Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Sunčica Heštera, dr. med. vet.

UTJECAJ SPOLA I RAZINE ENERGIJE U HRANI NA LIPOGENEZU TIJEKOM KRONIČNOG METABOLIČKOG SINDROMA KOD ŠTAKORA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2026.

Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Sunčica Heštera, dr. med. vet.

UTJECAJ SPOLA I RAZINE ENERGIJE U HRANI NA LIPOGENEZU TIJEKOM KRONIČNOG METABOLIČKOG SINDROMA KOD ŠTAKORA

DOKTORSKI RAD

Mentori:
dr. sc. Tomislav Mašek, redoviti profesor u trajnom izboru
dr. sc. Kristina Starčević, izvanredna profesorica

Zagreb, 2026.

University of Zagreb

Faculty of Veterinary Medicine

Sunčica Heštera, DVM

INFLUENCE OF SEX AND ENERGY CONTENT OF FOOD ON LIPOGENESIS DURING CHRONIC METABOLIC SYNDROME IN RATS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2026

University of Zagreb

Faculty of Veterinary Medicine

Sunčica Heštera, DVM

INFLUENCE OF SEX AND ENERGY CONTENT OF FOOD ON LIPOGENESIS DURING CHRONIC METABOLIC SYNDROME IN RATS

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Tomislav Mašek, PhD, Full Professor
Kristina Starčević, PhD, Associate Professor

Zagreb, 2026

University of Zagreb

VETERINARSKI FAKULTET

I Z J A V A

Ja, SUNČICA HEŠTERA, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima od onih navedenih u radu.

_____

(potpis studenta)

Zagreb, 2026.

Doktorski rad izrađen je u

Zavodu za prehranu i dijetetiku životinja
Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

i

Zavodu za kemiju i biokemiju
Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Predstojnik: *prof. dr. sc. Hrvoje Valpotić*
Predstojnik: *prof. dr.sc. Renata Barić-Rafaj*

Doktorski rad predan je na ocjenu Fakultetskom vijeću Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz znanstvenog područja Biomedicina i zdravstvo, polja Veterinarska medicina, grane Animalna proizvodnja i biotehnologija.

Istraživanje je provedeno kao dio istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost „Debljina i starost majke uzrokuju spolno ovisne negativne učinke na metabolizam lipida i upalu kod podmlatka“, voditeljice izv. prof. dr. sc. Kristine Starčević (IP-2022-10-4578).

ZAHVALA

Prije svega, želim izraziti iskrenu zahvalnost svojim mentorima, prof. dr. sc. trajnom izboru Tomislavu Mašeku i izv. prof. dr. sc. Kristini Starčević na stručnom vodstvu, nesebičnom prijenosu znanja, velikoj podršci tijekom izrade ovog doktorskog rada i svim korisnim savjetima. Hvala Vam što ste bili uz mene i u teškim i u lijepim trenutcima studija. Zauvijek sam zahvalna na tome. Hvala Vam što ste mi dane u laboratoriju i na studiju učinili još ljepšima.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj obitelji, mami Đurđici, tati Dragi, sestri Hermini i mom suprugu Mateju. Hvala Vam što ste uvijek uz mene, što ste se godinama odricali za mene, poticali me da idem naprijed i bili moj oslonac. Hvala Vam na podršci i ljubavi. Mojoj Keki, najboljoj seki, hvala ti što me paziš, čuvaš i što si vjerovala u mene i onda kada nam je bilo najteže. Hvala ti što si najbolja seka.

Posebnu zahvalu dugujem svom suprugu Mateju. Hvala ti na bezuvjetnoj ljubavi, strpljenju i razumijevanju tijekom svih godina ovog zahtjevnog puta. Tvoja ljubav, podrška i prisutnost učinili su ovaj put lakšim i dali mi snagu da ustrajem do samog kraja. Hvala ti što si razumio sva odricanja i bio uz mene u svakom trenutku. Što si me "nosio" dok sam bila nepokretna. Hvala ti što si uvijek uz mene i što zajedničkim snagama gradimo svoju sreću i obitelj. Ovaj uspjeh ne doživljavam samo kao svoj, već kao naš.

Od srca hvala i mojim najboljim prijateljima i kumovima Miranu i Dajani, što ste svih ovih godina uz mene. Što ste bili moja podrška i što ste se veselili mojim uspjesima. Što ste puno puta bili moj vjetar u leđa i podrška. Hvala vam na najljepšem prijateljstvu i najljepšem odrastanju.

Najveću zahvalu iskazujem dragom Bogu.

Sunčica

O MENTORIMA

Tomislav Mašek rođen je 7. prosinca 1975. u Karlovcu. Osnovnu školu i gimnaziju pohađao je u Karlovcu. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao je 1994. godine, a diplomirao 2001. godine. Od 2001. do 2010. zaposlen je kao znanstveni novak – asistent, od 2010. kao docent, od 2015. kao izvanredni profesor, od 2019. kao redoviti profesor, a od 2024. kao redoviti profesor u trajnom izboru u Zavodu za prehranu i dijetetiku životinja. Također je izabran u znanstveno zvanje znanstvenog savjetnika u trajnom izboru. Godine 2001. upisao je poslijediplomski studij, smjer Fiziologija domaćih životinja, koji je završio 2008. godine izradom doktorske disertacije naslova „Utjecaj žive kulture kvasca *Saccharomyces cerevisiae* na proizvodnju i kakvoću mlijeka te neke biokemijske krvne pokazatelje mliječnih ovaca“.

Kao nastavnik izvodi predavanja, seminare, vježbe, kolokvije i ispite studentima iz obveznih predmeta Primijenjena hranidba i Opća hranidba te izbornih predmeta Komparativna hranidba, Dijetetika životinja i Dodaci hrani za životinje – modulatori zdravlja. Na poslijediplomskom studiju izvodi nastavu iz predmeta Optimalizacija obroka i krmnih smjesa. Na specijalističkim studijima predaje predmete Hranidba životinja u sudskom veterinarstvu te Hranidba i dobrobit životinja.

Predavač je na tečajevima trajne edukacije za doktore veterinarske medicine Fiziologija probave, hranidba i metabolički poremećaji preživača te Prehrana i dijetetika laboratorijskih životinja. Također je predavao na edukaciji za veterinarske inspektore pri Upravi veterinarstva Ministarstva poljoprivrede iz područja analize hrane za životinje i sigurnosti hrane za životinje. Mentor je 14 obranjenih diplomskih radova i triju obranjenih doktorskih radova. Trenutačno je mentor trima doktorandima.

Sudjelovao je u većem broju kompetitivnih znanstvenih projekata, među kojima se izdvajaju tri projekta Hrvatske zaklade za znanost i projekt Europskog fonda za regionalni razvoj. Sudjelovao je i u četiri VIP projekta te u tri potpore Sveučilišta u Zagrebu. Autor je 85 znanstvenih radova indeksiranih u bazi Scopus, 51 sažetka sa skupova, 12 cjelovitih radova u zbornicima skupova, šest poglavlja u knjigama te triju ostalih radova. Trenutačno je stalni ili povremeni recenzent u 19 međunarodnih časopisa. Član je uredničkih odbora šest časopisa (*Stočarstvo, Krmiva, Hrvatski veterinarski vjesnik, Veterinarska stanica, Veterinarski arhiv* i *Agriculture*) te pomoćni urednik u časopisu *Agriculture*.

Član je Povjerenstva za statut Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Etičkog povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, Matičnog odbora za područje

biomedicine i zdravstva – polje veterinarske medicine te stručnog društva *International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids*.

OBJAVLJENI RELEVANTNI RADOVI U POSLJEDNJIH PET GODINA

MAŠEK, T. P. ROŠKARIĆ, S., SERTIĆ, K., STARČEVIĆ (2025): Docosahexaenoic and Eicosapentaenoic Acid Supplementation Could Attenuate Negative Effects of Maternal Metabolic Syndrome on Liver Lipid Metabolism and Liver Betacellulin Expression in Male and Female Rat Offspring. Metabolites, 15, 1:32-43.

DOI: 10.3390/metabo15010032

RUBIĆ, I., R. BURCHMORE, S. WEIDT, C. REGNAULT, J. KULEŠ, R. BARIĆ RAFAJ, **T. MAŠEK**, A. HORVATIĆ, M. CRNOGAJ, P.S. ECKERSALL, P. NOVAK, V. MRLJAK (2022): Multi-platform strategies and metabolomics approaches for the investigation of comprehensive metabolite profilein dogs with Babesia canis infection. Int. J. Mol. Sci. 23, 1575.

DOI: 10.3390/ijms23031575

ŠURAN, J., I. CEPANEC, **T. MAŠEK,** K. STARČEVIĆ, I. TLAK GAJGER, M. VRANJEŠ, B. RADIĆ, S. RADIĆ, I. KOSALEC, J. VLAINIĆ (2021): Nonaqueous polyethylene glycol as a safer alternative to ethanolic propolis extracts with comparable antioxidant and antimicrobial activity. Antioxidants 10, 978.

DOI: 10.3390/antiox10060978

VRANIĆ, M., K. BOŠNJAK, G. KIŠ, **T. MAŠEK,** D. BROZIĆ, A. NOVAK, K. KRAPINEC (2022): The effect of semi-natural grassland cutting height on the nutritive value of fermented forage. ACS 87, 253–258.

MAŠEK, T., J. BARIŠIĆ, V. MICEK, K. STARČEVIĆ (2020): Cafeteria diet and highfructose rodent models of NAFLD differ in the metabolism of important PUFA and palmitoleic acid without additional influence of sex. Nutrients 12, 3339.

DOI: 10.3390/nu12113339

Kristina Starčević rođena je 6. prosinca 1970. godine u Münchenu. Diplomirala je 1995. godine na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, na kojem je nastavila poslijediplomski znanstveni studij Inženjerska kemija te 2001. godine stekla akademski stupanj magistra znanosti. Doktorirala je 2005. godine u području prirodnih znanosti, znanstvenom polju kemije, grani organske kemije. Od prosinca 1995. do siječnja 2007. godine bila je zaposlena u Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije kao znanstvena novakinja na projektu prof. dr. sc. Grace Karminski-Zamola.

U razdoblju od 2007. do 2010. godine radila je u istraživačkom centru tvrtke GlaxoSmithKline Research Centre Zagreb d.o.o. Na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu zaposlena je od 2010. godine, najprije u Zavodu za stočarstvo, potom u Zavodu za sudsko i upravno veterinarstvo, a od veljače 2019. godine radi u Zavodu za kemiju i biokemiju, u kojem je zaposlena kao izvanredna profesorica. Aktivno sudjeluje u nastavi na integriranom preddiplomskom i diplomskom te specijalističkim studijima Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Trenutačno je članica Povjerenstva za upravljanje kvalitetom i Vijeća doktorskog studija Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Dobitnica je nagrade GSK R&D's Exceptional Science Award Programme (2008.) te Nagrade Veterinarskog fakulteta za znanstveni rad (2018.).

Znanstveni interes Kristine Starčević usmjeren je na metabolizam lipida i masnih kiselina, oksidacijski stres, upalne procese, antioksidativne mehanizme te dizajn i biološku evaluaciju bioaktivnih spojeva. Sudjelovala je kao suradnica na dva projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ), bila je voditeljica dvaju projekata HRZZ-a te jednog bilateralnog projekta. U navedenim područjima objavila je više od 80 radova u međunarodno recenziranim časopisima, dok njezina ukupna znanstvena bibliografija obuhvaća više od 170 znanstvenih i stručnih radova, uključujući izlaganja na međunarodnim kongresima.

Autorica je dvaju međunarodnih patenata iz područja medicinske kemije i bioaktivnih spojeva. Aktivno sudjeluje u mentoriranju mladih istraživača; pod njezinim mentorstvom obranjena su dva doktorska rada, dok je pet doktorskih radova u tijeku izrade, kao i veći broj diplomskih i završnih radova. Djeluje kao recenzentica u više međunarodnih znanstvenih časopisa te je članica Hrvatskog kemijskog društva i međunarodnog društva ISSFAL (*International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids*). Članica je Povjerenstva za osiguravanje kvalitete te Vijeća doktorskog studija Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

OBJAVLJENI RELEVANTNI RADOVI U POSLJEDNJIH PET GODINA

STARČEVIĆ, K., L. LOZICA, S. SERTIĆ, I. SABOLEK, S. ŽUŽUL, Ž. GOTTSTEIN, E. BUDICIN, D. BROZIĆ, M. BRUS, T. MAŠEK (2025): Chestnut tannin and chestnut tanninsoy protein isolate complex differently influence fecal Escherichia coli count, immune system, caecum fermentation and meat oxidative susceptibility in broiler chickens. J. Cent. Eur. Agric. 26, 606-617.

DOI: 10.5513/JCEA01/26.3.4695

KRSTULOVIĆ, L., M. LEVENTIĆ, V. RASTIJA, **K. STARČEVIĆ**, M. JIROUŠ, I. JANIĆ, M. KARNAŠ, K. LASIĆ, M. BAJIĆ, LJ. GLAVAŠ-OBROVAC (2023): Novel 7-chloro-4-aminoquinoline-benzimidazole hybrids as inhibitors of cancer cells growth: synthesis, antiproliferative activity, in silico ADME predictions, and docking. Molecules 28, 540.

DOI: 10.3390/ molecules28020

MAŠEK, T., P. ROŠKARIĆ, S., SERTIĆ, **K. STARČEVIĆ** (2025): Docosahexaenoic and Eicosapentaenoic Acid Supplementation Could Attenuate Negative Effects of Maternal Metabolic Syndrome on Liver Lipid Metabolism and Liver Betacellulin Expression in Male and Female Rat Offspring. Metabolites, 15, 1; 32-43.

DOI: 10.3390/metabo15010032

PERIN, N., M. CINDRIĆ, P. VERVAEKE, S. LIEKENS, T. MAŠEK, **K. STARČEVIĆ**, M. HRANJEC (2021): Benzazole-substituted iminocoumarins as potential antioxidants with antiproliferative activity. Med. Chem. 17, 13–20.

DOI: 10.2174/1573406416666191218101427

ROŠKARIĆ, P., M. ŠPERANDA, T. MAŠEK, D. VERBANAC, **K. STARČEVIĆ** (2021): Low dietary n-6/n-3 ratio attenuates changes in NRF2 gene expression, lipid peroxidation, and inflammatory markers induced by fructose overconsumption in rat abdominal adipose tissue. Antioxidants 10, 2005. DOI: 10.3390/antiox10122005

SAŽETAK

UTJECAJ SPOLA I RAZINE ENERGIJE U HRANI NA LIPOGENEZU TIJEKOM KRONIČNOG METABOLIČKOG SINDROMA KOD ŠTAKORA

Cilj istraživanja bio je utvrditi promjene u metabolizmu masnih kiselina, oksidacijskom stresu i kroničnoj upali tijekom dugotrajnog metaboličkog sindroma izazvanog saharozom te ispitati utjecaj spola i prehrane smanjene energetske vrijednosti s povećanim udjelom vlakana na razvoj metaboličkih poremećaja.

Istraživanje je provedeno na 120 Wistar Han štakora, mužjaka i ženki, raspoređenih u četiri hranidbene skupine. Dvije skupine primale su 30 % saharoze u vodi za piće, dok su dvije skupine hranjene prehranom smanjene energetske vrijednosti s povećanim udjelom vlakana. Životinje su žrtvovane nakon 1, 12 i 24 mjeseca tretmana. Analizirani su pokazatelji metabolizma glukoze, masnokiselinski sastav jetre, koncentracija malondialdehida te ekspresija gena uključenih u desaturaciju masnih kiselina, antioksidacijsku obranu i upalni odgovor.

Dugotrajan unos saharoze doveo je do postupnog razvoja metaboličkih poremećaja, izraženijih u kasnijim fazama istraživanja. U skupinama izloženima saharozi zabilježeni su poremećaji metabolizma glukoze i inzulinske osjetljivosti te promjene jetrenog masnokiselinskog sastava. Povećao se udio jednostruko nezasićenih masnih kiselina, osobito palmitoleinske i oleinske kiseline, uz vremenski ovisne promjene ekspresije *Scd1*. Istodobno je u većeg dijela n-3 i n-6 višestruko nezasićenih masnih kiselina zabilježeno smanjenje, uz promjene ekspresije *Fads1* i *Fads2*. Skupine izložene saharozi imale su i više vrijednosti malondialdehida te izraženiji upalni i profibrotični odgovor.

Prehrana smanjene energetske vrijednosti s povećanim udjelom vlakana ublažila je dio metaboličkih promjena i bila povezana s povoljnijim pokazateljima tjelesne mase, metabolizma glukoze, inzulinske osjetljivosti i masnokiselinskog profila. Ženski spol također je bio povezan sa sporijim razvojem pojedinih metaboličkih promjena i povoljnijim obrascem masnih kiselina. Rezultati pokazuju da prehrambeni sastav, trajanje izloženosti i spol imaju važnu ulogu u oblikovanju metaboličkog, oksidacijskog i upalnog odgovora tijekom kroničnog metaboličkog sindroma.

Ključne riječi: metabolički sindrom, saharoza, razina energije u hrani, spol, masne kiseline, inzulinska rezistencija, desaturaze, oksidacijski stres, upala

EXTENDED ABSTRACT

INFLUENCE OF SEX AND DIETARY ENERGY LEVEL ON LIPOGENESIS DURING CHRONIC METABOLIC SYNDROME IN RATS

Introduction: Metabolic syndrome is a complex disorder that includes impaired glucose homeostasis, insulin resistance, dyslipidaemia, increased adiposity, oxidative stress and chronic low-grade inflammation. These changes do not develop independently but are closely interconnected and tend to become more pronounced during prolonged exposure to an unfavourable nutritional environment. Both dietary composition and energy intake can therefore influence the onset and progression of metabolic syndrome, while biological sex may modify the intensity and temporal pattern of the metabolic response.

A high intake of simple carbohydrates is an important nutritional factor in the development of metabolic disturbances. Prolonged sucrose intake can impair glucose metabolism, promote insulin resistance and alter lipid metabolism. The liver has a central role in these processes because it regulates fatty acid synthesis, desaturation, elongation and oxidation. Long-term carbohydrate excess may therefore substantially modify hepatic fatty acid composition and the regulation of genes involved in lipid metabolism.

Lipogenesis is one of the major metabolic pathways affected by excessive carbohydrate intake. Stearoyl-CoA desaturase 1, encoded by the *Scd1* gene, catalyses the formation of monounsaturated fatty acids from saturated fatty acids. Palmitic acid (C16:0) can be desaturated to palmitoleic acid (C16:1n-7), while stearic acid (C18:0) can be converted to oleic acid (C18:1n-9). An increase in the proportions of these monounsaturated fatty acids together with increased *Scd1* expression may therefore reflect enhanced lipogenesis and increased desaturation of newly synthesised saturated fatty acids.

The metabolism of polyunsaturated fatty acids is regulated through a series of desaturation and elongation reactions. *Fads1* and *Fads2* encode Δ5- and Δ6-desaturases, respectively, and participate in the metabolism of n-3 and n-6 fatty acids. Changes in the expression of these genes, together with changes in the proportions of individual n-3 and n-6 PUFA, can provide additional insight into the metabolic adaptations that develop during chronic dietary challenge.

Disturbances in lipid metabolism are also closely related to oxidative stress. Increased formation of reactive oxygen species can promote lipid peroxidation, leading to the formation of secondary products such as malondialdehyde (MDA). The cellular antioxidant response is

regulated in part by the transcription factor NRF2, encoded by *Nfe2l2*. Oxidative stress is also closely linked to chronic inflammation. Tumour necrosis factor alpha (TNF-α) is involved in inflammatory signalling and metabolic dysfunction, whereas transforming growth factor beta (TGF-β) participates in inflammatory and profibrotic pathways.

The metabolic response to the same dietary challenge may differ between males and females. Sex-related differences in hormonal regulation, body composition, insulin sensitivity and hepatic fatty acid metabolism may influence both the development of metabolic syndrome and the regulation of desaturase pathways. Female animals have also been reported to differ in their capacity for long-chain PUFA metabolism, which may contribute to a different response to prolonged nutritional stress.

Modification of dietary energy content may partly counteract the metabolic consequences of excessive carbohydrate intake. A lower-energy diet with an increased fibre content may influence body weight, glucose homeostasis, fatty acid metabolism, oxidative stress and inflammatory responses. Long-term experimental models are particularly useful in this context because they allow early metabolic adaptation to be distinguished from changes that develop during chronic metabolic dysfunction.

Objectives: The objectives of this doctoral research were to determine which changes in lipogenesis and chronic inflammation are induced by sucrose-induced metabolic syndrome and how these changes develop over time; to investigate whether female sex has a protective role in the development and progression of metabolic syndrome; and to investigate whether the intake of a lower-energy diet has a beneficial effect on the development and progression of metabolic syndrome. The working hypothesis was that a lower-energy diet and sex exert protective effects on pathological molecular mechanisms involved in metabolic syndrome, with important implications for the prevention and treatment of chronic metabolic syndrome.

Material and methods: The study was conducted using 120 Wistar Han rats, comprising 60 males and 60 females, at the Laboratory Animal Unit of the Institute for Medical Research and Occupational Health in Zagreb. The experimental protocols were approved by the Veterinary Directorate of the Ministry of Agriculture of the Republic of Croatia (authorisation EP 410/2023). The animals were housed in polycarbonate cages under a 12 h light/12 h dark cycle at a temperature of 20 °C. Food and water were available *ad libitum* throughout the experimental period. Body weight was recorded once weekly using an electronic scale PLS 1200-3A (Kern & Sohn, Balingen, Germany), while fasting blood glucose concentration was determined after a 12 h fast in blood obtained from the tail vein.

After a two-week acclimatisation period, during which all animals received the control diet, the rats were randomly allocated to four dietary groups according to treatment and sex. The control group (CON) received a standard diet and plain drinking water. The LC group received a lower-energy diet with an increased fibre content and plain drinking water. The LC-HS group received the lower-energy, high-fibre diet together with 30% sucrose in drinking water, whereas the HS group received the standard diet together with 30% sucrose in drinking water. Each dietary group included males and females. Five animals were included in each combination of dietary treatment, sex and time point (n = 5). Animals were euthanised after 1, 12 and 24 months of dietary treatment.

Sampling: Following euthanasia, liver tissue samples were collected, weighed and stored at −80 °C until further analysis. Blood samples were collected for serum preparation and biochemical analyses.

Insulin concentration and indices of insulin resistance and sensitivity: Serum insulin concentration was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a commercially available Rat Insulin ELISA kit (Mercodia, Uppsala, Sweden). Ten microlitres of standard or serum sample were added to wells coated with insulin-specific monoclonal antibodies. Following addition of horseradish peroxidase-conjugated monoclonal antibody, the plate was incubated for 120 min at room temperature. Absorbance was measured at 450 nm using a Bio-Tek uQuant Universal Microplate Spectrophotometer (USA), and insulin concentrations were calculated from the standard calibration curve.

Insulin resistance was assessed using the Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR):

HOMA-IR = fasting insulin (μU/mL) × fasting glucose (mmol/L) / 22.5

Insulin sensitivity was additionally evaluated using the Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (QUICKI):

QUICKI = 1 / [log(fasting insulin (μU/mL)) + log(fasting glucose (mg/dL))]

Fatty acid composition of liver tissue: Lipids were extracted from liver tissue using a chloroform:methanol mixture (2:1, v/v). Fatty acid methyl esters were prepared using KOH in methanol and analysed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS; QP2010 Ultra, Shimadzu, Kyoto, Japan) using a BPX70 capillary column (30 m × 0.25 mm, film thickness 0.25 μm; SGE, Austin, TX, USA). Helium was used as the carrier gas. The injection volume was 1 μL, the split ratio was 1:80, the injector temperature was 250 °C and the linear velocity was 35 cm/s. The initial oven temperature was 150 °C and was maintained

for 1 min, then increased at 1 °C/min to 180 °C and held for 2 min, followed by an increase at 5 °C/min to 220 °C. Mass spectral analysis was performed in scan mode.

Fatty acids were expressed as proportions of total identified fatty acids. The analysis included saturated fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA), n-3 PUFA and n-6 PUFA. Particular attention was given to palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0), palmitoleic acid (C16:1n-7), oleic acid (C18:1n-9), linoleic acid (C18:2n-6), dihomo-γ-linolenic acid (C20:3n-6), arachidonic acid (C20:4n-6), docosatetraenoic acid (C22:4n-6), docosapentaenoic n-3 acid (C22:5n-3) and docosahexaenoic acid (C22:6n-3).

Malondialdehyde determination: MDA concentration in serum and liver tissue was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a Shimadzu LC2010CHT system (Shimadzu, Japan), equipped with a UV-Vis detector set at 532 nm and an InertSustain C18 column (4.6 × 150 mm, 5 µm; GL Sciences Inc., Japan). The method was based on the reaction of MDA with thiobarbituric acid (TBA), resulting in the formation of a coloured TBA-MDA adduct. Tetraethoxypropane was used for preparation of the calibration curve. Liver tissue was homogenised and subjected to alkaline hydrolysis followed by derivatisation with 0.8% TBA. Samples were incubated for 45 min at 90 °C, cooled, mixed with methanol and sodium dodecyl sulphate, centrifuged and the resulting supernatant was analysed chromatographically. The mobile phase consisted of 50 mM KH_2PO_4 and methanol (50:50, v/v), the flow rate was 1 mL/min, the injection volume was 20 µL and the column temperature was 37 °C.

Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR): Total RNA was isolated from 30 mg of liver tissue using the SV Total RNA Isolation System (Promega GmbH, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions. RNA concentration and purity were determined using a BioDrop µLITE spectrophotometer (Cambridge, United Kingdom). Reverse transcription and quantitative PCR were performed in a one-step reaction using the One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit II (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) on a Stratagene MxPro3005 system (Agilent Technologies, USA).

The analysed genes were *Scd1*, *Fads1*, *Fads2*, *Nfe2l2*, *Tnf-α* and *Tgf-β*. Relative gene expression was calculated using the 2^−ΔΔCt method, with *β-actin* and *cyclophilin* used as reference genes.

Statistical analyses: Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8. Data are presented as mean ± standard deviation (SD) (n = 5 per group). Measurements were performed in triplicate. Statistical analyses were conducted separately for males and females. Differences between dietary groups were analysed using analysis of variance (ANOVA)

followed by Tukey's post hoc test. The effects of dietary treatment, sex and time and their interactions were additionally assessed using factorial analysis of variance. Statistical significance was set at $P < 0.05$. Sparse partial least squares discriminant analysis (sPLS-DA) was additionally used to evaluate the overall pattern of hepatic fatty acid profiles. The model included both aggregate and individual fatty-acid variables. The variable "n6" represents the total sum of analysed n-6 fatty acids, including linoleic acid (C18:2n-6), whereas "n6 PUFA" represents the total group of analysed n-6 polyunsaturated fatty acids.

Results: During the first month of treatment, body weight and glucose concentration did not differ significantly among groups in either sex. With increasing duration of the experiment, the differences became more evident. In males, body weight was higher in the HS group after 12 months and remained higher after 24 months, whereas LC males had a lower body weight than controls after 24 months. In females, the increase developed later: HS females had a higher body weight only after 24 months, while LC females had a lower body weight than controls at the same time point.

Glucose concentration increased in HS males after 12 months and was higher in both HS and LC-HS males after 24 months. In females, higher glucose concentrations were already present in HS and LC-HS groups after 12 months and remained elevated after 24 months. No significant differences from controls were found in LC animals. At the final time point, HOMA-IR was increased in HS and LC-HS groups in both sexes, whereas QUICKI was reduced in the same groups. LC animals maintained values comparable to their respective controls.

Hepatic SFA showed a heterogeneous response. Total SFA increased in LC males at later time points, while lower values were observed in several sucrose-treated groups. Palmitic acid (C16:0) varied according to sex, dietary treatment and duration, whereas stearic acid (C18:0) was generally reduced in sucrose-treated animals.

Changes in MUFA were considerably more consistent. Total MUFA, palmitoleic acid (C16:1n-7) and oleic acid (C18:1n-9) increased markedly in HS and LC-HS groups after prolonged treatment. This response was present in both sexes and was especially pronounced at the later stages of the experiment. LC animals generally maintained lower MUFA values.

The increase in MUFA was accompanied by changes in *Scd1* expression. After 12 months, increased *Scd1* expression was observed in HS and LC-HS females, whereas no comparable increase was found in males. After 24 months, *Scd1* expression was increased in sucrose-treated animals of both sexes. The parallel increase in *Scd1* expression and in the proportions of palmitoleic and oleic acids supports an increase in lipogenesis and enhanced desaturation of saturated fatty acids during chronic sucrose exposure.

The n-6 PUFA profile also changed progressively. Total n-6 PUFA, linoleic acid (C18:2n-6) and arachidonic acid (C20:4n-6) were generally reduced in sucrose-treated groups after prolonged exposure. Docosatetraenoic acid (C22:4n-6) showed a similar tendency, while dihomo-γ-linolenic acid (C20:3n-6) followed a more variable pattern.

A similar time-dependent decline was observed for n-3 PUFA. Total n-3 PUFA decreased in several experimental groups after 12 and 24 months. Docosapentaenoic n-3 acid (C22:5n-3) was reduced in most experimental groups after 12 months. After prolonged treatment, it remained reduced in sucrose-treated males, whereas LC males had values close to control and LC females showed a higher C22:5n-3 proportion than controls. DHA (C22:6n-3) was lower in several groups after 12 and 24 months.

The expression of *Fads1* and *Fads2* changed over time and did not follow a single sustained direction. *Fads1* was reduced in LC and LC-HS females during the early phase, increased in selected groups after 12 months and decreased in several groups after prolonged treatment. *Fads2* showed a comparable time-dependent response, with early reduction in LC-HS females, increased expression in LC-HS animals after 12 months and lower expression in several groups after 24 months.

MDA concentrations did not differ among groups after the first month. After 12 months, MDA was increased in HS males and females, and after 24 months it was increased in both HS and LC-HS groups in both sexes. *Nfe2l2* expression was unchanged during the early phase, increased in several sucrose-treated groups after 12 months and was lower than control values in several groups after prolonged exposure.

Changes in oxidative stress were accompanied by altered expression of inflammatory genes. *Tgf-β* expression increased after 12 months in HS males and in HS and LC-HS females. After 24 months, the increase remained most evident in HS animals. *Tnf-α* expression increased in HS males and females after 12 months and in both sucrose-treated groups in both sexes after prolonged treatment.

The lower-energy diet with an increased fibre content modified several of these responses. LC animals had lower body weight and maintained glucose, HOMA-IR and QUICKI values close to control levels. MDA concentrations were also lower, while selected fatty acids showed a more favourable pattern. The most evident change was observed for C22:5n-3, which remained close to control values in LC males and increased above control values in LC females. However, the LC-HS groups still developed higher glucose and HOMA-IR and lower QUICKI after prolonged sucrose exposure, showing that the dietary intervention did not completely prevent the metabolic effects of sucrose.

The response also differed according to sex. The increase in body weight developed earlier in HS males than in HS females. Differences were also present in the temporal regulation of *Scd1*, *Fads1* and *Fads2*, as well as in the proportions of selected long-chain PUFA. Female animals showed a more favourable C22:5n-3 response under the LC treatment. However, prolonged sucrose exposure eventually affected glucose metabolism, oxidative stress and inflammatory pathways in both sexes.

The sPLS-DA analysis performed after 24 months showed a clear separation of CON and LC groups from HS and LC-HS groups along the first component. Partial separation according to sex was also visible along the second component. The n6 variable, total PUFA and MUFA contributed most strongly to the separation of groups, followed by oleic and palmitoleic acids. The heat map showed relatively higher MUFA, C18:1n-9 and C16:1n-7 in HS and LC-HS groups and relatively higher PUFA, n-6 PUFA and n6 in CON and LC groups. In this analysis, n6 and n-6 PUFA were treated as distinct variables: n6 denotes the total sum of analysed n-6 fatty acids, including linoleic acid, whereas n-6 PUFA denotes the summed analysed n-6 polyunsaturated fatty acids.

Discussion: The long duration of this experiment was important for understanding the progression of the metabolic response. Most analysed parameters were still relatively unchanged after one month, while a broader pattern of metabolic disturbances became evident after 12 months and was most pronounced after 24 months. This suggests that the sucrose model used in the present study is particularly suitable for examining chronic metabolic syndrome rather than only its early development.

The changes in glucose, HOMA-IR and QUICKI show that chronic sucrose exposure progressively impaired insulin sensitivity. The fact that LC-HS animals developed insulin resistance despite a less pronounced effect on body weight indicates that metabolic dysfunction was not simply a consequence of increased body mass. The dietary carbohydrate load itself appears to have played an important role in the deterioration of glucose homeostasis.

The most consistent lipid-related finding was the increase in MUFA together with increased *Scd1* expression. The simultaneous increase in palmitoleic and oleic acids suggests that chronic sucrose intake shifted hepatic fatty acid metabolism towards increased formation of monounsaturated fatty acids. Because *Scd1* is directly involved in the desaturation of saturated fatty acids, its increased expression provides molecular support for the observed fatty acid pattern and for enhanced lipogenesis during chronic metabolic syndrome.

The behaviour of palmitic acid was less uniform, which is not unexpected. Palmitic acid is not only a product of lipogenesis but also a substrate for elongation, desaturation and

oxidation. Therefore, increased lipogenesis does not necessarily lead to its accumulation in liver tissue. In this study, the combined increase in *Scd1*, C16:1n-7 and C18:1n-9 provides a clearer indication of the direction of lipid metabolism than changes in C16:0 alone.

The PUFA response was more complex. Several n-6 and n-3 fatty acids decreased during prolonged sucrose exposure, but the pattern was not identical for all individual fatty acids or all experimental groups. The variable response of DGLA is a good example of this complexity. The findings are therefore better described as remodelling of PUFA metabolism rather than a uniform reduction of all n-3 and n-6 fatty acids.

The time-dependent regulation of *Fads1* and *Fads2* supports this interpretation. Their expression changed differently during the early, intermediate and late stages of the experiment. This suggests that Δ5- and Δ6-desaturation pathways adapt dynamically during prolonged metabolic stress and that their regulation cannot be adequately assessed at a single time point.

The increase in MDA after prolonged sucrose intake indicates progressive lipid peroxidation. The pattern of *Nfe2l2* expression is also consistent with a changing antioxidant response over time. The increase observed at intermediate stages may represent an adaptive response to oxidative challenge, whereas lower expression after prolonged treatment in several groups may reflect reduced ability to maintain this response under chronic metabolic stress.

Increased expression of *Tnf-α* and *Tgf-β* accompanied these oxidative changes. The increase in *Tnf-α* is consistent with the development of chronic inflammatory signalling, while the increase in *Tgf-β* supports activation of profibrotic pathways. Taken together, the results show that chronic metabolic syndrome involved not only impaired glucose and lipid metabolism but also progressive oxidative and inflammatory changes.

The lower-energy diet with an increased fibre content had a clear preventive effect in animals that were not exposed to sucrose. These animals maintained more favourable body weight, glucose regulation and insulin sensitivity, while lipid peroxidation remained lower. The response of hepatic fatty acids was less uniform, but C22:5n-3 showed a particularly favourable pattern.

In the presence of sucrose, however, this dietary intervention provided only partial protection. LC-HS animals still developed impaired glucose regulation and insulin sensitivity after prolonged exposure. The lower-energy, high-fibre diet therefore had a favourable metabolic effect, but it was not sufficient to fully counteract the consequences of chronic intake of 30% sucrose. Because lower energy content and increased fibre content were part of the same intervention, their individual contributions cannot be separated in the present experimental design.

Female sex also modified the course of the metabolic response. Some changes, particularly the increase in body weight, appeared later in females than in males. Differences in the timing of *Scd1*, *Fads1* and *Fads2* expression and in selected long-chain PUFA further suggest sex-related regulation of hepatic fatty acid metabolism. However, prolonged sucrose exposure eventually affected both sexes, indicating that the protective effect associated with female sex was not complete and depended on the metabolic pathway and duration of exposure.

The multivariate analysis supported these observations. Dietary treatment was the main factor separating the hepatic fatty acid profiles, whereas sex contributed to a secondary level of separation. The strong contribution of n6, MUFA and total PUFA, together with the additional contribution of n-6 PUFA, confirms that chronic sucrose intake produced a distinct shift in the overall hepatic fatty acid pattern.

Overall, chronic sucrose exposure progressively altered glucose homeostasis, lipogenesis, fatty acid desaturation, oxidative balance and inflammatory signalling. The lower-energy, high-fibre diet attenuated several of these changes, particularly in the absence of sucrose, while female sex was associated with a slower or more favourable response in selected metabolic pathways.

Conclusion: Chronic intake of 30% sucrose induced metabolic syndrome, which was reflected by increased glucose concentrations and HOMA-IR values together with decreased QUICKI values.

Sucrose-induced metabolic syndrome was accompanied by enhanced lipogenesis and altered hepatic fatty acid metabolism. This was reflected by increased *Scd1* expression and higher proportions of palmitoleic acid (C16:1n-7) and oleic acid (C18:1n-9), together with changes in *Fads1* and *Fads2* expression and lower proportions of several n-6 PUFA, including linoleic acid (C18:2n-6), arachidonic acid (C20:4n-6) and docosatetraenoic acid (C22:4n-6), and n-3 PUFA, particularly docosapentaenoic n-3 acid (C22:5n-3) and docosahexaenoic acid (C22:6n-3).

Chronic metabolic syndrome was also associated with increased lipid peroxidation, altered *Nfe2l2* expression and increased *Tnf-α* and *Tgf-β* expression, confirming the development of oxidative and inflammatory responses and activation of profibrotic signalling.

The lower-energy diet with an increased fibre content attenuated the development of chronic metabolic syndrome, as reflected by lower body weight, lower glucose and HOMA-IR values, higher QUICKI values, reduced lipid peroxidation and a more favourable proportion of docosapentaenoic n-3 acid (C22:5n-3).

Female sex had a protective role in the development of chronic metabolic syndrome, reflected by the slower development of selected metabolic changes, a more favourable C22:5n-3 profile and a different temporal pattern of *Scd1*, *Fads1* and *Fads2* expression.

The results support the working hypothesis that a lower-energy diet and female sex have protective effects on selected metabolic and molecular mechanisms involved in the development of chronic metabolic syndrome, although the magnitude of these effects depends on the duration of exposure and the metabolic endpoint examined.

Keywords: metabolic syndrome, sucrose, dietary energy level, sex, fatty acids, desaturases, insulin resistance, oxidative stress, inflammation

POPIS PRILOGA

SLIKE

Slika 1. Patofiziologija metaboličkog sindroma (ROCHLANI i sur., 2017).

Slika 2. Prikaz α-linolenske kiseline i načina označavanja položaja dvostrukih veza

Slika 3. Biokonverzija n-3 i n-6 višestruko nezasićenih masnih kiselina

Slika 4. Povezanost nakupljanja masnog tkiva s oksidacijskim stresom, lipidnom peroksidacijom i razvojem inzulinske rezistencije (prilagođeno prema PILLON i SOULAGE, 2012).

Slika 5. Shematski prikaz lipidne peroksidacije

Slika 6. Shematski prikaz podjele životinja prema hranidbenom tretmanu, spolu i vremenu žrtvovanja

Slika 7. Kromatogram standardne smjese 37 metilnih estera masnih kiselina (FAME; Supelco, Bellfonte, PA, USA) upotrijebljen za identifikaciju masnih kiselina

Slika 8. Reprezentativni kromatogram masnih kiselina sadržanih u tkivu jetre

Slika 9. A) Preklopljeni kromatogrami standarda malondialdehida (MDA) korišteni za izradu kalibracijske krivulje i B) reprezentativni kromatogram koncentracije MDA, određene metodom tvari koje reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom (TBARS), u tkivu jetre

Slika 10. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na pokazatelje kroničnog metaboličkog sindroma u štakora.

Slika 11. Utjecaj hranidbenih tretmana na udio zasićenih masnih kiselina u jetri mužjaka i ženki.

Slika 12. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na udio jednostruko nezasićenih masnih kiselina u jetri.

Slika 13. Ukupne n-6 višestruko nezasićene masne kiseline (A, B), linolna kiselina (C18:2n-6; C, D), dihomo-γ-linolenska kiselina (C20:3n-6; E, F) i arahidonska kiselina (C20:4n-6; G, H) u jetri mužjaka i ženki nakon 1., 12. i 24. mjeseca hranidbenog tretmana.

Slika 14. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na udio n-3 višestruko nezasićenih masnih kiselina u jetri.

Slika 15. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na relativnu ekspresiju gena *Fads1*, koji kodira Δ5-desaturazu, u jetri nakon 1. (A), 12. (B) i 24. mjeseca (C) hranidbenog tretmana.

Slika 16. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na relativnu ekspresiju gena *Fads2*, koji kodira Δ6-desaturazu, u jetri nakon 1. (A), 12. (B) i 24. mjeseca (C) hranidbenog tretmana.

Slika 17. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na relativnu ekspresiju gena *Scd1*, koji kodira Δ9-desaturazu, u jetri nakon 1. (A), 12. (B) i 24. mjeseca (C) hranidbenog tretmana.

Slika 18. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na pokazatelje oksidacijskog stresa i antioksidacijske obrane.

Slika 19. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na relativnu ekspresiju gena povezanih s upalnim odgovorom u jetri.

Slika 20. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na multivarijantni obrazac masnokiselinskog profila jetre nakon 24 mjeseca istraživanja.

TABLICE

Tablica 1. Kemijski sastav i sastav masnih kiselina pokusne hrane

Tablica 2. Uvjeti tijekom mjerenja na kromatografu (STARČEVIĆ i sur., 2015.)

Tablica 3. Početnice korištene u RT-qPCR analizi

POPIS KRATICA

ALA – α-linolenska kiselina (engl. *alpha-linolenic acid*)

ANOVA – analiza varijance (engl. *analysis of variance*)

ARA – arahidonska kiselina (engl. *arachidonic acid*)

ChREBP – protein koji veže element odgovora na ugljikohidrate (engl. *carbohydrate-responsive element-binding protein*)

CoA – koenzim A

DGLA – dihomo-γ-linolenska kiselina

DHA – dokozaheksaenska kiselina

DPA – dokozapentaenska kiselina

ELOVL – elongaza masnih kiselina vrlo dugog lanca (engl. *elongation of very long-chain fatty acids*)

EPA – eikozapentaenska kiselina

FADS1 / Fads1 – desaturaza masnih kiselina 1; Δ5-desaturaza

FADS2 / Fads2 – desaturaza masnih kiselina 2; Δ6-desaturaza

FAME – metilni esteri masnih kiselina (engl. *fatty acid methyl esters*)

FASN – sintaza masnih kiselina (engl. *fatty acid synthase*)

GC–MS – plinska kromatografija s masenom spektrometrijom

GLA – γ-linolenska kiselina

GLP-1 – glukagonu sličan peptid 1 (engl. *glucagon-like peptide-1*)

HDL – lipoprotein visoke gustoće (engl. *high-density lipoprotein*)

HOMA-IR – indeks inzulinske rezistencije prema modelu homeostaze (engl. *Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (engl. *high-performance liquid chromatography*)

IL-6 – interleukin 6

LA – linolna kiselina

LDL – lipoprotein niske gustoće (engl. *low-density lipoprotein*)

MDA – malondialdehid

MUFA – jednostruko nezasićene masne kiseline (engl. *monounsaturated fatty acids*)

NAD(P)H – reducirani nikotinamid-adenin-dinukleotid (fosfat)

NADPH – reducirani nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat

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

NFE2L2 / Nfe2l2 – gen koji kodira transkripcijski čimbenik NRF2

NRF2 – nuklearni faktor eritroidnog podrijetla 2, sličan faktoru 2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)

PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

PUFA – višestruko nezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acids*)

QUICKI – indeks inzulinske osjetljivosti (engl. *Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*)

RNA – ribonukleinska kiselina

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

RT-qPCR – kvantitativna lančana reakcija polimerazom nakon reverzne transkripcije (engl. *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*)

SCD1 / Scd1 – stearoil-CoA desaturaza 1; Δ9-desaturaza

SCFA – kratkolančane masne kiseline (engl. *short-chain fatty acids*)

SD – standardna devijacija

SFA – zasićene masne kiseline (engl. *saturated fatty acids*)

sPLS-DA – rijetka parcijalna diskriminantna analiza najmanjih kvadrata (engl. *sparse partial least squares discriminant analysis*)

SREBP-1c – protein 1c koji veže regulatorni element sterola (engl. *sterol regulatory element-binding protein 1c*)

TBA – tiobarbiturna kiselina

TBARS – tvari koje reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom (engl. *thiobarbituric acid reactive substances*)

TEP – 1,1,3,3-tetraetoksipropan

TGF-β / Tgf-β – transformirajući čimbenik rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*)

TNF-α / Tnf-α – čimbenik nekroze tumora alfa (engl. *tumour necrosis factor alpha*)

VLDL – lipoprotein vrlo niske gustoće (engl. *very-low-density lipoprotein*)

CON – kontrolna skupina, standardna hrana i voda

LC – skupina hranjena hranom smanjene energetske vrijednosti s povećanim udjelom vlakana

HS – skupina hranjena standardnom hranom uz 30 % saharoze u vodi za piće

LC-HS – skupina hranjena hranom smanjene energetske vrijednosti s povećanim udjelom vlakana uz 30 % saharoze u vodi za piće

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA 3
2.1. Metabolički sindrom 3
2.2. Čimbenici i uzroci razvoja metaboličkog sindroma 4
2.3. Patofiziologija nastanka metaboličkog sindroma 6
2.4. Animalni modeli metaboličkog sindroma 8
2.4.1. Hranidbeni modeli metaboličkog sindroma 9
2.5. Podjela i svojstva masnih kiselina 14
2.6. Sinteza i biokonverzija masnih kiselina 16
2.7. Regulacija metabolizma i biokonverzije masnih kiselina 19
2.8. Utjecaj spola na metabolizam i sastav masnih kiselina 21
2.9. Utjecaj dobi na metabolizam i sastav masnih kiselina 22
2.10. Oksidacijski stres i lipidna peroksidacija 24
3. OBRAZLOŽENJE TEME 28
4. MATERIJALI I METODE 29
4.1. Pokusne životinje 29
4.2. Hranidbeni tretman 29
4.3. Uzimanje uzoraka 30
4.4. Određivanje koncentracije inzulina u serumu 31
4.5. Homeostatski model procjene inzulinske rezistencije (HOMA-IR) i kvantitativni indeks provjere osjetljivosti na inzulin (QUICKI) 32
4.6. Određivanje masnokiselinskog sastava tkiva jetre 32
4.7. Određivanje malondialdehida (MDA) 34
4.8. Određivanje ekspresije gena 35
4.8.1. Izolacija ukupne RNA 35
4.8.2. Reverzna transkripcija i kvantitativni PCR 35
4.9. Statistička analiza 37

5. REZULTATI 38
5.1. Pokazatelji kroničnog metaboličkog sindroma 38
5.2. Učinak prehrane smanjene energetske vrijednosti obogaćene vlaknima na metabolizam lipida 40
5.2.1. Utjecaj hranidbenih tretmana na sastav zasićenih masnih kiselina u jetri 40
5.2.2. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na sastav jednostruko nezasićenih masnih kiselina u jetri 42
5.2.3. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na sastav n-6 višestruko nezasićenih masnih kiselina u jetri 44
5.2.4. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na sastav n-3 višestruko nezasićenih masnih kiselina u jetri 46
5.2.5. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na ekspresiju gena desaturaza u jetri 48
5.3. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na oksidacijski stres i antioksidacijski odgovor .. 52
5.4. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na upalni odgovor u jetri 54
5.5. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na multivarijantni obrazac masnokiselinskog profila jetre 56
6. RASPRAVA 58
7. ZAKLJUČCI 67
8. LITERATURA 68
9. ŽIVOTOPIS 83
10. POPIS OBJAVLJENIH RADOVA 85

1. UVOD

Prevalencija pretilosti posljednjih se desetljeća izrazito povećala te pretilost danas predstavlja jedan od najvažnijih javnozdravstvenih izazova. Njezinu razvoju pridonose dugotrajan prekomjeran unos energetski bogate hrane i napitaka s visokim udjelom jednostavnih šećera, uz smanjenu tjelesnu aktivnost. Posljedice takvog načina života ne ograničavaju se na povećanje tjelesne mase, nego uključuju inzulinsku rezistenciju, poremećaje metabolizma lipida, metaboličku disfunkciju jetre i povećani kardiometabolički rizik (SINGLA i sur., 2010; MASOOD i MOORTHY, 2023; AHMED i MOHAMMED, 2025; CHOI i sur., 2025).

Starenje predstavlja dodatni fiziološki čimbenik koji može mijenjati tijek metaboličkih poremećaja. Praćeno je promjenama tjelesnog sastava i hormonalnog statusa, smanjenjem metaboličke prilagodljivosti te kroničnom upalom niskog stupnja (FRANCESCHI i sur., 2018; ZHANG i sur., 2023). Pretilost i starenje pritom dijele niz patofizioloških obilježja, među kojima su inzulinska rezistencija, mitohondrijska disfunkcija, oksidacijski stres i poremećaji metabolizma lipida (BARZILAI i sur., 2012; LÓPEZ-OTÍN i sur., 2013). Zbog toga dugotrajni pokusni modeli omogućuju praćenje metaboličkih promjena koje se ne moraju jednako očitovati u ranim i kasnijim fazama izloženosti prehrambenom opterećenju.

Jetra ima središnju ulogu u održavanju lipidne homeostaze jer sudjeluje u unosu, sintezi, desaturaciji, elongaciji i oksidaciji masnih kiselina (SANDERS i GRIFFIN, 2016). Promjene njezina masnokiselinskog sastava odražavaju istodobni utjecaj prehrane i endogenih metaboličkih putova te su povezane s metaboličkom disfunkcijom, oksidacijskim stresom i napredovanjem steatotičnih promjena jetre (PURI i sur., 2009; SOFTIC i sur., 2016; JUMP i sur., 2018). Posebno su važne promjene u zastupljenosti zasićenih (SFA), jednostruko nezasićenih (MUFA) i višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA), kao i promjene unutar n-3 i n-6 linija PUFA. U eksperimentalnim modelima prehrambeno izazvanih metaboličkih poremećaja takve se promjene mogu razlikovati ovisno o vrsti prehrambenog opterećenja (MAŠEK i sur., 2020).

Važnu ulogu u regulaciji masnokiselinskog sastava imaju desaturaze masnih kiselina. Stearoil-CoA desaturaza-1 (SCD-1; Δ9-desaturaza) sudjeluje u pretvorbi zasićenih masnih kiselina u MUFA, dok Δ5- i Δ6-desaturaze sudjeluju u biosintezi dugolančanih n-3 i n-6 PUFA iz njihovih esencijalnih prekursora (NAKAMURA i NARA, 2004). Ekspresija i aktivnost tih enzima mijenjaju se pod utjecajem prehrane, metaboličkog stanja i dobi (ULMANN i sur., 1991; WANG i sur., 2006; JUMP, 2009). Stoga istodobno praćenje masnokiselinskog profila i

ekspresije gena *Scd1*, *Fads1* i *Fads2* može dati dodatni uvid u prilagodbu jetrenog metabolizma masnih kiselina tijekom dugotrajnog metaboličkog opterećenja.

Sastav prehrane može ublažiti ili pojačati navedene metaboličke promjene. Prehrana smanjene energetske vrijednosti s povećanim udjelom vlakana može utjecati na tjelesnu masu, metabolizam glukoze i lipida te na upalni i oksidacijski odgovor. Prehrambena vlakna mogu pridonijeti metaboličkoj homeostazi i preko promjena sastava i aktivnosti crijevne mikrobiote (SONNENBURG i BÄCKHED, 2016). U ovom istraživanju učinak takve prehrane treba promatrati kao učinak cjelovite prehrambene intervencije jer su smanjena energetska vrijednost i povećani udio vlakana sastavni dijelovi istoga hranidbenog tretmana.

Na metabolizam masnih kiselina i odgovor na prehrambeno opterećenje utječe i spol. Razlike između mužjaka i ženki povezane su s hormonskom regulacijom, raspodjelom i oksidacijom masnih kiselina te metabolizmom dugolančanih PUFA (JENSEN, 1995; DECSI i KENNEDY, 2011; COSTA i sur., 2025). Razlike povezane sa spolom zabilježene su i u jetrenom masnokiselinskom sastavu, lipogenezi i β-oksidaciji u eksperimentalnih životinja (STARČEVIĆ i sur., 2017). Međutim, velik broj istraživanja proveden je samo na jednom spolu ili tijekom kraćeg razdoblja, pa još nije dovoljno jasno u kojoj se mjeri dugotrajni metabolički odgovor na isti prehrambeni izazov razlikuje između mužjaka i ženki.

Polazeći od navedenoga, ovo je istraživanje usmjereno na praćenje metaboličkih i molekularnih promjena tijekom dugotrajnog metaboličkog sindroma izazvanog saharozom u mužjaka i ženki Wistar Han štakora. Posebna je pozornost posvećena masnokiselinskom sastavu jetre i ekspresiji gena uključenih u desaturaciju masnih kiselina te njihovoj povezanosti s inzulinskom osjetljivošću, lipidnom peroksidacijom i upalnim odgovorom. Istodobno je ispitan učinak prehrane smanjene energetske vrijednosti s povećanim udjelom vlakana na razvoj i progresiju navedenih promjena. Praćenje životinja nakon 1., 12. i 24. mjeseca hranidbenog tretmana omogućilo je procjenu vremenskog tijeka metaboličkog odgovora i usporedbu njegova razvoja između mužjaka i ženki.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Metabolički sindrom

Definicija metaboličkog sindroma mijenjala se tijekom vremena, usporedno s razvojem novih spoznaja o njegovim uzrocima i čimbenicima rizika. Različite stručne organizacije predlagale su različite dijagnostičke kriterije, no svim je definicijama zajedničko prepoznavanje skupa međusobno povezanih metaboličkih poremećaja koji povećavaju rizik za razvoj šećerne bolesti tipa 2 i kardiovaskularnih bolesti. Danas se metabolički sindrom najčešće opisuje kao skup poremećaja koji uključuju abdominalnu pretilost, poremećenu regulaciju glukoze, povišeni krvni tlak i aterogenu dislipidemiju (ALBERTI i sur., 2009; KAUR, 2014; ROCHLANI i sur., 2017). U njegovu razvoju važnu ulogu imaju inzulinska rezistencija, visceralna pretilost, poremećaji metabolizma lipida i kronična upala niskog stupnja.

Jedan od ključnih patofizioloških poremećaja u metaboličkom sindromu jest inzulinska rezistencija, odnosno smanjena sposobnost perifernih tkiva da odgovore na djelovanje inzulina. Posljedično se smanjuju unos i iskorištavanje glukoze, dok u masnom tkivu slabi antilipolitički učinak inzulina, što dovodi do pojačanog otpuštanja slobodnih masnih kiselina u cirkulaciju i njihova povećanog dotoka u jetru. Istodobno, pojedini lipogeni učinci inzulina u jetri mogu ostati očuvani, čime se potiču sinteza lipida i nakupljanje triacilglicerola. Takvo istodobno narušavanje homeostaze glukoze i povećano lipidno opterećenje jetre čine važnu sastavnicu patofiziologije metaboličkog sindroma (ROBERTS i sur., 2013).

Jetra pritom ima središnju ulogu u održavanju homeostaze glukoze i lipida te u brojnim procesima metabolizma masnih kiselina, uključujući njihov unos iz cirkulacije, sintezu, desaturaciju, elongaciju i oksidaciju. Masne kiseline u jetri dalje se ugrađuju u triacilglicerole, fosfolipide i estere kolesterola, a njihova sudbina ovisi o ravnoteži između dostupnosti supstrata, sinteze, oksidacije i izlučivanja lipida. U uvjetima dugotrajnog energetskog viška ta se ravnoteža može narušiti, što pogoduje nakupljanju lipida i promjenama masnokiselinskog sastava jetre (ALVES-BEZERRA i COHEN, 2018). Dodatni doprinos takvim promjenama daje povećan priljev slobodnih masnih kiselina iz inzulinski rezistentnog masnog tkiva.

Dislipidemija je jedno od karakterističnih obilježja metaboličkog sindroma, a najčešće se očituje povišenim koncentracijama triacilglicerola i sniženim koncentracijama HDL-kolesterola, uz promjene u sastavu i raspodjeli lipoproteinskih čestica. Povećana dostupnost slobodnih masnih kiselina u jetri, zajedno s pojačanom sintezom triacilglicerola, može povećati

stvaranje i izlučivanje VLDL-a te dodatno poremetiti lipidnu homeostazu (ROCHLANI i sur., 2017; ALVES-BEZERRA i COHEN, 2018).

Metabolički sindrom usko je povezan i s kroničnom upalom niskog stupnja, osobito u uvjetima povećane količine visceralnog masnog tkiva. Hipertrofija adipocita i povećana infiltracija imunoloških stanica mijenjaju funkciju masnog tkiva i njegov sekretorni profil, pri čemu se povećava stvaranje proupalnih medijatora, među kojima su TNF-α i IL-6, uz istodobno smanjenje dostupnosti adiponektina. Takve promjene dodatno narušavaju inzulinsku signalizaciju i metabolizam lipida te pridonose održavanju inzulinske rezistencije i upalnog odgovora. Masno tkivo stoga se ne smatra samo spremištem energije, nego metabolički aktivnim tkivom koje ima važnu ulogu u razvoju i progresiji metaboličkog sindroma (KOPP i sur., 2003).

2.2. Čimbenici i uzroci razvoja metaboličkog sindroma

Razvoj metaboličkog sindroma posljedica je složenog međudjelovanja genetskih, okolišnih i životnih čimbenika. Među najvažnijima su dugotrajan prekomjeran unos energije, prehrana bogata jednostavnim šećerima i mastima, smanjena tjelesna aktivnost, povećanje visceralnog masnog tkiva te promjene povezane sa starenjem. Na izraženost metaboličkog odgovora dodatno utječu spol i genetska podloga pojedinca, zbog čega se isti okolišni i prehrambeni čimbenici ne moraju jednako odraziti na sve jedinke (ROBERTS i sur., 2013; ROCHLANI i sur., 2017).

Prehrana ima osobito važnu ulogu u nastanku i progresiji metaboličkog sindroma. Dugotrajan unos hrane visoke energetske vrijednosti, rafiniranih ugljikohidrata i napitaka zaslađenih šećerom pogoduje pozitivnoj energetskoj bilanci i razvoju metaboličkih poremećaja. Napitci zaslađeni šećerom omogućuju unos velikih količina lako dostupnih ugljikohidrata, a njihov visok unos povezan je s povećanim rizikom od pretilosti, šećerne bolesti tipa 2 i kardiovaskularnih bolesti (MALIK i sur., 2010). Važan je i sastav prehrambenih masti jer pojedine zasićene masne kiseline mogu nepovoljno utjecati na lipidnu homeostazu i upalne procese, dok nezasićene masne kiseline mogu imati drukčije metaboličke učinke. U uobičajenim prehrambenim obrascima ugljikohidrati i masti djeluju istodobno, pa njihov pojedinačni doprinos razvoju metaboličkih poremećaja nije uvijek moguće jasno razdvojiti (ROBERTS i sur., 2013; ROCHLANI i sur., 2017).

Dugotrajan energetski višak postupno povećava masne zalihe organizma. Kada kapacitet potkožnog masnog tkiva za skladištenje lipida postane nedostatan, dolazi do njihova većeg nakupljanja u visceralnom masnom tkivu i ektopičnim spremištima, osobito u jetri i skeletnim mišićima. Visceralno masno tkivo pritom ima važnu metaboličku i endokrinu ulogu jer otpušta slobodne masne kiseline, adipokine i citokine. Povećan dotok slobodnih masnih kiselina portalnom cirkulacijom dodatno opterećuje jetru, pogoduje sintezi triacilglicerola i pridonosi razvoju inzulinske rezistencije (KOPP i sur., 2003; BERGMAN i sur., 2006; TCHERNOF i DESPRÉS, 2013; ROBERTS i sur., 2013).

Važan čimbenik u sastavu prehrane jest i unos vlakana. Prehrambena vlakna smanjuju energetsku gustoću obroka, mogu usporiti apsorpciju pojedinih hranjivih tvari te djeluju kao supstrat crijevnoj mikrobioti. Njihovom fermentacijom nastaju kratkolančane masne kiseline, ponajprije acetat, propionat i butirat, koje sudjeluju u brojnim metaboličkim i signalnim procesima (DEN BESTEN i sur., 2013; KOH i sur., 2016). Veći unos prehrambenih vlakana povezan je s povoljnijom regulacijom glukoze i lipida te manjim dugoročnim povećanjem tjelesne mase (ANDERSON i sur., 2009; MENNI i sur., 2017).

Uz prehranu, važan čimbenik predstavlja i tjelesna aktivnost. Smanjena potrošnja energije pogoduje održavanju pozitivne energetske bilance, ali istodobno smanjuje iskorištavanje glukoze i masnih kiselina u skeletnim mišićima te pridonosi razvoju inzulinske rezistencije. Učinak prehrane i tjelesne aktivnosti stoga je međusobno povezan i zajedno određuje ukupno energetsko i metaboličko opterećenje organizma (ROBERTS i sur., 2013).

Dob dodatno utječe na osjetljivost organizma prema metaboličkim poremećajima. Tijekom starenja dolazi do promjena tjelesnog sastava, hormonalnog statusa, osjetljivosti na inzulin i energetskog metabolizma, zbog čega odgovor na isti prehrambeni izazov može biti različit u pojedinim životnim razdobljima. Dugotrajna izloženost nepovoljnim prehrambenim čimbenicima stoga s vremenom može dovesti do izraženijih metaboličkih promjena, što je u skladu i s porastom prevalencije metaboličkog sindroma sa životnom dobi (ROCHLANI i sur., 2017).

Spol je također važan biološki čimbenik koji može utjecati na razvoj i izraženost metaboličkih promjena. Spolni hormoni utječu na raspodjelu masnog tkiva, mobilizaciju i oksidaciju masnih kiselina te metabolizam dugolančanih višestruko nezasićenih masnih kiselina, zbog čega odgovor na isti prehrambeni izazov može biti različit u mužjaka i ženki (JENSEN, 1995; DECSI i KENNEDY, 2011; STARČEVIĆ i sur., 2017). Upravo zbog tih

razlika dob i spol predstavljaju važne čimbenike koje treba uzeti u obzir pri proučavanju razvoja i progresije metaboličkog sindroma.

2.3. Patofiziologija nastanka metaboličkog sindroma

Patofiziologija metaboličkog sindroma temelji se na međusobno povezanim promjenama u regulaciji glukoze i lipida, pri čemu središnje mjesto zauzima inzulinska rezistencija. Smanjena osjetljivost perifernih tkiva na djelovanje inzulina dovodi do slabijeg unosa glukoze u skeletne mišiće, dok se u masnom tkivu smanjuje sposobnost inzulina da inhibira lipolizu. Posljedično se povećava koncentracija glukoze u krvi i otpuštanje slobodnih masnih kiselina u cirkulaciju. Pankreas u početku kompenzira smanjenu osjetljivost perifernih tkiva povećanim lučenjem inzulina, zbog čega se razvija hiperinzulinemija. S produljenjem metaboličkog opterećenja takav kompenzacijski odgovor može postati nedostatan, čime se poremećaj regulacije glukoze dodatno produbljuje (ROBERTS i sur., 2013).

Povećana dostupnost slobodnih masnih kiselina dodatno opterećuje tkiva uključena u regulaciju energetskog metabolizma, osobito jetru i skeletne mišiće. Kada unos i stvaranje masnih kiselina premaše mogućnosti njihove oksidacije i pohrane u neutralne lipide, dolazi do nakupljanja lipidnih međuprodukata, među kojima su diacilgliceroli i ceramidi. Njihovo povećano stvaranje može narušiti inzulinsku signalizaciju i pridonijeti razvoju lipotoksičnosti. Metaboličke posljedice stoga ne ovise samo o ukupnoj količini lipida u tkivu, nego i o njihovu sastavu te raspodjeli među pojedinim lipidnim klasama (TCHERNOF i DESPRÉS, 2013; ROBERTS i sur., 2013).

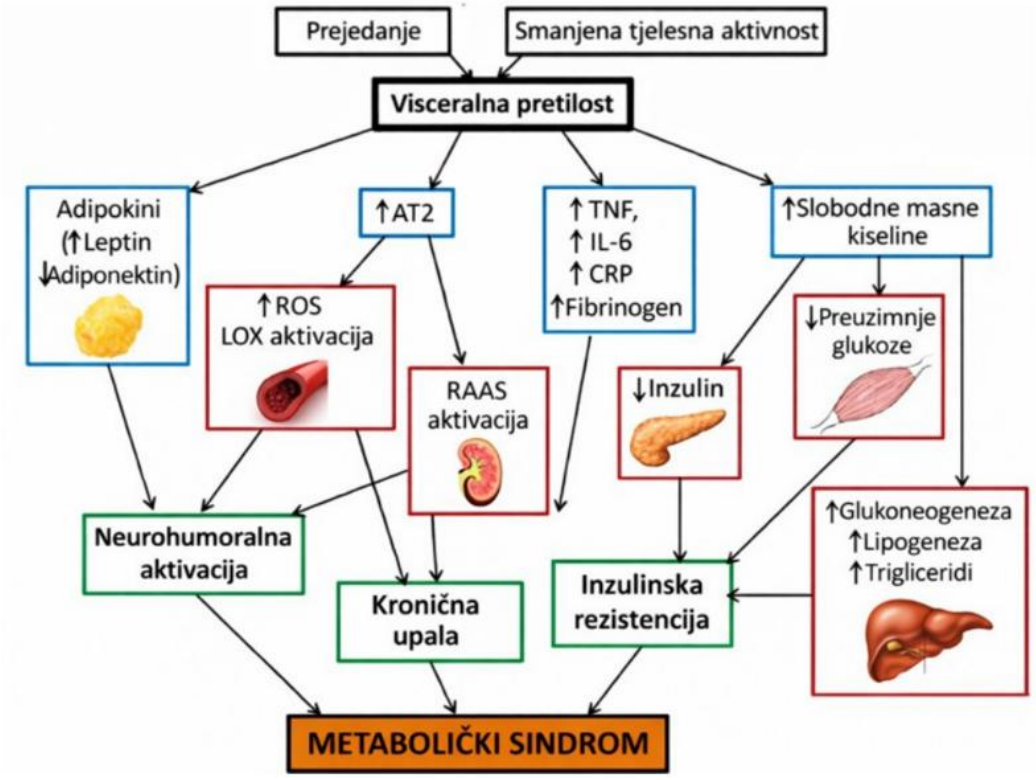
Jetra na povećanu dostupnost ugljikohidrata i masnih kiselina odgovara promjenama u regulaciji sinteze i preraspodjele lipida. Glukoza i inzulin djeluju preko transkripcijskih čimbenika, među kojima su ChREBP i SREBP-1c, koji sudjeluju u regulaciji ekspresije gena uključenih u sintezu masnih kiselina. Dugotrajan visok unos jednostavnih šećera zbog toga može potaknuti lipogene putove i mijenjati udio pojedinih zasićenih i jednostruko nezasićenih masnih kiselina u jetri. Ekspresija lipogenih gena pritom ne predstavlja izravnu mjeru ukupne *de novo* lipogeneze, nego pokazatelj molekularne regulacije procesa uključenih u sintezu i metabolizam masnih kiselina (NAKAMURA i NARA, 2004; JUMP i sur., 2013).

Poremećaji metabolizma glukoze i lipida usko su povezani i s povećanim oksidacijskim opterećenjem. Visoke koncentracije glukoze i slobodnih masnih kiselina mogu povećati

stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta različitim mehanizmima, uključujući aktivaciju NAD(P)H oksidaze i promjene u mitohondrijskom metabolizmu (INOGUCHI i sur., 2000). Kada stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta premaši sposobnost antioksidacijskih sustava da ih uklone, razvija se oksidacijski stres, praćen oksidacijskim oštećenjem lipida, proteina i nukleinskih kiselina. Posebno su osjetljive višestruko nezasićene masne kiseline, čija lipidna peroksidacija dovodi do nastanka sekundarnih produkata, među kojima je i malondialdehid.

Oksidacijski i upalni procesi pritom su međusobno povezani i mogu se uzajamno pojačavati. Reaktivne kisikove vrste mogu aktivirati proupalne signalne putove, dok aktivirane imunološke stanice dodatno pridonose stvaranju reaktivnih spojeva. Među važnim posrednicima takvog odgovora nalazi se TNF-α, koji može dodatno narušiti inzulinsku osjetljivost i potaknuti lipolizu. TGF-β sudjeluje u regulaciji upalnog odgovora, remodeliranju izvanstaničnog matriksa i profibrotičnoj signalizaciji. Povećana ekspresija *Tgf-β* stoga ne predstavlja dokaz razvijene fibroze, ali može upućivati na aktivaciju mehanizama povezanih s profibrotičnim odgovorom (DOOLEY i TEN DIJKE, 2012; ROCHLANI i sur., 2017).

Međusobna povezanost visceralne pretilosti, inzulinske rezistencije, poremećaja metabolizma lipida, kronične upale i povećanog stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta shematski je prikazana na slici 1.



Slika 1. Patofiziologija metaboličkog sindroma (ROCHLANI i sur., 2017).

2.4. Animalni modeli metaboličkog sindroma

Animalni modeli imaju važnu ulogu u proučavanju nastanka i progresije metaboličkog sindroma jer omogućuju praćenje metaboličkih promjena u kontroliranim uvjetima. Ipak, nijedan model ne može u potpunosti oponašati sva obilježja metaboličkog sindroma u ljudi. Pri odabiru i usporedbi modela potrebno je uzeti u obzir genetsku podlogu životinja, sastav i način primjene hrane, spol, dob te trajanje eksperimentalnog tretmana. Kratkotrajni pokusi uglavnom omogućuju praćenje ranih metaboličkih promjena, dok dugotrajni modeli pružaju uvid u njihovu progresiju i prilagodbu organizma tijekom vremena (KENNEDY i sur., 2010; LAI i sur., 2014; VATASHCHUK i sur., 2022). Noviji pregled animalnih modela metaboličkog sindroma također naglašava da se hranidbeni, genetski i kemijski inducirani modeli međusobno razlikuju prema mehanizmu nastanka i izraženosti pojedinih obilježja metaboličkog sindroma.

Prema načinu izazivanja metaboličkih poremećaja, animalni modeli mogu se podijeliti na hranidbene, genetske i farmakološke. Hranidbeni modeli posebno su prikladni za proučavanje metaboličkog sindroma jer metaboličke promjene nastaju postupno, kao posljedica dugotrajnog prehrambenog opterećenja. U tu skupinu ubrajaju se modeli s visokim udjelom masti, *cafeteria* prehrana te modeli s povećanim unosom jednostavnih šećera, osobito fruktoze i saharoze (VATASHCHUK i sur., 2022).

Modeli s visokim udjelom masti često se primjenjuju za izazivanje pretilosti i inzulinske rezistencije. Međutim, njihov se sastav znatno razlikuje među istraživanjima, osobito s obzirom na udio i izvor prehrambenih masti. Prehrana bogata zasićenim masnim kiselinama može izazvati drukčiji masnokiselinski i upalni odgovor od prehrane s većim udjelom nezasićenih masnih kiselina, zbog čega je pri usporedbi rezultata različitih istraživanja potrebno uzeti u obzir sastav primijenjene hrane. LAI i sur. (2014) upozoravaju da sastav standardnih visokomasnih dijeta za glodavce često znatno odstupa od prehrambenih obrazaca ljudi, što ograničava izravno prenošenje rezultata.

Cafeteria prehrana složeniji je hranidbeni model kojim se nastoji oponašati energetski bogata prehrana zapadnog tipa. Obično uključuje različite proizvode bogate mastima, šećerom i soli, zbog čega životinje spontano povećavaju unos energije. Takav način hranidbe može dovesti do izražene pretilosti i upalnih promjena u jetri i masnom tkivu (SAMPEY i sur., 2011). Prednost ovog modela jest razvoj složenijeg metaboličkog fenotipa koji u većoj mjeri podsjeća na metabolički sindrom u ljudi, dok je njegov glavni nedostatak otežano razdvajanje učinka pojedinih prehrambenih sastavnica.

Uz hranidbene modele, u istraživanju metaboličkih poremećaja primjenjuju se i farmakološki i genetski modeli. Streptozotocinski model ima važnu povijesnu ulogu u istraživanju dijabetesa i metabolizma masnih kiselina. Oštećenjem β-stanica gušterače nastaje izražen nedostatak inzulina, što dovodi i do promjena ekspresije enzima uključenih u metabolizam masnih kiselina. U takvim je uvjetima opisano smanjenje ekspresije Δ6-desaturaze, koje se djelomično može normalizirati primjenom inzulina (RIMOLDI i sur., 2001). Zbog drukčijeg mehanizma nastanka ovaj model nije izravan model metaboličkog sindroma, ali daje važne informacije o hormonalnoj regulaciji metabolizma PUFA.

Genetski modeli omogućuju proučavanje specifičnih molekularnih mehanizama povezanih s metaboličkim poremećajima. Životinje s poremećenom leptinskom signalizacijom razvijaju hiperfagiju, izraženu pretilost, hiperinzulinemiju i promjene jetrenog metabolizma, ali se etiološki razlikuju od postupnog razvoja metaboličkog sindroma izazvanog prehrambenim čimbenicima. Zbog toga rezultate takvih modela treba tumačiti u okviru njihove specifične genetske podloge (KENNEDY i sur., 2010; VATASHCHUK i sur., 2022).

Spol životinja također može bitno utjecati na metabolički odgovor. Istraživanja koja uključuju oba spola omogućuju procjenu razlika u sastavu masnih kiselina, lipogenezi i β-oksidaciji te smanjuju mogućnost da se odgovor opažen samo u mužjaka neopravdano generalizira na oba spola (STARČEVIĆ i sur., 2017). Dob životinja predstavlja dodatnu važnu metodološku varijablu jer se tijekom sazrijevanja i starenja mijenjaju sastav tijela, hormonalni status i aktivnost enzima uključenih u metabolizam masnih kiselina. U štakora su opisane dobno ovisne promjene aktivnosti Δ6-desaturaze i jetrenog masnokiselinskog sastava, zbog čega rezultate kratkotrajnih pokusa u mladih životinja nije moguće neposredno izjednačiti s nalazima dobivenima u dugotrajnim modelima (DINH i sur., 1993).

2.4.1. Hranidbeni modeli metaboličkog sindroma

Hranidbeni modeli posebno su važni u istraživanju metaboličkog sindroma jer omogućuju postupno izazivanje metaboličkih poremećaja promjenom sastava ili energetske vrijednosti hrane. Takvi modeli mogu obuhvatiti povećan unos masti, jednostavnih šećera ili njihovih kombinacija, a metabolički odgovor ovisi o vrsti hranjivih tvari, načinu njihove primjene i trajanju izloženosti. Za istraživanje promjena metabolizma glukoze i masnih kiselina

osobito su važni modeli s visokim unosom fruktoze i saharoze, dok se prehrana smanjene energetske vrijednosti i s povećanim udjelom vlakana može koristiti za procjenu mogućnosti ublažavanja razvoja metaboličkih poremećaja (VATASHCHUK i sur., 2022).

2.4.1.1. Prehrana bogata jednostavnim šećerima i saharoza

Prehrana bogata jednostavnim šećerima jedan je od često korištenih hranidbenih pristupa za izazivanje metaboličkih poremećaja u eksperimentalnih životinja. Posebno su značajni saharoza i fruktoza jer povećavaju dostupnost lako iskoristivih ugljikohidratnih supstrata, a njihov dugotrajan prekomjeran unos može pridonijeti povećanju tjelesne mase, hipertrigliceridemiji, inzulinskoj rezistenciji i promjenama jetrenog metabolizma. Povezanost česte konzumacije napitaka zaslađenih šećerom s pretilošću, šećernom bolešću tipa 2 i kardiovaskularnim rizikom potvrđena je i u epidemiološkim istraživanjima (MALIK i sur., 2010).

Saharoza je disaharid sastavljen od glukoze i fruktoze, pa njezin metabolički učinak uključuje djelovanje oba monosaharida. Glukoza snažno potiče lučenje inzulina, dok se znatan dio fruktoze metabolizira u jetri. Pri visokoj dostupnosti ugljikohidrata povećava se dotok ugljikovih supstrata u lipogene putove, a preko inzulina te transkripcijskih čimbenika ChREBP i SREBP-1c mijenja se regulacija gena uključenih u sintezu masnih kiselina (JUMP i sur., 2013).

U štakora je dugotrajna primjena saharoze u vodi za piće povezana s povećanjem tjelesne mase i narušavanjem tolerancije glukoze (KAWASAKI i sur., 2005). U kroničnim modelima opisane su i promjene ekspresije gena uključenih u metabolizam masnih kiselina, promjene udjela pojedinih zasićenih, jednostruko nezasićenih i višestruko nezasićenih masnih kiselina te povećana lipidna peroksidacija (MILJAK i sur., 2015; MAŠEK i STARČEVIĆ, 2017; MAŠEK i sur., 2018).

Jedna od važnih posljedica povećanog unosa jednostavnih šećera jest promjena odnosa između zasićenih i jednostruko nezasićenih masnih kiselina. SCD1, odnosno Δ9-desaturaza, katalizira stvaranje palmitoleinske i oleinske kiseline iz palmitoil- i stearoil-CoA. Povećanje udjela C16:1n-7 i C18:1n-9 može stoga pratiti pojačanu endogenu sintezu i desaturaciju masnih kiselina, iako na njihov konačni udio u tkivu istodobno utječu elongacija, oksidacija i raspodjela među lipidnim frakcijama (NAKAMURA i NARA, 2004; NTAMBI i MIYAZAKI, 2004).

Kronični unos saharoze može utjecati i na metabolizam n-3 i n-6 PUFA. Budući da se dugolančane PUFA stvaraju iz esencijalnih prekursora nizom reakcija desaturacije i elongacije, promjene ekspresije *Fads1* i *Fads2*, dostupnosti supstrata i ukupnog energetskog metabolizma mogu promijeniti njihov konačni udio u tkivu. MILJAK i sur. (2015) opisali su istodobne promjene ekspresije Δ-desaturaza, masnokiselinskog sastava i MDA u jetri štakora nakon dugotrajnog tretmana saharozom, što upućuje na povezanost promjena metabolizma masnih kiselina i oksidacijskog opterećenja.

Promjene linolne kiseline mogu se odraziti i na sastav kardiolipina, karakterističnog fosfolipida unutarnje mitohondrijske membrane. Kardiolipin u fiziološkim uvjetima sadržava visok udio linolne kiseline, a promjene njegova masnokiselinskog sastava mogu utjecati na organizaciju i funkciju mitohondrijske membrane te na oksidativnu fosforilaciju. U eksperimentalnim je modelima pokazano da sastav prehrambenih masnih kiselina mijenja sadržaj i masnokiselinski sastav jetrenog mitohondrijskog kardiolipina, dok poremećaji njegova sastava mogu biti povezani s mitohondrijskom disfunkcijom (AOUN i sur., 2012; ZEGALLAI i HATCH, 2021).

Smanjena dostupnost linolne kiseline može ograničiti i stvaranje arahidonske kiseline jer je LA početni supstrat n-6 metaboličkog puta. Konačni udio ARA pritom ovisi o dostupnosti supstrata te o aktivnosti desaturaza i elongaza. U štakora hranjenih saharozom opisane su promjene aktivnosti Δ9- i Δ5-desaturaze, a smanjena Δ5-desaturacija može dodatno pridonijeti nižem udjelu ARA (EL HAFIDI i sur., 2001).

Visoka dostupnost glukoze i slobodnih masnih kiselina može povećati stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta i potaknuti lipidnu peroksidaciju (INOGUCHI i sur., 2000). PUFA su zbog većeg broja dvostrukih veza osobito osjetljive na oksidacijsko oštećenje, pa promjene njihova udjela u kroničnim modelima visokog unosa šećera treba tumačiti u kontekstu biosinteze, oksidacije i lipidne peroksidacije, a ne pripisivati ih samo jednom od tih procesa.

Metabolički učinak saharoze ovisi i o sastavu ostalog dijela prehrane. MAŠEK i sur. (2016) pokazali su da primjena saharoze u vodi utječe na jetrenu histologiju, lipogenezu i ekspresiju lipogenih gena u štakora hranjenih visokovlaknastom hranom. To pokazuje da odgovor na visok unos šećera nije određen samo količinom saharoze, nego i ukupnom energetskom vrijednošću te sastavom krute hrane.

Važan je i način primjene šećera. Dodavanje saharoze ili fruktoze u vodu za piće omogućuje kontinuiranu dostupnost jednostavnih ugljikohidrata, dok njihovo uključivanje u

krutu hranu istodobno mijenja i energetsku gustoću obroka. KAWASAKI i sur. (2005) pokazali su da dugotrajan unos saharoze u vodi povećava tjelesnu masu i narušava toleranciju glukoze, dok je u drugim istraživanjima kronični unos saharoze bio povezan s promjenama jetrenog masnokiselinskog sastava i ekspresije desaturaza (MILJAK i sur., 2015).

Fruktozni modeli osobito se koriste za proučavanje jetrenog metabolizma zbog izraženog prvog prolaska fruktoze kroz jetru. Visok unos fruktoze može povećati sintezu triacilglicerola, promijeniti osjetljivost na inzulin i utjecati na jetreni masnokiselinski profil. Usporedba *cafeteria* i visokofruktoznog modela pokazala je da ta dva prehrambena izazova mogu dovesti do različitih promjena važnih PUFA i palmitoleinske kiseline, što potvrđuje da se pojam prehrambeno izazvanoga metaboličkog sindroma ne odnosi na jedinstven metabolički fenotip (MAŠEK i sur., 2020).

2.4.1.2. Prehrana smanjene energetske vrijednosti i prehrambena vlakna

Hrana smanjene energetske vrijednosti često sadržava veći udio sastojaka koji smanjuju energetsku gustoću obroka, među kojima važnu ulogu imaju prehrambena vlakna. Vlakna mogu povećati volumen obroka, usporiti apsorpciju pojedinih hranjivih tvari te utjecati na sitost, glikemiju, metabolizam lipida i sastav crijevne mikrobiote. Njihovi fiziološki učinci ovise o vrsti, topljivosti, viskoznosti i fermentabilnosti vlakana (ANDERSON i sur., 2009; MAKKI i sur., 2018; VELUVALI i SNYDER, 2023; DEEHAN i sur., 2024). Noviji pregledi dodatno potvrđuju važnost prehrambenih vlakana u regulaciji tjelesne mase, glikemije, lipidnog metabolizma i metaboličkog zdravlja.

Prehrambena vlakna čine heterogenu skupinu ugljikohidratnih spojeva koji se ne razgrađuju probavnim enzimima u tankom crijevu. Topiva i viskozna vlakna mogu usporiti pražnjenje želuca i apsorpciju glukoze, ublažiti postprandijalne promjene glikemije te utjecati na apsorpciju i enterohepatičku cirkulaciju žučnih kiselina. Veći unos prehrambenih vlakana povezuje se s povoljnijim metabolizmom glukoze i lipida te s manjim dugoročnim povećanjem tjelesne mase (ANDERSON i sur., 2009; MENNI i sur., 2017; LEE i sur., 2023). Meta-analiza randomiziranih kontroliranih istraživanja pokazala je da hrana obogaćena vlaknima može povoljno djelovati na tjelesnu masu, masno tkivo, koncentracije ukupnog i LDL-kolesterola, triacilglicerola te pokazatelje glikemije.

Fermentabilna vlakna služe kao supstrat crijevnoj mikrobioti. Njihovom fermentacijom nastaju kratkolančane masne kiseline, ponajprije acetat, propionat i butirat, koje imaju ulogu

energetskih supstrata i signalnih molekula (DEN BESTEN i sur., 2013; KOH i sur., 2016; DEEHAN i sur., 2024). Butirat je važan izvor energije za kolonocite, propionat se u jetri može uključiti u glukoneogenezu, dok acetat ulazi u perifernu cirkulaciju i sudjeluje u različitim metaboličkim procesima. Noviji pregled dodatno ističe ulogu metabolita crijevne mikrobiote, uključujući kratkolančane masne kiseline, u regulaciji energetske homeostaze i metaboličkog odgovora.

Kratkolančane masne kiseline mogu djelovati preko receptora povezanih s G-proteinima te utjecati na lučenje crijevnih hormona i energetsku homeostazu. U eksperimentalnom modelu primjene oligofruktoze povoljan učinak na toleranciju glukoze i jetrenu osjetljivost na inzulin ovisio je o funkcionalnom receptoru za GLP-1 (CANI i sur., 2006). U ljudi su kolonijske infuzije fizioloških mješavina kratkolančanih masnih kiselina povećale oksidaciju masti i utjecale na potrošnju energije (CANFORA i sur., 2017).

Učinak vlakana na metabolizam lipida ostvaruje se različitim mehanizmima. Viskozna vlakna mogu smanjiti reapsorpciju žučnih kiselina i utjecati na koncentraciju kolesterola, dok fermentabilna vlakna preko mikrobnih metabolita mogu mijenjati jetrenu sintezu i oksidaciju masnih kiselina. U visokomasnom modelu kratkolančane masne kiseline preusmjerile su metabolizam od lipogeneze prema oksidaciji masnih kiselina (DEN BESTEN i sur., 2015), dok je učinak β-glukana na koncentraciju kolesterola ovisio i o tehnološkom obliku hrane u koju je bio ugrađen (KERCKHOFFS i sur., 2003). Novija literatura također potvrđuje da metabolički učinci vlakana ovise o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima i interakciji s crijevnom mikrobiotom (DEEHAN i sur., 2024).

Prehrambena vlakna dugoročno mogu utjecati i na sastav crijevne mikrobiote. Veći unos vlakana povezan je s većom mikrobnom raznolikošću, dok prehrana siromašna vlaknima smanjuje dostupnost fermentabilnih supstrata i može promijeniti metaboličke funkcije mikrobiote. Povezanost većeg unosa vlakana s manjim dugoročnim porastom tjelesne mase i većom raznolikošću mikrobioma pokazana je u ljudi (MENNI i sur., 2017), a noviji pregledi dodatno naglašavaju važnost povezanosti prehrane, crijevne mikrobiote i metabolizma domaćina (KOH i sur., 2016; O'KEEFE, 2019; DEEHAN i sur., 2024).

Pri tumačenju učinka hrane smanjene energetske vrijednosti s povećanim udjelom vlakana važno je naglasiti da se učinci energetske gustoće i vlakana ne mogu uvijek potpuno razdvojiti. Promjena sastava hrane istodobno mijenja količinu raspoložive energije, probavljivost, brzinu apsorpcije hranjivih tvari i količinu fermentabilnog supstrata. Stoga je

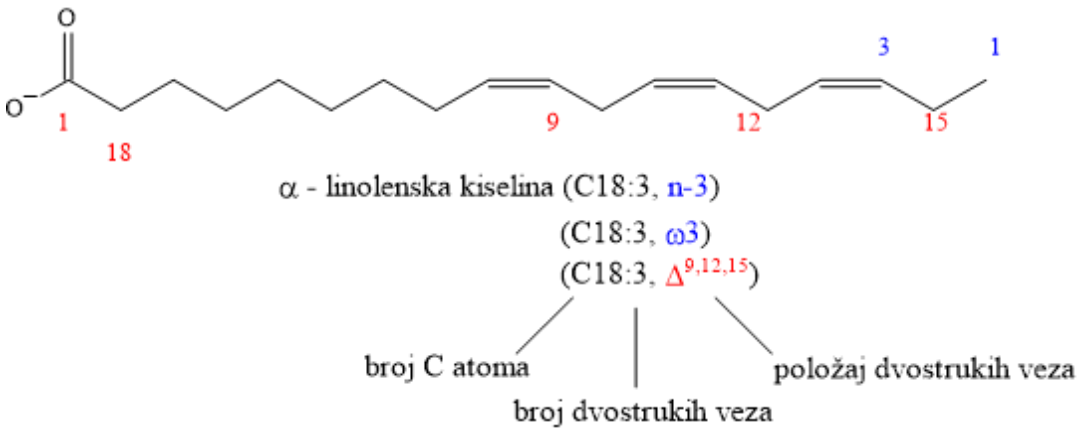
prikladnije govoriti o učinku cjelovitoga hranidbenog režima nego pojedini povoljni metabolički učinak pripisivati isključivo vlaknima.

Interakcija visokog unosa šećera i visokovlaknaste hrane posebno je važna u eksperimentalnim modelima. MAŠEK i sur. (2016) pokazali su da visokovlaknasta prehrana mijenja jetreni odgovor na saharozu, uključujući histološke promjene, lipogenezu i ekspresiju lipogenih gena. Takvi rezultati podupiru zaključak da ukupni metabolički učinak prehrane proizlazi iz međudjelovanja energetskog opterećenja i sastava krute hrane.

2.5. Podjela i svojstva masnih kiselina

Masne kiseline razlikuju se prema duljini ugljikovodičnog lanca, broju dvostrukih veza i njihovu položaju. Nomenklatura masnih kiselina najčešće se temelji na broju ugljikovih atoma, broju dvostrukih veza i položaju prve dvostruke veze u odnosu na metilni kraj molekule. Tako oznaka C18:3n-3 označava masnu kiselinu s 18 ugljikovih atoma i tri dvostruke veze, pri čemu se prva dvostruka veza nalazi na trećem ugljikovu atomu računajući od metilnog kraja. Takav način označavanja osobito je važan za razlikovanje n-3, n-6, n-7 i n-9 porodica masnih kiselina (TVRZICKA i sur., 2011).

Na slici 2 prikazan je primjer označavanja α-linolenske kiseline prema broju ugljikovih atoma, broju dvostrukih veza i položaju prve dvostruke veze u odnosu na metilni kraj.



Slika 2. Prikaz α-linolenske kiseline i načina označavanja položaja dvostrukih veza

Geometrijska konfiguracija dvostrukih veza utječe na prostornu strukturu masnih kiselina. *Cis*-dvostruke veze uzrokuju pregib ugljikovodičnog lanca i smanjuju mogućnost čvrstog slaganja molekula, dok *trans*-konfiguracija omogućuje pravilnije slaganje lanca. Stupanj nezasićenosti stoga utječe na fizikalna svojstva lipida i organizaciju staničnih membrana (HULBERT, 2003; TVRZICKA i sur., 2011).

U organizmu se samo manji dio masnih kiselina nalazi u slobodnom obliku, dok je većina esterificirana u triacilglicerole, fosfolipide, estere kolesterola i druge složene lipide. Triacilgliceroli predstavljaju glavni oblik pohrane masnih kiselina, dok su fosfolipidi važne strukturne sastavnice staničnih membrana. Masne kiseline ujedno služe kao energetski supstrati te sudjeluju u stvaranju brojnih signalnih molekula i lipidnih medijatora (HULBERT, 2003; ALVES-BEZERRA i COHEN, 2018).

Prema broju dvostrukih veza masne kiseline dijele se na zasićene, jednostruko nezasićene i višestruko nezasićene. Zasićene masne kiseline (engl. *saturated fatty acids*, SFA) nemaju dvostrukih veza, jednostruko nezasićene masne kiseline (engl. *monounsaturated fatty acids*, MUFA) sadržavaju jednu, a višestruko nezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) dvije ili više dvostrukih veza. Osim stupnja nezasićenosti, važna je i duljina ugljikovodičnog lanca jer utječe na probavu, apsorpciju, transport i metaboličku sudbinu pojedinih masnih kiselina (TVRZICKA i sur., 2011).

Stupanj nezasićenosti određuje i osjetljivost masnih kiselina na oksidacijsko oštećenje. Višestruko nezasićene masne kiseline zbog većeg broja dvostrukih veza osjetljivije su na lipidnu peroksidaciju od zasićenih i jednostruko nezasićenih masnih kiselina. Među njima je osobito osjetljiva dokozaheksaenska kiselina (DHA), koja sadržava šest dvostrukih veza (HULBERT, 2003; AYALA i sur., 2014).

Zasićene masne kiseline važni su energetski supstrati i prekursori u sintezi složenijih lipida. Palmitinska kiselina (C16:0) jedan je od glavnih produkata de novo sinteze masnih kiselina te važan prekursor za daljnju elongaciju i desaturaciju. Stearinska kiselina (C18:0) također sudjeluje u tim metaboličkim putovima i može se desaturirati u oleinsku kiselinu. Detaljni putovi sinteze i pretvorbe zasićenih masnih kiselina bit će opisani u sljedećem poglavlju (MIYAZAKI i NTAMBI, 2003; CARTA i sur., 2017; PAIVA i sur., 2021).

Među najzastupljenijim jednostruko nezasićenim masnim kiselinama u različitim tkivima nalaze se palmitoleinska (C16:1n-7) i oleinska kiselina (C18:1n-9). One potječu iz prehrane, ali se mogu stvarati i endogeno desaturacijom zasićenih masnih kiselina. Njihov udio

u tkivu ovisi i o prehrambenom unosu i o endogenom metabolizmu, pa ih je pri tumačenju masnokiselinskog profila potrebno promatrati u okviru ukupnih metaboličkih promjena (NTAMBI i MIYAZAKI, 2004; SCHWINGSHACKL i HOFFMANN, 2014).

Višestruko nezasićene masne kiseline imaju osobito važnu ulogu u građi staničnih membrana i stvaranju lipidnih medijatora. Esencijalni prekursori n-6 i n-3 porodice su linolna kiselina (C18:2n-6, LA) i α-linolenska kiselina (C18:3n-3, ALA), koje sisavci ne mogu sintetizirati u dovoljnoj mjeri te ih moraju unositi hranom. Iz njih daljnjim metaboličkim pretvorbama nastaju dugolančane višestruko nezasićene masne kiseline, među kojima su arahidonska kiselina (ARA), eikozapentaenska kiselina (EPA), dokozapentaenska kiselina (DPA) i DHA (NAKAMURA i NARA, 2004; DYALL i sur., 2022).

Linolna kiselina osnovni je prekursor n-6 porodice, dok je arahidonska kiselina važna sastavnica membranskih fosfolipida i prekursor brojnih lipidnih medijatora koji sudjeluju u regulaciji vaskularnog i upalnog odgovora (NAKAMURA i NARA, 2004; CALDER, 2013). U n-3 porodici ALA je početni prehrambeni prekursor za nastanak EPA, DPA i DHA. EPA i DHA, osim što su važne sastavnice staničnih membrana, sudjeluju i u stvaranju lipidnih medijatora uključenih u regulaciju upalnog odgovora (CALDER, 2013).

Dokozapentaenska kiselina n-3 (C22:5n-3) pripada skupini dugolančanih n-3 PUFA i važan je međuprodukt njihova metabolizma. Pri tumačenju masnokiselinskog sastava važno ju je razlikovati od C22:5n-6 jer te dvije masne kiseline pripadaju različitim metaboličkim porodicama i nemaju jednako biološko značenje (KAUR i sur., 2011).

Omjer n-6/n-3 često se koristi za prikaz međusobne zastupljenosti dviju skupina PUFA, ali sam po sebi ne daje podatke o udjelu pojedinih masnih kiselina ni o njihovoj biološkoj ulozi. Zbog toga je pri tumačenju masnokiselinskog profila korisnije istodobno promatrati pojedine prekursore i dugolančane produkte, osobito LA, ALA, ARA, EPA, DPA i DHA (CALDER i DECKELBAUM, 2011).

2.6. Sinteza i biokonverzija masnih kiselina

De novo sinteza masnih kiselina odvija se pretežito u citosolu, a započinje stvaranjem acetil-CoA i njegovom karboksilacijom u malonil-CoA djelovanjem acetil-CoA-karboksilaze. Sintaza masnih kiselina potom katalizira slijed reakcija kojima nastaje palmitinska kiselina,

glavni produkt ovoga biosintetskog puta. Intenzitet *de novo* lipogeneze ovisi o dostupnosti ugljikohidratnih supstrata, energetskom stanju stanice i hormonskoj regulaciji, zbog čega se mijenja u skladu s nutritivnim i metaboličkim uvjetima (ALVES-BEZERRA i COHEN, 2018; PAIVA i sur., 2021).

Palmitinska kiselina, kao glavni produkt *de novo* sinteze, važan je prekursor za nastanak drugih zasićenih i jednostruko nezasićenih masnih kiselina. Stearoil-CoA-desaturaza 1 (SCD1), odnosno Δ9-desaturaza, katalizira uvođenje cis-dvostruke veze u palmitoil-CoA i stearoil-CoA, pri čemu nastaju palmitoleoil-CoA i oleoil-CoA. Aktivnost SCD1 stoga ima važnu ulogu u određivanju odnosa zasićenih i jednostruko nezasićenih masnih kiselina te u osiguravanju supstrata za sintezu triacilglicerola, fosfolipida i estera kolesterola (MIYAZAKI i NTAMBI, 2003; NAKAMURA i NARA, 2004).

Produljivanje ugljikovodičnog lanca masnih kiselina kataliziraju elongaze iz obitelji ELOVL, koje dodaju po dvije ugljikove jedinice na postojeći acilni lanac. Pojedini članovi ove obitelji razlikuju se prema afinitetu za određene supstrate i time pridonose oblikovanju masnokiselinskog sastava. ELOVL6 osobito sudjeluje u elongaciji C16 u C18 masne kiseline, dok ELOVL5 i ELOVL2 imaju važnu ulogu u nastanku dugolančanih i vrlo dugolančanih višestruko nezasićenih masnih kiselina (WANG i sur., 2006; JUMP, 2009).

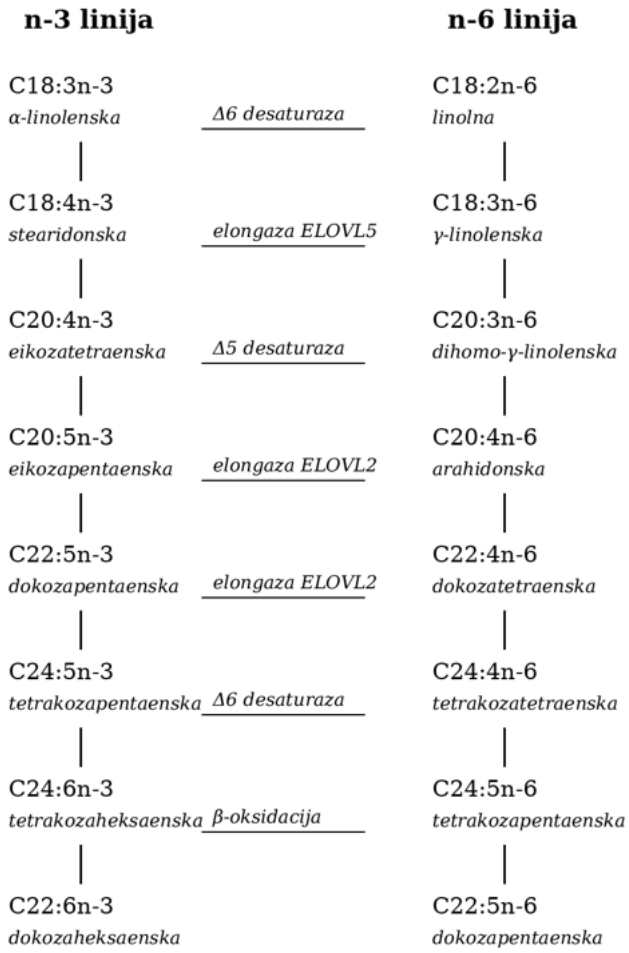
Biosinteza dugolančanih višestruko nezasićenih masnih kiselina razlikuje se od de novo sinteze zasićenih masnih kiselina. Budući da sisavci ne posjeduju Δ12- i Δ15-desaturazu, linolna i α-linolenska kiselina moraju se unositi hranom. Njihova se daljnja pretvorba odvija nizom reakcija desaturacije i elongacije u kojima sudjeluju FADS1, FADS2 te elongaze iz obitelji ELOVL (CHO i sur., 1999a, 1999b; NAKAMURA i NARA, 2004; JUMP, 2009; STROUD i sur., 2009; TOSI i sur., 2014).

U n-6 metaboličkom putu linolna kiselina (LA; C18:2n-6) djelovanjem Δ6-desaturaze, koju kodira gen *Fads2*, prelazi u γ-linolensku kiselinu. Nakon elongacije nastaje dihomo-γ-linolenska kiselina (DGLA), koja se djelovanjem Δ5-desaturaze, kodirane genom *Fads1,* pretvara u arahidonsku kiselinu (ARA). Daljnjim reakcijama elongacije i desaturacije nastaju ostali dugolančani n-6 produkti. Budući da n-3 i n-6 metaboličke linije dijele dio istih desaturaza i elongaza, dostupnost supstrata jedne skupine može utjecati na protok reakcija u drugoj (NAKAMURA i NARA, 2004).

U n-3 metaboličkom putu α-linolenska kiselina (ALA; C18:3n-3) najprije se desaturira djelovanjem Δ6-desaturaze, nakon čega slijede elongacija i daljnja desaturacija do

eikozapentaenske kiseline (EPA). EPA se zatim elongira u dokozapentaensku kiselinu (DPA), dok biosinteza dokozaheksaenske kiseline (DHA) uključuje dodatne reakcije elongacije i desaturacije te završni korak peroksisomalne β-oksidacije (NAKAMURA i NARA, 2004; BURDGE i CALDER, 2005).

Glavni koraci biokonverzije n-3 i n-6 višestruko nezasićenih masnih kiselina te zajedničko sudjelovanje desaturaza i elongaza prikazani su na slici 3.



Slika 3. Biokonverzija n-3 i n-6 višestruko nezasićenih masnih kiselina

U biokonverziji dugolančanih PUFA osobito su važni *Fads 1*, *Fads2,* ELOVL5 i ELOVL2. *Fads1* kodira Δ5-desaturazu, a *Fads2* Δ6-desaturazu, dok elongaze produljuju odgovarajuće masnokiselinske supstrate. ELOVL5 sudjeluje ponajprije u elongaciji C18 i C20 PUFA, dok je ELOVL2 važan za stvaranje vrlo dugolančanih prekursora potrebnih za biosintezu DHA (WANG i sur., 2006; JUMP, 2009).

Aktivnost desaturacijskih putova često se procjenjuje omjerima proizvoda i odgovarajućih supstrata. Tako se omjer C18:1n-9/C18:0 koristi kao neizravni pokazatelj Δ9-desaturacije, dok se omjer ARA/DGLA primjenjuje za procjenu Δ5-desaturacijskog puta. Takvi omjeri ne predstavljaju izravno izmjerenu enzimsku aktivnost jer na njih, osim desaturacije, utječu prehrambeni unos, elongacija, oksidacija i raspodjela masnih kiselina među lipidnim frakcijama (NAKAMURA i NARA, 2004).

Ni promjene ekspresije gena uključenih u desaturaciju i elongaciju ne moraju biti praćene razmjernim promjenama aktivnosti odgovarajućih enzima ili udjela njihovih produkata. Konačni masnokiselinski sastav rezultat je međudjelovanja genske ekspresije, translacije, stabilnosti proteina, dostupnosti supstrata i metaboličkog protoka kroz povezane putove. Zbog toga je ekspresiju gena *Fads1*, *Fads2* i *Scd1* potrebno tumačiti zajedno s promjenama masnokiselinskog sastava. Genetske varijante u klasteru FADS1/FADS2 također su povezane s masnokiselinskim sastavom fosfolipida (SCHAEFFER i sur., 2006).

2.7. Regulacija metabolizma i biokonverzije masnih kiselina

Metabolizam masnih kiselina podložan je složenoj nutritivnoj i hormonskoj regulaciji kojom se usklađuju njihova sinteza, desaturacija, elongacija i oksidacija s energetskim potrebama organizma. Posebno važnu ulogu u toj regulaciji imaju inzulin, glukoza i transkripcijski čimbenici osjetljivi na nutritivne i lipidne signale. Promjene njihove aktivnosti mogu utjecati na ekspresiju gena uključenih u metabolizam masnih kiselina te posljedično mijenjati njihov sastav u tkivima.

Inzulin je jedan od važnih regulatora enzima uključenih u desaturaciju masnih kiselina. U uvjetima izraženog nedostatka inzulina, kao u streptozotocinskom dijabetesu, smanjuje se ekspresija Δ6-desaturaze, dok primjena inzulina može djelomično obnoviti njezinu ekspresiju (RIMOLDI i sur., 2001). U stanjima inzulinske rezistencije regulacija desaturaza i elongaza dodatno je određena promijenjenim nutritivnim i hormonskim okruženjem, pa njihov odgovor ne mora biti jednak kao u uvjetima apsolutnog nedostatka inzulina (BRENNER, 2003; WANG i sur., 2006).

Dostupnost ugljikohidrata i inzulinski signal povezani su s regulacijom lipidnog metabolizma preko transkripcijskih čimbenika ChREBP i SREBP-1c. ChREBP odgovara na povećanu dostupnost ugljikohidrata i potiče ekspresiju gena uključenih u glikolizu i lipogenezu,

dok je SREBP-1c snažno povezan s djelovanjem inzulina i regulacijom lipogenih gena. Njihovo zajedničko djelovanje omogućuje prilagodbu sinteze i sastava masnih kiselina nutritivnom stanju organizma (JUMP i sur., 2013).

Suprotno lipogenim signalima, PPARα sudjeluje u regulaciji gena uključenih u transport i β-oksidaciju masnih kiselina. Dugolančane višestruko nezasićene masne kiseline mogu djelovati kao ligandi nuklearnih receptora i modulirati aktivnost PPARα, SREBP-1c i drugih transkripcijskih čimbenika osjetljivih na lipide. Time masne kiseline nisu samo supstrati u energetskom metabolizmu, nego i regulatori ekspresije gena koji određuju njihovu daljnju metaboličku sudbinu (JUMP i sur., 2013).

Na biokonverziju n-3 i n-6 PUFA znatno utječe i dostupnost njihovih esencijalnih prekursora. Budući da obje metaboličke porodice koriste dio istih desaturaza i elongaza, između njih postoji kompeticija za zajedničke enzimske korake. Povećana dostupnost prekursora jedne skupine može zbog toga promijeniti stvaranje produkata druge, dok se unosom preformiranih EPA i DHA djelomično zaobilaze početni koraci pretvorbe ALA (NAKAMURA i NARA, 2004; BURDGE i CALDER, 2005).

Regulacija desaturaza i elongaza dodatno se mijenja u metaboličkim bolestima. WANG i sur. (2006) pokazali su da se ekspresija jetrenih desaturaza i elongaza mijenja u dijabetesu i pretilosti, pri čemu smjer i intenzitet promjene ovise o hormonalnom i nutritivnom okruženju. Stoga se odgovor pojedinog enzima ne može promatrati neovisno o širem metaboličkom stanju organizma.

Masnokiselinski sastav može i povratno djelovati na regulaciju genske ekspresije. Dugolančane PUFA mogu smanjivati aktivnost SREBP-1c te modulirati druge transkripcijske čimbenike povezane s metabolizmom lipida (JUMP i sur., 2013). Na taj se način uspostavlja regulatorna povezanost između prehrambenog unosa, sastava masnih kiselina i ekspresije gena uključenih u njihovu sintezu i razgradnju.

Zbog takve višeslojne regulacije promjenu udjela pojedine masne kiseline nije opravdano pripisati aktivnosti samo jednog enzima. Primjerice, udio arahidonske kiseline može se mijenjati zbog razlika u dostupnosti linolne kiseline, aktivnosti Δ6- i Δ5-desaturaze, elongacije, oksidacije, ugradnje u fosfolipide ili njezina oslobađanja za sintezu lipidnih medijatora. Zbog toga je pri tumačenju masnokiselinskog profila potrebno istodobno razmotriti dostupnost prekursora, udio produkata i ekspresiju gena uključenih u pojedine metaboličke putove.

2.8. Utjecaj spola na metabolizam i sastav masnih kiselina

Spolne razlike u metabolizmu lipida očituju se na razini cijelog organizma, ali i u pojedinim tkivima. U ljudi se razlikuju raspodjela masnog tkiva, mobilizacija masnih kiselina iz adipocita, njihova oksidacija i metabolički odgovor na unos hrane. Žene prije menopauze češće imaju veći udio potkožnog masnog tkiva, dok je u muškaraca izraženija sklonost nakupljanju visceralne masti. Takve razlike utječu na protok slobodnih masnih kiselina prema jetri i povezane su s različitim kardiometaboličkim rizikom (JENSEN, 1995; COSTA i sur., 2025).

Spolne razlike osobito su izražene u metabolizmu esencijalnih masnih kiselina. Žene u pravilu pokazuju učinkovitiju pretvorbu α-linolenske kiseline u dugolančane n-3 PUFA, što se povezuje s većom sposobnošću endogene biosinteze EPA i DHA (DECSI i KENNEDY, 2011). CHILDS i sur. (2008) utvrdili su veći udio DHA u pojedinim lipidnim frakcijama plazme i tkiva žena. Budući da se takve razlike ne mogu u cijelosti objasniti prehrambenim unosom, važnu ulogu u njihovoj regulaciji imaju spolni hormoni.

Estrogen utječe na ekspresiju gena uključenih u desaturaciju i elongaciju masnih kiselina. U ovarijektomiranih štakora primjena 17β-estradiola povećala je jetrenu ekspresiju Δ6-desaturaze te koncentraciju DHA u jetri i plazmatskim fosfolipidima (KITSON i sur., 2013). Ti nalazi podupiru povezanost estrogena s učinkovitijom endogenom biosintezom dugolančanih n-3 PUFA i pružaju jedno od mogućih mehanističkih objašnjenja razlika između spolova.

Hormonalna regulacija metabolizma masnih kiselina ne ovisi samo o estrogenu. Tijekom trudnoće u ženki štakora zabilježeno je povećanje ekspresije Δ6-desaturaze povezano s koncentracijom progesterona, što može pridonijeti većoj raspoloživosti DHA u razdoblju povećanih potreba za dugolančanim PUFA (LEE i sur., 2016). Takve promjene pokazuju da se metabolizam masnih kiselina mijenja i unutar istoga spola, ovisno o fiziološkom i hormonalnom stanju.

Androgeni također sudjeluju u regulaciji lipidnog metabolizma. U eksperimentalnom modelu gonadektomije promjene hormonalnog statusa bile su povezane s promjenama jetrenog masnokiselinskog sastava, lipogeneze i β-oksidacije, što potvrđuje da spolne razlike u metabolizmu masnih kiselina proizlaze iz složenog djelovanja više hormonalnih čimbenika, a ne samo estrogena (STARČEVIĆ i sur., 2017).

Spol može utjecati i na odnos zasićenih i jednostruko nezasićenih masnih kiselina. MARKS i sur. (2013) povezali su razlike u jetrenom i plazmatskom sastavu SFA i MUFA s razlikama u ekspresiji elongaze ELOVL6, dok promjene ekspresije SCD1 nisu u svim uvjetima bile jednako izražene. Takvi nalazi potvrđuju da se spolno uvjetovane promjene masnokiselinskog profila ne mogu pripisati djelovanju samo jednog enzima, već ih treba promatrati kao rezultat međudjelovanja desaturacije, elongacije i drugih metaboličkih procesa.

Izraženost spolnih razlika ovisi i o promatranom tkivu. CHILDS i sur. (2010) pokazali su da na sastav PUFA u jetri i plazmi istodobno utječu spol i sastav prehrambenih masti. U tkivima u kojima je masnokiselinski sastav strože reguliran, poput mozga, razlike između spolova mogu biti manje izražene nego u jetri ili plazmi. Pri tumačenju spolnih razlika stoga je potrebno uzeti u obzir tkivnu specifičnost metabolizma masnih kiselina.

Brojna istraživanja upućuju na zaštitnu ulogu ženskog spola u razvoju metaboličkih poremećaja, osobito prije izraženijih promjena povezanih sa starenjem i promjenom hormonalnog statusa. Veća sposobnost pretvorbe ALA u dugolančane n-3 PUFA, povoljnija raspodjela masnog tkiva te hormonska regulacija desaturacijskih i elongacijskih putova mogu pridonijeti razlikama u metaboličkom odgovoru između spolova (BURDGE i CALDER, 2005; CHILDS, 2020). Ženski spol stoga predstavlja važan biološki čimbenik koji može djelovati zaštitno tijekom razvoja metaboličkih poremećaja, pri čemu izraženost tog učinka ovisi o dobi, hormonalnom statusu, prehrambenim uvjetima i promatranom tkivu.

2.9. Utjecaj dobi na metabolizam i sastav masnih kiselina

Dob je važan biološki čimbenik koji utječe na metabolizam masnih kiselina na više razina. Tijekom sazrijevanja i starenja mijenjaju se tjelesni sastav, hormonalni status, energetski metabolizam, aktivnost desaturaza i elongaza te oksidacijsko opterećenje. Zbog toga masnokiselinski sastav tkiva nije stalan tijekom života, nego odražava međudjelovanje biosinteze, raspodjele, oksidacije i dostupnosti pojedinih masnih kiselina (DINH i sur., 1993; CHEN i sur., 2020).

Dobno uvjetovane promjene osobito su dobro opisane u metabolizmu višestruko nezasićenih masnih kiselina. DINH i sur. (1993) pokazali su da se aktivnost Δ5- i Δ6-desaturacijskih putova u štakora mijenja tijekom života, pri čemu se pojedini pokazatelji povećavaju tijekom rasta, a zatim se u kasnijoj dobi smanjuju ili ponovno prilagođavaju. Takav obrazac potvrđuje da se

biokonverzija PUFA mijenja ovisno o životnom razdoblju i da rezultate dobivene u mladih životinja nije opravdano neposredno prenijeti na starije jedinke.

Starenje je povezano i s promjenama regulacije gena uključenih u elongaciju dugolančanih masnih kiselina. Posebno se ističe ELOVL2, čija metilacija regulatornih područja snažno korelira s kronološkom dobi. Budući da ELOVL2 sudjeluje u stvaranju vrlo dugolančanih prekursora potrebnih za biosintezu DHA, promjene njegove ekspresije i aktivnosti mogu pridonijeti dobno uvjetovanim promjenama sastava dugolančanih PUFA. U eksperimentalnim modelima poremećena funkcija ELOVL2 povezana je sa smanjenom dostupnošću DHA i ubrzanim promjenama mrežnice povezanima sa starenjem (PAUTER i sur., 2014; CHEN i sur., 2020).

Dob može mijenjati i odgovor organizma na metaboličko opterećenje. U dugotrajnim modelima metaboličke bolesti promjene u sastavu PUFA i aktivnosti desaturacijskih putova mogu biti izraženije u starijih životinja, što upućuje na smanjenu sposobnost održavanja metaboličke homeostaze tijekom starenja. U starih štakora s dugotrajnim streptozotocinskim dijabetesom opisane su promjene metabolizma arahidonske i dokozaheksaenske kiseline te pokazatelja Δ5-desaturacije (MAŠEK i sur., 2014). Takvi nalazi upućuju na to da kronično metaboličko opterećenje i starenje mogu djelovati istodobno te dodatno mijenjati metabolizam dugolančanih masnih kiselina.

Promjene spolnih hormona tijekom starenja dodatno pridonose razlikama u masnokiselinskom sastavu. Budući da estrogeni i androgeni sudjeluju u regulaciji desaturacije i elongacije masnih kiselina, dobno uvjetovane promjene hormonalnog statusa mogu mijenjati i učinkovitost biokonverzije esencijalnih prekursora u dugolančane PUFA. Zbog toga se učinak dobi ne može uvijek u potpunosti odvojiti od učinka spola, osobito u dugotrajnim istraživanjima koja obuhvaćaju više životnih razdoblja (BURDGE i CALDER, 2005; CHILDS, 2020).

Na izraženost dobnih promjena dodatno utječe sastav prehrane. Dostupnost linolne i α-linolenske kiseline, količina preformiranih dugolančanih PUFA te ukupno energetsko opterećenje određuju količinu supstrata dostupnih desaturazama i elongazama. U štakora je pokazano da se učinak manjka n-3 masnih kiselina na Δ6-desaturacijski put mijenja s dobi, što potvrđuje da se nutritivni i dobni čimbenici međusobno nadopunjuju u oblikovanju masnokiselinskog profila (DINH i sur., 1993).

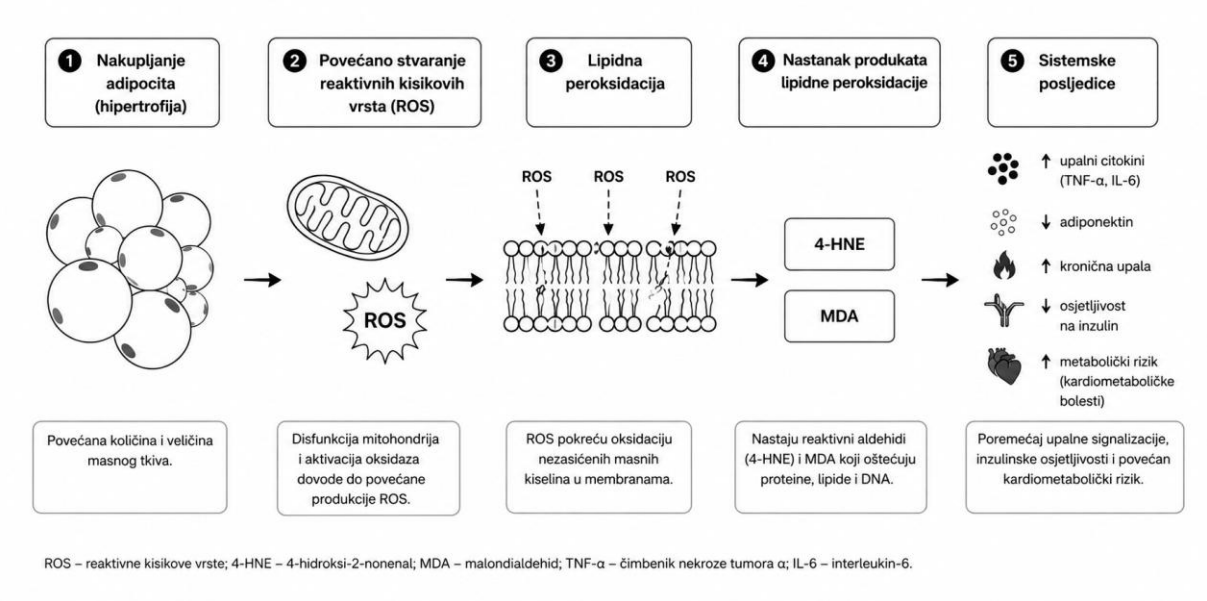
U dugotrajnim eksperimentalnim modelima dob stoga nije samo vremenska odrednica, nego čimbenik koji može mijenjati način na koji organizam odgovara na prehrambeno i

metaboličko opterećenje. Pri tumačenju promjena masnokiselinskog sastava i ekspresije gena uključenih u njihovu biokonverziju potrebno je zato istodobno uzeti u obzir trajanje izloženosti, dob životinja i njihov hormonalni status.

2.10. Oksidacijski stres i lipidna peroksidacija

Reaktivne kisikove vrste nastaju kao sastavni dio normalnog staničnog metabolizma i u fiziološkim uvjetima sudjeluju u brojnim signalnim procesima. Njihova se koncentracija održava ravnotežom između nastanka i djelovanja antioksidacijskih obrambenih sustava. Oksidacijski stres razvija se kada stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta premaši sposobnost stanice da ih učinkovito ukloni ili neutralizira. Među važnim staničnim izvorima reaktivnih kisikovih vrsta nalaze se mitohondriji, NADPH-oksidaze i peroksisomi (AYALA i sur., 2014; TONELLI i sur., 2018).

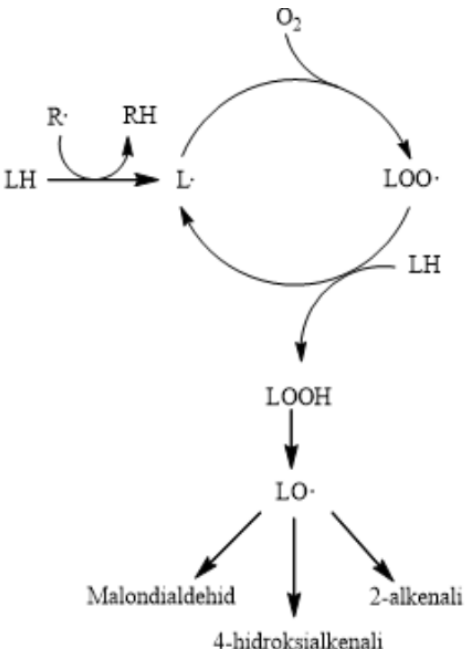
U metaboličkom sindromu povećano oksidacijsko opterećenje povezano je s poremećajem metabolizma glukoze i lipida. Hiperglikemija i povećana dostupnost slobodnih masnih kiselina mogu promijeniti staničnu redoks-ravnotežu, povećati stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta i dodatno opteretiti antioksidacijske sustave. Aktivacija NAD(P)H-oksidaze jedan je od mehanizama kojima visoke koncentracije glukoze i masnih kiselina mogu pridonijeti povećanom stvaranju ROS-a (INOGUCHI i sur., 2000). Međusobna povezanost nakupljanja masnog tkiva, povećanog stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta, poremećene antioksidacijske zaštite, lipidne peroksidacije i razvoja inzulinske rezistencije prikazana je na slici 4.



Slika 4. Povezanost nakupljanja masnog tkiva s oksidacijskim stresom, lipidnom peroksidacijom i razvojem inzulinske rezistencije (prilagođeno prema PILLON i SOULAGE, 2012).

Posebno važna posljedica oksidacijskog stresa jest lipidna peroksidacija. Taj proces započinje oduzimanjem vodikova atoma iz višestruko nezasićene masne kiseline i nastankom lipidnog radikala. Reakcijom s molekularnim kisikom nastaje lipidni peroksilni radikal, koji može reagirati sa susjednim masnim kiselinama i tako održavati lančanu reakciju. Osjetljivost masnih kiselina na peroksidaciju raste s brojem dvostrukih veza, zbog čega su višestruko nezasićene masne kiseline osobito podložne oksidacijskom oštećenju (AYALA i sur., 2014).

Lančani tijek lipidne peroksidacije i nastanak njezinih sekundarnih produkata, među kojima je i malondialdehid, prikazani su na slici 5.



Slika 5. Shematski prikaz lipidne peroksidacije

Primarni lipidni hidroperoksidi relativno su nestabilni i razgrađuju se u niz sekundarnih produkata, među kojima je malondialdehid (MDA) jedan od najčešće određivanih pokazatelja lipidne peroksidacije. MDA može reagirati s proteinima i nukleinskim kiselinama te time dodatno pridonijeti staničnom oštećenju. Njegova se koncentracija često određuje metodama temeljenima na reakciji s tiobarbiturnom kiselinom, pri čemu je pri interpretaciji rezultata potrebno uzeti u obzir ograničenu specifičnost TBARS metode (AYALA i sur., 2014).

Promjene koncentracije MDA potrebno je tumačiti zajedno s masnokiselinskim sastavom tkiva. Tkiva s većim udjelom PUFA sadržavaju više supstrata osjetljivih na peroksidaciju, ali istodobno smanjenje udjela pojedinih PUFA i povećanje MDA ne dokazuju da je oksidacija jedini uzrok promjene masnokiselinskog profila. Na udio pojedinih masnih kiselina istodobno utječu njihova biosinteza, elongacija, desaturacija, oksidacija i raspodjela među različitim lipidnim frakcijama (AYALA i sur., 2014).

Važnu ulogu u staničnoj obrani od oksidacijskog opterećenja ima transkripcijski čimbenik NRF2, kodiran genom *Nfe2l2*. Aktivacijom NRF2 potiče se ekspresija niza citoprotektivnih i antioksidacijskih gena koji sudjeluju u održavanju stanične redoks-ravnoteže. Međutim, ekspresija *Nfe2l2* mRNA ne odražava nužno količinu ili transkripcijsku aktivnost NRF2 proteina, zbog čega se ta dva pokazatelja pri tumačenju rezultata ne mogu izjednačiti (TONELLI i sur., 2018).

Oksidacijski i upalni odgovor međusobno su usko povezani. Reaktivne kisikove vrste i produkti lipidne peroksidacije mogu aktivirati proupalne signalne putove, dok aktivirane imunološke stanice istodobno mogu povećati stvaranje reaktivnih spojeva. Takva dvosmjerna povezanost pridonosi održavanju kronične upale niskog stupnja koja prati metabolički sindrom (AYALA i sur., 2014; ROCHLANI i sur., 2017).

TNF-α pritom može dodatno narušiti inzulinsku osjetljivost i regulaciju lipolize, dok TGF-β sudjeluje u remodeliranju izvanstaničnog matriksa i profibrotičnoj signalizaciji. Povećana ekspresija *Tgf-β* može stoga upućivati na aktivaciju profibrotičnih mehanizama, ali sama po sebi ne predstavlja dokaz prisutnosti fibroze (DOOLEY i TEN DIJKE, 2012; ROBERTS i sur., 2013).

U dugotrajnim metaboličkim poremećajima oksidacijsko opterećenje može se postupno pojačavati, dok sposobnost antioksidacijskih sustava za prilagodbu može s vremenom postati nedostatna. Zbog toga je u kroničnim eksperimentalnim modelima važno razlikovati rani adaptivni odgovor od promjena koje se razvijaju nakon dugotrajne izloženosti metaboličkom opterećenju. Takav pristup posebno je važan u istraživanjima koja uključuju više vremenskih točaka i omogućuju praćenje progresije oksidacijskih promjena.

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Dugotrajan unos hrane i napitaka s visokim udjelom jednostavnih šećera povezan je s razvojem metaboličkog sindroma, inzulinske rezistencije, poremećaja metabolizma lipida, oksidacijskog stresa i kronične upale niskog stupnja. Pritom dolazi i do promjena masnokiselinskog sastava jetre te ekspresije gena uključenih u desaturaciju masnih kiselina. Na intenzitet i tijek tih promjena mogu utjecati spol i sastav prehrane.

U ovom istraživanju ispitan je učinak dugotrajnog unosa 30 % saharoze u vodi za piće na metaboličke pokazatelje, masnokiselinski sastav jetre, lipidnu peroksidaciju te ekspresiju gena uključenih u metabolizam masnih kiselina i upalni odgovor u mužjaka i ženki štakora. Istodobno je ispitan učinak hrane smanjene energetske vrijednosti s povećanim udjelom vlakana na razvoj i progresiju metaboličkih poremećaja tijekom 1, 12 i 24 mjeseca.

Iako su učinci visokog unosa jednostavnih šećera na razvoj metaboličkog sindroma dobro opisani, manje je poznato kako se tijekom dugotrajne izloženosti istodobno mijenjaju metabolizam i desaturacija masnih kiselina, oksidacijski stres i upalni odgovor te u kojoj mjeri na tijek tih promjena utječu spol i energetska vrijednost prehrane s povećanim udjelom vlakana. Posebno nedostaju podaci iz dugotrajnih pokusnih modela koji omogućuju usporedbu ranih, srednjih i kasnih faza razvoja metaboličkih poremećaja u oba spola. Stoga je ovo istraživanje osmišljeno kako bi se navedeni procesi pratili tijekom 1, 12 i 24 mjeseca te kako bi se utvrdilo mogu li ženski spol i prehrana smanjene energetske vrijednosti s povećanim udjelom vlakana ublažiti razvoj i progresiju kroničnog metaboličkog sindroma.

Ciljevi istraživanja

1. Utvrditi koje promjene u lipogenezi i kroničnoj upali izaziva saharozom inducirani metabolički sindrom te kako se promjene mijenjaju kroz vrijeme.
2. Istražiti ima li ženski spol zaštitnu ulogu u nastanku i progresiji metaboličkog sindroma.
3. Istražiti ima li unos hrane smanjene energetske vrijednosti pozitivan učinak na razvoj i progresiju metaboličkog sindroma.

Hipoteza

Unos hrane smanjene energetske vrijednosti i spol imaju zaštitni učinak na patološke molekularne mehanizme u metaboličkom sindromu što ima znatne implikacije za uspješnost prevencije i liječenje kroničnog metaboličkog sindroma.

4. MATERIJALI I METODE

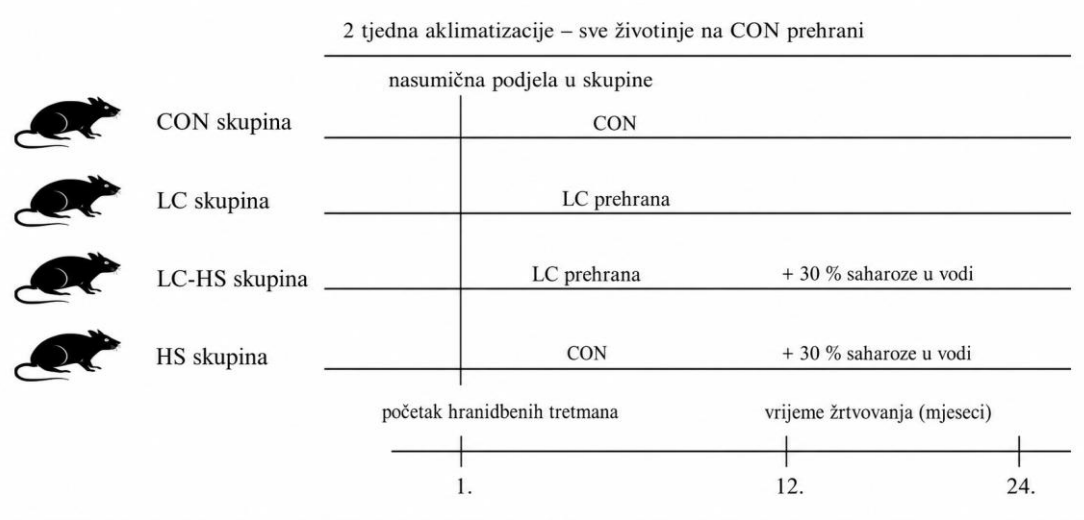
4.1. Pokusne životinje

Istraživanje je provedeno na ukupno 120 Wistar Han štakora, 60 mužjaka i 60 ženki, u Jedinici za laboratorijske životinje Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Eksperimentalne protokole odobrila je Uprava za veterinarstvo Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (ovlaštenje EP 410/2023). Životinje su bile smještene u polikarbonatnim kavezima, uz svjetlosni režim od 12 sati svjetla i 12 sati mraka te temperaturu od 20 °C. Podijeljene su prema hranidbenom tretmanu i spolu, a pristup hrani i vodi bio je neograničen (*ad libitum*) tijekom cijelog eksperimentalnog razdoblja. Štakori su vagani jedanput tjedno elektroničkom vagom PLS 1200-3A (Kern & Sohn, Balingen, Njemačka), a koncentracija glukoze natašte, nakon 12-satnog posta, određivana je u uzorku krvi iz repne vene.

4.2. Hranidbeni tretman

Nakon dva tjedna aklimatizacije, tijekom kojeg su sve životinje primale kontrolnu hranu, životinje su nasumično raspoređene u četiri hranidbene skupine prema hranidbenom tretmanu i spolu. Kontrolna skupina (CON) hranjena je standardnom hranom i dobivala je običnu vodu. Skupina LC hranjena je hranom smanjene energetske vrijednosti s povećanim udjelom vlakana i dobivala je običnu vodu. Skupina LC-HS hranjena je hranom smanjene energetske vrijednosti s povećanim udjelom vlakana te je u vodi za piće primala 30 % saharoze, dok je skupina HS hranjena standardnom hranom i u vodi za piće primala 30 % saharoze.

Svaka hranidbena skupina uključivala je životinje oba spola. U svakoj kombinaciji hranidbene skupine, spola i vremena žrtvovanja bilo je **pet životinja (n = 5)**. Životinje su žrtvovane nakon **1., 12. i 24. mjeseca** hranidbenog tretmana.



Slika 6. Shematski prikaz podjele životinja prema hranidbenom tretmanu, spolu i vremenu žrtvovanja

Sastav i nutritivne vrijednosti korištene hranidbene smjese određeni su u suradnji sa Zavodom za dijetetiku i prehranu životinja Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te su prikazani u tablici 1.

Tablica 1. Kemijski sastav i sastav masnih kiselina pokusne hrane

Kemijski sastav (%), osim gdje je drugačije navedeno	**Kontrolna hrana (CON)**	**Hrana niže energetske vrijednosti (LC)**
Sirove bjelančevine	20,2	14,3
Sirova mast	4,9	5,15
Sirova vlaknina	4,9	19,8
Sirovi pepeo	6,7	11,8
Lizin	1,2	0,87
Metionin	0,4	0,36
Metabolička energija (MJ/kg)	12,5	12,1

4.3. Uzimanje uzoraka

Životinje su žrtvovane u tri vremenske točke: nakon 1., 12. i 24. mjeseca istraživanja. U svakoj vremenskoj točki žrtvovano je pet životinja iz svake hranidbene skupine za svaki spol (n = 5). Životinjama je 12 sati prije žrtvovanja uskraćena hrana, uz slobodan pristup vodi.

Štakori su prije žrtvovanja izvagani te im je izmjerena razina glukoze u krvi. Životinje su usmrćene srčanom punkcijom u dubokoj anesteziji, koja je postignuta koktelom anestetika ketamina 80 mg/kg (Narketan, 100 mg/mL, Vetoquinol, Bern, Switzerland) i ksilazina 12 mg/kg (Xylapan, 20 mg/mL, Vetoquinol, Bern, Switzerland).

U epruvete bez antikoagulansa prikupljena je krv za biokemijske pretrage kako bi se dobio uzorak seruma. Krv je centrifugirana 10 minuta na 3000 okretaja u minuti (engl. *revolution per minute*, rpm) (Boeco U-320R, Njemačka), serum je odvojen od krvnih stanica i pohranjen na -80 °C do analiza. Nakon žrtvovanja uzeti su uzorci tkiva jetre, izvagani i pohranjeni na -80 °C do daljnjih analiza.

4.4. Određivanje koncentracije inzulina u serumu

Koncentracija inzulina u serumu određena je ELISA metodom (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) uporabom komercijalnog kompleta namijenjenog određivanju štakorskog inzulina (Rat Insulin ELISA, Mercodia, Uppsala, Švedska). U jažice mikrotitarske ploče obložene monoklonskim protutijelima specifičnima za inzulin pipetirano je 10 µL standarda ili uzorka. Za izradu baždarnog pravca korišteni su standardi koncentracija 0,148; 0,408; 1,06; 3,09 i 5,52 µg/L.

Nakon dodavanja 100 µL monoklonskog protutijela konjugiranog s peroksidazom hrena (HRP, engl. *horseradish peroxidase),* ploča je inkubirana 120 minuta pri sobnoj temperaturi. Po završetku inkubacije jažice su isprane šest puta sa 700 µL otopine za ispiranje, nakon čega je dodano 200 µL kromogenog supstrata. Reakcija je tijekom 15 minuta provedena pri sobnoj temperaturi u mraku, a zatim zaustavljena dodatkom 50 µL otopine za zaustavljanje reakcije.

Apsorbancija je očitana pri 450 nm na spektrofotometru Bio-Tek uQuant Universal Microplate Spectrophotometer (SAD). Koncentracija inzulina u uzorcima izračunata je iz baždarnog pravca standarda poznatih koncentracija i izražena u mU/L.

4.5. Homeostatski model procjene inzulinske rezistencije (HOMA-IR) i kvantitativni indeks provjere osjetljivosti na inzulin (QUICKI)

Inzulinska rezistencija procijenjena je pomoću HOMA-IR indeksa iz koncentracija glukoze i inzulina natašte (MATTHEWS i sur., 1985):

HOMA-IR = koncentracija inzulina (μU/mL) × koncentracija glukoze (mmol/L) /22,5

Osjetljivost na inzulin dodatno je procijenjena QUICKI indeksom prema jednadžbi (KATZ i sur., 2000):

QUICKI = 1 / [log(inzulin (μU/mL)) + log(glukoza (mg/dL))]

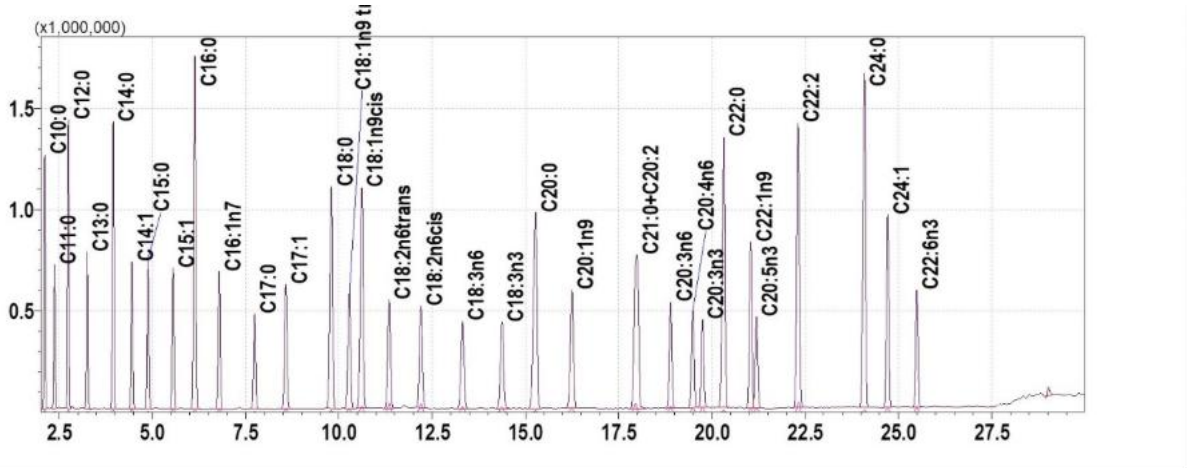
4.6. Određivanje masnokiselinskog sastava tkiva jetre

Lipidi iz tkiva jetre ekstrahirani su smjesom kloroforma i metanola (2:1, v/v) prema metodi Folcha i sur. (1957). Metilni esteri masnih kiselina pripravljeni su primjenom KOH u metanolu (STARČEVIĆ i sur., 2019). Pripremljeni uzorci analizirani su plinskom kromatografijom s masenim detektorom (GC-MS; QP2010 Ultra, Shimadzu, Kyoto, Japan) na kapilarnoj koloni BPX70 (30 m × 0,25 mm; debljina filma 0,25 μm, SGE, Austin, TX, SAD).

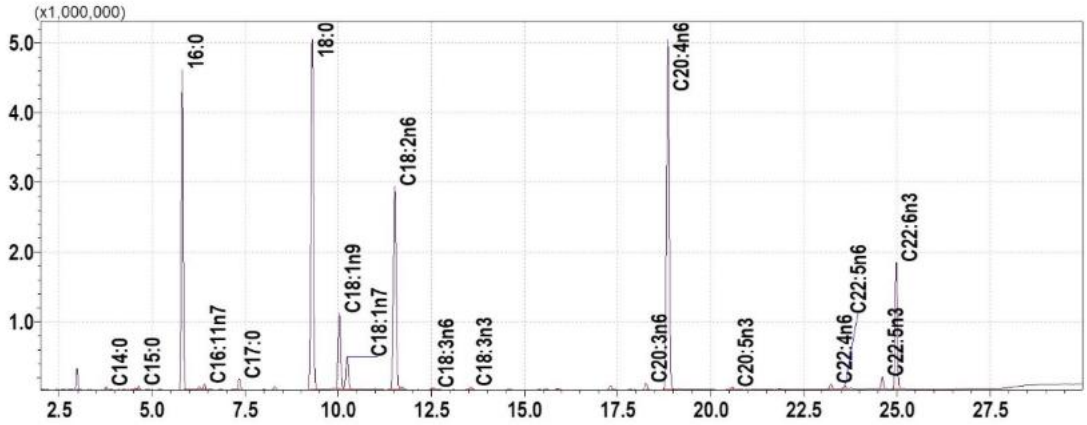
Helij je korišten kao plin nosilac. Volumen injektiranja iznosio je 1 μL, omjer razdvajanja 1:80, temperatura injektora 250 °C, a linearna brzina protoka 35 cm/s. Početna temperatura pećnice iznosila je 150 °C i zadržana je 1 minutu, zatim je povećavana brzinom 1 °C/min do 180 °C uz zadržavanje 2 minute te potom brzinom 5 °C/min do 220 °C. Masene spektralne analize provedene su u scan načinu rada.

Identifikacija i kvantifikacija masnih kiselina provedene su na temelju retencijskih vremena i površina pikova, uz standardnu smjesu 37 Component FAME Mix (Supelco, Bellefonte, PA, SAD) i interne standarde metil-trikozanoat (C23:0) i 1,2-dinonadekanoil-sn-

glicero-3-fosfokolin (19:0 PC) (QUIDEAU i sur., 2016) (Slika 7, Slika 8). Rezultati su izraženi kao postotak pojedine masne kiseline u ukupno određenim masnim kiselinama.



Slika 7. Kromatogram standardne smjese 37 metilnih estera masnih kiselina (FAME; Supelco, Bellfonte, PA, USA) upotrijebljen za identifikaciju masnih kiselina



Slika 8. Reprezentativni kromatogram masnih kiselina sadržanih u tkivu jetre

4.7. Određivanje malondialdehida (MDA)

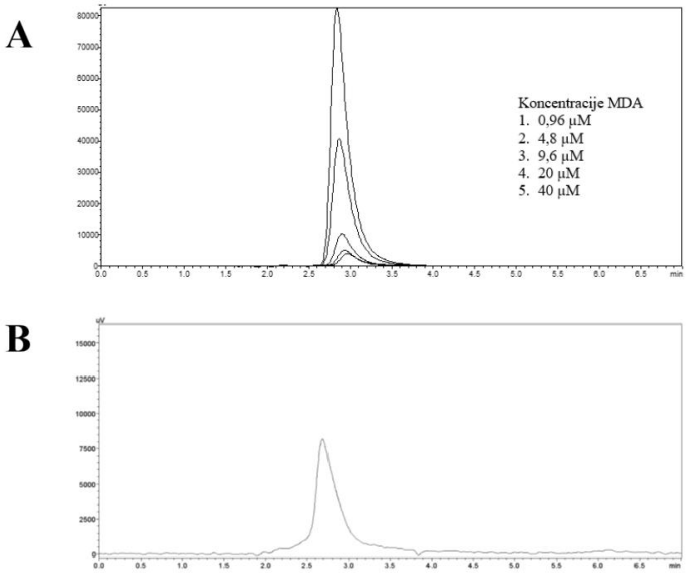
Koncentracija malondialdehida (MDA) u serumu i tkivu jetre određena je metodom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC) na uređaju Shimadzu LC2010CHT (Shimadzu, Japan) s UV-Vis detektorom pri 532 nm i kolonom InertSustain C-18 (4,6 × 150 mm; 5 µm; GL Sciences Inc., Japan). Metoda se temelji na reakciji MDA s tiobarbiturnom kiselinom (TBA), pri čemu nastaje obojeni TBA–MDA adukt koji se kromatografski odvaja i kvantificira (GROTTO i sur., 2007; STARČEVIĆ i sur., 2018). Za izradu kalibracijske krivulje korišten je tetraetoksipropan (TEP; 1,1,3,3-tetraethoxypropane, ≥96 %, Sigma-Aldrich, Njemačka) kao prekursor MDA. Početna standardna otopina pripremljena je dodavanjem 50 µL 4 M TEP-a u 50 mL etanola HPLC kakvoće (≥99,8 %, Sigma-Aldrich, Njemačka), a radne standardne otopine koncentracija 0,96; 4,8; 9,6; 20 i 40 µM pripremane su svježe neposredno prije analize. Uzorci tkiva jetre nakon odmrzavanja homogenizirani su ručnim homogenizatorom (Polytron, Kinematica GmbH, Luzern, Švicarska). U 150 mg homogeniziranog tkiva dodano je 50 µL vode HPLC kakvoće i 50 µL 3 N NaOH, nakon čega je uzorak miješan na vrtložnoj miješalici 1 minutu i inkubiran 30 minuta pri 60 °C. Nakon alkalne hidrolize provedena je derivatizacija s 0,8 %-tnom TBA prema primijenjenom protokolu, uz inkubaciju 45 minuta pri 90 °C. Nakon hlađenja dodano je 250 µL metanola i 100 µL 10 %-tnog natrijeva dodecil-sulfata, uzorci su ponovno promiješani te centrifugirani 10 minuta pri 3600 × g. Dobiveni supernatant prenesen je u kromatografske viale i analiziran pri niže navedenim kromatografskim uvjetima.

Uvjeti kromatografske analize (kolona, mobilna faza, protok, detekcijska valna duljina i volumen injekcije) prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Uvjeti tijekom mjerenja na kromatografu (STARČEVIĆ i sur., 2015.)

Parametar	**Specifikacija**
Kromatograf	HPLC sustav Shimadzu LC2010CHT
Detektor	UV–Vis, 532 nm
Kolona	InertSustain C18 (4.6 × 150 mm, 5 µm; GL Sciences Inc., Japan)
Mobilna faza	50 mM KH_2PO_4 (u destiliranoj vodi, HPLC grade) metanol (HPLC grade, ≥99.9%) = 50:50 (v/v)
Protok mobilne faze	1 mL/min
Injekcijski volumen	20 µL
Temperatura kolone	37 °C

Preklopljeni kromatogrami standarada MDA i reprezentativni kromatogram prikazani su na slici 9.



Slika 9. A) Preklopljeni kromatogrami standarda malondialdehida (MDA) korišteni za izradu kalibracijske krivulje i B) reprezentativni kromatogram koncentracije MDA, određene metodom tvari koje reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom (TBARS) u tkivu jetre

4.8. Određivanje ekspresije gena

4.8.1. Izolacija ukupne RNA

Ukupna RNA izolirana je iz 30 mg tkiva jetre pomoću komercijalno dostupnog kompleta SV Total RNA Isolation System (Promega GmbH, Mannheim, Njemačka), prema uputama proizvođača.

Koncentracija i čistoća izolirane RNA određene su spektrofotometrijski na uređaju BioDrop µLITE (Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo).

4.8.2. Reverzna transkripcija i kvantitativni PCR

RNA je razrijeđena (50 µg) i podvrgnuta je reverznoj transkripciji i kvantitativnom PCR-u u jednom koraku pomoću kompleta One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit II (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) na uređaju Stratagene MxPro3005 (Agilent Technologies,

SAD). Reakcijom RT-qPCR analizirana je ekspresija gena od interesa čije su početnice prikazane u tablici 3.

Tablica 3. Početnice korištene u RT-qPCR analizi

Gen	Uzlazne (5′–3′) početnice	Silazne (5′–3′) početnice
Fads1 (Δ5D)	TGGAGAGCAACTGGTTTGTG	GTTGAAGGCTGACTGGTGAA
Fads2 (Δ6D)	TGTCCACAAGTTTGTCATTG	ACACGTGCAGGCTCTTTATG
Scd1 (Δ9D)	ACATTCAATCTCGGGAGAAA	CCATGCAGTCGATGAAGAAC
Tgf-β	AATACGTCAGACATTCGGGAAGCA	TCAATGTACAGCTGCCGTAC
Tnf-α	ACTGAACTTCGGGGTGATTG	GCTTGGTGGTTTGCTACGAC
Nfe2l2	CACATCCAGACAGACACCAGT	CTACAAATGGGAATGTCTCTGC
β-aktin	ACTATTGGCAACGAGCGGTT	TGTCAGCAATGCCTGGGTACA
ciklofilin	CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCCT	GGATGGCAAGCATGTGGTCTTTG

Sve Ct-vrijednosti dobivene u kvantitativnoj PCR reakciji upotrijebljene su za izračunavanje relativne promjene ekspresije cDNA gena od interesa pokusnih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu. Metodom ΔΔCt ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) analizirana je i kvantificirana ekspresija gena, prema genu za normalizaciju (engl. *housekeeping gene, β*-aktinu i ciklofilinu), te je pomoću ΔΔCt-vrijednosti izračunat faktor promjene ekspresije gena (engl. *fold change*). Ekspresija je izračunata prema formuli:

$$\Delta\Delta Ct = (C_{T\ \text{ciljni gen}}\ P - C_{T\ \text{gen za normalizaciju}}\ P) - (C_{T\ \text{ciljni gen}}\ K - C_{T\ \text{gen za normalizaciju}}\ K)$$

K – kontrolna skupina; P – pokusna skupina

Pomoću izračunate ΔΔCt-vrijednosti izračunati je faktor promjene (engl. *fold change*) ekspresije gena od interesa u odnosu na kontrolnu skupinu prema formuli:

$$\text{Relativna promjena} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Dobiveni broj označava koliko je puta ekspresija mRNA gena od interesa pokusne skupine veća ili manja u odnosu na kontrolnu skupinu.

4.9. Statistička analiza

Rezultati su analizirani pomoću programa GraphPad Prism 8. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) (n = 5 po skupini). Sva mjerenja provedena su u triplikatu. Statističke analize provedene su odvojeno za mužjake i ženke. Razlike između hranidbenih skupina analizirane su analizom varijance (ANOVA) uz Tukeyjev post hoc test. Učinci hranidbenog tretmana, spola i vremena te njihove interakcije procijenjeni su faktorijskom analizom varijance. Razlike su smatrane statistički značajnima pri $p < 0,05$. Za procjenu ukupnog obrasca masnokiselinskog profila nakon 24 mjeseca dodatno je primijenjena sPLS-DA analiza. U model su uključene zbirne i pojedinačne masnokiselinske varijable. Oznaka „n6" predstavlja ukupni zbroj analiziranih n-6 masnih kiselina, uključujući linolnu kiselinu (C18:2n-6), dok „n6 PUFA" predstavlja ukupnu skupinu analiziranih n-6 višestruko nezasićenih masnih kiselina.

5. REZULTATI

5.1. Pokazatelji kroničnog metaboličkog sindroma

Na slici 10 prikazane su promjene tjelesne mase i koncentracije glukoze u mužjaka i ženki tijekom 1., 12. i 24. mjeseca hranidbenog tretmana te vrijednosti HOMA-IR i QUICKI nakon 24 mjeseca istraživanja.

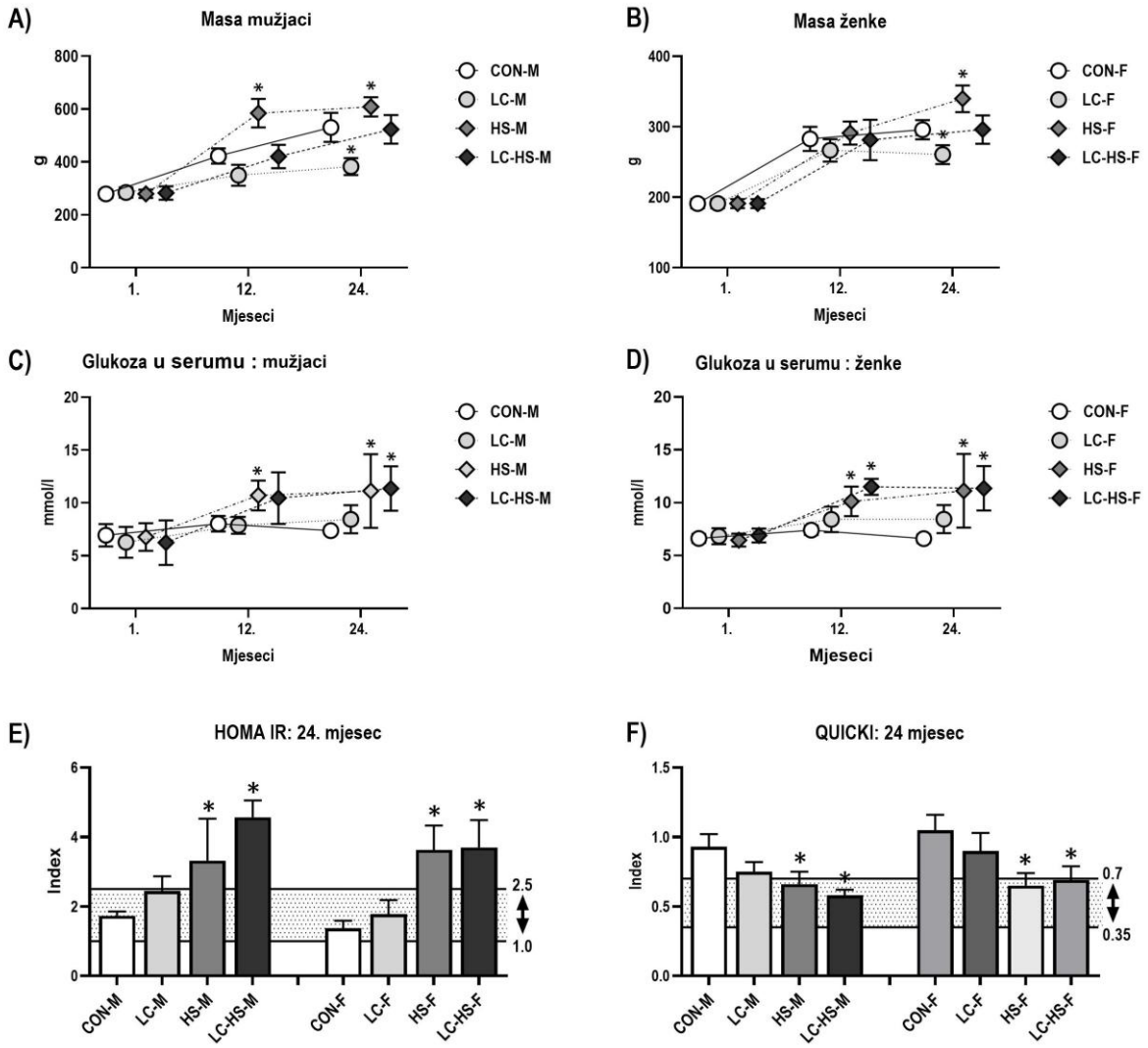
Porast tjelesne mase razlikovao se između hranidbenih tretmana i spolova. U mužjaka je skupina HS-M pokazala izraženiji porast tjelesne mase, pa je nakon 12 mjeseci masa bila veća u odnosu na CON-M ($P < 0,05$), a razlika je ostala prisutna i nakon 24 mjeseca ($P < 0,05$; Slika 10A). Nasuprot tome, porast tjelesne mase u skupini LC-M bio je blaži, zbog čega je nakon 24 mjeseca tjelesna masa bila manja u odnosu na CON-M ($P < 0,05$). U skupini LC-HS-M nije utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu. U ženki je također zabilježen različit intenzitet porasta tjelesne mase između tretmana. Skupina HS-F pokazala je izraženiji porast, s većom tjelesnom masom nakon 24 mjeseca u odnosu na CON-F ($P < 0,05$), dok je u skupini LC-F porast bio manji te je tjelesna masa nakon 24 mjeseca bila niža od CON-F ($P < 0,05$; Slika 10B). U skupini LC-HS-F nije utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na CON-F.

Koncentracija glukoze pokazivala je izraženije promjene u skupinama koje su primale saharozu. U mužjaka je nakon 12 mjeseci viša koncentracija glukoze utvrđena u skupini HS-M u odnosu na CON-M ($P < 0,05$), dok su nakon 24 mjeseca više vrijednosti zabilježene u skupinama HS-M i LC-HS-M ($P < 0,05$; Slika 10C). U ženki su više koncentracije glukoze u skupinama HS-F i LC-HS-F bile prisutne već nakon 12 mjeseci, a razlike su se zadržale i nakon 24 mjeseca ($P < 0,05$; Slika 10D). U skupinama LC-M i LC-F nisu utvrđene statistički značajne razlike u koncentraciji glukoze u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine.

Nakon 24 mjeseca vrijednosti HOMA-IR bile su više u skupinama izloženima saharozi u oba spola. U mužjaka su više vrijednosti utvrđene u skupinama HS-M i LC-HS-M, a u ženki u skupinama HS-F i LC-HS-F u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine ($P < 0,05$; Slika 10E). Vrijednosti HOMA-IR u skupinama LC-M i LC-F nisu se statistički značajno razlikovale od kontrolnih skupina.

Suprotan obrazac utvrđen je za QUICKI. U mužjaka su vrijednosti bile niže u skupinama HS-M i LC-HS-M ($P < 0,05$), a u ženki u skupinama HS-F i LC-HS-F u odnosu na

odgovarajuće kontrolne skupine ($P < 0,05$; Slika 10F). U skupinama LC-M i LC-F vrijednosti QUICKI nisu se statistički značajno razlikovale od CON-M odnosno CON-F.



Slika 10. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na pokazatelje kroničnog metaboličkog sindroma u štakora. Prikazane su tjelesna masa mužjaka (A) i ženki (B), koncentracija glukoze u serumu mužjaka (C) i ženki (D) nakon 1., 12. i 24. mjeseca hranidbenog tretmana te vrijednosti HOMA-IR (E) i QUICKI (F) nakon 24 mjeseca istraživanja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. *$P < 0,05$ u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu.

5.2. Učinak prehrane smanjene energetske vrijednosti obogaćene vlaknima na metabolizam lipida

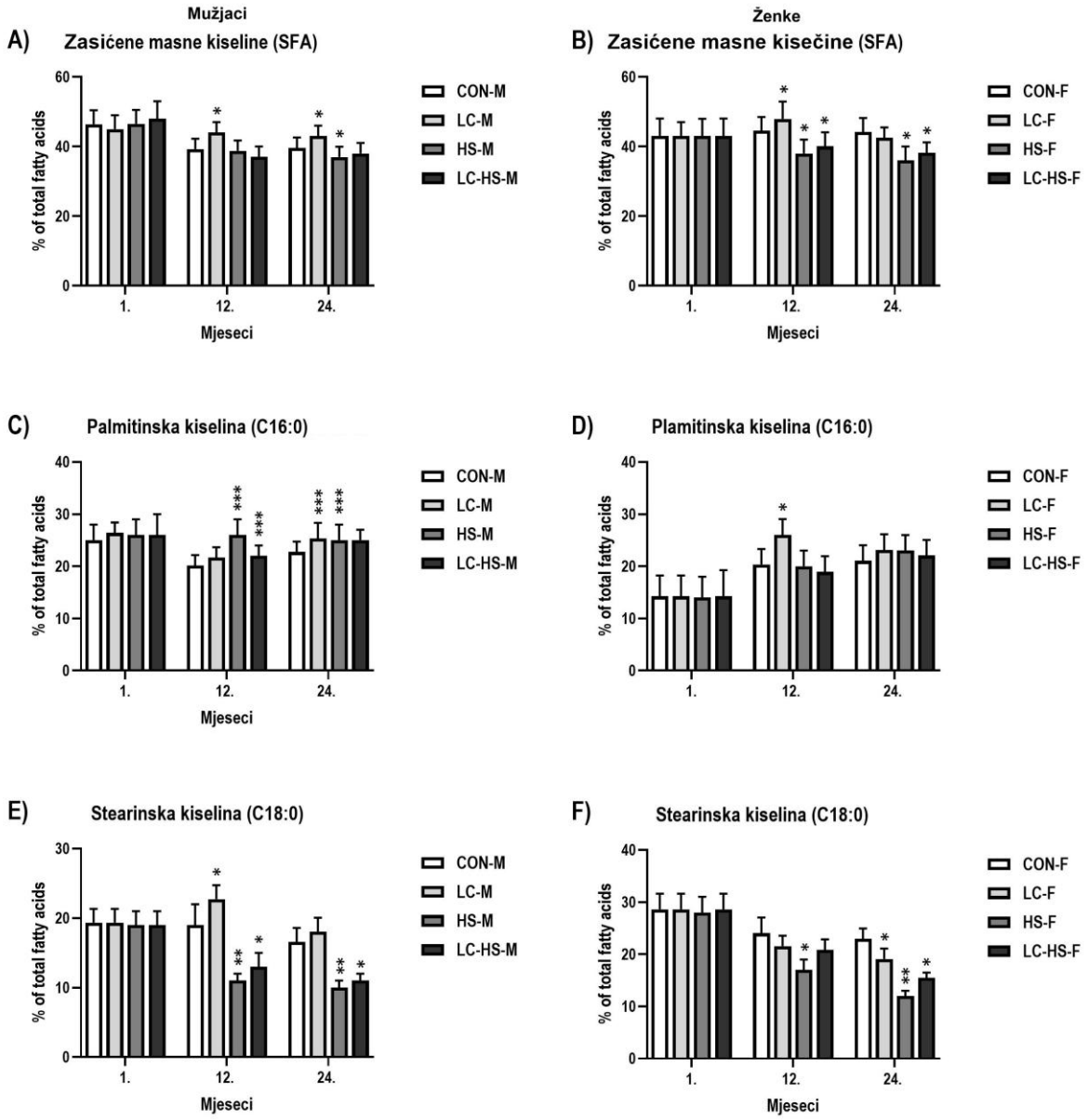
5.2.1. Utjecaj hranidbenih tretmana na sastav zasićenih masnih kiselina u jetri

Na slici 11 prikazani su udjeli ukupnih zasićenih masnih kiselina (SFA), palmitinske kiseline (C16:0) i stearinske kiseline (C18:0) u jetri mužjaka i ženki nakon 1., 12. i 24. mjeseca hranidbenog tretmana.

Hrana smanjene energetske vrijednosti (LC) bila je povezana s većim ukupnim udjelom SFA u oba spola nakon 12 mjeseci ($P < 0,05$; Slika 11A, B). Nakon 24 mjeseca veći udio SFA u odnosu na kontrolnu skupinu zadržao se samo u mužjaka skupine LC-M ($P < 0,05$; Slika 11A). U skupinama izloženima saharozi ukupni udio SFA bio je manji. U mužjaka skupine HS-M značajno smanjenje zabilježeno je nakon 24 mjeseca ($P < 0,05$; Slika 11A), dok su u ženki skupine HS-F i LC-HS-F imale niže vrijednosti u odnosu na CON-F nakon 12 i 24 mjeseca ($P < 0,05$; Slika 11B).

Udio palmitinske kiseline (C16:0) pokazivao je različite promjene ovisno o spolu i hranidbenom tretmanu. U ženki je nakon 12 mjeseci u skupini LC-F udio C16:0 bio veći nego u CON-F ($P < 0,05$; Slika 11D), dok nakon 24 mjeseca nisu utvrđene statistički značajne razlike. U mužjaka su nakon 12 mjeseci veće vrijednosti zabilježene u skupinama HS-M i LC-HS-M ($P < 0,001$; Slika 11C). Nakon 24 mjeseca veći udio C16:0 utvrđen je i u skupini LC-M, uz skupine HS-M i LC-HS-M ($P < 0,001$; Slika 11C).

Udio stearinske kiseline (C18:0) bio je niži u skupinama izloženima saharozi u oba spola. U mužjaka je nakon 12 mjeseci udio C18:0 bio niži u skupinama HS-M ($P < 0,01$) i LC-HS-M ($P < 0,05$) u odnosu na CON-M, a razlika je u obje skupine ostala prisutna i nakon 24 mjeseca ($P < 0,01$; Slika 11E). U ženki je nakon 12 mjeseci niži udio C18:0 zabilježen u skupini HS-F ($P < 0,05$; Slika 11F). Nakon 24 mjeseca niže vrijednosti u odnosu na CON-F utvrđene su u skupinama LC-F ($P < 0,05$), HS-F ($P < 0,001$) i LC-HS-F ($P < 0,05$; Slika 11F).



Slika 11. Utjecaj hranidbenih tretmana na udio zasićenih masnih kiselina u jetri mužjaka i ženki. Prikazani su ukupni udio zasićenih masnih kiselina (SFA) u mužjaka (A) i ženki (B), udio palmitinske kiseline (C16:0) u mužjaka (C) i ženki (D) te udio stearinske kiseline (C18:0) u mužjaka (E) i ženki (F) nakon 1., 12. i 24. mjeseca hranidbenog tretmana. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD (n = 5). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu.

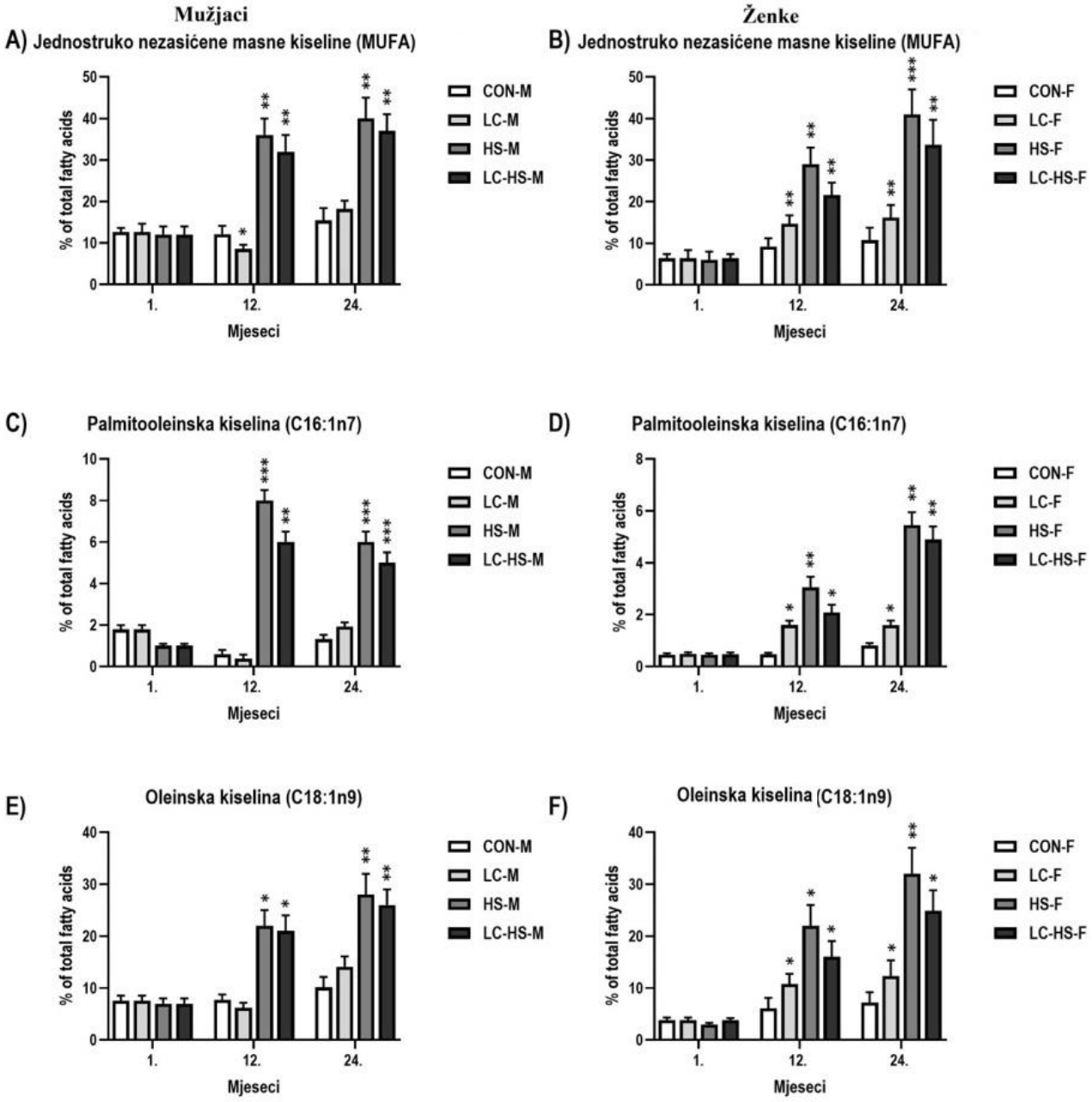
5.2.2. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na sastav jednostruko nezasićenih masnih kiselina u jetri

Na slici 12 prikazani su ukupni udjeli jednostruko nezasićenih masnih kiselina (MUFA) te udjeli palmitoleinske (C16:1n-7) i oleinske kiseline (C18:1n-9) u jetri mužjaka i ženki nakon 1., 12. i 24. mjeseca hranidbenog tretmana.

Tijekom prvog mjeseca nisu utvrđene statistički značajne razlike u ukupnom udjelu MUFA između hranidbenih skupina. Nakon 12 mjeseci razlike su bile izražene u oba spola. U mužjaka je ukupni udio MUFA bio niži u skupini LC-M ($P < 0,05$), a viši u skupinama HS-M ($P < 0,001$) i LC-HS-M ($P < 0,01$) u odnosu na CON-M (Slika 12A). U ženki su više vrijednosti zabilježene u skupinama LC-F ($P < 0,01$), HS-F ($P < 0,001$) i LC-HS-F ($P < 0,01$) u odnosu na CON-F (Slika 12B). Nakon 24 mjeseca ukupni udio MUFA ostao je viši u skupinama HS-M ($P < 0,001$) i LC-HS-M ($P < 0,01$) u mužjaka te u skupinama LC-F ($P < 0,01$), HS-F ($P < 0,001$) i LC-HS-F ($P < 0,01$) u ženki.

Palmitoleinska kiselina (C16:1n-7) pokazala je porast udjela ponajprije u skupinama koje su primale saharozu. U mužjaka su nakon 12 mjeseci više vrijednosti utvrđene u skupinama HS-M ($P < 0,001$) i LC-HS-M ($P < 0,01$), a razlike su ostale prisutne i nakon 24 mjeseca ($P < 0,001$; Slika 12C). U ženki je porast udjela C16:1n-7 zabilježen i u skupini LC-F. Nakon 12 mjeseci više vrijednosti utvrđene su u LC-F i HS-F ($P < 0,01$) te LC-HS-F ($P < 0,05$), a nakon 24 mjeseca u LC-F ($P < 0,05$), HS-F i LC-HS-F ($P < 0,01$; Slika 12D).

Udio oleinske kiseline (C18:1n-9) bio je veći u skupinama koje su primale saharozu u oba spola. U mužjaka su nakon 12 mjeseci više vrijednosti utvrđene u skupinama HS-M i LC-HS-M ($P < 0,05$), a razlike su ostale prisutne i nakon 24 mjeseca ($P < 0,01$; Slika 12E). U ženki su nakon 12 mjeseci više vrijednosti zabilježene u skupinama LC-F, HS-F i LC-HS-F ($P < 0,05$). Nakon 24 mjeseca veći udio C18:1n-9 ostao je prisutan u skupinama LC-F ($P < 0,05$), HS-F ($P < 0,001$) i LC-HS-F ($P < 0,05$) u odnosu na CON-F (Slika 12F).



Slika 12. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na udio jednostruko nezasićenih masnih kiselina u jetri. Prikazani su ukupni udio jednostruko nezasićenih masnih kiselina (MUFA) u mužjaka (A) i ženki (B), udio palmitoleinske kiseline (C16:1n-7) u mužjaka (C) i ženki (D) te udio oleinske kiseline (C18:1n-9) u mužjaka (E) i ženki (F) nakon 1., 12. i 24. mjeseca hranidbenog tretmana. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. * $P < 0,05$; ** P < 0,01; *** $P < 0,001$ u odnosu na kontrolnu skupinu.

5.2.3. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na sastav n-6 višestruko nezasićenih masnih kiselina u jetri

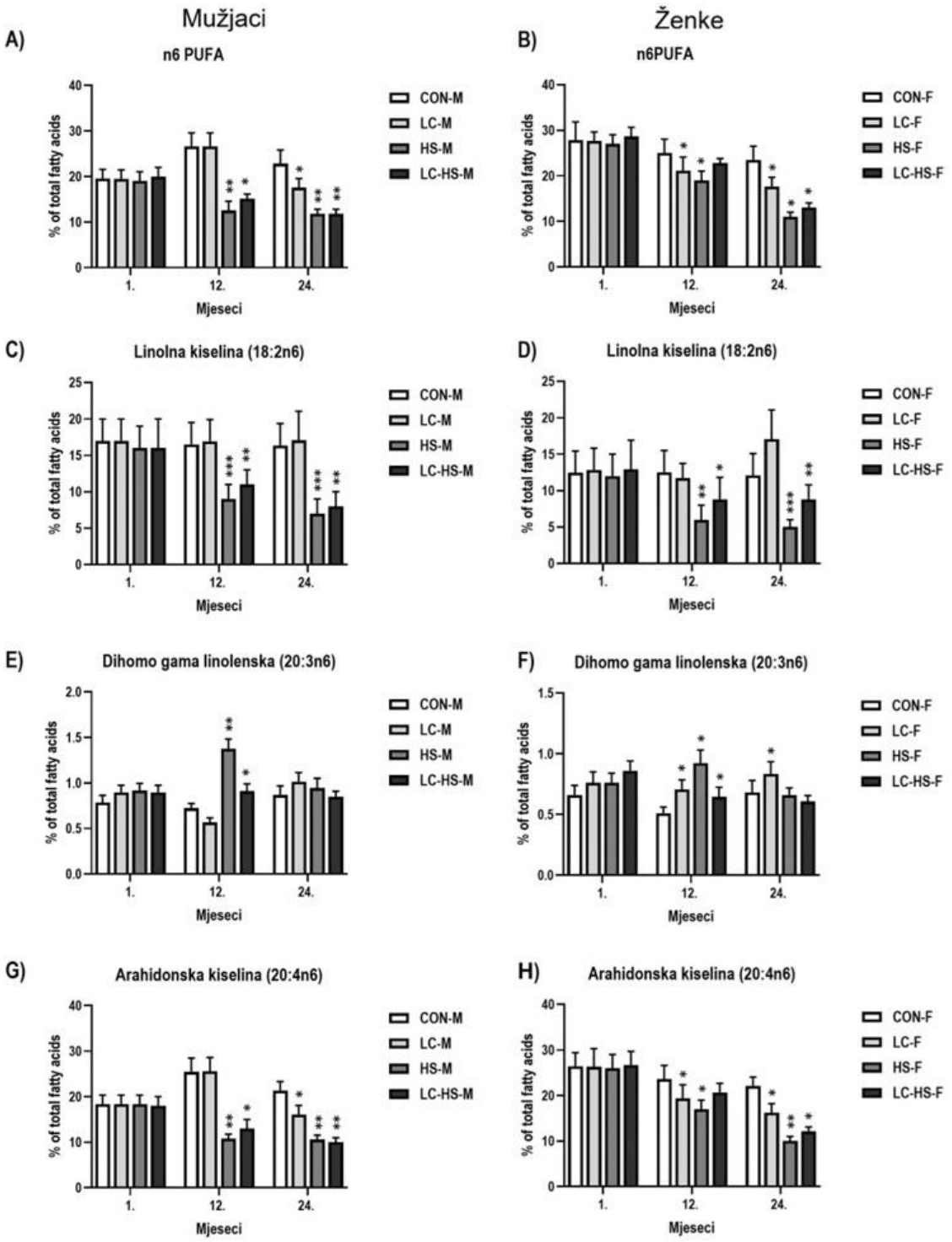
Na slici 13 prikazani su ukupni udjeli n-6 višestruko nezasićenih masnih kiselina (n-6 PUFA) te udjeli linolne kiseline (C18:2n-6), dihomo-γ-linolenske kiseline (DGLA; C20:3n-6) i arahidonske kiseline (C20:4n-6) u jetri mužjaka i ženki nakon 1., 12. i 24. mjeseca hranidbenog tretmana.

Tijekom prvog mjeseca nisu utvrđene statistički značajne razlike u ukupnom udjelu n-6 PUFA između hranidbenih skupina. Nakon 12 mjeseci u mužjaka su niže vrijednosti utvrđene u skupinama HS-M ($P < 0,01$) i LC-HS-M ($P < 0,05$), dok se LC-M nije razlikovao od CON-M (Slika 13A). U ženki su u istoj vremenskoj točki niži udjeli n-6 PUFA zabilježeni u skupinama LC-F i HS-F ($P < 0,05$), dok se LC-HS-F nije statistički značajno razlikovala od CON-F (Slika 13B). Nakon 24 mjeseca niži ukupni udio n-6 PUFA bio je prisutan u sve tri pokusne skupine mužjaka, LC-M ($P < 0,05$), HS-M ($P < 0,01$) i LC-HS-M ($P < 0,01$), kao i u ženki u skupinama LC-F ($P < 0,05$), HS-F ($P < 0,01$) i LC-HS-F ($P < 0,05$) u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine (Slika 13A, B).

Udio linolne kiseline (C18:2n-6) bio je niži ponajprije u skupinama koje su primale saharozu. U mužjaka su nakon 12 mjeseci niže vrijednosti utvrđene u skupinama HS-M ($P < 0,001$) i LC-HS-M ($P < 0,01$), a iste su razlike ostale prisutne i nakon 24 mjeseca (Slika 13C). Skupina LC-M nije se statistički značajno razlikovala od CON-M. U ženki je nakon 12 mjeseci niži udio linolne kiseline zabilježen u skupinama HS-F ($P < 0,01$) i LC-HS-F ($P < 0,05$), dok su nakon 24 mjeseca vrijednosti u istim skupinama i dalje bile niže od CON-F ($P < 0,001$ odnosno $P < 0,01$; Slika 13D).

Promjene udjela dihomo-γ-linolenske kiseline (DGLA; C20:3n-6) razlikovale su se između spolova i hranidbenih tretmana. U mužjaka je nakon 12 mjeseci veći udio DGLA utvrđen u skupinama HS-M ($P < 0,01$) i LC-HS-M ($P < 0,05$; Slika 13E). U ženki su u istoj vremenskoj točki više vrijednosti zabilježene u skupinama LC-F, HS-F i LC-HS-F ($P < 0,05$; Slika 13F). Nakon 24 mjeseca statistički značajno veći udio DGLA utvrđen je samo u skupini LC-F ($P < 0,05$; Slika 13F).

Udio arahidonske kiseline (C20:4n-6) bio je niži u skupinama izloženima saharozi u oba spola. U mužjaka su nakon 12 mjeseci niže vrijednosti utvrđene u skupinama HS-M ($P < 0,01$) i LC-HS-M ($P < 0,05$), dok su nakon 24 mjeseca niži udjeli zabilježeni u LC-M ($P < 0,05$), HS-M ($P < 0,01$) i LC-HS-M ($P < 0,01$; Slika 13G). U ženki je nakon 12 mjeseci niži udio C20:4n-6 utvrđen u skupinama LC-F i HS-F ($P < 0,05$), a nakon 24 mjeseca u skupinama LC-F ($P < 0,05$), HS-F ($P < 0,01$) i LC-HS-F ($P < 0,05$) u odnosu na CON-F (Slika 13H).



Slika 13. Ukupne n-6 PUFA (A, B), linolna kiselina (C18:2n-6; C, D), dihomo-γ-linolenska kiselina (C20:3n-6; E, F) i arahidonska kiselina (C20:4n-6; G, H) u jetri mužjaka i ženki nakon 1., 12. i 24. mjeseca hranidbenog tretmana. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD (n = 5). * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 u odnosu na kontrolnu skupinu.

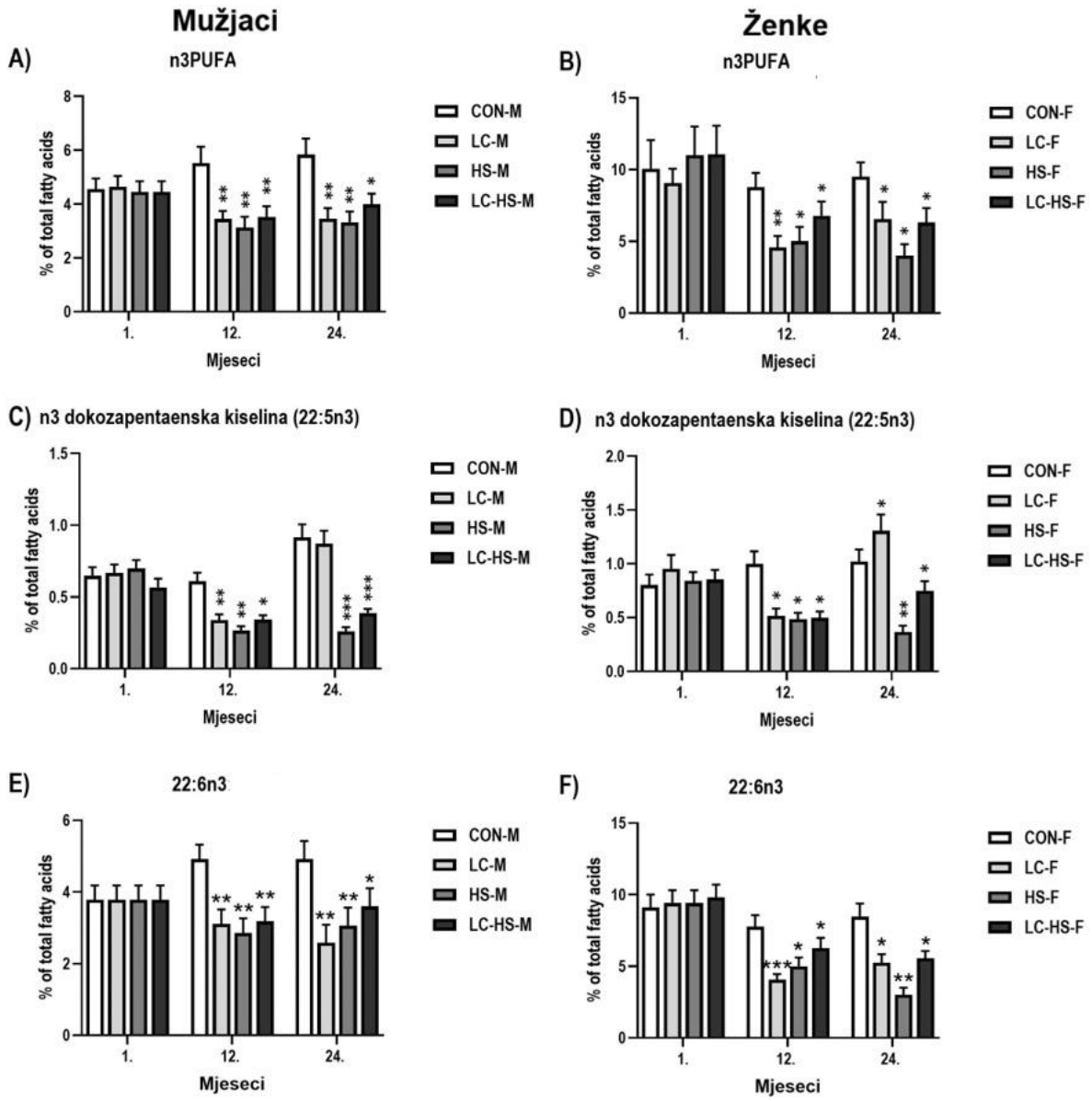
5.2.4. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na sastav n-3 višestruko nezasićenih masnih kiselina u jetri

Na slici 14 prikazani su ukupni udjeli n-3 višestruko nezasićenih masnih kiselina (n-3 PUFA) te udjeli dokozapentaenske kiseline n-3 (DPA; C22:5n-3) i dokozaheksaenske kiseline (DHA; C22:6n-3) u jetri mužjaka i ženki nakon 1., 12. i 24. mjeseca hranidbenog tretmana.

Tijekom prvog mjeseca nisu utvrđene statistički značajne razlike u ukupnom udjelu n-3 PUFA između hranidbenih skupina. Nakon 12 mjeseci ukupni udio n-3 PUFA bio je niži u svim tretiranim skupinama mužjaka, odnosno u LC-M, HS-M i LC-HS-M ($P < 0,01$) u odnosu na CON-M (Slika 14A). Sličan obrazac zabilježen je i u ženki, u kojih su niže vrijednosti utvrđene u skupinama LC-F ($P < 0,001$), HS-F ($P < 0,01$) i LC-HS-F ($P < 0,05$) u odnosu na CON-F (Slika 14B). Nakon 24 mjeseca ukupni udio n-3 PUFA ostao je niži u skupinama LC-M i HS-M ($P < 0,01$) te LC-HS-M ($P < 0,05$), kao i u skupinama LC-F, HS-F i LC-HS-F u ženki ($P < 0,05$) u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine (Slika 14A, B).

Udio dokozapentaenske kiseline n-3 (DPA; C22:5n-3) nakon 12 mjeseci bio je niži u svim tretiranim skupinama oba spola. U mužjaka su niže vrijednosti utvrđene u skupinama LC-M ($P < 0,05$), HS-M ($P < 0,01$) i LC-HS-M ($P < 0,05$; Slika 14C), dok su u ženki niže vrijednosti zabilježene u skupinama LC-F, HS-F i LC-HS-F ($P < 0,05$; Slika 14D). Nakon 24 mjeseca u mužjaka se LC-M više nije statistički značajno razlikovao od CON-M, dok su vrijednosti u skupinama HS-M i LC-HS-M ostale niže ($P < 0,001$; Slika 14C). U ženki je u istoj vremenskoj točki zabilježen drukčiji odgovor skupine LC-F, u kojoj je udio DPA bio veći nego u CON-F ($P < 0,05$), dok su u skupinama HS-F ($P < 0,001$) i LC-HS-F ($P < 0,05$) vrijednosti ostale niže (Slika 14D).

Udio DHA (C22:6n-3) bio je smanjen u svim tretiranim skupinama oba spola nakon 12 mjeseci. U mužjaka su niže vrijednosti utvrđene u skupinama LC-M ($P < 0,01$), HS-M ($P < 0,001$) i LC-HS-M ($P < 0,01$; Slika 14E). U ženki je smanjenje bilo prisutno u skupini LC-F ($P < 0,001$) te u skupinama HS-F i LC-HS-F ($P < 0,05$; Slika 14F). Nakon 24 mjeseca vrijednosti DHA u mužjaka ostale su niže u skupinama LC-M ($P < 0,001$), HS-M ($P < 0,01$) i LC-HS-M ($P < 0,05$) u odnosu na CON-M (Slika 14E). U ženki je isti smjer promjena zadržan u skupinama LC-F ($P < 0,05$), HS-F ($P < 0,01$) i LC-HS-F ($P < 0,05$) u odnosu na CON-F (Slika 14F).

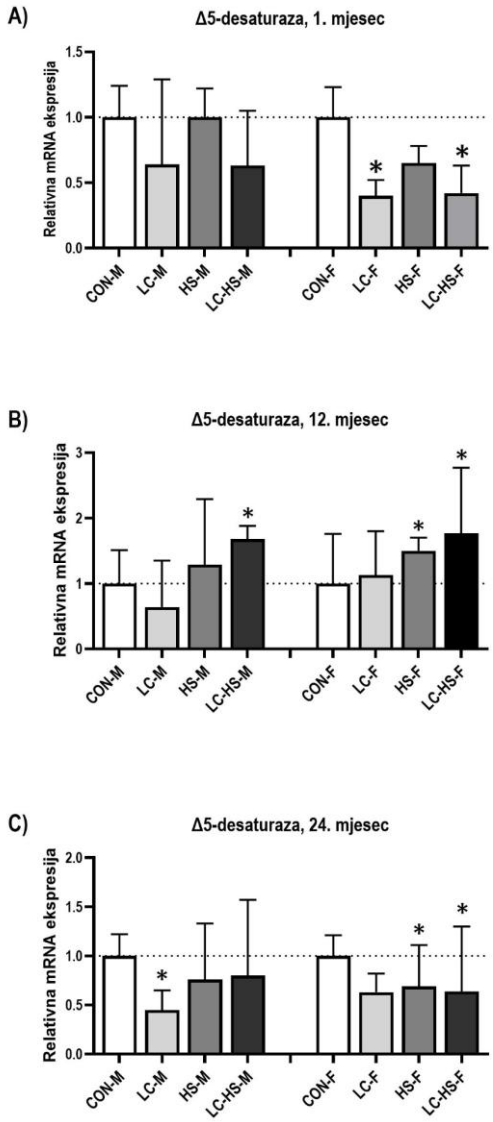


Slika 14. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na udio n-3 višestruko nezasićenih masnih kiselina u jetri. Prikazani su ukupni udio n-3 PUFA u mužjaka (A) i ženki (B), udio dokozapentaenske kiseline n-3 (DPA; C22:5n-3) u mužjaka (C) i ženki (D) te udio dokozaheksaenske kiseline (DHA; C22:6n-3) u mužjaka (E) i ženki (F) nakon 1., 12. i 24. mjeseca hranidbenog tretmana. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ u odnosu na kontrolnu skupinu.

5.2.5. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na ekspresiju gena desaturaza u jetri

Na slikama 15–17 prikazana je relativna ekspresija gena *Fads1*, *Fads2* i *Scd1*, koji kodiraju Δ5-, Δ6- odnosno Δ9-desaturazu, u jetri mužjaka i ženki nakon 1., 12. i 24. mjeseca hranidbenog tretmana.

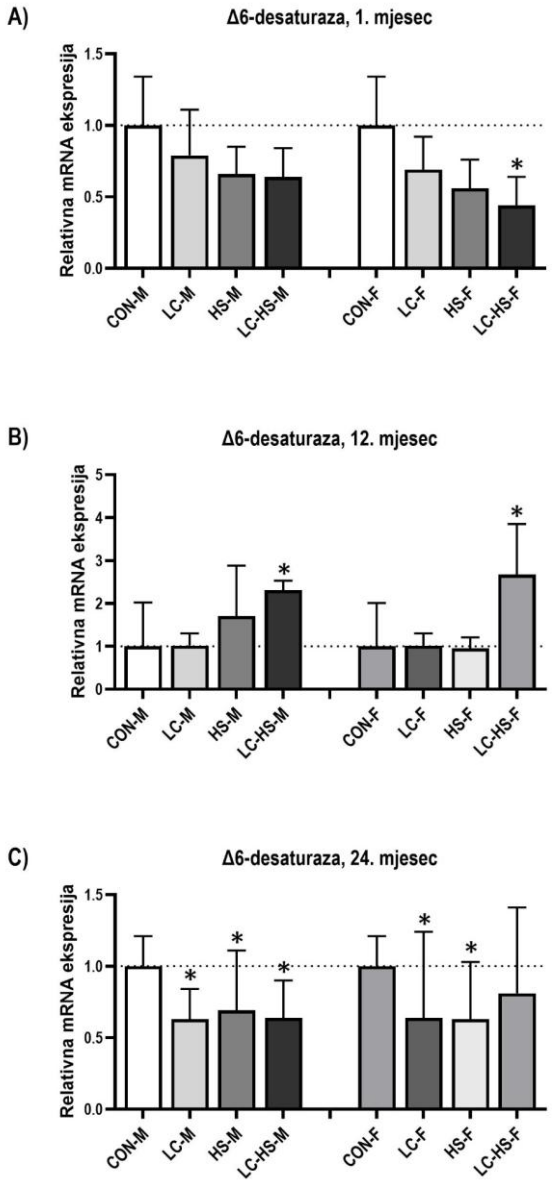
Ekspresija gena *Fads1* razlikovala se između hranidbenih skupina i spolova u pojedinim vremenskim točkama. Nakon prvog mjeseca u mužjaka nisu utvrđene statistički značajne razlike, dok je u ženki ekspresija bila niža u skupinama LC-F i LC-HS-F u odnosu na CON-F ($P < 0,05$; Slika 15 A). Nakon 12 mjeseci veća ekspresija *Fads1* u mužjaka utvrđena je u skupini LC-HS-M ($P < 0,05$), dok su u ženki više vrijednosti zabilježene u HS-F i LC-HS-F ($P < 0,05$; Slika 15 B). Nakon 24 mjeseca ekspresija je u mužjaka bila niža u skupini LC-M ($P < 0,05$), dok su u ženki niže vrijednosti utvrđene u skupinama HS-F i LC-HS-F u odnosu na CON-F ($P < 0,05$; Slika 15 C).



Slika 15. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na relativnu ekspresiju gena *Fads1* u jetri. Prikazana je relativna ekspresija gena *Fads1*, koji kodira Δ5-desaturazu, nakon 1. (A), 12. (B) i 24. mjeseca (C) hranidbenog tretmana. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD (n = 5). * $P < 0,05$ u odnosu na kontrolnu skupinu.

Ekspresija gena *Fads2* nakon prvog mjeseca nije se značajno razlikovala između hranidbenih skupina mužjaka, dok je u ženki niža vrijednost utvrđena u skupini LC-HS-F u odnosu na CON-F ($P < 0,05$; Slika 16A). Nakon 12 mjeseci veća ekspresija zabilježena je u skupini LC-HS-M u mužjaka i LC-HS-F u ženki ($P < 0,05$; Slika 16B). Nakon 24 mjeseca niže vrijednosti u mužjaka utvrđene su u skupinama LC-M, HS-M i LC-HS-M ($P < 0,05$), dok je u ženki

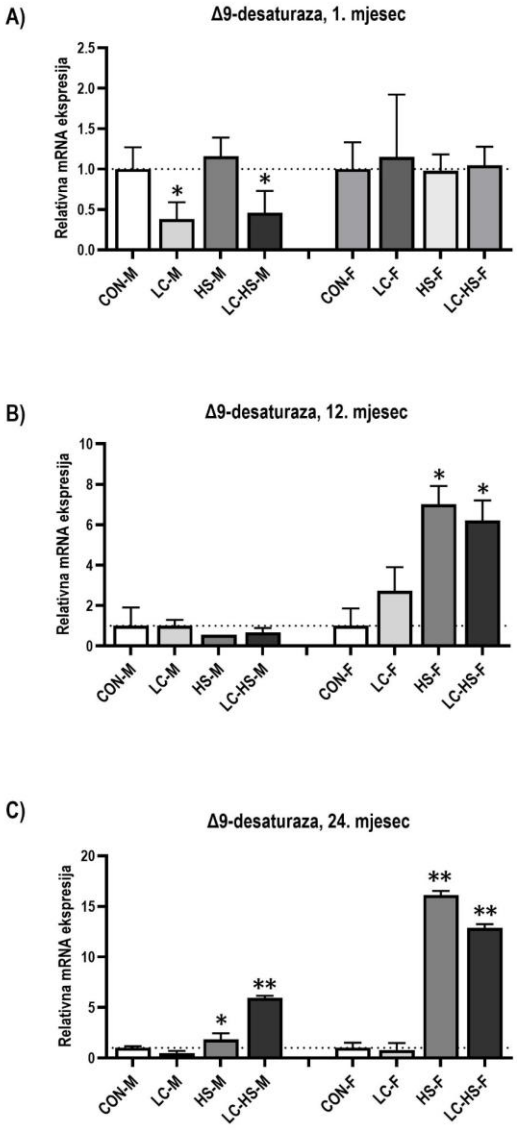
ekspresija *Fads2* bila niža u skupinama LC-F i HS-F ($P < 0,05$; Slika 16 C). Skupina LC-HS-F u toj se vremenskoj točki nije statistički značajno razlikovala od CON-F.



Slika 16. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na relativnu ekspresiju gena *Fads2* u jetri. Prikazana je relativna ekspresija gena *Fads2*, koji kodira Δ6-desaturazu, nakon 1. (A), 12. (B) i 24. mjeseca (C) hranidbenog tretmana. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD (n = 5). * $P < 0,05$ u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu.

Najizraženije promjene tijekom hranidbenog tretmana zabilježene su u ekspresiji gena *Scd1*. Nakon prvog mjeseca u mužjaka je ekspresija bila niža u skupinama LC-M i LC-HS-M u odnosu na CON-M ($P < 0,05$), dok u ženki nisu utvrđene statistički značajne razlike (Slika

17A). Nakon 12 mjeseci u mužjaka nije bilo značajnih razlika između skupina, dok je u ženki ekspresija *Scd1* bila veća u skupinama HS-F i LC-HS-F u odnosu na CON-F ($P < 0,05$; Slika 17B). Nakon 24 mjeseca veća ekspresija utvrđena je u oba spola, i to u skupinama HS-M ($P < 0,05$) i LC-HS-M ($P < 0,01$) u mužjaka te HS-F i LC-HS-F u ženki ($P < 0,01$; Slika 17C). U skupinama LC-M i LC-F bez dodatka saharoze u toj vremenskoj točki nisu utvrđene statistički značajne razlike u ekspresiji *Scd1* u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine.



Slika 17. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na relativnu ekspresiju gena *Scd1* u jetri. Prikazana je relativna ekspresija gena *Scd1*, koji kodira Δ9-desaturazu, nakon 1. (A), 12. (B) i 24. mjeseca (C) hranidbenog tretmana. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD (n = 5). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu.

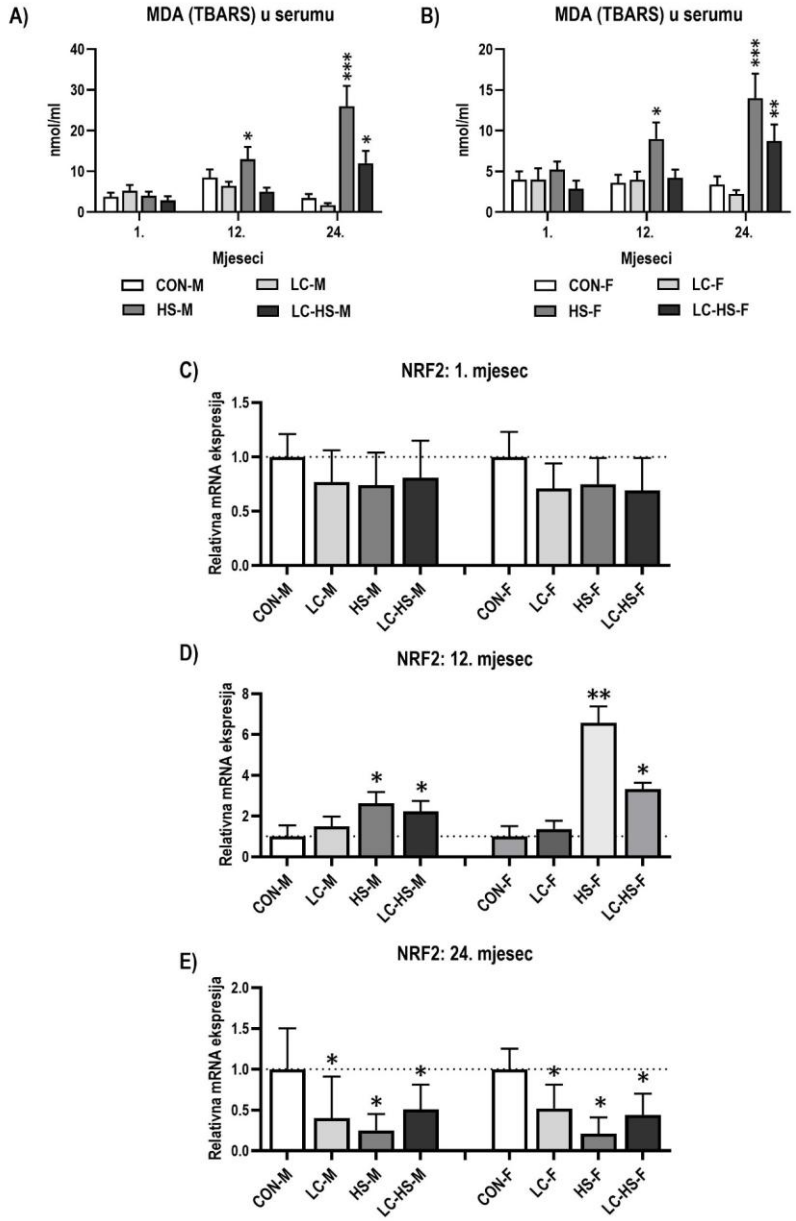
5.3. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na oksidacijski stres i antioksidacijski odgovor

Na slici 18 prikazane su koncentracije malondialdehida (MDA) u serumu mužjaka i ženki nakon 1., 12. i 24. mjeseca hranidbenog tretmana te relativna ekspresija gena *Nfe2l2* u jetri u istim vremenskim točkama.

Tijekom prvog mjeseca koncentracija MDA u serumu nije se statistički značajno razlikovala između hranidbenih skupina. Nakon 12 mjeseci više vrijednosti utvrđene su u skupinama HS-M i HS-F u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine ($P < 0,05$; Slika 18A, B), dok se skupine LC-M, LC-HS-M, LC-F i LC-HS-F nisu statistički značajno razlikovale od svojih kontrola. Nakon 24 mjeseca porast koncentracije MDA bio je izraženiji u skupinama koje su primale saharozu. U mužjaka su više vrijednosti zabilježene u HS-M ($P < 0,001$) i LC-HS-M ($P < 0,05$; Slika 18A), a u ženki u HS-F ($P < 0,001$) i LC-HS-F ($P < 0,01$; Slika 18B). U skupinama LC-M i LC-F koncentracije MDA nisu se statistički značajno razlikovale od pripadajućih kontrolnih skupina.

Ekspresija gena *Nfe2l2* tijekom prvog mjeseca nije se statistički značajno razlikovala između skupina ni u jednom spolu (Slika 18C). Nakon 12 mjeseci viša ekspresija utvrđena je u skupinama HS-M i LC-HS-M u mužjaka ($P < 0,05$) te HS-F ($P < 0,01$) i LC-HS-F ($P < 0,05$) u ženki u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine (Slika 18D). Skupine LC-M i LC-F u toj se vremenskoj točki nisu statistički značajno razlikovale od kontrola.

Nakon 24 mjeseca ekspresija *Nfe2l2* bila je niža u svim tretiranim skupinama u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine. U mužjaka su niže vrijednosti utvrđene u LC-M, HS-M i LC-HS-M ($P < 0,05$), a u ženki u LC-F, HS-F i LC-HS-F ($P < 0,05$; Slika 18E). Time se u kasnijoj vremenskoj točki smanjenje ekspresije *Nfe2l2* očitovalo ne samo u skupinama sa saharozom nego i u skupinama hranjenima hranom smanjene energetske vrijednosti.



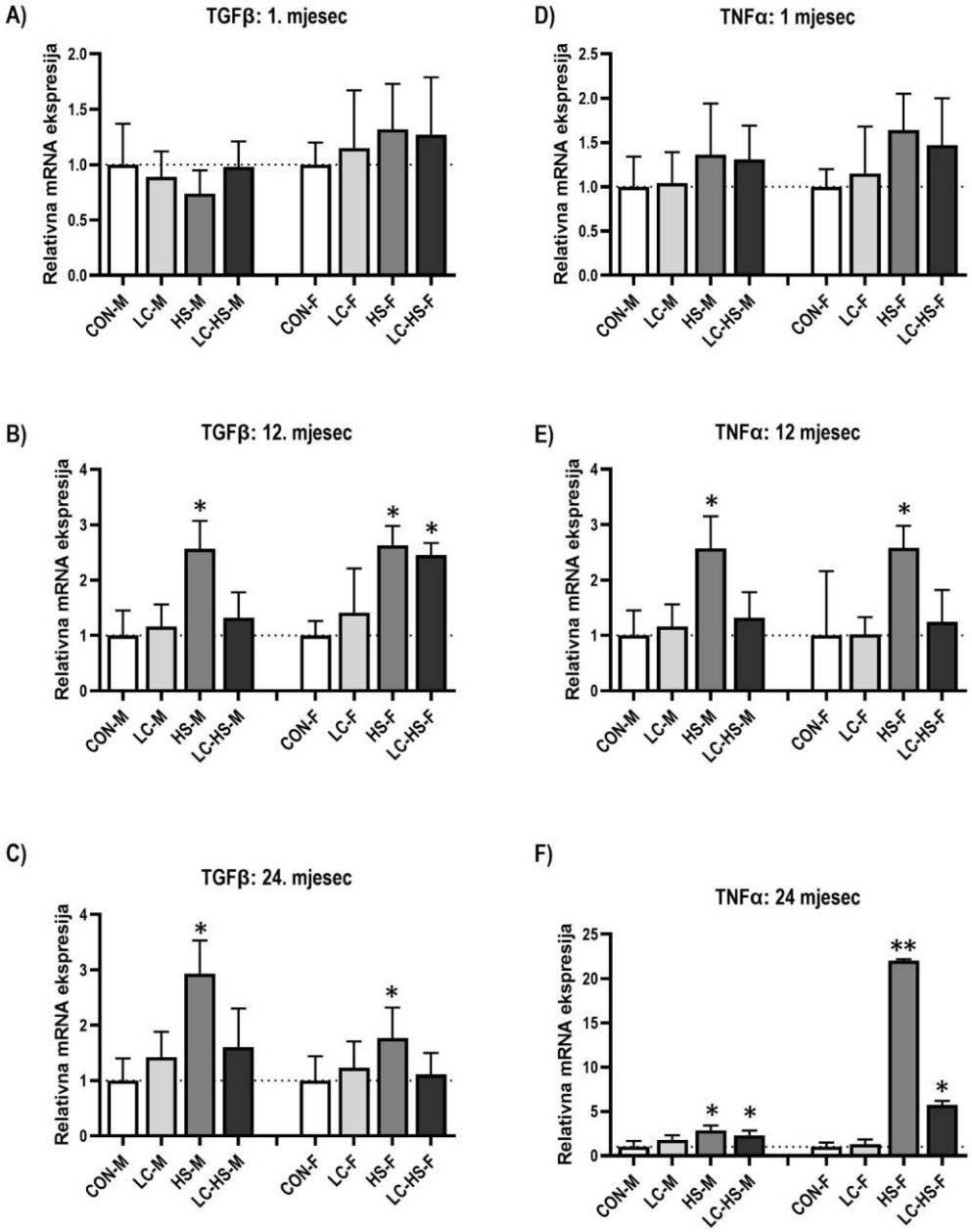
Slika 18. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na pokazatelje oksidacijskog stresa i antioksidacijske obrane. Prikazane su koncentracije malondialdehida (MDA) u serumu mužjaka (A) i ženki (B) nakon 1., 12. i 24. mjeseca hranidbenog tretmana te relativna ekspresija gena *Nfe2l2*, koji kodira transkripcijski čimbenik NRF2, nakon 1. (C), 12. (D) i 24. mjeseca (E) hranidbenog tretmana. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. *P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu.

5.4. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na upalni odgovor u jetri

Na slici 19 prikazana je relativna ekspresija gena *Tgf-β* i *Tnf-α* u jetri mužjaka i ženki nakon 1., 12. i 24. mjeseca hranidbenog tretmana.

Tijekom prvog mjeseca ekspresija gena *Tgf-β* nije se statistički značajno razlikovala između hranidbenih skupina ni u jednom spolu (Slika 19A). Nakon 12 mjeseci veća ekspresija utvrđena je u skupini HS-M u mužjaka te u skupinama HS-F i LC-HS-F u ženki u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine ($P < 0,05$; Slika 19B). Nakon 24 mjeseca veća ekspresija *Tgf-β* ostala je prisutna u skupinama HS-M i HS-F ($P < 0,05$), dok se LC-HS-M i LC-HS-F nisu statistički značajno razlikovale od odgovarajućih kontrolnih skupina (Slika 19C). U skupinama LC-M i LC-F nisu utvrđene značajne razlike ni u jednoj od promatranih vremenskih točaka.

Ekspresija gena *Tnf-α* tijekom prvog mjeseca također se nije statistički značajno razlikovala između skupina (Slika 19D). Nakon 12 mjeseci veće vrijednosti utvrđene su u skupinama HS-M i HS-F u odnosu na CON-M odnosno CON-F ($P < 0,05$; Slika 19E), dok se LC-M, LC-HS-M, LC-F i LC-HS-F nisu značajno razlikovale od svojih kontrola. Nakon 24 mjeseca veća ekspresija *Tnf-α* zabilježena je u obje skupine koje su primale saharozu u mužjaka, HS-M i LC-HS-M ($P < 0,05$), te u ženki u skupinama HS-F ($P < 0,01$) i LC-HS-F ($P < 0,05$) u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine (Slika 19F). U skupinama LC-M i LC-F bez dodatka saharoze nisu utvrđene statistički značajne razlike.



Slika 19. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na relativnu ekspresiju gena povezanih s upalnim odgovorom u jetri. Prikazana je relativna ekspresija gena *Tgf-β* nakon 1. (A), 12. (B) i 24. mjeseca (C) te gena *Tnf-α* nakon 1. (D), 12. (E) i 24. mjeseca (F) hranidbenog tretmana. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ u odnosu na kontrolnu skupinu.

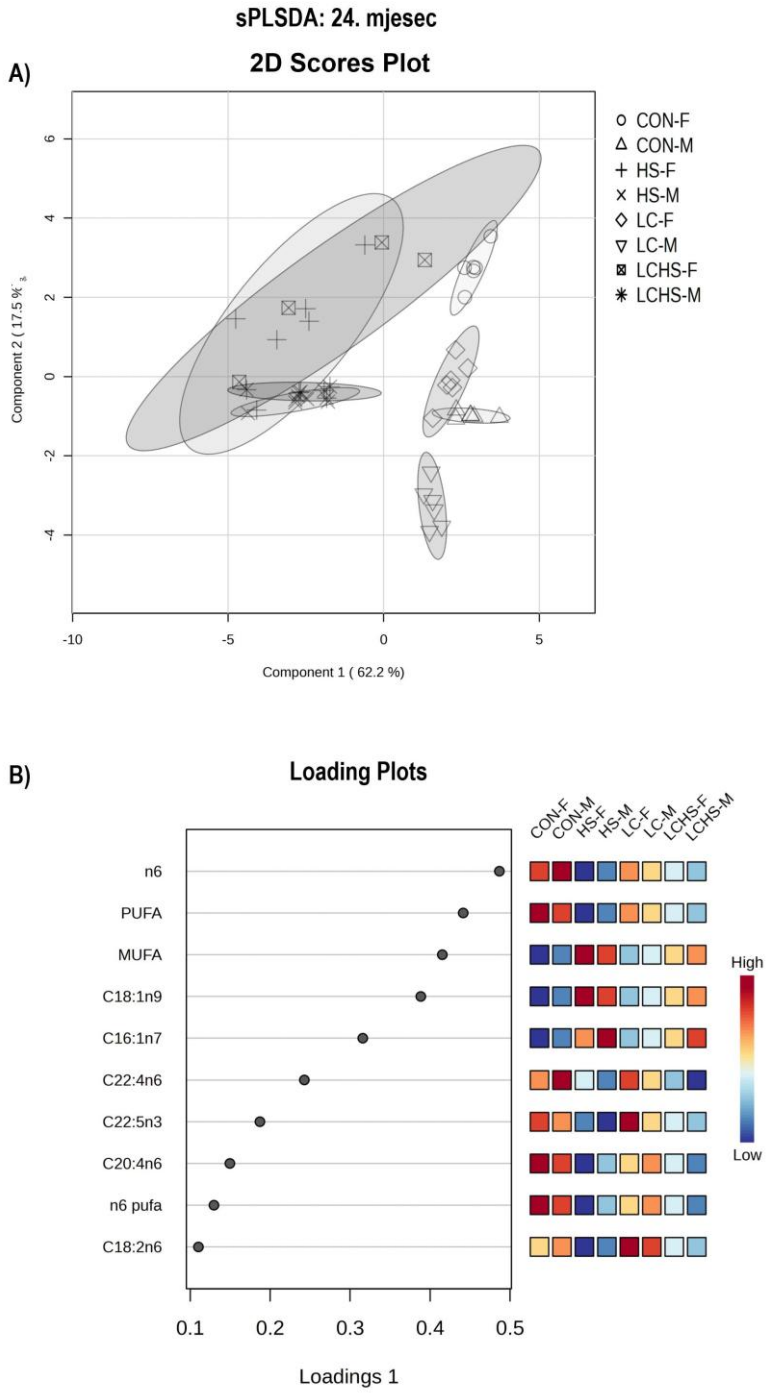
5.5. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na multivarijantni obrazac masnokiselinskog profila jetre

U sPLS-DA analizu masnokiselinskog profila jetre nakon 24 mjeseca hranidbenog tretmana uključene su varijable n6, ukupni PUFA, MUFA i n-6 PUFA te pojedinačne masne kiseline C18:1n-9, C16:1n-7, C22:4n-6, C22:5n-3, C20:4n-6 i C18:2n-6. Prva komponenta objašnjavala je 62,2 %, a druga 17,5 % varijabilnosti podataka, što zajedno čini 79,7 % ukupne varijabilnosti prikazane u dvodimenzionalnom modelu (Slika 20A). Pri interpretaciji modela važno je razlikovati varijable „n6" i „n6 PUFA": n6 predstavlja ukupni zbroj analiziranih n-6 masnih kiselina, uključujući linolnu kiselinu (C18:2n-6), dok n6 PUFA predstavlja ukupnu skupinu analiziranih n-6 višestruko nezasićenih masnih kiselina.

Na prikazu rezultata vidljivo je da se skupine nisu rasporedile nasumično, nego su se formirali obrasci povezani s hranidbenim tretmanom. Skupine HS i LC-HS, odnosno skupine koje su tijekom istraživanja primale saharozu, odvajale su se od skupina CON i LC ponajprije duž prve komponente. Unutar tih većih skupina uočljivo je dodatno razdvajanje pojedinih muških i ženskih skupina duž druge komponente, što upućuje na razlike u ukupnom masnokiselinskom profilu povezane sa spolom (Slika 20A). Pri tome je razdvajanje prema hranidbenom tretmanu bilo izraženije od razdvajanja prema spolu.

Analiza opterećenja pokazala je koje su varijable najviše pridonijele razdvajanju skupina. Najveći doprinos imala je varijabla n6, a zatim ukupni PUFA i MUFA te oleinska (C18:1n-9) i palmitoleinska kiselina (C16:1n-7) (Slika 20B). Manji, ali i dalje vidljiv doprinos imali su C22:4n-6, C22:5n-3, C20:4n-6, ukupni n-6 PUFA i C18:2n-6. To znači da razdvajanje skupina nije bilo određeno jednom pojedinačnom masnom kiselinom, nego kombinacijom promjena u zbirnim masnokiselinskim varijablama, njihovim ukupnim udjelima i udjelima pojedinačnih masnih kiselina.

Toplinska mapa dodatno prikazuje smjer tih razlika. Skupine HS i LC-HS obilježavale su veće relativne vrijednosti ukupnih MUFA te oleinske i palmitoleinske kiseline, dok su u skupinama CON i LC relativno više bile zastupljene ukupne PUFA, n-6 PUFA i n6. Sličan obrazac uočen je za linolnu (C18:2n-6), arahidonsku (C20:4n-6) i dokozatetraensku kiselinu (C22:4n-6), čije su relativne vrijednosti bile više u kontrolnim i LC skupinama. Dokozapentaenska kiselina n-3 (C22:5n-3) bila je relativno manje zastupljena u većem dijelu skupina koje su primale saharozu (Slika 20B).



Slika 20. Utjecaj spola i hranidbenih tretmana na multivarijantni obrazac masnokiselinskog profila jetre nakon 24 mjeseca istraživanja. (A) Dvodimenzionalni prikaz sPLS-DA analize masnokiselinskog profila jetre. Prva komponenta objašnjava 62,2 %, a druga 17,5 % varijabilnosti podataka. (B) Prikaz opterećenja pojedinih masnokiselinskih varijabli i njihovih relativnih vrijednosti u pojedinim eksperimentalnim skupinama.

Napomena: „n6" označava ukupni zbroj svih analiziranih n-6 masnih kiselina, dok „n6 PUFA" označava zbroj analiziranih dugolančanih n-6 PUFA s ≥ C20 ugljikovih atoma.

6. RASPRAVA

Pokazatelji kroničnog metaboličkog sindroma

Promjene tjelesne mase tijekom ovog istraživanja nisu slijedile jednak obrazac u svim hranidbenim skupinama, što pokazuje da dugotrajni metabolički odgovor nije bio određen samo prisutnošću saharoze nego i energetskom vrijednošću osnovne hrane. Najizraženiji porast tjelesne mase utvrđen je u HS skupini, dok je u životinja hranjenih hranom smanjene energetske vrijednosti porast bio manje izražen. Takav rezultat očekivan je s obzirom na to da dugotrajan dodatni unos saharoze povećava ukupno energetsko opterećenje, dok smanjena energetska gustoća hrane i veći udio vlakana mogu ograničiti raspoloživu energiju i pridonijeti boljoj kontroli tjelesne mase. Učinak prehrambenih vlakana pritom se ne svodi samo na smanjenje energetske gustoće obroka, nego uključuje i utjecaj na sitost, brzinu apsorpcije hranjivih tvari i postprandijalni metabolički odgovor (ANDERSON i sur., 2009; DEEHAN i sur., 2024).

Učinak hranidbenog tretmana na tjelesnu masu razlikovao se i između mužjaka i ženki. U mužjaka HS skupine povećanje tjelesne mase pojavilo se ranije, dok je u ženki postalo izraženo tek nakon duljeg trajanja pokusa. Takav vremenski pomak može se povezati s poznatim spolnim razlikama u regulaciji energetskog metabolizma, raspodjeli masnog tkiva i djelovanju spolnih hormona. Estrogeni povoljno djeluju na inzulinsku osjetljivost i raspodjelu masnog tkiva te mogu odgoditi pojavu pojedinih metaboličkih posljedica energetskog suficita (JENSEN, 1995; CHERUBINI i sur., 2024). Rezultati stoga upućuju na to da je spol utjecao prije svega na dinamiku odgovora na hranidbeno opterećenje, dok se nakon vrlo dugog trajanja pokusa ta prednost u pojedinim pokazateljima smanjivala.

Tjelesna masa sama po sebi nije dobro odražavala stupanj metaboličkog poremećaja. To je osobito vidljivo iz odnosa LC i LC-HS skupina. U LC skupinama smanjena energetska vrijednost hrane bila je povezana s povoljnijim obrascem tjelesne mase i bez razvoja izraženog poremećaja inzulinske osjetljivosti, što upućuje na preventivni učinak takvog hranidbenog režima. U prisutnosti saharoze taj učinak nije bio potpun. LC-HS skupine pokazuju da smanjena energetska vrijednost hrane može ublažiti pojedine metaboličke posljedice kroničnog hranidbenog opterećenja, ali ne može u cijelosti spriječiti njihov razvoj. Slična nepodudarnost između tjelesne mase i metaboličkih poremećaja opisana je i u eksperimentalnim modelima dugotrajnog unosa saharoze ili fruktoze (KAWASAKI i sur., 2005; CARVALHO i sur., 2012; MILJAK i sur., 2015; MAŠEK i sur., 2017).

Promjene koncentracije glukoze dodatno podupiru takvo tumačenje. U LC skupinama bez saharoze koncentracija glukoze ostala je usporediva s kontrolnim skupinama, dok se u LC-HS skupinama nakon dugotrajnog tretmana povećala unatoč smanjenoj energetskoj vrijednosti osnovne hrane. To pokazuje da dugotrajno saharozno opterećenje može nadjačati dio preventivnog učinka LC prehrane na regulaciju glukoze. Kronično povećana dostupnost jednostavnih ugljikohidrata povećava zahtjeve za inzulinskim odgovorom i može postupno smanjiti osjetljivost perifernih tkiva na inzulin, a dugotrajan unos saharoze u štakora već je povezan s razvojem intolerancije glukoze i inzulinske rezistencije (KAWASAKI i sur., 2005; SAMPEY i sur., 2011; FAHED i sur., 2022).

Takvo tumačenje dodatno podupiru vrijednosti HOMA-IR i QUICKI nakon 24 mjeseca. U HS i LC-HS skupinama oba spola povećanje HOMA-IR bilo je praćeno smanjenjem QUICKI, dok u LC skupinama bez saharoze takav obrazac nije utvrđen. Budući da HOMA-IR procjenjuje inzulinsku rezistenciju, a QUICKI inzulinsku osjetljivost, njihova istodobna promjena u suprotnim smjerovima daje dosljednu procjenu pogoršane inzulinske osjetljivosti (MATTHEWS i sur., 1985; KATZ i sur., 2000). Važnost ovog nalaza nije samo u promjeni pojedinačnih indeksa, nego u tome što oba upućuju na isti metabolički zaključak - nakon dugotrajnog saharoznog opterećenja razvila se inzulinska rezistencija.

Pritom je osobito informativna usporedba HS i LC-HS skupina. Nakon 24 mjeseca HOMA-IR i QUICKI u LC-HS skupinama slijedili su obrazac HS skupine, što pokazuje da smanjena energetska vrijednost hrane s povećanim udjelom vlakana nije mogla u potpunosti spriječiti razvoj poremećaja inzulinske osjetljivosti izazvanog dugotrajnim unosom saharoze. Ipak, povoljniji obrazac tjelesne mase i pojedinih metaboličkih pokazatelja upućuje na to da je takav hranidbeni režim i u prisutnosti saharoze zadržao povoljan metabolički učinak, iako nedostatan za potpunu zaštitu. Drugim riječima, LC prehrana bez HS pokazuje preventivni učinak, dok u uvjetima istodobnog saharoznog opterećenja ublažava dio metaboličkih posljedica, ali ne sprječava razvoj inzulinske rezistencije nakon dugotrajnog tretmana.

Spolne razlike nisu se jednako očitovale u svim pokazateljima. Dok se povećanje tjelesne mase u mužjaka pojavilo ranije, nakon 24 mjeseca povećanje HOMA-IR i smanjenje QUICKI bilo je prisutno u oba spola u skupinama izloženima saharozi. To upućuje na to da je ženski spol mogao odgoditi pojavu pojedinih metaboličkih promjena, ali nije osigurao potpunu zaštitu od razvoja inzulinske rezistencije tijekom vrlo dugotrajnog metaboličkog opterećenja. Takav obrazac u skladu je sa spolno različitom metaboličkom prilagodbom, čiji učinak ovisi o trajanju i intenzitetu hranidbenog opterećenja (CHERUBINI i sur., 2024).

Učinak hranidbenog tretmana i spola na lipogenezu i metabolizam masnih kiselina

Promjene masnokiselinskog sastava predstavljaju središnji dio procjene lipogeneze u ovom istraživanju. Njihovo značenje nije u promjeni pojedine masne kiseline izolirano, nego u obrascu koji se razvijao između SFA, MUFA i PUFA te u njegovoj povezanosti s ekspresijom *Scd1*, *Fads1* i *Fads2*. U skupinama izloženima saharozi nakon duljeg trajanja tretmana prevladavao je veći udio MUFA uz niže udjele više n-3 i n-6 PUFA, dok su promjene pojedinih SFA bile manje ujednačene. Takav obrazac upućuje na preusmjeravanje metabolizma masnih kiselina, a ne na jednostavnu promjenu ukupne količine jedne skupine masnih kiselina.

Promjene metabolizma zasićenih i jednostruko nezasićenih masnih kiselina

Palmitinska i stearinska kiselina neposredno su povezane s nastankom palmitoleinske i oleinske kiseline djelovanjem SCD1. Zato je porast C16:1n-7 i C18:1n-9 u skupinama izloženima saharozi važniji kada se promatra zajedno s promjenama C16:0, C18:0 i *Scd1* nego kada se svaka masna kiselina gleda zasebno. SCD1 određuje odnos između zasićenih i jednostruko nezasićenih masnih kiselina i time utječe na raspoloživost supstrata za stvaranje složenih lipida (NTAMBI i MIYAZAKI, 2004; NAKAMURA i NARA, 2004). Veći udjeli palmitoleinske i oleinske kiseline u kasnijim fazama pokusa stoga upućuju na jače usmjeravanje masnih kiselina prema MUFA tijekom kroničnog metaboličkog opterećenja.

Istodobno niži udio C18:0 u dijelu skupina izloženih saharozi dodatno podupire takav obrazac jer je stearinska kiselina neposredni supstrat za sintezu oleinske kiseline. Međutim, promjena C18:0 ne može se objasniti samo njegovom desaturacijom jer na masnokiselinski sastav utječu i elongacija, oksidacija, prehrambeni unos i raspodjela među lipidnim frakcijama. Zbog toga je važan zajednički smjer više pokazatelja, a ne odnos samo jednog supstrata i produkta. Upravo se takav pomak prema većoj zastupljenosti MUFA opisuje u modelima metaboličkog sindroma izazvanog jednostavnim ugljikohidratima (EL HAFIDI i sur., 2001; MILJAK i sur., 2015; MAŠEK i sur., 2020).

Ekspresija *Scd1* daje molekularnu potporu tom obrascu. U ranijoj fazi pokusa promjene *Scd1* i MUFA nisu bile potpuno podudarne, dok su nakon 24 mjeseca povećana ekspresija *Scd1* i veći udjeli C16:1n-7 i C18:1n-9 bili prisutni u skupinama izloženima saharozi. To pokazuje da se lipogeni odgovor tijekom vremena stabilizirao prema većoj zastupljenosti proizvoda SCD1. Važnost SCD1 u poremećajima energetske i lipidne homeostaze, pretilosti i inzulinskoj rezistenciji dobro je opisana (SUN i sur., 2024). Nalaz ovog istraživanja zato upućuje na to da

je kronično saharozno opterećenje postupno preoblikovalo lipogenezu u smjeru većeg stvaranja i/ili zadržavanja MUFA.

Promjene palmitinske kiseline dodatno su važne jer je C16:0 glavni proizvod *de novo* sinteze masnih kiselina i prekursor za daljnju elongaciju i desaturaciju (ALVES-BEZERRA i COHEN, 2018; PAIVA i sur., 2021). U ovom istraživanju udio C16:0 nije se mijenjao jednako u svim skupinama, što je razumljivo jer se palmitinska kiselina istodobno može dalje elongirati u C18:0, desaturirati u C16:1n-7 ili oksidirati. Zbog toga pojačana lipogeneza ne mora nužno biti praćena većim udjelom C16:0. Važniji je ukupni obrazac promjena, odnosno veći udio MUFA i povećana ekspresija *Scd1* u skupinama izloženima saharozi, što upućuje na pojačano usmjeravanje novonastalih zasićenih masnih kiselina prema njihovim jednostruko nezasićenim derivatima.

Povećan unos jednostavnih ugljikohidrata povezan je s većim udjelom MUFA, inzulinskom rezistencijom i lipidnom peroksidacijom. Iako je u tom istraživanju analizirano drugo tkivo i primijenjen kraći eksperimentalni model, smjer promjena podupire tumačenje da povećanje palmitoleinske i oleinske kiseline nije izoliran nalaz, nego dio šire metaboličke prilagodbe na kronično ugljikohidratno opterećenje (ROŠKARIĆ i sur., 2021). U ovom radu dodatnu vrijednost daje činjenica da su se promjene pratile tijekom 24 mjeseca, pa je vidljivo da lipogeni odgovor postaje jasniji s produljenjem hranidbenog tretmana.

Promjene metabolizma dugolančanih n-3 i n-6 PUFA

Za razliku od MUFA, veći broj n-3 i n-6 PUFA nakon 12 i 24 mjeseca pokazivao je niže udjele, osobito u skupinama izloženima saharozi. Taj nalaz ne upućuje na jednostavnu inhibiciju jednog enzima, nego na promjenu cijelog puta biokonverzije dugolančanih PUFA. n-3 i n-6 masne kiseline koriste zajedničke desaturaze i elongaze, pa njihov konačni udio ovisi o dostupnosti prekursora, konkurenciji za enzime i metaboličkom stanju organizma (CHO i sur., 1999a, 1999b; NAKAMURA i NARA, 2004). Zbog toga se promjene *Fads1* i *Fads2* moraju tumačiti zajedno s promjenama njihovih supstrata i produkata.

U n-6 putu niži udjeli linolne i arahidonske kiseline, uz promjenjiv odgovor DGLA, pokazuju da protok kroz taj metabolički put nije bio jednak tijekom cijelog pokusa. DGLA je međuprodukt čiji udio ovisi i o njegovu stvaranju i o daljnjoj pretvorbi u arahidonsku kiselinu djelovanjem Δ5-desaturaze. Zato kombinacija višeg DGLA i nižeg C20:4n-6 u pojedinim skupinama može odražavati promijenjen odnos između uzastopnih koraka biokonverzije, a ne samo promjenu ukupne dostupnosti n-6 PUFA (CHO i sur., 1999a; FAN i sur., 2012).

Ekspresija *Fads1* i *Fads2* dodatno pokazuje da odgovor desaturacijskog sustava nije bio stalan. Smjer promjena razlikovao se između 12. i 24. mjeseca, što upućuje na prilagodbu desaturacijskih putova tijekom kroničnog metaboličkog opterećenja. Regulacija desaturaza ovisi o hormonalnom i nutritivnom okruženju, a u inzulinskoj rezistenciji može se mijenjati ovisno o stupnju metaboličkog poremećaja (BRENNER, 2003; WANG i sur., 2006). Rezultati stoga ne govore o trajno pojačanoj ili trajno smanjenoj desaturaciji, nego o vremenski promjenjivoj regulaciji koja prati razvoj kroničnog metaboličkog sindroma.

Takvo tumačenje podupiru rezultati GHOORAY i sur. (2024), koji su pokazali da promjena ekspresije *Fads1* može mijenjati odnos DGLA i arahidonske kiseline te dio metaboličkog fenotipa u štakora hranjenih zapadnjačkim tipom prehrane. Važnost tog nalaza za ovo istraživanje jest u tome što pokazuje da značenje FADS1 ovisi o prehrambenom i metaboličkom kontekstu. Zato različiti smjerovi promjene *Fads1* između vremenskih točaka ne predstavljaju proturječnost, nego mogu odražavati različite faze prilagodbe na dugotrajni hranidbeni tretman.

U n-3 skupini posebno se izdvajao C22:5n-3 nakon 24 mjeseca. U LC skupinama njegov je obrazac bio povoljniji nego u skupinama izloženima saharozi, a u ženki LC skupine udio je bio i viši od kontrolne vrijednosti. To upućuje na to da su smanjena energetska vrijednost hrane i spol mogli pridonijeti boljem očuvanju dugolančanih n-3 PUFA tijekom starenja i kroničnog metaboličkog opterećenja. Poznate spolne razlike u metabolizmu dugolančanih n-3 PUFA i hormonska regulacija desaturaza pružaju biološku osnovu za takav obrazac (BURDGE i sur., 2008; ALLESSANDRI i sur., 2011; CHILDS, 2020).

DHA je pokazala drukčiji odgovor jer su njezini udjeli nakon duljeg tretmana bili niži u većem broju pokusnih skupina. Biosinteza DHA uključuje više koraka elongacije i desaturacije te završnu peroksisomsku β-oksidaciju, pa njezina promjena odražava širi metabolički odgovor od same ekspresije *Fads1* ili *Fads2* (SPRECHER, 2000; FERDINANDUSSE i sur., 2001). Niži udio DHA zato se može tumačiti kao posljedica promijenjene ravnoteže više procesa koji određuju stvaranje, ugradnju i potrošnju dugolančanih n-3 PUFA tijekom kroničnog metaboličkog sindroma.

Multivarijantna analiza nakon 24 mjeseca objedinjuje te pojedinačne nalaze. Razdvajanju skupina najviše su pridonosili n6, ukupni PUFA i MUFA te palmitoleinska i oleinska kiselina, uz dodatni doprinos n-6 PUFA. To pokazuje da osnovna razlika među hranidbenim skupinama nije bila vezana uz jednu masnu kiselinu, nego uz odnos lipogenog MUFA obrasca i očuvanja PUFA. Skupine izložene saharozi bile su pomaknute prema većoj

zastupljenosti MUFA, dok su CON i LC skupine bile povezane s većim udjelom više PUFA. Takav ukupni profil izravno podupire zaključak da su razina energije u hrani, saharozno opterećenje i spol oblikovali metabolizam masnih kiselina tijekom kroničnog metaboličkog sindroma. Istodobni doprinos varijabli n6 i n-6 PUFA pokazuje da razdvajanje skupina nije bilo povezano samo s promjenom pojedine masne kiseline, nego sa širim preoblikovanjem n-6 masnokiselinskog profila. Varijabla n6 odražava ukupnu zastupljenost analiziranih n-6 masnih kiselina, uključujući linolnu kiselinu, dok n-6 PUFA opisuje ukupnu zastupljenost analiziranih n-6 višestruko nezasićenih masnih kiselina.

Oksidacijski stres i upalni odgovor tijekom kroničnog metaboličkog sindroma

Porast MDA u kasnijim fazama pokusa pokazuje da se s trajanjem metaboličkog opterećenja povećavala lipidna peroksidacija. U prvom mjesecu takav odgovor nije bio izražen, nakon 12 mjeseci pojavio se u HS skupinama, a nakon 24 mjeseca bio je prisutan i u HS i u LC-HS skupinama. To upućuje na to da oksidacijsko opterećenje nije neposredna posljedica početka hranidbenog tretmana, nego se razvija nakon dugotrajnog narušavanja metaboličke homeostaze. MDA je završni produkt peroksidacije lipida i često se koristi kao pokazatelj oksidacijskog oštećenja (ANDREYEV i sur., 2005; REIS i sur., 2012; MATSUDA i sur., 2013).

Istodobno smanjenje udjela više PUFA daje tom nalazu dodatno metaboličko značenje. PUFA su zbog većeg broja dvostrukih veza osjetljivije na oksidacijsko oštećenje, pa povećana lipidna peroksidacija može pridonijeti promjenama njihova masnokiselinskog profila (HULBERT, 2003; AYALA i sur., 2014). Ipak, niži udjeli PUFA u ovom modelu vjerojatno odražavaju zajednički učinak promijenjene biokonverzije i oksidacijskog opterećenja. Zato MDA i masnokiselinski sastav zajedno upućuju na međusobno povezivanje poremećenog lipidnog metabolizma i oksidacijskog stresa tijekom kroničnog metaboličkog sindroma.

Ekspresija *Nfe2l2* pokazala je drukčiji vremenski tijek od MDA. Nakon 12 mjeseci povećana ekspresija u skupinama izloženima saharozi može se tumačiti kao kompenzacijski odgovor na rastuće oksidacijsko opterećenje. Nakon 24 mjeseca MDA je ostao povišen, dok je *Nfe2l2* u više skupina bio niži. NRF2 je ključni regulator transkripcijskog antioksidacijskog odgovora, a njegova aktivacija predstavlja važan mehanizam prilagodbe na oksidacijski stres (TONELLI i sur., 2018). Promjena odnosa *Nfe2l2* i MDA tijekom vremena zato upućuje na to da se kapacitet prilagodbe oksidacijskom opterećenju mijenja tijekom dugotrajnog metaboličkog poremećaja.

Povećanje *Tnf-α* u kasnijim fazama pokusa pokazuje da se oksidacijskoj komponenti metaboličkog sindroma pridružio i upalni odgovor. TNF-α je važan medijator kronične upale niskog stupnja i može pridonijeti smanjenju inzulinske osjetljivosti (HOTAMISLIGIL i sur., 1994). U ovom istraživanju njegova povećana ekspresija pojavila se nakon duljeg metaboličkog opterećenja, što je u skladu s postupnim prelaskom od metaboličke prilagodbe prema kroničnom upalnom stanju.

Promjene *Tgf-β* upućuju na uključivanje dodatnih signalnih putova povezanih s kroničnim oštećenjem i remodeliranjem tkiva. TGF-β sudjeluje u regulaciji profibrotičnih procesa i povezuje metaboličko i upalno opterećenje s odgovorima koji mogu prethoditi strukturnim promjenama tkiva (PAWLAK i sur., 2015). U ovom radu povećana ekspresija *Tgf-β* u skupinama izloženima saharozi stoga pokazuje da vrlo dugotrajno metaboličko opterećenje ne zahvaća samo regulaciju glukoze i lipida nego aktivira i putove povezane s kroničnim tkivnim odgovorom.

Povezanost promijenjenog masnokiselinskog sastava, lipidne peroksidacije i upalnih pokazatelja podupiru i rezultati ROŠKARIĆ i sur. (2021). U njihovom modelu fruktoza je bila povezana s promjenama masnih kiselina, lipidnom peroksidacijom i upalnim odgovorom, dok je povoljniji sastav prehrambenih masnih kiselina ublažio dio tih promjena. U ovom istraživanju sličan odnos postaje osobito vidljiv nakon 24 mjeseca, što pokazuje da oksidacijski i upalni odgovor predstavljaju kasniju komponentu kroničnog metaboličkog opterećenja.

Učinak hrane smanjene energetske vrijednosti s povećanim udjelom vlakana

Rezultati LC skupina pokazuju da je hrana smanjene energetske vrijednosti s povećanim udjelom vlakana imala preventivni učinak na više sastavnica metaboličkog poremećaja. Taj se učinak najjasnije vidi u povoljnijoj tjelesnoj masi, očuvanoj inzulinskoj osjetljivosti te u dijelu masnokiselinskog, oksidacijskog i upalnog odgovora. Učinak takve prehrane može se povezati sa smanjenom energetskom gustoćom, većom sitošću i sporijom apsorpcijom hranjivih tvari, ali i s djelovanjem vlakana preko crijevne mikrobiote i kratkolančanih masnih kiselina (CANI i sur., 2006; DEN BESTEN i sur., 2013; DE VADDER i sur., 2014; DEN BESTEN i sur., 2015; CRONIN i sur., 2021; DEEHAN i sur., 2024).

Važnije od samog učinka LC prehrane bez saharoze jest pitanje zadržava li takav hranidbeni režim povoljan učinak kada je metaboličko opterećenje već prisutno. Rezultati LC-HS skupina pokazuju da taj učinak postoji, ali nije potpun. Pojedini pokazatelji bili su povoljniji nego u HS skupinama, no nakon 24 mjeseca LC-HS životinje ipak su razvile poremećaj glukoze

i inzulinske osjetljivosti te oksidacijski odgovor. To znači da smanjena energetska vrijednost hrane nije mogla u cijelosti kompenzirati dugotrajni dodatni unos saharoze, ali je modificirala intenzitet dijela odgovora.

Na razini lipogeneze isti se odnos vidi kroz MUFA i *Scd1*. LC skupine bez saharoze nisu pokazivale izražen lipogeni obrazac karakterističan za skupine izložene saharozi, dok je u LC-HS skupinama taj obrazac bio prisutan, ali se u pojedinim pokazateljima razlikovao od HS skupina. To upućuje na to da energetska vrijednost osnovne hrane može mijenjati lipogeni odgovor čak i kada saharozno opterećenje ostaje prisutno. Takvo djelovanje važno je za naslov ovog rada jer pokazuje da razina energije u hrani ne utječe samo na tjelesnu masu nego i na regulaciju metabolizma masnih kiselina.

Učinak na PUFA bio je manje jednoznačan. LC prehrana nije u svim skupinama održala ukupne n-3 i n-6 PUFA na kontrolnim vrijednostima, ali je nakon 24 mjeseca C22:5n-3 pokazivao povoljniji obrazac, osobito u ženki. To pokazuje da preventivni učinak LC prehrane nije jednak za sve dijelove masnokiselinskog metabolizma. Vjerojatnije je da smanjena energetska vrijednost hrane i veći udio vlakana mijenjaju ukupno metaboličko okruženje, a pojedini metabolički putovi na tu promjenu odgovaraju različitim intenzitetom.

U cjelini, LC prehranu treba razlikovati prema uvjetima u kojima je primijenjena. Bez dodatnog saharoznog opterećenja njezin učinak može se opisati kao preventivan, jer je spriječila ili odgodila razvoj više obilježja metaboličkog sindroma. U prisutnosti HS pokazala je povoljan metabolički učinak, ali ne potpunu zaštitu. Takva razlika omogućuje preciznije tumačenje hranidbenog učinka: smanjena energetska vrijednost hrane s povećanim udjelom vlakana može ublažiti posljedice metaboličkog opterećenja, ali njezin učinak ovisi o trajanju i intenzitetu tog opterećenja.

Spol i metabolički odgovor tijekom kroničnog metaboličkog sindroma

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da spol nije djelovao jednako na sve sastavnice metaboličkog odgovora. Najjasnije se razlikovao vremenski tijek pojedinih promjena: u mužjaka su se neke nepovoljne promjene, osobito porast tjelesne mase, pojavile ranije, dok su ženke u ranijim fazama pokazivale povoljniji obrazac. Takav odgovor može se povezati s djelovanjem estrogena na raspodjelu masnog tkiva, inzulinsku osjetljivost i metabolizam lipida (JENSEN, 1995; KITSON i sur., 2013; CHERUBINI i sur., 2024).

Međutim, nakon 24 mjeseca poremećaj inzulinske osjetljivosti bio je prisutan i u ženki izloženih saharozi. To pokazuje da povoljniji odgovor ženskog spola nije predstavljao potpunu

zaštitu, nego prije odgodu razvoja pojedinih metaboličkih promjena. Važnost trajanja pokusa upravo je u tome što omogućuje razlikovanje privremene spolne prednosti od trajne otpornosti na metaboličko opterećenje. U ovom modelu vrlo dugotrajna izloženost smanjila je dio ranije vidljivih razlika između spolova.

Spol je bio posebno važan u metabolizmu dugolančanih PUFA. Poznato je da ženke imaju veću sposobnost biosinteze i očuvanja pojedinih n-3 PUFA, što se povezuje s hormonskom regulacijom desaturaza i elongaza (BURDGE i sur., 2008; ALLESSANDRI i sur., 2011; CHILDS, 2020). Rezultati C22:5n-3 i promjene *Fads1* i *Fads2* u ovom istraživanju uklapaju se u takav koncept, ali istodobno pokazuju da se odgovor mijenja s hranidbenim tretmanom i vremenom. Spol stoga nije djelovao kao stalni čimbenik istog smjera, nego je mijenjao način na koji se metabolizam masnih kiselina prilagođavao kroničnom opterećenju.

Slično vrijedi i za *Scd1* i MUFA. Promjene nisu imale potpuno jednak vremenski obrazac u mužjaka i ženki, ali su se nakon 24 mjeseca u skupinama izloženima saharozi približile istom lipogenom smjeru. To upućuje na to da spol može modulirati ranu i srednju fazu lipogenog odgovora, dok vrlo dugotrajno metaboličko opterećenje postupno smanjuje dio tih razlika. Takvo tumačenje odgovara nalazima da se spolne razlike u metabolizmu lipida mijenjaju ovisno o hormonalnom statusu i metaboličkom kontekstu (CHERUBINI i sur., 2024).

Ni oksidacijski i upalni odgovor nakon 24 mjeseca nije ostao ograničen na mužjake. Povećani MDA te promjene *Nfe2l2*, *Tnf-α* i *Tgf-β* bile su prisutne i u ženki izloženih saharozi. To dodatno pokazuje da zaštitni učinak ženskog spola u ovom modelu nije apsolutan. Njegovo se značenje prije vidi u sporijem razvoju dijela metaboličkih promjena i drukčijoj regulaciji lipogeneze i PUFA nego u potpunom sprječavanju kroničnog metaboličkog sindroma.

Promatrajući rezultate u cjelini, spol i razina energije u hrani mijenjali su način na koji se tijekom 24 mjeseca razvijala lipogeneza i druge sastavnice kroničnog metaboličkog sindroma. LC prehrana bez saharoze pokazala je preventivni učinak, dok je u prisutnosti saharoze zadržala povoljan metabolički učinak, ali ne i potpunu zaštitu. Ženski spol bio je povezan s kasnijom pojavom dijela metaboličkih promjena i drukčijim obrascem metabolizma masnih kiselina, no ta se prednost smanjivala s trajanjem metaboličkog opterećenja. Takav ukupni obrazac podupire postavljenu hipotezu i pokazuje da učinak spola i razine energije u hrani ovisi o promatranom metaboličkom putu i trajanju izloženosti.

7. ZAKLJUČCI

Iz rezultata ovog istraživanja, kojim su ispitani učinci dugotrajnog unosa saharoze, hrane smanjene energetske vrijednosti s povećanim udjelom vlakana te spola na razvoj i progresiju metaboličkog sindroma u štakora, može se zaključiti sljedeće:

1. Dugotrajni unos 30 % saharoze doveo je do razvoja kroničnog metaboličkog sindroma, što se očitovalo povišenom koncentracijom glukoze, povećanim vrijednostima HOMA-IR i smanjenim vrijednostima QUICKI.
2. Saharozom inducirani metabolički sindrom doveo je do pojačane lipogeneze i promijenjenog metabolizma masnih kiselina, što se očitovalo povećanom ekspresijom *Scd1* i većim udjelom palmitoleinske (C16:1n-7) i oleinske kiseline (C18:1n-9) te promjenama ekspresije *Fads1* i *Fads2* uz smanjen udio linolne (C18:2n-6), arahidonske (C20:4n-6) i dokozatetraenske kiseline (C22:4n-6) te dokozapentaenske (C22:5n-3) i dokozaheksaenske kiseline (C22:6n-3).
3. Kronični metabolički sindrom doveo je do povećane lipidne peroksidacije, promijenjene ekspresije *Nfe2l2* te povećane ekspresije *Tnf-α* i *Tgf-β*, što potvrđuje razvoj oksidacijskog i upalnog odgovora te aktivaciju profibrotičnih signalnih putova.
4. Prehrana smanjene energetske vrijednosti s povećanim udjelom vlakana ublažila je razvoj kroničnog metaboličkog sindroma, što se očitovalo nižom tjelesnom masom, nižom koncentracijom glukoze, nižim vrijednostima HOMA-IR, višim vrijednostima QUICKI, manjom lipidnom peroksidacijom te većim udjelom dokozapentaenske kiseline (C22:5n-3).
5. Ženski spol imao je zaštitnu ulogu u razvoju kroničnog metaboličkog sindroma, što se očitovalo sporijim razvojem pojedinih metaboličkih promjena, povoljnijim udjelom dokozapentaenske kiseline (C22:5n-3) te drukčijim obrascem ekspresije *Scd1*, *Fads1* i *Fads2*.

Dobiveni rezultati podupiru postavljenu hipotezu da prehrana smanjene energetske vrijednosti i ženski spol ublažavaju dio metaboličkih i molekularnih promjena uključenih u razvoj kroničnog metaboličkog sindroma, pri čemu jačina zaštitnog učinka ovisi o trajanju izloženosti i promatranom metaboličkom pokazatelju.

8. LITERATURA

AHMED, S. K., R. A. MOHAMMED (2025): Obesity: Prevalence, causes, consequences, management, preventive strategies and future research directions. Metabolism Open 27, 100375.
DOI: 10.1016/j.metop.2025.100375.

ALBERTI, K. G. M. M., R. H. ECKEL, S. M. GRUNDY, P. Z. ZIMMET, J. I. CLEEMAN, K. A. DONATO, J.-C. FRUCHART, W. P. T. JAMES, C. M. LORIA, S. C. SMITH, JR. (2009): Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement. Circulation 120, 1640-1645.
DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644.

ALLESSANDRI, J. M., A. EXTIER, K. H. AL-GUBORY, B. LANGELIER, C. BAUDRY, C. LEPOUPON, M. LAVIALLE, P. GUESNET (2011): Ovariectomy and 17beta-estradiol alter transcription of lipid metabolism genes and proportions of neo-formed n-3 and n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids differently in brain and liver. J. Nutr. Biochem. 22, 820-827.
DOI: 10.1016/j.jnutbio.2010.07.005.

ALVES-BEZERRA, M., D. E. COHEN (2018): Triglyceride metabolism in the liver. Compr. Physiol. 8, 1-22.
DOI: 10.1002/j.2040-4603.2018.tb00008.x.

ANDERSON, J. W., P. BAIRD, R. H. DAVIS, JR., S. FERRERI, M. KNUDTSON, A. KORAYM, V. WATERS, C. L. WILLIAMS (2009): Health benefits of dietary fiber. Nutr. Rev. 67, 188-205.
DOI: 10.1111/j.1753-4887.2009.00189.x.

ANDREYEV, A. Y., Y. E. KUSHNAREVA, A. A. STARKOV (2005): Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. Biochemistry (Mosc.) 70, 200-214.
DOI: 10.1007/s10541-005-0102-7.

AYALA, A., M. F. MUÑOZ, S. ARGÜELLES (2014): Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxid. Med. Cell. Longev. 2014, 360438.
DOI: 10.1155/2014/360438.

AOUN, M., G. FOURET, F. MICHEL, B. BONAFOS, J. RAMOS, J.-P. CRISTOL, M.-A. CARBONNEAU, C. COUDRAY, C. FEILLET-COUDRAY (2012): Dietary fatty acids

modulate liver mitochondrial cardiolipin content and its fatty acid composition in rats with non alcoholic fatty liver disease. J. Bioenerg. Biomembr. 44, 439-452.
DOI: 10.1007/s10863-012-9448-x.

BARZILAI, N., D. M. HUFFMAN, R. H. MUZUMDAR, A. BARTKE (2012): The critical role of metabolic pathways in aging. Diabetes 61, 1315-1322.
DOI: 10.2337/db11-1300.

BERGMAN, R. N., S. P. KIM, K. J. CATALANO, I. R. HSU, J. D. CHIU, M. KABIR, K. HUCKING, M. ADER (2006): Why visceral fat is bad: mechanisms of the metabolic syndrome. Obesity 14, 16S-19S.
DOI: 10.1038/oby.2006.277.

BRENNER, R. R. (2003): Hormonal modulation of delta6 and delta5 desaturases: case of diabetes. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 68, 151-162.
DOI: 10.1016/S0952-3278(02)00265-X.

BURDGE, G. C., J. L. SLATER-JEFFERIES, R. A. GRANT, W. S. CHUNG, A. L. WEST, K. A. LILLYCROP, M. A. HANSON, P. C. CALDER (2008): Sex, but not maternal protein or folic acid intake, determines the fatty acid composition of liver phospholipids, but not triacylglycerol, in adult rats. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 78, 73-79.
DOI: 10.1016/j.plefa.2007.10.028.

BURDGE, G. C., P. C. CALDER (2005): α-Linolenic acid metabolism in adult humans: the effects of gender and age on conversion to longer-chain polyunsaturated fatty acids. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 107, 426-439.
DOI: 10.1002/ejlt.200501145.

CALDER, P. C. (2013): Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? Br. J. Clin. Pharmacol. 75, 645-662.
DOI: 10.1111/j.1365-2125.2012.04374.x.

CALDER, P. C., R. J. DECKELBAUM (2011): Harmful, harmless or helpful? The n-6 fatty acids debate continues. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 14, 113-114.
DOI: 10.1097/MCO.0b013e328343d895.

CANFORA, E. E., C. M. VAN DER BEEK, J. W. E. JOCKEN, G. GOOSSENS, J. J. HOLST, S. W. M. O. DAMINK, K. LENAERTS, C. H. C. DEJONG, E. E. BLAAK (2017): Colonic infusions of short-chain fatty acid mixtures promote energy metabolism in overweight/obese men: A randomized crossover trial. Sci. Rep. 7, 1-12.
DOI: 10.1038/s41598-017-02546-x.

CANI, P. D., C. KNAUF, M. A. IGLESIAS, D. J. DRUCKER, N. M. DELZENNE, R. BURCELIN (2006): Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor. Diabetes 55, 1484-1490.
DOI: 10.2337/db05-1360.
CARTA, G., M. MURRU, S. BANNI, C. MANDOLI (2017): Palmitic acid: physiological role, metabolism and nutritional implications. Front. Physiol. 8, 902.
DOI: 10.3389/fphys.2017.00902.
CARVALHO, A. A. F., A. C. S. NAKAMUNE, B. G. BIFFE, M. J. Q. LOUZADA (2012): High-sucrose effect on bone structure, hardness and biomechanics in an obesity model using Wistar male rats. J. Morphol. Sci. 29, 32-37.
CHEN, D., D. L. CHAO, L. ROCHA, M. KOLAR, V. A. NGUYEN HUU, M. KRAWCZYK, M. DASYANI, T. WANG, M. JAFARI, M. JABARI, K. D. ROSS, A. SAGHATELIAN, B. A. HAMILTON, K. ZHANG, D. SKOWRONSKA-KRAWCZYK (2020): The lipid elongation enzyme ELOVL2 is a molecular regulator of aging in the retina. Aging Cell 19, e13100.
DOI: 10.1111/acel.13100.
CHERUBINI, A., S. DELLA TORRE, S. PELUSI, L. VALENTI (2024): Sexual dimorphism of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. Trends Mol. Med. 30, 1126-1136.
DOI: 10.1016/j.molmed.2024.05.013.
CHILDS, C. E. (2020): Sex hormones and n-3 fatty acid metabolism. Proceedings of the Nutrition Society Spring Meeting, 1-2 April 2019, University of Abertay, Scotland, Symposium 2: Sex differences in nutrient availability and health, pp. 219-224.
DOI: 10.1017/S0029665119001071.
CHILDS, C. E., A. ROUME-NADAL, G. C. BURDGE, P. C. CALDER (2008): Gender differences in n-3 fatty acid content of tissues. Proc. Nutr. Soc. 67, 19-27.
DOI: 10.1017/S0029665108005983.
CHILDS, C. E., M. ROMEU-NADAL, G. C. BURDGE, et al. (2010): Polyunsaturated fatty acid composition of liver and plasma lipids differs according to sex and dietary fat intake in rats. J. Nutr. 140, 245-250.
DOI: 10.3945/jn.109.115691.
CHO, H. P., M. NAKAMURA, S. D. CLARKE (1999a): Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human delta-5 desaturase. J. Biol. Chem. 274, 37335-37339.

DOI: 10.1074/jbc.274.52.37335.

CHO, H. P., M. T. NAKAMURA, S. D. CLARKE (1999b): Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian Delta-6 desaturase. J. Biol. Chem. 274, 471-477.
DOI: 10.1074/jbc.274.1.471.

CHOI, W., G. H. WOO, T.-H. KWON, J.-H. JEON (2025): Obesity-driven metabolic disorders: The interplay of inflammation and mitochondrial dysfunction. Int. J. Mol. Sci. 26, 9715.
DOI: 10.3390/ijms26199715.

COSTA, D. N., S. SANTOSA, M. D. JENSEN (2025): Sex differences in the metabolism of glucose and fatty acids by adipose tissue and skeletal muscle in humans. Physiol. Rev. 105, 897-934.
DOI: 10.1152/physrev.00008.2024.

CRONIN, P., S. A. JOYCE, P. W. O'TOOLE, E. M. O'CONNOR (2021): Dietary fibre modulates the gut microbiota. Nutrients 13, 1655.
DOI: 10.3390/nu13051655.

DE VADDER, F., P. KOVATCHEVA-DATCHARY, D. GONCALVES, J. VINERA, C. ZITOUN, A. DUCHAMPT, F. BÄCKHED, G. MITHIEUX (2014): Microbiota generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. Cell 156, 84-96.
DOI: 10.1016/j.cell.2013.12.016.

DECSI, T., K. KENNEDY (2011): Sex-specific differences in essential fatty acid metabolism. Am. J. Clin. Nutr. 94, 1914S-1919S.
DOI: 10.3945/ajcn.110.000893.

DEEHAN, E. C., V. MOCANU, K. L. MADSEN (2024): Effects of dietary fibre on metabolic health and obesity. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 21, 301-318.
DOI: 10.1038/s41575-023-00891-z.

DEN BESTEN, G., A. BLEEKER, A. GERDING, K. VAN EUNEN, R. HAVINGA, T. H. VAN DIJK, M. H. OOSTERVEER, J. W. JONKER, A. K. GROEN, D.-J. REIJNGOUD, et al. (2015): Short-chain fatty acids protect against high-fat diet-induced obesity via a PPARgamma-dependent switch from lipogenesis to fat oxidation. Diabetes 64, 2398-2408.
DOI: 10.2337/db14-1213.

DEN BESTEN, G., K. VAN EUN, A. K. GROEN, K. VENEMA, D. J. REIJNGOUD, B. M. BAKKER (2013): The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. J. Lipid Res. 54, 2325-2340.
DOI: 10.1194/jlr.R036012.

DINH, T. K., J. M. BOURRE, G. DURAND (1993): Effect of age and α-linolenic acid deficiency on Δ6 desaturase activity and liver lipids in rats. Lipids 28, 517-523.
DOI: 10.1007/BF02536083.
DOOLEY, S., P. TEN DIJKE (2012): TGF-β in progression of liver disease. Cell Tissue Res. 347, 245-256.
DOI: 10.1007/s00441-011-1246-y.
DYALL, S. C., L. BALAS, N. G. BAZAN, J. T. BRENNA, N. CHIANG, F. DA COSTA SOUZA, J. DALLI, T. DURAND, J. M. GALANO, P. J. LEIN, C. N. SERHAN, A. Y. TAHA (2022): Polyunsaturated fatty acids and fatty acid-derived lipid mediators: Recent advances in the understanding of their biosynthesis, structures, and functions. Prog. Lipid Res. 86, 101165.
DOI: 10.1016/j.plipres.2022.101165.
EL HAFIDI, M., A. CUÉLLAR, J. RAMÍREZ, G. BAÑOS (2001): Effect of sucrose addition to drinking water that induces hypertension in rats on Delta9 and Delta5-desaturase activities in liver microsomes. J. Nutr. Biochem. 12, 396-403.
DOI: 10.1016/S0955-2863(01)00154-1.
FAHED, G., L. AOUN, M. BOU ZERDAN, S. ALLAM, M. BOU ZERDAN, Y. BOUFERRAA, H. I. ASSI (2022): Metabolic syndrome: Updates on pathophysiology and management in 2021. Int. J. Mol. Sci. 22, 786.
DOI: 10.3390/ijms22020786.
FAN, Y. Y., J. M. MONK, T. Y. HOU, E. CALLWAY, L. VINCENT, B. WEEKS, et al. (2012): Characterization of an arachidonic acid-deficient (Fads1 knockout) mouse model. J. Lipid Res. 53, 1287-1295.
DOI: 10.1194/jlr.M024216.
FERDINANDUSSE, S., S. DENIS, P. A. MOOIJER, Z. ZHANG, J. K. REDDY, A. A. SPECTOR, R. J. WANDERS (2001): Identification of peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in biosynthesis of docosahexaenoic acid. J. Lipid Res. 42, 1987-1995.
DOI: 10.1016/S0022-2275(20)31527-3
FRANCESCHI, C., P. GARAGNANI, P. PARINI, C. GIULIANI, A. SANTORO (2018): Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. Nat. Rev. Endocrinol. 14, 576-590.
DOI: 10.1038/s41574-018-0059-4.

GHOORAY, D. T., M. XU, H. SHI, C. J. MCCLAIN, M. SONG (2024): Hepatocyte-specific Fads1 overexpression attenuates Western diet-induced metabolic phenotypes in a rat model. Int. J. Mol. Sci. 25, 4836.
DOI: 10.3390/ijms25094836.

GROTTO, D., L. D. SANTA MARIA, S. BOEIRA, J. VALENTINI, M. F. CHARÃO, A. M. MORO, P. C. NASCIMENTO, V. J. POMBLUM, S. C. GARCIA (2007): Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. J. Pharm. Biomed. Anal. 43, 619-624.
DOI: 10.1016/j.jpba.2006.07.030.

HOTAMISLIGIL, G. S., N. S. SHARGILL, B. M. SPIEGELMAN (1994): Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science 259, 87-91.
DOI: 10.1126/science.7678183.

HULBERT, A. J. (2003): Life, death and membrane bilayers. J. Exp. Biol. 206, 2303-2311.
DOI: 10.1242/jeb.00399.

INOGUCHI, T., P. LI, F. UMEDA, H. Y. YU, M. KAKIMOTO, M. IMAMURA, T. AOKI, T. ETOH, T. HASHIMOTO, M. NARUSE, H. SANO, H. UTSUMI, H. NAWATA (2000): High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. Diabetes 49, 1939-1945.
DOI: 10.2337/diabetes.49.11.1939.

JENSEN, M. D. (1995): Gender differences in regional fatty acid metabolism before and after meal ingestion. J. Clin. Invest. 96, 2297-2303.
DOI: 10.1172/JCI118285.

JUMP, D. B. (2009): Mammalian fatty acid elongases. Methods Mol. Biol. 579, 375-389.
DOI: 10.1007/978-1-60761-322-0_19.

JUMP, D. B., K. A. LYTLE, C. M. DEPNER, S. TRIPATHY (2018): Omega-3 polyunsaturated fatty acids as a treatment strategy for nonalcoholic fatty liver disease. Pharmacol. Ther. 181, 108-125.
DOI: 10.1016/j.pharmthera.2017.07.007.

JUMP, D. B., S. TRIPATHY, C. M. DEPNER (2013): Fatty acid-regulated transcription factors in the liver. Annu. Rev. Nutr. 33, 249-269.
DOI: 10.1146/annurev-nutr-071812-161139.

KATZ, A., S. S. NAMBI, K. MATHER, A. D. BARON, D. A. FOLLMANN, G. SULLIVAN, M. J. QUON (2000): Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. J. Clin. Endocrinol. Metab. 85, 2402-2410.
DOI: 10.1210/jcem.85.7.6661.

KAUR, G., D. CAMERON-SMITH, M. GARG, A. J. SINCLAIR (2011): Docosapentaenoic acid (22:5n-3): a review of its biological effects. Prog. Lipid Res. 50, 28-34.
DOI: 10.1016/j.plipres.2010.07.004.

KAUR, J. (2014): A comprehensive review on metabolic syndrome. Cardiol. Res. Pract. 2014, 943162.
DOI: 10.1155/2014/943162.

KAWASAKI, T., A. KASHIWABARA, T. SAKAI, K. IGARASHI, N. OGATA, H. WATANABE, K. ICHIYANAGI, T. YAMANOUCHI (2005): Long-term sucrose-drinking causes increased body weight and glucose intolerance in normal male rats. Br. J. Nutr. 93, 613-618.
DOI: 10.1079/BJN20051407.

KENNEDY, A. J., K. L. ELLACOTT, V. L. KING, A. H. HASTY (2010): Mouse models of the metabolic syndrome. Dis. Model. Mech. 3, 156-166.
DOI: 10.1242/dmm.003467.

KERCKHOFFS, D. A., G. HORNSTRA, R. P. MENSINK (2003): Cholesterol-lowering effect of β-glucan from oat bran in mildly hypercholesterolemic subjects may decrease when β-glucan is incorporated into bread and cookies. Am. J. Clin. Nutr. 78, 221-227.
DOI: 10.1093/ajcn/78.2.221.

KITSON, A. P., K. A. MARKS, B. SHAW, D. M. MUTCH, K. D. STARK (2013): Treatment of ovariectomized rats with 17β-estradiol increases hepatic delta-6 desaturase expression and docosahexaenoic acid levels in liver and plasma phospholipids. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 89, 81-88.
DOI: 10.1016/j.plefa.2013.05.003.

KOH, A., F. DE VADDER, P. KOVATCHEVA-DATCHARY, F. BÄCKHED (2016): From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. Cell 165, 1332-1345.
DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.041.

KOPP, H. P., C. W. KOPP, A. FESTA, K. KRZYZANOWSKA, S. KRIWANEK, E. MINAR, R. ROKA, G. SCHERNTHANER (2003): Impact of weight loss on inflammatory proteins and their association with the insulin resistance syndrome in morbidly obese patients. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23, 1042-1047.
DOI: 10.1161/01.ATV.0000073313.16135.21.

LAI, M., P. C. CHANDRASEKERA, N. D. BARNARD (2014): You are what you eat, or are you? The challenges of translating high-fat-fed rodents to human obesity and diabetes. Nutr. Diabetes 4, e135.
DOI: 10.1038/nutd.2014.30.

LEE, D. P. S., A. PENG, F. TANIASURI, D. TAN, J. E. KIM (2023): Impact of fiber-fortified food consumption on anthropometric measurements and cardiometabolic outcomes: A systematic review, meta-analyses, and meta-regressions of randomized controlled trials. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 63, 8301-8319.
DOI: 10.1080/10408398.2022.2053658.

LEE, J. M., H. LEE, S. KANG, W. J. PARK (2016): Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation, and biotechnological advances.
DOI: 10.3390/nu8010023.

LÓPEZ-OTÍN, C., M. A. BLASCO, L. PARTRIDGE, M. SERRANO, G. KROEMER (2013): The hallmarks of aging. Cell 153, 1194-1217.
DOI: 10.1016/j.cell.2013.05.039.

MAKKI, K., E. C. DEEHAN, J. WALTER, F. BÄCKHED (2018): The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease. Cell Host Microbe 23, 705-715.
DOI: 10.1016/j.chom.2018.05.012.

MALIK, V. S., B. M. POPKIN, G. A. BRAY, J. P. DESPRÉS, F. B. HU (2010): Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk. Circulation 121, 1356-1364.
DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.876185.

MARKS, K. A., A. P. KITSON, K. D. STARK (2013): Sex differences in liver and plasma saturated and monounsaturated fatty acids are associated with differences in expression of elongase 6 but not stearoyl-CoA desaturase in Sprague-Dawley rats. Genes Nutr. 8, 317-327.
DOI: 10.1007/s12263-012-0325-3.

MAŠEK, T., J. BARIŠIĆ, V. MICEK, K. STARČEVIĆ (2020): Cafeteria diet and high-fructose rodent models of NAFLD differ in metabolism of important PUFA and palmitoleic acid without additional sex influence. Nutrients 12, 3637.
DOI: 10.3390/nu12123637.
MAŠEK, T., K. STARČEVIĆ (2017): Chronic sucrose intake decreases concentrations of n6 fatty acids, but not docosahexaenoic acid in the rat brain phospholipids. Nutr. Res. 35, 235-242.
DOI: 10.1016/j.nutres.2015.01.004.
MAŠEK, T., N. FILIPOVIĆ, A. GALAN, K. STARČEVIĆ (2018): Chronic sucrose intake increases expression of SREBP-1c and inflammatory response genes in rat kidneys. Vet. Arhiv 88, 497-510.
DOI: 10.24099/vet.arhiv.0025.
MAŠEK, T., N. FILIPOVIĆ, A. VUICA, K. STARČEVIĆ (2016): Effects of treatment with sucrose in drinking water on liver histology, lipogenesis and lipogenic gene expression in rats fed high-fiber diet. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 101, 134-143.
DOI: 10.1111/jpn.12564.
MAŠEK, T., N. FILIPOVIĆ, L. FERHATOVIĆ HAMZIĆ, L. PULJAK, K. STARČEVIĆ (2014): Long-term streptozotocin diabetes impairs arachidonic and docosahexaenoic acid metabolism and Δ5 desaturation indices in aged rats. J. Physiol. Biochem. 70, 733-742.
DOI: 10.1007/s13105-014-0345-0.
MASOOD, B., M. MOORTHY (2023): Causes of obesity: a review. Clin. Med. (Lond.) 23, 284-291.
DOI: 10.7861/clinmed.2023-0168.
MATSUDA, M., R. TAMURA, K. KANNO, T. SEGAWA, H. KINOSHITA, O. NISHIMOTO, H. NISHIYAMA, T. KAWAMOTO (2013): Effects of dyslipidemic components of metabolic syndrome, adiponectin levels, and anti-diabetic drugs on malondialdehyde-modified low-density lipoprotein levels in statin-treated diabetes patients with coronary artery disease. Diabetol. Metab. Syndr. 5, 77.
DOI: 10.1186/1758-5996-5-77.
MATTHEWS, D. R., J. P. HOSKER, A. S. RUDENSKI, B. A. NAYLOR, D. F. TREACHER, R. C. TURNER (1985): Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia 28, 412-419.
DOI: 10.1007/BF00280883.

MENNI, C., M. A. JACKSON, T. PALLISTER, C. J. STEVES, T. D. SPECTOR, A. M. VALDES (2017): Gut microbiome diversity and high-fibre intake are related to lower long-term weight gain. Int. J. Obes. 41, 1099-1105.
DOI: 10.1038/ijo.2017.66.

MILJAK, K., T. MAŠEK, K. STARČEVIĆ (2015): Utjecaj dugotrajnog tretmana saharozom u pitkoj vodi na ekspresiju gena Δ desaturaza te koncentraciju masnih kiselina i malondialdehida u jetri štakora. Vet. Stanica 46, 23-34.

MIYAZAKI, M., J. M. NTAMBI (2003): Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 68, 113-121.
DOI: 10.1016/S0952-3278(02)00261-2.

NAKAMURA, A., Y. TERAUCHI (2013): Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD. Int. J. Mol. Sci. 14, 21240-21257.
DOI: 10.3390/ijms141121240.

NAKAMURA, M. T., T. Y. NARA (2004): Structure, function, and dietary regulation of Δ6, Δ5, and Δ9 desaturases. Annu. Rev. Nutr. 24, 345-376.
DOI: 10.1146/annurev.nutr.24.121803.063211.

NTAMBI, J. M., M. MIYAZAKI (2004): Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. Prog. Lipid Res. 43, 91-104.
DOI: 10.1016/S0163-7827(03)00039-0.

O'KEEFE, S. J. (2019): The association between dietary fibre deficiency and high-income lifestyle-associated diseases: Burkitt's hypothesis revisited. Lancet Gastroenterol. Hepatol. 4, 984-996.
DOI: 10.1016/S2468-1253(19)30257-2.

PAIVA, P., F. E. MEDINA, M. VIEGAS, P. FERREIRA, R. P. P. NEVES, J. P. M. SOUSA, M. J. RAMOS, P. A. FERNANDES (2021): Animal fatty acid synthase: A chemical nanofactory. Chem. Rev. 121, 9502-9553.
DOI: 10.1021/acs.chemrev.1c00147.

PAUTER, A. M., P. OLSSON, A. ASADI, B. HERSLÖF, R. I. CSIKASZ, D. ZADRAVEC, A. JACOBSSON (2014): Elovl2 ablation demonstrates that systemic DHA is endogenously produced and is essential for lipid homeostasis in mice. J. Lipid Res. 55, 718-728.
DOI: 10.1194/jlr.M046151.

PAWLAK, M., P. LEFEBVRE, B. STAELS (2015): Molecular mechanism of PPARα action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. J. Hepatol. 62, 720-733.
DOI: 10.1016/j.jhep.2014.10.039.
PILLON, N. J., C. O. SOULAGE (2012): Lipid Peroxidation by-Products and the Metabolic Syndrome. In: Lipid Peroxidation. IntechOpen.
DOI: 10.5772/46019.
PURI, P., M. M. WIEST, O. CHEUNG, F. MIRSHAHI, C. SARGEANT, H.-K. MIN, M. J. CONTOS, R. K. STERLING, M. FUCHS, H. ZHOU, S. M. WATKINS, A. J. SANYAL (2009): The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology 50, 1827-1838.
DOI: 10.1002/hep.23229.
QUIDEAU, S., A. C. MCINTOSH, C. E. NORRIS, E. LLORET, M. J. SWALLOW, K. HANNAM (2016): Extraction and analysis of microbial phospholipid fatty acids in soils. J. Vis. Exp. 10, e54360.
DOI: 10.3791/54360.
REIS, J. S., C. A. VELOSO, C. M. VOLPE, J. S. FERNANDES, E. A. BORGES, C. A. ISONI, P. M. DOS ANJOS, J. A. NOGUEIRA-MACHADO (2012): Soluble RAGE and malondialdehyde in patients with type 1 diabetes without chronic complications during the disease course. Diabetes Vasc. Dis. Res. 9, 309-314.
DOI: 10.1177/1479164111436316.
RIMOLDI, O. J., G. S. FINARELLI, R. R. BRENNER (2001): Effects of diabetes and insulin on hepatic delta6 desaturase gene expression. Biochem. Biophys. Res. Commun. 283, 323-326.
DOI: 10.1006/bbrc.2001.4785.
ROBERTS, C. K., A. L. HEVENER, R. J. BARNARD (2013): Metabolic syndrome and insulin resistance: underlying causes and modification by exercise. Compr. Physiol. 3, 1-58.
DOI: 10.1002/j.2040-4603.2013.tb00484.x.
ROCHLANI, Y., N. V. POTHINENI, S. KOVELAMUDI, J. L. MEHTA (2017): Metabolic syndrome: Pathophysiology, management and modulation by natural compounds. J. Am. Coll. Cardiol. Adv. Cardiovasc. Dis. 11, 215-225.
DOI: 10.1177/1753944717711379.

ROŠKARIĆ, P., M. ŠPERANDA, T. MAŠEK, D. VERBANAC, K. STARČEVIĆ (2021): Low dietary n-6/n-3 ratio attenuates changes in NRF2 gene expression, lipid peroxidation, and inflammatory markers induced by fructose overconsumption in rat abdominal adipose tissue. Antioxidants 10, 2005.
DOI: 10.3390/antiox10122005.
SAMPEY, B. P., A. M. VANHOOSE, H. M. WINFIELD, A. J. FREEMERMAN, M. J. MUEHLBAUER, P. T. FUEGER, C. B. NEWGARD, L. MAKOWSKI (2011): Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. Obesity 19, 1109-1117.
DOI: 10.1038/oby.2011.18.
SANDERS, F. W. B., J. L. GRIFFIN (2016): De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. Biol. Rev. 91, 452-468.
DOI: 10.1111/brv.12178.
SCHAEFFER, L., H. GOHLKE, M. MÜLLER, I. M. HEID, L. J. PALMER, I. KOMPAUER, H. DEMMELMAIR, T. ILLIG, B. KOLETZKO, J. HEINRICH (2006): Common genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster and their reconstructed haplotypes are associated with the fatty acid composition in phospholipids. Hum. Mol. Genet. 15, 1745-1756.
DOI: 10.1093/hmg/ddl117.
SCHWINGSHACKL, L., G. HOFFMANN (2014): Monounsaturated fatty acids, olive oil and health status: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. Lipids Health Dis. 13, 154.
DOI: 10.1186/1476-511X-13-154.
SINGLA, P., A. BARDOLOI, A. A. PARKASH (2010): Metabolic effects of obesity: A review. World J. Diabetes 1, 76-88.
DOI: 10.4239/wjd.v1.i3.76.
SOFTIC, S., D. E. COHEN, C. R. KAHN (2016): Role of dietary fructose and hepatic de novo lipogenesis in fatty liver disease. Dig. Dis. Sci. 61, 1282-1293.
DOI: 10.1007/s10620-016-4054-0.
SONNENBURG, J. L., F. BÄCKHED (2016): Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. Nature 535, 56-64.
DOI: 10.1038/nature18846.
SPRECHER, H. (2000): Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids 1486, 219-231.

DOI: 10.1016/S1388-1981(00)00077-9.
STARČEVIĆ, K., L. KRSTULOVIĆ, D. BROZIĆ, M. MAURIĆ, Z. STOJEVIĆ, Ž. MIKULEC, M. BAJIĆ, T. MAŠEK (2015): Production performance, meat composition and oxidative susceptibility in broiler chicken fed with different phenolic compounds. J. Sci. Food Agric. 95, 1172-1178.
DOI: 10.1002/jsfa.6805.
STARČEVIĆ, K., N. FILIPOVIĆ, A. GALAN, V. MICEK, A. GUDAN-KURILJ, T. MAŠEK (2018): Hepatic lipogenesis and brain fatty acid profile in response to different dietary n6/n3 ratios and DHA/EPA supplementation in streptozotocin treated rats. Mol. Nutr. Food Res. 62, 4-12.
DOI: 10.1002/mnfr.201701007.
STARČEVIĆ, K., N. FILIPOVIĆ, M. ŠPERANDA, M. DIDARA, T. MASEK (2017): Influence of sex and gonadectomy on liver and brain fatty acid composition, lipogenesis and β-oxidation. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 101, 574-584.
DOI: 10.1111/jpn.12575.
STARČEVIĆ, K., P. ROŠKARIĆ, M. ŠPERANDA, M. ĐIDARA, A. GUDAN KURILJ, M. MAURIĆ, T. MAŠEK (2019): High dietary n6/n3 ratio decreases eicosapentaenoic to arachidonic acid ratios and upregulates NFκB/p50 expression in short-term low-dose streptozotocin and high-fructose rat model of diabetes. J. Nutr. Biochem. 84, 108441.
DOI: 10.1016/j.jnutbio.2020.108441.
STROUD, C. K., T. Y. NARA, M. ROQUETA-RIVERA, E. C. RADLOWSKI, P. LAWRENCE, Y. ZHANG, B. H. CHO, M. SEGRE, R. A. HESS, J. T. BRENNA, W. M. HASCHEK, M. T. NAKAMURA (2009): Disruption of the FADS2 gene in mice impairs male reproduction and causes dermal and intestinal ulceration. J. Lipid Res. 50, 1870-1880.
DOI: 10.1194/jlr.M900039-JLR200.
TCHERNOF, A., J.-P. DESPRÉS (2013): Pathophysiology of human visceral obesity: an update. Physiol. Rev. 93, 359-404.
DOI: 10.1152/physrev.00033.2011.
SUN, Q., X. XING, H. WANG, K. WAN, R. FAN, C. LIU, Y. WANG, W. WU, Y. WANG, R. WANG (2024): SCD1 is the critical signaling hub to mediate metabolic diseases: Mechanism and the development of its inhibitors. Biomed. Pharmacother. 170, 115586.
DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115586.
TONELLI, C., I. I. C. CHIO, D. A. TUVESON (2018): Transcriptional regulation by Nrf2. Antioxid. Redox Signal. 29, 1727-1745.

DOI: 10.1089/ars.2017.7342.

TOSI, F., F. SARTORI, P. GUARINI, O. OLIVIERI, N. MARTINELLI (2014): Delta-5 and delta-6 desaturases: crucial enzymes in polyunsaturated fatty acid-related pathways with pleiotropic influences in health and disease. Adv. Exp. Med. Biol. 824, 61-81.
DOI: 10.1007/978-3-319-07320-0_7.

TVRZICKA, E., L.-S. KREMMYDA, B. STANKOVA, A. ZAK (2011): Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub. 155, 117-130.
DOI: 10.5507/bp.2011.038

ULMANN, L., J. P. BLOND, C. MANIONGUI, J. P. POISSON, G. DURAND, J. BÉZARD, G. PASCAL (1991): Effects of age and dietary essential fatty acids on desaturase activities and on fatty acid composition of liver microsomal phospholipids of adult rats. Lipids 26, 127-133.
DOI: 10.1007/BF02544006.

VATASHCHUK, M. V., M. M. BAYLIAK, V. V. HURZA, K. B. STOREY, V. I. LUSHCHAK (2022): Metabolic syndrome: Lessons from rodent and Drosophila models. Biomed Res. Int. 2022, 5850507.
DOI: 10.1155/2022/5850507.

VELUVALI, A., M. SNYDER (2023): Dietary fiber deficiency in individuals with metabolic syndrome: a review. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 26, 564-569.
DOI: 10.1097/MCO.0000000000000971.

WANG, Y., D. BOTOLIN, J. XU, B. CHRISTIAN, E. MITCHELL, B. JAYAPRAKASAM, M. NAIR, J. M. PETERS, J. BUSIK, L. K. OLSON, D. B. JUMP (2006): Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. J. Lipid Res. 47, 2028-2041.
DOI: 10.1194/jlr.M600177-JLR200

ZEGALLAI, H. M., G. M. HATCH (2021): Barth syndrome: cardiolipin, cellular pathophysiology, management, and novel therapeutic targets. Mol. Cell. Biochem. 476, 1605-1629.
DOI: 10.1007/s11010-020-04021-0.

ZHANG, K., Y. MA, Y. LUO, Y. SONG, G. XIONG, Y. MA, X. SUN, C. KAN (2023): Metabolic diseases and healthy aging: identifying environmental and behavioral risk factors and promoting public health. Front. Public Health 11, 1253506.

DOI: 10.3389/fpubh.2023.1253506.

9. ŽIVOTOPIS

Sunčica Heštera, djevojačko Sertić, rođena je 23. srpnja 1996. godine u Zagrebu. Nakon završene Opće gimnazije u Daruvaru, 2015/2016 upisala je Veterinarski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija kontinuirano se usavršavala u području suvremenih laboratorijskih metoda na Institutu Ruđer Bošković, na Zavodu za molekularnu medicinu u Laboratoriju za naprednu genomiku, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Jelenom Šuran i dr. sc. Josipom Vlainić. Na Institutu se usavršila u predkliničkom istraživanju lijekova u različitim metodama molekularne dijagnostike (izolacija DNA, RNA, PCR, RT-PCR), radu sa staničnim kulturama (HaCaT, HEK) te radu s bakterijskim kulturama i laboratorijskim životinjama.

Od 2018. godine sudjelovala je na EU projektu „SoftVets“, u suradnji s dr. sc. Ladom Radin na projektu „Pan-European Soft Skills for Undergraduate Veterinary Education“. Sudjelovala je u organizaciji brojnih radionica, među kojima je i „Student Challenge“, kroz koju je ostvarena suradnja sa Zagrebačkom školom ekonomije i managementa, uključujući radionice „Entrepreneurial Mindset“ i „Design Thinking“. Organizirala je brojne kongrese i događanja, poput EAEV-a, Veterinary Science and Professions te obilježavanja 100. obljetnice Veterinarskog fakulteta, te predstavljala Fakultet na Risan Lynx Day u Zoološkom vrtu Grada Zagreba. Kao studentska suradnica na HKO projektu organizirala je Školu poduzetništva. Diplomski studij završila je 2021. godine stekavši akademski naziv doktorice veterinarske medicine.

Nakon završetka studija zaposlila se na Zavodu za bolesti peradi Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu gdje je sudjelovala u radu molekularnog laboratorija. Nakon toga nastavlja karijerni put u farmaceutskoj industriji u području bioloških biosličnih lijekova. Od 2022. godine polaznica je Doktorskog studija Veterinarskog fakulteta, dok od 2023. godine postaje doktorand stipendist Veterinarskog fakulteta, pod mentorstvom prof. dr. sc. u trajnom izboru Tomislava Mašeka i izv. prof. dr. sc. Kristine Starčević.

Tijekom doktorskog studija sudjeluje u istraživanjima mentora na Zavodu za prehranu i dijetetiku životinja i Zavodu za kemiju i biokemiju, usmjerenih na metabolizam lipida, masnih kiselina i antioksidativne mehanizme. U okviru doktorskog studija, aktivno sudjeluje na međunarodnom sudjelovanju Krmiva (2023-2025.), kako i na International Symposium on Lipid Oxidation and Antioxidants u Bologni te Global Congress on Food & Nutrition u Portu.

Rezultate svog znanstveno- istraživačkog rada objavila je kao autorica i koautorica u ukupno 19 priloga s znanstvenih skupova i 3 znanstvena rada.

10. POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

STARČEVIĆ, K., I. SABOLEK, **S. HEŠTERA**, I. MIHOKOVIĆ BUHIN, I. C. ŠOŠTARIĆ ZUCKERMANN, T. MAŠEK (2025): Relation between phospholipid acid profile and tumour grade in dog mammary tumours. 50th World Small Animal Veterinary Association Congress (WSAVA), Rio de Janeiro, Brazil, 25–27 September 2025.

ROŠKARIĆ, P., T. MAŠEK, I. SABOLEK, **S. HEŠTERA**, D. VERBANEC, K. STARČEVIĆ (2025): A low dietary n6/n3 ratio attenuates the development of pathological changes in liver tissue induced by high fructose in male and female rats. 16th International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (ISSFAL) Congress, Quebec, Canada, 29 June–2 July 2025.

MAŠEK, T., **S. HEŠTERA**, P. ROŠKARIĆ, K. STARČEVIĆ (2025): Changes in the mother's liver fatty acid profile induced by excessive fructose consumption are similary transmitted to the male and female offspring. 16th International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (ISSFAL) Congress, Quebec, Canada, 29 June–2 July 2025.

MAŠEK, T., **S. HEŠTERA**, P. ROŠKARIĆ, K. STARČEVIĆ (2025): Fatty acid composition of black soldier fly larvae (Hermetia illucens) reared on different feeding media. 20th Euro Fed Lipid Congress and Expo, Leipzig, Germany, 12–15 October 2025.

HEŠTERA, S., P. ROŠKARIĆ, T. MAŠEK, K. STARČEVIĆ (2025): Possible protective role of high-fiber diet on liver fatty acid metabolism during aging in rat model of obesity. 20th Euro Fed Lipid Congress and Expo, Leipzig, Germany, 12–15 October 2025.

STARČEVIĆ, K., L. LOZICA, **S. SERTIĆ**, I. SABOLEK, S. ŽUŽUL, Ž. GOTTSTEIN, E. BUDICIN, D. BROZIĆ, M. BRUS, T. MAŠEK (2025): Chestnut tannin and chestnut tannin-soy protein isolate complex differently influence fecal Escherichia coli count, immune system, caecum fermentation and meat oxidative susceptibility in broiler chickens. J. Cent. Eur. Agric. 26, 606–617. https://doi.org/10.5513/jcea01/26.3.4695.

STARČEVIĆ, K., **S. SERTIĆ**, I. SABOLEK, S. ŽUŽUL, T. MAŠEK (2025): Tanin kestena i kompleks tanina i proteinskog izolata soje utječu na podložnost oksidaciji, upalu i profil masnih kiselina kod pilića u tovu. Zbornik sažetaka 30. međunarodnog savjetovanja KRMIVA 2025. Antunović, Z., Z. Janječić (ur.), Krmiva d.o.o. Zagreb, Zagreb, pp. 85–86.

MAŠEK, T., P. ROŠKARIĆ, **S. SERTIĆ**, K. STARČEVIĆ (2025): Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid supplementation could attenuate negative effects of maternal metabolic syndrome on liver lipid metabolism and liver betacellulin expression in male and female rat offspring. Metabolites 15, 32–43. https://doi.org/10.3390/metabo15010032.

STARČEVIĆ, K., **S. HEŠTERA**, T. MAŠEK (2024): Chestnut tannin and chestnut tannin-soy protein isolate complex influence meat oxidative susceptibility and fatty acid profile in broiler chickens. Global Congress on Food & Nutrition 2024, Porto, Portugal, 25–26 November 2024.

STARČEVIĆ, K., P. ROŠKARIĆ, **S. HEŠTERA**, T. MAŠEK (2024): Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid supplementation could attenuate negative effects of maternal metabolic syndrome on male and female offspring lipid metabolism. Global Congress on Food & Nutrition 2024, Porto, Portugal, 25–26 November 2024.

STARČEVIĆ, K., **S. HEŠTERA**, I. SABOLEK, S. ŽUŽUL, T. MAŠEK (2024): Chestnut tannin and chestnut tannin-soy protein isolate complex influence meat oxidative susceptibility, inflammation and fatty acid profile in broiler chickens. Zbornik sažetaka XXIX međunarodnog savjetovanja KRMIVA 2024. Antunović, Z., Z. Janječić (ur.), Krmiva d.o.o. Zagreb, Zagreb, 2024.

HEŠTERA, S., K. STARČEVIĆ, T. MAŠEK (2024): Synergistic effects of thymol, gallic and tannic acid on in vitro and in vivo antioxidative properties, fatty acid profile and oxidative stability of frozen tissues in chicken broilers. 5th International Symposium on Lipid Oxidation and Antioxidants (5th ISLOA), Bologna, Italy, 8–10 July 2024.

STARČEVIĆ, K., P. ROŠKARIĆ, **S. HEŠTERA**, T. MAŠEK (2024): Increased dietary content of DHA and EPA influences oxidation induced by fructose overconsumption in the rat adipose tissue. 5th International Symposium on Lipid Oxidation and Antioxidants (5th ISLOA), Bologna, Italy, 8–10 July 2024.

SERTIĆ, S., D. BROZIĆ, K. STARČEVIĆ, T. MAŠEK (2024): Antioxidative properties of phenol mixture and its influence on oxidative stability of chicken broilers frozen tissue. Zbornik sažetaka XXIX međunarodnog savjetovanja KRMIVA 2024. Antunović, Z., Z. Janječić (ur.), Krmiva d.o.o. Zagreb, Zagreb, pp. 67–67.

ĐURIĆ JARIĆ, M., D. BROZIĆ, **S. SERTIĆ**, Ž. GOTTSTEIN, S. VINCE, H. VALPOTIĆ (2024): Utjecaj različitih koncentracija ekstrakta đumbira (Zingiber officinale Roscoe) na mikrobiom ileuma kod tovnih pilića. Zbornik sažetaka XXIX međunarodnog savjetovanja KRMIVA 2024. Antunović, Z., Z. Janječić (ur.), Krmiva d.o.o. Zagreb, Zagreb, pp. 45–46.

SERTIĆ, S., J. VLAINIĆ, A. M. KOVAČ, L. LOZICA, D. HORVATEK TOMIĆ, E. BUDICIN, T. MAŠEK, D. BROZIĆ, H. VALPOTIĆ, J. ŠURAN et al. (2023): Antimicrobial effect of phenolic acids on bacterial strains isolated from poultry. Zbornik sažetaka 28. međunarodnog savjetovanja KRMIVA 2023. Antunović, Z., Z. Janječić (ur.), Krmiva d.o.o., Zagreb, pp. 67–67.

LOZICA, L., E. BUDICIN, L. FUČKAN, **S. SERTIĆ**, D. HORVATEK TOMIĆ, Ž. GOTTSTEIN (2023): Egg drop and high mortality in laying hens caused by an error in a manure removal system – a case report. XXIInd World Veterinary Poultry Association Congress – Book of Abstracts. Znanstveni odbor WVPA (ur.), World Veterinary Poultry Association (WVPA), Verona, pp. 681–681.

KOVAČ, A. M., L. LOZICA, Ž. GOTTSTEIN, M. DOLENEC, **S. SERTIĆ**, K. STARČEVIĆ, D. BROZIĆ, T. MAŠEK (2023): Učinak dodatka kestenovog tanina na mikrobiom crijeva tovnih pilića. Zbornik sažetaka 28. međunarodnog savjetovanja KRMIVA 2023. Krmiva, Zagreb, pp. 74–75.

GOTTSTEIN, Ž., L. LOZICA, **S. SERTIĆ**, D. HORVATEK TOMIĆ, M. DRAGOŠEVIĆ, M. KRALJEVIĆ, M. RITOŠA, L. KŐRÖSI (2022): Utjecaj docjepljivanja živim cjepivom protiv zarazne bolesti burze na proizvodne pokazatelje tovnih pilića nakon slabe stope cijepljenosti in ovo. Proceedings of "Poultry Days 2022". Hrvatski veterinarski institut, Centar za peradarstvo, Zagreb, pp. 218–222.

SERTIĆ, S., E. BUDICIN, L. LOZICA, M. LUKAČ, D. HORVATEK TOMIĆ, Ž. GOTTSTEIN (2022): Usporedba postupaka izdvajanja DNA iz pera u kontroli cijepljenja pilenki lake pasmine kokoši sojem CVI 988 virusa Marekove bolesti. Proceedings of "Poultry Days 2022". Hrvatski veterinarski institut, Centar za peradarstvo, Zagreb, pp. 78–83.

LOZICA, L., E. BUDICIN, **S. SERTIĆ**, S. KAZAZIĆ, M. LUKAČ, D. HORVATEK TOMIĆ, Ž. GOTTSTEIN (2022): Antimicrobial susceptibility, phylogenetic and proteomic characterization of Enterococcus cecorum. Peradarski dani 2022: zbornik = Poultry Days 2022: proceedings. Hrvatski veterinarski institut, Centar za peradarstvo, Zagreb, pp. 102–108.