TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
FARMAKOLOOGIA JA TOKSIKOLOOGIA ÕPPETOOL

D-vitamiini derivaadi elokaltsitooli terapeutilise potentsiaali uurimine rasvumisest tingitud metaboolse sündroomi avaldumisele metsiktüüpi ja mikroRNA146a defitsiitsetel hiirtel

Bakalaureusetöö
12 EAP

Anete Budrikas

Juhendajad PhD Monika Jürgenson
PhD Kristina Mäemets-Allas

TARTU 2025

D-vitamiini derivaadi elokaltsitooli terapeutilise potentsiaali uurimine rasvumisest tingitud metaboolse sündroomi avaldumisele metsiktüüpi ja mikroRNA146a defitsiitsetel hiirtel

Rasvumine on tõsine terviseprobleem, mis suurendab metaboolse sündroomi riski ning on seotud kroonilise madala taseme põletikuga. D-vitamiini madalamat taset on seostatud ainevahetuse ja rasvkoe funktsiooniga, kuid liigne D-vitamiini manustamine võib põhjustada hüperkaltseemiat. Elokaltsitool (BXL-628), D-vitamiini fluoreeritud analoog, on tugeva põletikuvastase toimega, kuid madalama hüperkaltseemia riskiga. MikroRNA-d, sh mikroRNA146a, osalevad põletiku ja ainevahetuse regulatsioonis. Käesolevas töös uuriti elokaltsitooli mõju rasvumisele ja metaboolsele sündroomile, keskendudes mikroRNA146a rollile, kasutades metsiktüüpi ja mikroRNA146a defitsiitsete hiirte mudeleid. Elokaltsitool vähendas oluliselt metsiktüüpi hiirtel kaalutõusu ja rasvade kogunemist ning parandas glükoositaluvust, viidates mikroRNA146a olulisusele nende toimetes.

Märksõnad: elokaltsitool, rasvumine, metaboolne sündroom, mikroRNA146a, hiiremudel

CERCS: B740 Farmakoloogia, farmakognoosia, farmaatsia, toksikoloogia

The therapeutic potential of the vitamin D derivative elocalcitol in the development of obesity-induced metabolic syndrome in wild-type and microRNA-146a deficient mice

Obesity is a serious health issue that increases the risk of metabolic syndrome and is associated with chronic low-grade inflammation Lower levels of vitamin D have been associated with metabolism and adipose tissue function, but excessive vitamin D supplementation can cause hypercalcemia. Elocalcitol (BXL-628), a fluorinated analog of vitamin D, exhibits strong anti-inflammatory effects with a lower risk of hypercalcemia. MicroRNAs, including microRNA-146a, play a role in regulating inflammation and metabolism. This study investigated the effect of elocalcitol on obesity and metabolic syndrome, focusing on the role of microRNA-146a, using wild-type and microRNA-146a-deficient mouse models. Elocalcitol significantly reduced weight gain and fat accumulation in wild-type mice and improved glucose tolerance, indicating the importance of microRNA-146a in these effects.

Keywords: elocalcitol, obesity, metabolic syndrome, microRNA-146a, mouse model

CERCS: B740 Pharmacological sciences, pharmacognosy, pharmacy, toxicology

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID 5
SISSEJUHATUS 7
1.KIRJANDUSE ÜLEVAADE 9
1.1 RASVUMINE 9
1.1.1 Epidemioloogia 9
1.1.2 Etioloogia ja kliiniline pilt 10
1.1.3 Rasvumise määratlus ja diagnoosimine 13
1.1.4 Rasvumisest tingitud metaboolne sündroom 14
1.1.5 Rasvumise ennetamine ja ravi 15
1.2 D-VITAMIIN 16
1.2.1 Metabolism 16
1.2.2 Bioloogiline tähtsus 17
1.2.3 Rasvumine ja D-vitamiini puudus 18
1.2.4 D-vitamiini analoogid 18
1.2.2 Elokaltsitool 19
1.3 MikroRNA (miRNA) 20
1.3.1 MikroRNA146a (miR146a) 21
2. EKSPERIMENTAALNE OSA 22
2.1 Uurimistöö eesmärgid ja ülesanded 22
2.2 Materjal ja metoodika 23
2.2.1 Katseloomad ja katse disain 23
2.2.2 Preparaatide manustamine 24
2.2.3 Katseloomade toidu ja vee tarbimine 25
2.2.4 Katseloomade kehakaalu dünaamika 25
2.2.5 Lokomotoorne aktiivsus 25
2.2.6 Uue objekti äratundmise katse 25
2.2.7 Epididümaalse rasvkoe ning maksa massi määramine 26
2.2.8 Glükoositolerantsi katse (*Glucose tolerance test, GTT*) 26
2.2.9 β-ketoonide määramine 27
2.2.10 Rasvatolerantsi katse 27
2.2.11 Kaltsiumi taseme määramine vereseerumis 27
2.2.12 Andmete töötlus 27
2.3 Tulemused 28
2.3.1 Elokaltsitooli mõju katseloomade toidu- ja vee tarbimisele 28
2.3.2 Katseloomade kehakaalu dünaamika muutused rasvase dieedi ja elokaltsitooli manustamise mõjul 28
2.3.3 Katseloomade lokomotoorse aktiivsuse ja uue objekti äratundmise hindamine rasvase dieedi ja elokaltsitooli manustamise mõjul 29
2.3.4 Elokaltsitooli mõju epididümaalse rasva ja maksa massile 30

2.3.5 Katseloomade glükoositaluvus rasvase dieedi ja elokaltsitooli manustamise mõjul 31
2.3.6 β-ketoonide taseme määramine 32
2.3.7 Triglütseriidid ja rasva imendumine 33
2.3.8 Kaltsiumi tase vereseerumis 34
2.4 Arutelu 34
2.5 Järeldused 36
KOKKUVÕTE 37
SUMMARY 38
TÄNUSÕNAD 39
KIRJANDUSE LOETELU 40
Kasutatud raamatud 40
Kasutatud veebilehed 40
Kasutatud artiklid 41
LISAD 54
Lisa 1. Madala rasvasisaldusega dieet (MRS) 54
Lisa 2. Kõrge rasvasisaldusega dieet (KRS) 55
Lisa 3. Süstelahuse protokoll 56
Lisa 4. Süstimise üldtabel 59
Lisa 5. Postri tutvustus ja välkkõne Tartu Ülikooli arstiteaduskonna aastapäeva teaduskonverentsil 2024 60
LIHTLITSENTS 61

KASUTATUD LÜHENDID

ATP III	täiskasvanute ravipaneel III (*Adult Treatment Panel III*)
BBB	hematoentsefaalbarjäär (*blood-brain barrier)*
BXL-628	elokaltsitool
CRP	C-reaktiivne valk
CT	kompuutertomograafia
CVD	südame- ja veresoonkonnahaigused
DXA	röntgenabsorptsioonimeetria
Elok	elokaltsitool
GLP-1	glükagoonpeptiidi retseptor-1
GLP-1/GIP	glükagoonpeptiidi retseptor-1/glükoosisõltuv insuliin
HSP	kuumašoki valgud
i.p.	intreperitoneaalne
ICAM-1	rakkudevaheline adhesioonimolekul-1
IL-6	interleukiin-6
KMI	kehamassiindeks
KRS	kõrge rasvasisaldusega dieet
LPS	lipopolüsahhariidid
MetS	metaboolne sündroom
miR146a	mikroRNA146a
miRNA	mikroRNA
MRI	magnetresonantstomograafia
MRS	madala rasvasisaldusega (mitte-rasvane) dieet
MT	metsiktüüpi
NAFLD	mittealkohoolne rasvmaksahaigus *(Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*)
NCEP	USA Riiklik Kolesteroolihaldusprogramm (*National Cholesterol Education Program)*
NF-κB	tuumafaktor kappa B
SAA	seerum amüloid A
SAT	subktuaanne ehk nahaalune rasvkude *(Subcutaneous adipose tissue)*
	sekretsiooni soodustav polüpeptiid
SEM	keskmine standardviga (*Standard error of the mean*)
TAG	triatsüülglütseroolid
TLR4	tollilaadne retseptor 4

TNF-α	kasvaja nekroosifaktor-alfa
UVB	ultraviolettkiirguse B-tüüp (*ultraviolet B radiation*)
VAT	vistseraalne ehk siseelundeid ümbritsev rasvkude (*Visceral adipose tissue*)
VDR	D-vitamiini retseptor (*vitamin D receptor*)
VDRE	D-vitamiini vastuselement (*Vitamin D Response Element*)
WHO	Maailma Tervishoiu Organisatsioon (*World Health Organization*)

SISSEJUHATUS

Rasvumine on tõsine ülemaailmne terviseprobleem, mida seostatakse kroonilise madala taseme põletiku ning suurenenud riskiga haigestuda vähki, metaboolsesse rasvmaksahaigusesse, kardiovaskulaarhaigustesse ja II tüüpi diabeeti (Battineni *et al*., 2021; Ungvari *et al*., 2024; Hruby *et al*., 2016; Goran *et al*., 2003). Rasvumise ärahoidmiseks soovitatakse patsientidele esmalt elustiilimuutusi, mis hõlmavad endas füüsilist aktiivsust, piisavat und, menüü korrigeerimist ning käitumuslikku sekkumist. Vaatamata pakutud juhistele ei ole inimesed tihti praktikas suutelised neid rakendama, mistõttu tekivad vastuolud soovitud kaalulanguse ja tegeliku elustiili või käitumise vahel. Sellisel juhul kaalutakse farmakoloogilisi lahendusi ja vajadusel ka kirurgilist sekkumist. Paraku võivad viimastega kaasneda aga rasked kõrvaltoimed, mistõttu otsitakse uusi ja ohutumaid farmakoloogilisi alternatiive, mis koos elustiilimuutustega võiksid viia soovitud tulemusteni.

D-vitamiini puhul on organismi seisukohalt tegemist sekosteroidse hormooni eelühendiga, mis säilitab organismis kaltsiumi ja fosfori tasakaalu, toetab luude tervist, mõjutab immuunsüsteemi ning reguleerib geenide avaldumist mitmetes organites (DeLuca, 2004). Kuna D-vitamiini liigtarvitamine võib viia raskete kõrvaltoimeteni - eelkõige hüperkaltseemiani, on välja töötatud erinevaid D-vitamiini analooge (Maestro *et al*., 2019). Üheks potentsiaalseks kandidaadiks on elokaltsitool (BXL-628), millel on tugev põletikuvastane, kuid madalam hüperkaltseemilise toime risk (Colli *et al*., 2006).

Mikro-RNA-d (miRNA-d) on väikesed, mittekodeerivad RNA-d, mis reguleerivad geenieksрessiooni, seondudes nende sihtmärk-mRNA-de 3` transleerimata piirkonnaga ning mõjutades seeläbi mitmesuguseid rakkudes toimuvaid protsesse. Uuringud on näidanud, et mikroRNA146a-l on võime alla suruda põletikku ning reguleerida ainevahetuslikke protsesse (Roos *et al*., 2021; Roos *et al*., 2016). Samas ei ole seni uuritud, kas elokaltsitooli rasvumist ja metaboolse sündroomi avaldumist ärahoidev toime sõltub mikroRNA146a ekspressioonist katseloomadel.

Käesoleva töö puhul on tegemist teadusliku uurimistööga, mis koosneb kirjanduse ülevaatest ja eksperimentaalsest uurimusest. Töö teoreetilises osas käsitletakse rasvumise epidemioloogiat, etioloogiat ja kliinilist pilti, metaboolset sündroomi, rasvumise ennetamist ja praeguseid ravivõimalusi. Vaatluse alla võetakse D-vitamiin ja selle analoogid, neist põhjalikumalt keskendutakse elokaltsitoolile ning selle rasvumist ärahoidvatele efektidele. Lisaks vaadeldakse mikroRNA-sid ja nende rolli rasvumise ning põletiku regulatsioonis ning uuritakse mikroRNA146a võimet alla suruda põletikku ja rasvasest dieedist põhjustatud rasvumist elokaltsitooli toime kaudu.

Eksperimentaalses osas kirjeldatakse elokaltsitooli toimet rasvumise ja metaboolse sündroomi ennetamisele metsiktüüpi (MT) ja miR146a defitsiitsetel katseloomadel, keda toideti madala ja kõrge rasvasisaldusega dieediga. Uuringu käigus jälgiti katseloomade toidu ja vee tarbimist, kehakaalu dünaamikat, liikumisaktiivsust, kognitiivseid funktsioone ning teostati glükoosi- ja rasvatolerantsi katsed. Lisaks mõõdeti epididümaalse rasvkoe ja maksa mass ning määrati β-ketoonide ja kaltsiumi tase vereseerumis.

Antud töö eesmärk oli selgitada, kas elokaltsitooli manustamine katseloomadele mõjutab rasvumisest tingitud metaboolse sündroomi avaldumist metsiktüüpi ja miR146a-/- hiirtel ning hinnata sellega kaasnevaid muutusi katseloomade tervisenäitajates.

Töö eksperimentaalne osa viidi läbi Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditsiini instituudi katseloomakeskuses (Ravila 14b, Tartu) ning Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditsiini instituudi farmakoloogia osakonnas (Ravila 19, Tartu).

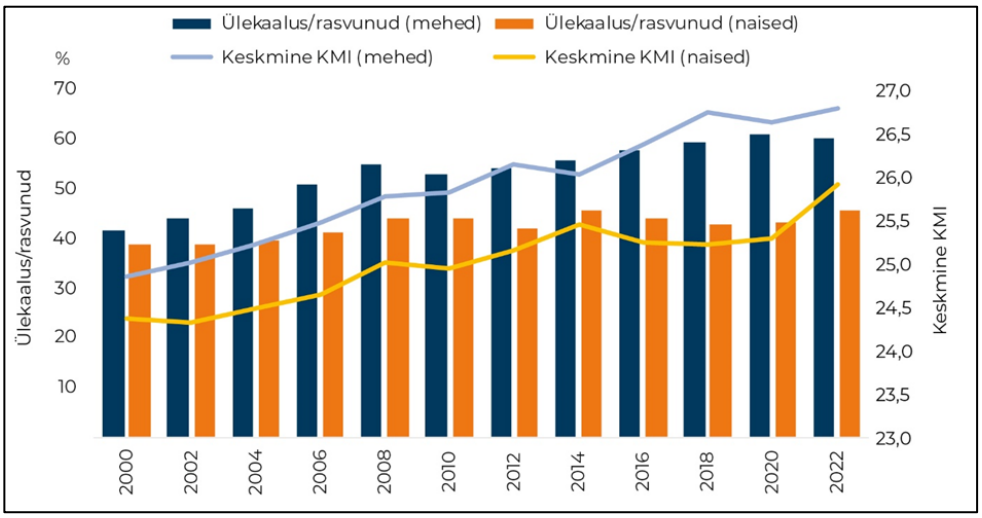
Käesolevat uuringut rahastati Eesti Teadusagentuuri PRG878 grandiga.

1.KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 RASVUMINE

1.1.1 Epidemioloogia

Rasvumise kui haigusliku seisundi massiline ülemaailmne kasv sai alguse 20. sajandi lõpul ja 21. sajandi alguses, millest tulenevalt prognoositakse rasvumise kasvu ka järgnevatel aastatel (Sørensen, 2025; The GBD 2015 Obesity Collaborators, 2017). 2021. aasta seisuga kannatas ülekaalulisuse all 174 miljonit last ja noort (Kerr *et al*., 2025). See tähendab, et järjest rohkem noori seisab silmitsi ülekaalulisuse ja sellest tingitud tervislike probleemidega, mis avaldavad mõju nende heaolule ja üldisele elukvaliteedile (Buttitta *et al*., 2014). Sarnane tendents on näha ka täiskasvanute ja vanemate inimeste seas, kus Euroopa Liidu riikides, sh Eestis, on rasvumine viimase 20 aasta jooksul märgatavalt kasvanud (Tervise Arengu Instituut, i.a.). Rasvumise levikut ilmestuvad aga soolised erinevused: 2022. aastal Eestis läbi viidud uuringud näitavad, et meestel esineb liigset kehakaalu sagedamini kui naistel (Joonis 1).



Joonis 1. Ülekaalu/rasvumise levimus naiste ja meeste seas Eestis 2022. aastal (Tervise Arengu Instituut, i.a.).

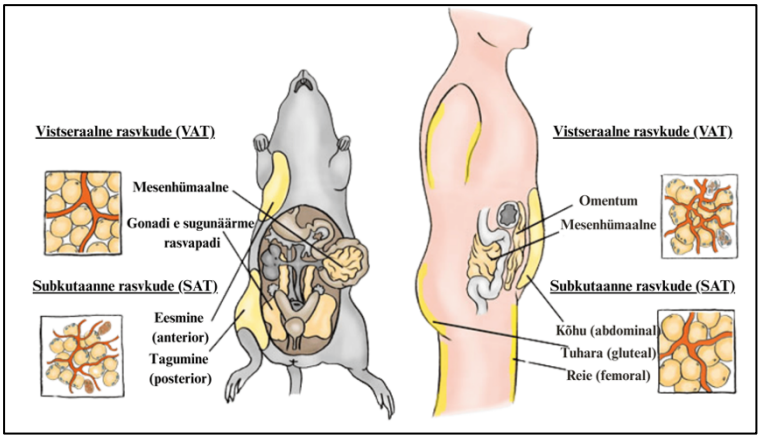
Rasvumise suurenemist Eesti elanikkonna hulgas näitas ka 2000-2018. aastal läbi viidud uuring, millest selgus, et 25-64-aastaste täiskasvanute seas on ülekaalulisus sagenenud, eriti vanemas eas, ning tähelapanuväärsed olid erinevused meeste ja naiste vahel (Pärna ja Kender, 2021).

Kuna probleem pole laialt levinud mitte ainult Eestis, vaid ka mujal maailmas, on tegemist inimkonda laiemalt puudutava epideemiaga. Vaatamata ülemaailmsetele pingutustele suurendada teadlikkust varajases eas tekkinud liigse kehakaalu ja sellega seonduvate

terviseriskide kohta, ei ole senised meetmed olnud piisavad kasvava tervisemure lahendamiseks (Kerr *et al*., 2025; Ruban *et al*., 2019).

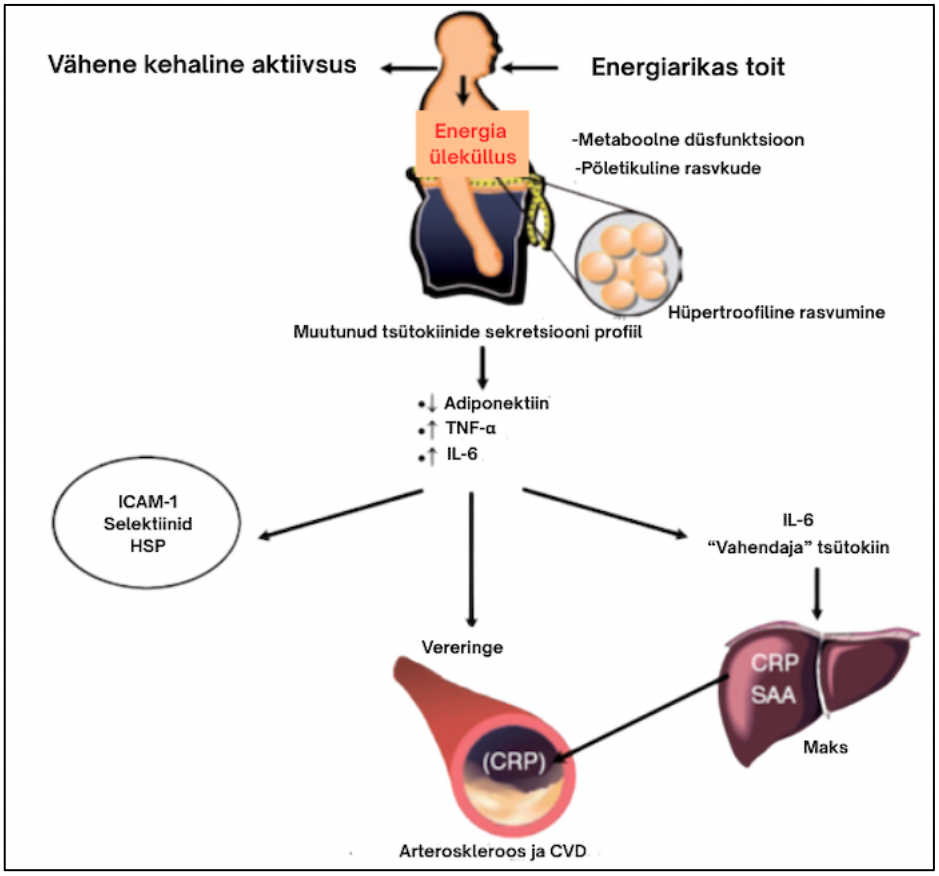
1.1.2 Etioloogia ja kliiniline pilt

Rasvumise puhul on tegemist kroonilise põletikulise haigusliku seisundiga, kus vähese kehalise aktiivsuse ja energiarikka toidu tarbimise tulemusena toimub rasvade liigne või ebanormaalne jaotumine keha erinevates piirkondades (Gregor ja Hotamisligil, 2011; Blüher, 2019).
Kuigi rasvade kogunemine võib olla indiviiditi erinev, on anatoomiliselt võimalik eristada kaht peamist rasvkoe tüüpi: vistseraalset (VAT; ingl *visceral adipose tissue*) ehk siseelundeid ümbritsevat rasvkude ja subkutaanset (SAT; ingl *subcutaneous adipose tissue*) ehk nahaalust rasvkude (Börgeson *et al*., 2022). Metaboolsete radade reguleerimises on leitud keskne roll valgel rasvkoel. Valge rasvkude osaleb energia salvestamisel triatsüülglütseroolide (TAG) kujule, mobiliseerides need rasvhapeteks ning aidates säilitada organismi homöostaasi (Morigny *et al*., 2021). Rasvumise korral on valge rasvkoe metaboolne funktsioon häiritud, mis on tihedalt seotud insuliiniresistentsuse ja ainevahetushäirete kujunemisega. Seega võib valge rasvkoe funktsiooni ja düsregulatsiooni parem mõistmine toetada sihipäraste terapeutiliste lähenemiste väljatöötamist. Kui uuringuid läbi viia katseloomadel, siis tuleks arvesse võtta katselooma (nt hiire) ja inimese rasvafenotüübilisi erinevusi (Morigny *et al*., 2021; Börgeson *et al*., 2022). Võrreldes valge subkutaanse rasvkoe asukohta, on näha, et kui hiirtel on see peamiselt eesmise kaenlaaluse ja tagumise kubeme piirkonnas, siis inimestel esineb rasvkude vastavalt kõhu-, tuhara ja reie piirkonnas (Joonis 2). Katseloomadel kasutatakse valge VAT rasvkoe hindamiseks tavaliselt loomade keskõõnes sugunäärmete ümber paiknevat rasvapadjandit, kus isastel loomadel on tegemist epididümaalrasva ning emastel periovaarse rasvaga (Börgeson *et al*., 2022).



Joonis 2. Lihtsustatud skeemil on kujutatud hiire (vasakul) ja inimese (paremal) siseelundite- ja nahaalune valge rasvkude (kohandatud, Börgeson *et al*., 2022).

Rasvumise teket võivad mõjutada nii toitumuslik käitumine, keskkond kui ka geneetilised tegurid. Viimastel aastatel on rasvumise patofüsioloogia uurimisel hakatud keskenduma metaboolsete radadega seotud molekulaarsetele sihtmärkidele, et mõista paremini selle kompleksse seisundi aluseks olevaid mehhanisme (Jackson *et al*., 2015). Kuna rasvumist iseloomustab krooniline madala taseme põletik, kutsutakse seda seisundit ka metapõletikuks (ingl *metaflammation*) ehk metaboolselt vallandunud põletikuks. See seisund viitab immuunsüsteemi reageeringule ja põletikuliste tsütokiinide ekspressioonile rasvkoes (Hotamisligil, 2006). Kuna rasvumisest tingitud süsteemset põletikku on seostatud ainevahetuslike muutustega, võivad immuunvastuse ja põletikuliste reaktsioonide vahendajatena omada mõju tollilaadsed retseptorid (TLR) (Medzhitov *et al*., 1997). TLR4 (tollilaadne retseptor 4) aktiveeritakse LPS (lipopolüsahhariidide) või vabade rasvhapete poolt, mis käivitab tuumafaktor kappa B (NF-κB) signaaliraja ning põletikuga seotud tsütokiinide kasvaja nekroosifaktor-alfa (TNF-α) ja interleukiin-6 (IL-6) tootmise rasvarakkudes (Joonis 3) (Fu *et al*., 2024). Kuna on leitud, et rasvast dieeti saavate hiirte rasvarakkudes toimus TLR4 taseme tõus, võib see viidata ainevahetuslikust kõrvalekaldest tingitud insuliiniresistentsusele (Song *et al*., 2006). Varasemad uuringud hiirte mudelitel kinnitavad rasvumise ja põletiku seost TNF-α-ga, mis avaldab mõju glükoosi ainevahetuse ja insuliinitundlikkuse reguleerimisele (Uysal *et al*., 1997).



Joonis 3. Vähene füüsiline aktiivsus ja kaloririkka toidu tarbimine toob kaasa rasvarakkude hüpertroofia, rasvkoe põletiku, rasvarakkude apoptoosi ning muutused tsütokiinide tootmise profiilis. Joonisel esinevad lühendid: C-reaktiivne valk (CRP); südame- ja veresoonkonnahaigused (CVD); kuumašoki valgud (HSP); rakkudevaheline adhesioonimolekul-1 (ICAM-1); interleukiin-6 (IL-6); seerum amüloid A (SAA); kasvaja nekroosifaktor-alfa (TNF-α) (kohandatud, Mathieu *et al*., 2010).

Olulised hormoonid, mis osalevad hematoentsefaalbarjääri (BBB; ingl *blood-brain barrier*) vahelise regulatsiooni vahendamisel, on leptiin, insuliin ja greliin, kus nende signaaliradade häirumine võib esile kutsuda hormoonresistentsuse, mida on seostatud rasvumisega (Battineni *et al*., 2021). Kuna hematoentsefaalbarjäär mängib olulist rolli seedetrakti hormoonide reguleerimisel vereringest ajju, võib selle häirumine esile kutsuda toitumise ja kehakaalu düsregulatsiooni (Banks, 2012). Näiteks leptiini liikumist läbi hematoentsefaalbarjääri mõjutavad mitmed tegurid, sealhulgas vere triglütseriidide tase. Kui kehas on triglütseriidide tase normaalsest kõrgem, võib see pärssida leptiini transporti. Arvatakse, et selline mehhanism tuleneb evolutsioonilisest kohastumusest, kus nälgimise korral leptiini, anorektilise aine, toime pärssimisel võib see suurendada ellujäämise tõenäosust (Banks, 2012).

Rasvumine ei hõlma üksnes liigse rasva kogunemist naha alla ega piirdu ainult põletikuga rasvkoes, vaid mõjutab süsteemselt kogu organismi talitlust. Rasvarakkude hüpertroofia ja krooniline põletik võivad vallandada mitme teise organi, näiteks maksa, pankrease ja aju,

funktsiooni häirumise (Nielsen *et al*., 2022; Yi *et al*., 2020; Chithanathan *et al*., 2024; Jürgenson *et al*., 2025). Üks rasvumisest tingitud seisund, millest vähem teadlik ollakse, on maksa normaalse funktsiooni häirumisel tekkiv mittealkohoolne rasvmaksahaigus (NAFLD; ingl *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*). Selline seisund võib halvimal juhul lõppeda maksa kärbumise ehk maksatsirroosi või maksavähiga (Kucera, 2014; Haldre *et al.,* 2024). Lisaks maksale võib rasvumine mõjutada ka kesknärvisüsteemi, sealhulgas aju. Uuringud on näidanud, et rasvumine võib oluliselt mõjutada erinevaid aju piirkondi, näiteks hüpotalamust, mis mängib keskset rolli ainevahetussignaalide reguleerimises (Jais *et al*., 2017). Hüpotalamuse talitluse häirumine võib viia metaboolse düsregulatsioonini, näiteks söögiisu kontrolli ja energiatasakaalu häirumiseni ning soodustada hüpotalaamilise põletiku teket (Rahman *et al*., 2018). Loomkatsetes on näidatud, et hüpotalamuse põletik esineb sagedamini isastel loomadel, kuna emasloomadel võib küllastunud rasvhapete (FA; ingl *fatty acid*) põletikuvastast toimet pärssida kõrgem östrogeenitase (Argente-Arizón *et al*., 2018). Lisaks on eksperimentaalsetes mudelites leitud, et kõrge rasvasisaldusega dieet (KRS) võib põhjustada muutusi mitteneuronaalsetes gliiarakkudes, sealhulgas astrotsüütides ja mikrogliia rakkudes, mida seostatakse neuropõletiku ning rakkude enneaegse vananemisega (Chithanathan *et al*., 2024; Jürgenson *et al*., 2025).

1.1.3 Rasvumise määratlus ja diagnoosimine

Rasvumise esmase riski tuvastamiseks kasutatakse kehamassiindeksit (KMI), vööümbermõõdu ning vajadusel kehakoostise mõõtmist. KMI on suurus, mis väljendab inimese kehakaalu ja pikkuse suhet (kg/m^2). Maailma Tervishoiu Organisatsiooni (WHO) klassifikatsiooni järgi loetakse üle 20-aastase inimese kehakaalu tema pikkuse puhul normaalseks, kui kehamassiindeks on vahemikus 18,5-24,9. Kui KMI on üle 25, on tegu ülekaalulisusega, ja kui see suureneb veelgi, olles võrdne või suurem kui 30, loetakse seda rasvumiseks (Ruban *et al*., 2019; WHO, i.a.). Rasvumise hindamisel võetakse kasutusele sageli antropomeetrilised näitajad, mis on odavad ja kergesti rakendatavad mõõtmised, võimaldades hinnata keha proportsioone, kuju ja suurust (Padilla *et al*., 2021). Antropomeetrilised muutujaid, nagu pikkus, kaal ning vöö- ja puusaümbermõõt, on lihtsad, kuid sageli usaldusväärsed parameetrid, mis annavad meile esmase hinnangu patsiendi tervislikust seisundist ja võimalikest riskiteguritest (Padilla *et al*., 2021; Price *et al*., 2006). Kuna vööümbermõõtu seostatakse tänapäeval ka suurema kardiometaboolse riski ja suurema suremusega, on selle varajane diagnoosimine oluline (Klarqvist *et al*., 2022).

Rasvade jaotuse täpsemateks uuringuteks ja kaardistamiseks keha erinevates piirkondades kasutatakse teaduses sageli meditsiinilist pildistamist, näiteks kompuutertomograafiat (CT),

magnetresonantstomograafiat (MRI) ja röntgenabsorptsioonimeetriat (DXA) (Galanakis *et al*., 2015; Jürgenson *et al*., 2025; Tan *et al*., 2022). Kuigi rasvade jaotuse hindamine meditsiinilise pildistamise abil võib aidata ennustada mitmete krooniliste haiguste riske, seda siiski tänapäeva kliinilises praktikas mitmete piirangute tõttu ei kasutata (Klarqvist *et al*., 2022).
Rasvumise varajane diagnostika on aga oluline, kuna inimestel, kes on juba rasvunud, suureneb oluliselt risk ainevahetushäire ehk metaboolse sündroomi tekkeks, võrreldes normaalkaalus olevate inimestega (Mayoral *et al*., 2020).

1.1.4 Rasvumisest tingitud metaboolne sündroom

Metaboolse sündroomi (MetS) puhul on tegemist kroonilise ainevahetushäirega, mis hõlmab endas nii füsioloogilisi, biokeemilisi kui ka ainevahetuslikke kõrvalekaldeid (Giangregorio *et al*., 2024). Metaboolse sündroomi esmakordne määratlus töötati Ameerika Ühendriikide riikliku kolesterooliharidus programmi (NCEP; ingl *National Cholesterol Education Program*) poolt välja 2001. aastal (Huang, 2009). Tegemist on komplekshaigusega, mida iseloomustab glükoosi ainevahetuse häirumine (II tüüpi diabeet), düslipideemia (triglütseriidide ja kolesterooli taseme tõus), hüpertensioon ja rasvumine (eelkõige vöökoha piirkonnas) (Mottillo *et al*., 2010). Kliiniliseks aluseks on võetud NCEP ATP III (NCEP; ingl *National Cholesterol Education Program;* ATP III; ingl *Adult Treatment Panel III*) poolt välja toodud kriteeriumid, mille kohaselt peab MetS korral esinema vähemalt kolm viiest tunnusest: paastutriglütseriidide tase ≥150 mg/dl, vererõhk ≥130/85 mmHg, HDL-kolesterooli tase <40 mg/dl meestel ja <50 mg/dl naistel, paastuglükoosi tase ≥100 mg/dl ning vööümbermõõt meestel üle 102 cm ja naistel üle 88 cm (Grundy *et al*., 2005; Scuteri *et al*., 2015). Metaboolse sündroomi esinemisel on tunduvalt suurem risk südame- ja veresoonkonnahaiguste ja II tüüpi diabeeti haigestumiseks (Mottillo *et al*., 2010). Seega on metaboolse sündroomi võimaliku esinemise kindlaks tegemine oluline kaasuvate haiguste ennetamisel ja diagnoosimisel. Kuna tegemist on haigusega, mis hõlmab endas mitmeid tegureid, on selle kõrvalekallete ja füsioloogiliste muutuste kaardistamine kliinilises praktikas veel ebaselge (Grundy, 2005). Vaatamata sellele näitavad uuringud, et metaboolne sündroom (MetS) suurendab oluliselt mitmete põletikuliste markerite tõusu organismis (Sur *et al*., 2014).
Metaboolne sündroom on täiskasvanute seas maailmas tõusutrendis ja seda istuva eluviisi ning suurenenud energiarikka toidu tarbimise tõttu (Saklayen, 2018). Eestis läbi viidud uuringust selgub, et kõige levinumateks kõrvalekalleteks nii meestel kui naistel on eelkõige hüpertensioon, kõhuõõne rasvumine ja glükoosi metabolismi häirumine. Uuringud näitavad, et

MetS esinemissagedus on meestel kõrgem ja selle levimus suureneb vanusega ning kaasuvate haiguste esinemisega (Eglit *et al*., 2012; Stout *et al*., 2017).

Seega võib metaboolse sündroomi kontseptsioon olla oluline südame- ja veresoonkonnahaiguste ning diabeedi eluaegse riski varajases prognoosimises.

1.1.5 Rasvumise ennetamine ja ravi

Rasvumise ennetamine on oluline, et vähendada tõsiste terviseriskide ja krooniliste haiguste teket (Goran *et al*., 2003). Nii ennetuse kui ka ravi puhul on oluline individuaalne ja terviklik lähenemine selleks, et muutused oleksid püsivad (MacLean *et al*., 2015). Terviklik lahendus ei tähenda aga üksikut sekkumisviisi, vaid sageli mitme meetme kombineerimist. Esmased sekkumised hõlmavad toitumise korrigeerimist ja kehalise aktiivsuse suurendamist. Sõltuvalt patsiendi vajadusest võib lisanduda käitumuslik sekkumine (nt kognitiivne käitumisteraapia), farmakoloogiline ravi ning raskematel juhtudel kirurgiline sekkumine (NHLBI Obesity Education Initiative Expert Panel, 1998; MacLean *et al*., 2015).

Kuigi rasvumise tekkeks võib olla geneetiline eelsoodumus, suurendab vastuvõtlikkust kehakaalu muutustele ikkagi elustiil (Zhang *et al*., 2024). Esmasteks rasvumise põhjusteks on kehv toitumine ja ebatervislikud valikud (näiteks kalori- ja suhkrurikas toit/jook, ebapiisav uni, vähene kehaline aktiivsus), mis kõik soodustavad kehakaalu tõusu ja terviseriskide teket (Hruby *et al*., 2016). Seega on rasvumise ennetamise keskmes just elustiilimuutused, eeskätt mitmekülgne ja tasakaalustatud toitumine, regulaarne kehaline aktiivsus ning piisav uni (Ka *et al*., 2025; De Oliveira Otto *et al*., 2018). Inimene on loodud liikuma ning liikumisharjumuste parandamiseks leidub tänapäeval mitmeid võimalusi, millest igaüks saab leida omale meelepärasema. Soovituslik on füüsiliselt aktiivne olla (mõõduka või tugeva intensiivsusega aeroobne liikumine) vähemalt 150 minutit nädalas (Tervise Arengu Instituut, 2022). Teaduslikud uuringud on tõestanud, et regulaarne kehaline aktiivsus parandab glükeemilist regulatsiooni, vähendades insuliiniresistentsuse, metaboolse sündroomi ning II tüüpi diabeeti haigestumise riski (Bird and Hawley, 2017).

Selleks, et elustiili muutused oleksid püsivad, nõuavad need patsiendipoolset distsipliini ja järjepidevust. Tihti aga juba ülekaalus patsientide puhul ei ole normaalkaalu tagasi pöördumine enam nii lihtne ning ainult toitumise ja kehalise aktiivsuse muutmine ei pruugi viia soovitud tulemuseni (Fischer *et al*., 2020). Lisaks on leitud, et nii inimese kui ka hiirte rasvkoes säilivad pärast kaalulangust muutused rasvkoe epigenoomis. Neid muutusi nimetatakse ka epigeneetiliseks mäluks, mis mõjutavad rakkude edasist funktsiooni ja vastust

ainevahetuslikele stiimulitele. See võib selgitada kiiremat kaalutõusu pärast dieedi lõppemist, mida tuntakse ka kui “yo-yo” efekti (Hinte *et al*., 2024).

Selliste püsivate bioloogiliste muutuste tõttu võib üksnes elustiilimuutustest jääda väheseks. Sel juhul kaalutakse täiendavat sekkumist farmakoteraapia näol, mis võimaldab toetada patsiendi kehakaalu vähendamist ja säilitamist. Ravimid ei ole siinkohal esmaseks valikuks, vaid toetavaks meetmeks, kus täpselt sama oluline on järgida samal ajal tervislikku elustiili. Patsientide puhul, kelle kehamassiindeks on >27 kg/m^2 või ≥ 30 kg/m^2, kasutatakse vajadusel järgmiste toimetega rasvumisvastaseid ravimeid: soolelipaasi inhibiitoreid (nt orlistaat), serotoniini retseptori agoniste (nt lorkaseriin), GLP-1 retseptori agoniste (nt liraglutiid, semaglutiid (nt Ozempic)), GLP-1/GIP agoniste (nt tirzepatiid), serotoniini ja noradrenaliini tagasihaarde inhibiitorid (nt sibutramiin), aga ka kombinatsioonravi (nt fentermiin/topiramaat, fenfluramiin/fentermiin, pramlintiid/sibutramiin ja pramlintiid/fentermiin). Hiljutiste uuringute tulemused näitavad, et kõige tõhusamad on rasvumise ravis tänapäeval eelkõige GLP-1 ja GLP-1/GIP retseptori agonistid (nii meestel kui naistel) kui ka kombinatsioonravi (Ruban *et al*., 2019; Jackson *et al*., 2015; Morsali *et al*., 2023). Paraku võivad nende ravimitega kaasneda rasked kõrvaltoimed, nagu peavalu, kõhukinnisus/-lahtisus, valu seljas või lihastes, liigne väsimus, pearinglus, mao või sooleärritus, iiveldus või oksendamine. Ka võivad esineda psühhiaatrilised häired, sh ärevus, depressioon või unetus (MedlinePlus, 2020; Johnson ja Quick, 2023). Seetõttu on tungiv vajadus uute, toimeainelt tõhusamate ja minimaalsete kõrvaltoimetega farmakoloogiliste ravimite järele (Jackson *et al*., 2015).

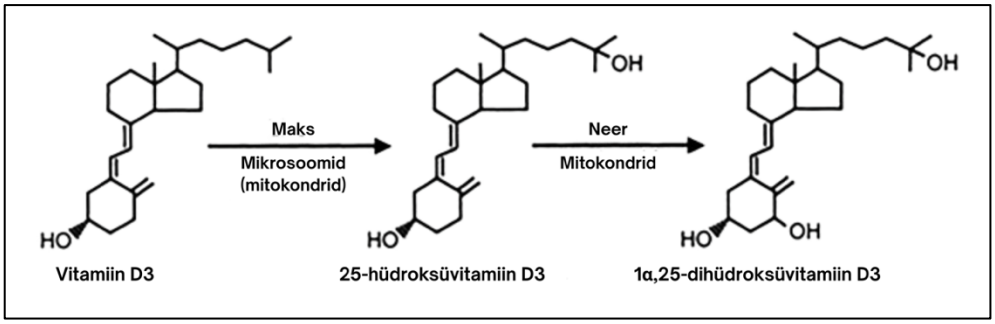
Kui rasvumine osutub juba ohtlikuks patsiendi tervisele ja kaasuvate haiguste progresseerumisele, kaalutakse kirurgilist sekkumist. Üks lahenduseks on bariaatriline kirurgia, mis on kõige tõhusam viis rasvumise kontrolli alla saamiseks, juba kriitilisemate seisundite puhul. Kuigi viimane võib tõhusalt kaasa aidata kaalu langetamisele ning vähendada kaasuvate haiguste riske, piirab see oma tõsiste kõrvaltoimete tõttu laialdast kasutamist (Ruban *et al*., 2019; Jackson *et al*., 2015).

1.2 D-VITAMIIN

1.2.1 Metabolism

D-vitamiin on ühine nimetus metaboliitidele kolekaltsiferool (vitamiin D3) ja ergokaltsiferool (vitamiin D2). Mõlemad hormoonid omavad tähtsat rolli organismi ainevahetuslikes ning rakulistes protsessides (Schmitz *et al*., 2021). Kui D2-vitamiin on taimset päritolu, seda valmistatakse peamiselt tööstuslikult ning ta esineb kontrollitud kujul toiduainetes ja toidulisandites, siis D3-vitamiini sünteesitakse päikesevalguse (UVB-kiirguse) toimel naha

välimises kihis ehk epidermises ning ta on metaboolselt stabiilsem ja bioloogiliselt aktiivsem (Ross *et al*., 2011; L Bishop *et al*., 2020). D-vitamiini võib leiduda ka mõnedes looduslikes toiduainetes, nagu rasvane kala, kalamaksaõli ja munakollane (Ross *et al*., 2011). D3-vitamiin on ise bioloogiliselt mitteaktiivne ja selle omistamine ning metaboolselt aktiivseks vormiks muundamine on organismi seisukohast keeruline protsess (Joonis 4). Pärast imendumist või sünteesi naha kaudu muundatakse D3-vitamiin maksas 25-hüdroksüvitamiiniks D3 [25(OH)D], mida tuntakse kaltsidioolina – see on peamine vereseerumis mõõdetav D-vitamiini varu näitaja. Seejärel toimub teine hüdroksüülimine neerudes, kus moodustub selle aktiivne hormoon 1α,25-dihüdroksüvitamiin D3 [1,25(OH)$_2$D] ehk kaltsitriool (DeLuca, 2004).



Joonis 4. D3-vitamiini muundamine metaboolselt aktiivseks vormiks (kohandatud, DeLuca, 2004).

1.2.2 Bioloogiline tähtsus

D3-vitamiinil on organismi seisukohast tähtis roll kaltsiumi ja fosfaadi imendumisel soolestikus, kaltsiumi vabastamisel luudest ning reabsorptsioonil neerudes (DeLuca, 2004).
Selle toime avaldub peamiselt läbi D-vitamiini retseptori (VDR; ingl *vitamin D receptor*), mis on transkriptsioonifaktorina võimeline mõjutama geenieksprессiooni erinevates sihtrakkudes (Evans, 1988). VDR-i puhul on näidatud selle tähtsust lipiidide ainevahetuses ning võimet reguleerida metaboolselt vallandunud põletikku (Huang *et al*., 2023). Hiiremudelil läbi viidud katse tõestab VDR kaitsvat toimet rasvasest dieedist tingitud metaboolsele põletikule rasvkoes ja maksas (Jahn *et al*., 2019). Seepärast on VDR oluline sihtmärk kroonilise põletiku ja patoloogiliste seisundite ravis. Lisaks on kirjeldatud D-vitamiinile omaseid spetsiifilisi elemente (VDRE; ingl *Vitamin D Response Element*), mis esinevad paljudes inimese geenides ning reguleerivad rakkude paljunemist, diferentseerumist ja apoptoosi (Ross *et al*., 2011).

1.2.3 Rasvumine ja D-vitamiini puudus

Kuna D-vitamiin (nii D2 kui D3) on looduslikult rasvlahustuv vitamiin, toimub selle imendumine peensooles koos teiste lipiididega. Pärast D3-vitamiini sünteesimist nahas, vahendab selle edasist transporti spetsiifiline plasmavalk (DBP) (Haddad *et al*., 1993). Edasi toimub D-vitamiini metaboliseerumine maksas ja neerudes ning transport ja salvestamine külomikronite abil rasvkoesse. Viimase etapina transporditakse spetsiifilise ensüümi lipoproteiini abil D-vitamiin lümfisüsteemist vereringesse (Ross *et al*., 2011). Kuna perifeersed koed nagu rasvkude ja skeletilihased seovad suure osa vabanevast D-vitamiinist, kipub see pärast toidukorda plasmast kiiresti kaduma. See võib selgitada ka asjaolu, miks rasvunud inimestel võib D-vitamiini madalamat taset esineda sagedamini (Jones, 2008). Seda seost kinnitavad ka varasemad uuringud, mis näitavad, et rasvunud isikutel on 25(OH)D3 basaaltase madalam võrreldes mitterasvunud isikutega (Wortsman *et al*., 2000). Paljud teadusuuringud viitavad, et D-vitamiini puudus võib olla seotud rasvumise ja sellest tuleneva metaboolse sündroomi kujunemisega (Mansouri *et al*., 2018). D-vitamiinil on lisaks ainevahetuslikele toimetele oluline roll ka immuunsüsteemi talitluses, kuid tema liigsel manustamisel võib tekkida hüperkaltseemia. Eestis diagnoositakse D-vitamiini puudus siis, kui 25-hüdroksüvitamiin D [25(OH)D] sisaldus veres langeb alla 50 nmol/L; optimaalseks peetakse taset vahemikus 75–125 nmol/L (Viitasalo *et al*., 2021; Holick *et al*., 2011).

Senised kliinilised uuringud ei ole suutnud veenvalt tõestada, et D-vitamiini manustamine avaldaks inimestel olulist mõju kehakaalu langusele (Karampela *et al*., 2021). Samas on näriliste mudelitel saadud tulemused näidanud, et D-vitamiinil võib olla kaitsev ja ennetav toime rasvumisega kaasneva põletiku, maksa steatoosi ja insuliiniresistentsuse suhtes (Marziou *et al*., 2020). D-vitamiini manustamisel rasvarikkal dieedil olevatele rottidele, on leitud maksa lipogeneesi ja rasvade kogunemise vähenemine (Yin *et al*., 2012), samal ajal kui D-vitamiini defitsiit halvendab glükoositaluvust ja insuliinitundlikkust (Cade ja Norman, 1986).

Kuna D-vitamiini toime sõltub manustamisviisist ja annusest, võib suuremate dooside kasutamine põhjustada hüperkaltseemiat, eriti kui need ületavad inimorganismi talutavaid piirmäärasid (Vieth, 2007). Seetõttu keskenduvad tänapäevased teadusuuringud D-vitamiini analoogide leidmisele, mis oleks sarnase bioloogilise toime, kuid madalama kaltseemilise riskiga.

1.2.4 D-vitamiini analoogid

D-vitamiinil on organismi seisukohalt asendamatu roll kaltsiumi ja fosfori homöostaasis, kuid selle suures annuses manustamine võib olla toksiline ning põhjustada hüperkaltseemiat (Jones,

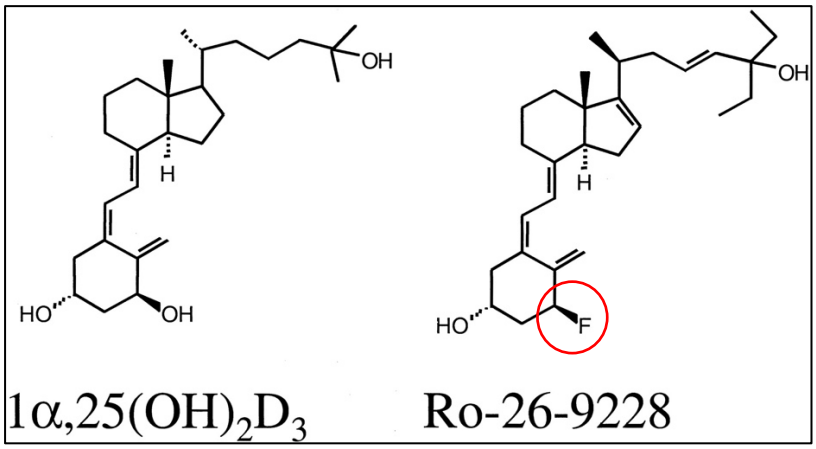
2008). Hüperkaltseemia tekib kaltsiumi või D-vitamiini üledoseerimisel, millest omakorda võib tekkida neerupuudulikkus või veresoonte ja pehmete kudede lupjumine (Maestro *et al*., 2019). D-vitamiin võib muutuda organismile toksiliseks ning põhjustada hüperkaltseemiat, kui selle aktiivse metaboliidi 1,25$(OH)_2$D plasmakontsentratsioon ületab 600 nmol/L (Vieth, 2007). Seega on teadlased otsustanud leida erinevaid D-vitamiini sünteetilisi analooge, mille kõrvaltoimete risk oleks minimaalne.

Praeguseks on teada üle 3000 sünteetilise D-vitamiini analoogi, millest tänaseks on turule jõudnud vaid vähesed (Maestro *et al*., 2019). Tänu VDR avastamisele sihtrakkudes, on tänaseks sünteesitud erinevaid geeniekspressioonis osalevaid sünteetilisi VDR ligande. VDR ligandide puhul on näidatud nende efektiivsust mõjutada organismis põletikku (reumatoidartriit), osteoporoosi (postmenopaus), dermatoloogilisi näidustusi (psoriaas, seborroiline dermatiit), vähki ning autoimmuunhaigusi (II tüüpi diabeet) (Nagpal *et al*., 2005; Maestro *et al*., 2019). Seega osalevad D-vitamiini analoogid tänu VDR retseptorile lisaks kaltsiumi ainevahetusele immuunsüsteemi reguleerimises, rakkude proliferatsioonis ja diferentseerumises (Nagpal *et al*., 2005). See on viinud sünteesitud D-vitamiini analoogide kliinilise kasutuseni erinevate näidustuste, peamiselt osteoporoosi, psoriaasi ja sekundaarse kilpnäärme ületalitluse ravis (Adorini *et al*., 2005; Mariani *et al*., 2012). Kõige edukamaks analoogidest peetakse kaltsipotriooli, mida kasutatakse peamiselt psoriaasi ravis (Dubertret *et al*., 1992). Analoogidest kasutatakse dokserkaltsiferooli, falekaltsitriooli ja maksatsitooli kilpnäärme ületalitluse korral ja eldekaltsitooli osteoporoosi raviks (Leyssens *et al*., 2014). Lisaks on analoogidest teada veel alfakaltsidool, takaltsitool, parikaltsitool, oksaltsitriool (Maestro *et al*., 2019).

Viimasel ajal on uuritud D-vitamiini analoogide mõju ka lipiidide ainevahetusele. Näiteks on kindlaks tehtud, et üks D-vitamiini analoogidest, elokaltsitool, suudab inhibeerida SREBP/SCAP süsteemi ning takistada lipiidide kogunemist maksas, ilma hüperkaltseemiat põhjustamata (Jürgenson *et al*., 2025).

1.2.2 Elokaltsitool

Elokaltsitool (BXL-628 või Ro-26-9228) on kaltsitriooli (1,25-$(OH)_2D_3$) sünteetiline derivaat. Elokaltsitooli struktuuris on tsüklilise süsinikuaatomiga seotud fluori aatom, mis suurendab molekuli stabiilsust ja seondumist VDR-ga (Joonis 5) (Penna *et al*., 2006; Peleg *et al*., 2002). Erinevad uuringud näitavad, et elokaltsitooli suuremates kontsentratsioonides kasutamine omab kaitsvat toimet luude tervises ja kaltsiumi homöostaasis (Peleg *et al*., 2002). Samuti on prekliiniliselt ja kliiniliselt tõestatud elokaltsitooli efektiivsust ja ohutust eesnäärme healoomulise hüperplaasia ravis (Adorini *et al*., 2007).



Joonis 5. Kaltsitriooli ($1,25\text{-}(OH)_2D_3$) ja selle analoogi elokaltsitooli (Ro-26-92289 struktuurvalemid (Peleg *et al*., 2002).

Varasemad loommudelitega tehtud uuringud näitavad elokaltsitooli võimet läbi VDR alla suruda põletikulisi tsütokiine (Chithanathan *et al*., 2024).

1.3 MikroRNA (miRNA)

Viimaste aastakümnete jooksul on RNA-de uurimises tehtud palju edusamme, kus erilise tähelepanu alla on võetud mikroRNA-d ning nende toimemehhanismide mõistmine geenide avaldumises (Carthew ja Sontheimer, 2009). MikroRNAd (miRNA) on lühikesed (20-25 nukleotiidi pikad), üheahelalised geenieksрessiooni reguleerimisel osalevad RNA molekulid (Anglicheau *et al*., 2010). Inimese genoomis on tuvastatud enam kui 2000 mikroRNA-d (miRNA), millest ligikaudu kolmandikul on regulatoorne toime (Hammond, 2015). Samas ei ole miRNA-de täpne funktsioon organismis teada, kuid on leitud, et nad võivad mõjutada läbi geenieksрessiooni olulisi rakufunktsioone, sealhulgas metabolismi (Krützfeldt *et al*., 2006). Esimesed tõendid miRNA-de osalemisest ainevahetusprotsessides saadi mudelorganismil *Drosophila melanogaster*, kus näidati miRNA-de olulist rolli rasvkoe muutustes (Xu *et al*., 2003).

MiRNA-de ekspressiooni reguleerivad transkriptsioonifaktorid, mis aktiveeruvad vastusena rakutüübi arengule või keskkonnastiimulile (Anglicheau *et al*., 2010). Kõigepealt toimub eel-miRNA-de transportimine valgu eksportiin-5 abil tuumast tsütoplasmasse, kus edasi miRNA-dele omase Dicer ensüümi poolt toimub nende lõikamine väiksemateks nukleotiidideks (Anglicheau *et al*., 2010). MiRNA-d võivad mõjutada organismi seisukohalt olulisi signaaliradasid, mis osalevad rasvarakkude ja skeletilihaste diferentseerumises ning lipiidide, aminohapete ja glükoosi ainevahetuses (Krützfeldt *et al*., 2006). Varasemalt on kirjeldatud, et

miRNA võib esile kutsuda tugeva immuunvastuse ja põletikulisi protsesse, mis võivad mõjutada mitme kroonilise haiguse patoloogia väljakujunemist (Chithanathan *et al*., 2024).
MiRNA-de kindlaks tegemiseks on mitmeid meetodeid, nende seas kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (PCR), DNA-mikrokiiptehnoloogia, järgmise põlvkonna sekveneerimine ja *in situ* hübridiseerimismeetodid (Berezikov, 2006).

1.3.1 MikroRNA146a (miR146a)

Üks olulisemaid mikroRNA gruppe, mis reguleerivad immuunvastuse ja põletikuliste protsesside kujunemist, on mikroRNA146 (miR146). Inimese genoomist on leitud kaht tüüpi miR146-sid - miR146a ja miR146b - mis erinevad teineteisest kahe nukleotiidi poolest (Chithanathan *et al*., 2022). Samas jääb mõlema miR146 puhul ebaselgeks nende spetsiifiline mõju terviseseisundite ja haiguste patoloogias (Paterson, 2017).
MiR146a puhul on tegemist negatiivse regulaatoriga, mis NF-κB raja kaudu mõjutab immuunvastuse kujunemist, põletikulisi reaktsioone ja rakkude ellujäämist (Taganov *et al*., 2006). Eelnevates uuringutes on leitud, et miR146a madalam ekspressioon võib olla seotud suurenenud insuliiniresistentsuse, halvenenud glükeemilise kontrolli ning põletikuliste tsütokiinide, sealhulgas TNF-α, kõrgema tasemega organismis. Samuti on näidatud miR146a võimet maha suruda TNF-α poolt põhjustatud lipogeneesi (Wu *et al*., 2016). See viitab sellele, et miR146a võib mängida olulist rolli metaboolsete haiguste, nagu II tüüpi diabeedi ja kardiovaskulaarsete haiguste patogeneesis.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Uurimistöö eesmärgid ja ülesanded

Käesoleva uurimistöö eesmärk on hinnata bioloogiliselt aktiivse D-vitamiini derivaadi elokaltsitooli mõju kõrge rasvasisaldusega dieeti (KRS) saavate metsiktüüpi (MT) ja miR146a defitsiitsete hiirte kehakaalu muutustele, kognitiivsetele funktsioonidele ning rasvumisega seotud tervisenäitajatele. Uurimistöö eesmärgiks on ühtlasi selgitada, kas elokaltsitooli toime rasvumisest tingitud metaboolse sündroomi avaldumisele on seotud miR146a ekspressiooniga.

Käesoleva töö ülesanded olid järgmised:

1. Hinnata kogu katseperioodi vältel metsiktüüpi ja miR146a defitsiitsete hiirte kehakaalu dünaamikat;
2. Selgitada, kas ja kuidas avaldab elokaltsitool toimet katseloomade aktiivsusele ja kognitiivsetele funktsioonidele;
3. Tuvastada elokaltsitooli manustamise järgselt selle mõju metsiktüüpi ja miR146a defitsiitsete hiirte maksa ja epididümaalse rasva massile;
4. Uurida metsiktüüpi ja miR146a defitsiitsete hiirte lipiidide imendumist verre, kasutades rasvatolerantsi katset;
5. Uurida, millisel viisil mõjutab elokaltsitooli manustamine kõrge rasvasisaldusega dieedist tingitud glükoosiainevahetust ja rasvade lagundamist;
6. Teostada vere biokeemilised analüüsid, hindamaks elokaltsitooli võimalikku mõju kaltsiumi metabolismile.

Eesmärkide ja olemasoleva kirjanduse põhjal püstitati järgmised hüpoteesid:

1. Elokaltsitooli manustamine vähendab kõrge rasvasisaldusega dieedi (KRS) poolt indutseeritud kaalutõusu ja rasvade kogunemist.
2. Elokaltsitooli toime on seotud miR146a ekspressiooniga.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Katseloomad ja katse disain

Kõik protseduurid teostati Eesti Maaeluministeeriumi loomkatseprojekti komisjoni loal (1.2-17/166, 2023). Katseloomad pärinesid Tartu Ülikooli Bio-ja siirdemeditsiini instituudi katseloomakeskusest, mis on tunnustatud Veterinaar- ja Toiduameti poolt (tunnustamise otsus nr KL1210) ning kus on rakendatud ISO 9001:2008 kvaliteedijuhtimissüsteemi (SERT nr 10843, BM TRADA). Loomi hoiustati standardsetes laboritingimustes 12-tunnise valgus/pimeduse režiimil (kus valge tsükkel algas kell 8.00), temperatuuril 24-26 °C. Hiired elasid 4-6 kaupa puuris (Techniplast, Italy), mille pindala oli 1820 cm^2 (1346G Euro standard Type IV). Kogu katseperioodi vältel söödeti loomi kas madala või kõrge rasvasisaldusega dieediga (ssniff Spezialdiäten GGmbH, Saksamaa) ja joodeti autoklaavitud kraaniveega *ad libitum*, ning puure koristati kord nädalas.

Katsegruppide moodustamiseks ristati C57BL/6J taustaga miR146a heterosügootseid isaseid ja emaseid hiiri. Loomad genotüpiseeriti TÜ RNA bioloogia uurimisgrupi poolt ja genotüpiseerimiseks kasutati järgmisi praimerite järjestusi:

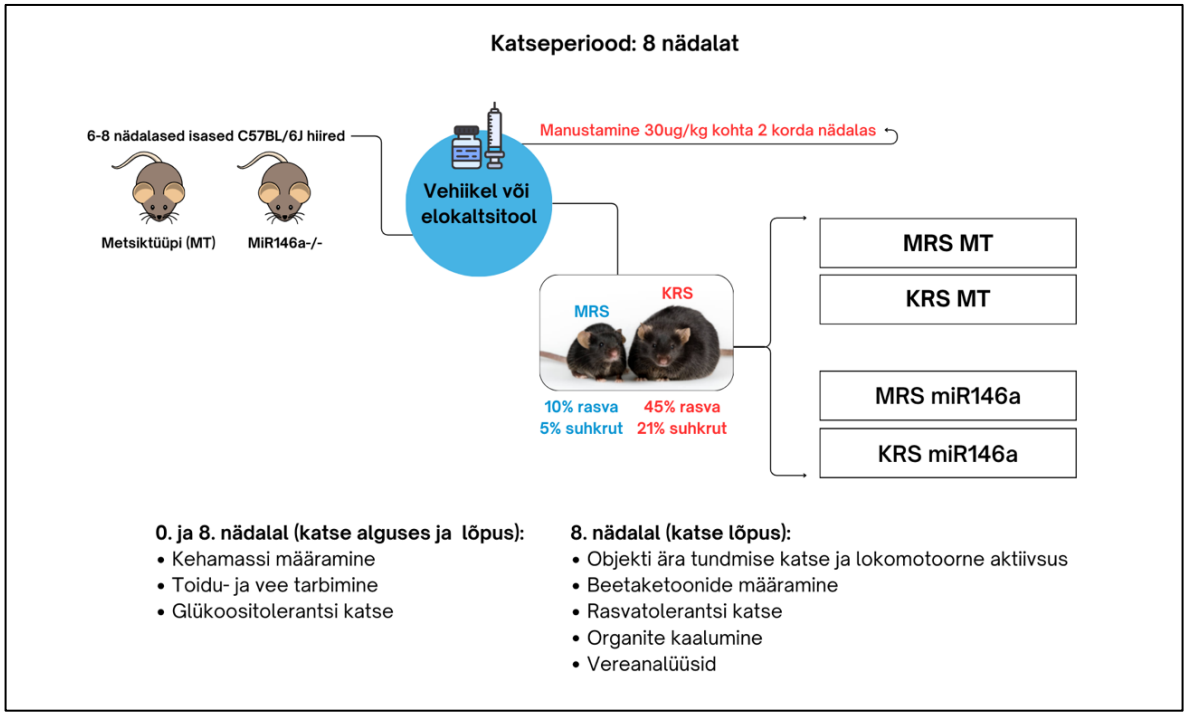
146a lookus 5′ eesmine praimer- 5′-ACC AGC AGT CCT CTT GAT GC-3′,

146a lookus 3′ tagumine praimer- 5′-GAC GAG CTG CTT CAA GTT CC-3′.

Saadud hiirte kolooniast kasutati katsetes metsiktüüpi (miR146a +/+; MT) ja miR146a -/- (miR146a) isaseid loomi (Joonis 6). Loomi hoiti algselt 10 kaupa puuris ja seejärel jaotati 5 kaupa puuridesse. Sama puuri loomi kasutati võrdlusena KRS ja MRS dieediga. Nii MT kui ka miR146a defitsiitsete loomade puhul kasutati katsetes samasugust jaotust. Loomi toideti kindla valgu, rasva ja süsivesikute sisaldusega dieediga. MRS dieedi (vt Lisa 1) puhul said loomad kontrollitud 11 kJ% rasvasisaldusega sööta, samas kui KRS dieedi (vt Lisa 2) puhul oli rasvasisaldus 45 kJ%. Kõik katseloomad said kaks korda nädalas 8 nädala jooksul intraperitoneaalselt (i.p.) vastavalt katsegrupile vehiiklit või elokaltsitooli (30 ug/kg, Lisa 3).

Katseloomad jaotati nelja katsegruppi:

- Metsiktüüpi madala rasvasisaldusega dieeti saavad loomad, kellele manustati vehiiklit või elokaltsitooli (viidatud kui MRS MT; MRS MT+Elok);
- Metsiktüüpi kõrge rasvasisaldusega dieeti saavad loomad, kellele manustati vehiiklit või elokaltsitooli (viidatud kui KRS MT; KRS MT+Elok);
- MiR146a defitsiitsed madala rasvasisaldusega dieeti saavad loomad, kellele manustati vehiiklit või elokaltsitooli (viidatud kui MRS miR146a; MRS miR146a+Elok);
- MiR146a defitsiitsed kõrge rasvasisaldusega dieeti saavad loomad, kellele manustati vehiiklit või elokaltsitooli (viidatud kui KRS miR146a; KRS miR146a+Elok).



Joonis 6. Visuaalne katseskeem.

Katseloomadega tegelesid ja protseduure viisid läbi EL direktiivi 2010/63/EL kohaselt koolituse läbinud ja loomkatse luba omavad isikud. Loomkatsed viidi läbi Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditsiini instituudi katseloomakeskuses, mis on tunnustatud Veterinaar- ja Toiduameti poolt (määrusega nr 92). Katse lõpus, 24h pärast viimast manustamist, loomad uinutati pentobarbitaali letaalse doosiga (200-300 mg/kg). Hukkamise järgselt eraldati katselooma organid ning võeti vereproov, millest eraldati seerum. Seerumit säilitati -80 °C juures kuni analüüside teostamiseni. Analüüsid teostati Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlaboris (Puusepa 8a, Tartu). Käesoleva töö autori roll oli osaleda katsete läbiviimises, dokumenteerida protsesse, sisestada saadud andmed, assisteerida analüüside teostamisel ning koostöös juhendajaga teostada andmeanalüüs.

2.2.2 Preparaatide manustamine

Enne igat manustamist katseloomad kaaluti ning tulemused kanti protokolli. Vastavalt katsegrupile manustati loomadele kaks korda nädalas 8 nädala jooksul elokaltsitooli (SML23-95, Sigma Aldrich, Saksamaa) või vehiiklit i.p. annuses 30 ug/kg kohta (0,1 ml 10 g kehakaalu kohta) (Lisa 3; Lisa 4).

2.2.3 Katseloomade toidu ja vee tarbimine

Selleks, et hinnata elokaltsitooli mõju katseloomade söögiisule ja vedeliku tarbimisele, määrati katseloomade tarbitud toidu ja joodud vedeliku kogused looma kohta 1x 24h jooksul kaalumeetodil.

2.2.4 Katseloomade kehakaalu dünaamika

Kehakaalu muutuste jälgimine oli oluline rasvase dieedi ja elokaltsitooli manustamise mõju hindamiseks ainevahetuslikele muutustele. Enne elokaltsitooli manustamist kaaluti loomi kaks korda nädalas ning tulemused märgiti protokolli. Pärast kaalumist manustati katseloomadele i.p. elokaltsitooli või vehiiklit vastavalt katserühmale. Seejärel asetati loomad tagasi oma kodupuuri, kus nad said jätkata oma tavapärast elu- ja toitumisrežiimi.

2.2.5 Lokomotoorne aktiivsus

Katseloomade lokomotoorset ehk liikumisaktiivsust mõõdeti ühe tunni jooksul. Selleks kasutati PhenoTyper (Noldus Information Technology, Holland) pleksiklaasist motoorikapuure (puuri mõõdud 30 x 30 x 36 cm; n = 15), mis olid varustatud videojälgimissüsteemiga. Loomad asetati motoorikapuuri ja videojälgimissüsteem fikseeris automaatselt looma liikumisaktiivsuse. Katse käigus mõõdeti iga üksiku katselooma poolt läbitud distants (cm) ja loomade liikumiskiirus (cm/s) ühe tunni jooksul. Andmeanalüüsiks kasutati EthoVision version 8 tarkvara.

2.2.6 Uue objekti äratundmise katse

Katse eesmärk oli selgitada elokaltsitooli mõju rasvumisest tingitud kognitiivsetele funktsioonidele (lühi- ja pikaajalisele mälule). Katses kasutati kambrit mõõtudega 50 × 50 × 50 cm (pikkus × laius × kõrgus). Kambrisse asetati tekstuurilt ja värvilt sarnased, kuid kujult erinevad läbipaistmatud klaasist objektid, mis olid piisavalt rasked, et hiired neid liigutada ei suudaks. Tulemused registreeriti erinevatel ajahetkedel, katseloomade jaoks tuttav objekt vahetati uue vastu ning mõõdeti vana ja uue objekti uudistamise aeg. Uudistamine registreeriti, kui katseloom objekti nuusutas või katsus nina või esikäppadega. Uudistamise puhul ei läinud arvesse see, kui katseloom ronis objekti otsa. Katseloomad, kes katse mingis faasis ühte või kumbagi objekti ei uudistanud, jäeti katse lõppstatistikast välja. Katse toimumise hetkel viibisid katset läbi viinud isikud eraldi arvutiruumis, kus läbi arvutiga ühendatud kaamera sai katseloomade käitumist jälgida ja stopperiga aega registreerida. Vajadusel oli võimalik hiljem

videosalvestuste põhjal katsetulemusi analüüsida. Uue objekti eelistussuhe leiti protsentides valemiga: (AEG uus objekt) / (AEG tuttav objekt + AEG uus objekt) × 100, kus „AEG tuttav objekt“ ja „AEG uus objekt“ on vastavalt vana ja uue objekti uudistamisele kulunud ajad.

Katse koosnes neljast faasist:

1) Esimeses faasis asetati katseloomad 5 minutiks kambrisse kohanema ning pandi seejärel oma kodupuuri tagasi;
2) Katse teises faasis (24h hiljem) asetati kaks sarnast objekti (A ja A′) kambri seintest 10 cm kaugusele ja diagonaalis ning katseloom pandi kambri keskele tühja nurga suunas. Seejärel mõõdeti 5 minuti jooksul katselooma objekti uudistamise aeg ning asetati ta tagasi kodupuuri;
3) Katse kolmas faas toimus 3h hiljem, kus üks kahest objektist (A) asendati uue objektiga B ning mõõdeti objektide A ja B uudistamise aeg 5 minuti jooksul;
4) Neljas faas algas 24h pärast teist faasi, kus objekt B asendati objektiga C ning mõõdeti objektide A ja C uudistamise aeg 5 minuti jooksul.

Peale iga katselooma sessiooni puhastati katsekamber ja klaasist objektid 5%-lise etanooli lahusega.

2.2.7 Epididümaalse rasvkoe ning maksa massi määramine

Epididümaalne rasv ehk munandimanuse rasv on isastel loomadel epididüümuse ümber olev rasvkude. Hiirtel on rasvade kogunemist siseelundite ümber seostatud metaboolse sündroomi ning insuliiniresistentsuse avaldumisega (Gabriely *et al*., 2002).

Maksa massi määramine on oluline näitaja rasvmaksahaiguse (NAFLD; ingl *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*) hindamisel katseloomadel (Ryu *et al*., 2015). Maksa suurenemine võib viidata rasva akumulatsioonile maksarakkudes ja selle varajastele patoloogilistele seisunditele. Organite massi määramiseks uinutati loomad pentobarbitaali letaalse üledoosiga (200-300 mg/kg) ning peale epididümaalse rasva kogumike ning maksakoe eraldamist organid kaaluti ning saadud andmed protokolliti.

2.2.8 Glükoositolerantsi katse (*Glucose tolerance test, GTT*)

Antud katse viidi läbi enne ja pärast manustamisperioodi, et hinnata elokaltsitooli mõju katseloomade glükoosi ainevahetusele. 10-12h enne katse läbi viimist võeti katseloomadelt söök ära. Kõigepealt mõõdeti glükomeetriga (Accu-Chek® Performa, Roche, Mannheim, Saksamaa) hiirte sabaotsast võetud verest glükoosi baastase (0 min). Seejärel manustati hiirtele

i.p. glükoosilahust (2 g/kg; 0,1 ml 10 g kehakaalu kohta; Lisa 3), mõõdeti glükoosisisaldus veres vastavalt 15., 30., 60. ja 120. minutil ning saadud tulemused märgiti protokolli. Kogu katseaja vältel jälgiti katseloomade terviseseisundit, et vajadusel hüperglükeemia esinemise korral koheselt insuliini manustada (NovoRapid 100 TÜ (0,5 U/kg, 0,1 ml 10 g kehakaalu kohta; Lisa 3). Katseloomi, kellele oli vaja manustada insuliini, katsetulemuste arvutamisel ei arvestatud.

2.2.9 β-ketoonide määramine

Hindamaks maksa funktsionaalsust rasvade lagundamisel, määrati katseloomade verest β-ketoonide tase. Selleks kasutati inimeste jaoks mõeldud glükomeetrit (CareSens Dual, Saksamaa) koos KetoSens testiribadega. Katse teostamiseks eemaldati 2h enne katset loomadelt söök ja seejärel võeti katseloomade sabadest vereproov ning testiribade abil määrati ketokehade kontsentratsioon veres. Tulemused protokolliti hilisemaks analüüsiks.

2.2.10 Rasvatolerantsi katse

Selleks, et uurida rasvade imendumist ja triglütseriidide taset vastavalt katsegrupile, sai teostatud rasvatolerantsi katse. Loomad olid enne manustamist 16h söömata. Katseloomadele manustati vastavalt kehakaalule suukaudselt sondi abil rasvainet (oliiviõli; 10 ul/g hiire kohta). Katse nõudis äärmist täpsust, et vältida rasvaine sattumist katselooma hingamisteedesse. Pärast manustamist võeti täpse ajalise intervalli järgi (15., 30., 60., 120. minutil) loomadelt vereproov, millest eraldati tsentrifuugimise teel (2000 pööret/20 minutit) seerum. Seerum analüüsiti Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlaboris (Puusega 8a, Tartu), kus määrati triglütseriidide tase (TRIGL; mmol/l).

2.2.11 Kaltsiumi taseme määramine vereseerumis

Pärast katseloomade hukkamist võeti loomadelt vereproov, millest eraldati seerum. Hiljem teostati seerumist analüüsid kaltsiumi taseme määramiseks (Ca^{2+}; mmol/l). Analüüsid teostati Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlaboris (Puusepa 8a, Tartu).

2.2.12 Andmete töötlus

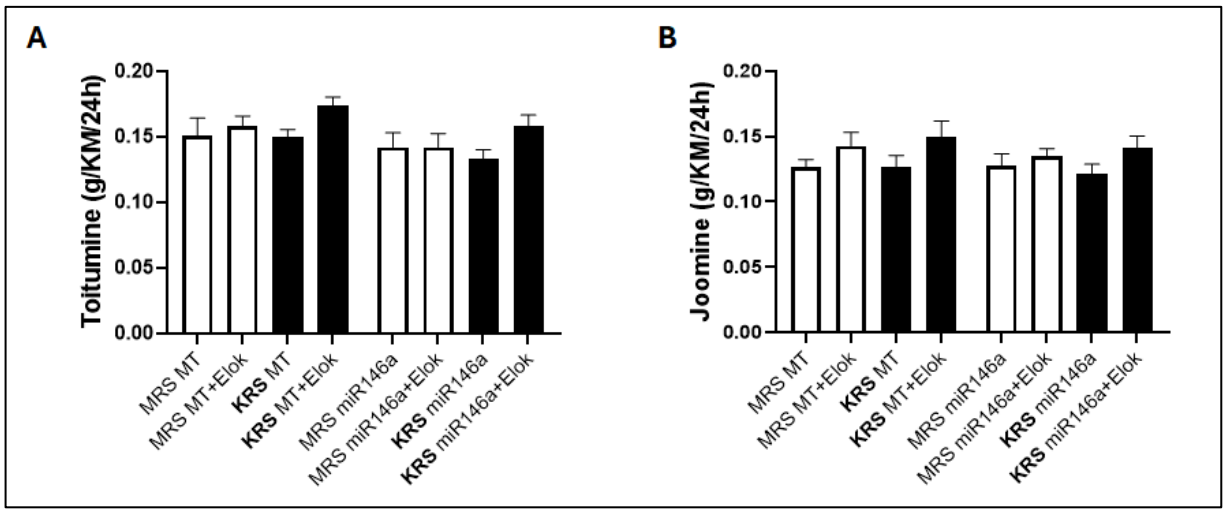
Tulemuste statistiliseks analüüsiks ja graafiliseks esitamiseks kasutati GraphPad Prism 9.4.1 (USA) tarkvara. Viidi läbi ühe- või kahesuunaline ANOVA, millele järgnes Tukey järeltest

ning andmed esitati keskmine ± standardviga (± SEM). Statistiliselt oluliseks väärtuseks loeti $p < 0.05$. Andmete esitlemisel kasutatud statistiline test on välja toodud joonise legendis.

2.3 Tulemused

2.3.1 Elokaltsitooli mõju katseloomade toidu- ja vee tarbimisele

Selleks, et hinnata elokaltsitooli mõju katseloomade toitumisele ja vedelikutarbimisele, määrati katseloomade 24h jooksul tarbitud toidu- ja vee kogused (Joonis 7). Saadud tulemustes olulisi erinevusi katsegruppide vahel toidu- ja vee tarbimises ei esinenud.

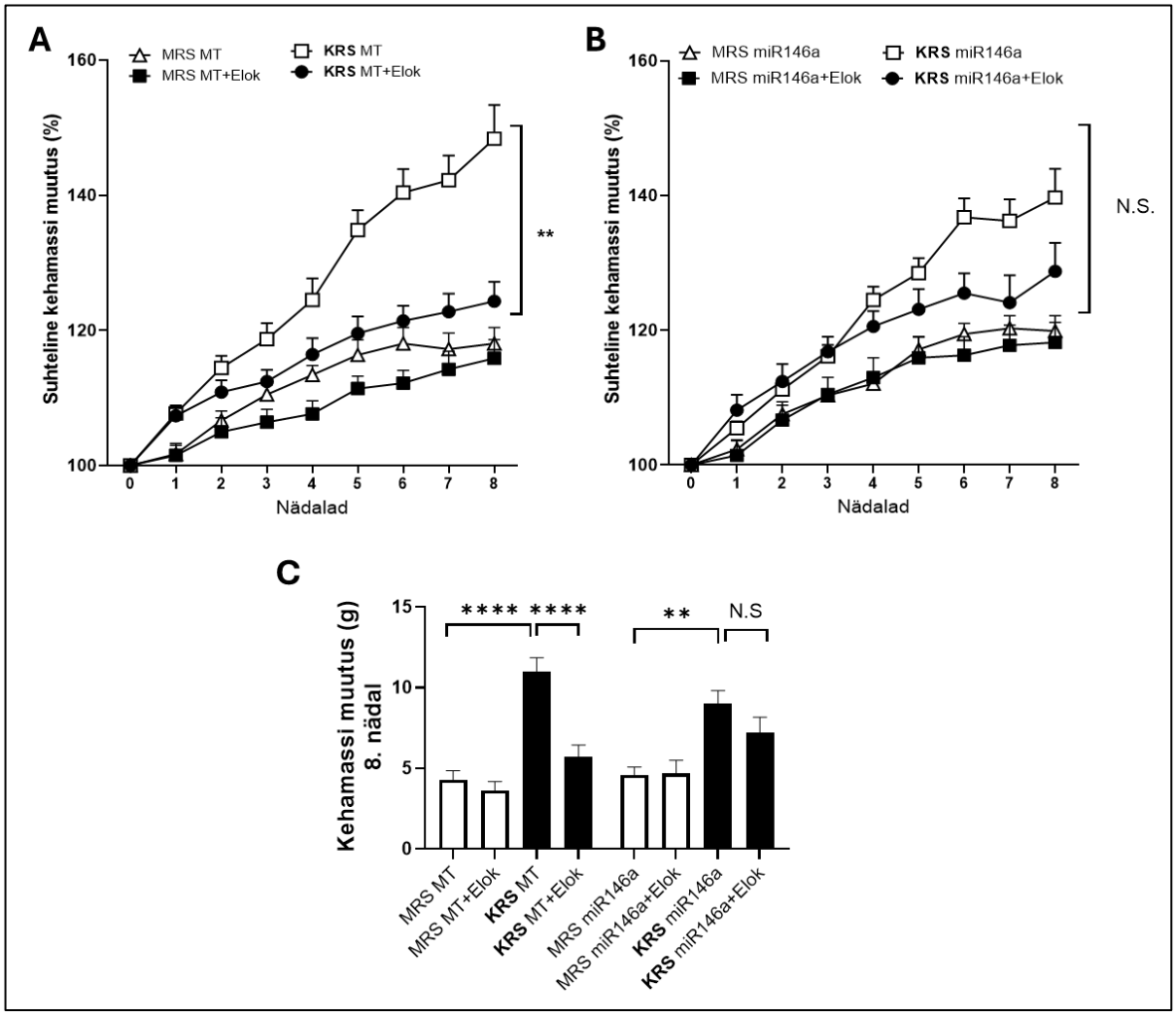


Joonis 7. Katseloomade toidu- ja vee tarbimine 24h jooksul grammides kehamassi kohta (g/KM/24h). **A.** Katseloomade toitumine 24h jooksul grammides kehamassi kohta; **B.** Katseloomade joomine 24h jooksul grammides kehamassi kohta. Ühesuunaline ANOVA, millele järgnes Tukey järeltest; n = 10.

2.3.2 Katseloomade kehakaalu dünaamika muutused rasvase dieedi ja elokaltsitooli manustamise mõjul

Käesoleva katse jooksul fikseeriti uuringusse võetud loomade kehakaalu muutused, vaadeldes elokaltsitooli toimet KRS dieeti saanud katseloomade kehakaalu muutustele kaheksa nädala jooksul. KRS põhjustas kehakaalu tõusu nii MT kui ka miR146a defitsiitsetel loomadel (Joonis 8). KRS dieet statistiliselt olulist mõju MT loomade kehakaalu muutustele oli märgata juba katse teisel nädalal. MT katseloomadel vähendas elokaltsitool oluliselt KRS dieedi poolt indutseeritud kaalutõusu (**$p < 0.01$; kahesuunaline ANOVA, millele järgnes Tukey järeltest; Joonis 8A). Samas on joonisel C näha, et KRS dieet tõstis oluliselt MT loomade kehamassi, võrreldes MRS kontrollgrupiga (****$p < 0.0001$; ühesuunaline ANOVA, millele järgnes Tukey

järeltest). Samasugune muutus on näha ka KRS dieedil olnud miR146a defitsiitsetel hiirtel (**p < 0.01). Rasvumist ärahoidvat efekti miR146a defitsiitsetel loomadel elokaltsitooli manustamisel ei täheldatud (Joonis 8B, C).

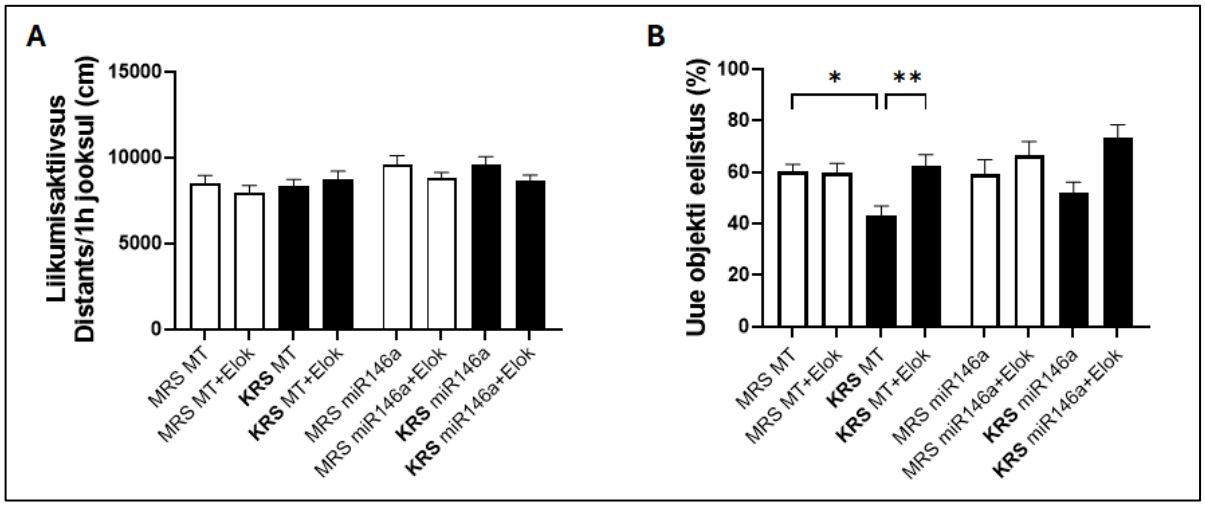


Joonis 8. Katseloomade suhtelised kehamassi muutused (%) manustamisperioodi jooksul (n = 10). **A.** MT katseloomade suhtelised kehamassi muutused KRS dieedi ja elokaltsitooli manustamise mõjul; **B.** MiR146a defitsiitsete loomade suhtelised kehamassi muutused KRS dieedi ja elokaltsitooli manustamise mõjul. Kahesuunaline ANOVA, millele järgnes Tukey järeltest; ** tähistab vastavalt p < 0.01; N.S. – statistiline erinevus puudub. **C.** Katseloomade kehamassi muutused grammides (g). Ühesuunaline ANOVA; **, ***** tähistavad vastavalt p < 0.01; p < 0.0001; N.S. – statistiline erinevus puudub.

2.3.3 Katseloomade lokomotoorse aktiivsuse ja uue objekti äratundmise hindamine rasvase dieedi ja elokaltsitooli manustamise mõjul

KRS dieedil olnud MT ja miR146a defitsiitsete loomade puhul 2 kuu jooksul mõõdetud liikumisaktiivsuses olulisi erinevusi ei olnud (Joonis 9A). Uue objekti eelistuse katses oli aga märgata, et KRS dieeti saanud MT loomade mälufunktsioon oli võrreldes kontrollrühmaga

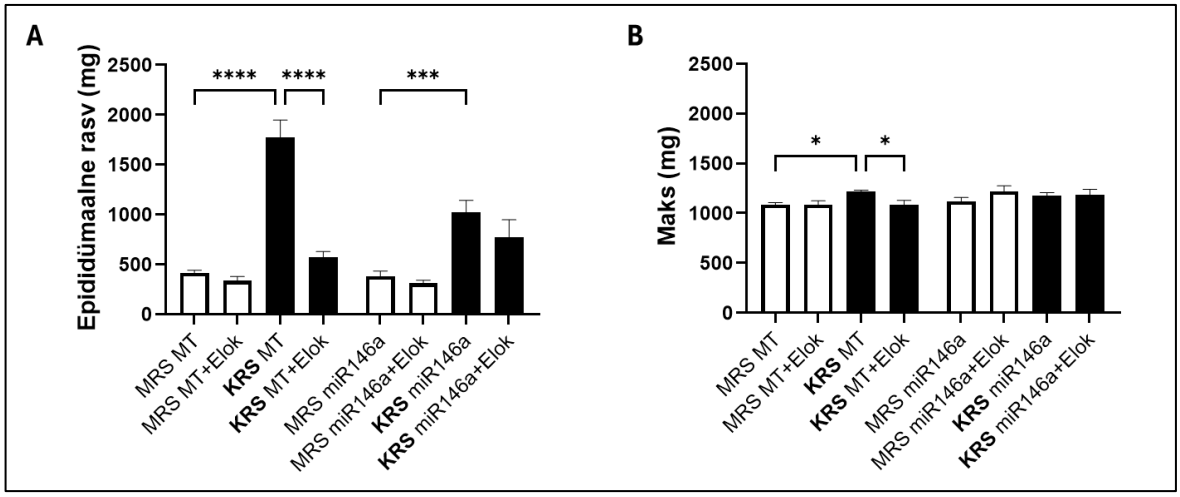
(MRS) tunduvalt halvenenud (*p<0.05; Joonis 9B). Elokaltsitooli manustamine parandas aga oluliselt KRS dieeti saanud MT loomade mälu, võrreldes KRS MT loomadega (**p < 0.01; Joonis 9B).



Joonis 9. Katseloomade lokomotoorse aktiivsuse (A) ja uue objekti eelistuse (B) hindamine (n = 10). **A.** Katseloomade liikumisaktiivsus; **B.** Katseloomade uue objekti eelistus. Ühesuunaline ANOVA; *, ** tähistavad vastavalt p < 0.05; p < 0.01.

2.3.4 Elokaltsitooli mõju epididümaalse rasva ja maksa massile

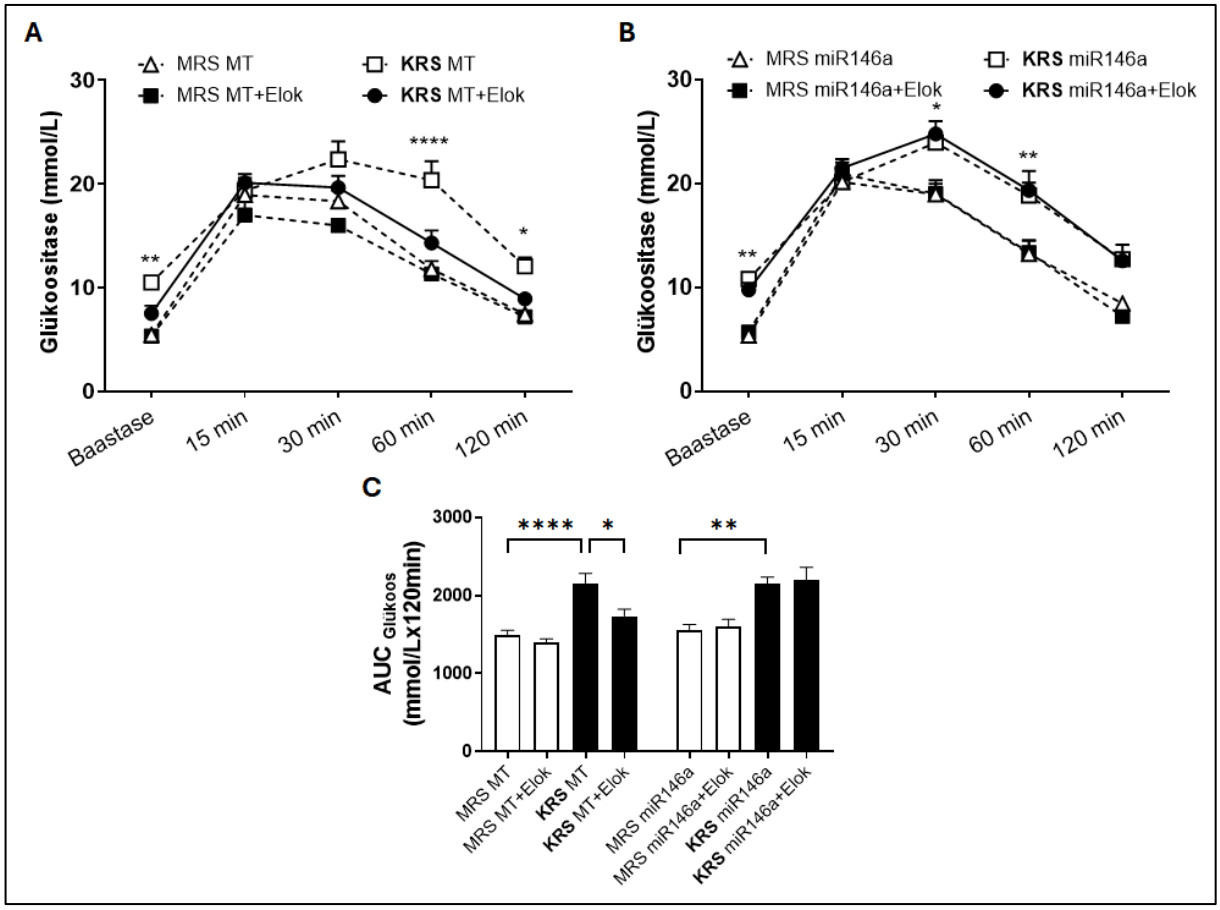
Võttes arvesse rasvarikka dieedi poolt esile kutsutud märgatavat mõju katseloomade kehakaalu tõusule eelnevas katses, keskenduti käesolevalt elokaltsitooli toimele rasvade kogunemises. Tulemused näitasid, et KRS dieet põhjustas epididümaalse rasva kogunemist nii MT kui ka miR146a defitsiitsetel loomadel (****p < 0.0001; ***p < 0.001; Joonis 10A). Elokaltsitooli manustamise tulemusena väheneb oluliselt MT loomadel KRS dieedi poolt indutseeritud rasvade kogunemine (****p < 0.0001; Joonis 10A), mida miR146a defitsiitsete loomade puhul ei täheldatud. Lisaks viis KRS dieet maksa massi suurenemiseni MT loomadel (*p<0.05; Joonis 10B), samas kui miR146a defitsiitsetel loomadel maksa massis olulisi muutusi ei olnud. Elokaltsitool vähendas oluliselt MT loomadel KRS dieedist tulenevat maksa massi suurenemist (*p<0.05; Joonis 10B), kuid miR146a defitsiitsetel loomadel sellised mõjud puudusid. Lisaks, elokaltsitooli manustamisel MRS dieeti saavatele MT ja miR146a loomadele, ei täheldatud muutusi rasvade ladestumises ning maksa massis.



Joonis 10. Katseloomade epididümaalse rasva (A) ja maksa (B) mass (mg) (n = 10). **A.** Katseloomade epididümaalse rasva mass; **B.** Katseloomade maksa mass. Ühesuunaline ANOVA, millele järgnes Tukey järeltest; *, ***, **** tähistavad vastavalt $p < 0.05$; $p < 0.001$; $p < 0.0001$.

2.3.5 Katseloomade glükoositaluvus rasvase dieedi ja elokaltsitooli manustamise mõjul

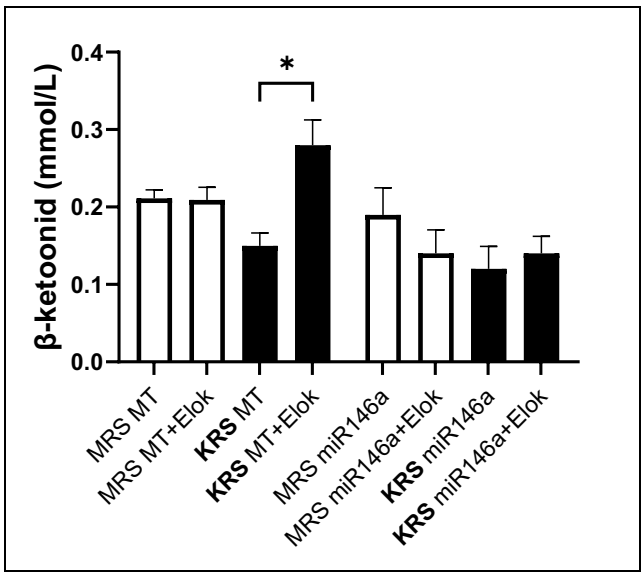
Glükoositolerantsi katse tulemustest on näha, et võrreldes MRS dieeti saavate loomadega halvendas KRS dieet oluliselt MT loomadel glükoositaluvust pärast i.p. glükoosi manustamist (2 g/kg) (****$p < 0.0001$; Joonised 12A, C). Sarnaseid tulemusi oli näha KRS dieeti saanud saanud miR146a defitsiitsete loomade puhul, kelle glükoositaluvus halvenes märgatavalt (**$p < 0,01$; Joonised 12B, C). Elokaltsitooli manustamine parandas KRS dieedil olnud MT loomade glükoositaluvust, millele viitab glükoosi kõveraaluse pindala vähenemine (AUC) (*$p < 0.05$; Joonis 12C). Selliseid muutusi KRS dieedil miR146a defitsiitsetel loomadel ei täheldatud. See viitab, et elokaltsitoolil võib olla oluline mõju glükoosi homöostaasi reguleerimisele KRS dieeti saavatel MT loomadel.



Joonis 12. Katseloomade glükoositaluvus (n = 10). **A.** Glükoositase erinevatel ajahetkedel MT katseloomadel; **B.** Glükoositase erinevatel ajahetkedel miR146a (B) defitsiitsetel katseloomadel; **C.** Glükoosi kõvera alune pindala (AUC) katsegruppide lõikes. Kahesuunaline ANOVA (A, B); ühesuunaline ANOVA (C); *, **, **** tähistavad vastavalt $p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.0001$. AUC (ingl *Area Under Curve*) viitab kõvera all olevale pindalale.

2.3.6 β-ketoonide taseme määramine

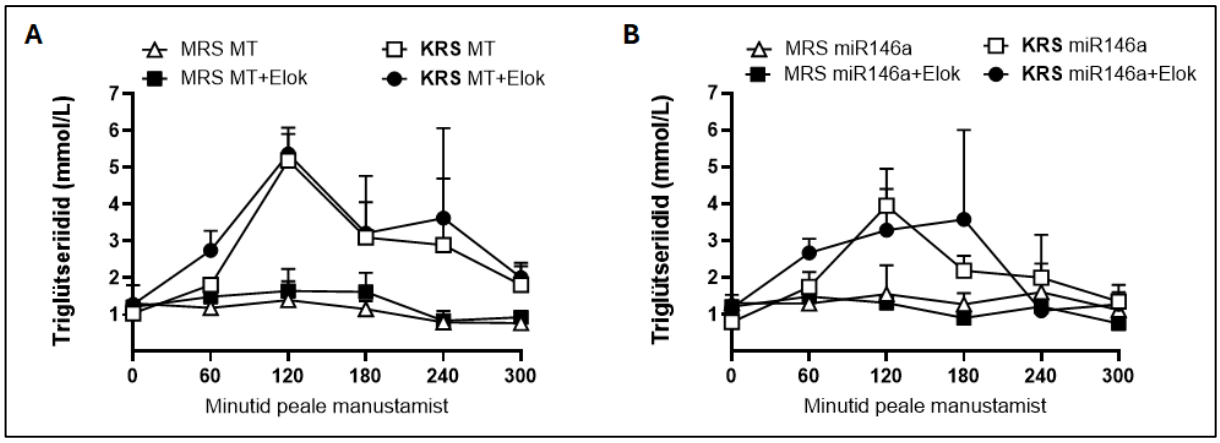
Elokaltsitooli manustamine KRS dieeti saavatele MT grupi loomadele tõstis oluliselt β-ketoonide taset, võrreldes elokaltsitooli mitte saanud KRS MT grupi loomadega (Joonis 13). KRS dieeti saavate miR146a defitsiitsetel loomadel statistiliselt olulisi muutusi ei täheldatud.



Joonis 13. Katseloomadel määratud β-ketoonide tase (n = 10). * tähistab vastavalt $p < 0.05$; ühesuunaline ANOVA, millele järgnes Tukey järeltest.

2.3.7 Triglütseriidid ja rasva imendumine

Katseloomadele rasvaine (oliiviõli) manustamise järgselt hinnati selle mõju rasvade imendumisele ja triglütseriidide tasemele. Saadud tulemused näitasid, et elokaltsitooli manustamine KRS dieeti saavatele MT ja miR146a grupi loomadele ei põhjustanud statistiliselt olulisi erinevusi triglütseriidide tasemetes võrreldes kontrollrühmadega (MRS) (Joonis 14A, B). Seega ei avaldanud elokaltsitool olulist mõju lipiidide imendumisele.



Joonis 14. Katseloomadel määratud triglütseriidide tase (mmol/L) (n = 10). **A.** Triglütseriidide tase MT katseloomadel. **B.** Triglütseriidide tase miR146a defitsiitsetel katseloomadel. Kahesuunaline ANOVA.

2.3.8 Kaltsiumi tase vereseerumis

Kõrge rasvasisaldusega dieedi ja elokaltsitooli manustamise mõjul statistiliselt olulisi muutusi seerumi kaltsiumi tasemetes ei ilmnenud (Tabel 1). Mõningad väikesed erinevused olid tõenäoliselt tingitud dieedist, mille taustal elokaltsitooli toime ei avaldunud. Loomade arv n = 7-8. Esitatud on iga katsegrupi aritmeetiline keskmine ja standardviga (± SEM).

Tabel 1. Katseloomadel määratud kaltsiumi tase vereseerumis pärast MRS või KRS dieediga ning elokaltsitooli manustamist.

Katseloomade grupid							
MRS MT	MRS MT+Elok	**KRS** MT	**KRS** MT+Elok	MRS miR146	MRS miR146a+ Elok	**KRS** miR146a	**KRS** miR146a+ Elok
1,99±0,04	**2,03±0,12**	**2,35±0,14**	**2,36±0,05**	**1,98±0,10**	**2,10±0,04**	**2,31±0,08**	**2,28±0,07**

2.4 Arutelu

Rasvumine ja metaboolne sündroom on järjest süvenev tervisemure, mille levimus on viimastel aastatel märgatavalt kasvanud. Rasvumine ei ole üksnes esteetiline või elustiilist tulenev probleem, vaid tõsine krooniline haigus, mis on tihedalt seotud paljude eluohtlike seisunditega. Metaboolset sündroomi iseloomustab mitme riskiteguri, sealhulgas düslipideemia, hüpertensiooni ning kõhupiirkonna rasvumise samaaegne esinemine ning see suurendab oluliselt kardiovaskulaarhaiguste ja varajase suremuse riski (Mottillo *et al*., 2010). Kuigi elustiilimuutused on esmaseks ja soovituslikuks lähenemiseks rasvumise ennetamises ja ravis, ei pruugi need meetmed üksi olla piisavad. Paljud patsiendid ei suuda soovitatud elustiilimuutusi järjepidevalt rakendada või toimub kiire tagasilangus varasemate harjumuste juurde. Lisaks on juba rasvunud patsientidel normaalkaalu tagasi pöördumine tihti keerulisem. (Fischer *et al*., 2020). Praegu kasutuses olevatel kehakaalu langetamiseks mõeldud ravimitel on sageli kaasneda võivad rasked kõrvaltoimed.

Varasemad uuringud on leidnud, et D-vitamiin võib kaitsta ja ennetada rasvumisega kaasnevat põletikku, maksa lipogeneesi ja rasvade ladestumist (Yin *et al*., 2012; Marziou *et al*., 2020). Samas ei ole D-vitamiini suuremas koguses manustamine ohutu, kuna inimorganismile talutavate piirmäärade ületamisel võib kaasneda hüperkaltseemia risk. Käesolevas töös uuriti D-vitamiini sünteetilist derivaati, elokaltsitooli, mis on võimeline maha suruma rasvumisest tingitud madala taseme põletikku ning millel on D-vitamiinist väiksem hüperkaltseemiline toime. Samuti uuriti miR146a rolli rasvumise ja metaboolse sündroomi avaldumisele läbi

elokaltsitooli toime. Rasvumine ja selle mõju uurimine nõuab kompleksseid mudelsüsteeme, mistõttu on näriliste ja eriti hiiremudeli kasutamine põhjalikeks katseteks sobilik (Börgeson *et al*., 2022). See võimaldab kujundada meie arusaama rasvkoe ja metaboolsetest muutustest katseloomadel ning uurida geenide mõju rasvumisest tingitud kehakaalu muutustele ja haiguslikele seisunditele (Wang *et al*., 2013; Kim *et al*., 2007; Zhang *et al*., 1994). Antud uurimistöö eksperimentaalsetesse katsetesse võeti C57BL/6J taustaga isased hiired, sest seda mudelit on hea kasutada inimesele sarnaste patofüsioloogiliste seisundite modelleerimiseks (Fraulob *et al*., 2010). Uuringusse sai valitud just isased hiired, sest varasemalt on loomkatsed näidanud, et emasloomadel võib kõrgem östrogeenitase pärssida küllastunud rasvhapete (FA; ingl *fatty acid*) põletikuvastast toimet (Argente-Arizón *et al*., 2018). Samuti on varem näidatud, et elokaltsitool on võimeline vähendama KRS dieeti saavatel hiirtel kehakaalu tõusu, rasvade ladestumist ning alandama põletikuliste tsütokiinide taset (Jürgenson *et al*., 2024).

Antud töö eksperimentaalses osas katseloomadel läbi viidud toidu- ja vee tarbimises katsegruppide vahel statistiliselt olulisi erinevusi ei ilmnenud, mis tähendab, et elokaltsitooli manustamine ei mõjutanud loomade söögiisu ega vedeliku tarbimist ning loomade kaalulangust ei saa seostada vähenenud toitumusega. Kehakaalu dünaamikas ilmnes, et KRS dieet tõstis oluliselt MT loomade kehamassi. Elokaltsitooli manustamine aitas aga kehamassi tõusu oluliselt takistada, nagu on näha joonisel 8 toodud andmetes. MiR146a defitsiitsetel loomadel ilmnes samuti KRS dieedi korral kehamassi tõus, kuid puudusid olulised erinevused KRS miR146a ja elokaltsitooli saanud loomade grupis. Elokaltsitooli manustamine vähendas MT katseloomadel siseelundite ja epididümaalse rasvkoe hulka – nende mehhanismide täpsemaks selgitamiseks oleks kindlasti tarvilik teostada veel lisauuringuid. Kirjandusest tulenevalt on rasvumise korral leitud üleliigse rasva kogunemine maksarakkudesse, mis vallandab põletiku ning võib viia steatohepatiidi või fibroosi tekkimiseni (Kucera, 2014). Kuna rasvmaksa teke on sageli asümptomaatiline, jääb see aladiagnoosituks ning vajab täiendavaid eksperimentaalseid uuringuid just selle varajaste muutuste osas (Nielsen *et al*., 2022). Seepärast sai antud uurimistöös teostatud rasvunud ja mitte-rasvunud katseloomade maksa kaalumuutuste uurimine. MT katseloomadel vähenes elokaltsitooli toimel maksa mass, mis võis takistada lipiidide kogunemist rasvarakkudesse ning ära hoida mittealkohoolse rasvamaksa teket. Sellele võivad viidata ka varasemalt tehtud MRI uuringud, mis näitavad elokaltsitooli ravi järgselt vähenenud lipiidide kogunemist maksa (Jürgenson *et al*., 2024).

Antud katsetingimustes ei täheldatud elokaltsitooli toimel olulisi muutusi rasvade imendumises ja triglütseriidide tasemes. Need tulemused võivad viidata sellele, et elokaltsitooli võimalik metaboolne toime ei hõlma rasvade seedimist või imendumist sooles, vaid võib avalduda pigem teistes ainevahetusprotsessides, näiteks glükoosi ainevahetuses, põletikureaktsioonides või

rasvkoe tasandil. Hindamaks võimalikku mõju katseloomade glükoositaluvusele, viidi läbi glükoositolerantsi katse, kus glükoosi manustamise järgselt mõõdeti katseloomade glükoositase veres erinevatel ajahetkedel. KRS dieeti saanud MT katseloomade glükoositaluvus oli tunduvalt halvenenud, võrreldes elokaltsitooli saanud katseloomadega. Samal ajal miR146a defitsiitsete KRS dieeti saanud loomade puhul statistilisi erinevusi ei esinenud. Katseloomadel määratud β-ketoonide tasemetes ilmnesid muutused KRS MT loomade puhul, kellel elokaltsitooli mõjul β-ketoonide tase tõusis – see võib viidata võimalikule maksa ketoosile.

Lisaks rasvkoele ja rasvade imendumisele, võib üleliigse rasva ladestumine mõjutada ka aju ning kognitiivseid funktsioone. Uuringud on näidanud, et KRS võib põhjustada mikrogliia rakkudes neuropõletikku ning see võib olla seotud mälu halvenemisega (Chithanathan *et al*., 2024). Mälufunktsiooni hindamiseks viidi läbi uue objekti äratundmise katse, kus tulemustest selgus, et KRS dieedil MT katseloomad uudistasid uut objekti tunduvalt vähem kui loomad, kellele manustati elokaltsitooli. Elokaltsitool parandas MT katseloomade mälu, sest nad uudistasid uut objekti tunduvalt rohkem kui rasvunud ja elokaltsitooli mitte saanud loomad.

Elokaltsitooli manustamise võimaliku kaltseemilise toime hindamiseks määrati katseloomadel katse järgselt vereseerumist kaltsiumi tase. Kuna kaltsiumi tasemetes katsegruppidel statistilised erinevused puudusid, võib järeldada, et elokaltsitoolil on D-vitamiiniga võrreldes väiksem kaltseemia tekkimise ja kõrvalmõjude risk.

Käesolevas katses MT loomadel ilmnenud muutusi nii kehakaalu dünaamikas, rasvade ladestumises, glükoositaluvuses, β-ketoonide tasemes kui kognitiivsetes funktsioonides miR146a defitsiitsetel katseloomadel ei esinenud. Nende tulemuste põhjal võib oletada, et elokaltsitool avaldab oma toimet miR146a ekspressiooni kaudu, kuid see väide nõuab veel täiendavate kinnitavate teadusuuringute läbiviimist.

2.5 Järeldused

1. Elokaltsitooli manustamine vähendas oluliselt MT hiirtel KRS dieedi poolt indutseeritud kaalutõusu ja rasvade ladestumist.
2. Elokaltsitool parandas oluliselt KRS dieeti saanud loomade glükoositaluvust.
3. Elokaltsitooli manustamine aitas ära hoida rasvumisest tingitud metaboolset sündroomi katseloomadel.
4. Kuna miR146 defitsiitsetel hiirtel elokaltsitooli toimel selliseid muutusi kehakaalu dünaamikas, rasvade ladestumises, glükoositaluvuses, β-ketoonide tasemes ning kognitiivsetes funktsioonides ei ilmnenud, võib arvata, et elokaltsitooli mõju rasvumisele on tõenäoliselt seotud miR146a ekspressiooniga.

KOKKUVÕTE

Käesoleva uurimistöö eesmärk oli uurida, kas D-vitamiini fluoreeritud analoog, elokaltsitool, aitab ära hoida KRS dieedist tingitud rasvumist ja metaboolset sündroomi C57BL/6J MT ja miR146a defitsiitsetel hiirtel ning hinnata miR146a rolli elokaltsitooli toimes. Tulemused näitasid, et elokaltsitooli ravi takistas MT hiirtel kehakaalu tõusu ja rasvade ladestumist, vähendas siseelundite ja epididümaalse rasva ning maksa massi ning parandas glükoositaluvust. Selliseid MT loomadel ilmnenud muutusi miR146a defitsiitsetel hiirtel ei esinenud.

Seega viitavad tulemused sellele, et elokaltsitooli toime KRS dieedist tingitud rasvumise ja metaboolse sündroomi tekkele on tõenäoliselt seotud miR146a ekspressiooniga.

Antud uurimistöö annab uusi teadmisi elokaltsitooli kasulikest toimetest rasvumise ja metaboolse sündroomi ennetamise kohta ning pakub uusi võimalikke suundi ravivõimaluste arendamiseks, eriti elokaltsitooli madalama hüperkaltseemilise toime tõttu D-vitamiiniga võrreldes. Tulevikus on oluline uurida elokaltsitooli toimet rasvumisele ka kliinilistes uuringutes ning täpsustada miR146a rolli ja seost teiste patofüsioloogiliste mehhanismidega.

Bakalaureusetöö on esitatud 61 leheküljel ja sisaldab 13 joonist, 1 tabelit ning 108 viidet.

The therapeutic potential of the vitamin D derivative elocalcitol in the development of obesity-induced metabolic syndrome in wild-type and microRNA-146a deficient mice

Anete Budrikas

Summary

Obesity and the resulting metabolic syndrome are global health issues with extensive consequences for both mental and physical health. Obesity has been linked to systemic low-grade inflammation, leading to an increase in inflammatory cytokines in the body. As a chronic inflammatory condition, obesity significantly increases the risk of serious diseases such as cancer, cardiovascular diseases, type 2 diabetes, and non-alcoholic fatty liver disease. This has created an urgent need for new pharmacological treatments that are more effective in terms of active ingredients.

The aim of this study is to investigate the therapeutic potential of the vitamin D derivative elocalcitol in the manifestation of obesity-induced metabolic syndrome in wild-type and microRNA-146a deficient mice. Elocalcitol is a vitamin D receptor agonist with potent anti-inflammatory effects and a hypocalcemic action lower than that of vitamin D. Previous studies have shown that microRNA-146a suppresses inflammation and diet-induced obesity and regulates metabolic processes. However, it has not been previously investigated whether and how the effect of elocalcitol is influenced by the expression of microRNA-146a in animal models.

The experiment conducted with animals explored the effects of elocalcitol on the body weight dynamics, mobility, cognitive functions, glucose metabolism, liver condition, and other obesity-related health parameters in obese animals. The study included wild-type and microRNA-146a deficient mice, which were fed either a low-fat or high-fat diet. Animals were administered either vehicle or elocalcitol (30 μg/kg) intraperitoneally twice a week for 8 weeks. The results showed that elocalcitol administration significantly reduced the weight gain and fat accumulation induced by the high-fat diet, decreased epididymal fat and liver mass, and improved glucose tolerance. These changes suggest that the effect of elocalcitol on obesity is linked to miR-146a expression.

Elocalcitol's ability to alleviate obesity-related conditions highlights it`s potential as a therapeutic intervention. Given that obesity and associated diseases continue to be one of the leading health problems globally, the results suggest that elocalcitol administration, combined with lifestyle changes, may represent a new pharmacological approach. Furthermore, elocalcitol's anti-inflammatory effects may open new avenues for future research in the development of treatment strategies for obesity and metabolic syndrome.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajat Monika Jürgensoni pühendatud aja, toetuse, minusse uskumise ja meeldiva koostöö eest. Samuti lähevad tänusõnad minu kaasjuhendajale Kristina Mäemets-Allasele abistava ja põhjaliku tagasiside eest. Aitäh ka kõigile neile, kes töö valmimisel abiks olid ning toetavaid sõnu jagasid!

KIRJANDUSE LOETELU

Kasutatud raamatud

Haldre, K, Ehala-Aleksejev, K, Vogelberg, J, Hanson, M. 2024. Naise tervis, lk. 44-45.

National Library of Medicine. (2023). *Topiramate and Phentermine*. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482165/
(Võib liigitada ka veebiallikaks, aga sisult on see ravimite käsiraamat – sobib raamatute alla, kuna pärineb NCBI Bookshelf'ist)

Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, Del Valle HB, editors. Institute of Medicine (US) Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D Washington (DC): National Academies Press (US). (2011), PMID: 21796828.

Institute of Medicine (US) Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium. (2011). *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D* (A. C. Ross, C. L. Taylor, A. L. Yaktine, & H. B. Del Valle, Toim). National Academies Press (US). http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56070/

Kasutatud veebilehed

National Library of Medicine. (2020). *Medline Plus – Drug Information: Topiramate*. Vaadatud 15.04.2025, https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a613014.html#other-information

National Library of Medicine. Medline Plus. (2020). Vaadatud 15.04.2025, https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a613014.html#other-information

National Library of Medicine. Topiramate and Phentermine (2023). Vaadatud 15.04.2025, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482165/

NHLBI Obesity Education Initiative Expert Panel on the Identification, Evaluation, and Treatment of Obesity in Adults. (1998). *Clinical guidelines on the identification, evaluation,*

and treatment of overweight and obesity in adults: The evidence report (Chapter 4, Treatment guidelines). National Heart, Lung, and Blood Institute. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2004/

Ravijuhend: Ülekaalulise või rasvunud patsiendi käsitlus esmatasandil. Vaadatud 12.04.2025, https://ravijuhend.ee/tervishoiuvarav/juhendid/187/ulekaalulise-voi-rasvunud-patsiendi-kasitlus-esmatasandil

Tervise Arengu Instituut. (2022). *Maailma terviseorganisatsiooni (WHO) soovitused kehalise aktiivsuse kohta*. Vaadatud 15.03.2025, https://tai.ee/sites/default/files/2022-11/Kehaaktiivsuse_voldik_web.pdf

Tervise Arengu Instituut. (i.a.). Vaadatud 12.04.2025, https://www.tai.ee/et/uudised/ulemaailmne-rasvumise-paev-probleem-eestis-suur-nii-taiskasvanute-kui-laste-seas

Tervise Arengu Instituut. (i.a.). *Ülemaailmne rasvumise päev: Probleem Eestis suur nii täiskasvanute kui laste seas.* Vaadatud 12.04.2025, https://www.tai.ee/et/uudised/ulemaailmne-rasvumise-paev-probleem-eestis-suur-nii-taiskasvanute-kui-laste-seas

World Health Organisation. (i.a.). Global Health Observatory. Body mass index (BMI). https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/topic-details/GHO/body-mass-index

Kasutatud artiklid

Adorini, L., Penna, G., Amuchastegui, S., ... Maggi, M. (2007). Inhibition of prostate growth and inflammation by the vitamin D receptor agonist BXL-628 (elocalcitol). *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 103*(3–5), 689–693.https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.12.065

Anglicheau, D., Muthukumar, T., & Suthanthiran, M. (2010). MicroRNAs: Small RNAs With Big Effects. *Transplantation*, *90*(2), 105–112. https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181e913c2

Argente-Arizón, P., Díaz, F., Ros, P., Barrios, V., Tena-Sempere, M., García-Segura, L. M., Argente, J., & Chowen, J. A. (2018). The Hypothalamic Inflammatory/Gliosis Response to Neonatal Overnutrition Is Sex and Age Dependent. *Endocrinology*, *159*(1), 368–387. https://doi.org/10.1210/en.2017-00539

Banks, W. A. (2012). Role of the blood–brain barrier in the evolution of feeding and cognition. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1264*(1), 13–19. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06568.x

Battineni, G., Sagaro, G. G., Chintalapudi, N., Amenta, F., Tomassoni, D., & Tayebati, S. K. (2021). Impact of Obesity-Induced Inflammation on Cardiovascular Diseases (CVD). *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9), 4798. https://doi.org/10.3390/ijms22094798

Berezikov, E., Cuppen, E., & Plasterk, R. H. A. (2006). Approaches to microRNA discovery. *Nature Genetics*, *38*(S6), S2–S7. https://doi.org/10.1038/ng1794

Bird, S. R., & Hawley, J. A. (2017). Update on the effects of physical activity on insulin sensitivity in humans. *BMJ Open Sport & Exercise Medicine*, *2*(1), e000143. https://doi.org/10.1136/bmjsem-2016-000143

Blüher, M. (2019). Obesity: Global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*, *15*(5), 288–298. https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8

Buttitta, M., Iliescu, C., Rousseau, A., & Guerrien, A. (2014). Quality of life in overweight and obese children and adolescents: A literature review. *Quality of Life Research*, *23*(4), 1117–1139. https://doi.org/10.1007/s11136-013-0568-5

Börgeson, E., Boucher, J., & Hagberg, C. E. (2022). Of mice and men: Pinpointing species differences in adipose tissue biology. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *10*, 1003118. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1003118

Cade, C., & Norman, A. W. (1986). Vitamin D_3 Improves Impaired Glucose Tolerance and Insulin Secretion in the Vitamin D-Deficient Rat *in Vivo*. *Endocrinology*, *119*(1), 84–90. https://doi.org/10.1210/endo-119-1-84

Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, *136*(4), 642–655. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035

Chithanathan, K., Jürgenson, M., Ducena, K., Anu Remm, Kask, K., Rebane, A., Tian, L., & Zharkovsky, A. (2024). Elocalcitol mitigates high-fat diet-induced microglial senescence via miR-146a modulation. *Immunity & Ageing*, *21*(1), 82. https://doi.org/10.1186/s12979-024-00485-6

Chithanathan, K., Somelar, K., Jürgenson, M., ... Zharkovsky, A. (2022). Enhanced cognition and neurogenesis in miR-146b deficient mice. *Cells, 11*(13), 2002. https://doi.org/10.3390/cells11132002

Colli, E., Rigatti, P., Montorsi, F., Artibani, W., Petta, S., Mondaini, N., Scarpa, R., Usai, P., Olivieri, L., & Maggi, M. (2006). BXL628, A Novel Vitamin D3 Analog Arrests Prostate Growth in Patients with Benign Prostatic Hyperplasia: A Randomized Clinical Trial. *European Urology*, *49*(1), 82–86. https://doi.org/10.1016/j.eururo.2005.08.014

De Oliveira Otto, M. C., Anderson, C. A. M., Dearborn, J. L., Ferranti, E. P., Mozaffarian, D., Rao, G., Wylie-Rosett, J., Lichtenstein, A. H., & On behalf of the American Heart Association Behavioral Change for Improving Health Factors Committee of the Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health and Council on Epidemiology and Prevention; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Clinical Cardiology; and Stroke Council. (2018). Dietary Diversity: Implications for Obesity Prevention in Adult Populations: A Science Advisory From the American Heart Association. *Circulation*, *138*(11). https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000595

DeLuca, H. F. (2004). Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *80*(6), 1689S-1696S. https://doi.org/10.1093/ajcn/80.6.1689S

Dubertret, L., Wallach, D., Souteyrand, P., Perussel, M., Kalis, B., Meynadier, J., Chevrant-Breton, J., Beylot, C., Bazex, J. A., & Jurgensen, H. J. (1992). Efficacy and safety of calcipotriol (MC 903) ointment in psoriasis vulgaris. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *27*(6), 983–988. https://doi.org/10.1016/0190-9622(92)70299-U

Eglit, T., Rajasalu, T., & Lember, M. (2012). Metabolic syndrome in estonia: Prevalence and associations with insulin resistance. *International Journal of Endocrinology*, *2012*, 951672. https://doi.org/10.1155/2012/951672

Evans, R. M. (1988). The Steroid and Thyroid Hormone Receptor Superfamily. *Science*, *240*(4854), 889–895. https://doi.org/10.1126/science.3283939

Fischer, M., Oberänder, N., & Weimann, A. (2020). Four main barriers to weight loss maintenance? A quantitative analysis of difficulties experienced by obese patients after successful weight reduction. *European Journal of Clinical Nutrition*, *74*(8), 1192–1200. https://doi.org/10.1038/s41430-020-0559-x

Fraulob, J. C., Ogg-Diamantino, R., Fernandes-Santos, C., Aguila, M. B., & Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2010). A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, *46*(3), 212–223. https://doi.org/10.3164/jcbn.09-83

Fu, Y., Gao, C., Sun, X., Zhao, Y., & Zhang, H. (2024). Study on the mechanism of action of Wu Mei Pill in inhibiting rheumatoid arthritis through TLR4-NF-κB pathway. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, *19*(1), 65. https://doi.org/10.1186/s13018-024-04551-z

Gabriely, I., Ma, X. H., Yang, X. M., Atzmon, G., Rajala, M. W., Berg, A. H., Scherer, P., Rossetti, L., & Barzilai, N. (2002). Removal of Visceral Fat Prevents Insulin Resistance and Glucose Intolerance of Aging. *Diabetes*, *51*(10), 2951–2958. https://doi.org/10.2337/diabetes.51.10.2951

Galanakis, C. G., Daskalakis, M., Manios, A., Xyda, A., Karantanas, A. H., & Melissas, J. (2015). Computed Tomography-Based Assessment of Abdominal Adiposity Changes and Their Impact on Metabolic Alterations Following Bariatric Surgery. *World Journal of Surgery*, *39*(2), 417–423. https://doi.org/10.1007/s00268-014-2826-2

Giangregorio, F., Mosconi, E., Debellis, M. G., ... Tung-Chen, Y. (2024). A systematic review of metabolic syndrome: Key correlated pathologies and non-invasive diagnostic approaches. *Journal of Clinical Medicine, 13*(19), 5880. https://doi.org/10.3390/jcm13195880

Goran, M. I., Ball, G. D. C., & Cruz, M. L. (2003). Obesity and Risk of Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease in Children and Adolescents. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *88*(4), 1417–1427. https://doi.org/10.1210/jc.2002-021442

Grundy, S. M. (2005). Point: The Metabolic Syndrome Still Lives. *Clinical Chemistry*, *51*(8), 1352–1354. https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.050989

Grundy, S. M., Cleeman, J. I., Daniels, S. R., ... Costa, F. (2005). Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation, 112*(17), 2735–2752. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.169404

Haddad, J. G., Matsuoka, L. Y., Hollis, B. W., Hu, Y. Z., & Wortsman, J. (1993). Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis. *Journal of Clinical Investigation*, *91*(6), 2552–2555. https://doi.org/10.1172/JCI116492

Hammond, S. M. (2015). An overview of microRNAs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *87*, 3–14. https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.05.001

Hinte, L. C., Castellano-Castillo, D., Ghosh, A., ... Von Meyenn, F. (2024). Adipose tissue retains an epigenetic memory of obesity after weight loss. *Nature, 636*(8042), 457–465. https://doi.org/10.1038/s41586-024-08165-7

Holick, M. F., Binkley, N. C., Bischoff-Ferrari, H. A., Gordon, C. M., Hanley, D. A., Heaney, R. P., Murad, M. H., & Weaver, C. M. (2011). Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *96*(7), 1911–1930. https://doi.org/10.1210/jc.2011-0385

Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, *444*(7121), 860–867. https://doi.org/10.1038/nature05485

Hruby, A., Manson, J. E., Qi, L., Malik, V. S., Rimm, E. B., Sun, Q., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2016). Determinants and Consequences of Obesity. *American Journal of Public Health*, *106*(9), 1656–1662. https://doi.org/10.2105/AJPH.2016.303326

Huang, D., Guo, Y., Li, X., Pan, M., Liu, J., Zhang, W., & Mai, K. (2023). Vitamin D3/VDR inhibits inflammation through NF-κB pathway accompanied by resisting apoptosis and inducing autophagy in abalone Haliotis discus hannai. *Cell Biology and Toxicology*, *39*(3), 885–906. https://doi.org/10.1007/s10565-021-09647-4

Huang, P. L. (2009). A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Disease Models & Mechanisms*, *2*(5–6), 231–237. https://doi.org/10.1242/dmm.001180

Jackson, V. M., Breen, D. M., Fortin, J.-P., Liou, A., Kuzmiski, J. B., Loomis, A. K., Rives, M.-L., Shah, B., & Carpino, P. A. (2015). Latest approaches for the treatment of obesity. *Expert Opinion on Drug Discovery*, *10*(8), 825–839. https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1044966

Jahn, D., Dorbath, D., Schilling, A.-K., ... Geier, A. (2019). Intestinal vitamin D receptor modulates lipid metabolism, adipose tissue inflammation and liver steatosis in obese mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 1865*(6), 1567–1578. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.03.007

Jais, A., & Brüning, J. C. (2017). Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. *Journal of Clinical Investigation*, *127*(1), 24–32. https://doi.org/10.1172/JCI88878

Jones, G. (2008). Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *88*(2), 582S-586S. https://doi.org/10.1093/ajcn/88.2.582S

Jürgenson, M., Chithanathan, K., Orav, A., Jaako, K., Viil, J., Guha, M., Kask, K., & Zharkovsky, A. (2025). Elocalcitol, a fluorinated vitamin D derivative, prevents high-fat diet-induced obesity via SCAP downregulation and miR-146a-associated mechanisms. *Frontiers in Pharmacology*, *15*. https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1505729

Ka, S., Choe, Y. H., Kim, Y.-I., Kim, N., Seo, M., Choi, Y., & Park, J. (2025). The Effect of Exercise Interventions on Sleep Quality and Weight Loss in Individuals with Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Control Trials. *Applied Sciences*, *15*(1), 467. https://doi.org/10.3390/app15010467

Karampela, I., Sakelliou, A., Vallianou, N., Christodoulatos, G.-S., Magkos, F., & Dalamaga, M. (2021). Vitamin D and Obesity: Current Evidence and Controversies. *Current Obesity Reports*, *10*(2), 162–180. https://doi.org/10.1007/s13679-021-00433-1

Kawagoe, F., Mendoza, A., Hayata, Y., ... Kittaka, A. (2021). Discovery of a vitamin D receptor-silent vitamin D derivative that impairs sterol regulatory element-binding protein *in vivo*. *Journal of Medicinal Chemistry, 64*(9), 5689–5709. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c02179

Kerr, J. A., Patton, G. C., Cini, K. I., ... Azzopardi, P. S. (2025). Global, regional, and national prevalence of child and adolescent overweight and obesity, 1990–2021, with forecasts to 2050: A forecasting study for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet, 405*(10481), 785–812. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(25)00397-6

Kim, J.-Y., Van De Wall, E., Laplante, M., ... Scherer, P. E. (2007). Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation, 117*(9), 2621–2637. https://doi.org/10.1172/JCI31021

Klarqvist, M. D. R., Agrawal, S., Diamant, N., Ellinor, P. T., Philippakis, A., Ng, K., Batra, P., & Khera, A. V. (2022). Silhouette images enable estimation of body fat distribution and associated cardiometabolic risk. *Npj Digital Medicine*, *5*(1), 105. https://doi.org/10.1038/s41746-022-00654-1

Krützfeldt, J., & Stoffel, M. (2006). MicroRNAs: A new class of regulatory genes affecting metabolism. *Cell Metabolism*, *4*(1), 9–12. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.05.009

Kucera, O. (2014). Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(26), 8364. https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i26.8364

L Bishop, E., Ismailova, A., Dimeloe, S., Hewison, M., & White, J. H. (2021). Vitamin D and Immune Regulation: Antibacterial, Antiviral, Anti-Inflammatory. *JBMR Plus*, *5*(1), e10405. https://doi.org/10.1002/jbm4.10405

Leyssens, C., Verlinden, L., & Verstuyf, A. (2014). The future of vitamin D analogs. *Frontiers in Physiology*, *5*. https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00122

MacLean, P. S., Wing, R. R., Davidson, T., ... Ryan, D. (2015). NIH working group report: Innovative research to improve maintenance of weight loss. *Obesity, 23*(1), 7–15. https://doi.org/10.1002/oby.20967

Maestro, M. A., Molnár, F., & Carlberg, C. (2019). Vitamin D and Its Synthetic Analogs. *Journal of Medicinal Chemistry*, *62*(15), 6854–6875. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00208

Mansouri, M., Abasi, R., Nasiri, M., Sharifi, F., Vesaly, S., Sadeghi, O., Rahimi, N., & Sharif, N. A. (2018). Association of vitamin D status with metabolic syndrome and its components: A cross-sectional study in a population of high educated Iranian adults. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, *12*(3), 393–398. https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.01.007

Mariani, M., Vigano, P., Gentilini, D., Camisa, B., Caporizzo, E., Di Lucia, P., Monno, A., Candiani, M., Somigliana, E., & Panina-Bordignon, P. (2012). The selective vitamin D receptor agonist, elocalcitol, reduces endometriosis development in a mouse model by inhibiting peritoneal inflammation. *Human Reproduction*, *27*(7), 2010–2019. https://doi.org/10.1093/humrep/des150

Marziou, A., Philouze, C., Couturier, C., Astier, J., Obert, P., Landrier, J.-F., & Riva, C. (2020). Vitamin D Supplementation Improves Adipose Tissue Inflammation and Reduces Hepatic Steatosis in Obese C57BL/6J Mice. *Nutrients*, *12*(2), 342. https://doi.org/10.3390/nu12020342

Mathieu, P., Lemieux, I., & Després, J.-P. (2010). Obesity, Inflammation, and Cardiovascular Risk. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, *87*(4), 407–416. https://doi.org/10.1038/clpt.2009.311

Mayoral, L. P.-C., Andrade, G. M., Mayoral, E. P.-C., ... Perez-Campos, E. (2020). Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. *Indian Journal of Medical Research, 151*(1), 11–21. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1768_17

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., & Janeway, C. A. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, *388*(6640), 394–397. https://doi.org/10.1038/41131

Morigny, P., Boucher, J., Arner, P., & Langin, D. (2021). Lipid and glucose metabolism in white adipocytes: Pathways, dysfunction and therapeutics. *Nature Reviews Endocrinology*, *17*(5), 276–295. https://doi.org/10.1038/s41574-021-00471-8

Morsali, M., Poorolajal, J., Shahbazi, F., Vahidinia, A., & Doosti-Irani, A. (2023). Pharmaceutical Therapies for the Treatment of Obesity: A Network Meta-analysis. *Clinical Therapeutics*, *45*(7), 671–678. https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2023.06.003

Mottillo, S., Filion, K. B., Genest, J., Joseph, L., Pilote, L., Poirier, P., Rinfret, S., Schiffrin, E. L., & Eisenberg, M. J. (2010). The Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk. *Journal of the American College of Cardiology*, *56*(14), 1113–1132. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.05.034

Nagpal, S., Na, S., & Rathnachalam, R. (2005). Noncalcemic Actions of Vitamin D Receptor Ligands. *Endocrine Reviews*, *26*(5), 662–687. https://doi.org/10.1210/er.2004-0002

Nielsen, E. M., Anderson, K. P., Marsden, J., Zhang, J., & Schreiner, A. D. (2022). Nonalcoholic fatty liver disease underdiagnosis in primary care: What are we missing? (2022). *Journal of General Internal Medicine, 37*(10), 2587–2590. https://doi.org/10.1007/s11606-021-07197-3

Padilla, C. J., Ferreyro, F. A., & Arnold, W. D. (2021). Anthropometry as a readily accessible health assessment of older adults. *Experimental Gerontology*, *153*, 111464. https://doi.org/10.1016/j.exger.2021.111464

Paterson, M. R., & Kriegel, A. J. (2017). MiR-146a/b: A family with shared seeds and different roots. *Physiological Genomics*, *49*(4), 243–252. https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00133.2016

Peleg, S., Uskokovic, M., Ahene, A., Vickery, B., & Avnur, Z. (2002). Cellular and Molecular Events Associated with the Bone-Protecting Activity of the Noncalcemic Vitamin D Analog Ro-26-9228 in Osteopenic Rats. *Endocrinology*, *143*(5), 1625–1636. https://doi.org/10.1210/endo.143.5.8777

Penna, G., Amuchastegui, S., Cossetti, C., Aquilano, F., Mariani, R., Sanvito, F., Doglioni, C., & Adorini, L. (2006). Treatment of Experimental Autoimmune Prostatitis in Nonobese Diabetic Mice by the Vitamin D Receptor Agonist Elocalcitol. *The Journal of Immunology*, *177*(12), 8504–8511. https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.12.8504

Price, G. M., Uauy, R., Breeze, E., Bulpitt, C. J., & Fletcher, A. E. (2006). Weight, shape, and mortality risk in older persons: Elevated waist-hip ratio, not high body mass index, is associated with a greater risk of death. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *84*(2), 449–460. https://doi.org/10.1093/ajcn/84.2.449

Pärna, K., & Kender, E. (2021). Trends in obesity among adults in Estonia, 2000–2018. *European Journal of Public Health*, *31*(Supplement_3), ckab164.530. https://doi.org/10.1093/eurpub/ckab164.530

Rahman, M. H., Kim, M.-S., Lee, I.-K., Yu, R., & Suk, K. (2018). Interglial Crosstalk in Obesity-Induced Hypothalamic Inflammation. *Frontiers in Neuroscience*, *12*. https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00939

Roos, J., Dahlhaus, M., Funcke, J.-B., ... Fischer-Posovszky, P. (2021). miR-146a regulates insulin sensitivity via NPR3. *Cellular and Molecular Life Sciences, 78*(6), 2987–3003. https://doi.org/10.1007/s00018-020-03699-1

Roos, J., Enlund, E., Funcke, J.-B., Tews, D., Holzmann, K., Debatin, K.-M., Wabitsch, M., & Fischer-Posovszky, P. (2016). miR-146a-mediated suppression of the inflammatory response in human adipocytes. *Scientific Reports*, *6*(1), 38339. https://doi.org/10.1038/srep38339

Ruban, A., Stoenchev, K., Ashrafian, H., & Teare, J. (2019). Current treatments for obesity. *Clinical Medicine*, *19*(3), 205–212. https://doi.org/10.7861/clinmedicine.19-3-205

Runtsch, M. C., Nelson, M. C., Lee, S.-H., ... O'Connell, R. M. (2019). Anti-inflammatory microRNA-146a protects mice from diet-induced metabolic disease. *PLOS Genetics, 15*(2), e1007970. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007970

Ryu, J.-E., Jo, W., Choi, H.-J., Jang, S., Lee, H.-J., Woo, D.-C., Kim, J. K., Kim, K. W., Yu, E. S., & Son, W.-C. (2015). Evaluation of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in C57BL/6J Mice by Using MRI and Histopathologic Analyses. *Comparative Medicine*, *65*(5), 409–415. Saklayen, M. G. (2018). The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Current Hypertension Reports*, *20*(2), 12. https://doi.org/10.1007/s11906-018-0812-z

Schmitz, L. M., Kinner, A., Althoff, K., Rosenthal, K., & Lütz, S. (2021). Investigation of Vitamin D $_2$ and Vitamin D $_3$ Hydroxylation by *Kutzneria albida*. *ChemBioChem*, *22*(13), 2266–2274. https://doi.org/10.1002/cbic.202100027

Schmitt, E. B., Nahas-Neto, J., Bueloni-Dias, F., Poloni, P. F., Orsatti, C. L., & Petri Nahas, E. A. (2018). Vitamin D deficiency is associated with metabolic syndrome in postmenopausal women. *Maturitas*, *107*, 97–102. https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2017.10.011

Scuteri, A., Laurent, S., Cucca, F., ... Nilsson, P. M. (2015). Metabolic syndrome across Europe: Different clusters of risk factors. *European Journal of Preventive Cardiology, 22*(4), 486–491. https://doi.org/10.1177/2047487314525529

Song, M. J., Kim, K. H., Yoon, J. M., & Kim, J. B. (2006). Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *346*(3), 739–745. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.170

Sørensen, T. I. A. (2025). Forecasting the global obesity epidemic through 2050. *The Lancet*, *405*(10481), 756–757. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(25)00260-0

Stout, M. B., Justice, J. N., Nicklas, B. J., & Kirkland, J. L. (2017). Physiological Aging: Links Among Adipose Tissue Dysfunction, Diabetes, and Frailty. *Physiology*, *32*(1), 9–19. https://doi.org/10.1152/physiol.00012.2016

Sur, G., Floca, E., Kudor-Szabadi, L., Sur, M. L., Sur, D., & Samasca, G. (2014). The relevance of inflammatory markers in metabolic syndrome. *Maedica*, *9*(1), 15–18.
Zhang, M., Ward, J., Strawbridge, R. J., Celis-Morales, C., Pell, J. P., Lyall, D. M., & Ho, F. K. (2024). How do lifestyle factors modify the association between genetic predisposition and obesity-related phenotypes? A 4-way decomposition analysis using UK Biobank. *BMC Medicine*, *22*(1), 230. https://doi.org/10.1186/s12916-024-03436-6

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, *372*(6505), 425–432. https://doi.org/10.1038/372425a0

Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K.-J., & Baltimore, D. (2006). NF-κB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(33), 12481–12486. https://doi.org/10.1073/pnas.0605298103

Tan, C., Chan, K. E., Ng, C. H., ... Muthiah, M. D. (2022). DEXA scan body fat mass distribution in obese and non-obese individuals and risk of NAFLD—Analysis of 10,865 individuals. *Journal of Clinical Medicine, 11*(20), 6205. https://doi.org/10.3390/jcm11206205

The GBD 2015 Obesity Collaborators. (2017). Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *New England Journal of Medicine*, *377*(1), 13–27. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1614362

Ungvari, Z., Fekete, M., Varga, P., Lehoczki, A., Fekete, J. T., Ungvari, A., & Győrffy, B. (2024). Overweight and obesity significantly increase colorectal cancer risk: A meta-analysis of 66 studies revealing a 25–57% elevation in risk. *GeroScience*. https://doi.org/10.1007/s11357-024-01375-x

Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Marino, M. W., & Hotamisligil, G. S. (1997). Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-α function. *Nature*, *389*(6651), 610–614. https://doi.org/10.1038/39335

Vieth, R. (2007). *Vitamin D toxicity, policy, and science*. Journal of Bone and Mineral Research, 22(S2), V64–V68. https://doi.org/10.1359/jbmr.07s221

Wang, Q. A., Tao, C., Gupta, R. K., & Scherer, P. E. (2013). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nature Medicine*, *19*(10), 1338–1344. https://doi.org/10.1038/nm.3324

Wortsman, J., Matsuoka, L. Y., Chen, T. C., Lu, Z., & Holick, M. F. (2000). Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *72*(3), 690–693. https://doi.org/10.1093/ajcn/72.3.690

Xu, P., Vernooy, S. Y., Guo, M., & Hay, B. A. (2003). The Drosophila MicroRNA Mir-14 Suppresses Cell Death and Is Required for Normal Fat Metabolism. *Current Biology*, *13*(9), 790–795. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00250-1

Yi, X., Cai, X., Wang, S., & Xiao, Y. (2020). Mechanisms of impaired pancreatic β-cell function in high-fat diet-induced obese mice: The role of endoplasmic reticulum stress. *Molecular Medicine Reports*. https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11013

Yin, Y., Yu, Z., Xia, M., Luo, X., Lu, X., & Ling, W. (2012). Vitamin D attenuates high fat diet–induced hepatic steatosis in rats by modulating lipid metabolism. *European Journal of Clinical Investigation*, *42*(11), 1189–1196. https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2012.02706.x

LISAD

Lisa 1. Madala rasvasisaldusega dieet (MRS)

LF Control – 21 % protein, 11 kJ% fat

ssniff

Low fat control diet ¦ 24 % casein, 4 % fat

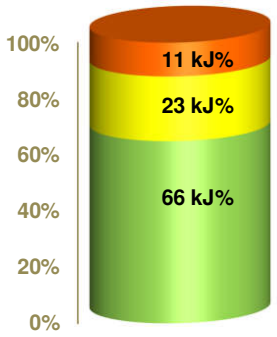
Description

This traditional diet with high protein contents may serve as control diet for many ssniff HF diets. It is characterized by low sugar and fat contents (soybean oil).

The diet is intended for ad libitum feeding. The animals should have free access to fresh water.

Gross Energy (GE)	**18.1**	**MJ/kg**
Metabolizable Energy (ME) [1)]	**15.2**	**MJ/kg**

[1)] *= Physiological fuel value (Atwater); correspond to 3,630 kcal/kg*



Crude Nutrients	**[%]**
Crude protein (N x 6.25)	21.1
Crude fat	4.2
Crude fibre	5.0
Crude ash	5.4
Starch	28.9
Dextrin	19.4
Sugar	11.0
N free extracts	60.4

Minerals	**[%]**
Calcium	0.92
Phosphorus	0.65
Ca / P	1.41 : 1
Sodium	0.20
Magnesium	0.23
Potassium	0.97

Fatty acids	**[%]**
C 12:0	—
C 14:0	0.02
C 16:0	0.50
C 17:0	0.01
C 18:0	0.15
C 20:0	0.02
C 16:1	0.01
C 18:1	1.03
C 18:2	2.11
C 18:3	0.23

Amino acids	**[%]**
Lysine	1.75
Methionine	0.75
Cystine	0.29
Met+Cys	1.04
Threonine	0.93
Tryptophan	0.27
Arginine	0.83
Histidine	0.64
Valine	1.47
Isoleucine	1.19
Leucine	2.10
Phenylalanine	1.10
Phe+Tyr	2.22
Glycine	0.42
Glutamic acid	4.76
Aspartic acid	1.57
Proline	2.43
Serine	1.27
Alanine	0.64

Vitamins	**per kg**	
Vitamin A	15,000	IU
Vitamin D_3	1,500	IU
Vitamin E	150	mg
Vitamin K (as MNB)	20	mg
Thiamine (B_1)	26	mg
Riboflavin (B_2)	16	mg
Pyridoxine (B_6)	16	mg
Cobalamin (B_{12})	30	µg
Nicotinic acid	49	mg
Pantothenic acid	55	mg
Folic acid	16	mg
Biotin	300	µg
Choline	920	mg

Trace elements	**per kg**	
Iron	168	mg
Manganese	98	mg
Zinc	67	mg
Copper	14	mg
Iodine	1.2	mg
Selenium	0.2	mg

Main products

E15000-00	Meal / Powder
E15000-04	10 mm pellets
E15000-047	10 mm pellets, γ-irradiated 25 kGy

Production and Sale
ssniff Spezialdiäten GmbH
Phone: +49-(0)2921-9658-0
Fax: +49-(0)2921-9658-40
E-Mail mail@ssniff.de
www.ssniff.de / www.ssniff.com

Lisa 2. Kõrge rasvasisaldusega dieet (KRS)

LF Control – 21 % protein, 11 kJ% fat

ssniff

Low fat control diet ¦ 24 % casein, 4 % fat

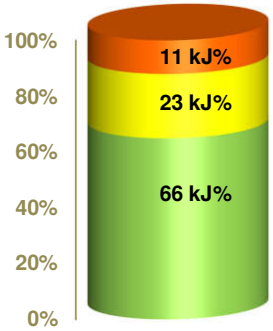
Description

This traditional diet with high protein contents may serve as control diet for many ssniff HF diets. It is characterized by low sugar and fat contents (soybean oil).

The diet is intended for ad libitum feeding. The animals should have free access to fresh water.

Gross Energy (GE)	**18.1**	**MJ/kg**
Metabolizable Energy (ME) [1)]	**15.2**	**MJ/kg**

[1)] *= Physiological fuel value (Atwater); correspond to 3,630 kcal/kg*



Crude Nutrients	**[%]**
Crude protein (N x 6.25)	21.1
Crude fat	4.2
Crude fibre	5.0
Crude ash	5.4
Starch	28.9
Dextrin	19.4
Sugar	11.0
N free extracts	60.4

Minerals	**[%]**
Calcium	0.92
Phosphorus	0.65
Ca / P	1.41 : 1
Sodium	0.20
Magnesium	0.23
Potassium	0.97

Fatty acids	**[%]**
C 12:0	—
C 14:0	0.02
C 16:0	0.50
C 17:0	0.01
C 18:0	0.15
C 20:0	0.02
C 16:1	0.01
C 18:1	1.03
C 18:2	2.11
C 18:3	0.23

Amino acids	**[%]**
Lysine	1.75
Methionine	0.75
Cystine	0.29
Met+Cys	1.04
Threonine	0.93
Tryptophan	0.27
Arginine	0.83
Histidine	0.64
Valine	1.47
Isoleucine	1.19
Leucine	2.10
Phenylalanine	1.10
Phe+Tyr	2.22
Glycine	0.42
Glutamic acid	4.76
Aspartic acid	1.57
Proline	2.43
Serine	1.27
Alanine	0.64

Vitamins	**per kg**	
Vitamin A	15,000	IU
Vitamin D_3	1,500	IU
Vitamin E	150	mg
Vitamin K (as MNB)	20	mg
Thiamine (B_1)	26	mg
Riboflavin (B_2)	16	mg
Pyridoxine (B_6)	16	mg
Cobalamin (B_{12})	30	µg
Nicotinic acid	49	mg
Pantothenic acid	55	mg
Folic acid	16	mg
Biotin	300	µg
Choline	920	mg

Trace elements	**per kg**	
Iron	168	mg
Manganese	98	mg
Zinc	67	mg
Copper	14	mg
Iodine	1.2	mg
Selenium	0.2	mg

Main products

E15000-00 Meal / Powder
E15000-04 10 mm pellets
E15000-047 10 mm pellets, γ-irradiated 25 kGy

Production and Sale
ssniff Spezialdiäten GmbH
Phone: +49-(0)2921-9658-0
Fax: +49-(0)2921-9658-40
E-Mail mail@ssniff.de
www.ssniff.de / www.ssniff.com

Lisa 3. Süstelahuse protokoll

Standardne töökord (SOP)

ELOKALTSITOOLI JA VITAMIIN D SÜSTELAHUSTE VALMISTAMINE JA SÜSTIMINE HIIRTELE INTRAPERITONEAALSELT+ GLÜKOOSITOLERANTSI KATSE SÜSTELAHUS

Farmakoloogia Instituut
Tartu Ülikool
Ravila 19
50411, Tartu

PRG 878 SOP No:1

Koostamise kuupäev:
14.03.2021
Muudetud 16.04.2021 (doos 2x nädalas 30ug/kg)
Muudetud 16.07.2021 (lisatud insuliini lahuse ettevalmistus)

Eesmärk:
Elokaltsitooli ja vehiikli intraperitoneaalne (i.p.) manustamine kaks korda nädalas annuses 30 ug/kg, et hinnata ainete mõju hindamiseks rasvumise tekkele.

Koostanud: Monika Jürgenson

Tööks vajalikud vahendid:

- 0,9 % NaCl lahus, pH=7, autoklaveeritud
- 2 ml eppendorf tuubid
- 200 ul eppendorf tuubid
- 15 ml tuubid (Nunc)
- Kaalud (Kern SE 1-01)
- Ühekordsed süstlad, mahuga 1 ml
- 100 % etanool (≥99.8 % denat, CarlRoth, Saksamaa)
- **ELOCALCITOL** Sigma Prod. No. SML2395-5MG 98% (5 mg klaasviaalis)

Elokaltsitooli stock lahuse valmistamine:

1) Pipeteeri 5 ml 100% etanooli viaali ainele. Sulge kork ja loksuta õrnalt. Saadud stock lahus on kontsentratsiooniga 1 mg/ml
2) Võta 46 tuubi, 200 ul. Markeeri tuubid, kirjutades peale veekindla markeriga „ELOCAL 1 mg/ml“
3) Pipeteeri igasse tuubi 100 ul stock lahust. Aseta tuubid hoidikusse püstises asendis ja aseta hoidik -20 C juurde

Elokaltsitooli süstelahuse valmistamine:

Aine manustatakse annuses 30 ug/kg ja iga 10 g kehakaalu kohta tuleb süstida 100 ul lahust. Süstelahus valmistada enne süstimist EX TEMPORE!

1) Võta 15 ml korgiga tuub, markeeri „Elocal süstelahus“
2) Pipeteeri 10 ml 0.9%-list NaCl lahust
3) Võta -20 °C juurest üks tuub elokaltsitooli stock lahust (markeeritud „Elocal 1 mg/ml“) ja pipeteeri 30 ul stocklahust vehiikli lahusesse
4) Sulge korralikult süstelahuse tuubi kork ja sega ettevaatlikult vältides vahu teket

Vehiikli ehk ravimikandja lahuse valmistamine:

1) Võta 15 ml korgiga tuub, markeeri „Vehiikel“
2) Pipeteeri 10 ml 0.9%-list NaCl lahust.
3) Lisa 30 ul etanooli ja sulge kork

Elokaltsitooli ja vehiikli mõju hindamine rasvumise tekkele

Elokaltsitooli ja vehiiklit manustati intraperitoneaalselt (i.p.) 30 ug/kg ja iga 10 g kehakaalu kohta kaks korda nädalas.
Elokaltsitooli stocklahuse valmistamine 1 mg/ml etanoolis.
Kaaluti loomad ja vastavalt kehakaalule süstiti vastav kogus elokaltsitooli.

Glükoositolerantsi süstelahus

Aine manustatakse annuses 2 g/kg ja iga 10 g kehakaalu kohta tuleb süstida 100 ul lahust. Süstelahus valmistada enne süstimist EX TEMPORE!

D-glükoosi lahuse valmistamine:

1) Võta 15 ml korgiga tuub, markeeri „Glükoos“
2) Kaalu 4 g D-glükoosi
3) Lisa 20 ml füsioloogilist lahust ja sulge kork

Insuliini Stock lahuse valmistamine:

1) Võta 40 ml tuub ja pipeteeri 9,5 ml füsioloogilist lahust.
2) Lisa insuliini alglahust 0,5 ml

Sega lahus korralikult.
Saadud stock lahus sisaldab insuliini 5 TÜ/ml

Insuliini süstelahuse valmistamine:

1) Võta 40 ml tuub ja markeeri „Insuliini süstelahus“
2) Pipeteeri 19.8 ml füsioloogilist lahust
3) Lisa 200 ul insuliini Stock lahust.
4) Saadud lahus sisaldab 0,05 TÜ insuliini ml

Kontroll: 30 g loomale manustati 300 ul süstelahust (0,015 TÜ)
Doos 0,5 TÜ/kg

NB! Lahuste ettevalmistamise ja manustamisega tegeles juhendaja Monika Jürgenson.

Lisa 4. Süstimise üldtabel

Kaalu katseloom ja tabelis oleva kehakaalu järgi süsti vastav kogus elokaltsitooli või vehiikli lahust (glükoositolerantsi katses vastavalt glükoosi lahust) intraperitoneaalselt (i.a.).

Katselooma kehakaal	**Süstimiseks vajalik lahus (ul)**
20 g	200 ul
21 g	210 ul
22 g	220ul
23 g	230 ul
24 g	240 ul
25 g	250 ul
26 g	260 ul
27 g	270 ul
28 g	280 ul
29 g	290 ul
30 g	300 ul
31 g	310 ul
32 g	320 ul
33 g	330 ul
34 g	340 ul
35 g	350 ul
36 g	360 ul
37 g	370 ul
38 g	380 ul
39 g	390 ul
40 g	400 ul

Lisa 5. Postri tutvustus ja välkkõne Tartu Ülikooli arstiteaduskonna aastapäeva teaduskonverentsil 2024

D-vitamiini analoogi elokaltsitooli toime kõrge rasvasisaldusega dieedist põhjustatud rasvumisele ning metaboolsele sündroomile metsiktüüpi ja mikroRNA146a-/- hiirtel

Anete Budrikas [1,2], Monika Jürgenson [3], Aleksander Žarkovski [3] - [1] geenitehnoloogia üliõpilane, [2] TÜ molekulaar- ja rakubioloogia insituut, [3] TÜ bio- ja siirdemeditsiini instituudi farmakoloogia osakond
Juhendaja: Monika Jürgenson, TÜ bio- ja siirdemeditsiini instituudi farmakoloogia osakond

SISSEJUHATUS

Rasvumisest tulenev metaboolne sündroom (MS) on riskitegurite kogum, mis suurendab oluliselt vähi, südamehaiguste ja II tüüpi diabeeti haigestumise riski. [1] Samuti kaasneb MSi avaldumisel lisaks kehamassi tõusule ka triglütseriidide ja kolesterooli suurenenud sisaldus veres, insuliiniresistentsuse avaldumine ning krooniline madalatasemeline süsteemne põletik. D-vitamiini analoog elokaltsitool on D-vitamiini retseptori agonist, millel on tugev põletikuvastane ja D-vitamiinist madalam hüperkaltseemiline toime. Varem on näidatud, et mikroRNA146a (miR146a) surub alla põletikku ja dieedist põhjustatud rasvumist ning reguleerib ainevahetuslikke protsesse. [2] Samas ei ole selge, kas ja kuidas on elokaltsitooli toime mõjutatud miR146a ekspressioonist katseloomadel.

EESMÄRK

Uurimistöö eesmärk oli selgitada, kas elokaltsitooli manustamine mõjutab rasvumisest tuleneva MSi avaldumist metsiktüüpi ja miR146a-/- hiirtel ning hinnata sellega kaasnevaid muutusi katseloomade tervisenäitajates.

MEETODID

Uuringusse võeti 1,5-kuused isased metsiktüüpi (MT) ja miR146a-/- hiired, (n = 10 / rühm). Hiired said vastavalt madala rasvasisaldusega (MRS) ja kõrge rasvasisaldusega sööta (KRS). Loomadele manustati vehiiklit või elokaltsitooli (30 ug/kg 2 korda nädalas) 8 nädala jooksul ja neid kaaluti üks kord nädalas. Katse lõpus teostati katseloomadega glükoositolerantsi katse ning hukkamisjärgselt võeti vereproov ning kaaluti organid.

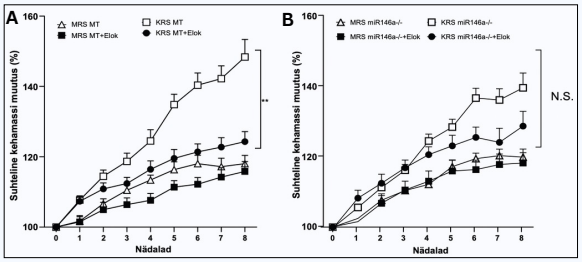
STATISTIKA

Tulemuste statistiliseks analüüsiks kasutati ühe- ja kahesuunalist ANOVA`t, millele järgnes Tukey test. Statistiliselt oluliseks väärtuseks loeti $p < 0.05$.

TULEMUSED

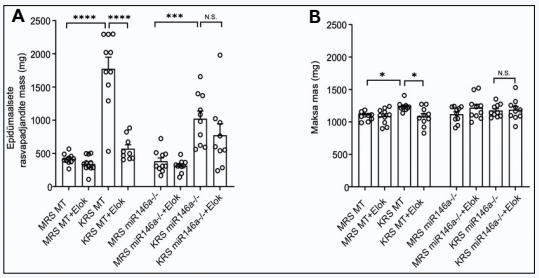
Katse tulemused näitasid, et kõrge rasvasisaldusega sööt kutsus nii metsiktüüpi kui ka miR146a-/- hiirtel esile sarnase kehakaalu tõusu, tõstis oluliselt epidümaalse rasva ja maksa massi ning halvendas glükoosi taluvust (Joonised 1, 2, 3). Elokaltsitooli manustamine metsiktüüpi hiirtele vähendas oluliselt KRS-i poolt indutseeritud kehamassi tõusu ja rasvade kogunemist ning hoidis ära rasvumisest tuleneva maksa kaalu tõusu ja parandas glükoosi taluvust. Selliseid selgeid muutusi miR146a-/- KRS-i ja MRS-i grupi hiirtel ei ilmnenud (Joonis 1, 2, 3). Hüperkaltseemia tuvastamiseks sai määratud katseloomade seerumis kaltsiumi sisaldus. Ilmnes, et elokaltsitooli manustamine ei põhjustanud hüperkaltseemiat (Tabel 1).

Suhteline kehamassi muutus



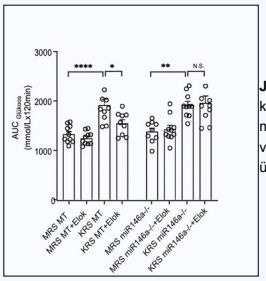
Joonis 1. Metsiktüüpi (A) ja miR146a-/- (B) hiirte kehamassi muutused
Joonis 1A. KRS-i ja elokaltsitooli mõju metsiktüüpi hiirte kehamassi muutustele. ** tähistab vastavalt p<0.01; N.S - olulist muutust ei esinenud; kahesuunaline ANOVA. Katses ilmnes, et elokaltsitooli manustamine metsiktüüpi hiirtele vähendas oluliselt KRS-i poolt indutseeritud kehamassi tõusu.
Joonis 1B. KRS-i ja elokaltsitooli mõju miR146a-/- hiirte kehamassi muutustele. Katses ilmnes, et elokaltsitooli manustamine miR146a-/- KRS grupi ja KRS + elokaltsitooli grupi katseloomadele selgeid muutusi esile ei toonud.

Epidümaalse rasva mass **Maksa mass**



Joonis 2. Katseloomade kaalutud epidümaalse rasva (A) ja maksa (B) mass.
Joonis 2A. Epidümaalse rasva mass. ***, **** tähistavad vastavalt p<0.001; p<0.0001; ühesuunaline ANOVA; n = 10 / rühm.
Joonis 2B. Maksa mass. * tähistab vastavalt p<0.05; ühesuunaline ANOVA; n = 10 / rühm.

Glükoositolerantsi katse



Joonis 3. Katseloomade glükoositolerantsi katse KRS-i tarbimise ja elokaltsitooli manustamise mõjul. *,**, **** tähistavad vastavalt p<0.05; p<0.01; p <0.0001; ühesuunaline ANOVA; n= 10/rühm.

Tabel 1. Kaltsiumi tase (mmol/L) metsiktüüpi (MT) ja puuduliku miR-146a ekspressiooniga hiirte vereseerumis, keda toideti KRS-ga ja raviti elokaltsitooliga.

	Katserühmad							
	MRS MT	MRS MT+Elok	KRS MT	KRS MT+Elok	MRS miR146a-/-	MRS miR146a-/- Elok	KRS miR146a-/-	KRS miR146a-/- +Elok
Serum	1,99±0,04	2,03±0,12	2,35±0,14	2,36±0,05	1,98±0,10	2,10±0,04	2,31±0,08	2,28±0,07

Märkus: Loomade arv n= 7-8. Esitatud on iga katsegrupi aritmeetiline keskmine ja standardviga (+-SEM).

JÄRELDUSED JA ARUTELU

Uurimistöö käigus ilmnes, et elokaltsitooli manustamine metsiktüüpi hiirtele vähendas oluliset KRS-i poolt indutseeritud kehamassi tõusu ja parandas glükoosi taluvust, takistades seega rasvumisest tuleneva metaboolse sündroomi teket hiirtel. Kuna miR146a-/- hiirtel selliseid muutusi elokaltsitooli toimel ei ilmnenud, siis võib arvata, et tema mõju rasvumisele on tõenäoliselt seotud miR146a ekspressiooniga.

GRANT PRG878
Eesti Teadusagentuur
Estonian Research Council

1.World Health Organization: Obesity and overweight. (2024). Kasutatud 03.10.2024, https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight
2.Runtsch, M. C., Nelson, M. C., Lee, S. H., Voth, W., Alexander, M., Hu, R., Wallace, J., Petersen, C., Panic, V., Villanueva, C. J., Evason, K. J., Bauer, K. M., Mosbruger, T., Boudina, S., Bronner, M., Round, J. L., Drummond, M. J., & O'Connell, R. M. (2019). Anti-inflammatory microRNA-146a protects mice from diet-induced metabolic disease. PLoS genetics, 15(2), e1007970. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007970

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Anete Budrikas,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose,

   mille juhendaja(d) on Monika Jürgenson ja Kristina Mäemets-Allas,

   reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;

2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;

3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;

4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Anete Budrikas
26.05.2025