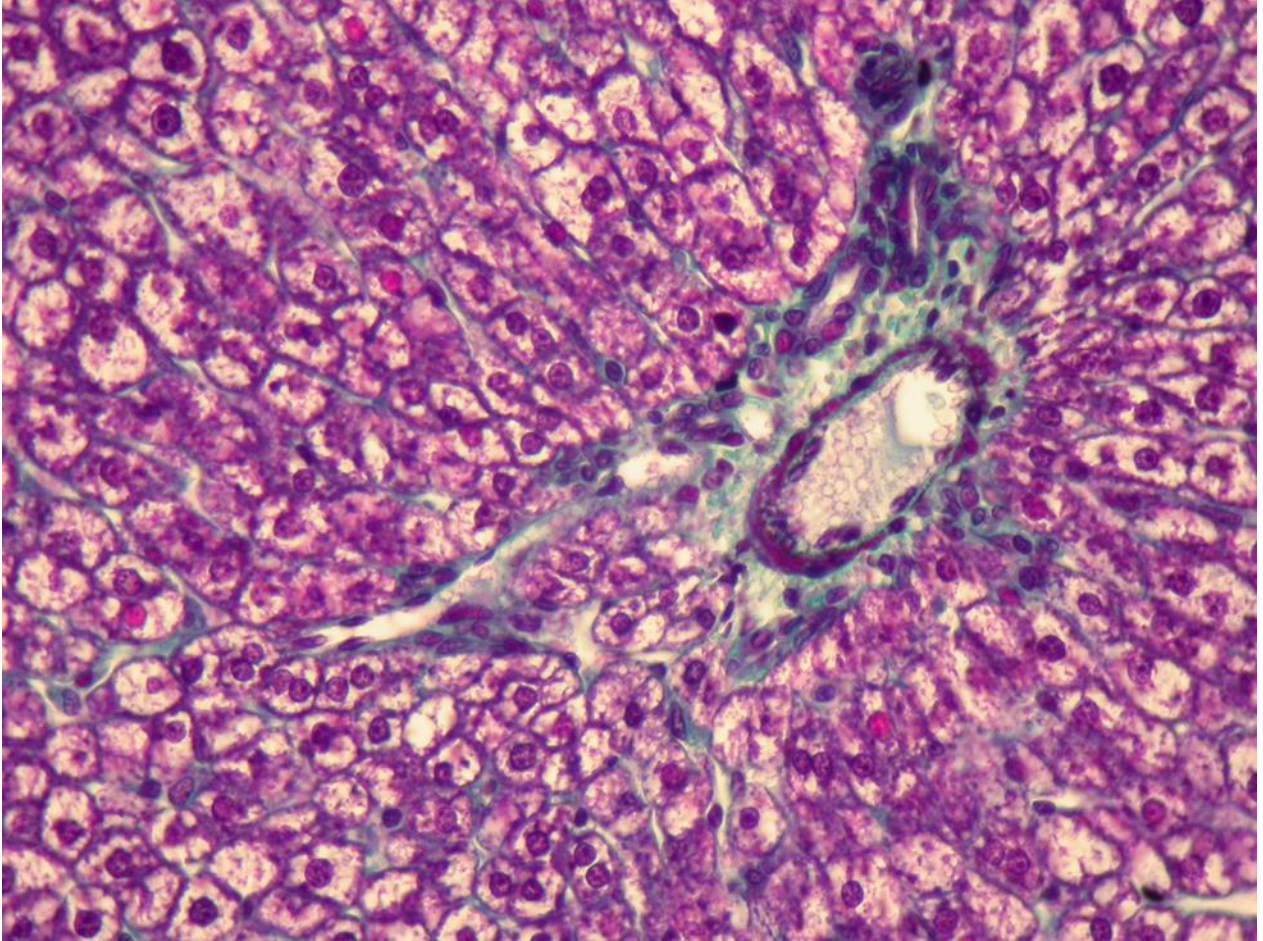
Skupina hranjena suncokretovim uljem ima nakupljanje lipida u sve tri acinarne zone što odgovara 3. stupnju steatoze (slika 20.). U periportalnoj i središnjoj zoni svi hepatociti su masno promijenjeni s obiljem sitnih masnih kapljica (mikrovesikularna steatoza). Dio hepatocita u centralnoj zoni također imao masnu infiltraciju. Vidljivo je da su hepatociti poslagani u tračke, ali sinusoidne u periportalnoj i središnjoj zoni su sužene, a pojedini hepatociti u tim zonama hipertrofirani zbog obilja masnih kapljica. Nije bilo naznaka upale ili fibroze (slike 21. i 22.).



Slika 20. Histološki prikaz jetre, HE, uvećanje 100 x , nakon 21. dana hranjena visokomasnom prehranom sa suncokretovim uljem. Vena centralis označena je \*, a strelicom primjer hipertrofiranog hepatocita.



Slika 21. Preparat obojen Massonovom trikrom bojom za prikazivanje fibrotičnih promjena u skupini MDS nakon 21 dana dijete. Nema vidljivih fibrotičnih promjena (uvećanje 100 x).

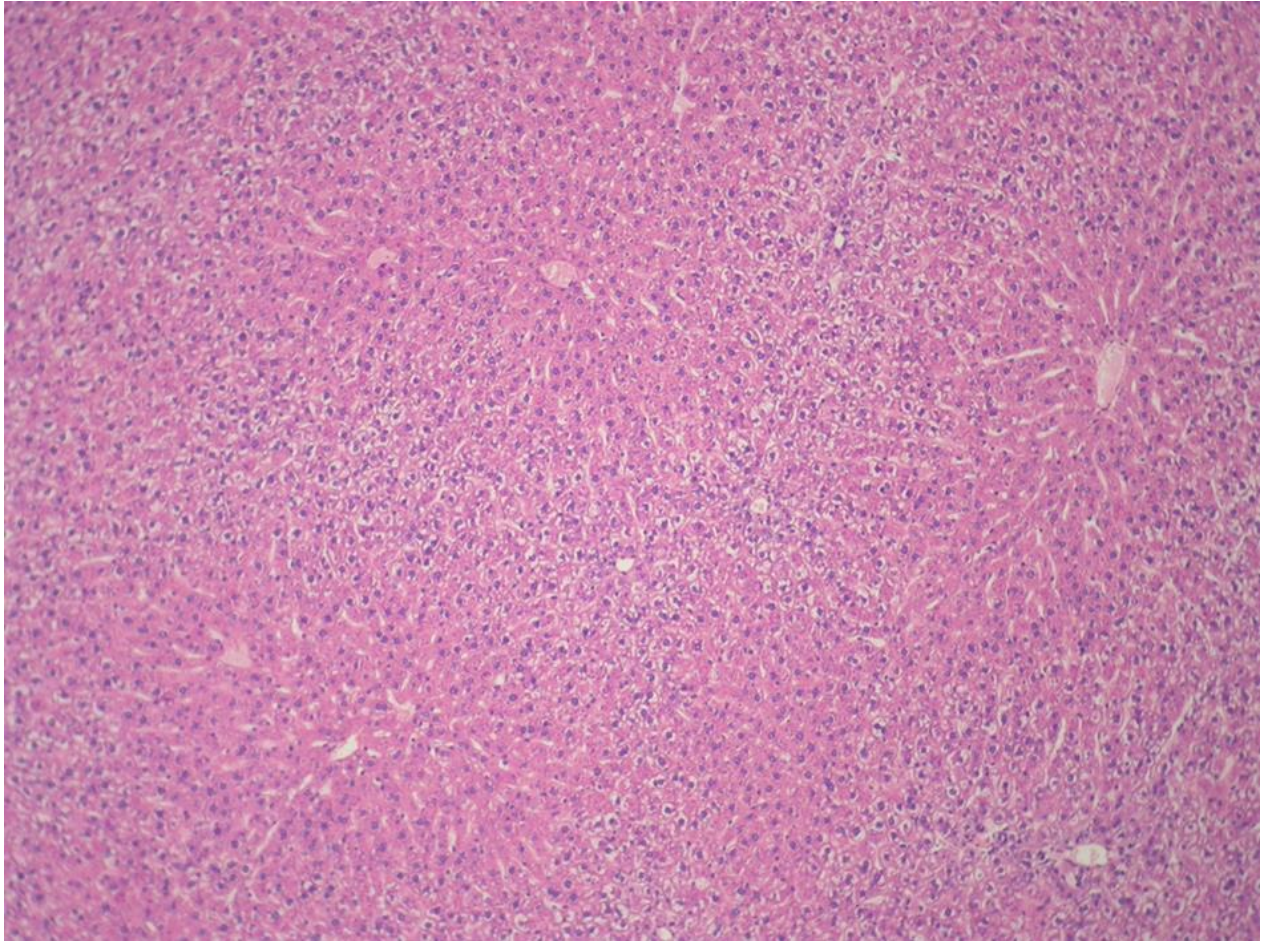


Slika 22. Preparat obojen Massonovom trikrom bojom za prikazivanje fibrotičnih promjena, uvećanje 400 x. Prikaz portalnog trijasa. 21. dan visokomasne prehrane s dodatkom suncokretova ulja nije uzrokovalo fibrotičke promjene u periportalnom prostoru.

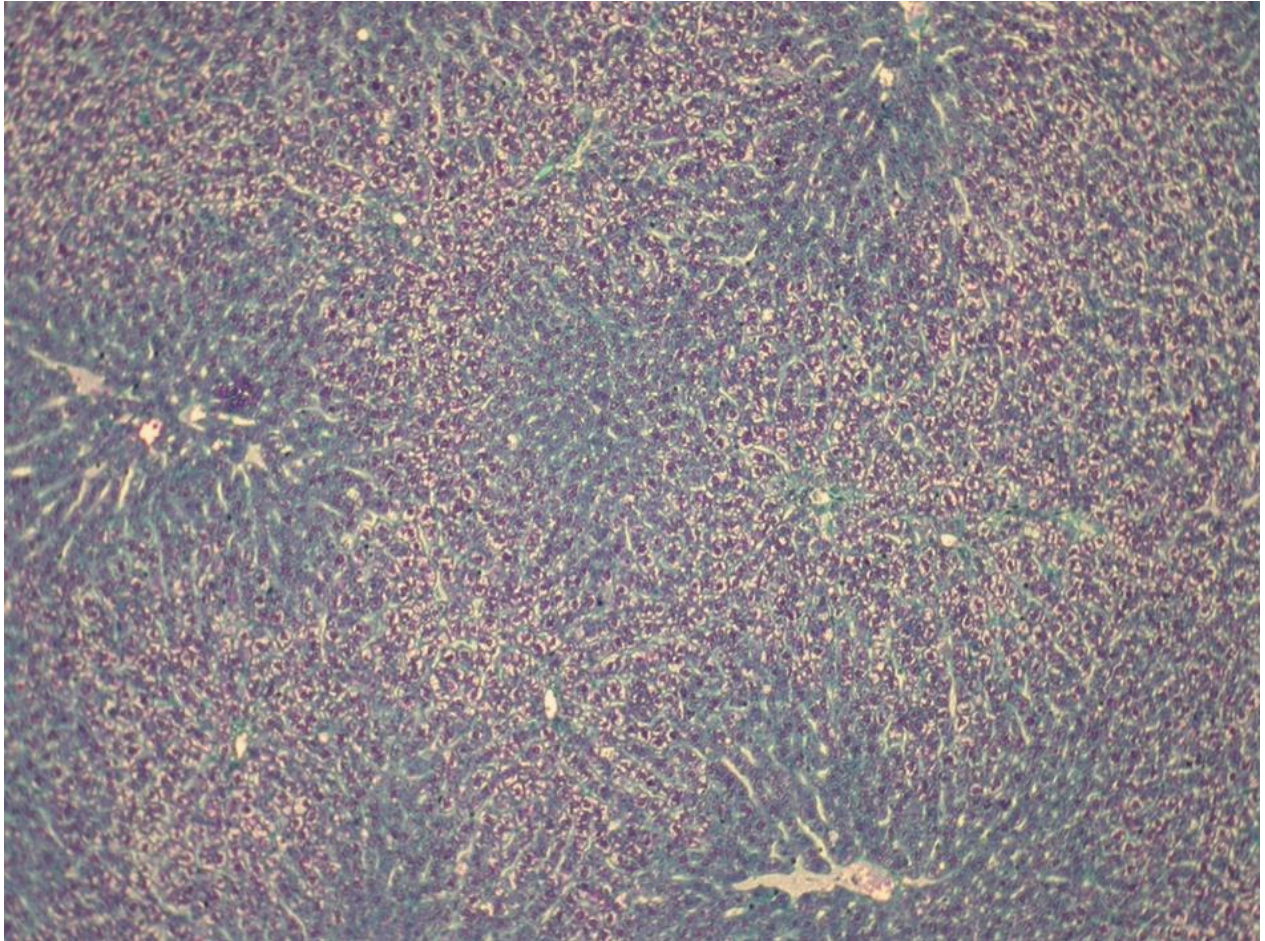
#### ***4.1.5.4. Histološka analiza skupine tretirane bučnim uljem***

Kod životinja hranjenih bučnim uljem steatoza je bila prisutna u dvije zone i nije sezala do zone vene centralis kao kod suncokretova ulja što odgovara 2. stupnju steatoze (slika 23.). Mogao se pratiti tračak hepatocita i sinusoida od vene centralis do periportalne zone gdje su se sinusoide suzile. Histološki, nismo našli upalne promjene ili znakove. Steatoza je bila mikrovesikularna. Hipertrofija hepatocita nije bila značajna. U trikrom obojenim preparatima nismo našli znakove fibroze (slike 24. i 25.).

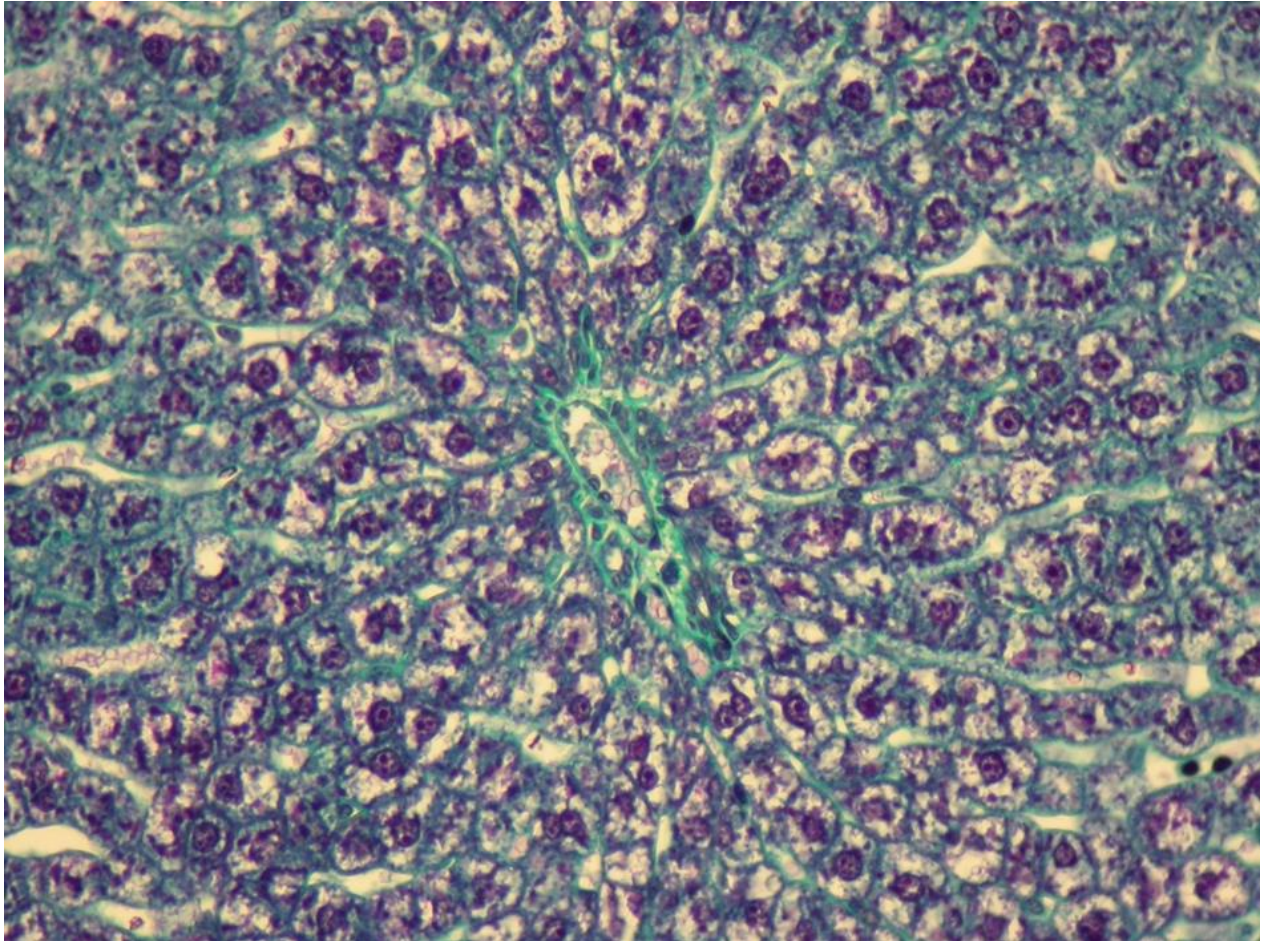




Slika 23. Histološki prikaz jetre, HE, uvećanje 100 x, nakon 21. dana hranjena visokomasnom prehranom s bučnim uljem.



Slika 24. Preparat obojen Massonovom trikrom bojom za prikazivanje fibrotičnih promjena u skupini MDM nakon 21 dana dijete, uvećanje 100 x. Nema vidljivih fibrotičnih promjena.



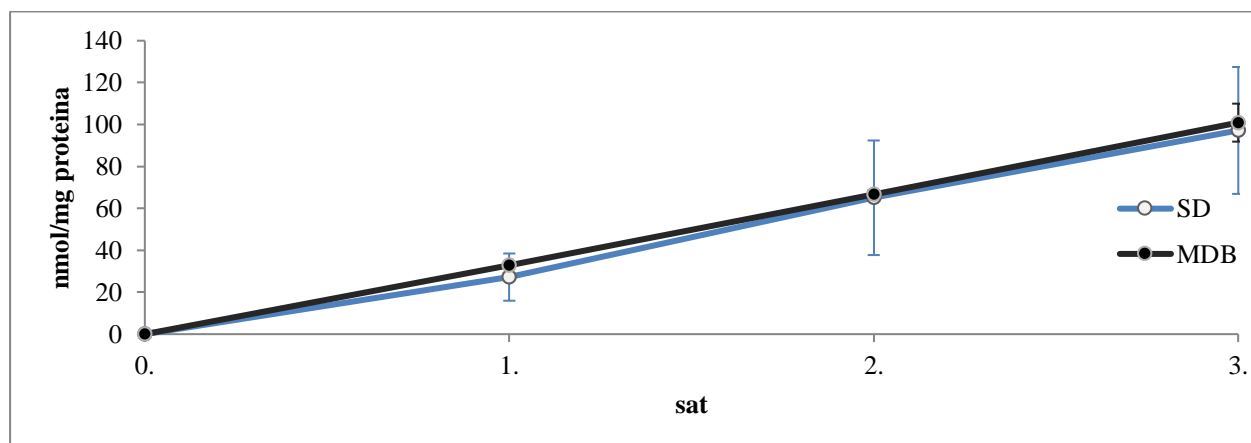
Slika 25. Preparat obojen Massonovom trikrom bojom za prikazivanje fibrotičnih promjena, uvećanje 400 x. Prikaz portalnog trijasa. 21. dan visokomasne prehrane s dodatkom bučina ulja nije uzrokovalo fibrotičke promjene u periportalnom prostoru.

## 4.2. Pokusi *in vitro* – ispitivanje inzulinske osjetljivosti u primarnoj kulturi jetrenih stanica

### Regulacija otpuštanja glukoze iz jetrenih stanica izoliranih iz štakora na standardnoj dijeti i na visokomasnoj dijeti bučinim uljem

U primarnim kulturama stanica jetre mjerena je količina otpuštene glukoze kao i utjecaj hormona inzulina i glukagona na otpuštanje glukoze. Sve kulture bile su inkubirane u Hanks Hepes mediju bez glukoze uz dodatak 10 mmol piruvata, bazalno bez hormona (SD i MDB) ili uz dodatka hormona inzulina (SD(I), MDB(I), glukagona (SD(G), MDB(G)) i oba hormona (SD(GI), MDB(GI)). Za svaki pokus koristila sam po 5 petrijevki.

#### 4.2.1 Bazalno otpuštanje glukoze

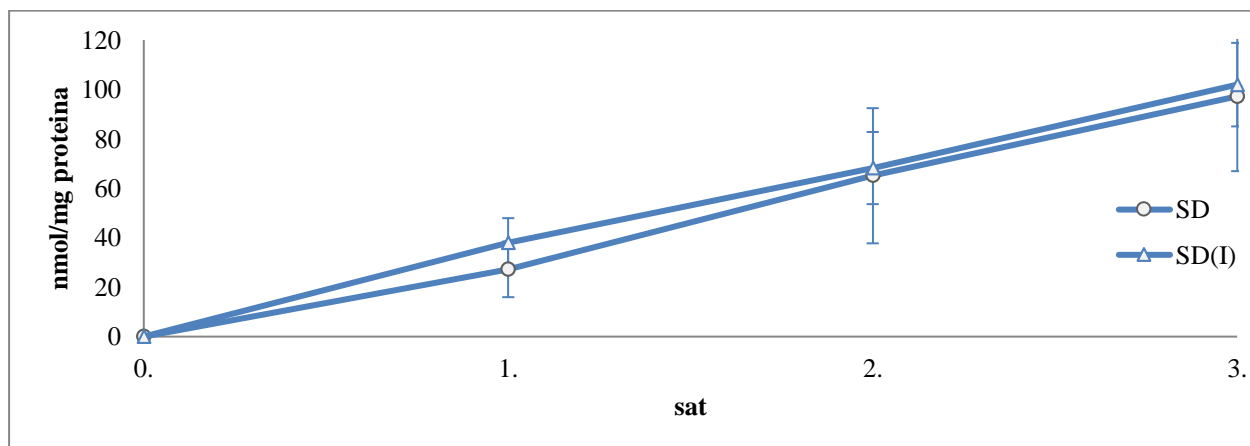


Slika 26. Otpuštanje glukoze (nmol/mg proteina) u kulturi hepatocita inkubiranoj u mediju Hanks Hepes bez glukoze s dodatkom 10 mmol/L piruvata, izoliranih iz štakora na visokomasnoj dijeti s bučinim uljem (MDM) ili iz štakora na standardnoj dijeti (SD). Svaka vrijednost je aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija.

Slika 26. prikazuje bazalno otpuštanje glukoze u kulturama inkubiranim u Hanks Hepes mediju uz dodatak piruvata (10 mmol/L) kroz tri sata. U kontrolnoj grupi kultura (SD)

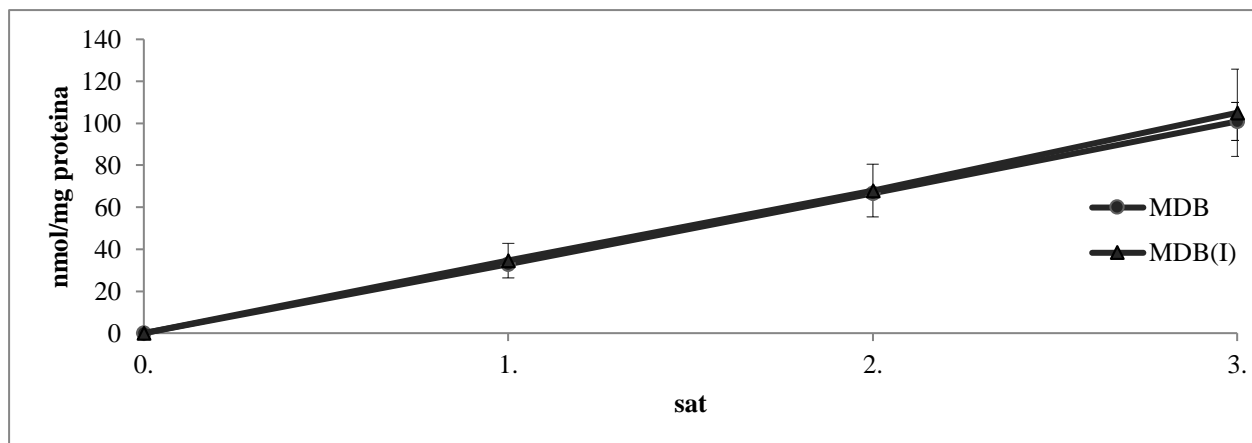
ukupno se otpustilo oko  $97,18 \pm 28,71$  nmol/mg glukoze, a iz kultura hepatocita dobivenih iz MDB  $100,90 \pm 9,06$  nmol/mg glukoze. Ukupno otpuštanje glukoze u grupi MDB nije se značajno razlikovalo od kontrole (SD).

#### 4.2.1. Utjecaj inzulina



Slika 27. Otpuštanje glukoze (nmol/mg proteina) u kulturi hepatocita inkubiranoj u mediju Hanks Hepes bez glukoze s dodatkom 10 mmol/L piruvata, izoliranih iz štakora na standardnoj dijeti bez inzulina (SD) ili sa inzulinom (80 nmol/L) ((SD(I)). Svaka vrijednost je aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija.

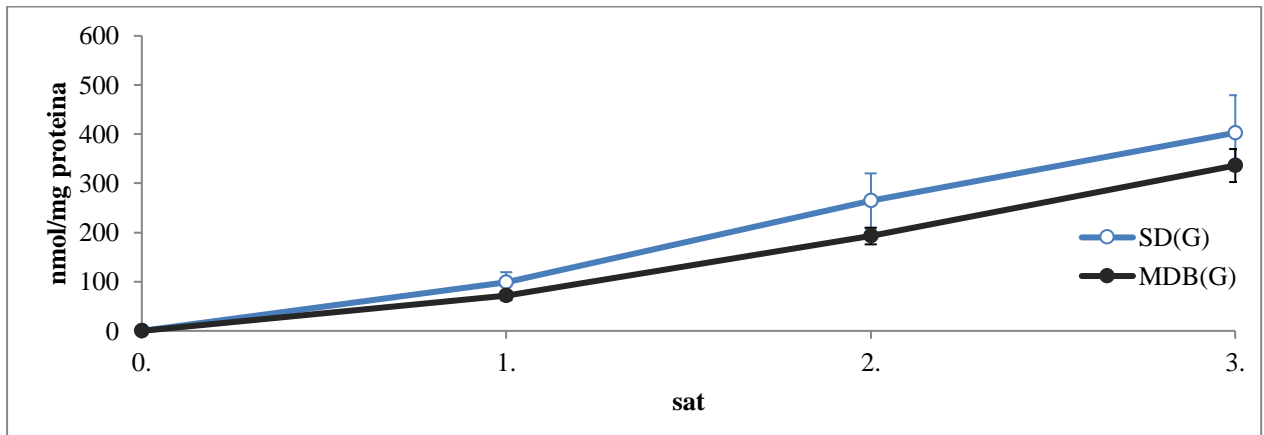
Ukupno otpuštanje glukoze uz 80 nmol inzulina (SD(I)) iznosilo je  $101,90 \pm 16,90$  nmol/mg proteina, a u kulturama bez dodatka inzulina (SD)  $97,18 \pm 28,71$  nmol/mg proteina. Inzulin nije statistički značajno utjecao na ukupno otpuštanje glukoze u kulturama hepatocita dobivenih iz životinja hranjenih standardnom prehranom (slika 27.).



Slika 28. Otpuštanje glukoze (nmol/mg proteina) u kulturi hepatocita inkubiranoj u mediju Hanks Hepes bez glukoze s dodatkom 10 mmol/L piruvata , izoliranih iz štakora na visokomasnoj dijet bez inzulina (MDB) ili sa inzulinom (80 nmol/L) (MDB(I)).

Bazalno otpuštanje glukoze u kulturi hepatocita dobivenih iz životinja na visokomasnoj prehrani bučnim uljem iznosilo je  $105,01 \pm 20,81$  nmol/mg proteina, a inzulin nije imao nikakvog učinka na bazalno otpuštanje ( $100,90 \pm 9,06$  nmol/mg proteina) (slika 28.).

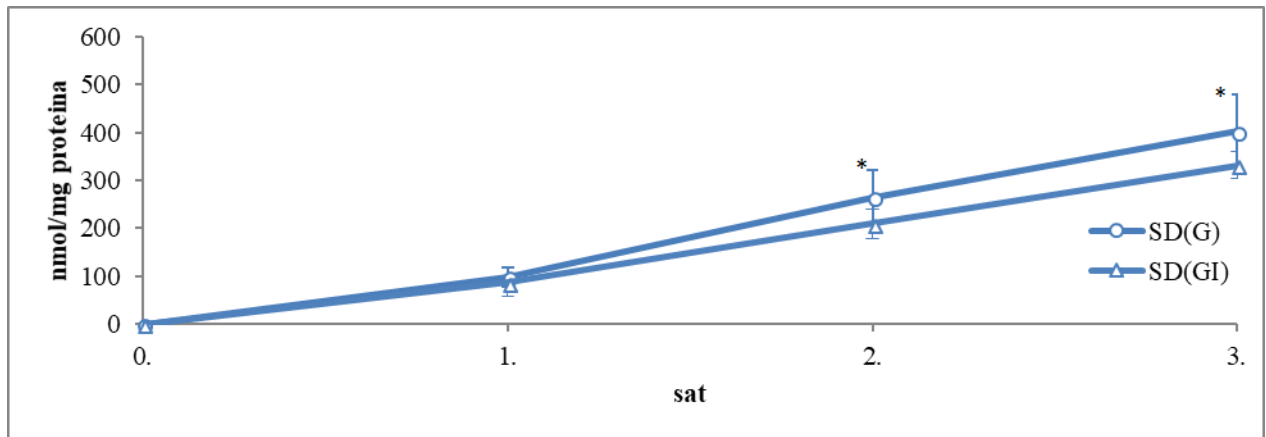
#### 4.2.2. Utjecaj glukagona



Slika 29. Otpuštanje glukoze (nmol/mg proteina) u kulturi hepatocita inkubiranoj u mediju Hanks Hepes bez glukoze s dodatkom 10 mmol/L piruvata i 200 nmol/L glukagona, izoliranih iz štakora na visokomasnoj dijeti s bučnim uljem (MDM(G)) ili iz štakora na standardnoj dijeti (SD(G)).

Na slici 29. prikazano je utjecaj glukagona na otpuštanje glukoze u kulturama hepatocita dobivenih iz životinja na standardnoj na standardnoj dijeti (SD(G)) i visokomasnoj dijeti bučnim uljem (MDB(G)). Otpuštanje glukoze iz jetre pod utjecajem glukagona iznosilo je  $402,87 \pm 72,57$  nmol/mg u grupi SD(G), a u grupi MDG iznosilo je  $336,26 \pm 33,54$  što porasta od 250 – 300 % u obje grupe u odnosu na bazalnu. Ukupna količina otpuštene glukoze nakon tri sata pokusa nije se statistički značajno razlikovala između dvije grupe.

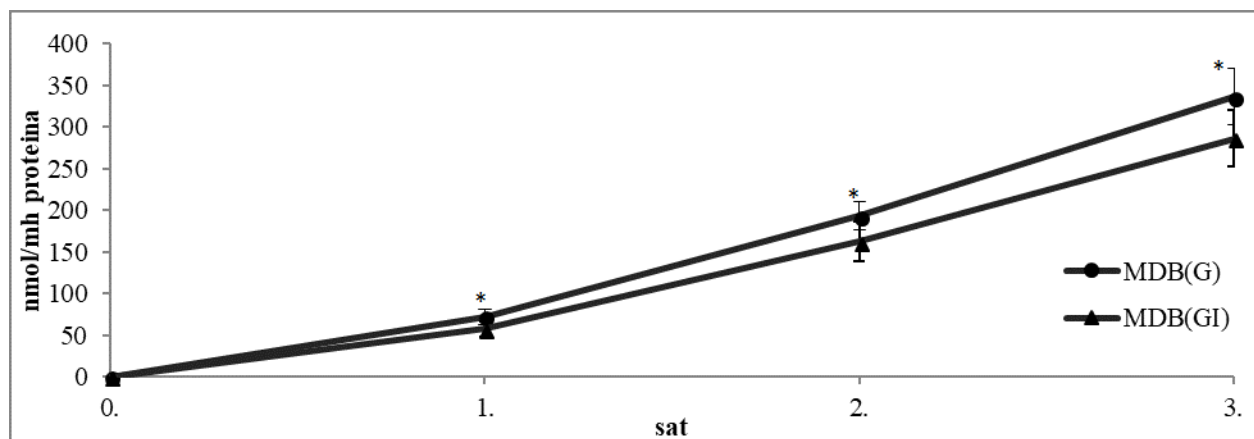
#### 4.2.3. Utjecaj inzulina i glukagona



Slika 30. Otpuštanje glukoze (nmol/mg proteina) u kulturi hepatocita izoliranih iz štakora na standardnoj dijeti, inkubiranih u mediju Hanks Hepes bez glukoze s piruvatom (10 mmol/L) uz dodatak glukagona (200 nmol/L) (SD(G) ili uz dodatak glukagona (200 nmol/L) i inzulina (80 nmol/L) (SD(GI)). Statistički značajne razlike označene su \* ( $p \leq 0,05$ ).

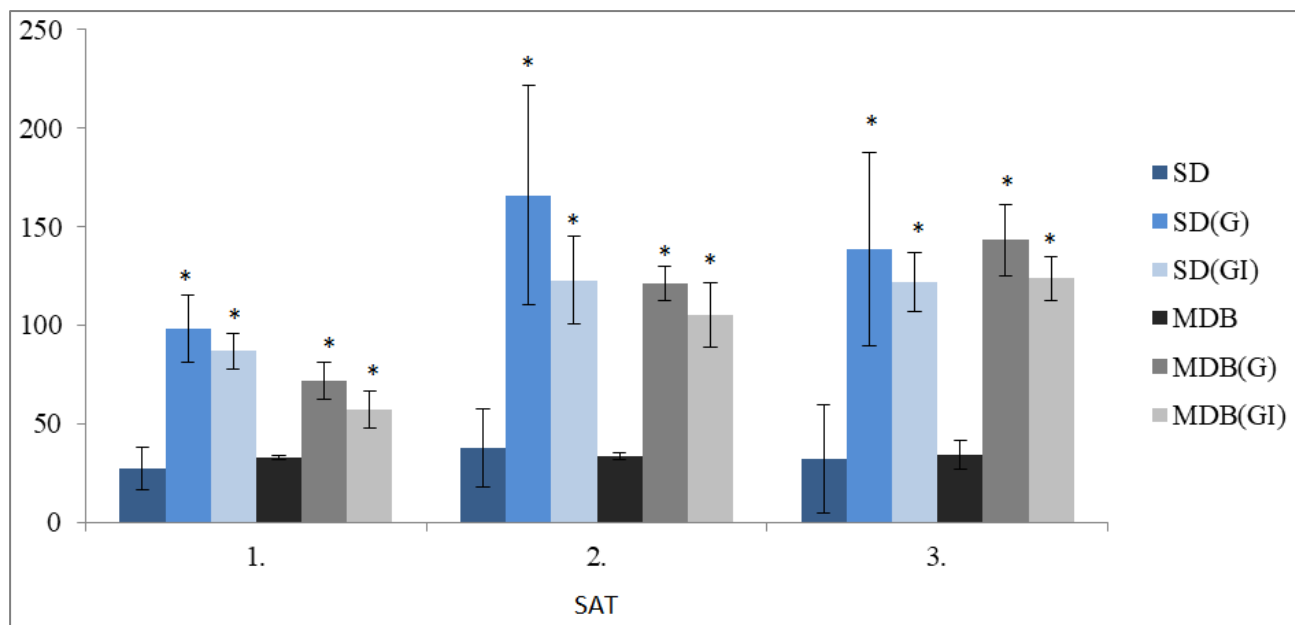
U kulturama dobivenim iz životinja na standardnoj dijeti, inzulin je statistički značajno smanjio glukagonom stimuliranu produkciju glukoze za 21 % u drugom i za 18 % u trećem satu pokusa (Slika 30.).





Slika 31. Otpuštanje glukoze (nmol/mg proteina) u kulturi hepatocita izoliranih iz štakora na visokomasnoj dijeti bučnim uljem, inkubiranih u mediju Hanks Hepes bez glukoze s piruvatom (10 mmol/L) uz dodatak glukagona (200 nmol/L) (MDB(G) ili uz dodatak glukagona (200 nmol/L) i inzulina (80 nmol/L) (MDB(GI). Statistički značajne razlike označene su \* ( $p \leq 0,05$ ).

U kulturama dobivenim iz životinja hranjenih visokomasnom dijetom bučnim uljem, inzulin je ukupno smanjio glukagonom stimuliranu produkciju i otpuštanje glukoze za oko 15 %, a razlika je statistički značajna već od prvoga sata pokusa (Slika 31.).



Slika 32. Otpuštanje glukoze po satu (nmol/mg proteina) u kulturama hepatocita izoliranih iz štakora na standardnoj dijeti (SD) i visokomasnoj dijeti bučnim uljem (MDB). Hepatociti su inkubirani u mediju Hanks Hepes bez glukoze s piruvatom (10 mmol/L) (SD, MDB), uz dodatak hormona, glukagona (200 nmol/L) (SD(G), MDB(G)) i dodatak inzulina (80 nmol/L) (SD(GI), MDB(GI)). Statistički značajne razlike u odnosu na bazalno otpuštanje glukoze (SD, MDB) prikazane su \*.

Produkcija glukoze, iz primarnih kultura dobivenih iz grupe SD, uz dodatak glukagona iznosila je  $98,24 \pm 21,16$  nmol/mg proteina u prvom satu. U drugom satu produkcija je bila najveća i za 69 % veća od produkcije u prvom satu. U trećem satu bila je veća za 41 % u odnosu na prvi sat. Uz dodatak inzulina, produkcija u SD(GI) iznosila je 87,04 nmol/mg proteina u prvom satu. U drugom satu produkcija je porasla za 41 % u odnosu na prvi sat, a trećem satu porast je bio oko 40 % . U kulturama dobivenih iz grupe MDB glukagon je također kao i u grupi SD značajno povećao otpuštanje glukoze. U prvom satu otpustilo se  $71,72 \pm 9,23$  nmol/mg glukoze, u drugom satu poraslo je za 72 %, a u trećem za 100 % u odnosu na otpuštanje u prvom satu .

Glukagon je snažno i značajno stimulirao produkciju u svim grupama (SD(G); MDB(G); SD(GI); MDB(GI) kroz sva 3 sata pokusa u odnosu na kulture bez glukagona (Slika 32.). Dodatak inzulina statistički značajno je smanjilo otpuštanje glukoze u kulturama tretirane glukagonom.

## 5. RASPRAVA

---

Biljna ulja s visokim udjelom nezasićenih masnih kiselina smatraju se „zdravijim“ uljima zbog njihova povoljna učinka na metabolički sindrom. Polinezasićene slobodne masne kiseline iz omega 3 i omega 6 grupe prethodnici su potentnih signalizirajućih molekula koje imaju važnu ulogu u regulaciji upale<sup>87</sup>. Glavna masna kiselina u suncokretovu ulju je linolna kiselina koja se ne sintetizira u ljudskom tijelu, i time je esencijalna masna kiselina<sup>88</sup>. Mononezasićene masne kiseline imaju pozitivan utjecaj na kardiovaskularno zdravlje. Smatra se da je za taj pozitivan efekt odgovorna oleinska kiselina koja je prevladavajuća slobodna masna kiselina u maslinovu ulju<sup>89</sup>.

Oksidativni stres i inzulinska rezistencija povezani su i glavni su uzročnici razvoja i progresije nealkoholne bolesti jetre<sup>90</sup>. Mononezasićene kiseline iz prehrane generiraju lipoproteinske čestice koje su otporne na oksidacijsku modifikaciju<sup>91</sup>, a dijeta bogata polinezasićenim masnim kiselinama znatno povećava peroksidaciju lipida i može povećati osjetljivost tkiva na upalu<sup>92</sup>. Masne kiseline u maslinovu ulju u prehrani imaju protektivni učinak na ozljedu tkiva uzrokovanih slobodnim radikalima<sup>93</sup>.

## 5.1. Utjecaj visokomasne prehrane na unos hrane

Vidljiva je statistička razlika u konzumaciji hrane u gramima, ali izraženo u energiji životinje su uzimale jednaku količinu grane. Štakori hranjeni visokomasnom prehranom *ad libitum* imaju sposobnost određivanja uzimanja potrebne količine hrane izražene u energiji. To je obilježje gotovo svih sisavaca i pod utjecajem je hipotalamusa, ali pod utjecajem neizbalansirane prehrane ili sjedilačkim načinom života taj se sustav može poremetiti<sup>94</sup>. Visokomasna prehrana može dovesti do upale i oštetiti neurone hipotalamusa zaslužne za održavanje homeostaze unosa i potrošnje energije<sup>95</sup>.

U ovom istraživanju nije bilo razlike u energetske unosu štakora u odnosu na kontrolu i u odnosu na različite vrste ulja u visokomasnoj prehrani. Štakori u kontrolnoj grupi uzimali su više hrane izražene u gramima, ali jednaku količinu hrane izraženu u energiji u odnosu na štakore hranjene visokomasnom prehranom. Rezultati ovog istraživanja odgovaraju rezultatima dobivenim u istraživanju dijeta s različitim količinom masti<sup>22</sup>. Štakori Wistar, hranjeni visokomasnom dijetom (71 % energije iz masti) nisu imali različit energetske unos u

odnosu na kontrolu hranjenu s 10 % energije iz masti nakon tri i šest tjedana hranjenja. Također, štakori hranjeni s 35 % energije iz masti, nisu se razlikovali od kontrole ili skupine hranjene visokomasnom prehranom<sup>96</sup>. U istraživanju na štakorima Wistar starim 7 tjedana<sup>97</sup> HFD s 58 % energije iz masti iz životinjske masnoće ili maslinova ulja nije utjecala na energetske unos u odnosu na kontrolu i u odnosu na vrstu masnih kiselina, ali dijeta bogata škrobom (67 % energije iz kukuruznog ili bananina škroba) značajno je povisila energetske unos u odnosu na kontrolu i grupe HFD. I kod životinjskih modela na miševima možemo zamijetiti da HFD nije utjecao bitno na unos kalorija. Miševi hranjeni HFD-om (40 % energije) sa sojinim ili kokosovim uljem s dodanom fruktozom ili bez nje, nisu imali razlike u unosu energije, bez obzira na omjer makronutrijenata ili masti u dijeti<sup>98</sup>. Dugoročna HFD (45 % energije iz masti) u muških miševa u odnosu na miševe na standardnoj prehrani izazvala je značajnu promjenu unosa energije tek nakon 27 tjedana eksperimentalne dijetete i ostala je značajna do kraja pokusa, dok je ta promjena u ženskih miševa bila značajna samo u 23. i 43. tjednu<sup>99</sup>.

## 5.2. Utjecaj visokomasne prehrane na dobivanje na masi

Grupe štakora na početku pokusa imale su statistički jednaku masu. Kao što je vidljivo iz rezultata, masna prehrana s različitim uljima nije utjecala na dobivanje na masi životinja. U istraživanju s visokomasnom prehranom (71 % energije iz masti) i hranjenjem *ad libitum* štakori Wistar nakon 3 i 8 tjedana nisu imali razlike u masi<sup>22</sup>. Štakori hranjeni *ad libitum* osam tjedana visokomasnom dijetom s 58 % energije iz maslinova ulja ili životinjske masnoće nešto su manje dobivali na masi po tjednima, ali ta razlika nije bila značajna, no ukupno su, nakon osam tjedana, značajno dobili manje na masi, uz jednak unos energije, nego grupa hranjena standardnom prehranom<sup>97</sup>. Mi smo dobili slične rezultate, dobivanje na masi pratilo je unos energije. Najviše energije od grupa HFD unijele su životinje koje su hranjenje dodatkom maslinova ulja, a one su imale i najviše dobile na masi, dok je najmanje dobila skupina hranjena bučnim uljem koja je najmanje unosila energije, ali ni u jednom slučaju razlike između grupa nisu bile statistički značajne.

Životinje iz skupina HFD u našem istraživanju, iako nisu imale povećanu masu u odnosu na životinje iz kontrole, imale su više visceralnog masnog tkiva nego kontrole. To povećanje bilo je najevidentnije u skupini MDS, osobito u predjelu epididimalnoga masnog tkiva. MDM je

imala neznatno povećanje, dok je MDB imao manje izraženo visceralno tkivo od MDS-a. Zanimljivo je da iako su životinje iz skupine MDS imale evidentno povećanje, nisu imale povećanu tjelesnu masu u odnosu na kontrolu niti su imale dislipidemiju.

### **5.3. Utjecaj visokomasne prehrane na masu jetre i makroskopski izgled jetre**

Masa jetre te omjer mase jetre/mase životinje bio je bez statistički značajne razlike između grupa. Takvi rezultati pri visokomasnoj prehrani u trajanju od tri i šest tjedana dobiveni su u istraživanju različitog soja štakora na različite omjere masti u prehrani<sup>22</sup>. U tom pokusu korišteni su između ostalog i štakori Wistar na visokomasnoj dijeti slične početne težine kao i štakori u našem pokusu. Dok u drugom istraživanju<sup>100</sup> sa štakorima, HFD je povećao tjelesnu masu te masu jetre i omjer mase jetre i mase tijela. Štakori Wistar u tom istraživanju, premda su bili odrasli, bili su puno manje mase (40 - 60 g) nego u ostalim istraživanjima s odraslim štakorima Wistar. Naše rezultate potvrđuje i istraživanje<sup>97</sup> na štakorima starosti sedam tjedana (160 – 200 g) gdje nije bila razlika u masi jetre između kontrolne skupine u masi jetre.

Makroskopski izgled jetre razlikovao se kod životinja iz kontrolnih grupa, te životinja na HFD-u. Životinje na standardnoj prehrani imale su glatku jetru, bogate tamne boje. Dok su životinje iz skupine HFD imale svjetliju žućkastu jetru, ali je jetra bila glatka i napuhnuta zbog kapljica masti. Takve promjene u izgledu jetre, odgovaraju jednostavnoj steatozi u štakora na visokomasnoj dijeti<sup>101</sup>.

### **5.4. Utjecaj visokomasne prehrane na lipidni status**

Brojna istraživanja pokazuju pozitivan učinak maslinova ulja na lipide u plazmi. Na životinjskom modelu miša<sup>102</sup> dnevna doza od 0,2 ml maslinova ulja kroz 30 dana značajno je smanjila trigliceride i povisila HDL-kolesterol u odnosu na kontrolu koja nije dobivala ulje. Druga grupa je dobivala bučino ulje u istoj količini. Bučino ulje također je pokazalo pozitivan učinak na lipide plazme, ali ne u tolikoj mjeri kao maslinovo ulje.

Rezultati ovog istraživanja ne pokazuju pozitivan efekt, ali su u skladu s brojnim istraživanjima s visokomasnom dijetom<sup>22, 103</sup> gdje je vidljivo da visokomasna prehrana *ad libitum* u zdravih štakora u prvih 3-6 tjedana nema utjecaja na lipidni status. Lipidni status mijenjao se jedino kod životinjskih modela s dijabetesom tipa II ili hranjenih kolesterolom ili metionin manjkavom dijetom gdje su vidljivi pozitivni učinci maslinova ulja<sup>104</sup> i bučina ulja<sup>105</sup> te smjese bučinih i lanenih sjemenki<sup>106</sup>.

## 5.5. Utjecaj visokomasne prehrane na histološku sliku jetre

Iz rezultata je vidljivo da su ulja različitog sastava i omjera masnih kiselina u visokomasnoj prehrani štakora različito utjecala na jetru. Kod svih životinja hranjenih HFD-om nađena je jednostavna steatoza, ali različitog stupnja. U grupi MDS pojedini hepatociti bili su hipertrofirani zbog obilja masnih kapljica, ali ne u toj mjeri da bi upućivali na NASH. Tome u prilog i ulazi činjenica da nisam našla znakove propadanja hepatocita, upale i fibroze ni u jednoj životinji hranjenoj HFD-om, kao ni kod kontrolnih životinja. U odnosu na kontrolu maslinovo ulje pokazalo je blagi stupanj steatoze, bučino srednje izraženu steatozu, a suncokretovo ulje imalo je steatotičke promjene u sva tri acinarna područja. Niti jedna grupa životinja nije imala znakove progresije jednostavne steatoze u steatohepatitis. Maslinovo ulje imalo je pozitivnu ulogu u sprečavanju pretjeranog nakupljanja lipida kod visokomasne prehrane, dok suncokretovo ulje nije imalo taj učinak. Taj podatak je u skladu s istraživanjima o utjecaju različitih ulja na jetru. Dodatak maslinova ulja kod štakora hranjenih metionin-kolin manjkavom dijetom spriječio je prekomjerno nakupljanje lipida<sup>104</sup>, a zanimljivo je da taj efekt u istom pokusu nije nađen kod ribljeg ulja bogatog omega 3 polinezasićenim kiselinama. U pokusu, visokomasna prehrana s 14 % maslinovog izazvala je steatozu i fibrozu, a pri oporavku steatoza se značajno smanjila jedino kod grupe hranjene maslinovim uljem<sup>107</sup>. U ovom istraživanju nije bilo fibroze kod štakora hranjenih visokomasnom dijetom, a te rezultate potvrđuju već navedeno Kučerino istraživanje<sup>22</sup> na muškim štakorima Wistar i Sprague-Dawley hranjenima HFD-om *ad libitum*.

U literaturi nisam našla podatak o utjecaju visokomasne prehrane bučnim uljem na nakupljanje lipida u jetri, ali postoje istraživanja o zaštitnoj ulozi bučina ulja pri NASH-u uzrokovanom visoko fruktoznom dijetom<sup>108</sup> te pozitivnog utjecaja bučina ulja u izokaloričnoj

dijeti nakon nealkoholne bolesti jetre uzrokovane visokomasnom prehranom zasićenim masnim kiselinama<sup>109</sup>.

## **5.6. Utjecaj visokomasne prehrane na otpuštanje glukoze i jetrenu osjetljivost na inzulin**

Linolna kiselina, koja je najzastupljenija slobodna masna kiselina u suncokretovu ulju ima peroksidativno djelovanje i može dovesti do oksidativne ozlijede jetre te nastanka inzulinske rezistencije u jetri<sup>81</sup>. Smatra se da maslinovo ulje ima pozitivan učinak zbog visokog sadržaja oleinske kiseline<sup>89</sup>, ali taj učinak oleinska kiselina ima samo u prehrani. Izravno djelovanje oleinske kiseline na hepatocite u primarnoj kulturi izaziva inzulinsku rezistenciju<sup>110</sup>.

Iz prijašnjih istraživanja naš je laboratorij dokazao povećanu osjetljivost hepatocita na inzulin kod štakora hranjenih visokomasnom prehranom s dodatkom maslinova ulja<sup>81</sup> i smanjenu osjetljivost hepatocita na inzulin kod štakora hranjenih visokomasnom prehranom s dodatkom suncokretova ulja<sup>81,111</sup> te jetrenu inzulinsku rezistenciju kod štakora hranjenih zasićenim masnim kiselinama<sup>112</sup>.

Hepatociti u kulturi dobiveni iz životinja na visokomasnoj prehrani s dodatkom bučina ulja imali su jednako otpuštanje glukoze kao i hepatociti dobiveni iz kontrolne grupe. Dodatak inzulina nije značajno smanjio produkciju s obzirom na produkciju bez inzulina u kontrolnoj grupi, a ni u visokomasnoj grupi. Taj efekt je najvjerojatnije zbog samog sastava i omjera masnih kiselina u bučinu ulju. Bučino ulje ima manje linolne kiseline, a više oleinske nego suncokretovo te manje oleinske, a više linolne nego maslinovo ulje te je spriječilo povećanje bazalne produkcije iz piruvata, ali nije povećalo osjetljivost hepatocita na inzulin kao maslinovo ulje niti smanjilo osjetljivost na inzulin kao kod suncokretova ulja.

Dodatak glukagona snažno je i statistički značajno povisio otpuštanje glukoze u svim grupama. Grupa s bučnim uljem imala je nešto manju ukupnu produkciju nego kontrola, ali ta razlika nije bila značajna. U kulturama s dodatkom glukagona, izoliranih iz životinja na standardnoj dijeti i životinja na visokomasnoj dijeti bučnim uljem, dodatak inzulina je statistički značajno smanjio produkciju glukoze.



## 6. ZAKLJUČCI

---

1. Visokomasna dijeta u trajanju od tri tjedna nije utjecala na tjelesnu masu životinja u odnosu na kontrolu. Nije bilo niti statistički značajne razlike između grupa na visokomasnoj prehrani.
2. Životinje na visokomasnoj dijeti uzimale su značajno manju količinu hrane izraženu u gramima u odnosu na kontrolu. Također nije bilo statistički značajne razlike u gramima konzumirane hrane između grupa na visokomasnoj prehrani.
3. Životinje na visokomasnoj prehrani unosile su jednaku količinu energije izražene u kilodžulima kao i kontrola. Nije bilo statistički značajne razlike između grupa na različitim visokomasnim dijetama.
4. Sastav i omjer masnih kiselina kod prehrane utjecao je na visceralnu pretilost. Sve životinje na visokomasnoj prehrani imale su nakupljanje abdominalne masti u odnosu na kontrolu. Životinje hranjene dodatkom suncokretova ulja imale su najveće nakupljanje masti u abdomenu, a životinje na maslinovu ulju najmanje.
5. Makroskopski, jetre životinja na visokomasnoj dijeti bile su svjetlije nego jetre kontrolne skupine.
6. Visokomasna dijeta u trajanju od tri tjedna nije utjecala na lipidni profil plazme u odnosu na kontrolu. Dijeta s različitim sastavima i omjerima masnih kiselina nije imala statistički značajne razlike u koncentraciji HDL, TG, LDL i ukupnog kolesterola u odnosu na kontrolu.
7. Sastav i omjer masnih kiselina u visokomasnoj prehrani utjecao je na nakupljanje masti u hepatocitima. Sve životinje iz visokomasnih skupina imale su nakupljanje masti u hepatocitima za razliku od kontrolne skupine, ali sastav i omjer masnih kiselina u prehrani utjecao je na stupanj steatoze. Omjer i sastav masnih kiselina u maslinovu ulju spriječio je pretjerano nakupljanje lipida viđeno u životinja hranjenih suncokretovim uljem. Omjer i

sastav slobodnih masnih kiselina u bučinu ulju nije imao isti učinak kao maslinovo ulje, ali ipak je spriječio razvoj visokog stupnja steatoze kakvu nalazimo kod suncokretova ulja.

8. U kulturi hepatocita izoliranih iz životinja na visokomasnoj dijeti bučnim uljem nisu nađene promjene u bazalnom otpuštanju glukoze niti u glukagonom stimuliranom otpuštanju glukoze u odnosu na kontrolu. Također nije nađena promjena u inzulinskoj osjetljivosti hepatocita.

Visokomasna dijeta u trajanju od tri tjedna dovodi do masne promjene jetre i nakupljanju masti u abdomenu, međutim, sastav i omjer masnih kiselina u visokomasnoj dijeti utječe na stupanj steatoze i količinu nakupljene masti u abdomenu.

Omjer i sastav masnih kiselina u suncokretovu ulju koje je bogato polinezasićenim masnim kiselinama rezultirao je visokim stupnjem steatoze jetre i obilnim nakupljanjem masti u abdomenu. Omjer i sastav masnih kiselina u maslinovu ulju bogatom mononezasićenom oleinskom kiselinom nije doveo do značajnijeg nakupljanja lipida u jetri i abdomenu. Bučino ulje nije imalo isti učinak kao maslinovo ulje, ali je spriječilo razvoj visokog stupnja steatoze kao i ekscesivno nakupljanje masti u abdomenu kakvo nalazimo kod suncokretova ulja. Također nije uzrokovalo inzulinsku rezistenciju. Moguće je da za pozitivan učinak maslinova i bučina ulja zasluge ima oleinska kiselina što otvara teme za daljnja znanstvena istraživanja.

## 7. LITERATURA

---

1. Boron W, Boulpaep E. Medical Physiology. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 2005.
2. Fritsch H. Priručni Anatomski Atlas. 7th ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2006.
3. Hall JE. Guyton i Hall Medicinska Fiziologija. 13th ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2017.
4. Koeppen B, Stanton B. Berne And Levy Physiology. 7th ed. Saint Louis: Elsevier Health Sciences; 2017.
5. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. 5th edition. New York: W H Freeman; 2002. Section 16.3, Glucose Can Be Synthesized from Noncarbohydrate Precursors.
6. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, Harrison SA, Brunt EM, Sanyal AJ. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018 Jan;67(1):328-357.
7. Hashimoto E, Taniai M, Tokushige K. Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013 Dec;28 Suppl 4:64-70.
8. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights. *Science (New York, NY)*. 2011;332(6037):1519-1523.
9. Okur G, Karacaer Z. The prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in healthy young persons. *Northern Clinics of Istanbul*. 2016;3(2):111-117.
10. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, George J, Bugianesi E. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018 Jan;15(1):11-20. doi: 10.1038/nrgastro.2017.109.
11. Verdelho Machado M, Cortez-Pinto H. Fatty liver in lean patients: is it a different disease? *Annals of Gastroenterology*. 2012;25(1):1-2.

12. Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol.* 2006;45:600–6.
13. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Tessari R, Zenari L, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2007;30:1212–8.
14. Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis.* 2010;28(1):155-61.
15. Højland Ipsen D, Tveden-Nyborg P, Lykkesfeldt J. Normal weight dyslipidemia: Is it all about the liver? *Obesity (Silver Spring).* 2016 Mar;24(3):556-67.
16. Lee SS, Park SH. Radiologic evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG.* 2014;20(23):7392-7402.
17. Saleh HA, Abu-Rashed AH. Liver biopsy remains the gold standard for evaluation of chronic hepatitis and fibrosis. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2007 Dec;16(4):425-6.
18. Takahashi Y, Fukusato T. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology : WJG.* 2014;20(42):15539-15548.
19. Nalbantoglu Ilk, Brunt EM. Role of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG.* 2014;20(27):9026-9037.
20. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2468–2474.
21. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005 Jun;41(6):1313-21.

22. Kučera O, Garnol T, Lotková H, Staňková P, Mazurová Y, Hroch M, Bolehovská R, Roušar T, Červinková Z. The effect of rat strain, diet composition and feeding period on the development of a nutritional model of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *Physiol Res*. 2011;60(2):317-28.
23. Liang W, Menke AL, Driessen A, et al. Establishment of a General NAFLD Scoring System for Rodent Models and Comparison to Human Liver Pathology. Sookoian SC, ed. *PLoS ONE*. 2014;9(12):e115922.
24. Birkenfeld AL, Shulman GI. Non Alcoholic Fatty Liver Disease, Hepatic Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2014;59(2):713-723.
25. Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2002 Oct;16(5):663-78.
26. Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, Shulman GI. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem*. 2004 Jul 30;279(31):32345-53.
27. Qureshi K, Abrams GA. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2007 Jul 14;13(26):3540-53.
28. Aronis A, Madar Z, Tirosh O. Mechanism underlying oxidative stress-mediated lipotoxicity: exposure of J774.2 macrophages to triacylglycerols facilitates mitochondrial reactive oxygen species production and cellular necrosis. *Free Radic Biol Med*. 2005 May 1;38(9):1221-30.
29. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM: An International Journal of Medicine*. 2010;103(2):71-83.
30. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 2010 Nov;52(5):1836-46.

31. Yilmaz Y. Review article: is non-alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and non-alcoholic steatohepatitis distinct conditions? *Aliment Pharmacol Ther.* 2012 Nov;36(9):815-23.
32. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism.* 2016 Aug;65(8):1038-48. doi: 10.1016/j.metabol.2015.12.012.
33. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Toetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes.* 2001 Aug;50(8):1844-50.
34. Paschos P, Paletas K. Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia.* 2009;13(1):9-19.
35. Ortner Hadžiabdić M. Metabolički sindrom. *Medicus* 2015;24(2): 191-203. Available at: <http://hrcak.srce.hr/148326>. Accessed June 15, 2018.
36. Moore JX, Chaudhary N, Akinyemiju T. Metabolic Syndrome Prevalence by Race/Ethnicity and Sex in the United States, National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-2012. *Prev Chronic Dis.* 2017 Mar 16;14:E24.
37. Hjemdahl P. Stress and the metabolic syndrome: an interesting but enigmatic association. *Circulation.* 2002 Nov 19;106(21):2634-6.
38. Assadi SN. What are the effects of psychological stress and physical work on blood lipid profiles? Chen. Y-H, ed. *Medicine.* 2017;96(18):e6816.
39. Djindjic N, Jovanovic J, Djindjic B, Jovanovic M, Jovanovic JJ. Associations between the occupational stress index and hypertension, type 2 diabetes mellitus, and lipid disorders in middle-aged men and women. *Ann Occup Hyg.* 2012 Nov;56(9):1051-62.
40. Zimmerman FH. Cardiovascular disease and risk factors in law enforcement personnel: a comprehensive review. *Cardiol Rev.* 2012 Jul-Aug;20(4):159-66.



41. Liu YZ, Chen JK, Zhang Y, Wang X, Qu S, Jiang CL. Chronic stress induces steatohepatitis while decreases visceral fat mass in mice. *BMC Gastroenterol.* 2014 Jun 10;14:106.
42. WHO. Obesity and overweight [internet] World Health Organization; 2017 Oct [cited 2018 Jan 8] Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
43. Ogden CL, Carroll MD, Fryar SD, Flegal KM. Prevalence of Obesity Among Adults and Youth: United States, 2011-2014. *NCHS Data Brief.* 2015 Nov;(219):1-8.
44. Nieves DJ, Cnop M, Retzlaff B, Walden CE, Brunzell JD, Knopp RH, Kahn SE. The atherogenic lipoprotein profile associated with obesity and insulin resistance is largely attributable to intra-abdominal fat. *Diabetes.* 2003 Jan;52(1):172-9.
45. Prentice AM, Jebb SA. Beyond body mass index. *Obes Rev.* 2001 Aug;2(3):141-7.
46. Ford ES, Maynard LM, Li C. Trends in Mean Waist Circumference and Abdominal Obesity Among US Adults, 1999-2012. *JAMA.* 2014;312(11):1151-1153.
47. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation.* 2000;106(4):473-481.
48. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jun;89(6):2548-56.
49. Mlinar B, Marc J, Pfeifer M. Molekularni mehanizmi inzulinske rezistencije, pretilosti i metaboličkog sindroma. *Biochemia Medica* 2006;16(1):8-24.
50. Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci.* 2014 Apr 11;15(4):6184-223.
51. Hardy OT, Czech MP, Corvera S. What causes the insulin resistance underlying obesity? Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity. 2012;19(2):81-87.

52. Rytka JM, Wueest S, Schoenle EJ, Konrad D. The Portal Theory Supported by Venous Drainage–Selective Fat Transplantation. *Diabetes*. 2011;60(1):56-63.
53. Glund S, Krook A. Role of interleukin-6 signalling in glucose and lipid metabolism. *Acta Physiologica*, 2008;192: 37–48.
54. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Mooney RA. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes*. 2002 Dec;51(12):3391-9.
55. Perry RJ, Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2014;510(7503):84-91.
56. Kitade H, Chen G, Ni Y, Ota T. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance: New Insights and Potential New Treatments. *Nutrients*. 2017;9(4):387.
57. Seppälä-Lindroos A, Vehkavaara S, Häkkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijärvi A, Halavaara J, Yki-Järvinen H. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jul;87(7):3023-8
58. Meshkani R, Adeli K. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin Biochem*. 2009 Sep;42(13-14):1331-46.
59. Klop B, Elte JW, Cabezas MC. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients*. 2013 Apr 12;5(4):1218-40.
60. Bitzur R, Cohen H, Kamari Y, Shaish A, Harats D. Triglycerides and HDL Cholesterol: Stars or second leads in diabetes? *Diabetes Care*. 2009;32(Suppl 2):S373-S377.
61. Mirmiran P, Amirhamidi Z, Ejtahed H-S, Bahadoran Z, Azizi F. Relationship between Diet and Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Review Article. *Iranian Journal of Public Health*. 2017;46(8):1007-1017.

62. Zelber-Sagi S, Salomone F, Mlynarsky L. The Mediterranean dietary pattern as the diet of choice for non-alcoholic fatty liver disease: Evidence and plausible mechanisms. *Liver Int.* 2017 Jul;37(7):936-949.
63. Sofi F, Casini A. Mediterranean diet and non-alcoholic fatty liver disease: new therapeutic option around the corner? *World J Gastroenterol.* 2014 Jun 21;20(23):7339-46.
64. Basaranoglu M, Basaranoglu G, Sabuncu T, Sentürk H. Fructose as a key player in the development of fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2013 Feb 28;19(8):1166-72.
65. Jensen T, Abdelmalek MF, Sullivan S, Nadeau KJ, Green M, Roncal C, Nakagawa T, Kuwabara M, Sato Y, Kang DH, Tolan DR, Sanchez-Lozada LG, Rosen HR, Lanasa MA, Diehl AM, Johnson RJ. Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2018 May;68(5):1063-1075.
66. Musso G, Gambino R, Cassader M. Non-alcoholic fatty liver disease from pathogenesis to management: an update. *Obes Rev.* 2010 Jun;11(6):430-45.
67. Fan JG, Cao HX. Role of diet and nutritional management in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013 Dec;28 Suppl 4:81-7.
68. Hashemi Kani A, Alavian SM, Haghghatdoost F, Azadbakht L. Diet Macronutrients Composition in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Review on the Related Documents. *Hepatitis Monthly.* 2014;14(2):e10939.
69. Jeyapal S, Putcha UK, Mullapudi VS, Ghosh S, Sakamuri A, Kona SR, Vadakattu SS, Madakasira C, Ibrahim A. Chronic consumption of fructose in combination with trans fatty acids but not with saturated fatty acids induces nonalcoholic steatohepatitis with fibrosis in rats. *Eur J Nutr.* 2017 Jul 4.
70. Kontogianni MD, Tileli N, Margariti A, Georgoulis M, Deutsch M, Tiniakos D, Fragopoulou E, Zafiropoulou R, Manios Y, Papatheodoridis G. Adherence to the Mediterranean diet is associated with the severity of non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Nutr.* 2014 Aug;33(4):678-83.

71. Žanetić M, Gugić M. Health values of olive oil. *Pomologia Croatica*, 2006; 12(2):159-173.
72. Škevin D, Kraljić K, Miletić L, Obranović M, Neđeral S, Petričević S. Adulteration of Oblica virgin olive oil with edible sunflower and refined olive pomace oil. *Croatian Journal of Diet Technology, Biotechnology and Nutrition*. 2011; 6(3-4):117-122.
73. Assy N, Nassar F, Nasser G, Grosovski M. Olive oil consumption and non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2009;15(15):1809-1815.
74. Nakić S, Rade D, Škevin D, Štrucelj D, Mokrovčak Ž, Bartolić M. Chemical characteristics of oils from naked and husk seeds of *Cucurbita pepo* L. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2006;108(11):936-943.
75. Ferramosca A, Zara V. Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. *World J Gastroenterol*. 2014 Feb 21;20(7):1746-55.
76. Green CJ, Hodson L. The Influence of Dietary Fat on Liver Fat Accumulation. *Nutrients*. 2014;6(11):5018-5033.
77. Bjeremo H, Iggman D, Kullberg J, Dahlman I, Johansson L, Persson L, Berglund J, Pulkki K, Basu S, Uusitupa M, Rudling M, Arner P, Cederholm T, Ahlström H, Risérus U. Effects of n-6 PUFAs compared with SFAs on liver fat, lipoproteins, and inflammation in abdominal obesity: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2012 May;95(5):1003-12.
78. Fritsche KL. Too much linoleic acid promotes inflammation-doesn't it? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2008 Sep-Nov;79(3-5):173-5.
79. van Herpen NA, Schrauwen-Hinderling VB, Schaart G, Mensink RP, Schrauwen P. Three weeks on a high-fat diet increases intrahepatic lipid accumulation and decreases metabolic flexibility in healthy overweight men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Apr;96(4):E691-5.
80. Westerbacka J, Lammi K, Häkkinen AM, Rissanen A, Salminen I, Aro A, Yki-Järvinen H. Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 May;90(5):2804-9.

81. Roša J, Baraba A, Bucević P, Dordijevski D, Antolković I, Rosa J. Substituting dietary polyunsaturated fat with monounsaturated fat increases insulin sensitivity in cultured rat hepatocytes. *Coll Antropol.* 2008 Mar;32(1):119-23.
82. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972 Jun;18(6):499-502.
83. Sánchez-Muniz FJ, Bastida S. Do not use the Friedewald formula to calculate LDL-cholesterol in hypercholesterolaemic rats. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2008;110(4):295–301.
84. Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J. Cell Biol.* 1969;43:506–520.
85. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75.
86. Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies? *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics.* 2013;4(4):303-306.
87. Patterson E, Wall R, Fitzgerald GF, Ross RP, Stanton C. Health Implications of High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal of Nutrition and Metabolism.* 2012;2012:539426.
88. Guo S, Ge Y, Na Jom K. A review of phytochemistry, metabolite changes, and medicinal uses of the common sunflower seed and sprouts (*Helianthus annuus L.*). *Chemistry Central Journal.* 2017;11:95.
89. Schwingshackl L, Hoffmann G. Monounsaturated fatty acids, olive oil and health status: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Lipids Health Dis.* 2014 Oct 1;13:154.

90. Videla LA, Rodrigo R, Araya J, Poniachik J. Insulin resistance and oxidative stress interdependency in non-alcoholic fatty liver disease. *Trends Mol Med*. 2006 Dec;12(12):555-8.
91. Scaccini C et al. Effect of dietary oils on lipid peroxidation and on antioxidant parameters of rat plasma and lipoprotein fractions. *J Lipid Res*. 1992 May;33(5):627-33.
92. Haggag ME-SYE-S, Elsanhoty RM, Ramadan MF. Impact of dietary oils and fats on lipid peroxidation in liver and blood of albino rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2014;4(1):52-58.
93. Kasdallah-Grissa A et al. Dietary virgin olive oil protects against lipid peroxidation and improves antioxidant status in the liver of rats chronically exposed to ethanol. *Nutr Res*. 2008 Jul;28(7):472-9.
94. Wei W, Pham K, Gammons J et al. Diet composition, not calorie intake, rapidly alters intrinsic excitability of hypothalamic AgRP/NPY neurons in mice. *Sci Rep*. 2015;5(1).
95. Thaler J, Yi C, Schur E et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *Journal of Clinical Investigation*. 2012;122(1):153-162.
96. Xu P, Dai S, Wang J et al. Preventive obesity agent montmorillonite adsorbs dietary lipids and enhances lipid excretion from the digestive tract. *Sci Rep*. 2016;6(1).
97. Ble-Castillo J, Aparicio-Trapala M, Juárez-Rojop I et al. Differential Effects of High-Carbohydrate and High-Fat Diet Composition on Metabolic Control and Insulin Resistance in Normal Rats. *Int J Environ Res Public Health*. 2012;9(5):1663-1676.
98. Deol P, Evans J, Dhahbi J et al. Soybean Oil Is More Obesogenic and Diabetogenic than Coconut Oil and Fructose in Mouse: Potential Role for the Liver.
99. Yang Y, Smith DL, Keating KD, Allison DB, Nagy TR. Variations in body weight, food intake and body composition after long-term high-fat diet feeding in C57BL/6J Mice. *Obesity (Silver Spring, Md)*. 2014;22(10):2147-2155.

100. Yang H, Chen Q, Sun F et al. Down-regulation of the klf5-c-Myc interaction due to klf5 phosphorylation mediates resveratrol repressing the caveolin-1 transcription through the PI3K/PKD1/Akt pathway. *PLoS ONE*. 2017;12(12):e0189156.
101. Duan Y, Sun D, Chen J, Zhu F, An Y. MicroRNA-29a/b/c targets iNOS and is involved in protective remote ischemic preconditioning in an ischemia-reperfusion rat model of non-alcoholic fatty liver disease. *Oncol Lett*. 2017;13(3):1775-1782.
102. Landeka Jurčević I, Đikić D, Radišić I, Teparić R, Bračun Družina V, Rogič D. The Effects of Olive and Pumpkin Seed Oil on Serum Lipid Concentrations. *Croatian Journal of Diet Technology, Biotechnology and Nutrition*. 2011; 6(1-2):63-68.
103. Ahmed U, Redgrave TG, Oates PS. Effect of dietary fat to produce non-alcoholic fatty liver in the rat. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009 Aug;24(8):1463-71.
104. Hussein O et al. Monounsaturated fat decreases hepatic lipid content in non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol*. 2007 Jan 21;13(3):361-8.
105. El-Mosallamy AE, Sleem AA, Abdel-Salam OM, Shaffie N, Kenawy SA. Antihypertensive and cardioprotective effects of pumpkin seed oil. *J Med Food*. 2012 Feb;15(2):180-9.
106. Makni M, Fetoui H, Gargouri NK, Garoui el M, Zeghal N. Antidiabetic effect of flax and pumpkin seed mixture powder: effect on hyperlipidemia and antioxidant status in alloxan diabetic rats. *J Diabetes Complications*. 2011 Sep-Oct;25(5):339-45.
107. Hernández R et al. Steatosis recovery after treatment with a balanced sunflower or olive oil-based diet: involvement of perisinusoidal stellate cells. *World J Gastroenterol*. 2005 Dec 21;11(47):7480-5.
108. Al-Okbi S, Mohamed D, Hamed T, Esmail R. Rice Bran Oil and Pumpkin Seed Oil Alleviate Oxidative Injury and Fatty Liver in Rats Fed High Fructose Diet. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2014;64(2).

109. Morrison MC, Mulder P, Stavro PM, Suárez M, Arola-Arnal A, van Duyvenvoorde W, Kooistra T, Wielinga PY, Kleemann R. Replacement of Dietary Saturated Fat by PUFA-Rich Pumpkin Seed Oil Attenuates Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Atherosclerosis Development, with Additional Health Effects of Virgin over Refined Oil. *PLoS One*. 2015 Sep 25;10(9):e0139196.
110. Roša J, Roša J. Effects of vanadate on oleic acid induced insulin resistance in cultured rat hepatocytes. *Diabetologia Croatica*. 2004;33(2): 43-45
111. Roša J, Pancirov H, Skala H, Gadzić A, Rosa J. Effects of troglitazone and insulin on glucose production in cultured hepatocytes isolated from rats on high fat diet. *Coll Antropol*. 2004 Dec;28(2):631-7.
112. Roša J, Skala H, Roša J. Effects of vanadate on glucose production in cultured hepatocytes isolated from rats on high saturated fat diet. *Coll Antropol*. 2005 Dec;29(2):693-6.



## 8. ŽIVOTOPIS

---

Iva Marolt Banek rođena je 23. siječnja 1982. u Zagrebu gdje je završila osnovnu i srednju školu zdravstvenog smjera „Zdravstveno učilište“. Godine 2002. upisuje Stomatološki fakultet u Zagrebu. Diplomski rad „Promjena histološke građe jetre štakora izazvana prehranom“ obranila je 19. rujna 2011. i stekla titulu doktora stomatologije.

Od travnja 2012. godine zaposlena je na Katedri za fiziologiju Stomatološkog fakulteta na mjestu asistenta.

Sudjelovala je u znanstveno-istraživačkom radu i projektima na Katedri za Fiziologiju Stomatološkog Fakulteta te Katedri za Histologiju i Embriologiju medicinskog fakulteta u Zagrebu.

U veljači 2014. položila je tečaj na PMF-u za rukovanje malim laboratorijskim životinjama

Udana je i majka dvoje djece.

Iva Marolt Banek, Disertacija

Popis radova:

Radovi u časopisima:

**Marolt Banek I**, Roša J, Ježek D, Delaš I. Effect of metabolic cage housing on a young male rat. Slovenian veterinary research. (prihvačeno, u postupku objavljivanja).

Kongresna priopćenja:

**Marolt Banek, Iva**; Šučur, Alan; Kelava, Tomislav; Crljen, Vladiana. Safe and simple procedure to restrain rats for blood sampling from tail vein // SLOVENIAN VETERINARY RESEARCH Supplement 18 3rd Congress of the SLAS and 1st joint SLAS - CroLASA meeting / Simona Kranjc, Gregor Majdič (ur.). Ljubljana, 2017. 53-53.

**Marolt Banek, Iva**; Šučur, Alan; Kelava, Tomislav; Crljen, Vladiana. Blood glucose in rat by simple rat restrain procedure or standard anaesthesia during sampling blood from tail vein // .2017. 63-63.

Banek, Ljerka; Kozina, Viviana; Banek, Tomislav; Ježek, Davor; **Marolt, Iva**. Quantitative stereological analysis of cryptorchid testes in men after puberty // Regional multidisciplinary biomedical workshop- Molecular Morphology in Neuroscience Workshop.8-8

Banek Lj.; Roša J.; Ježek D.; Vrdoljak I.; **Marolt I.**; Žurić A. Diet induced hepatic steatosis in rat // Zbornik radova - 2.hrvatski mikroskopijski kongres s međunarodnim sudjelovanjem / Srećko Gajović (ur.). Zagreb : Croatian Society for Electron Microscopy, 2006. 165-166.

Poglavlja u knjizi:

Banek, Ljerka; Kozina, Viviana; **Marolt, Iva**; Banek, Tomislav. Cryptorchidism (Undescended Testis) // Atlas on the Human Testis / Ježek, Davor (ur.). London : Springer-Verlag, 2013. Str. 123-145.

Patenti:

Vladiana Crljen, **Iva Marolt Banek**, Tomislav Kelava, Alan Šučur. P20170909A: Pomagalo za obuzdavanje laboratorijskog glodavca u svrhu uzorkovanja krvi iz repne vene. (u postupku , datum prijave 14.06.2017.)