

# Okolišni čimbenici s epigenetskim učinkom na pretilost

---

**Bekavac, Barbara**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:106341>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-12**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Barbara Bekavac**

**Okolišni čimbenici s epigenetskim učinkom na pretilost**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2019.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Škola narodnog zdravlja „Andrija Štampar“, Katedra za zdravstvenu ekologiju, medicinu rada i sporta pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Iskre Alexandre Nola i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2018./2019.

## Sadržaj

<b>SAŽETAK</b> .....	I
<b>SUMMARY</b> .....	II
<b>POPIS KRATICA</b> .....	III
<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Pretilost</b> .....	1
<b>1.2. Okolišni čimbenici</b> .....	3
<b>1.3. Epigenetika</b> .....	6
<b>2. OKOLIŠNI ČIMBENICI S EPIGENETSKIM UČINKOM NA PRETILOST</b> .....	8
<b>2.1. Prehrana</b> .....	8
<b>2.2. Bihevioralni/sociološki čimbenici</b> .....	11
<b>2.3. Endokrini disruptori</b> .....	13
<b>3. JAVNOZDRASTVENO ZNAČENJE PRAĆENJA POVEZANOSTI EPIGENETIKE I PRETILOSTI</b> .....	15
<b>3.1. Pretilost i javnozdravstvene posljedice</b> .....	15
3.1.1. Diabetes mellitus tip 2 i epigenetski mehanizmi povezane pretilosti .....	15
3.1.2. Karcinom dojke i epigenetski mehanizmi povezane pretilosti.....	17
3.1.3. Kolorektalni karcinom i epigenetski mehanizmi povezane pretilosti .....	19
<b>3.2. Modulacija epigenetskih čimbenika u prevenciji pretilosti</b> .....	21
<b>4. ZAKLJUČAK</b> .....	23
<b>5. ZAHVALE</b> .....	24
<b>6. LITERATURA</b> .....	25
<b>7. ŽIVOTOPIS</b> .....	28

# SAŽETAK

## OKOLIŠNI ČIMBENICI S EPIGENETSKIM UČINKOM NA PRETILOST

BARBARA BEKAVAC

Sveučilište u Zagrebu

Medicinski fakultet

Epidemija pretilosti koja je zahvatila svjetsku populaciju krajem 20. stoljeća potaknula je brojna istraživanja da bi se otkrio uzrok te epidemije. Iako su neki uzroci bili prilično jasni, poput povećanja energetske unosa i smanjenja fizičke aktivnosti, s vremenom je otkriveno kako ulogu u nastanku epidemije pretilosti imaju i naizgled neutralni okolišni čimbenici, kao što su primjerice socioekonomski status i endokrini disruptori. Usto, istraživače je zanimao i mehanizam kojim okolišni čimbenici djeluju na nastanak pretilosti. Prema dosadašnjim saznanjima najbolje objašnjenje tog mehanizma nudi epigenetika. Također, početkom 21. stoljeća prepoznato je kako je pretilost rizični čimbenik za nastanak niza velikih javnozdravstvenih problema poput diabetes mellitus tip 2 te karcinoma. Stoga razumijevanje etiologije pretilosti važno je ne samo za zaustavljanje epidemije pretilosti već i niza drugih bolesti kojima pretilost pridonosi.

**Ključne riječi:** diabetes mellitus tip 2, endokrini disruptori, epigenetika, neoplazme, okoliš i javno zdravstvo, pretilost

# SUMMARY

## ENVIRONMENTAL FACTORS WITH EPIGENETIC EFFECT ON OBESITY

BARBARA BEKAVAC

University of Zagreb

School of Medicine

The obesity epidemic that hit the world population at the end of the 20th century has inspired numerous studies to search for the cause of this epidemic. Although some of the causes were quite clear, such as increased energy intake and decrease in physical activity, over time it was discovered that seemingly neutral environmental factors such as socioeconomic status and endocrine disruptors also have a role in the emergence of obesity epidemics. In addition, researchers were also interested in the mechanism by which environmental factors effect obesity. The best explanation for this were epigenetic mechanisms. Also, at the beginning of the 21st century, it was recognized that obesity is a risk factor for the emergence of a number of major public health problems such as type 2 diabetes mellitus and cancer. Therefore understanding the etiology of obesity is important not only to stop the epidemic of obesity but also a number of other diseases that obesity contributes to.

**Keywords:** diabetes mellitus type 2, endocrine disruptors, environment and public health, epigenetics, obesity, neoplasms

## POPIS KRATICA

AGRP (prema engl. *agouti-related protein*) – bjelančevina srodna agouti-proteinu

BPA (prema engl. *bisphenol A*) – bisfenol A

CART (prema engl. *cocaine and amphetamine-related transcript*) – prijepis reguliran kokainom i amfetaminom

CSC (prema engl. *stem cell-like cells*) – stanice slične matičnim stanicama

DDT – diklorodifeniltrikloroetan

DNA (prema engl. *deoxyribonucleic acid*) – deoksiribonukleinska kiselina

FTO (prema engl. *fat mass and obesity-associated protein*) – protein povezan s masnim tkivom i pretilošću

GLUT 4 – transporter glukoze 4

HDAC4 (prema engl. *histone deacetylase 4*) – histonska deacetilaza 4

HIF3A (prema engl. *hypoxia-inducible factor 3 alpha*) – hipoksijom induciran faktor 3

IGF2 (prema engl. *insulin-like growth factor*) – inzulinu sličan faktor rasta

ITM – indeks tjelesne mase

kcal – kilokalorije

kg - kilogram

kJ – kilodžuli

LINE1 (prema engl. *long interspersed nucleotide element 1*) – element dugih mješavina nukleotida

MBD2\_v2 (prema engl. *methyl-CpG-binding domain 2*) – metil -CpG vezujuća domena verzija 2

MCR (prema engl. *melanocortin receptor*) – melanokortinski receptor

miRNA (prema engl. *micro ribonucleic acid*) – mikro ribonukleinska kiselina

mRNA (prema engl. *messenger ribonucleic acid*) – glasnička ribonukleinska kiselina

MSH – melanin stimulirajući hormon

NCOR2 (prema engl. *nuclear receptor co-repressor 2*) – korepresor jezgrinoga receptora

PDK4 (prema engl. *pyruvate dehydrogenase kinase 4*) – kinaza piruvat dehidrogenaze 4

PGC1 $\alpha$  (prema engl. *PPAR $\gamma$  coactivator 1-alpha*) – koaktivator PPAR $\gamma$

POMC (prema engl. *pro-opiomelanocortin*) – proopiomelanokortin

PPAR $\gamma$  (prema engl. *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* ) – receptor aktiviran peroksisomskim proliferatorom

RNA (prema engl. *ribonucleic acid*) – ribonukleinska kiselina

SAD – Sjedinjene Američke Države

TNF $\alpha$  (prema engl. *tumor necrosis factor*) – faktor tumorske nekroze alfa

UN – Ujedinjeni narodi



# 1. UVOD

Posljednjih 50 godina udio pretilih osoba rapidno se povećava te se sve više istraživanja fokusira na otkrivanje uzroka i mehanizama u podlozi pretilosti kao i na istraživanje utjecaja pretilosti na razvoj bolesti. Ovaj rad se bavi pregledom okolišnih čimbenika koji utječu na razvoj pretilosti epigenetskim mehanizmima te javnozdravstvenim posljedicama koje su povezane s pretilošću.

## 1.1. Pretilost

Prema definiciji Američkog udruženja za liječenje pretilosti, pretilost je kronična, relapsirajuća multifaktorska, neurobihevioralna bolest, u kojoj povećanjem količine masti u masnom tkivu dolazi do disfunkcije i abnormalnosti masnog tkiva s metaboličkim, biomehaničkim i psihosocijalnim posljedicama (1).

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije u svijetu je više od 1,9 milijardi (39%) odraslih osoba prekomjerne tjelesne mase, od toga više od 650 milijuna (13%) pretilih. Među osobama s prekomjernom tjelesnom masom podjednak je broj muškaraca i žena, dok je pretilih nešto više muškaraca (15%, nasuprot 11% žena). Ti podaci govore da se pretilost utrostručila od 1975. godine. Povećanje pretilosti uočeno je i među djecom. S 4% 1975. godine na 18% 2016. godine pa danas u svijetu živi 41 milijun pretilih djece do 5 godina i preko 340 milijuna pretilih djece starije od 5 godina i adolescenata do 19 godina (2).

Podaci Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo pokazuju slično stanje u Hrvatskoj. Skoro 60% odrasle populacije ima prekomjernu tjelesnu masu, a 20% je pretilo. Kao i u svijetu, nešto je više pretilih muškaraca (20%) nego žena (17%). Velik je porast pretilosti uočen i kod djece u Hrvatskoj, udio pretilih djece povećao se gotovo 15% u razdoblju od 2003. godine do 2015. godine kada je iznosio 35% pretilih djece (3).

Pretilost nastaje kada je unos energije (u formi hrane) veći nego potrošnja energije. Taj višak energije pohranjuje se u obliku masti, najviše u adipocitima potkožnog masnog tkiva ili masnog tkiva u abdomenu (visceralno masno tkivo) (4).

Osim što pohranjuje višak energije, masno tkivo luči hormone kojima povratnom spregom regulira uzimanje hrane. U mozgu, točnije u hipotalamusu nalaze se centar za glad (lateralna

jezgra hipotalamusa) i centar za sitost (ventromedijalna jezgra hipotalamusa). Uz ta dva centra u regulaciji energetske ravnoteže sudjeluju i paraventrikularne, dorzomedijalne i arkuatne jezgre hipotalamusa. U arkuatnim jezgrama postoje dvije vrste neurona: proopiomelanokortinski (POMC) koji luče melanin stimulirajući hormon ( $\alpha$ -MSH) i prijelazni reguliran kokainom i amfetaminom (CART, engl. *cocaine and amphetamine-related transcript*) te neuroni koji proizvode bjelančevinu srodnu agut-proteinu (AGRP) i neuropeptid Y (NPY). Svi ti neurotransmiteri djeluju na melanokortinske receptore (MCR-3 i MCR-4) u paraventrikularnim jezgrama hipotalamusa.  $\alpha$ -MSH djeluje kao agonist MCR-3 i MCR-4 i stimulira neuronske putove koji se šire u jezgru solitarnog trakta te povećava aktivnost simpatikusa i potrošnju energije. AGRP je antagonist MCR-3 i MCR-4 receptora te mu je djelovanje vjerojatno suprotno, no njegova uloga u regulaciji uzimanja hrane još nije dovoljno istražena (4).

Hormon masnog tkiva, leptin, sudjeluje u regulaciji preko tih putova. Kada se energija pretjerano pohranjuje povećana je količina masnog tkiva te adipociti stvaraju veću količinu leptina. U mozgu leptin ima nekoliko učinaka: smanjuje proizvodnju AGRP i NPY, aktivira POMC neurone i simpatikus. Na taj način masno tkivo daje mozgu do znanja da unos hrane više nije potreban (4).

Kod pretilih ljudi razina leptina u plazmi je povišena, no čini se da navedene jezgre hipotalamusa kod pretilih ljudi nisu osjetljive na leptin. Uz sve prethodno navedeno, kao što će biti opisano u ovome radu, na nastanak pretilosti utječu i okolišni čimbenici (4).

Masno tkivo, naročito visceralno masno tkivo ima još jedan sistemski učinak. Visceralno masno tkivo, zbog hipertrofije u pretilosti postaje rezistentno na inzulin (koji potiče lipogenezu) te dolazi do lipolize i nastanka slobodnih masnih kiselina. U jetri, slobodne masne kiseline oksidiraju se te nastaju slobodni kisikovi radikali. Također, hipertrofično masno tkivo i samo potiče migraciju makrofaga u vezivno tkivo, a i sami adipociti izlučuju proinflammatorne citokine. Svi ti čimbenici dovode do niske razine upale kod pretilih koja je važna za razvoj diabetes mellitus tip 2 te nekih tumora o čemu će biti riječ dalje u tekstu (5).

Klinički, pretilost je najlakše dijagnosticirati ako se izračuna indeks tjelesne mase (ITM) prema formuli:  $ITM = \text{tjelesna masa (kg)} / (\text{visina u metrima})^2$  koji pokazuje količinu masti u tijelu. ITM između 25 i 29,99  $\text{kg/m}^2$  naziva se prekomjerna tjelesna masa, a ITM veći od 30  $\text{kg/m}^2$  je pretilost. ITM nije idealan jer će i kod mišićavih osoba biti visok zbog velike mišićne mase.

Zato postoje druge metode za određivanje količine masti u tijelu poput određivanja debljine kožnog nabora ili određivanja bioelektrične vodljivosti (4).

Kod liječenja pretilosti naglasak je na promijeni prehrambenih navika u svrhu smanjena unosa energije. Preporuča se konzumacija hrane od pretežito celuloznih tvari jer takva hrana zbog svoje naizgled velike količine rasteže želudac te djelomice utažuje glad. Uz to, preporuča se i povećanje tjelesne aktivnosti u svrhu povećanja potrošnje energije. Postoje i lijekovi koji djeluju na smanjenje intenziteta gladi (sibutramin) ili inhibiraju probavu masti u crijevima (orlistat), no njihove nuspojave nadmašuju njihovu korist u mršavljenju. Što se tiče operacijskih zahvata, ugradnje želučane prenosnice i postavljanja želučanog obruča, oni su učinkoviti, no nose sa sobom sve rizike operacijskoga zahvata (4).

## 1.2. Okolišni čimbenici

U Stockholmu je 1972. godine održana Prva konferencija Ujedinjenih naroda o čovjekovu okolišu (6). Nakon niza katastrofa, poput one u Minamati u Japanu kada se preko 1200 ljudi otrovalo jedući ribu u kojoj su se nakupile velike količine žive, svjetske vlade počele su prepoznavati važnost utjecaja okoliša na zdravlje ljudi.

Za multifaktorske bolesti, poput pretilosti, okolišni čimbenici ključni su etiološki čimbenici jer samo je 20 do 25% pretilosti uzrokovano genetskim čimbenicima (4). Prehrana i smanjena fizička aktivnost okolišni su čimbenici za koje se već dugi niz godina zna da utječu na nastanak pretilosti, a u novije vrijeme često se govori i o drugim sociološkim čimbenicima (socioekonomski status) te endokrinim disruptorima (7,8).

Prehrana je glavni izvor energije za ljudski organizam. Probavom hrane u probavnom traktu nastaju jednostavniji spojevi koji zatim krvlju putuju do svake stanice u tijelu gdje se iskorištavaju za stvaranje energijom bogatih spojeva (6). Kao što je već navedeno, višak energije tijelo pohranjuje u obliku masnog tkiva.

Glavni izvori energije iz prehrane su bjelančevine, ugljikohidrati i masti. Udio energije iz bjelančevina u ukupnom dnevnom unosu energije je 10-15%, udio iz ugljikohidrata 50-60%, a udio iz masti 25-30%. Bjelančevine, osim što su izvor energije, također su i glavni gradivni materijal ljudskog organizma i izvor esencijalnih aminokiselina koje tijelo ne može samo sintetizirati, a prijeko su potrebne za rast djece te građu proteina ljudskog tijela. Dnevna potreba za bjelančevinama kod odrasle osobe je 0,7 g/kg, a kod djece 2 g/kg. Ugljikohidrati su glavni

izvor energije iz prehrane. Dnevna potreba za ugljikohidratima kod odrasle osobe je 4 g/kg. Prema probavljivosti dijele se na probavljive i neprobavljive. Probavljivi ugljikohidrati u probavnom traktu razgrađuju se do jednostavnih šećera (glukoza) koji se zatim resorbiraju u krv. Neprobavljivi ugljikohidrati najčešće su vlakna biljnog podrijetla koji se ne razgrađuju u probavnom traktu. Zbog toga, povećanje njihova unosa čini temelj liječenja pretilosti prehranom jer takve namirnice svojom naizgled velikom količinom stvaraju osjećaj punosti i sitosti. Masti su također bogat izvor energije, ali je potreba za njima dvostruko manja nego za ugljikohidratima. Osim kao izvor energije važni su i za apsorpciju vitamina topivih u mastima (vitamini A, D, E i K). Vitamini u ljudskom organizmu služe najčešće kao koenzimi (C, B1, B6, B9). Vitamin B3 (nikotinamid) važan je za proces staničnog disanja kao kofaktor. Vitamin A sudjeluje u stvaranju proteina bitnog za vid – rodopsina, a vitamin K važan je za proces zgrušavanja krvi. Vitamin E veže slobodne kisikove radikale i sprječava oštećenje stanice. Vitamin D sudjeluje u resorpciji kalcija i fosfora u probavnom traktu te regulira njihovu koncentraciju u krvi, a kao što će biti opisano u daljnjem tekstu, njegov epigenetski učinak povezuje se s prevencijom nastanka kolorektalnog karcinoma. Prehranom se također unose i elementi u tragovima, neizostavni za normalno funkcioniranje organizma, poput željeza i joda (6).

Energija dobivena iz hrane računa se u kilodžulima (kJ) ili kilokalorijama (kcal). Dnevna potreba za energijom ovisi o tjelesnoj masi, tjelesnoj visini, spolu i intenzitetu fizičke aktivnosti. Najčešće iznosi između 1100 kcal i 2700 kcal (6).

Prema američkim istraživanjima, dnevni unos energije povećao se s 1800 kcal na 2000 kcal između 1970. i 1996. Također, povećala se i energetska vrijednost porcija. Primjerice meni u McDonald'su 1990. imao je 984 kcal dok je 2000. isti meni imao 1258 kcal. Takav povećani energetska unos sigurno je pridonio epidemiji pretilosti (9).

Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije fizička aktivnost označava svaki pokret tijela nastao kontrakcijom skeletnih mišića za koji je potrebna potrošnja energije. Prema intenzitetu fizičku aktivnost možemo podijeliti na umjerenu i snažnu. Umjerena fizička aktivnost označava fizičku aktivnost umjerenog napora poput hodanja, plesanja, obavljanja kućanskih poslova ili vrtlarenja. Snažna fizička aktivnost zahtjeva više napora, ubrzava rad srca i disanje. Primjeri teže fizičke aktivnosti su trčanje, penjanje, brzo plivanje ili brzo hodanje (10).

Iako je poznato da je fizička aktivnost zaštitni čimbenik za mnoge javnozdravstvene probleme modernog svijeta (10), istraživanja su pokazala zabrinjavajući nedostatak fizičke aktivnosti, naročito kod djece. Američko istraživanje iz 2002. godine pokazalo je da 60% djece u dobi od 9 do 13 godina nije sudjelovalo niti u jednom obliku fizičke aktivnosti izvan škole. Škotsko istraživanje pokazalo je da djeca u dobi od 3 do 5 godina 76% vremena provedu u sedentarnim aktivnostima, a samo 2% vremena radeći neku fizičku aktivnost (9).

Upravo zato Svjetska zdravstvena organizacija izdala je preporuke za minimalnu dnevnu količinu tjelesne aktivnosti ovisno o dobi. Za djecu od 5 do 17 godina preporuča se minimalno 60 minuta aerobne fizičke aktivnosti dnevno. Odraslim osobama preporuča se 150 minuta fizičke aktivnosti tjedno, od toga barem 75 minuta aerobne, snažne fizičke aktivnosti (11).

Socioekonomski status označava položaj osobe u društvu prema ekonomskim kriterijima, njenom zanimanju i edukaciji. Klasifikacija po socioekonomskom statusu može biti jednostavna, tako da uzima u obzir zanimanje kojim se osoba bavi, što je povezano s dohotkom i edukacijom. Složena klasifikacija po socioekonomskom statusu obuhvaća dohodak, edukaciju, zanimanje i druge faktore poput etničke i kulturalne pripadnosti te pismenosti (12). Socioekonomski status neposredni je okolišni čimbenik koji utječe na pretilost, točnije socioekonomski status utječe na ponašanja (fizičku aktivnost i način prehrane) važna za razvoj pretilosti (9).

Endokrini disruptori su egzogene tvari ili mješavine koje mijenjaju funkciju endokrinog sustava i posljedično utječu na zdravlje organizma, potomstva ili subpopulacije. To su različite kemikalije poput ftalata, bisfenola A i diklorodifeniltrikloroetana koje se nalaze u plastici, pesticidima, proizvodima za osobnu njegu, aditivima i različitim drugim predmetima koje ljudi svakodnevno upotrebljavaju. U ljudski organizam ulaze ingestijom, udisanjem ili preko kože. Njihov najveći utjecaj na ljudski organizam očituje se na reproduktivnom sustavu (13).

Većina navedenih okolišnih čimbenika posrednim ili neposrednim mehanizmima utječe na pojavu pretilosti u ljudi. Međutim, svaki od njih može biti odgovoran za pokretanje epigenetskih reakcija kojima se, bez promjene u redoslijedu nukleotida DNA molekule, modulira ekspresija gena.

### 1.3. Epigenetika

Epigenetika je znanost koja proučava svaku kromatinsku promjenu koja utječe na ekspresiju gena, bila ona mitotička i/ili mejotička, stabilna ili nestabilna (14). Epigenetski mehanizmi zapravo su kemijske promjene na samoj DNA molekuli ili njenim histonima te postranskripcijske promjene mRNA. Te promjene ne mijenjaju redosljed nukleotida DNA molekule, već djeluju na ekspresiju gena. Na ideju o epigenetici došao je 1940-ih Waddington proučavajući rast i razvoj embrija. On nije smatrao da je genotip samo zbroj gena već cijeli sustav koji se smatra potencijalom za razvojne reakcije, dok je na fenotip gledao kao na razvojnu jedinicu. Proučavao je poveznicu između genotipa i fenotipa te je u svojoj knjizi „Epigenotip“ 1942. definirao kako je upravo epigenetika ta poveznica. Danas postoje dva različita pogleda na epigenetiku: uloga epigenetike u razvoju i uloga epigenetike u evoluciji (podrijetlo epigenetskih promjena) (14). Za ovaj rad važna su oba pogleda na epigenetiku jer okolišni čimbenici često djeluju od najranijih stadija organizma, a neki njihovi učinci mogu se prenositi s generacije na generaciju.

Danas poznati epigenetski mehanizmi uključuju DNA metilaciju, modifikaciju jezgrinih histona razvrstanih u 4 obitelji (H2A, H2B, H3 i H4) te posttranskripcijsku modulaciju mRNA (5).

Najviše proučavan epigenetski mehanizam, DNA metilacija, proces je adicije metilne skupine na citozin u regijama DNA molekule bogatim CpG dinukleotidima poznatim pod imenom CpG otoci koje su smještene blizu promotorskih regija gena. Jače metilirana područja u procesu transkripcije prepisuju se manje te pokazuju manju gensku ekspresiju, dok manje metilirana područja pokazuju veću gensku ekspresiju. Proces je reverzibilan, kataliziran enzimima DNA metiltransferazama (DNMT) i DNA demetilazama (DNAdemeths) (5).

Modifikacija jezgrinih histona označava adiciju različitih skupina na N-terminalne krajeve (15), a najviše je proučavan proces acetilacije i metilacije na lizin i arginin. Procesi acetilacije i metilacije obavljaju se enzimima transferazama. Rezultati te modifikacije mogu biti i aktivacija i inhibicija ekspresije gena. Primjerice, u histonu H3 acetilacija lizina na mjestu 9/14 i metilacija lizina na mjestu 4 povezane su s aktivacijom ekspresije gena, dok su metilacija lizina na mjestu 9 ili metilacija lizina na mjestu 27 povezane sa smanjenom ekspresijom gena (5).

Nekodirajuće regulatorne RNA (ncRNA) kratke su sekvence RNA od svega nekoliko desetaka nukleotida pa do nekoliko stotina nukleotida. One se vežu za specifične regije glasničke RNA

(mRNA), dolazi do djelovanja ribonukleaze i uništavanja mRNA. Najpoznatija od nekodirajućih, kratkih sekvenci RNA koje imaju utjecaj na posttranskripcijsku modifikaciju gena je micro-RNA (miRNA). miRNA duga je svega 19 do 33 nukleotida. Uparivanjem miRNA i mRNA može doći do inhibicije translacije i/ili destabilizacije mRNA (5).

Epigenetika je trenutno jedna od najaktivnije proučavanih polja biologije (14), što i ne iznenađuje s obzirom da se smatra kako su upravo epigenetski mehanizmi u podlozi mnogih javnozdravstvenih problema. Samo gensko nasljeđivanje objašnjava tek mali postotak slučajeva bolesti poput pretilosti, diabetes mellitus tip 2 te različitih karcinoma. Stoga se istraživanja sve više fokusiraju na otkrivanje načina kako okoliš djeluje na nastanak i razvoj tih bolesti. Sve je više dokaza kako je upravo epigenetika most između djelovanja okolišnih čimbenika i nastanka bolesti multifaktorske etiologije (5).

## 2. OKOLIŠNI ČIMBENICI S EPIGENETSKIM UČINKOM NA PRETILOST

Etiologija pretilosti, kao jednog od najvećih javnozdravstvenih problema današnjice, fokus je mnogih istraživanja. S obzirom da svega petina svih slučajeva pretilosti ima uzrok u mutaciji gena, s vremenom je postalo jasno da većinu pretilosti uzrokuju okolišni čimbenici. Daljnjim istraživanjem načina na koji okolišni čimbenici pridonose razvoju pretilosti te razvojem epigenetike sve se više počelo istraživati bi li upravo epigenetika mogla biti posrednik između okolišnih čimbenika i bolesti kojima ti čimbenici pridonose, poput pretilosti. Istraživanja su pokazala hipermetilaciju *HIF3A* lokusa u krvi i masnom tkivu pretilih osoba europskog podrijetla te se smatra da promjena HIF signalnog puta koja nastaje kao posljedica te hipermetilacije ima važnu ulogu u nastanku pretilosti (15). Ovaj rad prikazat će utjecaj najvažnijih okolišnih čimbenika na promjenu epigenoma kod pretilih osoba.

### 2.1. Prehrana

Prehrana na razvoj pretilosti utječe svojom kvantitetom i kvalitetom. Utjecaj kvantitete je jasan: povećanim unosom energije (hrane) u tijelu nastaje višak energije koji se pohranjuje u formi masnog tkiva (4). Učinci kvalitete, odnosno sastava hrane, više se očituju na molekularnoj razini (16). Primjerice, ugniježđeno istraživanje slučajeva i kontrola pokazalo je da muškarci i žene skloni mediteranskom načinu prehrane imaju manji rizik za pretilost, unatoč tome što su nositelji alela *FTO* gena rizičnih za pretilost (*FTO* lokus najviše je povezan s indeksom tjelesne mase; polimorfne varijacije nekodirajuće regije toga gena mogu adaptirati adipocite da upotrebljavaju energiju, umjesto da je pohranjuju (17)). Druge studije također su pokazale da zdrave prehrambene navike umanjuju genetsku sklonost dugoročnom nakupljanju tjelesne mase. Štoviše, pozitivni ishodi zdravih prehrambenih navika izraženiji su kod ljudi koji imaju veći genski rizik za pretilost (16).

Istraživanje koje su proveli Laker et al. (18) analizira može li fizička aktivnost, točnije vježbe otpornosti, tijekom uzimanja dijete s visokim udjelom masti kompenzirati štetne učinke takve prehrane na epigenom. U tom istraživanju prikazani su i zasebni učinci dijete s visokim udjelom masti na epigenom, bez utjecaja fizičke aktivnosti.



Poznato je da dijete s visokim udjelom masti imaju štetni učinak na metabolički aktivna tkiva, poput mišića. Međutim u posljednje vrijeme režim prehrane s visokim udjelom masti, a malim udjelom ugljikohidrata u kombinaciji s vježbama otpornosti popularan je način gubljenja kilograma, poglavito zato što su masne kiseline, nastale probavom i metabolizmom masti, vrlo zasitne. Mogu li stvarno vježbe otpornosti kompenzirati štetnost visokog udjela masti u prehrani do sad nije istraživano i upravo zato je to glavna svrha ove studije (18).

Sudionici istraživanja bili su trinaestorica sredovječnih, sedentarnih muškaraca normalnog indeksa tjelesne mase. Sva trinaestorica su 9 dana uzimali dijetu s povišenim udjelom masti, ali bili su raspoređeni u dvije skupine: jedna skupina je tijekom tih 9 dana radila vježbe otpornosti na početku, u sredini i na kraju istraživanja, druga skupina nije radila vježbe. Bioptat mišića uzet je na početku, prije dijete s visokim udjelom masti, i na kraju. Iz bioptata analizirala se metilacija DNA te je napravljeno i sekvencioniranje RNA da bi se utvrdilo je li došlo do promjene transkripcije gena tijekom prehrane dijetom s visokim udjelom masti. Također, tijekom istraživanja uzeti su i uzorci plazme iz kojih se odredila razina čimbenika tumorske nekroze alfa (engl. *tumor necrosis factor*, TNF $\alpha$ ) i interleukina-6 (IL-6) (18).

Rezultati analize diferencijalno metiliranih DNA regija (engl. *differentially methylated DNA regions*, DMR) pokazali su značajno drugačiji obrazac metilacije kod sudionika koji su uzimali samo prehranu bogatu mastima. Također je uočeno da pod utjecajem dijete s visokim udjelom masti dolazi do atrofije mišića te da takva prehrana potiče ekspresiju gena zaduženih za imunološki i upalni odgovor. Jedan od takvih gena je *IRAK1* (engl. *interleukin-1 receptor associated kinase 2*) koji kodira receptor za interleukin 1 i potiče upalni odgovor. Vježbe otpornosti nisu uspjele u potpunosti kompenzirati utjecaj prehrane s visokim udjelom masti na skeletni mišić (18).

Rezultati tog istraživanja pokazuju kako prehrana određenog sastava, u ovom slučaju prehrana obogaćena mastima, ima epigenetski utjecaj na metabolički aktivna tkiva, mijenjajući metilaciju i ekspresiju gena.

Da prehrana može utjecati na nastanak pretilosti od samog začetka života u majčinoj utrobi najbolje pokazuju epidemiološke studije nastale proučavanjem djece koju su rodile majke (P) koje su u Drugom svjetskom ratu u Nizozemskoj bile izložene gladi. Originalna kohorta (F1) uključivala je 2414 osoba rođenih između studenog 1943. godine i veljače 1947. godine. U toj kohorti bio je veći postotak pretilosti, metaboličkih poremećaja i intolerancije na glukozu u kasnijoj životnoj dobi (19). Povećana metilacija gena za leptin zabilježena je kod muškaraca iz

originalne kohorte (15). Leptin je, kao što je navedeno, hormon masnog tkiva koji signalizira mozgu da je pohranjena dovoljna količina energije i na taj način suprimira osjećaj gladi. U istoj kohorti zabilježena je i smanjena metilacija *IGF2* gena nakon što je kohorta bila izložena bogatim nutritivnim uvjetima (15). *IGF2* gen kodira peptidni hormon, IGF2, važan za fetalni rast i razvoj (20). Epidemiološko istraživanje provedeno na djeci (F2) originalne kohorte pokazalo je povećan indeks tjelesne mase kod osoba čiji je otac (F1) bio izložen gladi, dok indeks tjelesne mase kod osoba čija je majka (F1) bila izložena gladi nije odstupao (21). Rezultati te studije pokazuju da se transgeneracijsko negenomsko nasljeđivanje prenosi po očevoj liniji.

Studije na primatima i glodavcima pokazale su kako i energijom bogata prehrana majke ima epigenetski utjecaj na fetus. Kod primata, energetske bogata prehrana majke mijenja aktivnost fetalnog tipa histonske deacetilaze povezane s regulacijom gena zaduženih za metabolizam. Kod glodavaca, energetske bogata prehrana majke povećava transkripcijski aktivator leptina i transkripcijski aktivator adiponektina. Oba hormona sintetiziraju se u masnom tkivu i utječu na regulaciju uzimanja hrane (19).

Klinički efekti majčine prehrane bogate energijom na fetus očituje se u povećanoj porođajnoj težini te povećanom riziku za nastanak metaboličkih bolesti i pretilosti kasnije tijekom života (19).

No, za razliku od utjecaja majčinog gladovanja na epigenom fetusa koji izaziva transgeneracijski efekt, majčina prehrana bogata energijom za vrijeme trudnoće nema utjecaj na F2 generaciju (19). Ta činjenica još više naglašava važnost prevencije pretilosti jer pravilna prehrana pojedinca može umanjiti epigenetske modifikacije prethodnih generacija.

## 2.2. Bihevioralni/sociološki čimbenici

Najvažniji bihevioralni čimbenik za nastanak pretilosti je fizička aktivnost, točnije, njezin nedostatak. Nedostatak fizičke aktivnosti, koji se obično procjenjuje brojem sati provedenim sjedeći pred televizorom, zapravo samo još ojačava genetsku sklonost nastanku pretilosti. S druge strane, slično kao i kod pravilne prehrane, fizička aktivnost može umanjiti utjecaj alela FTO gena koji povećavaju sklonost pretilosti (16).

Istraživanje Rönn et al. (22) pokazalo je kako fizička aktivnost dovodi do promjene u metilaciji DNA u masnom tkivu inače sedentarnih muškaraca nakon 6 mjeseci vježbanja.

U istraživanju je sudjelovao 31 muškarac s nešto povišenim prosječnim indeksom tjelesne mase od 27.8 kg/m<sup>2</sup>. Metilacija DNA određivala se pirosekvenciranjem na bioptatu masnog tkiva prije vježbanja i 6 mjeseci nakon vježbanja. Iz istog uzorka određivala se i ekspresija RNA. Sudionicima je preporučeno da tijekom istraživanja ne mijenjaju način prehrane (22).

Rezultati su pokazali promjenu u razini DNA metilacije u 17975 CpG regija povezanih s 7663 gena. Do promjene metilacija došlo je i kod CpG regija 18 gena povezanih s pretilošću. Kod trećine tih gena došlo je i do promjene ekspresije gena, uključujući i gene *HDAC4* i *NCOR2*. *HDAC4* gen kodira histonsku deacetilazu 4 koja koči transkripciju GLUT4 u adipocitima. *NCOR2* kodira protein NCOR2 važan za adipogenezu i metabolizam lipida koji može regrutirati enzime deacetilaze, uključujući histonsku deacetilazu 4. Metilacija tih gena nakon vježbanja bila je povećana, a ekspresija manja. Ta dva gena su i inače kandidati za patogenezu pretilosti te su istraživači odlučili odrediti funkciju tih gena *in vitro* u adipocitima (22).

Dodatnim eksperimentom pokazalo se da nakon utišavanja *HDAC4* i *NCOR2* gena lipogeneza raste i u bazalnim uvjetima i dodavanjem inzulina. Pretpostavlja se da kod stišavanja *HDAC4* dolazi do ekspresije GLUT 4, ulaska glukoze u adipocite i lipogeneze. Inhibitori *HDAC4* razmatraju se za potencijalnu primjenu u terapiji pretilosti, stoga ovi rezultati mogu imati klinički značaj (22).

Usto, rezultati ovog istraživanja pokazuju kako je metilacija masnog tkiva drugačija kod ljudi prije i nakon fizičke aktivnosti. No, uzevši u obzir rezultate istraživanja Laker et al. (18), navedene u prethodnom odlomku, kako fizička aktivnost ipak ne može potpuno umanjiti negativne efekte nezdrave prehrane još je jednom neophodno napomenuti kako je u nastanku i suzbijanju pretilosti važna i prehrana i fizička aktivnost.

Sociološki čimbenici, najbolje predstavljeni socioekonomskim statusom, imaju neposredan utjecaj na razvoj pretilosti. Socioekonomski status utječe na izbor namirnica i dostupnost zdravijih prehrambenih alternativa kako u vidu cijene tako i u vidu doslovne fizičke dostupnosti jer su u siromašnijim predjelima, naročito u Americi, jedine dostupne opcije za kupnju namirnica prodavaonice alkoholnih pića, benzinske postaje ili restorani brze hrane. Slične prepreke nalaze se i kad je u pitanju dostupnost objekata i infrastrukture namijenjene fizičkoj aktivnosti. Siromašniji predjeli nemaju nikakva dječja igrališta niti ustanove namijenjene rekreaciji. Edukacija, koja je i inače najvažniji čimbenik socioekonomskog statusa, određuje koliko će pojedinac razumjeti važnost pravilne prehrane, kao i kako je integrirati u svoj život (7).

Istraživanje provedeno na američkim adolescentima 2013. godine pokazalo je kako je porast pretilosti koji je zabilježen od 80-ih do ranih 2000-ih dosegnuo plato pa tako pretilost među adolescentima nije rasla u razdoblju od 2003-2004 do 2009-2010. Iako bi takvi rezultati trebali biti zadovoljavajući, čini se da postoje razlike s obzirom na socioekonomske klase. Među adolescentima čiji roditelji imaju samo srednjoškolsko obrazovanje ili manje, proporcija pretili se u razdoblju od 1990. do 2010. povećavala, dok se među adolescentima čiji su roditelji visoko obrazovani proporcija pretilih povećavala od 1990. do početka 2000-ih, a od sredine 2000-ih do 2010. se smanjuje. Razlozi za to mogli bi ležati upravo u načinu prehrane i fizičkoj aktivnosti (7).

Dnevni energijski unos među adolescentima čiji roditelji imaju samo srednjoškolsko obrazovanje ili manje smanjio se s prosječnih 2271 kcal na 2150 kcal od 1990. do 2010., dok se kod adolescenata čiji su roditelji visokoobrazovani prosječni energijski unos smanjio puno više, iako je konačni prosječni energijski unos 2010. isto 2150 kcal, 1990. bio je 2487 kcal (7).

Kod fizičke aktivnosti slična je situacija. 2003. godine 93% adolescenata čiji su roditelji visokoobrazovani izjavilo je da je u posljednjih 30 dana obavljalo bar 10 minuta kontinuirane fizičke aktivnosti dok je 87% izjavilo da se u posljednjih 7 dana barem 20 minuta bavilo nekim sportom. Za razliku od njih, 90% adolescenata čiji roditelji imaju samo srednjoškolsko obrazovanje ili manje izjavilo je da je u posljednjih 30 dana obavljalo bar 10 minuta neke fizičke aktivnosti, dok se njih samo 80% u posljednjih 7 dana bavilo nekim sportom barem 20 minuta. 2010. godine ta se razlika samo produbila pa je tako s 3-7% koliko je iznosila 2003. godine porasla na 11-13% koliko je iznosila 2010. godine (7).

Dakle, iako su rezultati na razini cijele države bili zadovoljavajući pokazujući trend prestanka porasta pretilosti među adolescentima, čini se da taj trend nije zastupljen u svim socioekonomskim klasama te svakako još treba raditi na prevenciji pretilosti u svim socioekonomskim klasama (7).

### **2.3. Endokrini disruptori**

Blumberg et al. (23) 2006. godine predložili su hipotezu o obesogenima kao kemikalijama koje povećavaju broj masnih stanica i/ili pohranu masti u postojeće adipocite i tako direktno stimuliraju pretilost. Od tada istraživanja su otkrila nekolicinu obesogena upravo među endokrinim disruptorima. Kao što je rečeno, endokrini disruptori najviše utječu na spolni sustav, stoga je očekivano da će njihov obesogeni učinak biti najizraženiji na fetus te spolne stanice. Rani razvoj fetusa zahtjeva hormonsko djelovanje u točno određenom trenutku kako bi potpomoglo pravilnom razvoju i rastu tkiva i organa. Djelovanje endokrinih disruptora u tom najosjetljivijem razdoblju ljudskog života može ostaviti trajne posljedice na zdravlje. Djelovanjem na spolne stanice, endokrini disruptori uzrokuju transgeneracijski efekt, odnosno posljedice njihova djelovanja vide se tek na F3 generaciji (8).

Bisfenol A (engl. *bisphenol A*, BPA) koristi se za izradu polikarbonatnih plastika koje se koriste u proizvodnji ambalaže za hranu, pića i medicinske proizvode. Prenosi se transplacentalno i izlučuje se mlijekom te oponaša djelovanje estrogena iako je njegov afinitet za vezanje na estrogenske receptore slab (8). Rezultati istraživanja obesogenog djelovanja BPA u dječjoj dobi su oprečni. Dvije studije pokazuju da je prenatalna izloženost bisfenolu A povezana s povećanim opsegom struka, povećanim indeksom tjelesne mase i povećanim rizikom za pretilost. Studija na reprezentativnom uzorku američke djece određivala je izloženost bisfenolu A prema koncentraciji metabolita u urinu. Rezultati te studije pokazali su da djeca s većim koncentracijama bisfenola A u urinu imaju 25% veći rizik za pretilost u usporedbi s djecom s manjim koncentracijama bisfenola A u urinu. S druge strane, neke studije pokazuju da je veća prenatalna izloženost bisfenolu A povezana s manjim indeksom tjelesne mase ili da uopće nema povezanosti između bisfenola A i indeksa tjelesne mase (24).

Ftalati također imaju široki spektar primjene u proizvodima za osobnu njegu, lijekovima i industriji plastike. Njihov utjecaj u organizmu interferira s djelovanjem androgenih, tiroidnih i glukokortikoidnih hormona (24). Najrasprostranjeniji je dietilheksil ftalat (engl. *di-2-ethylhexyl*

*phthalate*, DEHP) koji se u organizmu metabolizira u monoetilheksil ftalat i pojačava ekspresiju PPAR $\gamma$  receptora važnih za diferencijaciju adipocita te na taj način vjerojatno pridonosi razvoju pretilosti i povezanih metaboličkih bolesti (8). Studija na štakorima pokazala je da postoji i transgeneracijski epigenetski učinak ftalata. Kod potomaka F1 generacije (F1 generacija je bila izložena ftalatima) zabilježena je hipermetilacija *GLUT4* gena te posljedično smanjena ekspresija GLUT4, transportera za glukozu ovisnog o inzulinu koji je važan za ulazak glukoze u adipocite i skeletne mišiće. Taj je transporter važan za razvoj metaboličkih bolesti, no točan mehanizam još treba istražiti (8).

Diklorodifeniltrikloroetan (DDT) jedan je od najpoznatijih insekticida. U široku uporabu dolazi 50-ih godina prošlog stoljeća kada je korišten za eradikaciju malarije u područjima s umjerenom klimom. U SAD-u je zabranjen od 1972., a 2001. UN je skoro u potpunosti zabranio uporabu DDT-a. Od tada raste broj dokaza o povezanosti DDT-a i pretilosti. Studija na štakorima pokazala je transgeneracijski epigenetski učinak DDT-a. F1, izložena generacija, povećano je oboljevala od pretilosti zbog izravnih učinaka DDT-a. U F2 generaciji nije zabilježen povećani pobol od pretilosti. Kod F3 generacije zabilježena je povećana visceralna adipoznosti i kod manjih i kod viših doza DDT-a. I visoka i niska doza smatrane su bezopasnima za ljude i okoliš. Također, 50% ženki i mužjaka štakora koji su bili izloženi niskoj dozi DDT-a razvilo je pretilosti, a 75% mužjaka štakora (ne i ženki) koji su bili izloženi višoj dozi razvilo je pretilost. Diferencijalno metilirane DNA regije za *TUBB3*, *SLC4A4* i *CARM1* gene pronađene su u sjemennoj tekućini F3 generacije. Smatra se kako se transgeneracijski učinak DDT-a prenosi metilacijom CpG otoka, koji su u ovom slučaju bili hipometilirani. Ipak, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdio točan mehanizam.

Svaki pojedini endokrini disruptor ima obesogeni učinak ovisan o dozi i vremenu u kojem je organizam izložen, no u prirodi smo najčešće izloženi djelovanju više endokrinih disruptora zajedno. Da bi se utvrdilo točno sinergično djelovanje različitih endokrinih disruptora na ljudski organizam potrebni su podaci ne samo iz životinjskih studija, već i iz epidemioloških studija te genomskih baza podataka.

### **3. JAVNOZDRASTVENO ZNAČENJE PRAĆENJA POVEZANOSTI EPIGENETIKE I PRETILOSTI**

Povećanje masnog tkiva kod pretilih osoba ima i sistemski učinak u vidu upale niskog stupnja i povećanja slobodnih kisikovih radikala (5), stoga ne iznenađuje da pretilost ima utjecaj na razvoj bolesti mnogih organa. To su bolesti poput diabetes mellitus tip 2, tumora te kardiovaskularne bolesti i nalaze se na vrhu ljestvice javnozdravstvenih problema u razvijenim zemljama (25).

#### **3.1. Pretilost i javnozdravstvene posljedice**

Još početkom tisućljeća pretilost je prepoznata kao rizični čimbenik za kronične nezarazne bolesti poput diabetes mellitus tip 2 te različitih oblika tumora (26), no mehanizmi koji bi objašnjavali povezanost do danas ostaju nepoznati. Mnogobrojne studije, ipak, sugeriraju da bi zapravo epigenetika mogla objasniti povezanost pretilosti i navedenih bolesti (5,27–29).

Pretpostavlja se da kod pretilih osoba dolazi do epigenetskih modifikacija gena u stanicama organa koji je zahvaćen bolešću (27,28), ali modifikacije gena nalaze se i u organima na koje djeluju produkti oboljelih organa (5,27), kao i u tkivima koja okružuju oboljeli organ (29).

##### **3.1.1. Diabetes mellitus tip 2 i epigenetski mehanizmi povezane pretilosti**

Diabetes mellitus tip 2 složena je metabolička bolest kojoj je glavni nalaz kronično povišena razina glukoze u krvi uzrokovana inzulinskom rezistencijom ciljnih tkiva (na primjer skeletni mišić) te disregulacijom inzulina iz  $\beta$ -stanica Langerhansovih otočića gušterače (30). Točan mehanizam bolesti još uvijek je nepoznat, no smatra se kako nastaje međudjelovanjem genetičkih i okolišnih čimbenika (5). No, uloga genetskih čimbenika je mala, samo 10-15% (27), a čak 60 do 90% ljudi oboljelih od diabetes mellitus tip 2 je pretilo (5). Stoga autori Dobosz et al.(27) daju pregled studija koje istražuju epigenetski učinak pretilosti na nastanak diabetes mellitus tip 2.

Istraživanje na  $\beta$ -stanicama pankreasa DIO miševa (engl. *diet induced obesity*, pretilost uzrokovana dijetom) pokazalo je drugačiju ekspresiju gena uključenih u stanični ciklus i

proliferaciju stanice, signalne putove te metabolizam mitohondrija i kolesterola (3). Istraživanja na ljudima također su pokazala drugačiju metilaciju kod pretilih sudionika oboljelih od diabetes mellitus tipa 2 i zdravih sudionika. Naime, promotori gena za koje se zna kako su uključeni u metabolizam  $\beta$ -stanica pankreasa (*INS* – kodira inzulin, *PDX1* – kodira transkriptorski faktor važan za razvoj i sazrijevanje  $\beta$ -stanica gdje regulira inzulinsku ekspresiju, *GLP1R* – kodira receptor koji stimulira inzulinsku sekreciju i *PPARGC1A* – kodira PGC1 $\alpha$  koji je koaktivator PPAR $\gamma$ ) pokazuju drugačiji obrazac metilacije – hipermetilaciju kod sudionika oboljelih od diabetes mellitus tipa 2 (27).

Istraživanja su također proučavala metilacijski obrazac skeletnih mišića, najvažnijeg tkiva za iskorištavanje glukoze, kod pretilih osoba oboljelih od diabetes mellitus tipa 2 i zdravih osoba. Vezanje inzulina za inzulinski receptor na skeletnom mišiću pokreće kaskadu kojoj je posljedica premještanje GLUT4 na membranu i ulazak glukoze u mišić (27).

Različita metilacija promotorske regije za gen *PPARGC1A* ustanovljena je kod pretilih osoba oboljelih od diabetes mellitus tipa 2 i zdravih osoba. Kod oboljelih, promotorska regija je hipermetilirana, a rezultat je slabija ekspresija proteina PGC1 $\alpha$ , jednog od najvažnijih metaboličkih regulatora u skeletnom mišiću (27).

Metilacija još jednog gena uključenog u normalno funkcioniranje skeletnih mišića bila je promijenjena kod pretilih osoba oboljelih od diabetes mellitus tipa 2. Gen *PDK4*, koji kodira piruvat dehidrogenazu 4 (dio kompleksa piruvat dehidrogenaze, enzima zaduženog za prvu fazu u procesu staničnog disanja – oksidaciju piruvata u acetil-CoA) bio je hipometiliran u oboljelih. To je negativno koreliralo s ekspresijom gena, a pozitivno koreliralo s indeksom tjelesne mase (ITM) (27).

Masno tkivo, osim što služi za pohranu energije u ljudskom organizmu, ima i ulogu endokrinog organa koji izlučuje hormone, citokine i slobodne masne kiseline (5). Jedan od hormona koje izlučuje masno tkivo je i adiponektin, hormon koji senzibilizira ostala tkiva na inzulin (31). Istraživanja su pokazala da je kod pretilih sudionika oboljelih od diabetes mellitus tip 2 hipermetilirana promotorska regija za gen *ADIPOQ* koji kodira adiponektin te da je usto i smanjena ekspresija tog gena (27).

Stoga, može se zaključiti da su epigenetski procesi značajan čimbenik u procesu nastanka diabetes mellitus tip 2, no točan redoslijed uzroka i posljedica, baš kao i sam molekularni mehanizam nastanka bolesti još uvijek je nepoznat.



### 3.1.2. Karcinom dojke i epigenetski mehanizmi povezane pretilosti

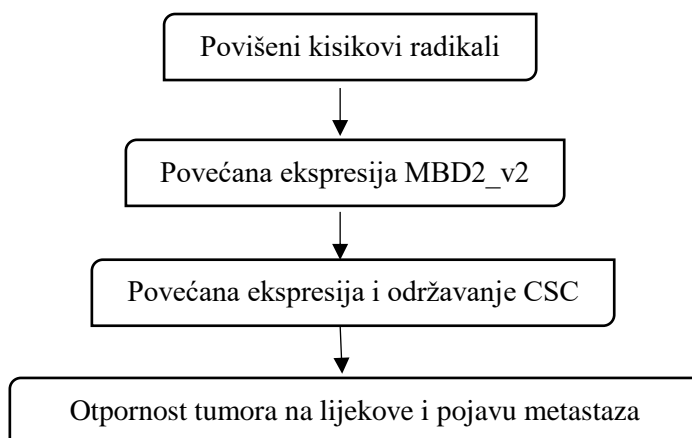
Karcinom dojke najčešći je tumor kod žena. Prema Registru za rak Republike Hrvatske (32) jednu četvrtinu svih tumora kod žena čini karcinom dojke. Incidencija karcinoma dojke u 2015. godini bila je 126,3/100000, a mortalitet od karcinoma dojke 47,7/100000. Ti podaci upućuju na veličinu problema koju predstavlja ovaj karcinom (32).

Tradicionalna patohistološka podjela dijeli većinu karcinoma dojke (80%) na dvije skupine: duktalni ili lobularni, ovisno o tome jesu li nastali od epitelnih stanica duktusa ili lobusa mliječnih žlijezda dojke.

U novije vrijeme, osim patohistološke, važna je i molekularna podjela karcinoma dojke jer takva podjela govori kakav će biti odgovor karcinoma na terapiju. Imunohistokemijskim bojanjem određuje se postoje li steroidni receptori (estrogenski, ER i progesteronski, PR receptori) te receptori za čimbenike rasta (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*, HER2) i s obzirom na prisutnost ili odsutnost tih receptora postoji nekoliko podtipova karcinoma dojke, od kojih najlošiju prognozu i odgovor na terapiju ima karcinom u kojem su odsutna sva tri receptora – trostruko negativni karcinom dojke (33).

Istraživanje koje su proveli Teslow et al. (28) traži odgovor na pitanje zašto trostruko negativni karcinom dojke ima najlošiju prognozu i odgovor na terapiju. To istraživanje povezuje upravo pretilost, odnosno upalu niskog stupnja i povećanu koncentraciju kisikovih radikala koju uzrokuje pretilost, s lošom prognozom i odgovorom na terapiju trostruko negativnog karcinoma dojke.

Prethodna istraživanja pokazala su da kisikovi radikali povećavaju ekspresiju MBD2\_v2 (engl. *methyl-CpG-binding domain 2*, v2 označava njegovu varijantu 2, nastalu nakon obrade mRNA). MBD2\_v2 važan je za ekspresiju i održavanje stanica sličnih matičnim stanicama (engl. *stem cell-like cells*, CSC). CSC su subpopulacija tumorskih stanica koje iniciraju maligna zbivanja. Njihova prisutnost povećava otpornost tumora na liječenje te pojavu tumorskih metastaza (Slika 1.)(28).



**Slika 1.** Kaskada koju uzrokuju povišeni kisikovi radikali

Hipoteza tog istraživanja je da upala niskog stupnja i povećana koncentracija slobodnih kisikovih radikala kod pretilih osoba uzrokuje povećanu ekspresiju MBD2\_v2, proteina koji je promotor nastanka podtipa tumorskih stanica (CSC) u trostruko negativnom karcinomu dojke *in vivo* te da zbog prisutnosti CSC stanica trostruko negativni karcinom dojke ima lošu prognozu i otporan je na liječenje (28).

Da bi uopće imalo smisla postaviti tu hipotezu, treba odrediti ima li razina MBD2\_v2 kod bolesnika uopće veze s preživljavanjem i indeksom tjelesne mase. Zato su istraživači koristili podatke iz baza podataka. Ti podaci pokazali su da je visoka ekspresija MBD2\_v2 kod bolesnika s trostruko negativnim karcinomom dojke povezana s viskom razinom relapsa tumora, a time i lošijim preživljenjem. Također, podaci su pokazali značajno povišenu ekspresiju MBD2\_v2 kod bolesnika s ITM>30 (28).

Istraživanje je uključivalo DIO miševu (engl. *diet induced obesity*, pretilost uzrokovana dijetom) i miševu normalne tjelesne mase. U obje skupine miševa inokulirane su dvije linije stanica trostruko negativnog karcinoma, jedna linija stanica sadržavala je višu koncentraciju MBD2\_v2, druga nižu koncentraciju. Nasumično je odabrano da se u neke jedinice inokulira je linija s višom koncentracijom MBD2\_v2, u druge linija s nižom koncentracijom. Računala se frekvencija nastanka tumora (28).

Rezultati su pokazali veću frekvenciju nastanka tumora kod DIO miševa. Također, u obje skupine miševa frekvencija nastanka tumora bila je veća kod jedinki u koje su inokulirane

tumorske stanice s većom razinom MBD2\_v2. Usto, sama ekspresija MBD2\_v2 bila je veća kod DIO miševa (28).

Istraživači su također izveli eksperiment u kojem su pokazali da povećana ekspresija MBD2\_v2 u stanicama trostruko negativnog karcinoma dojke *in vivo* povećava sposobnost inicijacije tumora, odnosno ekspanziju CSC, stanica koje dovode do otpornosti na terapiju i lošiju prognozu bolesti (28).

Na temelju rezultata zaključci su:

- a) Povećana ekspresija MBD2\_v2 dovodi do veće frekvencije nastanka tumora.
- b) Ekspresija MBD2\_v2 povećana je kod DIO miševa.
- c) Povećana ekspresija MBD2\_v2 u stanicama trostruko negativnog karcinoma dojke *in vivo* povećava ekspanziju CSC, stanica odgovornih za otpornost tumora na terapiju.

Rezultati ovog istraživanja, dakle, podupiru tezu da pretilost, zbog niske razine upale i povećane koncentracije kisikovih radikala koje izaziva, dovodi do slabijih ishoda u terapiji trostruko negativnog karcinoma dojke. Međutim, točan molekularni mehanizam ostaje nepoznat.

### **3.1.3. Kolorektalni karcinom i epigenetski mehanizmi povezane pretilosti**

Pretilost je rizični čimbenik za još jedan tumor od velikog javnozdravstvenog značenja, kolorektalni karcinom. To je treći najčešći tumor u svijetu (34). Epidemiološke studije pokazale su 30-70% veći rizik za obolijevanje od kolorektalnog karcinoma kod pretilih (29), no točan mehanizam kojim pretilost posreduje nastanak kolorektalnog karcinoma je nepoznat.

Podatak da epigenetika ima ulogu u nastanku kolorektalnog karcinoma već je otprije poznat. Hipometilacija LINE1 (engl. *Long Interspersed Nucleotide Element 1*, marker za genomsku metilaciju) pronađena je u stanicama kolorektalnog karcinoma (35). Takav obrazac metilacije povezan je i sa slabim preživljavanjem i lošijim kliničkih ishodom (35).

Istraživanje koje su proveli Castellano-Castillo D et al. (29) proučava postoji li hipometilacija LINE1 u visceralnom masnom tkivu bolesnika s kolorektalnim karcinomom i je li to povezano s pretilošću ili nekim drugima varijablama za koje je poznato da imaju epigenetski učinak, poput vitamina D (36).

Istraživanje je uključivalo skupinu oboljelih od kolorektalnog karcinoma i kontrolnu skupinu. Pirosekvenciranjem provedena je analiza metilacije LINE 1 sekvenca u visceralnom masnom

tkivu oboljelih i kontrolne skupine. LINE1 sekvence smatraju se markerima za metilaciju cijelog genoma stanice. Koncentracija vitamina D izmjerena je u krvi sudionika (29).

Rezultati su pokazali hipometilaciju LINE1 u visceralnom masnom tkivu te manju razinu vitamina D u serumu sudionika oboljelih od kolorektalnog karcinoma (29).

Da bi analizirali povezanost LINE1 metilacije, pretilosti i serumskog vitamina D sudionici su podijeljeni u 4 grupe:

1. Oboljeli od kolorektalnog karcinoma i pretili.
2. Oboljeli od kolorektalnog karcinoma, normalne tjelesne mase.
3. Zdravi i pretili.
4. Zdravi i normalne tjelesne mase.

U grupi 1 sudionici su imali značajno nižu razinu LINE1 metilacije u usporedbi s grupom 2. Rezultati za grupe zdravih sudionika (grupe 3 i 4), kao i za koncentraciju vitamina D u serumu nisu bili statistički značajni (29).

Kod oboljelih od kolorektalnog karcinoma utvrđena je povezanost između LINE1, pretilosti i koncentracije vitamina D u serumu. Povećanje koncentracije vitamina D u serumu prati povećanje razine LINE1 metilacije, a povećanje ITM-a prati smanjenje razine metilacije LINE1 u visceralnom masnom tkivu, odnosno hipometilaciju LINE1 (29).

Međutim, razina LINE1 i koncentracija vitamina D u serumu korelirale su s BMI jedino kod pacijenata s ITM>30 (29).

Na kraju, logističkom regresijskom analizom ustanovljeno je da veća razina LINE1 metilacije znači manji rizik za razvoj kolorektalnog karcinoma u prilagođenom modelu. No, u tom modelu niti pretilost niti koncentracija vitamina D ne pridonose riziku za razvoj kolorektalnog karcinoma (29).

I pretilost i koncentracija vitamina D u serumu svakako imaju epigenetski učinak na visceralno masno tkivo koje može pridonijeti razvoju kolorektalnog karcinoma, no njihov učinak je samo karika u lancu rizičnih čimbenika za razvoj kolorektalnog karcinoma.

### 3.2. Modulacija epigenetskih čimbenika u prevenciji pretilosti

Činjenica da pretilost utječe na razvoj mnogih javnozdravstvenih problema, poput već nabrojanih karcinoma dojke i kolorektalnog karcinoma te diabetesa mellitusa tip 2, svakako zahtjeva pozornost, ali i djelovanje svih zdravstvenih djelatnika.

Za smanjenje tjelesne mase najvažniji faktori su promjena prehrambenih navika i povećanje tjelesne aktivnosti (15), stoga svaka javnozdravstvena djelatnost za prevenciju i suzbijanje pretilosti treba biti usmjerena na ta dva faktora.

Međutim, istraživanja su pokazala da tjelesna aktivnost i prehrambene navike imaju i epigenetski učinak na tkiva najznačajnija za razvoj pretilosti i bolesti povezanih s pretilošću.

Provedeno je istraživanje na inače sedentarnim muškarcima i ženama koje je mjerilo razinu metilacije bioptata skeletnog mišića prije i nakon kratke akutne fizičke aktivnosti. Rezultati su pokazali znatno manju razinu metilacije čak i nakon kratke fizičke aktivnosti, a među hipometiliranim regijama nakon fizičke aktivnosti bile su i promotorske regije za gene *PPARGC1A*, *PDK4* i *PPAR $\delta$*  koji su ranije bili spomenuti kao geni čija je metilacija promijenjena kod pretilih bolesnika s diabetes mellitus tip 2 (37).

Istraživanje koje je mjerilo DNA metilaciju skeletnog mišića nakon 6 mjeseci treninga izdržljivosti također je pokazalo smanjenje metilacije. Između ostalog, smanjena metilacija, a pojačana ekspresija uočena je za promotorsku regiju *THADA*, gena povezanog s diabetes mellitus tip 2 (38).

Istraživanja utjecaja tjelovježbe na metilaciju pokazala su i smanjenje metilacije promotorskih regija za receptore za adiponektin, hormon masnog tkiva koji senzibilizira tkiva na inzulin nakon tjelovježbe (31).

Istraživanje utjecaja prehrane na metilaciju DNA u ljudskom potkožnom masnom tkivu pokazalo je kako bi taj pristup mogao biti epigenetički pokazatelj hoće li osoba odgovoriti na kalorijske restrikcije u prehrani. Mjerena je metilacija promotorskih regija za gene za leptin i TNF $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor*). Leptin je hormon masnog tkiva koji potiče upalu i prevenira nakupljanje lipida u masnom tkivu, a TNF $\alpha$  citokin uključen u akutnu fazu upale, no također ga izlučuju i stanice masnog tkiva. Za oba se smatra kako su uključeni u poticanje niske razine upale kod pretilosti.

Nakon provedene nisko kalorijske dijeta ispitanici su podijeljeni u dvije skupine na temelju promjene u težini, lipidnog profila, postotka masnog tkiva i krvnog tlaka. Podijeljeni su u skupinu onih koji su odgovorili na dijetu i onih koji nisu odgovorili na dijetu (engl. *responder* i *non-responder*). Manja razina metilacije uočena je u promotorskim regijama za leptin i TNF $\alpha$  prije nisko kalorijske dijeta kod onih koji su odgovorili na dijetu (engl. *responder*) u usporedbi s onima koji nisu odgovorili na dijetu (engl. *non-responder*), no te razlike nije bilo nakon provedbe režima prehrane. Razina ekspresije gena za leptin i TNF $\alpha$  nije se značajno razlikovala između skupina prije provedene dijeta, no nakon provedbe dijeta uočena je smanjena ekspresija leptina kod osoba koje su odgovorile na dijetu (engl. *responder*). Promjene u ekspresiji TNF $\alpha$  nisu uočene (39).

## 4. ZAKLJUČAK

Složena etiologija pretilosti prikazana u ovom radu otkriva da su prevencija i liječenje te epidemije modernog doba u rukama ne samo zdravstvenih djelatnika, već cijeloga društva. Pretilost dakle zahtijeva multidisciplinarni pristup. Važno je od najranije dobi osvijestiti utjecaj pravilne prehrane i redovite fizičke aktivnosti na prevenciju pretilosti. Također, potrebno je naglašavati kako pretilost nije samo estetski problem već bolest sama po sebi te rizični čimbenik za razvoj kroničnih nezaraznih bolesti koje predstavljaju veliki javnozdravstveni problem.

Epigenetske promjene kojima okolišni čimbenici dovode do nastanka pretilosti, kao i epigenetske promjene koje uzrokuje sama pretilost u većini slučajeva su reverzibilne ako se na vrijeme krene s prevencijom i liječenjem. U tom je pogledu važnost prevencije pretilosti značajna jer se ne odnosi samo na zaštitu pojedinca, već i njegovo potomstvo.

## **5. ZAHVALE**

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Iskri Alexandri Nola na uputama te brznoj i konkretnoj pomoći kod pisanja i oblikovanja ovoga rada.

Također, zahvaljujem se svojoj sestri te svojim roditeljima i prijateljima na podršci tijekom cijelog studija.



## 6. LITERATURA

1. Shah N, Clark T. Obesity Algorithm ® 2016-2017. 2017; Available from: [www.ObesityAlgorithm.org](http://www.ObesityAlgorithm.org).
2. Obesity and overweight [Internet]. [cited 2019 May 17]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
3. HZJZ (Hrvatski zavod za javno zdravstvo). Hrvatski dan osviještenosti o debljini, 16.03.2019.[Internet]. [cited 2019 May 17]. Available from: <https://www.hzjz.hr/sluzba-promicanje-zdravlja/hrvatski-dan-osvijestenosti-o-debljini-16-03-2019/>
4. Hall JE, Guyton AC. Medicinska fiziologija - udžbenik. Kukolja Taradi S, Andreis I, (ed). Zagreb: Medicinska naklada; 2012.
5. Kasinska MA, Drzewoski J, Sliwinska A. Epigenetic modifications in adipose tissue - Relation to obesity and diabetes. Arch Med Sci. 2016;12(6):1293–301.
6. Valić F. Zdravstvena ekologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2001.
7. Frederick CB, Snellman K, Putnam RD. Increasing socioeconomic disparities in adolescent obesity. Proc Natl Acad Sci. 2014;111(4):1338–42.
8. Article R, Chemicals ED, Epigenetics T, Diseases M. Review Article Endocrine Disrupting Chemicals, Transgenerational Epigenetics and Metabolic Diseases. 2017;1:31–51.
9. Hebebrand J, Hinney A. Environmental and Genetic Risk Factors in Obesity. Child Adolesc Psychiatr Clin N Am [Internet]. 2009;18(1):83–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chc.2008.07.006>
10. WHO | Physical Activity. WHO [Internet]. 2017 [cited 2019 May 19]; Available from: <https://www.who.int/dietphysicalactivity/pa/en/>
11. World Health Organization. Recommendations for 5-17 years old : Recommendations for 18-64 years old : Recommendations for 65 years and above. Who. 2011;
12. Last JM, editor. A Dictionary of Public Health. Oxford University Press; 2007.
13. Bergman Å, Heindel J, Jobling S, Kidd K, Zoeller RT. State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012: an assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme and World Health Organization [Internet]. World Health Organization. 2013. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427412001221>
14. Nicoglou A, Merlin F. Epigenetics: A way to bridge the gap between biological fields. Stud Hist Philos Sci Part C Stud Hist Philos Biol Biomed Sci. 2017;66:73–82.
15. Thaker V V. Genetic and Epigenetic Causes of Obesity. In: Adolescent medicine: state of the art reviews [Internet]. 2017. p. 379–405. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30416642><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6226269>

16. Heianza Y, Qi L. Impact of Genes and Environment on Obesity and Cardiovascular Disease. *Endocrinology*. 2019;160(1):81–100.
17. Bays H, Scinta W. Adiposopathy and epigenetics: an introduction to obesity as a transgenerational disease. *Curr Med Res Opin*. 2015;31(11):2059–69.
18. Laker RC, Garde C, Camera DM, Smiles WJ, Zierath JR, Hawley JA, et al. Transcriptomic and epigenetic responses to short-term nutrient-exercise stress in humans. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–12.
19. Li Y. Epigenetic mechanisms link maternal diets and gut microbiome to obesity in the offspring. *Front Genet*. 2018;9(AUG):1–13.
20. Bergman D, Halje M, Nordin M, Engström W. Insulin-Like Growth Factor 2 in Development and Disease: A Mini-Review. *Gerontology* [Internet]. 2013;59(3):240–9. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/343995>
21. Veenendaal MVE, Painter RC, De Rooij SR, Bossuyt PMM, Van Der Post JAM, Gluckman PD, et al. Transgenerational effects of prenatal exposure to the 1944-45 Dutch famine. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2013;120(5):548–53.
22. Rönn T, Volkov P, Davegårdh C, Dayeh T, Hall E, Olsson AH, et al. A Six Months Exercise Intervention Influences the Genome-wide DNA Methylation Pattern in Human Adipose Tissue. *PLoS Genet*. 2013;9(6).
23. Janesick A, Blumberg B. Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity. *Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev*. 2011;93(1):34–50.
24. Braun JM. Early life exposure to endocrine disrupting chemicals and childhood obesity and neurodevelopment. *Nat Rev Endocrinol*. 2017;13(3):161–73.
25. WHO (World Health Organization). The top 10 causes of death [Internet]. [cited 2019 May 20]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
26. WHO (World Health Organization). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser*. Who. 2000;1–253.
27. Dobosz AM, Dziewulska A. Spotlight on epigenetics as a missing link between obesity and type 2 diabetes. 2018;157–65.
28. Bollig-Fischer A, Mohammad RM, Dyson G, Teslow EA, Polin LA, Bao B, et al. Obesity-induced MBD2\_v2 expression promotes tumor-initiating triple negative breast cancer stem cells. *Mol Oncol*. 2019;(2019):0–1.
29. Castellano-Castillo D, Morcillo S, Crujeiras AB, Sánchez-Alcoholado L, Clemente-Postigo M, Torres E, et al. Association between serum 25-hydroxyvitamin D and global DNA methylation in visceral adipose tissue from colorectal cancer patients. *BMC Cancer*. 2019;19(1):93.
30. Cerf ME. Beta cell dysfunction and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2013 [cited 2019 May 8];4:37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23542897>

31. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev.* 2005;26(3):439–51.
32. HZJZ (Hrvatski zavod za javno zdravstvo). Registar za rak Republike Hrvatske Incidencija raka u Hrvatskoj 2015. 2018;(Bilten 40). Available from: [https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/03/Bilten\\_2015\\_rak\\_final.pdf](https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/03/Bilten_2015_rak_final.pdf)
33. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. *Patologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2014.
34. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut.* 2017;66(4):683–91.
35. Inamura K, Yamauchi M, Nishihara R, Lochhead P, Qian ZR, Kuchiba A, et al. Tumor LINE-1 methylation level and microsatellite instability in relation to colorectal cancer prognosis. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(9):1–10.
36. Dou R, Ng K, Giovannucci EL, Manson JE, Qian ZR, Ogino S. Vitamin D and colorectal cancer: molecular, epidemiological and clinical evidence. *Br J Nutr.* 2016;115(9):1643–60.
37. Barrès R, Yan J, Egan B, Treebak JT, Rasmussen M, Fritz T, et al. Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. *Cell Metab.* 2012;15(3):405–11.
38. McCarthy MI. Genomics, Type 2 Diabetes, and Obesity. *N Engl J Med.* 2010;363(24):2339–50.
39. Cordero P, Campion J, Milagro FI, Goyenechea E, Steemburgo T, Javierre BM, et al. Leptin and TNF-alpha promoter methylation levels measured by MSP could predict the response to a low-calorie diet. *J Physiol Biochem.* 2011;67(3):463–70.

## **7. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam u Zagrebu 25. rujna 1994. godine. Pohađala sam Osnovnu školu Gornje Vrapče, a nakon toga X. gimnaziju „Ivan Supek“. Medicinski fakultet upisala sam 2013. godine.