# Pretilost u mačaka - metabolomski pristup

**Ećimović, Luka**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:738784

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

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

*Repository / Repozitorij:*

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**VETERINARSKI FAKULTET**

**LUKA EĆIMOVIĆ**

# PRETILOST U MAČAKA – METABOLOMSKI PRISTUP

**ZAGREB, 2021.**

Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Zavod za kemiju i biokemiju

**Predstojnica Zavoda:** prof. dr. sc. Renata Barić Rafaj

**Mentorica:** prof. dr. sc. Renata Barić Rafaj

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Ivana Kiš
2. izv. prof. dr. sc. Maja Belić
3. prof. dr. sc. Renata Barić Rafaj
4. prof. dr. sc. Vladimir Mrljak (zamjena)

**Popis kratica**

| | |
|---|---|
| ALT | alanin aminotransferaza |
| ALP | alkalna fosfataza |
| AST | aspartat aminotransferaza |
| BCS- | (*Body Score Condition*) tjelesna kondicija |
| BMI- | (*Body Mass Indeks*) indeks tjelesne mase |
| CrHis | kromov histidinat |
| CrPic | kromov pikolinat |
| GCS | glicin dekarboksilaznog kompleksa |
| GGT | gama glutamil transferaza |
| GLDC | glicin dekarboksilaza |
| GLUT4 | glukozni transporter tipa 4 |
| HDL | *(High density lipoprotein)* lipoprotein velike gustoće |
| HMW | *(High molelucar weight)* – oligomer visoke molekularne težine |
| ICAM-1 | (*Intercellular adhesion molecule-1*) intercelularna adhezijska molekula –1 |
| IDO1 | indolamin-pirol-2,3-dioksigneaza |
| IL-6 | interleukin-6 |
| IL-8 | interleukin-8 |
| LDL | *(Low density lipoprotein)* lipoprotein niske gustoće |
| LMW | *(Low molecular weight)* niska molekularna težina |
| KMO | kinurenin 3-monooksigenaza |
| MHO | *(Metabolically healthly obesity*) metabolički zdrava debljina |
| MS2/ MS | *(Mass spectometry)* masena spektometrija |
| MUO | *(Metabolically unhealthly obesity*) metabolički nezdrava debljina |
| $NAD^+$ | nikotinamid adenin dinukleotid |
| PPARγ | receptori aktivirani proliferacijom peroksisoma γ |
| SREBP-1c | *(Sterol-regulatory element binding protein-1c*) protein-1c koji veže regulatorni element za sterol |
| STAT | prijenosnici i aktivatori transkripcijskih signala |
| T2D | dijabetes mellitus tip 2 |

| | |
|---|---|
| TRIG | trigliceridi |
| TRP | triptofan |
| VCAM-1 | *(Vascular cell adhesion molecule-1)* vaskularna stanična adhezijska molekula - 1 |
| TNF-α | (*Tumor necrosis factor alpha)* tumorski čimbenik nekroze alfa |
| WAT | *(White adipose tissue)* bijelo masno tkivo |

**POPIS PRILOGA**

**SLIKE:**

Slika 1: Shematski prikaz područja koje obuhvaća metabolomika.

**GRAFIKONI:**

Grafikon 1. Koncentracija ukupnih proteina u serumu N, O i M grupe mačaka
Grafikon 2. Koncentracija glukoze u serumu N, O i M grupe mačaka
Grafikon 3. Koncentracija triglicerida u serumu N, O i M grupe mačaka
Grafikon 4. Koncentracija kolesterola u serumu N, O i M grupemačaka
Grafikon 5. Koncentracija adiponektina u serumu N, O i M grupe mačaka
Grafikon 6: Metabolom O grupe mačaka u usporedbi sa N grupom
Grafikon 7: Distribucija metaboloma O grupe mačaka u usporedbi sa N grupom.
Grafikon 8: Intenzitet signala u ovisnosti o retencijskom vremenu pozitivno nabijenih iona kontrolne skupine mačaka (N)
Grafikon 9: Intenzitet signala u ovisnosti o retencijskom vremenu pozitivno nabijenih iona kontrolne skupine mačaka (N)
Grafikon 10: Intenzitet signala u ovisnosti o retencijskom vremenu negativno nabijenih iona kontrolne skupine mačaka, N
Grafikon 11: Intenzitet signala u ovisnosti o retencijskom vremenu negativno nabijenih iona O skupine mačaka
Grafikon 12: Distribucija M mačaka u usporedbi sa N mačkama.
Grafikon 13: Intenzitet signala u ovisnosti o retencijskom vremenu pozitivno nabijenih iona N skupine mačaka
Grafikon 14: Intenzitet signala u ovisnosti o retencijskom vremenu pozitivno nabijenih iona M skupine mačaka
Grafikon 15: Intenzitet signala u ovisnosti o retencijskom vremenu negativno nabijenih iona N skupine mačaka
Grafikon 16: Intenzitet signala u ovisnosti o retencijskom vremenu negativno nabijenih iona M skupine mačaka
Grafikon 17: Prikaz metaboličke mape glicina, serina i treonina u usporedbi M mačaka sa N

mačkama

Grafikon 18: Prikaz metabolizma biotina u usporedbi M sa N grupom mačaka

**TABLICE:**

Tablica 1. Rezultati očitanja pikova metabolita N i M grupe mačaka i njihov intenzitet

**SADRŽAJ RADA** **STR**


| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1. | | | UVOD | 1 |
| | 1.1. | | PREVELIKA TJELESNA TEŽINA I PRETILOST | 1 |
| | 1.2. | | UZROCI PREVELIKE TJELESNE TEŽINE I PRETILOSTI | 1 |
| | 1.3. | | POSLJEDICE PREVELIKE TJELESNE TEŽINE I PRETILOSTI | 2 |
| | 1.4. | | ADIPOKINI | 2 |
| | | 1.4.1. | ADIPONEKTIN I NJEGOVA GRAĐA | 3 |
| | | 1.4.2. | ULOGA ADIPONEKTINA | 4 |
| | 1.5. | | METABOLOMIKA | 4 |
| | | 1.5.1. | CILJANA I NE-CILJANA METABOLOMIKA | 7 |
| 2. | | | HIPOTEZA | 7 |
| 3. | | | ISPITANICI I METODE | 7 |
| | 3.1 | | ISPITANICI | 7 |
| | 3.2. | | METODE | 8 |
| | 3.3. | | STATISTIČKA ANALIZA | 10 |
| 4. | | | REZULTATI | 10 |
| 5. | | | RASPRAVA | 23 |
| 6. | | | ZAKLJUČCI | 30 |
| 7. | | | ZAHVALA | 32 |
| 8. | | | LITERATURA | 33 |
| 9. | | | SAŽETAK | 42 |
| 10. | | | SUMMARY | 43 |
| 11. | | | ŽIVOTOPIS | 44 |

# 1. UVOD

## 1.1. Prevelika tjelesna težina i pretilost

Danas u razvijenim zemljama ljudi i kućni ljubimci dijele način života i žive u istom okolišu. Koncept pristupa zdravlju, popularno nazvan "One health" potiče zajedničku suradnju liječnika humane i veterinarske medicine u rješavanju problema koji su zajednički ljudima i životinjama. Izvrstan primjer ovakvom pristupu zdravlju predstavlja problem prevelike tjelesne težine i pretilosti, koji je postao glavni problem u održavanju zdravlja kako kod ljudi, tako i kod kućnih ljubimaca (CHANDLER i sur., 2017). Prevelika tjelesna težina i pretilost danas predstavljaju pravu pandemiju i kod ljudi i kod životinja, a povezana je sa povećanim morbiditetom i mortalitetom. Statistički podaci iz humane medicine i veterinarskih ambulanti u SAD-u pokazuju, tijekom 5 godišnjeg perioda praćenja, da je incidencija prevelike tjelesne težine i pretilosti narasla za 37% kod ljudi, te za 90% kod pasa i mačaka. Pri tome posebno zabrinjava činjenica da 75% Europljana sa prevelikom tjelesnom težinom toga uopće nisu svjesni, kao i podatak da jedan od pet Europljana ne poduzima nikakve mjere za korekciju debljine. Ovo je naročito važno zbog činjenice da se sve više prepoznaje uloga samih vlasnika životinja u smanjivanju rizika razvoja različitih poremećaja izazvanih debljinom kod kućnih ljubimaca (WALL i sur., 2019).

Suvišno nakupljanje tjelesne masnoće u mačaka u tolikoj mjeri da prijeti njenom zdravlju naziva se pretilost, odnosno adipoznost (GERMAN, 2006). Neki autori smatraju da su prevelika tjelesna težina i pretilost prisutni kod 11.5% – 63% populacije pasa i mačaka (ZORAN, 2009), dok drugi utvrđuju raspon koji varira između 19% u područjima zapadne Australije, do 52% u Engleskoj (RANGEL-HUERTA, 2019). Poremećaj je multifaktorske etiologije.

## 1.2. Uzroci prevelike tjelesne težine i pretilosti

Među glavnim uzrocima pretilosti smatra se pretjeran unos kalorija tijekom duljeg vremenskog perioda (GERMAN, 2006; FANTUZZI 2008). Toj činjenici pridonose starija životna dob (veća od 7 godina), fizička neaktivnost te kastrirani mužjaci. Osim navedenog, uzrokom pretilosti smatraju se bolesti poput hipotireoidizima, hiperadrenokorticizma, nasljedni poremećaji metabolizma lipida, pasminska dispozicija te iatrogeni uzroci (LUND, 2005; KELLER i sur., 2017). Posebno je važno naglasiti ulogu vlasnika životinje u njenoj pretilosti. Istraživanja su

pokazala da vlasnici debljih mačaka provode više vremena gledajući mačke kako jedu, a manje igrajući se s njima, nego vlasnici normalnih mačaka. Uz to, vlasnici su skloniji antropomorfiziranju debelih mačaka zbog mogućeg pomankanja interakcije sa drugim ljudima. (TARKOSOVA, 2016). Novi vlasnici često im daju poslastice, a da nisu upućeni u balansiranu prehranu za mačke. Njihovu okolinu u kućanstvima ne obogaćuju, čime smanjuju njihovu fizičku aktivnost i doprinose razvoju debljine već u prvim godinama života mačke (WALL i sur., 2019). Također, rizični čimbenici za pretilost u mačaka i pasa vezani uz ljude podrazumijevaju mjesečna primanja. Vlasnici pretilih životinja imaju niže mjesečne prihode u odnosu na vlasnike životinja normalne tjelesne težine (KIENZLE i sur. 1998).

### 1.3. Posljedice prevelike tjelesne težine i pretilosti

U ljudi je metabolička zdrava debljina ona u kojoj nije prisutna hiperglikemija, hipertenzija ili neki oblik dislipidemije. Abnormalna metabolička debljina podrazumijeva prisutnost jednog ili više promjenjenih metaboličkih indeksa. Poznato je da je u ljudi koji su pretili, ali metabolički zdravi, prisutna viša koncentracija adiponektina u krvi od onih s abnormalnim metaboličkim indeksom (CHEN, 2015). Zato se u medicinu uvodi termin „metabolički sindrom“ koja služi da bi razdvojili „zdrave“ od „nezdravih“ pretilih pacijenata (LIBERT i sur., 2018). Metaboličkim se sindromom u humanoj medicini smatra prisutnost rizičnih faktora koji se povezuju sa kardiovaskularnim bolestima uključujući arterosklerozu te kroničnim bubrežnim bolestima. Simptomi i dijagnostički kriteriji koji obuhvaćaju metabolički sindrom su intolerancija na glukozu, hipertrigliceridemija s dislipidemijom, hipertenzija te nakupljanje masti u predjelu struka. Razvoj visceralne masti smatra se važnim u nastanku metaboličke disfunkcije te je opisan u ljudi kao „visceral fat syndrome“. Slične bolesti te metabolička odstupanja pojavljuju se i u mačaka. Smatra se da su ona posljedica sličnih patofizioloških puteva te progresije bolesti do metaboličkog sindroma i u mačaka. Debljina se također povezuje sa intolerancijom na glukozu te šećernu bolest tipa 2 (OKADA, 2017). Razlog tomu je prolongirana i dugotrajna hiperlipidemija koja koči djelovanje inzulina na način da suprimira receptore osjetljive na inzulin (JIANPING, 2013). Dislipidemija je karakterizirana povišenom indeksu oksidacije masnih kiselina, sniženim koncentracijama lipoproteina visoke gustoće (HDL), povišenim koncentracijama lipoproteina niske gustoće (LDL) te povišenim razinama ukupnog kolesterola (KOLOVOU, 2005). Također, pretilost pridonosi razvoju osteoartritisa, ali je isto tako vjerojatno da osteoartritis pridonosi razvoju pretilosti umanjujući životinji volju za kretanjem (MARSHALL i sur., 2009).

## 1.4. Adipokini

Postoje dvije vrste masnog tkiva: bijelo i smeđe masno tkivo. Bijelo masno tkivo (WAT) izlučuje hormon leptin. Od otkrića leptina, prije 25 godina, WAT se smatra važnim endokrinim organom koji izlučuje veliki broj aktivnih supstanci, uključujući steroidne hormone, faktore rasta i citokine, komplementne proteine, vežuće proteine, eikozanoide, vazoaktivne tvari, regulatore metabolizma lipida i glukoze te druge tvari koji aktivno sudjeluju u energetskom metabolizmu i modulaciji apetita (RADIN i sur., 2009.; BADMAN i FLIER, 2007). Mnogi hormoni i faktori koji se izlučuju iz masnog tkiva se zajedničkim nazivom nazivaju „adipokini" ili „adipocitokini". Ovi termini se odnose na proteine koji sudjeluju u staničnoj signalizaciji, otpuštaju se iz stanica masnog tkiva, te specifično djeluju na staničnu diferencijaciju, energetski metabolizam, diferencijaciju tkiva, imunosni odgovor te imaju funkciju u endokrinom, parakrinom te autokrinom lučenju (WANG i sur., 2008.). Do danas je otkriveno više od 50 različitih adipokina.

### 1.4.1. Adiponektin i njegova građa

Masno tkivo ima važnu ulogu u homeostazi energije organizma. Uz funkciju pohrane energije, ono je važan endokrini organ koji producira različite hormone i peptide. Od njih je najbolje istražen adiponektin. Razina adiponektina u plazmi u negativnoj je korelaciji sa indeksom tjelesne mase (CHEN, 2015). Adiponektin je proteinski produkt adipocita koji djeluje protuupalno, antiaterogenetski, kardioprotektivno te antidiabetički. Homooligomer je te u strukturi razlikujemo 3 multimerne forme: LMW (low molecular weight) koji je trimer, MMW (medium molecular weight) u heksamerskoj formi te HMW (high molelucar weight). Peptidna sekvenca jednog monomera sastavljena je od N- terminalnog peptida, kratke hipervarijabilne regije, kolagenske domene čija ponavljajuća sekvenca glasi 22 Gly-X-Pro ili Gly-X-Y te C-terminalnog globularnog kraja (KADOWAKI, 2005). U serumu je monomer prisutan kao *f Adiponectin* u cijelom sastavu ili u globularnoj formi proteina kao *g Adiponectin* (KISHIDA i sur., 2003). Adiponektini podliježu posttranslacijskim procesima glikozilacije i hidroksilacije aminokiselina unutar kolagenske domene. Nakon sekrecije, različiti adiponektinski kompleksi ne prelaze iz jedne forme u drugu, već su njihove forme odraz biološkog stanja organizma. Stoga je poznato da su HMW oligomeri zastupljenije forme adiponektina kada je riječ o njegovoj ulozi u inzulinskoj osjetljivosti (CALTON, 2013). Adiponektini djeluju kroz 2 receptora: AdipoR1 i AdipoR2. Njih sačinjava 7 transmembranskih G-proteina (KADOWAKI, 2005). Kroz receptore djeluju na fiziološke procese

u stanici. Ovisno o molekularnoj formi adiponektina i zastupljenosti receptora na ciljnom organu, ovisit će i fiziološko djelovanje adiponektina (YAMAUCHI i sur., 2007).

### 1.4.2. Uloga adiponektina u organizmu

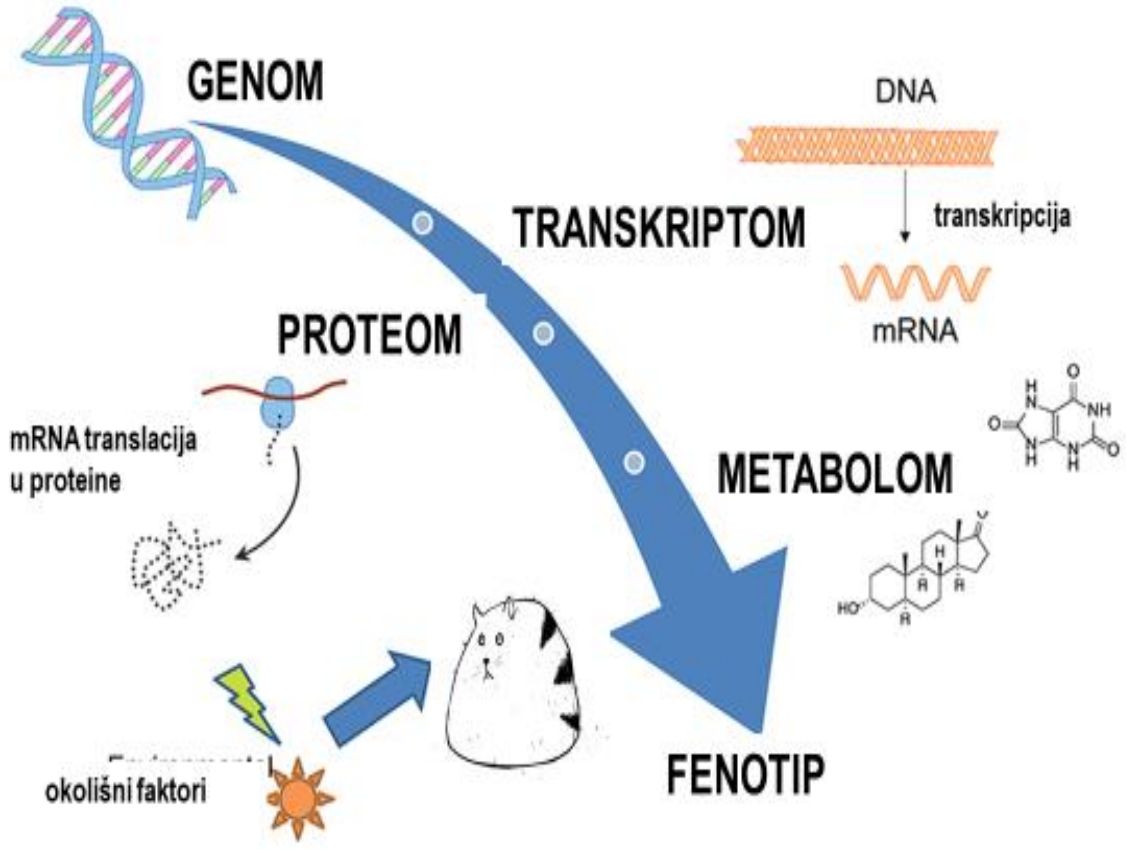
Adiponektin djeluje protuupalno i povećavaju osjetljivost stanica na inzulin (PHILLIPS i sur., 2017). Ima važnu ulogu u očuvanju endotela krvnih žila. Suprimira ekspresiju VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1) i ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1) molekule te na taj način smanjuje interakciju i adheziju leukocita sa endotelolom. Koncentracija adiponektina smanjena je u bolestima povezanih sa debljinom poput dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti te inzulinskoj preosjetljivosti (SULISTYONINGRUM i sur., 2007). U ljudi i mačaka, pretilost je često povezana sa kroničnom, tinjajućom upalom koja primarno potječe iz masnog tkiva (KELLER i sur., 2017). Ta upala implicira razvoj metaboličkog sindroma povisujući koncentracije visfatina, rezistina, TNFα, IL-6 te IL-8 (CHEN, 2015). Upalni medijatori poput TNFα i IL-6 djeluju na adipocite tako da suprimiraju produkciju adiponektina, a time pojačavaju inzulinsku rezistenciju te rizik od bolesti povezanih s pretilošću poput dijabetesa tipa 2, kardiovaskularnih bolesti te hipertenzije (FANTUZZI, 2008; SULISTYONINGRUM i sur., 2007). No i prije nego li se navedene bolesti klinički očituju, tinjajuća upala sa oksidativnim stresom je prisutna zbog povišene peroksidacije lipida i navedenih upalnih medijatora (OKADA, 2017). U metabolizmu mišića povećava osjetljivost na inzulin. U jetri inhibira glukoneogenezu te aktivira oksidaciju masnih kiselina (NIGRO i sur., 2014). U stanju pretilosti, adiponektin je snižen jer dolazi do smanjene ekspresije adiponektinskih receptora. Posljedica toga jest inzulinska rezistencija (SULISTYONINGRUM i sur., 2007). Postoje i brojne druge uloge adiponektina u organizmu (NIGRO i sur., 2014).

Potrebno je više istražiti ovo područje, a napose ulogu i različitu regulaciju raznih oblika adiponektina (visoke i niske molekularne težine te globularnog adiponektina) (FANTUZZI, 2008).

## 1.5. Metabolomika

Metabolomika je analitička metoda koja proučava metabolom stanica, biofluida, tkiva ili cjelokupnog organizma u cilju identifikacije i kvantifikacije svih niskomolekularnih endogenih i egzogenih molekula i metabolita prisutnih u istraživanom biološkom sistemu. Metoda se bazira na mjerenju spektroskopije masa upotrebom masenog spektroskopa te omogućava klasifikaciju i

karakterizaciju izmjerenih komponenti kao i identifikaciju promjena cjelokupnih metaboličkih puteva. Metaboliti su intermedijeri i proizvodi metabolizma. Metabolit se u kontekstu metabolomike obično definira kao bilo koja molekula manje od 1 kDa. Sastav endogenih komponenti je posljedica utjecaja genoma i okolišnih faktora, životnog stila, uzimanja lijekova i prisutnosti bolesti. Metabolom je rezultat aktivnosti gena, transkripta i posljedično sintetiziranih proteina, pa je stoga metabolomika kao metoda komplementarne genomici, transkriptomici i proteomici. Metaboliti su konačni produkti metabolizma. Promjene u genskoj ekspresiji, transkriptomu i ekspresiji proteina, zajedno sa utjecajem okolišnih faktora direktno utječu na metabolom čineći ga mnogo kompleksnijim od genoma i proteoma. Od svih omika tehnologija, metabolomika najbolje odražava molekularni fenotip i razlike između zdravog i bolesnog stanja (ZHANG i sur., 2017).




Slika 1: Shematski prikaz područja koje obuhvaća metabolomika. Izvor: (https://www.google.com/search?q=metabolomics&source)

Metabolomika obuhvaća analitički pristup i tehnologiju koja omogućava ustvrditi i izmjeriti promjene u profilu metabolita niske molekularne mase (<1500 Da) u stanicama, tkivima, organima ili cijelom organizmu kao odgovor na genetske varijacije, patološka ili fiziološka stanja (RANGEL-HUERTA, 2009). Ti metaboliti su ili intermedijatori ili konačni produkt metaboličkih puteva (CHEN, 2015). Cilj metabolomike jest odrediti cjeloviti profil metabolita (metaboloma) koji moduliraju fenotip u svrhu dijagnostičkih i prognostičkih biomarkera (ZHANG i sur., 2017). Metabolomika je osjetljiva metoda kojom se mogu prepoznati promjene u metaboličkom profilu mnogo prije nego se počinju pojavljivati patohistološke promjene, tj. prije nego se bolest pojavi (REEVE-JOHNSON i sur., 2016). Zbog toga su endogeni metaboliti lako podložni kliničkom testiranju. Cilj takvih istraživanja jest selektirati metabolite i uvrstiti ih u biomarkere mnogih bolesti (GUIJAS i sur. 2018). Glavna analitička platforma za metabolomiku je masena spektrometrija. Ona nudi metabolički profil promjenjenih metabolita zbog bolesti (ZHANG i sur., 2017).

Metabolomika je najmlađa disciplina u grupi "omika" tehnologija, a posljednjih godina doživljava intenzivan razvoj. Ovaj pristup dijagnostici ima neke prednosti pred genomikom, transkriptomikom i proteomikom, metodama koje su se do sada intenzivnije razvijale od metabolomike. Prvo, broj molekula koji se detektira je manji (n=6500) u komparaciji sa genomskim pristupom (n=25.000), transkriptom ((n=100.000) i proteinima (n=100.000). Drugo, metaboliti bolje odražavaju trenutačno stanje cijelog organizma i kompletnog biološkog statusa od ostalih "omika" tehnologija. Treće, metabolomika kao metoda ima vrlo snažan istraživački potencijal i danas se sve češće koristi u praćenju učinka različitih lijekova u farmaceutskoj industriji. Promjene u metaboličkom profilu se javljaju puno ranije od pojave histopatoloških znakova različitih bolesti, stoga metabolomske metode mogu biti upotrijebljene za otkrivanje ranih indikatora različitih poremećaja. Četvrto, za razliku od gena i proteina koji se razlikuju između različitih vrsta životinja i ljudi, metaboliti su konzervirani i identični između različitih vrsta. Ta činjenica nam omogućava istraživanja na različitim vrstama životinja. Detekcijske metode primjenjene na jednoj vrsti životinja mogu se aplicirati na drugu vrstu, bez dodatnih potreba adaptacije metoda ili kalibracijskih postupaka. Peto, istraživanja metabolita primjenom metabolomskih tehnika mjerenja pružaju rezultate vrlo brzo i financijski su mnogo prihvatljivija od ostalih "omika" tehnika, pa su stoga idealne kao postupci u kojima se može obraditi veliki broj uzoraka u kratkom vremenu, uz pristupačna financijska sredstva (REEVE-JOHNSON i sur., 2016).

Zbog kompleksnosti metaboloma i velikog broja kemijskih spojeva kao što su lipidi, organske kiseline, ugljikohidrati, aminokiseline, nukleotidi i steroidi, veliki broj metabolita još nije validiran i u potpunosti karakteriziran, stoga do danas još nije poznat točan broj metabolita koji se nalazi u ljudskom organizmu. Aplikacija metabolomskih metoda mjerenja upotrebom spektroskopije masa je još uvijek u ranoj fazi razvoja u veterinarskoj medicini, međutim, potencijal njene primjene u istraživanjima je izuzetno velik.

### 1.5.1. Ciljana i ne-ciljana metabolomika

Metabolomske metode se mogu podijeliti u dvije glavne skupine: 1.ciljana metabolomika, u kojoj se metaboliti identificiraju i mjeri se njihova koncentracija i 2.ne-cijana metabolomika, u kojoj se različita biološka stanja međusobno uspoređuju simultanim mjerenjem što više analita u biološkom uzorku. Ne-ciljana metabolomika stoga istraživačima pruža potencijal za otkrivanje novih biomarkera za pojedine poremećaje i bolesti, te se danas primjenjuje u širokom spektru istraživanja. Biomarkeri su definirani kao karakteristične komponente u biološkim uzorcima, koji su izmjereni objektivnim metodama i evaluirani kao indikatori normalnog ili poremećenog biološkog procesa. U ne-ciljanom metabolomskom pristupu se pokušava utvrditi prisutnost karakterističnih grupa koje se sastoje od više biomarkera koji pripadaju nekom metaboličkom putu, zato jer takve grupe biomarkera imaju veću dijagnostičku vrijednost od pojedinačnih biomarkera (REEVE-JOHNSON i sur., 2016).

## 2. HIPOTEZA

Adipociti luče razne tvari zajedničkim imenom nazvane adipokini, čija precizna funkcija još nije razjašnjena. Oni mogu utjecati i na metaboličke promjene. U istraživanju problema koje prate povećanu tjelesnu težinu i pretilost kod mačaka očekuju se promjene u sustavima čija je funkcija poremećena kao posljedica proliferacije masnog tkiva. Moguća posljedica je snižavanje koncentracije adiponektina u cirkulaciji. Očekivane promjene metaboloma prvenstveno obuhvaćaju promjene u metabolizmu aminokiselina. Pretpostavljamo da mačke sa povećanom tjelesnom težinom i pretilošću, ali bez utvrđenih metaboličkih poremećaja imaju manje promjene u metabolomu od mačaka koje uz povećanu tjelesnu težinu imaju i metabolički sindrom.

## 3. ISPITANICI I METODE

### 3.1. Ispitanici

U ovom radu sudjelovale su mačke, koje su bile podijeljene u 3 skupine, zdrave mačke sa normalnom tjelesnom težinom, zdrave mačke sa povećanom tjelesnom težinom i mačke sa povećanom tjelesnom težinom i metaboličkim sindromom. Životinje su kućni ljubimci privatnih vlasnika, koji su uz potpisani informirani pristanak sudjelovali u provođenju sistematskog pregleda zdravlja svojih životinja. U okviru toga, uz detaljni klinički pregled, učinjena je kompletna hematološka i biokemijska analiza uzorka periferne krvi istraživanih mačaka. pasa.

Za provođenje sistematskog pregleda mačaka i izradu ovog rada izdano je odobrenje Povjerenstva za etiku Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Skala od 1-9 korištena je u procjeni tjelesne mase, pri čemu indeks 5 označava normalnu težinu, a indeksi 6-9 predstavljaju preveliku težinu (LAFLAMME, 1997; BALDWIN, 2010). Tjelesnu težinu određivali smo pomoću BCS (Body Condition Score) metode. To je semikvantitativna, opće prihvaćena metoda koja uključuje subjektivni fizikalni pregled te palpaciju životinje (OKADA i sur., 2017). U obzir se uzimaju palpacija rebara, inspekcija abdomena, struka, lumbalnih kralježaka te pelvičnih kostiju kako bi se utvrdila prisutnost i opseg visceralne masti. Na temelju navedenog, životinji se dodjeljuje indeks debljine koji se nalazi u rasponu od 1 do 9. Normalan BCS indeks trebao bi se u zdravih jedinki kretati između 4 i 5 (BALDWIN, 2010). Kliničkim i laboratorijskim pregledom ustanovljeno je da su sve istraživane životinje bile zdrave u trenutku pregleda, bez registriranih poremećaja u zdravlju u posljednja 2 mjeseca. Sve skupine u istraživanju sadržavale su mačke različitih pasmina i dobi. Mačke su podijeljene na 3 skupine:

**N** grupa životinja sastojala se od 10 zdravih životinja idealne tjelesne težine

**O** grupa životinja formirana je od 10 klinički zdravih životinja, koje su imali pretjeranu tjelesnu težinu, kod kojih nije dijagnosticiran metabolički sindrom

**M** skupina mačaka sadržavala je 8 mačaka koje su također bili klinički zdrave, sa pretjeranom tjelesnom težinom i dijagnosticiranim metaboličkim sindromom (MS)

Metabolički sindrom dijagnosticiran je prema slijedećim kriterijima: (1) BCS >3.5/5 ili 5/9, (2) glukoza (mg/dL) >120, (3) trigliceridi (mg/dL) ili ukupni kolesterol (mg/dL) >165 i >180, (4) adiponektin (μg/mL) <3.0. (OKADA i sur.,2017).

### 3.2. Metode

Nakon detaljnog kliničkog pregleda, krv je uzeta natašte iz cefalične vene, u dvije epruvete: jednu sa EDTA antikoagulansom za hematološke pretrage, i drugu sa gelom aktivatorom zgrušavanja, za biokemijske pretrage. Nakon procesa zgrušavanja, epruveta za serum sa aktivatorom zgrušavanja centrifugirana je na 1200 g tijekom 10 minuta, nakon čega je dio seruma odvojen za rutinske biokemijske analize, a dio pohranjen na -80°C do izvođenja spektrometrijskih mjerenja.

Hematološka mjerenja provedena su upotrebom automatskog analizatora "Horiba ABX cell counter" (Diagnostics, Montpellier, France) sa posebnim programom za pojedine vrste životinja, na programu prilagođenom specifičnostima u hematologiji za mačke, a biokemijska na automatskom analizatoru Olympus AU600 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan), upotrebom standardiziranih metoda i originalnih reagensa proizvođača.

Koncentracija adiponektina određena je upotrebom ELISA testa proizvođača Biotang (Biotang Source International, Camarillo, USA). Serum mačaka nanosi se na pločice sa imobiliziranim antitjelima za adiponektin. Antitjela su specifična za adiponektin mačaka. Da bi se koncentracija pravilno očitala, paralelno sa uzorcima izrađuje se i kalibracijska krivulja sa različitim razjeđenjima poznate koncentracije mačjeg adiponektina. Kalibracijska krivulja je izrađena u duplikatu, radi točnosti mjerenja. U analizi se koristi multikanalna pipeta kako bi uvjeti mjerenja bili što sličniji za standarde i mjerene uzorke. Nakon vezanja adiponektina iz uzorka seruma, pločica se ispire i dodaje reagens TMB koji razvija obojenje koje je proporcionalno količini analita. Na kraju se dodaje reagens koji prekida razvoj reakcija, te pločica čita na aparatu Biotec (BioTek Instruments, Vermont, USA) na valnoj duljini 450 nanometara. Koncentracije adiponektina čitaju se sa kalibracijeke krivulje.

Da bi se provela spektrometrijska analiza serumskog metaboloma mačaka, uzorak seruma je odmrznut na +4ºC, tijekom jednog sata, bez zagrijavanja uzorka. Za ekstrakciju je upotrijebljeno ekstrakcijsko otapalo koje se sastojalo od kloroforma, metanola i vode, u omjeru 1:3:1. Jedan alikvot otapala sačuvan je za testiranje pozadinskog signala na spektrometru masa. Za provođenje kvalitete kontrole, napravljen je i skupni uzorak, na način da je 10 ml svakog uzorka pomiješan u jednu epruvetu. Nakon toga, provedena je ekstrakcija metabolita iz svakog uzorka, na način da je 25 ml preneseno u zasebnu eppendorf epruvetu, te dodano 1000 ml ekstrakcijskog otapala. Svi postupci provedeni su na ledu, radi prevencije raspada nestabilnih metabolita. Uzorci su nakon

toga dobro promiješani te centrifugirani tijekom 3 minute na 13.000 g na 4ºC. Nakon toga, 400 ml supernatanta prenešeno je u staklene spremnike za mjerenje na aparatu MS Thermo Scientific Q Exactive Plus uz ionski izvor Nanospray Flex i SilicaTip emiter.

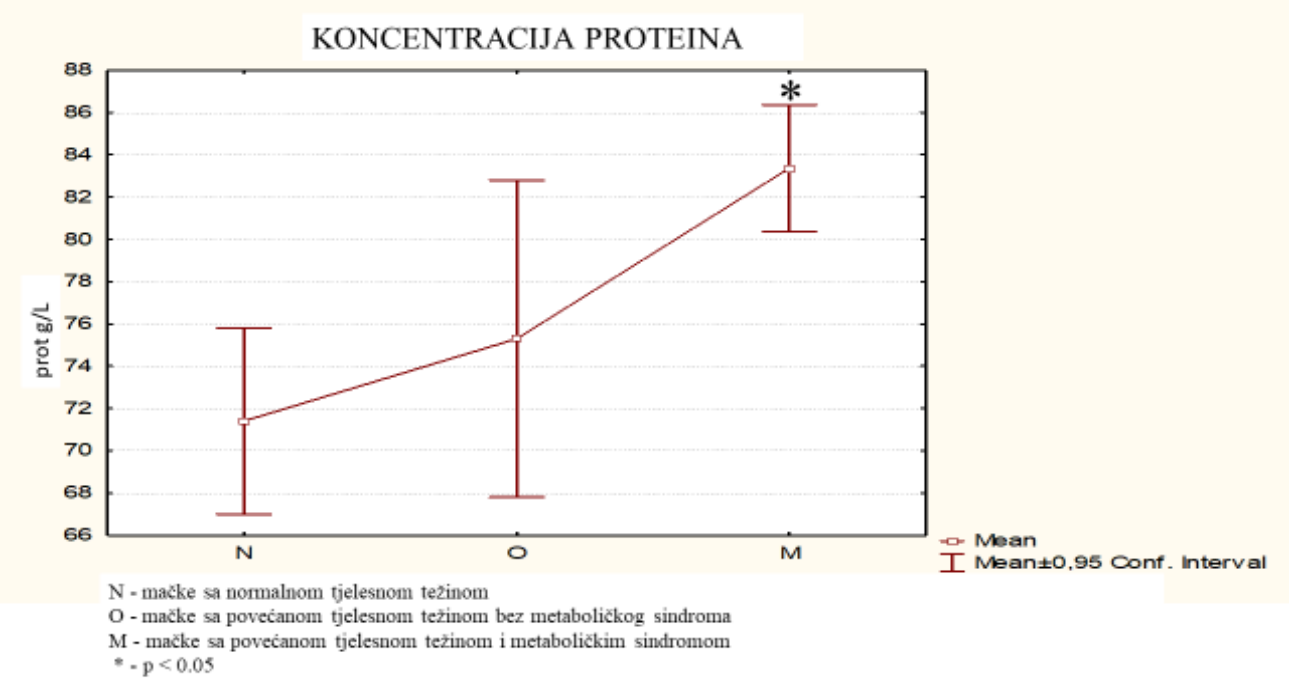
### 3.3. Statistička obrada podataka

Biokemijski i hematološki podaci obrađeni su upotrebom programa Statistica. Ovisno o vrsti distribucije podataka, parametrijskoj ili neparametrijskoj, podaci su uspoređeni t testom ili Mann Whitney testom, pri čemu su O grupa i M grupa životinja uspoređene sa N grupom. Za statističku značajnost određen je p 0.05. Podaci dobiveni spoektroskopijom masa obrađeni su programom The Polyomics integrated Metabolomics Pipeline (PiMP), pri čemu su utvrđeni statistički značajni parametri metaboloma i statistički značajni metabolički putevi.

## 4. REZULTATI

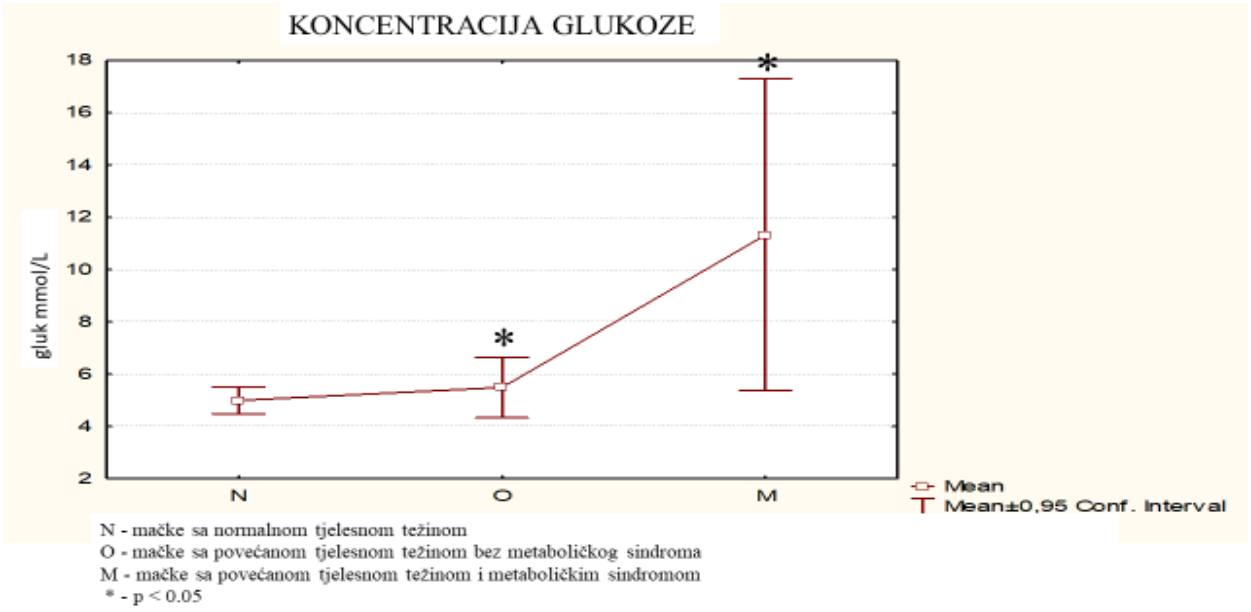
Svim životinjama iz N, O i M grupe izrađen je hemogram, sa svim standardnim parametrima, uz diferencijalnu krvnu sliku. Analiziran je broj krvnih stanica, eritrocita, leukocita i trombocita, izmjerena je koncentracija hemoglobina i hematokrit, određeni su volumeni eritrocita i trombocita te izračunate prosječne koncentracije i prosječan sadržaj hemoglobina u eritrocitima. Određen je i postotak segmentiranih leukocita, limfocita, monocita, eozinofila i bazofila u ukupnom broju leukocita. Također, pregledani su razmazi krvi i utvrđene eventualne morfološke osobitosti. U hematološkim analizama između skupina O i N i skupina M i N nisu utvrđene statistički značajne razlike.

U serumu mačaka provedene su i biokemijske analize: koncentracija uree, kreatinina, ukupnih proteina i albumina, glukoze, triglicerida i kolesterola te su izmjerene aktivnosti enzima aspartat i alanin aminotransferaze (AST i ALT, gama glutamil transferaze (GGT) i alkalne fosfataze (ALP). Statistički značajne razlike utvrđene su u usporedbi O i M skupine sa N skupinom mačaka u koncentracijama proteina, glukoze, triglicerida i kolesterola. Rezultati su prikazani su na slikama 1-4. Izmjerena je i koncentracija glavnog adipokina, adiponektina u serumu. Koncentracija adiponektina u serumu mačaka iz O i M grupe bila je sttistički značajno snižena u usporedbi sa N grupom mačaka.



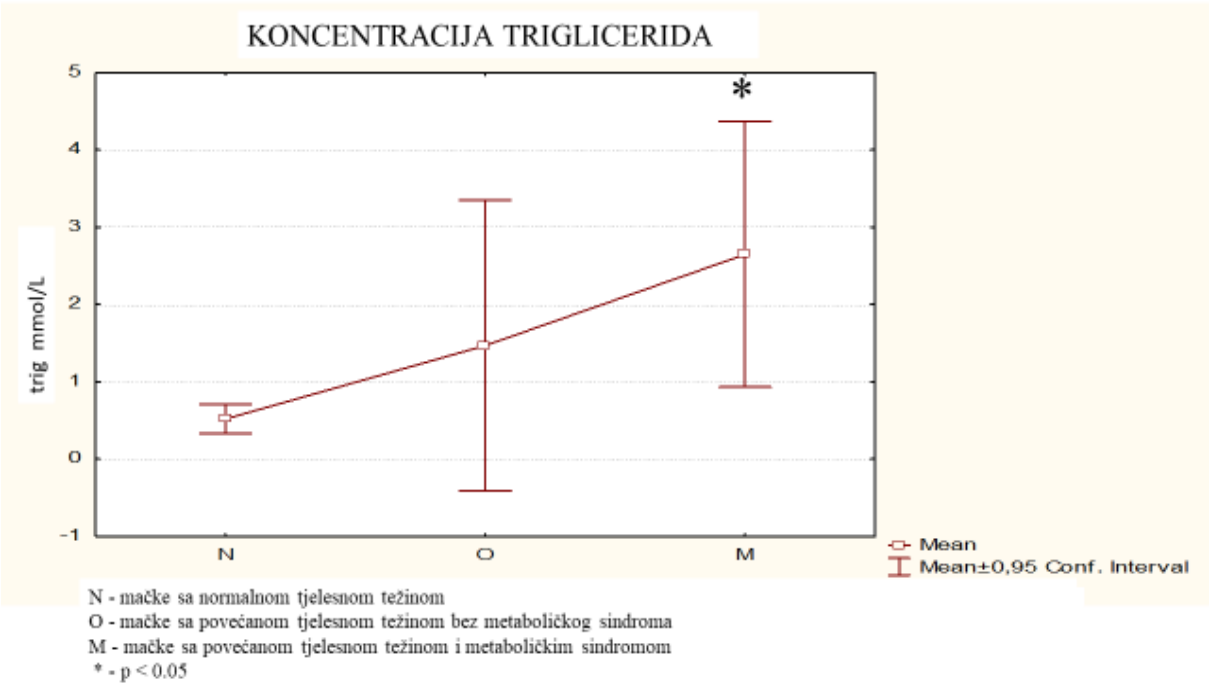

Grafikon 1: Koncentracija ukupnih proteina u serumu N, O i M grupe mačaka

Skupina M ima statistički značajno povećane koncentracije proteina ($p < 0.05$) u odnosu na skupinu N. Skupina O se značajno ne razlikuje sa N u koncentraciji serumskih proteina.



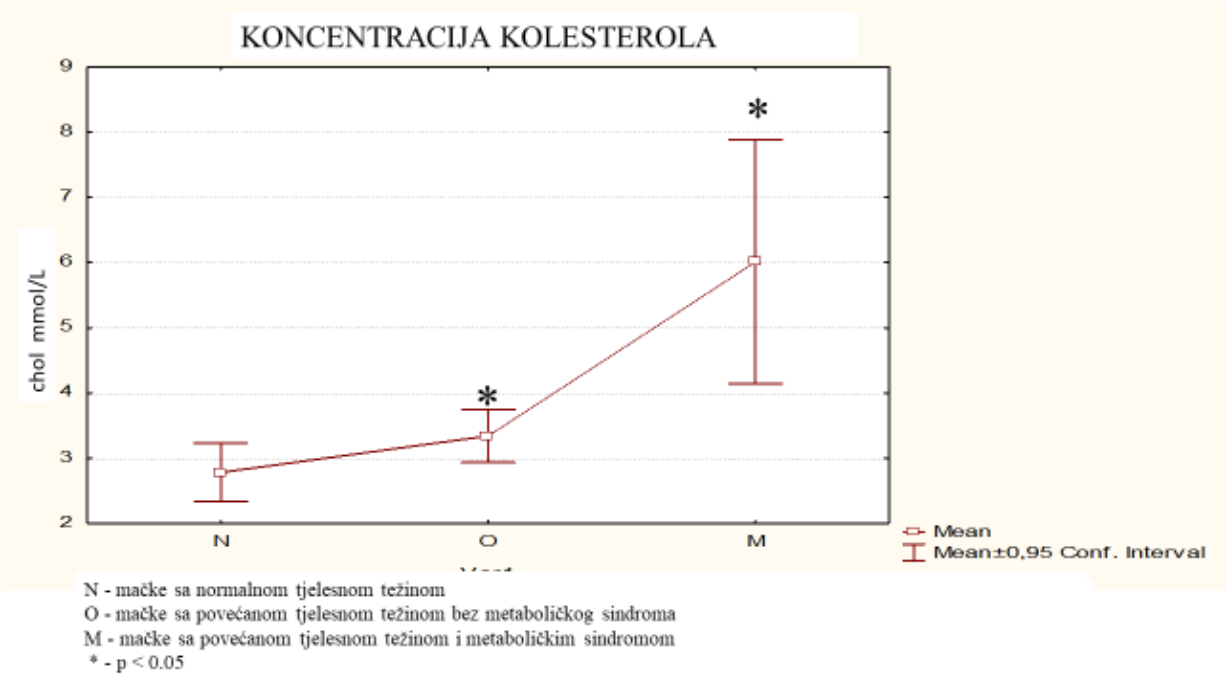

Grafikon 2: Koncentracija glukoze u serumu N, O i M grupe mačaka

Skupine O i M imaju statistički značajno povećane koncentracije glukoze ($p < 0.05$) u odnosu na skupinu N.



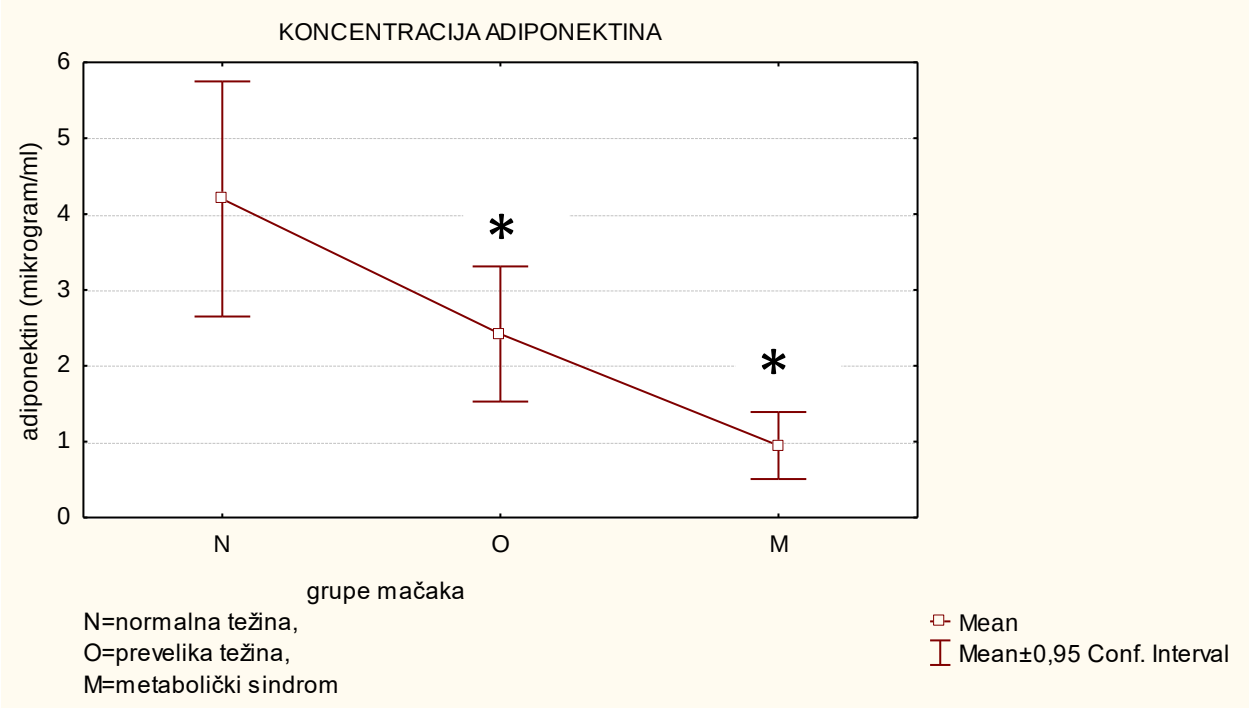

Grafikon 3: Koncentracija triglicerida u serumu N, O i M grupe mačaka

Skupina M ima statistički značajno povećane koncentracije triglicerida ($p < 0.05$) u odnosu na skupinu N. Skupina O se ne razlikuje značajno od N u koncentraciji triglicerida.




Grafikon 4: Koncentracija kolesterola  u serumu N, O i M grupemačaka

Skupine O i M imaju statistički značajno povećane koncentracije kolesterola u serumu ($p < 0.05$) u odnosu na skupinu N.



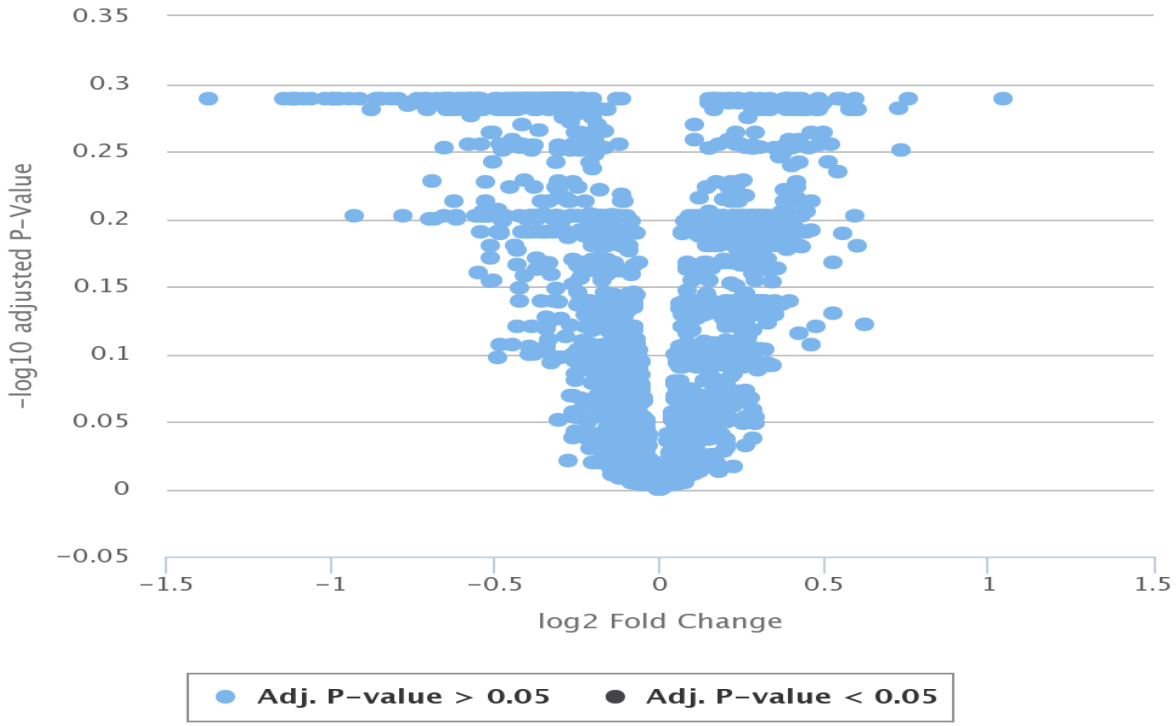

Grafikon 5: Koncentracija adiponektina u serumu N, O i M grupe mačaka

Skupine O i M imaju statistički značajno smanjene koncentracije adiponektina u serumu ($p < 0.05$) u odnosu na skupinu N.

U analizi metaboloma spektroskopijom masa, prikazani pikovi su identificirani i anotirani na bazi omjera mase i retencijskog vremena. Uspoređeni su sa standardima. 44 metabolita odgovara poznatim standardima.

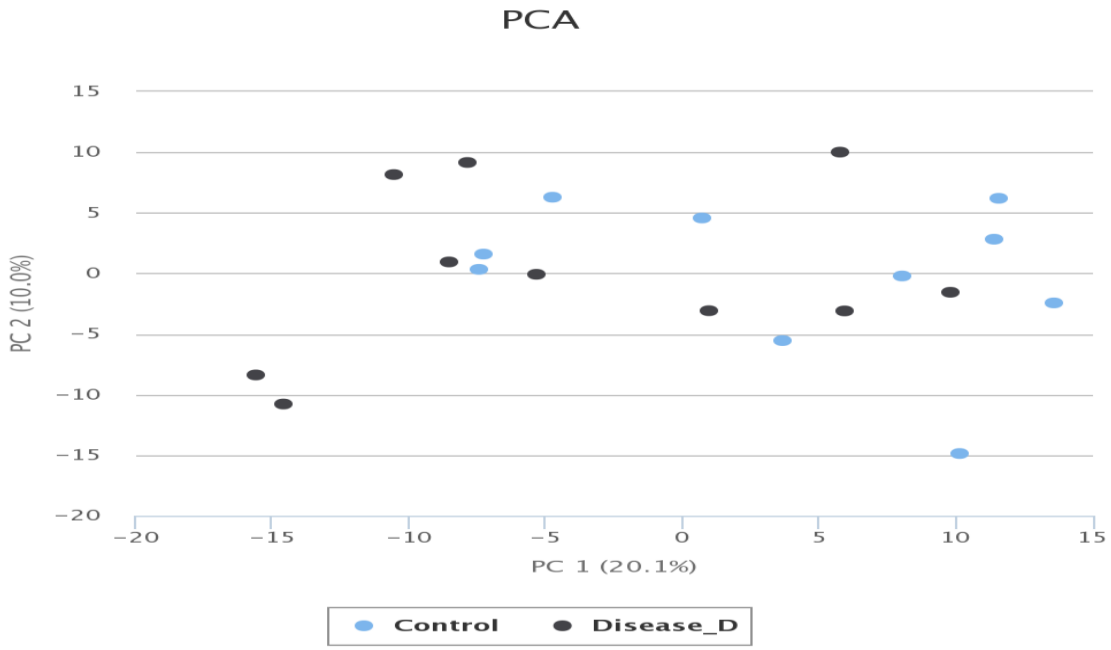
Grafički prikaz "Volcano plot" uspoređuje značajnosti promjena na osi X i Y koje označavaju statističku značajnost intenziteta promjena (fold change). Grupa O je uspoređena sa grupom N. U toj usporedbi nisu utvrđene statističke značajnosti.

Statistička značajnost promjena metabolita između O i N grupe mačaka (Volcano plot) prikazuje O i N grupu mačaka.



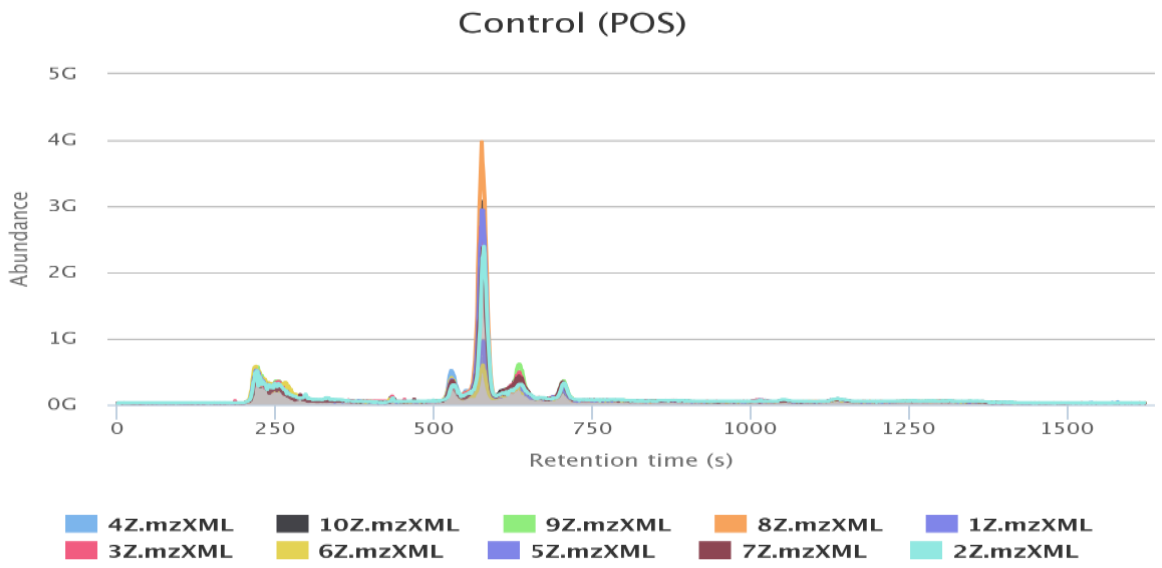

Grafikon 6: Metabolom O grupe mačaka u usporedbi sa N grupom.

Statistički značajne razlike nisu utvrđene.

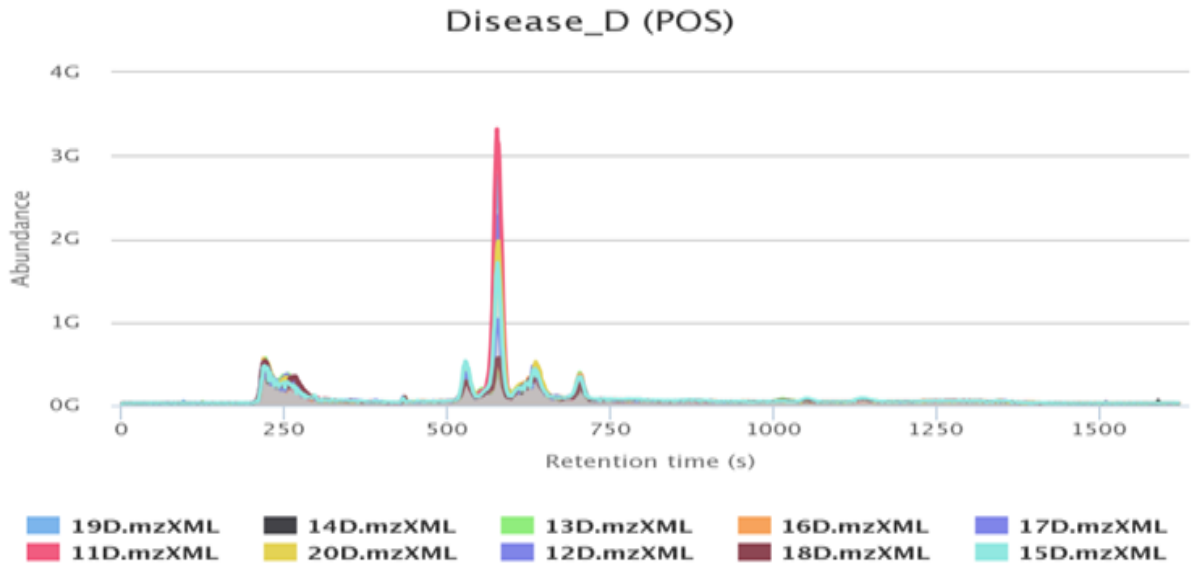



Grafikon 7: Distribucija metaboloma O grupe mačaka u usporedbi sa N grupom.

Statistički značajne razlike nisu utvrđene.

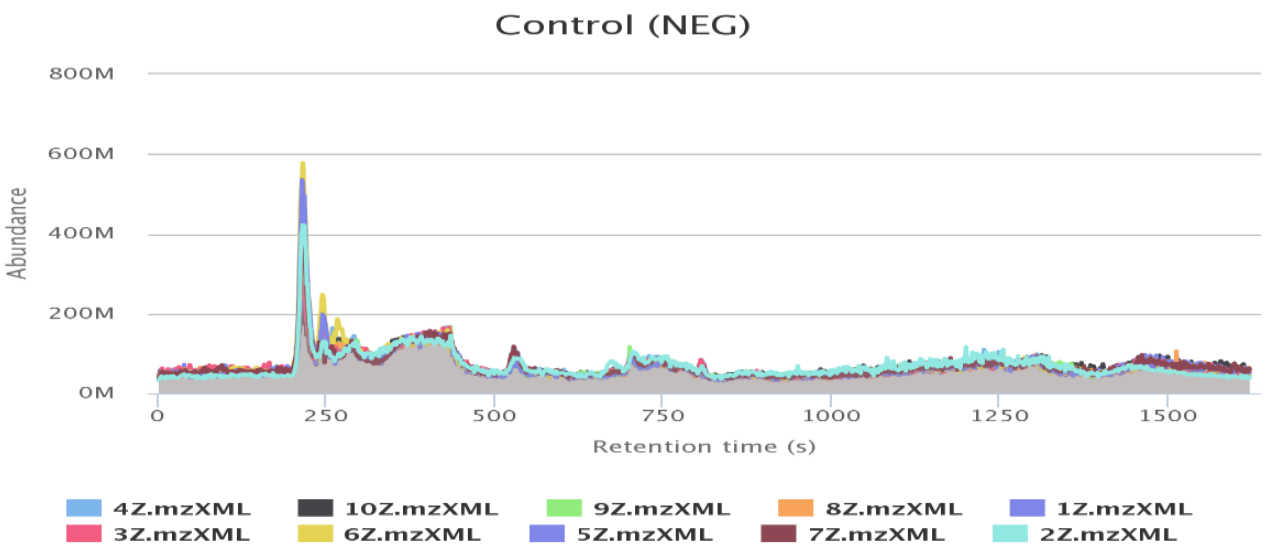



Grafikon 8: Intenzitet signala u ovisnosti o retencijskom vremenu pozitivno nabijenih iona kontrolne skupine mačaka (N)

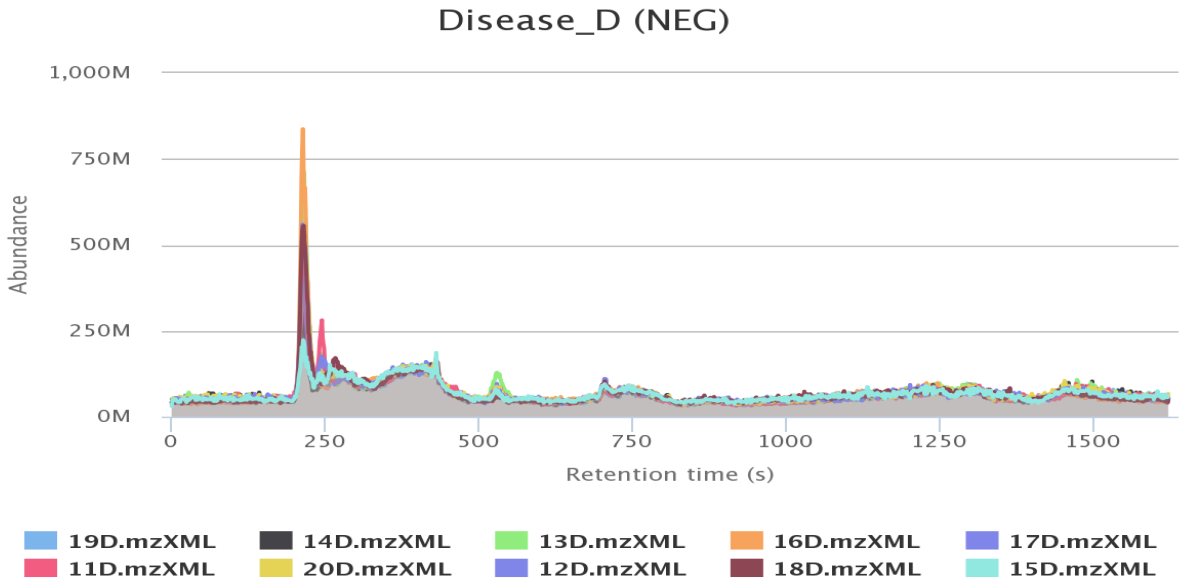



Grafikon 9: Intenzitet signala u ovisnosti o retencijskom vremenu pozitivno nabijenih iona kontrolne skupine mačaka (N)

Grafikoni 8 i 9 prikazuju rezultate očitanja pozitivno nabijenih iona N i O grupe životinja. Iz prikaza je vidljivo da su svi ioni detektirani u uzorcima zabilježeni i u kontrolnom uzorku koji služi kao kvaliteta kontrole provedenog mjerenja.




Grafikon 10: Intenzitet signala u ovisnosti o retencijskom vremenu negativno nabijenih iona kontrolne skupine mačaka, N

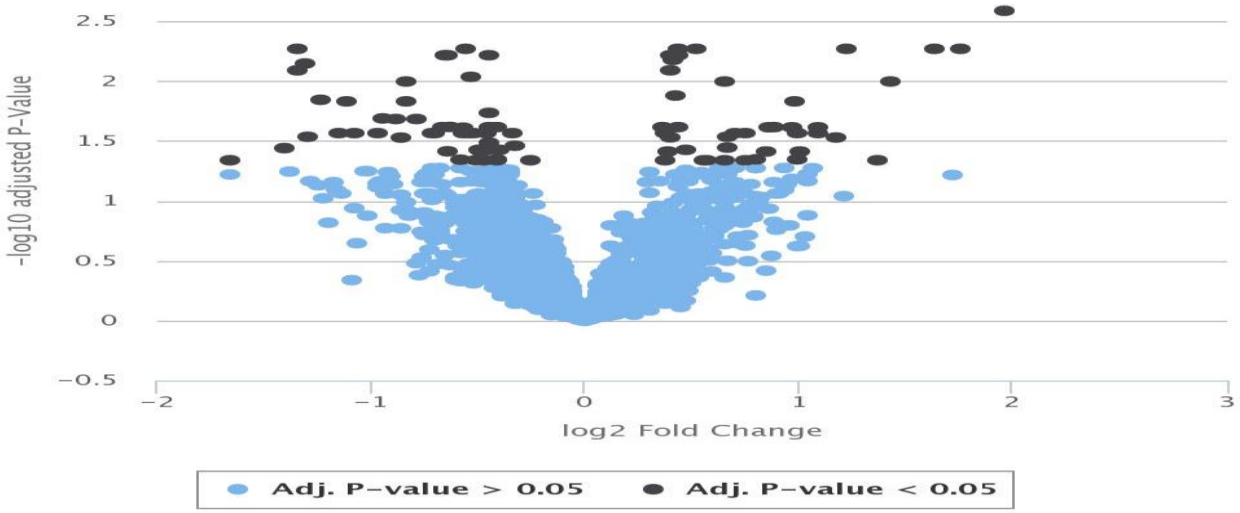



Grafikon 11: Intenzitet signala u ovisnosti o retencijskom vremenu negativno nabijenih iona O skupine mačaka

Grafikoni 10 i 11 prikazuju rezultate očitanja negativno nabijenih iona N i O skupine mačaka. I iz ovog prikaza je također vidljivo da su svi ioni detektirani u uzorcima zabilježeni i u kontrolnom uzorku.

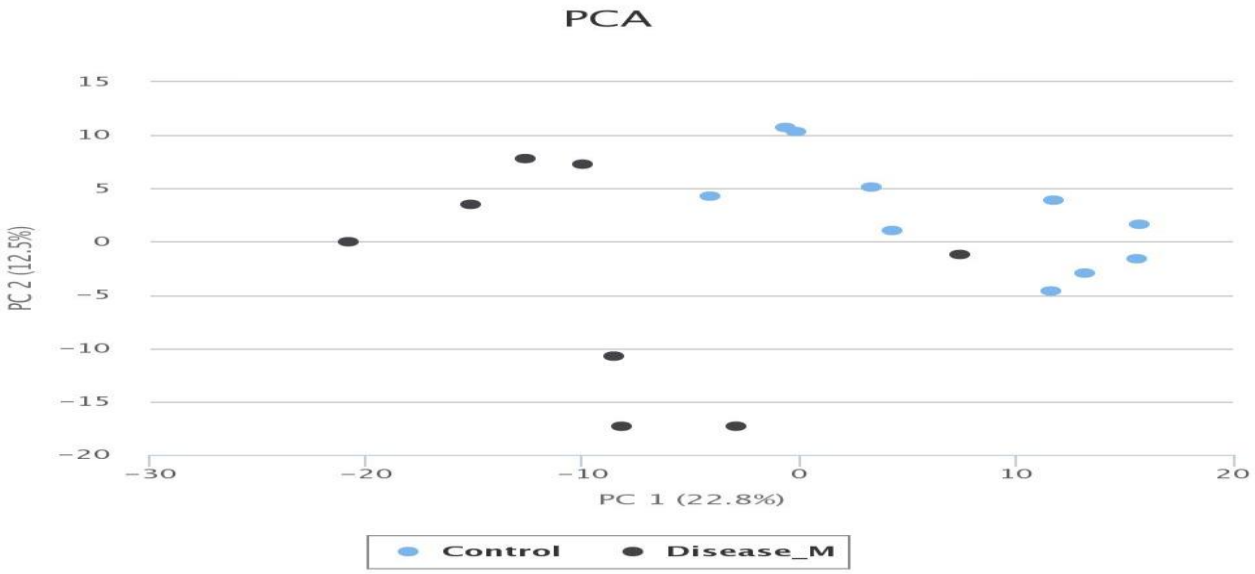
Prikazani pikovi su identificirani i anotirani na bazi omjera mase i retencijskog vremena. Upoređeni su sa standardima. 44 metabolita odgovara poznatim standardima.

Statistička značajnost promjena metabolita između M i N grupe mačaka (Volcano plot) prikazana je na slici 11, gdje je vidljivo da 44 metabolita pokazuju značajne razlike.



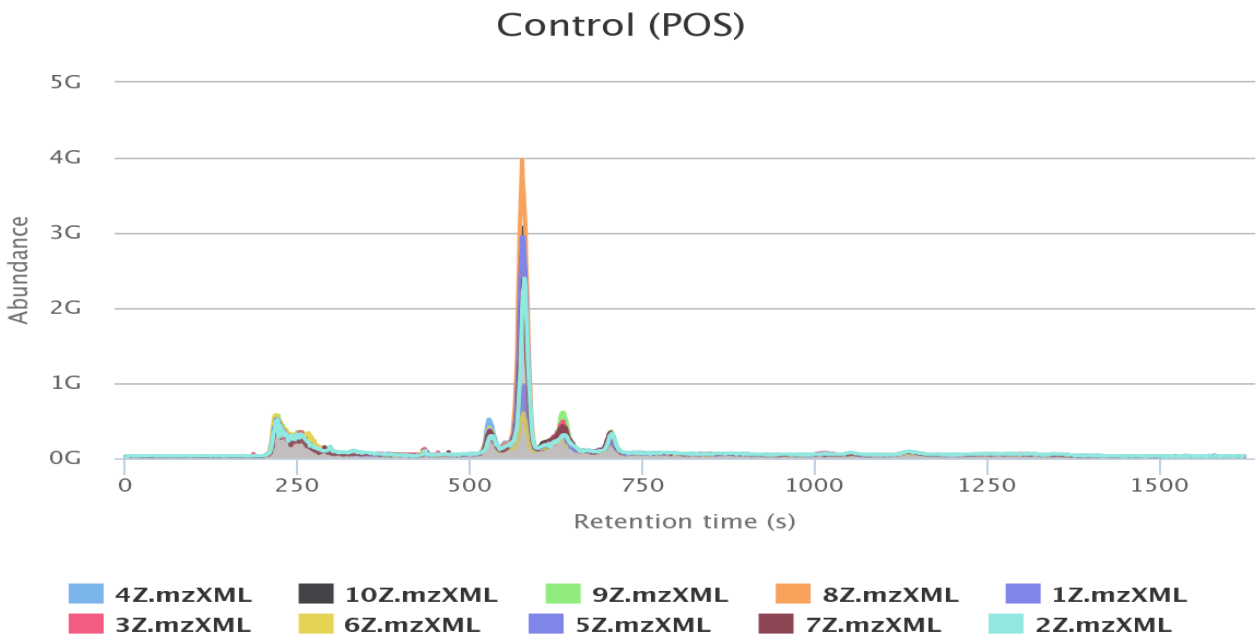

Grafikon 11: Metabolom M mačaka u usporedbi sa N mačkama.

Statistički značajne razlike utvrđene su u metaboličkim putevima aminokiselina i biotina.

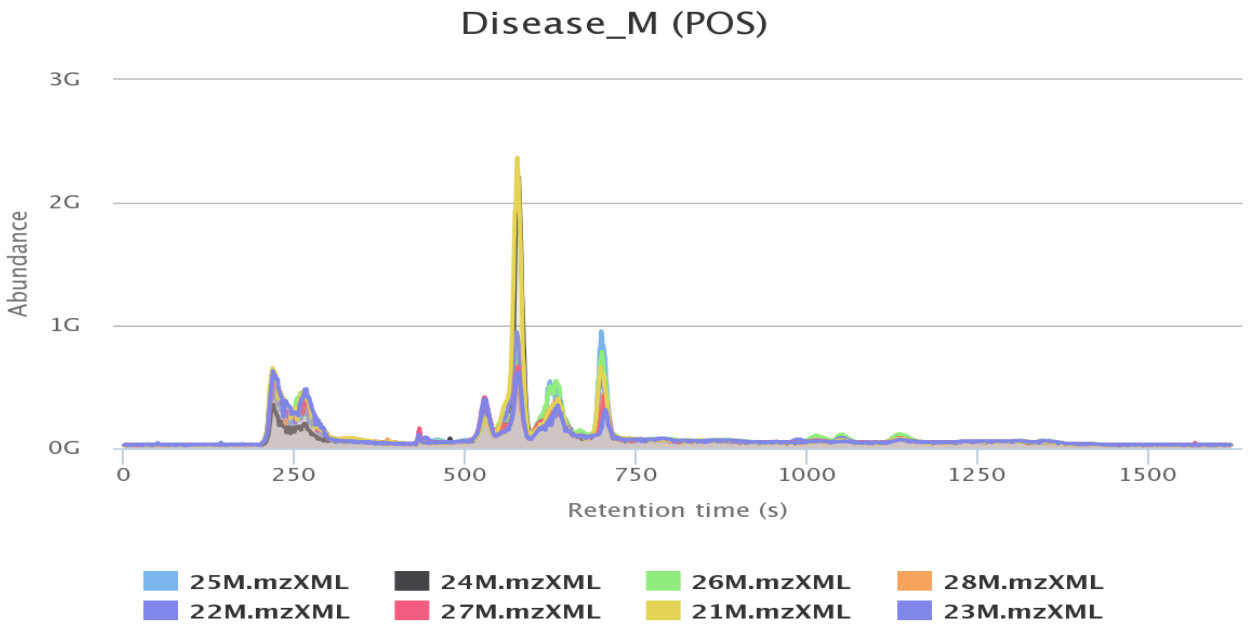



Grafikon 12: Distribucija M mačaka u usporedbi sa N mačkama.

Statistički značajne razlike utvrđene su u metaboličkim putevima aminokiselina i biotina.

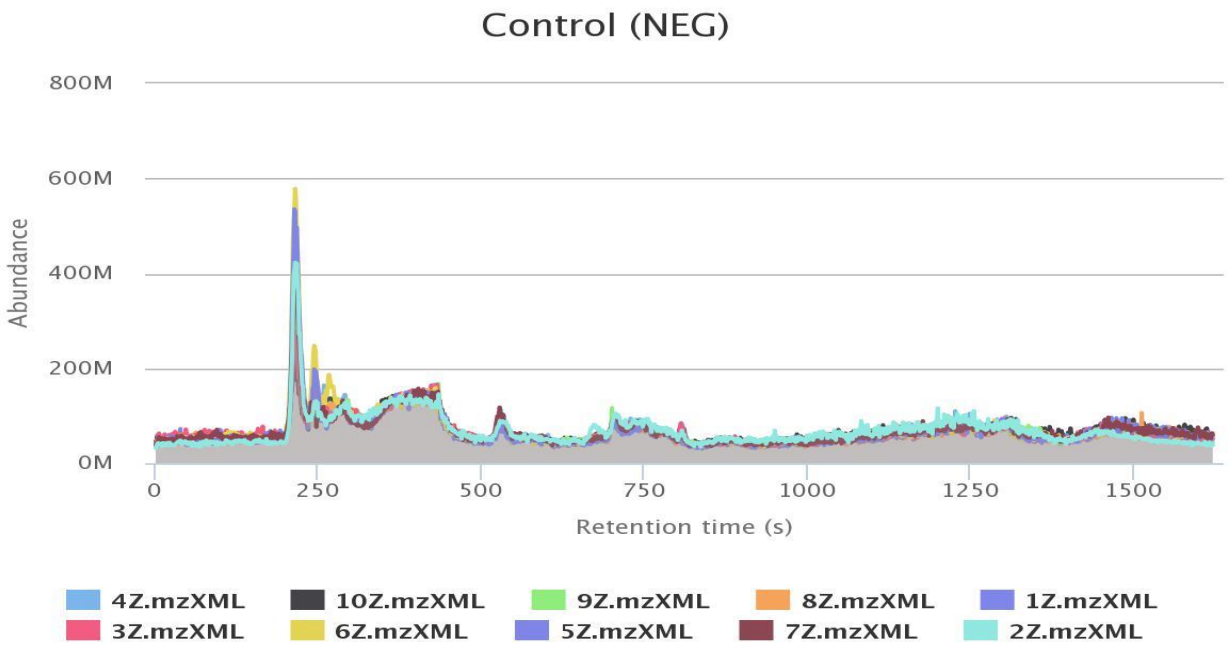



Grafikon 13: Intenzitet signala u ovisnosti o retencijskom vremenu pozitivno nabijenih iona N skupine mačaka

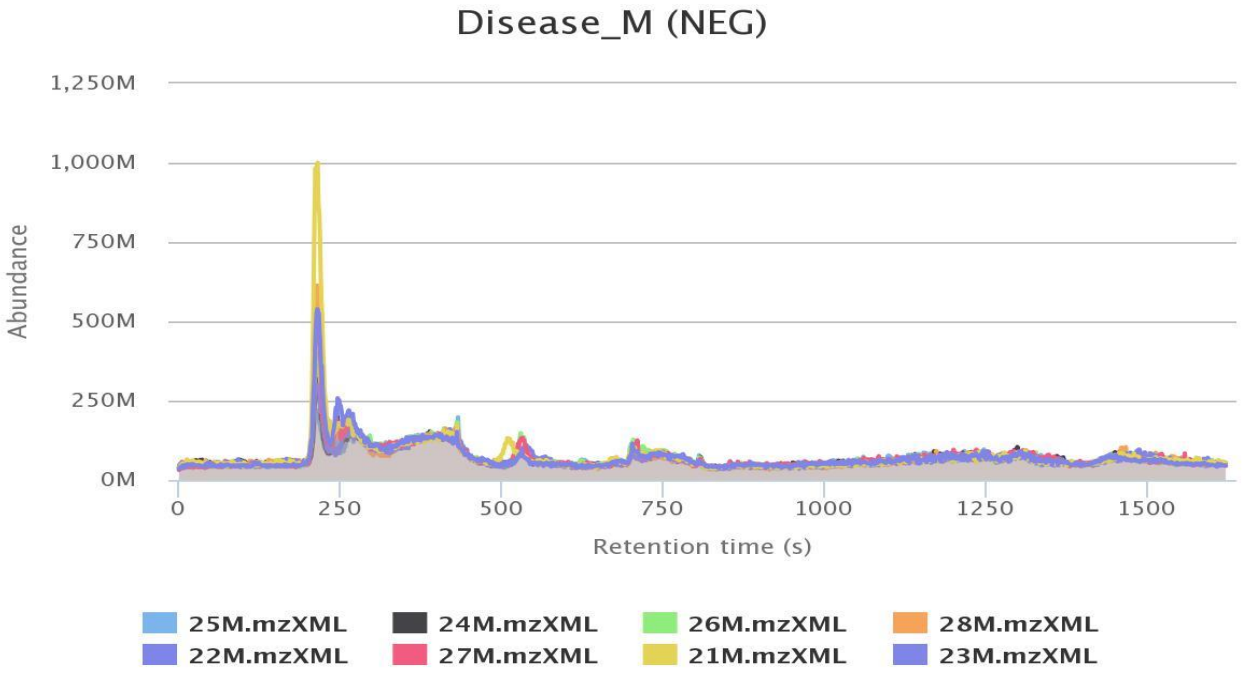



Grafikon 14: Intenzitet signala u ovisnosti o retencijskom vremenu pozitivno nabijenih iona M skupine mačaka

Grafikoni 13 i 14 prikazuju  rezultate očitanja pozitivno nabijenih iona N i M skupina mačaka. Iz prikaza je vidljivo da su svi ioni detektirani u uzorcima zabilježeni i u kontrolnom uzorku koji služi kao kvaliteta kontrole provedenog mjerenja.




Slika 15: Intenzitet signala u ovisnosti o retencijskom vremenu negativno nabijenih iona N skupine mačaka




Slika 16: Intenzitet signala u ovisnosti o retencijskom vremenu negativno nabijenih iona M skupine mačaka

Grafikoni 15 i 16 prikazuju rezultate očitanja negativno nabijenih iona N i M skupina mačaka. Iz prikaza je vidljivo da su svi ioni detektirani u uzorcima zabilježeni i u kontrolnom uzorku koji služi kao kvaliteta kontrole provedenog mjerenja.

U usporedbi N i M grupe životinja, 2 identificirana metabolita značajno su promijenjena, a radi se o pikovima kinurenina na pozicijama 2411 i 335.

Tablica 1: Rezultati očitanja pikova metabolita N i M grupe mačaka i njihov intenzitet

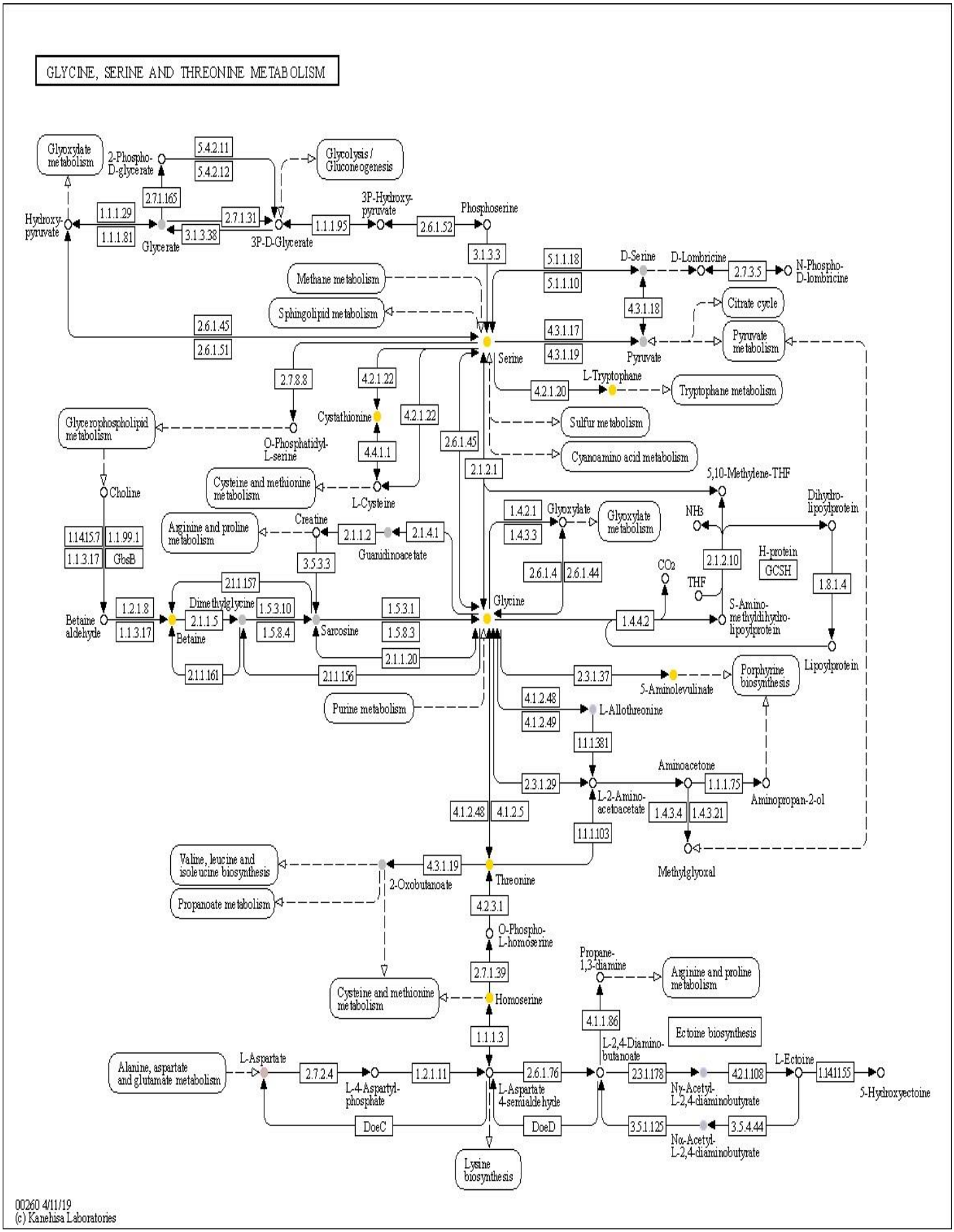
| Compound | Peak | Log FC | P-Value | Adj. P-Value | N intensity | M intensity |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **L-Kynurenine** | 2411 | -1.07 | 0.00055 | 0.027 | 97870 | 43546 |
| **L-Kynurenine** | 335 | -0.96 | 0.00057 | 0.027 | 2645636 | 1297504 |

Intenzitet dva pika koja označavaju L-kinurenin je statistički značajno smanjen u usporedbi M mačaka sa N mačkama ($P < 0.027$).

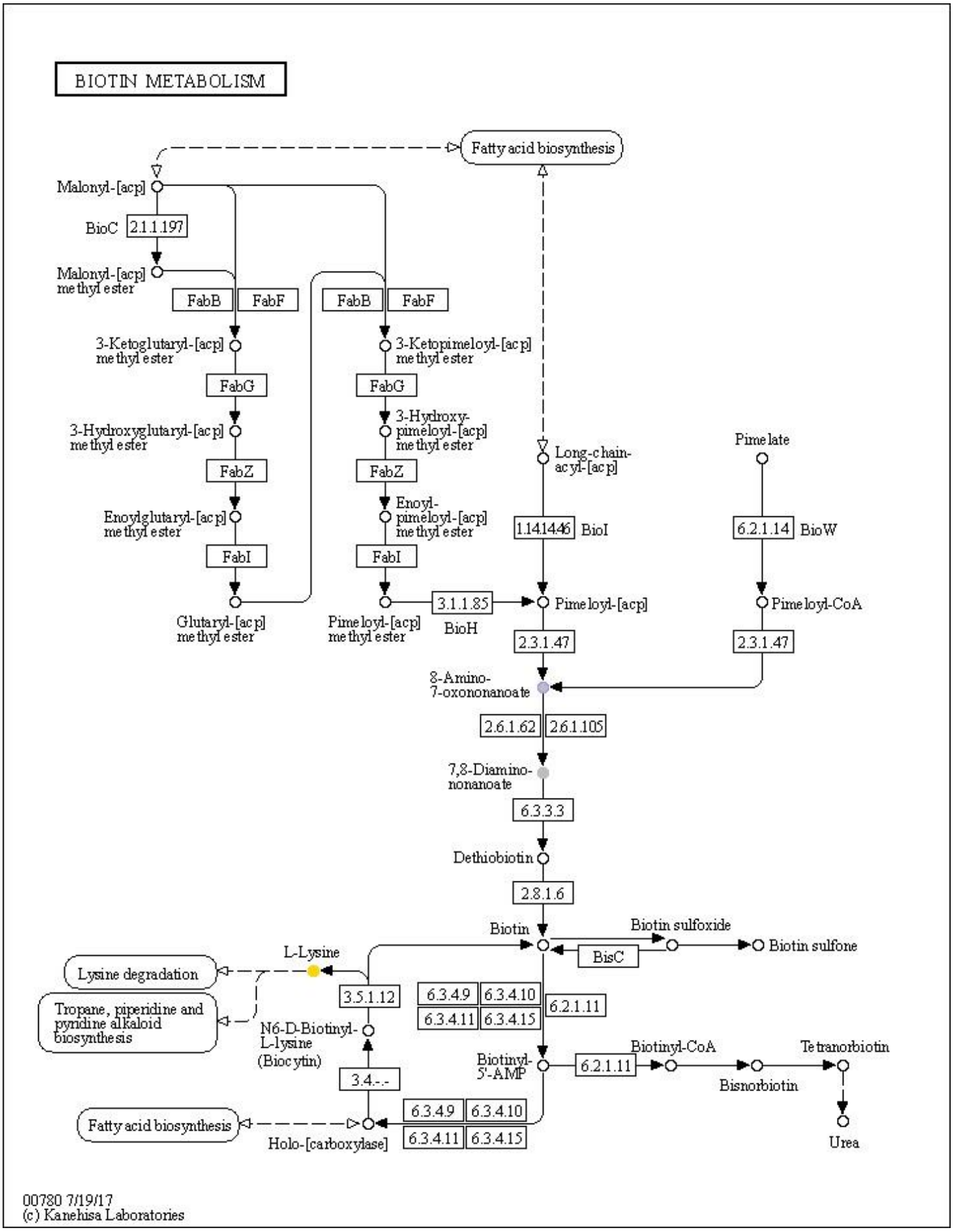
Grafikoni 17 i 18 prikazuju metaboličke mape aminokiselina kod statistički značajno različitih puteva između grupe M u usporedbi sa N. U M skupini mačaka koje karakterizira povećana tjelesna težina i metabolički sindrom, u usporedbi sa N skupinom životinja statistički su značajno suprimirani metabolički putevi glicina, serina i treonina, kao i metabolički put biotina.

U metaboličkom putu glicina, serina i treonina ustanovljene su snižene vrijednosti serina, triptofana, glicina, betaina, treonina, aminolevulinske kiseline, homocisteina i N-acetildiaminobutirata.

U metaboličkom putu biotina snižene su vrijednosti aminooksononanoata i lizina.




Grafikon 17: Prikaz metaboličke mape glicina, serina i treonina u usporedbi M mačaka sa N mačkama




Grafikon 18: Prikaz metabolizma biotina
u usporedbi M sa N grupom mačaka

## 5. RASPRAVA

Debljina se danas javlja u pandemijskim razmjerima i kod ljudi i kod životinja. Glavni problem i kod ljudi i kod mačaka predstavlja neograničen pristup visokokalorijskoj hrani uz nedostatak fizičke aktivnosti. Energetski metabolizam glukoze i patofiziološki mehanizmi kojima debljina dovodi do razvoja dijabetesa tipa 2 su vrlo slični, zato mačke predstavljaju izvrstan model za istraživanja i u humanoj medicini (HOENIG, 2006).

U O skupini mačaka, koje su imale preveliku tjelesnu težinu, ali bez dijagnosticiranog metaboličkog sindroma, utvrđene su statistički značajne povećane koncentracije glukoze i kolesterola u krvi, te snižena koncentracija adiponektina u usporedbi sa N skupinom mačaka. U rezultatima hematoloških analiza nisu utvrđena statistički značajna odstupanja između O i N skupine. Također, u metabolomu O skupine mačaka ne postoje značajna odstupanja u usporedbi sa N skupinom.

Metaboličke komplikacije koje su povezane uz debljinu i pretilost izrazito su heterogene. SMITH i sur. (2019) su u istraživanjima debljine kod ljudi ustanovili da je 50% populacije sa pretilošću metabolički zdravo ukoliko se zdravlje definira kao odsutnost metaboličkog sindroma. U istraživanjima zdravstvenog statusa kod ljudi, velika meta-analiza provedena je na 40 populacija, te je ustanovljena prevalencija metabolički zdrave debljine (MHO) kod 35% pretilih jedinki (LIN i sur., 2014). Međutim, ukoliko za zdravlje definira kao odsutnost svih komponenti koje sačinjavaju metabolički sindrom uz normalnu osjetljivost na inzulin, tada se zdravim može smatrati samo 5% pretile populacije.

Glavni faktori koji su povezani sa konverzijom MHO u metabolički poremećen oblik (MUO) su snižavanje osjetljivosti na inzulin i povećavanje koncentracije glukoze u cirkulaciji natašte (BELL i sur., 2016). Rizik za ovakvu tranziciju je veći kod osoba sa većim BCS, starijih osoba te onih sa koncentracijama analita koji su važni za razvoj metaboličkog sindroma blizu gornjeg referentnos raspona (GUO i GARVEY, 2016; HASIMOTO i sur., 2017; MOUSSA i sur.,2019). U istraživanjima debljine kod mačaka BRENNAN i sur., 2006 zaključili su da se metaboličke promjene javljaju rano u razvoju debljine kod mačaka. Autori su zaključili da je ekspresija inzulin-senzitivnog transportera, GLUT-4, u mišićima i masnom tkivu pretilih mačaka značajno niža u usporedbi sa ekspresijom kod životinj normalne tjelesne težine.

Ovakvi rezultati u suglasju su sa rezultatima dobivenim u našem istraživanju na mačkama, koje ne pokazuju znakove bolesti niti metaboličkih poremećaja, te su dovedene kao zdrave na

sistematski pregled. Ipak, neki elementi za procjenu metaboličkog sindroma (glukoza, kolesterol) su statistički značajno povećani u odnosu na N skupinu mačaka, iz čega možemo zaključiti da je i u populaciji mačaka prisutno svojevrsno tranzicijsko stanje vezano sa viškom tjelesne težine, te postoji mogućnost da u skorijoj budućnosti razviju metabolički sindrom.

Pretilost bez metaboličkih poremećaja, MHO, je termin koji se koristi u opisu fenotipa pretilosti bez metaboličkih disfunkcija, ili sa vrlo malo njih. Oko 35 % ljudi sa pretilosti ne pokazuje znakove metaboličkih poremećaja (MAGKOS, 2019). U usporedbi metaboloma plazme pasa normalne i prevelike tjelesne težine (SÖDER i sur.,2019), također nisu ustanovili značajne razlike. Studije na glodavcima ukazuju na razlike u biološkim procesima u adipoznom tkivu kao odgovor na preveliku tjelesnu težinu, te da različit biološki odgovor može uzrokovati ili prevenirati metaboličke disfunkcije (SMITH i sur., 2019). Kod mačaka ovakva detaljna istraživanja još nisu provedena, te naše istraživanje daje jedno od prvih rezultata o prusutnosti MHO i kod mačaka sa prevelikom tjelesnom težinom.

Okolnosti koje dovode do različitih efekata pretilosti na metabličko zdravlje još nisu u potpunosti razjašnjene. Mogući mehanizmi u održavanju zdravog metaboličkog statusa u MHO uključuju povoljnu distribuciju adipoznog tkiva i odsutnost inflamacije (CHANG i sur., 2017). Manji sadržaj masti u jetri, manje visceralnog adipoznog tkiva, veća osjetljivost na inzulin i veća sekrecija inzulina, veća kardiorespiratorna aktivnost i manje masti u donjim dijelovima tijela predstavljaju povoljne aspekte za MHO kod ljudi (MAGKOS, 2019).

Usprkos činjenici da neki ispitanici ne pokazuju znakove metaboličkih poremećaja unatoč debljini u trenutku ispitivanja, zdravstveni status je dinamičan i podložan promjenama. SORIGUER i sur. (2013) pokazali su da 30-40% MHO individua nakon 6 godina praćenja metaboličkog statusa počinje pokazivati znakove metaboličkih poremećaja. SMITH i sur. (2019) utvrdili su da tijekom 10 godina 50% pojedinaca sa MHO razvije MUO. Stoga autori postavljaju pitanje: da li MHO predstavlja posebnu grupu sa specifičnim metabolizmom u kojemu ne dolazi do promjena, ili se radi o svojevrsnom tranzicijskom stanju koje sa vremenom vodi ka razvoju MUO. Autori stoga zaključuju da je rana intervencija i modifikacija tjelesne težine važna i neophodna, bez obzira na trenutnu prisutnost MHO. Slične smjernice mogle bi se usvojiti i u veterinarskoj medicini, u cilju dugoročnog održavanja zdravlja mačaka sa prevelikom tjelesnom težinom.

Skupine pretilih mačaka i mačaka sa metaboličkim sindromom imaju statistički značajno smanjene koncentracije adiponektina u odnosu na mačke normalne tjelesne težine.

Adiponektin je važan faktor koji pridonosi povećanju osjetljivosti stanica na inzulin stimulirajući fosforilaciju 5'AMP-aktivirane protein kinaze koja potom aktivira unos glukoze u

stanicu preko GLUT4 transportera (RADIN i sur., 2009). Mnoge studije pokazale su da se koncentracija adiponektina smanjuje s pretilošću i povećava s gubitkom težine (TVARIJONAVICIUTE i sur., 2012; HOENIG i sur., 2013; HOENIG i sur., 2007), dok druga istraživanja nisu pokazala razlike u serumskoj koncentraciji adiponektina između normalnih i pretilih mačaka (BJORNVAD i sur., 2014).

U jednom istraživanju, plazmatski adiponektin u pretilih mačaka (7.2 +/- 1.5 microg/ml) bio je značajno manji nego onaj u normalnih mačaka (18.0 +/- microg/ml). Ovi rezultati ukazuju da je adiponektin vjerojatno odgovoran za funkciju inzulina i u mačaka te da bi mogao biti ciljana mokela u liječenju pretilosti i dijabetesa u mačaka (ISHIOKA i sur., 2009). U istraživanju Ishioke i sur., koncentracije adiponektina u plazmi 71-og psa bile su u negativnog korelaciji sa koncentracijom leptina. Adiponektin je bio niži u pretilih u odnosu na pse normalne tjelesne težine. Ovo se istraživanje podudara s ostalim istraživanjima koja sugeriraju da bi adiponektin mogao biti mjera za indeks adipoznosti i ciljana molekula za daljnja istraživanja u bolesti vezanih uz pretilost pasa (ISHIOKA, 2006). U istraživanju debljine u mačaka, Williams i sur. također su ustanovili snižene koncentracije cirkulirajućeg adiponektina u pretilih mački (WILLIAMS i sur., 2019). Nasuprot našim rezultatima, u istraživanjima utjecaja debljine na koncentraciju adiponektina kod mačaka, (BJORNVAD i sur., 2014) nisu ustanovili značajne razlike između normalno teških i pretilih životinja.

Adiponektin je endokrini faktor sintetiziran u masnom tkivu. Istraživanja su pokazala da on ima inzulin-senizibiliuirajuća (YAMAUCHI i sur., 2001), anti-aterogena i protuupalna svojstva (OKAMOTO, 2002; MATUSA i sur., 2002). Važno je, stoga, poznavati djelovanje adiponektina kako bi se ta svojstva mogla koristiti u terapijske svrhe kod bolesti poput metaboličkog sindroma, dijabetesa tipa 2 i kardiovaskularnih bolesti poput ateroskalroze. (ACHARI, 2017).

U M skupini mačaka u usporedbi sa N skupinom, statistički su značajno povećane koncentracije proteina, glukoze, triglicerida i kolesterola, a na temelju 3 navedena parametra dijagnosticiran je i metabolički sindrom. Adiponektin je snižen. Metabolički put glicina, serina i treonina značajno je suprimiran u odnosu na mačke normalne tjelesne težine. Također, aktivnost metaboličkog puta biotina je snižena, kao i serumska koncentracija kinurenina.

Mnogobrojna istraživanja pretilosti kod ljudi dovela su do zaključka da dijabetes, kao česta posljedica prevelike tjelesne težine i pretilosti, dovodi do promjena u metabolizmu aminokiselina. Koncentracija glicina u cirkulaciji pretilih životinja i ljudi je značajno snižena, kao i u našem istraživanju. Ovakvi rezultati upućuju na to da glicin u serumu može predstavljati izuzetno

značajan biomarker za razvoj T2D, štoviše, postoji mogućnost da poremećeni metabolizam glicina ima aktivnu ulogu u razvoju T2D u pretilosti (YOG i sur., 2017). Autori predlažu slijedeći mehanizam djelovanja: inzulin posreduje u stimulaciji transkripcije enzima glicin dekarboksilaze (GLDC). Ovaj enzim je ključan u razgradnji glicina. Pretpostavlja se da bi posrednik u ovakvoj stimulaciji mogao biti jedan transkripcijski faktor ovisan o inzulinu. Stimulacija enzima za razgradnju glicina ubrzava njegovu razgradnju u stanjima inzulinske rezistencije i uzrokuje niske koncentracije glicina u serumu pacijenata sa T2D (YOG i sur., 2017).

U skladu sa dobivenim rezultatima u našem istraživanju, TAKASHIMA i sur. su u istrživanju pretilosti kod ljudi izmjerili niže koncentracije glicina, i serina, uz asparagin, citrulin i glutamin, u usporedbi sa koncentracijama dobivenim u kontrolnoj skupini ljudi sa normalnom tjelesnom težinom. Uz to, autori su izmjerili i značajno povišene koncentracije aminokiselina sa razgranatim pobočnim lancem (izoleucin, leucin i valin) kod pretilih ljudi, što mi kod mačaka iz O i M skupine nismo ustanovili (TAKASHIMA i sur., 2016).

Kod pacijenata sa T2D, mnogi metaboliti su sniženi u metaboličkom putu glicina, serina i treonina (AL-AAMA, 2019) sukladno našim rezultatima. Autori zaključuju da to dovodi do potrošnje glicina. Glicin pozitivno korelira sa osjetljivošću na inzulin, a u slučajevima njegovog nedostatka javlja se inzulinska rezistencija (THALACKER-MERCER i sur., 2014; TAKASHINA i sur., 2016). Iz tog razloga PALMER i sur. (2015) naglašavaju da bi reducirani plazmatski glicin mogao predstavljati rani prediktor poremećene tolerancije na glukozu i pojave inzulinske rezistencije. I AL-AAMA i sur. (2019) predlažu glicin, serin i treonin kao prediktore za rani poremećaj metabolizma glukoze.

Glicin je aminokiselina najmanje molekularne mase koja se sintetizira iz serina, treonina, kolina i hidroksiprolina u jetri i bubrezima. Organizam ga u koristi u proizvodnji kreatina, purina, glukoze i kolagena. Također je važan u građi kolagena, uključen je u protuupalne procese, imunološki sustav i antioksidacijski sustav (RAZAK, 2017). Glicin je glavna sastavna komponenta žučnih kiselina koje su neophodne za probavu masti i absorpciju dugolančanih masnih kiselina (HAFKENSCHEID, 1975). Znanstvenici su kod ljudi sa metaboličkim sindromom i dijabetičara pronašli značajno smanjene vrijednosti glicina nego u zdravih ljudi. Sukladno s time, poboljšanje inzulinske rezistencije povisuje serumske razine glicina u dijabetičara (LI, 2018; ADEVA-ANDANY i sur. 2018). Pošto je u istraživanjima dokazan poremećaj metabolizma glicina u pretilih osoba i dijabetičara, smatra se da oni imaju povišen rizik od nastanka kardiovaskularnih bolesti (ADEVA-ANDANY, 2018). Degradacija glicina dešava se kroz 3 načina: sistem razgradanje glicina putem glicin dekarboksilaznog kompleksa (GCS), putem enzima hidroksimetiltransferaze te pretvorbom glicina u glioksilat pomoću peroksisomalne D-amino oksidaze. Od njih tri, GCS je

glavni enzim koji pokreće razgradnju glicina do CO2 i NH3 (LOWRY, 1985). Protein koji veže regulacijske elemente sterola (SREBP-1c) je transkripcijski faktor koji je izravno pod utjecajem inzulina. On regulira transkripciju gena koji kodiraju GCS kompleks i posreduje u stimulativnim učincima inzulina poput lipogeneze. Iz toga proizlazi da se u dijabetesu tipa 2, pri čemu je prisutno stanje inzulinske rezistencije, povećava razgradnja glicina (JOG, 2017). Nadalje, analizom metaboličkih puteva, u skorašnjoj se literaturi niže koncentracije glicina i serina u pretilih osoba tumače kao posljedica ulaska serina u proces sinteze sfingolipida koji se akumuliraju u jetri i mišićima tijekom inzulinske rezistencije (PALMNÄS i sur. 2018).

Metabolički put biotina značajno se razlikuje u usporedbi skupina M sa skupinom N. U grupi životinja M biotin i intermedijeri metaboličkog puta biotina značajno su sniženi.

U istraživanju provedenom na parovima blizanaca koji su se razlikovali po BMI, JÄRVINEN i sur. (2016) utvrdili su da je koncentracija biotina u serumu bila značajno niža u skupini sa većim BMI. Također, biotin je bio u negativnoj korelaciji unutar parova blizanaca sa međusobno statistički značajno različitim koncetracijama triglicerida (r=-0.56, P=0.045) (). Ovakvi rezultati su u suglasju sa rezultatima dobivenim u našem istraživanju. Biotin je vitamin topljiv u vodi kojeg sintetiziraju biljke i mikoorganizmi. Modulira sekreciju inzulina, iskorištavanje glukoze u jetri i sintezu glukagona u prisutnosti hiperglikemije (FERNANDEZ-MEJIA, 2005). Pacijenti koji boluju od dijabetesa tipa 2 imaju snižene koncetracije cirkulirajućeg biotina u odnosu na zdrave kontrole (COGGESHALL i sur., 1985). Supletmecacija sa biotinom i kromom pokazala se da ima pozitivne učinke u kontroli glikemije i metabolizmu lipida u ljudi dijabetičara (SINGER i GEOHAS, 2006). Životinjski modeli štakora pokazuju razvoj inzulinske rezistencije pri nedostatku biotina pri čemu se navedeno stanje otklanja nadomjestkom biotina (VIA, 2012). Ovaj se fenomen pobliže objašnjava stimulirajućim učinkom biotina na pojačanu ekspresije gena heksokinaze koja povećava unos glukoze u jetri (DAKSHINAMURTI i CHEAH-TAN, 1968). Također neka klinička istraživanja pokazuju da kombinacija kromovog pikolinata (CrPic) sa biotinom pokazuje efikasnu djelotvornost u moduliranju metabolizma lipida i glukoze u dijabetičara (GEOHAS i sur., 2007; SINGER i GEOHAS, 2006; ALBARRACIN i sur., 2008). Biotin regulira transkripciju inzlinskih receptora i poboljšava funkciju β-stanica gušterače. Sastavni je dio reakcija karboksilacije u metabolizmu glukoze i inzulina (TURGUT i sur., 2018). Kofaktor je enzimima karboksilaze u metaboličkom putu sinteze masnih kiselina, ciklusu limunske kiselina i metabolizmu aminokiselina (FERNANDEZ-MEJIA, 2005). Koenzim je karboksilazama koje reguliraju metabolizam lipida i aminokiselina te regulira ekspresiju gena. (RODRIGUEZ-MELENDEZ i ZEMPLENI, 2003; JÄRVINEN i sur., 2016). Prva reakcija u procesu sinteze masti

u citosolu počinje sa enzimom acetil-CoA karboksilazom koji sadrži biotin-karboksilazu kao prostetičku skupinu. Reakcija uključuje ATP-ovisnu karboksilaciju biotina sa bikarbonatom, pri čemu bikarbonat služi kao izvor $CO_2$ biotinu. Nakon toga, karboksilna skupina prenosi se sa biotina na acetil-CoA pri čemu nastaje spoj malonil-CoA. Reakcija je katalizirana enzimom karboksiltransferazom. U obje prethodne reakcije, karboksilni dio biotina ostaje kovalentno vezan za amino skupinu proteina nosača biotina (TANABE i sur., 1975). Terapija sa koloroacetiliranim biotinom blokira ekspresiju receptora aktiviranih proliferacijom peroksisoma γ (PPARγ) , prijenosnika i aktivatora transkripcijskih signala 1 (STAT1), STAT5A koja se dešava pri adipogenzi. Također je dodatkom istog, blokirano nakupljanje lipida prema Oil Red O bojanju. Levertovo istraživanje potvrđuje dosadašnja istraživanja da bi acetil-CoA karboksilaza mogla biti prikladna ciljna meta u terapiji pretilosti (LEVERT i sur., 2002). Turgut i sur. su u najnovijem istraživanju na štakorima prikazali učinke suplementacije CrHis i biotina u vidu smanjenja razine glukoze i triglicerida, a povišenja koncentracije HDL kolesterola (TURGUT ET AL, 2018).

U usporedbi na N grupom mačaka, M grupa pokazuje statistički značajno snižene koncentracije kinurenina u serumu.

Metaboliti triptofana i kinurenina služe kao signalne molekule između organa. Metaboliti triptofana (Trp), poznati kao kinurenini, predstavljaju različite setove metabolita koji signaliziraju svakojake stanice u tijelu uključujući i mikrofloru (CERVENKA i sur., 2017). Kinurenin ima važnu ulogu u kontroli energetskog metabolizma. Uz to što je važan za sintezu proteina, triptofan je potreban za biosintezu nužnih metabolita poput neurotransmitera serotonina, melatonina i raznih katabolita kinurena koji mogu rezultirati spojem nikotinamid adenin dinukleotidom ($NAD^+$) (CERVENKA i sur., 2017). Iako triptofan i njegovi metaboliti poput melatonina imaju ulogu u regulaciji cirkadijalnog ritma, neki imaju ulogu u energetskom metabolizmu gdje reguliraju homeostazu glukoze djelujući na nekoliko ciljnih tkiva. Na primjer, aktivacijom melatoninskog receptora 1B putem melatonina, smanjuje se iskorištavanje glukoze u smeđem masnom tkivu suprimirajući ekspresiju GLUT4 transportera. Nadalje, melatonin inhibira sekreciju inzulina u β-stanicama i time podiže razinu glukoze u krvi (CONTRERAS-ALCANTRA i sur., 2010). Poput melatonina, serotonin djeluje na energetsku homeostazu postižući anoreksigeni učinak na mozak i djelujući izravno na regulaciju aktivnosti masnog tkiva (DONOVAN i TECOTT, 2013). Ukoliko su svi prethodno metaboliti i njihovi putevi aktivirani i uravnoteženi, konačni ishod jest povećano iskorištavanje energije i protuupalna okolina u masnom tkivu.

U istraživanjima povezanosti debljine i kinurenina, AGUDELO i sur. (2018) utvrdili su da kinureninska kiselina povećava iskorištavanje energije tako da aktivira receptore vezane uz G-

protein. Aktivacija tih receptora dovodi do stimuliranja intenziteta metabolizma lipida i pojačane termogeneze. Također, pojačava se ekspresija antiinflamatornih gena u adipoznom tkivu. Sve to dovodi do smanjenja akumulacije masnog tkiva kod životinja koje su hranjene visokokalorijskom prehranom punom masti. Iskazan je i povoljan učinak na toleranciju glukoze. Iz navedenog možemo zaključiti da nedostatak kinurenina kod mačaka iz M skupine ima obrnuti učinak na njihovo zdravlje, te da je moguć usporen metabolizam lipida, smanjena termogeneza te iskazan negativni učinak na toleranciju glukoze.

Pošto se smatra da metabolički put triptofana/kinurenina igra važnu ulogu u patofiziologiji mnogih upalnih bolesti, postoji veliki interes o utjecaju ljekova na taj put. Za početak su najveću pažnju privukli ljekovi sposobni inhibirati enzim indolamin-pirol-2,3-dioksigneazu (IDO1), jer taj enzim prvi i onaj koji ograničava brzinu njihovog metaboličkog puta (DOUNAY i sur., 2015.; ZÁDORI i sur., 2016). Nedavno je inhibicija enzima kinurenin 3-monooksigenaze (KMO) privukla veću pažnju jer ovaj enzim može izravno blokirati proizvodnju citotoksičnog-3-hidroksikinurenina (SMITH, JAMIE i GULLEMIN, 2016). Posljedično, KMO inhibitori su trenutno predmet istraživanja terapeutskih mogućnosti u raznim upalnim bolestima (DOUNAY i sur., 2015;, MOLE i sur., 2016; ZÁDORI i sur., 2016) .

Prema našim saznanjima, ovo je prvo istraživanje utjecaja debljine kod mačaka na metabolom. Utvrđene su promjene aktivnosti metaboličkih puteva povezanih uz razvoj debljine, mada su sve životinje u trenutku pregleda bile klinički zdrave, što ukazuje na važnost održavanja normalne tjelesne težine.

Međutim, ovaj rad ima i nekoliko nedostataka. U istraživanju je sudjelovao relativno mali broj životinja. Procjenom težine mačaka zajedno sa parametrima za utvrđivanje indeksa tjelesne težine, nismo bili u mogućnosti utvrditi da li životinja ima povećane depoe visceralne masti. Na kraju, bilo bi interesantno utvrditi nakon nekoliko godina zdravstveni status istih životinja koje su sudjelovale u našem istraživanju, te pokušati identificirati metabolite koji eventualno ukazuju na rizik razvoja bolesti povezanih uz višak masnog tkiva.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Kod mačaka sa prekomjernom težinom i pretilošću, bez metaboličkog sindroma, koncentracija glukoze i kolesterola su značajno povišene u odnosu na zdrave životinje normalne tjelesne težine. Koncentracija adiponektina je snižena. Moguće je da je prisutno svojevrsno tranzicijsko stanje vezano sa viškom masnog tkiva, analogno konverziji MHO u MUO, opisanoj u humanoj medicini.

2. Mačke sa prekomjernom težinom i pretilošću, sa metaboličkim sindromom, imaju povećane koncentracije glukoze, triglicerida, kolesterola i ukupnih proteina u odnosu na mačke normalne tjelesne težine. Koncentracija adiponektina u serumu je tekođer snižena.

3. Utjecaj masnog tkiva na koncentraciju adiponektina dokazan je kod ljudi i mnogih vrsta životinja, a u ovom radu snižavnje adiponektina izmjereno je i kod pretilih mačaka. Adiponektin je protein sa mnogobrojnim protektivnim svojstvima, a njegovo snižavanje u cirkulaciji može dovesti do razvoja mnogih metaboličkih poremećaja.

4. Mačke sa prekomjernom težinom i pretilošću, bez metaboličkog sindroma, nemaju promjena u koncentracijama metabolita utvrđenim spektroskopijom masa, u odnosu na mačke idealne težine. Mogući mehanizmi u održavanju zdravog metaboličkog statusa u MHO uključuju povoljnu distribuciju adipoznog tkiva i odsutnost inflamacije. Međutim, smatra se da ovaj fenotip nije stabilan tijekom vremena, stoga se sugerira intervencija u što ranijoj fazi razvoja prekomjerne težine.

5. Metabolički put glicina, serina i treonina je kod mačaka sa prekomjernom težinom i pretilošću i metaboličkim sindromom suprimiran u usporedbi sa mačkama notmalne tjelesne težine. Najnovija istraživanja ukazuju na ulogu poremećenog metabolizma glicina u razvoju T2D u pretilosti, pri čemu transkripcijski faktori ovisni o inzulinu stimuliraju sintezu enzima za razgradnju glicina, što dovodi do stanja inzulinske rezistencije.

6. Metabolički put biotina je suprimiran je kod mačaka sa prekomjernom težinom i pretilošću i metaboličkim sindromom suprimiran u usporedbi sa mačkama notmalne tjelesne težine. U slučajevima deficita biotina razvija se inzulinska rezistencija. Mehanizam razvoja rezistencije uključuje biotinom induciranu ekspresiju heksokinaze koja pojačava potrošnju glukoze u jetri.

Biotin regulira i transkripciju inzulinskih receptora. Zbog navedenog, razmatraju se potencijalni korisni učinci suplementacije biotina kod dijabetičara i kod pretilih životinja i ljudi.

7. Mačke sa prekomjernom težinom i pretilošću, sa metaboličkim sindromom, imaju značajno smanjeni kinurenin u odnosu na mačke normalne tjelesne težine. Kinurenini predstavljaju različiti skup metabolita koji služe kao stanična komunikacija, a imaju značajnu ulogu u sistemskom energetskom metabolizmu. Snižavanje aktivnosti ovoga puta može biti uzrokom, ali i posljedicom debljine, stoga su potrebna daljnja istraživanja o ulozi kinurenina u razvoju pretilosti kod mačaka.

8. Glavnu ulogu u razvoju prekomjerne težine u većini slučajeva imaju vlasnici životinja. Redukcija prekomjerene tjelesne težine kod mačaka je često neučinkovita i veliki postotak životinja ne uspijeva postići i održati idealnu tjelesnu težinu, stoga veterinari moraju provesti pravodobnu edukaciju vlasnika i poduzeti preventivne mjere u cilju održanja normalne tjelesne težine tijekom cijelog života, u cilju sprječavanja razvoja metaboličkih poremećaja i bolesti vezanih uz debljinu.

## 7. ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Renati Barić Rafaj i Ivani Rubić za pomoć u izradi ovog rada.

Zahvaljujem se svojoj obitelji na neizmjernoj podršci tijekom cijelokupnog studija. Bez njihove podrške i pomoći ovaj cilj ne bilo moguće postići.

## 8. LITERATURA


ACHARI, A. E., K. J. SUSHIL (2017): Review: Adiponectin, a therapeutic target for obesity, diabetes, and endothelial dysfunction. Int. J. Mol. Sci. 18, 1321. doi: 10.3390/ijms18061321.

ADEVA-ANDANY, M., G. SOUTO-ADEVA, E. AMENEIROS-RODRIGUEZ C. FERNANDEZ-FERNANDEZ , C. DONAPETRY-GARCIA , A. DOMINGUEZ-MONTERO (2018): Insulin resistance and glycine metabolism in humans. Amino Acids. 50, 11-27.

AL-AAMA, J., H. B. Al MAHDI, M. A SALAMA, K. H BAKUR, A. ALHOZALI, Hala H MOSLI, S. M BAHIJRI , A. BABHIELDIN, L. WILLMITZER, S. EDRIS (2019): Detection of secondary metabolites as biomarkers of early diagnosis and prevention of type 2 diabetes. Diabetes Metab Syndrome Obes. 17, 2675-2684.

ALBARRACIN, C. A., B. C. FUQUA, J .L. EVANS, I.D. GOLDFINE (2008): Chromium picolinate and biotin combination improves glucose metabolism in treated, uncontrolled overweight to obese patients with type 2 diabetes. Diabetes Metab Res Rev. 24, 41 – 51.

ALVES, A., A. BASSOT, A.-L. BULTEAU, L. PIROLA, B. MORIO (2019): Glycine metabolism and its alterations in obesity and metabolic diseases. Nutrients. 11, 1356. doi: 10.3390/nu11061356.

ARMSTRONG, P. J. WHITEHEAD (2014): Obesity and sex inflence insulin resistance and total and multimer adiponectin levels in adult neutered domestic shorthair client-owned cats. Domest. Anim. Endocrinol. 47, 55–64.

BADMAN, M. K., J. S. FLIER (2007): The adipocytes as an active participant in energy balance and metabolism. Gastroenterol. 132, 2103–2115.

BALDWIN, K. (2010): AAHA Nutritional Assessment Guidelines for Dogs and Cats. J Am Animal Hospital Assoc. 46, 285-296.

BELL, JA, M. HAMMER, G. D. BATTY, A. SINGH-MANOUX, S. SABIA, M. KIVIMÄKI (2016): Incidence of metabolic risk factors among healthy obese adults: 20-year fol- low-up. J Am Coll Cardiol. 66, 871–873.

BRENNAN, C. L., M. HOENIG, D.C. FERGUSON (2004): GLUT4 but not GLUT1 expression decreases early in the development of feline obesity. Domest Anim Endocrinol 26, 291–301.

CALTON, E. K. (2013): Factors determining the risk of the metabolic syndrome: is there a central role for adiponectin?. The European Journal of Clinical Nutrition. 67, 485–491.

CERVENKA, I., LZ. AGUDELO, JL. RUAS (2017): Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health. Science. 357, 9794. doi: 10.1126/science.aaf9794.

CHANDLER, M., S. CUNNINGHAM, E. M. LUND, C. KHANNA, R. NARAMORE, A. PATEL, M. J. DAY (2017): Obesity and associated comorbidities in people and companion animals: A one health perspective. J. Comp. Path. 156, 296 – 309.

CHANG, H.J., J.L. WOO, K.H. SONG (2017): Metabolically healthy obesity: a friend or foe? Korean J Intern Med. 32, 611-621.

CHEN, H. H. (2015): The metabolome profiling and pathway analysis in metabolic healthy and abnormal obesity. Int J Obesity. 15, 1-8.

COGGESHALL, J. C., J. P. HEGGERS, M. C. ROBSON, H. BAKER (1985): Biotin status and plasma glucose levels in diabetics. Annals of the New York Academy of Sciences. 447, 389-392.

CONTRERAS-ALCANTRA, S., K. BABA, G. TOSINI (2010): Removal of melatonin receptor type 1 induces insulin resistance in the mouse. Obesity. 18, 1861–1863.

DAKSHINAMURTI, K., C. CHEAH-TAN (1968): Biotin-mediated synthesis of hepatic glucokinase in the rat. Archives of Biochemistry and Biophysics. 127, 17–21.

DONOVAN, MH., LH. TECOTT (2013): Serotonin and the regulation of mammalian energy balance. Front Neurosci. 7, 36. doi: 10.3389/fnins.2013.00036.

DOUNAY, AB., JB. TUTTLE, PR.VERHOEST (2015): Challenges and opportunities in the discovery of new therapeutics targeting the kynurenine pathway. J Med Chem 58, 8762–8782

FANTUZZI, G. (2008): Adiponection and inflammation: Consensus and controversy. J Allergy Clin Immunol 121, 326-330.

FERNANDEZ-MEJIA, C. (2005): Pharmacological effects of biotin. J Nutritional Biochem. 16, 424-427.

GEOHAS, J., A. DALY, V. JUTURU, J. R KOMOROWSKI, M. FINCH (2007): Chromium picolinate and biotin combination reduces atherogenic index of plasma in patients with type 2

diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blinded, randomized clinical trial. Am J Med Sci. 333, 145–153.

GERMAN, A.J. (2006). The growing problem of obesity in dogs and cats. J Nutr. 136: 1940–1946.

GUIJAS, C., J R. MONTENEGRO-BURKE, B. WARTH, M. E SPILKER, G. SIUZDAK (2018): Metabolomics activity screening for indentifying metabolites that modulate phenotype. Nat Biotechnology. 36, 316-320.

GUO, F., WT. GARVEY (2016): Cardiometabolic disease risk in metabolically healthy and unhealthy obesity: stability of metabolic health status in adults. Obesity (Silver Spring). 24, 516–525.

HAFKENSCHEID, J. C., M. P. HECTORS (1975): An enzymic method for the determination of the glycine/taurine ratio of conjugated bile acid in bile. Clin Chim Acta. 65, 67–74.

HASHIMOTO, Y., M. HAMAGUCHI, T. FUKUDA, A. OHBORA, T. KOJIMA, M. FUKUI (2017): Fatty liver as a risk factor for progression from metabolically healthy to metabolically abnormal in non-overweight individuals. Endocrine. 57, 89–97.

HOENIG, M., N. PACH, K. THOMASETH, A. LE, D. SCHAEFFR, D. C. FERGUSON (2013): Cats diffr from other species in their cytokine and antioxidant enzyme response when developing obesity. Obesity (Silver Spring). 21**,** 407–414.

HOENIG, M., K. THOMASETH, M. WALDRON, D. C. FERGUSON (2007): Insulin sensitivity, fat distribution, and adipocytokine response to diffrent diets in lean and obese cats before and after weight loss. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 292, 227–234.

HOENIG, M. (2006): The cat as a model for human nutrition and disease, Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care: 9, 584-588.

ISHIOKA, K., A. OMACHI, M. SAGAWA, H. SHIBATA, T. HONJOH, K. KIMURA, M. SAITO (2006): Canine Adiponectin: cDNA Structure, mRNA Expression in Adipose Tissues and Reduced Plasma Levels in Obesity. Res Vet Sci. 80, 127-132.

ISHIOKA, K., A. OMACHI, N. SASAKI, K. KIMURA, M. SAITO (2009): Feline adiponectin: molecular structures and plasma concentrations in obese cats. J Vet Med Sci. 71,189-194

JÄRVINEN, E., K. ISMAIL, M. MUNIDAY, L. H. BOGL, S. HEINONEN, M. TUMMERS, S. MIETTINEN, J. KAPRIO, A. RISSANEN, M. OLLIKAINEN, K. H. PIETILÄINEN (2016):. Biotin-dependent functions in adiposity: a study of monozygotic twin pairs. Int J Obes 40**,** 788–795.

JIANPING, Y. (2013): Mechanisms of insulin resistance in obesity. Front Med. 7, 14-24.

JOG, R., J. WANG, T. LEFF (2017): Hormonal regulation of glycine metabolism and its potential role in diabetes susceptibility. The FASEB Journal 31, 626.6-626.6.

KADOWAKI, T. (2005): Adiponectin and Adiponectin Receptors. Endocrine Reviews. 26, 439–451.

KELLER, C. A. LIESEGANG, D. FREY, B. WICHERT (2017): Metabolomic differences between lean and obese neutered senior cats and associations with glucose tolerance. BMC Vet Res. 13, 184. doi: 10.1186/s12917-017-1107-3.

KIENZLE, E., R. BERGLER, A. MANDERNACH (1998): A comparison of the feeding behavior and the human-animal relationship in owners of normal and obese dogs. J Nutr. 128, 2779-2782.

KISHIDA, K., H. NAGARETANI, H. KONDO, H. KOBAYASHI, S. TANAKA, N. MAEDA, A. NAGASAWA, T. HIBUSE, K. OHASHI, M. KUMADA, H. NISHIZAWA, Y. OKAMOTO, N. OUCHI, K. MAEDA, S. KIHARA, T. FUNAHASHI, Y. MATSUZAWA (2003): Disturbed secretion of mutant adiponectin associated with the metabolic syndrome. Biochem Biophysical Res Commun. 306, 286–292.

KOLOVOU, G.D. (2005): Pathophysiology of dyslipidaemia in the metabolic syndrome. Postgrad Med J. 81, 358-366.

LAFLAMME, D. (1997): Development and validation of a body condition score system for dogs. Canine practice. 22, 10-15.

LEVERT, K. L., L. W. GROVER, M. J. STEPEHNS (2002): A Biotin Analog Inhibits Acetyl-CoA Carboxylase Activity and Adipogenesis. J Biol Chem. 277, 16347–16350.

LI, X., L. SUN, W. ZHANG, H. LI, S. WANG, H. MU, Q. ZHOU, Y. ZHANG, Y. TANG, Y. WANG, W. CHEN, R. YANG (2018): Association of serum glycine levels with metabolic syndrome in an elderly Chinese population. Nutrition & Metabolism. 15, 89. https://doi.org/10.1186/s12986-018-0325-4.

LIBERT, D. M., A. S NOWACKI, M. R NATOWICZ (2018): Metabolomic analysis of obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes: amino acid and acylcarnitine levels change along a spectrum of metabolic wellness. Peer J. 6, 5410. doi: 10.7717/peerj.5410.

LIN, H., L. ZHANG, R. ZHENG, Y. ZHENG (2014): The prevalence, metabolic risk and effects of lifestyle intervention for metabolically healthy obesity: a systematic review and meta-analysis: a PRISMA-compliant article. Medicine. 96, e8838. doi: 10.1097/MD.0000000000008838.

LOWRY, M., D. E. HALL, J. T. BROSNAN (1985): Hydroxyproline metabolism by the rat kidney: distribution of renal enzymes of hydroxyproline catabolism and renal conversion of hydroxyproline to glycine and serine. Metabolism. 34, 955–961.

MAGKOS, F. (2019): Metabolically healthy obesity: what's in a name? Am J Clin Nutr. 100, 533-539.

MARSHALL, W. G., B. A. BOCKSTAHLER, D.A. HULSE, S. CARMICHARL (2009): A review of osteoarthritis and obesity: current understanding of the relationship and benefit of obesity treatment and prevention in the dog. Vet Comp Orthop Traumatol. 22, 339-345.

MATSUDA, M., I. SHIMOMURA, M. SATA, Y. ARITA, M. NISHIDA, N. MAEDA, M. KUMADA, Y. OKAMOTO, H. NISHIZAWA (2002): Role of adiponectin in preventing vascular stenosis the missing link of adipo-vascular axis. J. Biol. Chem. 277, 37487–37491.

MOLE, D.J., S.P. WEBSTER, I. UINGS, X. ZHENG, M. BINNIE K. WILSON, J. P HUTCHINSON, O. MIRGUET, A. WALKER, B. BEAUFILS, N. ANCELIN, L. TROTTET, V. BENETON , C. G MOWAT, M. WILKINSON (2016): Kynurenine-3-monooxygenase inhibition prevents multiple organ failure in rodent models of acute pancreatitis. Nat Med. 22, 202–209.

MOUSSA, O., C. ARHI, P. ZIPRIN, A. DARZI, O. KHAN, S. PURKAYASTHA (2019): Fate of the metabolically healthy obese-is this term a misnomer? A study from the Clinical Practice Research Datalink. Int J Obes (Lond). 43, 1093–1101.

NIGRO, E., O. SCUDIERO, M. L. MONACO, A. PALMIERI, G. MAZZARELLA, C. COSTAGLIOLA, A. BIANCO, A. DANIELE (2014): New insight into adiponection role in obesity and obesity – related diseases. Bio Med Research International. 2014, ID 658913, 14p.

OKADA, Y., M. KOBAYASHI, M. SAWAMURA, T. ARAI (2017): Comparisoon of Visceral Fat Accumulation and Metabolome Markers among Cats of Varying BCS and Novel

Classification of Feline Obesity and Metabolic Syndrome. Frontiers in Veterinary Science. 14, 4-17.

OKAMOTO, Y., S. KIHARA, N. OUCHI, M. NISHIDA, Y. ARITA, M. KUMADA, K. OHASHI, N. SAKAI, I. SHIMOMURA, H. KOBAYASHI (2002): Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice. Circulation. 106, 2767–2770.

PALMER, N.D., R.D. STEVENS, P.A. ANTINOZZI, A. ANDERSON, R. N BERGMANN,. L. E WAGENKNECHT, C. B NEWGARD, D. W BOWDEN (2015): Metabolomic profile associated with insulin resistance and conversion to diabetes in the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. J Clin Endocrinol Metab. 100, 463–468.

PALMNÄS M. S. A., A. K. KOPCIUK, R. A. SHAYKHUTDINOV, P. J. ROBSON i sur. (2018): Serum metabolomics of activity energy expenditure and its relation to metabolic syndrome and obesity. Scientific reports. 8, 3308. DOI: 10.1038/s41598-018-21585-6.

PHILLIPS, A. M., J. B. COE, M. J. ROCK, C. L. ADAMS (2017): Feline Obesity in Veterinary Medicine: Insight from a Thematic Analysis of Communication in Practice. Front in Vet Sci. 4, 117. https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00117.

RADIN, M. J., L. C. SHARKEY, B. J. HOLYCROSS (2009): Adipokines: a review of biological and analytical principles and an update in dogs, cats, and horses. Vet. Clin. Pathol. 38, 136–156.

RANGEL-HUERTA, O. D. (2019): Are we close to defning a metabolomic signature of human obesity? A systematic review of metabolomics studies. Metabolomics. 15, 93. https://doi.org/10.1007/s11306-019-1553-y.

RAZAK, M.A., P. S. BEGUM, B. VIVWANATH, S. RAJAGOPAL (2017): Multifarious beneficial effect of nonessential amino acid, Glycine: a review. Oxidative Med Cell Longev. 2017, 1716701.

REEVE-JOHNSON, M.K. J. S. RAND, S. T. ANDERSON, D. M. VANKAN, D. A. DIAS, A. M. DE LIVERA, A. M. ISHIOKA, U. ROESSNER (2016): Metabolite differences between healthy senior Burmese and Non-Burmese cats, and associations between metabolites and measures of glucose metabolism. Journal of Veterinary Internal Medicine. 30, 1407–1519.

RODRIGUEZ-MELENDEZ, R., J. ZEMPLENI (2003): Regulation of gene expression by biotin (review). J Nutritional Biochem. 14, 680–690.

SINGER, G. M., J. GEOHAS (2006): The effect of chromium picolinate and biotin supplementation on glycemic control in poorly controlled patients with type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blinded, randomized trial. Diabetes Technol Ther. 8, 636–643.

SMITH, I. G., B. MITTENDORFER, S. KLEIN, (2019): Metabolically healthy obesity: facts and fantasies. The Journal of Clinical Investigation. 129, 3978-3989.

SMITH, J. R., J. F. JAMIE, G. J. GUILLEMIN (2016): Kynurenine-3-monooxygenase: a review of structure, mechanism, and inhibitors. Drug Discov Today. 21, 315–324

SÖDER, J. K. HÖGLUND, J. DICKSVED, R. HAGMAN, H. E. RÖHNISCH, A. A. MOAZZAMI, S. WERNERSSON (2019): Plasma metabolomics reveals lower carnitine concentrations in overweight Labrador Retriever dogs. Acta Vet Scand. 61, 10

SORIGUER, F., C. GUTIERREZ-REPISO, E. RUBIO-MARTIN, E. GARICA-FUENTES, M. C. ALMARAZ, N. COLOMO, F. J. CHAVES, S. MORCILLO, S. VALDES, G. ROJO-MARTINEZ (2013): Metabolically healthy but obese, a matter of time? Findings from the prospective Pizarra study. J Clin Endocrinol Metab. 98, 2318-2325.

SULISTYONINGRUM, E. (2007): Role of Adiponection in Atherosclerosis. Journal Anatomi Indonesia. 2, 13-17.

TAKASHINA, C., I. TSUJINO, T. WATANABE i sur. (2016): Associations among the plasma amino acid profile, obesity, and glucose metabolism in Japanese adults with normal glucose tolerance. Nutr Metab (Lond). 13, 5. https://doi.org/10.1186/s12986-015-0059-5.

TANABE, T., K. WADA, T. OKAZAKI, S. NUMA (1975): Acetyl-Coenzime-A Carboxylase from rat liver. Subunit structure and proteolytic modification. Eur. J. Biochem. 57, 15–24.

TARKOSOVA, D., J. RAND, M. M. STORY, M. SVOBODA (2016): Feline obesity – prevalence, risk factors, pathogenesis, associated conditions and assessment: a review. Veterinari Medicina. 61, 295-307.

THALACKER-MERCER, A. E., K. H. INGRAM, F. GUO, O. ILKAYEVA, C. B. NEWGARD, W T. GARVEY (2014): BMI, RQ, diabetes, and sex affect the relationships between amino acids and clamp measures of insulin action in humans. Diabetes. 63,791–800.

TURGUT, M., V. CINAR, R. PALA, M. TUZCU, C. ORHAN, H. TELCKEN, N. SAHIN, P. B. D. DEEH, J. R KOMORWSKI, K. SAHIN (2018): Biotin and chromium histidinate improve

glucose metabolism and proteins expression levels of IRS-1, PPAR-γ, and NF-KB in exercise-trained rats. Journal of the International Society of Sports Nutrition. 15, 45-55.

TVARIJONAVICIUTE, A., J. J. CERON, S. L. HOLDEN, P. J. MORRIS, V. BIOURGE, A. J. GERMAN (2012): Effcts of weight loss in obese cats on biochemical analytes related to inflmmation and glucose homeostasis. Domest. Anim. Endocrinol. 42, 129–141.

VIA, M. (2012): The malnutrition of Obesity: Micronutrient deficiencies that promote diabetes. International Scholary Research Network. 2012, 8. doi: 10.5402/2012/103472.

WALL, M., N. J. CAVE, E. VALLEE (2019): Owner and cat-related risk factors for feline overweight in obesity. Front Vet Sci. 6,266. https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00266.

WANG, P., E. MARIMAN, J. RENES, J. KEIJER (2008): The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. J. Cell. Physiol. 216, 3–13.

WILLIAMS, M.C., C. J. MCMILLAN, E. R. SNEAD, K. TAKADA, P. K CHELIKANI (2019): Association of circulating adipokine concentrations with indices of adiposity and sex in healthy, adult client owned cats. BMC Vet Res. 15, 332. https://doi.org/10.1186/s12917-019-2080-9.

YAMAUCHI, T., J. KAMON, H. WAKI, Y. TERAUCHI, N. KUBOTA, K. HARA, Y. MORI, T. IDE, K. MUKARAMI, N. TSUBOYAMA-KASAOKA (2001): The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. Nat. Med. 7, 941–946.

YAMAUCHI, T., Y. NIO, T. MAKI, M. KOBAYASHI, T. TAKAZAWA, M. IWABU, M. OKADA-IWABU, S. KAWAMOTO, N. KABOTA, T. KUBOTA (2007): Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. Nature Medicine. 13, 332–339.

ZÁDORI, D., G. VERES, L. SZALÁRDY, P. KLIVÉNYI, F. FÜLÖP, J. TOLDI, L. VÉCSEI (2016): Inhibitors of the kynurenine pathway as neurotherapeutics: a patent review. Expert Opin Ther Pat. 26, 815–832.

ZHANG, A., H. SUN, X. WANG (2017): Emerging role and recent applications of metabolomics biomarkers in obesity disease research. Royal society of chemistry. 7, 14966-14973.

ZORAN, D. L. (2009): Feline obesity: recognition and management. Compendium (Yardley, PA). 31, 284 – 293.

## 9. SAŽETAK

**Luka Ećimović: Pretilost u mačaka – metabolomski pristup**

Veliki problem u veterinarskoj medicini danas predstavlja debljina. U istraživanju je sudjelovalo 10 mačaka sa prevelikom tjelesnom težinom, bez metaboličkih promjena i 8 mačaka sa prevelikom tjelesnom težinom i utvrđenim metaboličkim sindromom. Dobiveni rezultati uspoređeni su sa rezultatima 10 zdravih mačaka sa normalnom tjelesnom težinom. Uz rutinske hematološke i biokemijske metode, u mjerenjima je korišten spektroskop masa MS Thermo Scientific Q Exactive Plus. U istraživanim skupinama mačaka utvrđen je kompletni spektar svih razlikovnih metabolita koji se mogu indentificirati u bazama podataka korištenjem PIMP analize.

Metabolički put glicina, serina i treonina, kao i metabolički put biotina je kod mačaka sa prekomjernom težinom i pretilošću i metaboličkim sindromom suprimiran. Najnovija istraživanja ukazuju na ulogu poremećenog metabolizma glicina u razvoju T2D u pretilosti, pri čemu transkripcijski faktori ovisni o inzulinu stimuliraju sintezu enzima za razgradnju glicina, što dovodi do stanja inzulinske rezistencije. U slučajevima deficita biotina razvija se inzulinska rezistencija. Mehanizam razvoja rezistencije uključuje biotinom induciranu ekspresiju heksokinaze koja pojačava potrošnju glukoze u jetri. Biotin regulira i transkripciju inzulinskih receptora. Zbog navedenog, razmatraju se potencijalni korisni učinci suplementacije biotina kod dijabetičara i kod pretilih životinja i ljudi. Mačke sa prekomjernom težinom i pretilošću, sa metaboličkim sindromom, imaju značajno smanjeni kinurenin u odnosu na mačke normalne tjelesne težine. Kinurenini predstavljaju različiti skup metabolita koji služe kao stanična komunikacija, a imaju značajnu ulogu u sistemskom energetskom metabolizmu. Snižavanje aktivnosti ovoga puta može biti uzrokom, ali i posljedicom debljine, stoga su potrebna daljnja istraživanja o ulozi kinurenina u razvoju pretilosti kod mačaka.

Glavnu ulogu u razvoju prekomjerne težine u većini slučajeva imaju vlasnici životinja. Redukcija prekomjerene tjelesne težine kod mačaka je često neučinkovita i veliki postotak životinja ne uspijeva postići i održati idealnu tjelesnu težinu, stoga veterinari moraju provesti pravodobnu edukaciju vlasnika i poduzeti preventivne mjere u cilju održanja normalne tjelesne težine tijekom cijelog života, u cilju sprječavanja razvoja metaboličkih poremećaja i bolesti vezanih uz debljinu.

Ključne riječi: debljina, metabolomika, mačke, metabolički sindrom

## 10. SUMMARY

**Luka Ećimović: Metabolomic approach to feline obesity**

Nowadays, obesity is great problem in veterinary medicine. 10 overweight cats wthout metabolic alterations and 8 overweight cats with established metabolic syndrome took part in this research. Their results were compared to those from 10 healthy cats with normal body weight. Mass spectrometry was performed on MS Thermo Scientific Q Exactive Plus along with other routine hematologic and biochemistry assays. In researched groups of cats, we established the whole spectrum of distingushing metabolites that can be identified in database using PIMP analysis.

Metabolic pathways of glycine, serine, threonine and biotin are suppressed in both obese cats and in cats with metabolic syndrome. Latest researches indicate the role of glycine metabolism disorder in development of T2D related to obesity, in which insulin-dependent transcription factors stimulate enzyme synthesis for glycine degradation, which in turn results in insulin resistence. In case of biotine deficiency, insuline resistence develops. Mechanism of latter includes biotine-induced hexokinase expression which enhances up glucose consumption in liver. Biotine regulates transcription of insuline receptors as well. Because of mentioned above, some benefitial effects of biotine supplementation are being considered with diabetic patients and obese people and animals as well. Overweight cats and cats with metabolic syndrome have siginificantely decreased kynurenine to those with normal weight. Kynurenines present set of metabolites that play role in diverse cells signalization and have important role in systemic energy metabolism. Decrease of activity of kynurenine pathway can be both cause and consequence of obesity, therefore further investigations about kynurenine role in development of obesity in cats are needed.

In most cases, the major role in development of overweight have owners of the animals. Losing body weight is often insufficient and large number of cats do not achieve nor keep up with their targeted body mass, therefore veterinarians are the ones that need to timely educate owners and take all preventive measures in order to maintain normal weight during whole life to prevent development of metabolic disorders and diseases associated to obesity.

Key words: obesity, metabolomics, cat, metabolic syndrome

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 30.1.1996. godine u Zagrebu. Osnovnu školu završio sam u Bregani 2010. godine, a u razdolju od 2010. do 2014. pohađao sam Gimnaziju Lucijana Vranjanina u Zagrebu. 2014. godine upisao sam Veterinarski Fakultet Sveučilišta u Zagrebu te sam trenutno student šeste godine. Tijekom osnovnoškolskog obrazovanja, 8 godina sam trenirao karate. Rekreativno plivam i igram odbojku. Tijekom studija, volontirao na Klinici za porodništvo i reprodukciju i u laboratoriju Klinike za unutarnje bolesti. Stručnu praksu u razdoblju od 3 mjeseca odradio sam na Agrikulturalnom Sveučilištu u Uppsali (SLU) – odjsek animalne znanosti, Kraljevina Švedska.