

# Utjecaj nadomjesne prehrane višestruko nezasićenim masnim kiselinama na masnokiselinski sastav fosfolipida, stupanj oštećenja i izražaj VEGF, NF-κB i SATB1 u bubregu dijabetičnih štakora

---

**Vitlov Uljević, Marija**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2023**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:797800>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-22**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**MARIJA VITLOV ULJEVIĆ**

**UTJECAJ NADOMJESNE PREHRANE VIŠESTRUKO NEZASIĆENIM  
MASNIM KISELINAMA NA MASNOKISELINSKI SASTAV  
FOSFOLIPIDA, STUPANJ OŠTEĆENJA I IZRAŽAJ VEGF, NF-KB I  
SATB1 U BUBREGU DIJABETIČNIH ŠTAKORA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Split, 2023.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**MARIJA VITLOV ULJEVIĆ**

**UTJECAJ NADOMJESNE PREHRANE VIŠESTRUKO NEZASIĆENIM  
MASNIM KISELINAMA NA MASNOKISELINSKI SASTAV  
FOSFOLIPIDA, STUPANJ OŠTEĆENJA I IZRAŽAJ VEGF, NF-KB I  
SATB1 U BUBREGU DIJABETIČNIH ŠTAKORA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Akadska godina:**

**2022./2023.**

**Mentor:**

**izv. prof. dr. sc. Natalija Filipović**

**Split, 2023.**

Rad je izrađen u Laboratoriju za neurokardiologiju Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Voditeljica rada: izv. prof. dr. sc. Natalija Filipović

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Bubrež .....	3
1.1.1 Građa bubrež .....	3
1.1.2 Histologija bubrež .....	5
1.1.3 Funkcije bubrež .....	6
1.2. Šećerna bolest.....	8
1.2.1 Šećerna bolest tipa 1.....	9
1.2.2 Šećerna bolest tipa 2.....	10
1.2.3 Komplikacije šećerne bolesti .....	10
1.3. Višestruko nezasićene masne kiseline.....	12
1.3.1 Klasifikacija višestruko nezasićenih masnih kiselina .....	12
1.3.2 Biološki učinci višestruko nezasićenih masnih kiselina .....	13
1.3.3 Metabolizam višestruko nezasićenih masnih kiselina.....	15
2. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA .....	19
3. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	21
4. METODE ISTRAŽIVANJA.....	23
4.1. Mjerenje stupnja lipidne peroksidacije.....	24
4.2. Ekstrakcija lipida i kvantifikacija sastava fosfolipida u tkivu bubrež.....	25
4.3. Western blot protokol .....	25
4.4. Histologija i imunohistokemija .....	26
4.5. Priprema tkiva za transmisijsku elektronsku mikroskopiju .....	28
4.6. Prikupljanje i analiza podataka.....	28
4.7. Statistički postupci .....	29
5. REZULTATI.....	30
5.1. Razina glukoze u krvi i oksidacijski status u plazmi.....	31
5.2. Masnokiselinski sastav fosfolipida u tkivu bubrež.....	31
5.3. Utjecaj šećerne bolesti tipa 1 i suplementacije višestruko nezasićenim masnim kiselinama na distalne kanaliće bubrež štakora.....	35
5.3.1 Histološka bojenja .....	35
5.3.2 Ultrastruktura stanica distalnih kanalića.....	38
5.3.3 Izražaj nuklearnog čimbenika kappa B (NF-kB) .....	40

5.3.4 Izražaj proteina koji organizira kromatin / globalnog transkripcijskog regulatora (SATB1).....	42
5.3.5 Bojenje perjodnom kiselinom i Shiffovom reagensom (Periodic acid–Shiff - PAS) .....	45
5.4. Utjecaj šećerne bolesti tipa 1 i suplementacije višestruko nezasićenim masnim kiselinama na proksimalne kanaliće bubrega štakora .....	47
5.4.1 Ektopično nakupljanje lipida u proksimalnim kanalićima dijabetičnih štakora	47
5.4.2 Utjecaj šećerne bolesti tipa 1 i suplementacije višestruko nezasićenim masnim kiselinama na izražaj čimbenika rasta vaskularnog endotela u stanicama proksimalnih kanalića .....	49
5.4.3 Transmisijska elektronska mikroskopija bubrega obojenih na čimbenik rasta vaskularnog endotela (VEGF) imunogold tehnikom.....	52
6. RASPRAVA.....	55
7. ZAKLJUČCI .....	61
8. SAŽETAK.....	63
9. SUMMARY .....	66
10. LITERATURA.....	69
11. ŽIVOTOPIS .....	84

## ZAHVALA

*Veliko hvala mentorici izv. prof. dr. sc. Nataliji Filipović na usmjeravanju, vođenju i pomoći u mom znanstvenom radu. Hvala na nesebičnom prenošenju znanja, strpljenju u učenju, a nadasve na razvoju moje ljubavi prema znanosti. Odgovornost i vođenje vlastitim primjerom u radu dali su mi dodatan poticaj.*

*Od srca zahvaljujem prof. dr. sc. Katarini Vukojević na ukazanoj prilici, entuzijazmu, velikoj radnoj energiji i kontinuiranom bodrenju. Plemenita borba i angažman za znanost ohrabrenje su svakom pojedincu u zajednici.*

*Veliko hvala gđi Asiji Miletić na poticanju i praćenju mog rada u znanosti, prof. dr. sc. Mirni Saraga-Babić i svim ostalim kolegama Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju na stvaranju produktivne i kvalitetne radne atmosfere.*

*Hvala mojoj obitelji na strpljenju, ohrabrenju i podršci u svim mojim odlukama.*

*“Sve mogu u Onome koji me jača!” Fil 4,11-13*

## POPIS OZNAKA I KRATICA

<b>A1C</b>	glikirani hemoglobin - tromjesečni prosjek vrijednosti šećera u krvi (engl. <i>glycated hemoglobin</i> )
<b>AA</b>	arahidonska kiselina (engl. <i>arachidonic acid</i> )
<b>ADA</b>	Američko dijabetičko društvo (engl. <i>American Diabetes Association</i> )
<b>ADH</b>	antidiuretski hormon (engl. <i>antidiuretic hormone</i> )
<b>AGE</b>	krajnji proizvodi glikacije (engl. <i>advanced glycation end products</i> )
<b>AHA</b>	Američko udruženje za srce (engl. <i>American Heart Association</i> )
<b>ALA</b>	alfa linoleinska kiselina (engl. <i>alpha linolenic acid</i> )
<b>ATP</b>	adenozin trifosfat (engl. <i>adenosine triphosphate</i> )
<b>BHT</b>	butilirani hidroksitoluen (engl. <i>butylated hydroxytoluene</i> )
<b>CAD</b>	koronarna arterijska bolest srca (engl. <i>coronary artery disease</i> )
<b>CRP</b>	C-reaktivni protein (engl. <i>C-reactive protein</i> )
<b>DAPI</b>	4', 6-diamidin-2-fenilindol (engl. <i>4', 6-diamidino-2- phenylindole</i> )
<b>DHA</b>	dokozaheksaenoična kiselina (engl. <i>docosahexaenoic acid</i> )
<b>DM</b>	šećerna bolest (engl. <i>diabetes mellitus</i> )
<b>DM1</b>	šećerna bolest tipa 1 (engl. <i>diabetes mellitus type I</i> ili <i>insulin-dependent diabetes mellitus</i> , IDDM)
<b>DM2</b>	šećerna bolest tipa 2 (engl. <i>diabetes mellitus type II</i> ili <i>non- insulin-dependent diabetes mellitus</i> , NIDDM)
<b>DN</b>	dijabetička nefropatija (engl. <i>diabetic nephropathy</i> )
<b>DTC</b>	stanice distalnih kanalića (engl. <i>distal tubular cells</i> )
<b>EFSA</b>	Europsko udruženje za sigurnost hrane (engl. <i>European Food Safety Authority</i> )



<b>EPA</b>	eikozapentaenoična kiselina (engl. <i>eicosapentaenoic acid</i> )
<b>GAD</b>	dekarboksilaza glutaminske kiseline (engl. <i>glutamic acid decarboxylase</i> )
<b>GDM</b>	trudnička (gestacijska) šećerna bolest (engl. <i>gestation diabetes mellitus</i> )
<b>GUK</b>	glukoza u krvi natašte
<b>HPLC</b>	tekućinska kromatografija pod visokim tlakom (engl. <i>high-pressure liquid chromatography</i> )
<b>ICA</b>	protutijela na Langerhansove otočice (engl. <i>islet cell autoantigen</i> )
<b>IL-6</b>	interleukin-6
<b>ISSFAL</b>	Međunarodno društvo za proučavanje masnih kiselina i lipida (engl. <i>International Society for the Study of Fatty acids and Lipids</i> )
<b>JGA</b>	jukstaglomerularni aparat (engl. <i>juxtaglomerular apparatus</i> )
<b>LA</b>	linolna kiselina (engl. <i>linoleic acid</i> )
<b>LC - PUFA</b>	dugolančane polinezasićene masne kiseline (engl. <i>long chain polyunsaturated fatty acids</i> )
<b>LD</b>	lipidne kapljice (engl. <i>lipid droplets</i> )
<b>MDA</b>	malonaldehid
<b>MODY</b>	šećerna bolest koja se javlja u mlađoj dobi kod odraslih (engl. <i>maturity onset diabetes of the young</i> )
<b>MUFA</b>	mononezasićene masne kiseline (engl. <i>monounsaturated fatty acids</i> )
<b>NF-κB</b>	jezgrin čimbenik κB (engl. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> )
<b>NL</b>	neutralni lipidi (engl. <i>neutral lipids</i> )
<b>N-3 PUFA</b>	omega-3 višestruko nezasićene masne kiseline
<b>N-6 PUFA</b>	omega-6 višestruko nezasićene masne kiseline

<b>OGTT</b>	test oralne podnošljivosti glukoze (engl. <i>oral glucose tolerance test</i> )
<b>PAS</b>	bojenje perjodnom kiselinom i Shiffovim reagensom - metoda bojenja koja se koristi za otkrivanje polisaharida kao što je glikogen (engl. <i>Periodic acid-Schiff</i> )
<b>PBS</b>	fiziološka otopina u fosfatnom puferu (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
<b>PTC</b>	stanice proksimalnih kanalića (engl. <i>proximal tubular cells</i> )
<b>PUFA</b>	višestruko nezasićene masne kiseline (engl. <i>polyunsaturated fatty acids</i> )
<b>RAAS</b>	sustav renin-angiotenzin-aldosteron (engl. <i>renin-angiotensin-aldosteron system</i> )
<b>SATB1</b>	protein koji organizira kromatin i globalni transkripcijski regulator (engl. <i>special AT-rich sequence-binding protein-1</i> )
<b>SCF</b>	Europski znanstveni odbor za hranu (engl. <i>Scientific Committee on Food, Commission of the European Communities</i> )
<b>SC - PUFA</b>	kratkolančane polinezasićene masne kiseline (engl. <i>short chain PUFA</i> )
<b>SFA</b>	zasićene masne kiseline (engl. <i>saturated fatty acids</i> )
<b>SREBP1</b>	Sterol regulirajući element-vežući protein 1 (engl. <i>sterol regulatory element-binding protein 1</i> )
<b>STZ</b>	streptozotocin (engl. <i>streptozotocin</i> )
<b>SZO</b>	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>WHO - World Health Organisation</i> )
<b>TEM</b>	transmisijska elektronska mikroskopija (engl. <i>transmission electron microscopy</i> )
<b>TL</b>	ukupni lipidi (engl. <i>total lipids</i> )
<b>VEGF</b>	čimbenik rasta vaskularnog endotela (engl. <i>Vascular endothelial growth factor</i> )

**WHO**

Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*).

## **1. UVOD**

Unatoč velikim ulaganjima u liječenje, prevalencija šećerne bolesti (engl. *Diabetes mellitus*, DM) i dalje raste te bilježi najveći porast u zemljama u razvoju (1). Potreba za dodatnim istraživanjima i boljim razumijevanjem patofiziologije DM-a dodatno je rasla u posljednje dvije godine zbog činjenice, da je kroz dinamiku novih oboljenja, DM dokazan kao čimbenik rizika u razvoju težeg i dužeg oblika bolesti Covid 19 te u razvoju post-covid komplikacija (2, 3). Ipak, značajno su bolje opisane makro- i mikrovaskularne komplikacije same bolesti. Jedna od najčešćih i najozbiljnijih komplikacija šećerne bolesti tipa 1 i 2 (DM1 i DM2) je dijabetička nefropatija (DN), koja ujedno predstavlja i vodeći uzrok zatajenja bubrega (4, 5).

Razvoj i progresija DN karakterizirani su ranim strukturnim i funkcionalnim promjenama koje uključuju hipertrofiju bubrega i glomerularnu hiperfiltraciju (6). Posljedica je oštećenje glomerularne filtracijske membrane, koja je do nedavno bila primarni fokus istraživanja DN. Novija istraživanja ključnog terapijskog cilja dijabetičke bolesti bubrega u fokus stavljaju proksimalni kanalić kao glavni pokretač i polazišnu točku u patofiziologiji DN (7). Iz tog razloga, upravo su proksimalni kanalić i uloga čimbenika rasta vaskularnog endotela (VEGF, engl. *vascular endothelial growth factor*), stavljeni u fokus našeg prethodnog istraživanja (8). Poznato je da je kod oštećenja bubrega epitel distalnog kanalića bubrega, u usporedbi s epitelom proksimalnog kanalića bubrega, otporniji na proces apoptoze, što se manifestira izlučivanjem niza reparativnih citokina i čimbenika rasta. Povoljan učinak citokina i čimbenika rasta koje izlučuje epitel distalnog kanalića odražava se i na ishemični epitel proksimalnog kanalića koji ih u uvjetima ishemije ne može sintetizirati, iako izražava receptore za iste (9). Ipak, do sada nisu istraživani pojavnost, patofiziološke promjene i temeljni mehanizmi oštećenja stanica distalnih kanalića (DTC, engl. *distal tubular cells*) u ranoj fazi DN, što bi također moglo znatno pomoći boljem razumijevanju same bolesti, a što je i predmet ovog rada.

Tijekom posljednjih godina povećan je interes za višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA; engl. *polyunsaturated fatty acids*) zbog nutritivne vrijednosti i potencijalnih zdravstvenih dobiti njihovog unošenja u organizam. Istraživanja pokazuju da su brojna patološka stanja i promjene u tkivima povezane s promjenom udjela PUFA u tkivima (10-12). Osim brojnih zaštitnih učinaka koji su dugolančane n-3 PUFA pokazale u kardiovaskularnom sustavu (13-16), u epidemiološkim studijama DM1 i DM2 (17-18), kao i u eksperimentalnim modelima DM-a (19, 20) zabilježeni su i renoprotektivni učinci n-3 PUFA. Dosad zabilježeni korisni učinci n-3 PUFA u bubrezima uključuju prevenciju albuminurije, tubulointersticijske fibroze, glomeruloskleroze i upale povezane s dugotrajnom šećernom bolešću (21). Poznato je

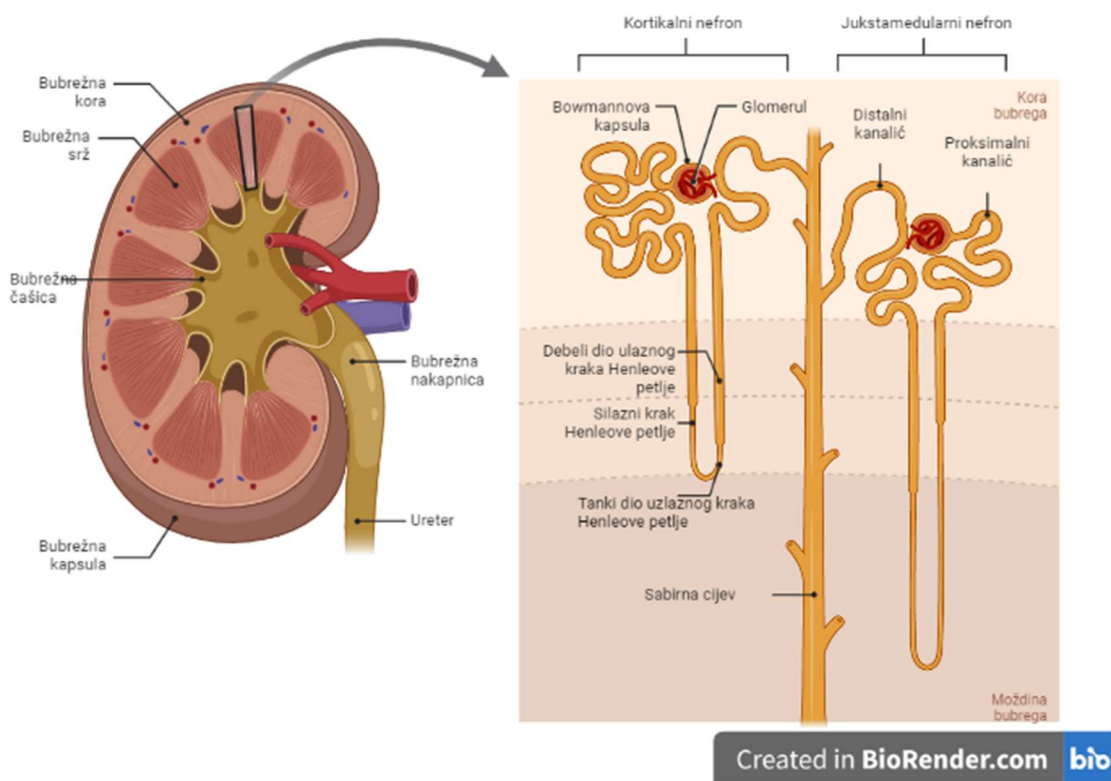
da položaj dvostruke veze u PUFA određuje njezine učinke na upalna stanja. Općenito, medijatori nastali od n-3 PUFA imaju protuupalno djelovanje; dok su oni nastali od n-6 PUFA proupalni (22). Učinci različitih omjera n-6/n-3 PUFA u prehrani na sastav bubrežnih fosfolipida i patološke promjene uzrokovane šećernom bolešću nisu do sada istraženi.

Uloga VEGF-a u bubrežnoj bolesti intenzivno je istraživana. Promjene u izražaju VEGF-a pronađene su u različitim studijama korištenjem eksperimentalnih modela DM-a, u kojima je upravo neprimjerena proizvodnja VEGF-a istaknuta kao patološka poveznica između hiperglikemije i rane bubrežne disfunkcije (23, 24). Naime, utvrđeno je da hiperglikemija aktivira renin-angiotenzin-aldosteronski (RAAS) sustav, koji u stanicama proksimalnih kanalića (PTC, engl. *proximal tubular cells*) pokreće stimulaciju sinteze VEGF-a (25, 26). Terapeutski potencijal VEGF-a u bolesti bubrega pripisuje se njegovoj sposobnosti da potiče preživljavanje endotelnih stanica i održava zdravu vaskulaturu (27). U našem prethodnom istraživanju (8) u modelu DM-a tipa 2, tijekom kronične hiperglikemije, pronašli smo dinamičku preraspodjelu VEGF-a u PTC. Otkrili smo prisutnost VEGF u vezikularnom aparatu PTC normalnog bubrega štakora i njegovu prividnu translokaciju na apikalnu membranu PTC-a u bubrežnom tkivu oštećenom saharozom. Ta otkrića dala su nam novi uvid u promet VEGF-a putem bubrega i pokrenula naše novo istraživanje u kojem smo istražili učinak prehrane s različitim omjerima n-6/n-3 PUFA na mehanizam endocitoze VEGF-a kod dijabetičnih štakora. Nadalje, naša prethodna istraživanja ukazuju na ulogu SATB1 (engl. *special AT-rich sequence-binding protein-1*) u patofiziologiji DN (28), te da bi upravo SATB1 mogao biti novi biljeg i kod oštećenja DTC. Uz navedene čimbenike, značajnu ulogu ima jezgrin čimbenik kapa B (NF- $\kappa$ B engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), proteinski kompleks koji kontrolira preživljenje stanica, a osim u upali i imunitetu, smatra se potencijalnim targetom u liječenju vaskularnih komplikacija DM (29).

## **1.1 Bubrež**

### **1.1.1 Građa bubrega**

Bubrež (lat. *ren*, grč. *nephros*) je parni organ, crvenkastosmeđe boje, oblika zrna graha (30). Smješten je retroperitonealno, između 12. prsnog i 3. slabinskog kralješka. Bubrezi su jedan prema drugomu okrenuti konkavnom stranom na kojoj se nalazi bubrežni hilus, mali uvučeni otvor kroz koji ulaze arterije, a izlaze mokraćovod (lat. *ureter*) i vene. Zbog položaja jetre u desnom hipohondriju, desni bubrež je uvijek niže položen (30, 31). Primarna funkcija bubrega je reguliranje ravnoteže tekućine i elektrolita te kiselinsko-bazne ravnoteže kako bi se stvorilo stabilno okruženje za metabolizam tkiva i stanica (32).



**Slika 1. Presjek bubrega i građa nefrona (kortikalni i jukstamedularni nefron).** Izrađeno u programu Biorender.

U bubrežnom parenhimu razlikujemo dva dijela: srž i koru. Bubrežnu srž (lat. *medulla renalis*) čini 10 do 18 svijetlih ispruganih bubrežnih piramida (lat. *pyramides renales*) (33). Na vrhu piramida nalazi se *papilla renalis* s mnogo malih otvora, u kojima se otvaraju izvodni bubrežni kanalići piramide. Papile su obavijene bubrežnim vrčevima (lat. *calices renales*) koji se slijevaju u bubrežnu nakapnicu (lat. *pelvis renalis*), a koja prelazi u mokraćovod. Piramida s pripadajućom kortikalnom tvari oko nje tvori bubrežni režanj (lat. *lobus renalis*). Bubrežna srž okružena je bubrežnom korom (lat. *cortex renalis*) koja među piramide šalje izdanke (lat. *columnae renales*). Stvaranje urina započinje u bubrežnoj kori koja je zrnate strukture, a u kojoj su smješteni glomeruli s Bowmanovim čahurama, proksimalni i distalni dio kanalića, te početni dijelovi sabirnih kanalića (32, 34) (Sl. 1).

Bubrežni parenhim obavijen je vezivnom ovojnicom (lat. *capsula fibrosa*), oko koje se nalazi sloj masnog tkiva (lat. *capsula adiposa*) koji održava stalnu toplinu i štiti bubreg od mehaničkog oštećenja. Sloj masnog tkiva obavija bubrežna ovojnica od subperitonealnog vezivnog tkiva (lat. *fascia renalis*) (30).

### 1.1.2 Histologija bubrega

Glavna morfološka i funkcionalna jedinica bubrega je nefron. Svaki bubreg čovjeka ima 1 do 4 milijuna nefrona, koji su funkcionalno povezani s krvnim žilama (36). Ovisno o položaju, nefroni se mogu podijeliti na kortikalne i jukstamedularne, koji su bliži meduli bubrega i imaju duge Henleove petlje (36). Nefron je sastavljen od bubrežnog tjelešca, proksimalnog zavijenog kanalića, Henleove petlje te distalnog zavijenog kanalića koji se ulijeva u sabirni kanalić (Sl. 1). Bubrežno ili Malpighijevo tjelešće čine Bowmanova čahura dvostruke stijenke koja obavlja glomerul sastavljen od mreže kapilara, promjera oko 200  $\mu\text{m}$ . U kapilare glomerula krv ulazi aferentnom arteriolom, a iz njih izlazi eferentnom arteriolom (34). Na bubrežnom tjelešću razlikujemo vaskularni pol, mjesto ulaska aferentne i izlaska eferentne arteriole, i urinarni pol, mjesto izlaska proksimalnoga zavijenog kanalića. Kapilarno klupko okruženo je unutrašnjim (visceralnim) listom Bowmanove čahure koji okružuje vanjski (parijetalni) list. Između dvaju listova nalazi se interkapsularni prostor u koji se filtrira glomerularni filtrat. Parijetalni list čahure čini jednoslojni pločasti epitel, a visceralni list čine epitelne stanice - podociti, koje se naslanjaju na glomerularnu membranu na kojoj se elektronskim mikroskopom razlikuje središnji, elektronski gusti sloj (lat. *lamina densa*) i sa svake strane elektronski svijetli sloj (lat. *lamina rara*) (34). Glomerularna filtracijska membrana sastavljena je od stanica podocita, endotela fenestriranih kapilara (kapilara s otvorima - fenestrama) te bazalne membrane debljine 200-400 nm koja se nalazi između njih i predstavlja glavnu barijeru albuminu (35).

Iznad vaskularnog pola bubrežnog tjelešca nalazi se jukstaglomerularni aparat (JGA, engl. *juxtaglomerular apparatus*), endokrini mikroorgan koji regulira funkciju nefrona, a čine ga aferentna i eferentna arteriola, ekstraglomerularne mezangijske stanice (između dvije arteriole) i makula densa - specijalizirana grupa stanica početnog dijela distalnog kanalića koja prijanja uz vaskularni pol glomerula istog nefrona. Jukstaglomerularne stanice imaju citoplazmu ispunjenu sekretornim zrcima i izlučuju enzim renin, čime sudjeluju u regulaciji krvnog tlaka (37).

Bubrežni kanalić čine tri dijela: proksimalni kanalić, Henleova petlja i distalni kanalić. Proksimalni zavijeni kanalić počinje na mokraćnom polu glomerula, duži je od distalnog kanalića te na histološkom rezu korteksa čini najveći dio parenhimske komponente. Građen je od niskog cilindričnog ili kubičnog epitela, a na luminalnim plohama kubičnih stanica nalaze se brojni mikrovili koji čine četkastu prevlaku kojom se povećava učinkovitost reapsorpcije. U proksimalnom kanaliću odvija se reapsorpcija 60% glomerularnog filtrata. Henleova petlja, (lat. *ansa nephroni*), nastavlja se na proksimalni kanalić te ima važnu ulogu u koncentriranju



mokraće. Henleova petlja izgleda kao slovo „U“ te je njezin tanki dio silaznog kraka potpuno propustan za vodu za razliku od uzlaznog kraka koji je nepropustan. Debeli uzlazni krak Henleove petlje ulazi u koru, nakon kratkog toka postaje zavijen i postaje distalni zavijeni kanalić. Distalni zavijeni kanalić obložen je jednoslojnim kubičnim epitelom te, za razliku od od proksimalnog kanalića, nema četkastu prevlaku. Distalni zavijeni kanalići u kori bubrega izljevaju se u sabirne kanaliće koji se u svom toku udružuju u veće sabirne cijevi i spuštaju do vrška papila, gdje završavaju kao Bellinijevi papilarni kanali. Sabirni kanali u srži imaju glavnu ulogu u koncentriranju mokraće (37).

### 1.1.3 Funkcije bubrega

Bubrezi su organi s intenzivnim funkcionalnim opterećenjem. Svake minute renalni kanalići filtriraju 125 ml tekućine (38). Oni su glavni organ izlučivanja i uklanjanja otpadnih metaboličkih i stranih tvari. Bubrezi reguliraju ravnotežu vode i volumena krvi, ekstra- i intracelularne tekućine promjenom volumena vode koja se izlučuje urinom (održavaju stalan volumen krvi i sadržaj elektrolita). U bubrežima se također obavlja osmoregulacija - kontrola osmolarnosti, kao i ionska regulacija - kontrola koncentracije pojedinih iona u tjelesnim tekućinama.

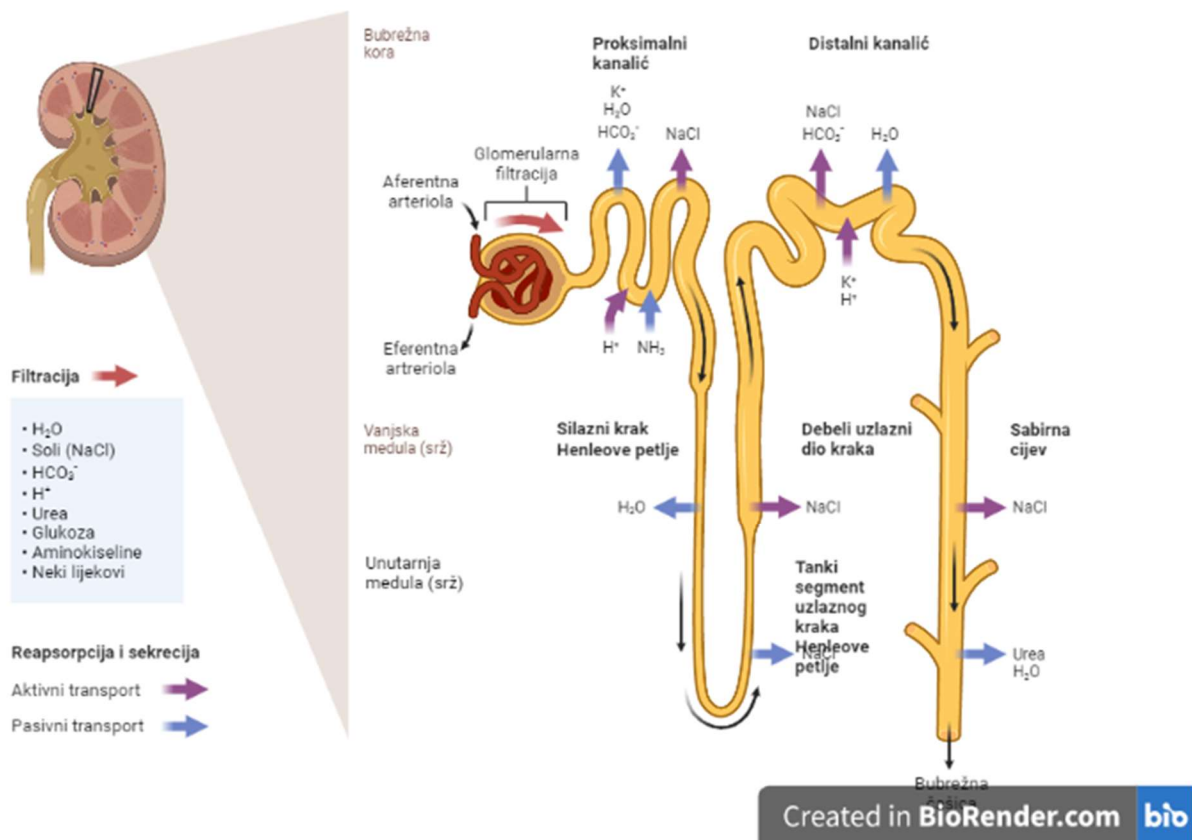
Regulacija acidobazne ravnoteže postiže se izlučivanjem vodikovih iona, nehlapljivih kiselina i baza, a regulacija arterijskog krvnog tlaka putem unutarnjeg lučenja renina, supstanci depresorskog djelovanja te izlučivanjem natrija i vode. Osim izlučivanjem renina, endokrina funkcija bubrega utječe na opskrbu krvlju i stvaranje krvnih stanica izlučivanjem hormona eritropoetina. Bubrezi su važni za regulaciju metabolizma kalcija i fosfata, budući da se u njima zbiva ključni korak aktivacije vitamin D, pri čemu nastaje 1,25 - dihidroksikolekalciferol. Uz egzokrinu i endokrinu, bubrezi imaju i metaboličku funkciju te sudjeluju u metabolizmu proteina, lipida i ugljikohidrata. Rad bubrega također je nadziran hormonima; antidiuretskim hormonom (ADH, engl. *antidiuretic hormone*), koji stimulira reapsorpciju vode i tako kontrolira količinu vode u krvi, odnosno količinu vode koja se izlučuje putem bubrega, i aldosteronom (kora nadbubrežne žlijezde), koji regulira reapsorpciju iona natrija i kalija (39).

Stvaranje urina započinje u Malpighijevom tjelešcu u kojem se pod djelovanjem krvnog tlaka krvna plazma filtrira najprije kroz stijenke kapilara, a nakon toga kroz bazalnu membranu te kroz unutarnji list Bowmanove čahure. Glomerularni filtrat zaostaje u interkapsularnom prostoru, a profiltrirana krv eferentnom arteriolom napušta glomerul. Molekule s masom višom od 200 000 zadržavaju se u plazmi, dok one s masom nižom od 10 000 prolaze kroz sustav filtriranja. Primjerice, albumin iz seruma s molekularnom masom oko 68 000 ne može proći

glomerularnu filtracijsku membranu, dok pročišćeni preparati albumina iz jajeta s molekularnom težinom oko 40 000 prolaze membranu. Možemo zaključiti da svojstva čestica imaju određenu ulogu u određivanju sposobnosti prolaza tvari kroz glomerularnu filtracijsku membranu (40).

Ultrafiltrat krvi koji nastaje u početnom dijelu nefrona čini primarni urin. U jednom danu bubrezi proizvedu oko 180 l primarnog urina koji, za razliku od krvi, ima malu količinu bjelančevina i nema staničnih elemenata. U proksimalnom kanaliću dolazi do reapsorbiranja vode i drugih korisnih tvari: glukoze, hormona, vitamina, enzima, neorganskih soli, bjelančevina i aminokiselina, koje se potom vraćaju u peritubularne kapilare. Nakon toga, u Henleovoj petlji, sljedećem dijelu bubrežnog kanalića, izlučivanjem natrija u uzlaznom dijelu petlje stvara se osmotski gradijent u srži, koji je neophodan za koncentriranje urina jer omogućuje izlazak vode iz tankog silaznog kraka petlje. Iz Henleove petlje tekućina dospijeva u distalni kanalić u kojem se, kako bi nefron zadržao potrebne tvari, a izlučio one štetne, odvija daljnja reapsorpcija vode i elektrolita, kao i sekrecija iona. Nakon toga tekućina ulazi u sabirne cjevčice, koje prelaze u sve šire sabirne cijevi (Sl. 2). Hipertonični urin potom dospijeva u bubrežnu zdjelicu, mokraćovod i mokraćni mjehur te se izlučuje iz tijela (30, 37).

Distalni kanalići, iako kratke duljine, imaju ključnu ulogu u održavanju homeostatske ravnoteže natrija, kalija, kalcija i magnezija. DTC imaju jedinstvenu morfologiju koja odgovara njihovoj vrlo aktivnoj fiziologiji s jezgrama smještenima na apikalnoj strani stanice i citosolom na bazalnom aspektu stanica s puno mitohondrija. DTC su jedne od mitohondrijima najbogatijih stanica u bubregu, upravo zbog procesa koji zahtijevaju znatnu potrošnju ATP-a i aktivan transport elektrolita (41).



Slika 2. Stvaranje mokraće u nefronu. Izrađeno u programu Biorender.

## 1.2 Šećerna bolest

Šećerna bolest je jedan od vodećih javnozdravstvenih problema suvremenog društva. Predstavlja skup metaboličkih bolesti koje karakterizira kronična hiperglikemija nastala zbog poremećaja u sekreciji i/ili djelovanju inzulina, što je povezano s poremećajem u metabolizmu ugljikohidrata, masti i proteina. U razvoj DM uključeno je više patogenih procesa; od autoimunog uništavanja β stanica gušterače s posljedičnim nedostatkom inzulina, do rezistencije na djelovanje inzulina u ciljanim tkivima (42). Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (SZO, engl. *World Health Organisation, WHO*), broj oboljelih od šećerne bolesti porastao je sa 108 milijuna u 1980. na 422 milijuna u 2014. godini. Značajno je i povećanje prerane smrtnosti od šećerne bolesti od 5% koje je zabilježeno između 2000. i 2016. godine. U 2019. godini šećerna bolest bila je deveti vodeći uzrok smrti s procijenjenih 1,5 milijuna smrtnih slučajeva izravno uzrokovanih šećernom bolešću, dok je godišnja smrtnost zbog posljedica šećerne bolesti procijenjena na 5 milijuna ljudi. Polovica dijabetičara je

nedijagnosticirana i bez liječenja, a prevalencija raste brže u zemljama s niskim i srednjim dohotkom nego u zemljama s visokim dohotkom (43).

Šećerna bolest može se svrstati u sljedeće kategorije, uzimajući u obzir etiologiju, terapijski pristup i prognozu (44):

- a) DM1 tip (engl. *diabetes mellitus type 1*),
- b) DM2 tip (engl. *diabetes mellitus type 2*),
- c) trudnička (gestacijska) šećerna bolest (engl. *gestation diabetes mellitus*, GDM) - intolerancija glukoze koja se po prvi put pojavljuje ili dijagnosticira u trudnoći,
- d) drugi specifični tipovi, npr. monogeni sindromi šećerne bolesti, kao što su neonatalni dijabetes i MODY (engl. *maturity onset diabetes of the young*); šećerna bolest uzrokovana bolestima gušterače - cistična fibroza i pankreatitis, i šećerna bolest uzrokovana lijekovima ili toksinima, kao što je primjena glukokortikoida u liječenju HIV-a/AIDS-a ili nakon transplantacije organa (44, 45).

Prema SZO, šećerna bolest može se dijagnosticirati prema sljedećim kriterijima:

1. GUK natašte  $\geq 7,0$  mmol/L ili 126 mg/dl, nakon 8 sati neunošenja kalorija u organizam, (dvije izmjerene vrijednosti).
2. GUK  $\geq 11,1$  mmol/L ili 200 mg/dl, 2 sata nakon uzimanja otopine 75 g glukoze - OGTT test.
3. A1C  $\geq 6.5\%$  (48 mmol/mol)
4. Kod bolesnika s klasičnim simptomima hiperglikemije ili hiperglikemijske krize, glukoza u plazmi  $\geq 11,1$  mmol/L (200mg/dl).

DM1 i DM2 javljaju u obje dobne skupine pa tradicionalne paradigme da se DM2 javlja samo u odraslih, a DM1 samo u djece, više ne smatramo točnima (44).

### 1.2.1 Šećerna bolest tipa 1

Šećerna bolest tipa 1 (engl. *diabetes mellitus type 1*, DM1; *insulin-dependent diabetes mellitus*, IDDM) nastaje kao posljedica stanično posredovanog autoimunog uništenja  $\beta$  stanica gušterače, ranije je nazivana „dijabetes ovisan o inzulinu“ ili „juvenilni dijabetes“, a čini 5-10% slučajeva šećerne bolesti (44, 45). Autoimuni biljezi koje nalazimo u DM1 su protutijela na dekarboksilazu glutaminske kiseline (engl. *glutamic acid decarboxylase*, GAD), protutijela na endogeni inzulin (engl. *insulin autoantibody*, IAA), protutijela na Langerhansove otočice (engl.

*islet cell autoantigen*, ICA), protutijela na tirozinsku fosfatazu IA-2 i IA-2 $\beta$ , te protutijela na transporter cinka 8 (ZnT8) (44, 46).

Stopa uništavanja  $\beta$  stanica kod dojenčadi i djece je brza, a kod odraslih je uglavnom spora. Kod odraslih dovoljna funkcija  $\beta$  stanica može biti zadržana dugi niz godina te oni tek na kraju postaju ovisni o inzulinu i izloženi riziku dijabetičke ketoacidoze (44, 47). Kod bolesnika s DM1 postoji sklonost razvoju drugih autoimunih bolesti, kao što su Gravesova bolest, Hashimotov tireoiditis, Addisonova bolest, vitiligo, autoimuni hepatitis i miastenija gravis (44). Ovaj tip šećerne bolesti najčešći je u djetinjstvu i adolescenciji, ali se može pojaviti u bilo kojoj dobi, čak i u 8. i 9. desetljeću života. Manjina bolesnika s DM1 ima idiopatski tip bolesti, kod kojega nema dokaza o autoimunosti na  $\beta$  stanice, ali je prisutna trajna inzulinopenija i sklonost dijabetičkoj ketoacidozi (44).

### **1.2.2 Šećerna bolest tipa 2**

Šećerna bolest tipa 2 čini 90-95% svih slučajeva šećerne bolesti. Ranije je nazivana „o inzulinu neovisan dijabetes“, a karakterizirana je inzulinskom rezistencijom i relativnim nedostatkom inzulina (44). Inzulinska rezistencija klinički se definira kao nemogućnost poznate količine egzogenog ili endogenog inzulina da poveća unos glukoze u stanice i njezinu iskorištenost. Djelovanje inzulina posljedica je vezanja inzulina za njegov receptor na staničnoj membrani i prijenos signala u stanici (48). U različitim stanjima inzulinske rezistencije dokazan je mitohondrijski poremećaj oksidativne fosforilacije s posljedičnim povećanim sadržajem lipida u skeletnom mišiću (49). Ipak, smatra se da disregulacija metabolizma masnih kiselina igra ključnu ulogu u patogenezi inzulinske rezistencije u skeletnom mišiću (50). U početnoj fazi, a često i kasnije, DM2 ne zahtijeva liječenje inzulinom. Većina, ali ne i svi pacijenti s DM2, imaju prekomjernu težinu ili pretilost. Rizik razvoja DM2 povećava se s godinama, pretilošću i s nedostatkom tjelesne aktivnosti. Genetska predispozicija ili obiteljska anamneza je izraženija nego kod DM1 (44).

### **1.2.3 Komplikacije šećerne bolesti**

Šećerna bolest i njezine komplikacije značajno doprinose troškovima zdravstvene zaštite. Primjerice, u Sjedinjenim Državama šećerna bolest i njezine komplikacije glavni su uzrok pobola i smrtnosti (51). Komplikacije šećerne bolesti mogu se klasificirati na mikrovaskularne i makrovaskularne. Mikrovaskularne komplikacije pogađaju male krvne žile te uključuju oštećenje živčanog sustava (neuropatija), oštećenje bubrega (nefropatija) i

oštećenje oka (retinopatija) s visokim utjecajem na kvalitetu života i ukupni očekivani životni vijek. DM je glavni uzrok sljepoće u razvijenim državama, a DN je vodeći uzrok zatajenja bubrega, dok je dijabetička neuropatija glavni uzrok amputacija donjih ekstremiteta. Prevalencija DN i retinopatije kreće se oko 25% bolesnika s DM2, dijabetička neuropatija susreće se u gotovo 50% dijabetične populacije, dok je prevalencija erektilne disfunkcije prisutna kod 35-90% bolesnika s DM2 (52). Makrovaskularne komplikacije DM2 uključuju koronarnu bolest srca (CAD, engl. *coronary artery disease*), kardiomiopatiju, aritmije i iznenadnu smrt, cerebrovaskularne bolesti te bolest perifernih arterija. Kardiovaskularne bolesti primarni su uzrok smrti u bolesnika sa šećernom bolešću, kao posljedica različitih patogenetskih puteva koji uključuju hiperglikemiju i inzulinsku rezistenciju. Mnoge kliničke studije pokazale su vezu između T2DM-a i vaskularnih bolesti, ali su kod dijabetičara gotovo uvijek prisutni i drugi čimbenici rizika, poput hipertenzije, pretilosti i dislipidemije (53).

Dijabetička nefropatija druga je najčešća i najrasprostranjenija komplikacija DM-a i uzrokuje gotovo polovicu svih slučajeva završnog stadija bolesti bubrega u SAD-u (54). Otprilike jedna trećina pacijenta s DM1 i otprilike 25% bolesnika s DM2 razvijaju DN (55, 56). Sa sve većom učestalošću širom svijeta, DN je postala ozbiljna prijetnja ljudskom zdravlju (57).

Patofiziološke abnormalnosti u DN karakterizira glomerularna hipertrofija, zadebljanje glomerularnih i tubularnih bazalnih membrana i nakupljanje izvanstaničnog matriksa u membranama. Kako bolest napreduje, te promjene uzrokuju tubulointersticijsku i glomerularnu fibrozu i sklerozu (58, 55). Patogeneza DN istražena je u brojnim studijama, otkrivajući da njezin razvoj i pojava uključuju interakciju više čimbenika i višestrukih metaboličkih putova kao što su abnormalna bubrežna hemodinamika, metaboličke abnormalnosti uzrokovane hiperglikemijom, oksidativni stres izazvan povećanom glikacijom, genetskim čimbenicima, apoptozom i upalom (59, 60, 54, 61). Sve ove promjene rezultiraju glomerularnom hiperfiltracijom, glomerularnom hipertenzijom i bubrežnom hipertrofijom, koje se klinički manifestiraju kao hipertenzija i albuminurija (62). Dijabetički milje koji karakterizira hiperglikemija, oksidativni stres i aktiviran RAAS sustav pokreću upalni proces u bubrežima. Upala igra bitnu ulogu u napredovanju DN-a što uključuje izražaj adhezivnih molekula, faktora rasta, kemokina, proupalnu proizvodnju citokina i na kraju oštećenja tkiva (63). Međutim, detaljni metabolički mehanizmi na kojima se temelji patogeneza DN još uvijek nisu do kraja definirani.

### 1.3 Višestruko nezasićene masne kiseline

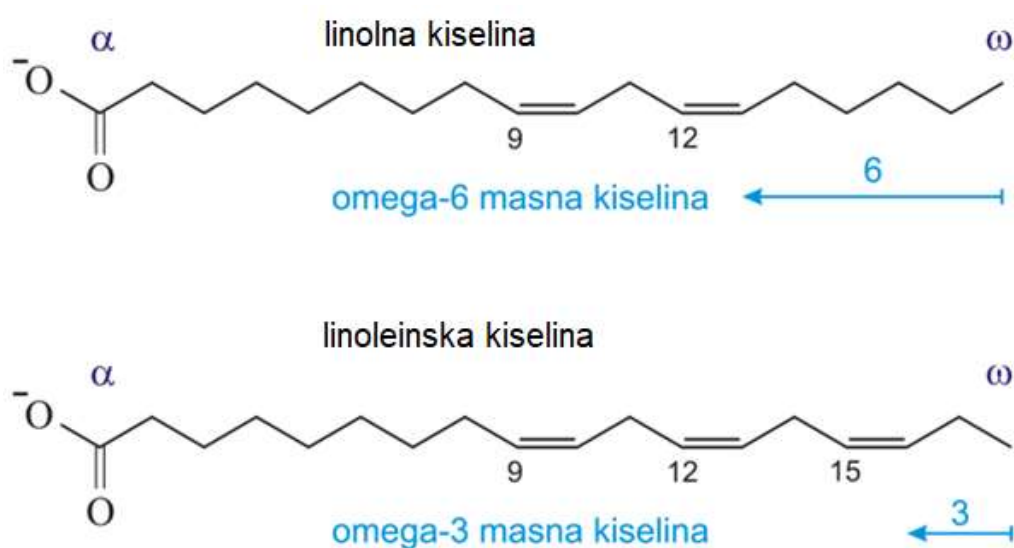
Masne kiseline su karboksilne kiseline koje imaju ugljikovodične strukture različitih duljina. Kao organske molekule uključene su u sintezu ATP-a, skladištenje energije, stvaranje membrane i transdukciju signala. Biokemijski, prema odsutnosti, prisutnosti jedne ili prisutnosti više od jedne dvostruke veze ugljik - ugljik, označene su kao zasićene masne kiseline, mononezasićene masne kiseline (MUFA, engl. *monounsaturated fatty acids*) i višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA, engl. *polyunsaturated fatty acids*) (64).

#### 1.3.1 Klasifikacija višestruko nezasićenih masnih kiselina

PUFA masne kiseline sadrže dvije ili više dvostrukih veza u strukturi, a po svojoj kemijskoj strukturi mogu se svrstati u različite skupine: polieni prekinuti metilenskom skupinom, konjugirane masne kiseline i ostale PUFA-e. Na temelju duljine ugljikovog lanca možemo ih razvrstati u dvije skupine: polinezasićene masne kiseline kratkog lanca (SC-PUFA, engl. *short-chain PUFA*) s 18 ugljikovih atoma i dugolančane polinezasićene masne kiseline (LC-PUFA, engl. *long-chain PUFA*) s 20 ili više atoma ugljika (65, 66). Skupina PUFA kod koje je dvostruka veza razdvojena metilenskom skupinom (polieni prekinuti metilenskom skupinom) može se podijeliti na omega-3 (n-3), omega-6 (n-6) i omega-9 (n-9) masne kiseline, pri čemu broj pokraj n označava mjesto ugljikovog atoma s prvom dvostrukom vezom u odnosu na terminalni metilni kraj molekule, dok je ostatak oznake izveden iz broja ugljikovih atoma, nakon čega slijedi broj desaturiranih mjesta (primjerice linolna kiselina, n-6, 18:2). Početak lanca dugolančanih masnih kiselina je mjesto gdje se nalazi karboksilna skupina -COOH, dok je kraj mjesto na lancu gdje se nalaze tri atoma vodika vezana na atom ugljika (CH<sub>3</sub>-). Kraj se naziva omega (ω), a prema mjestu prve dvostruke veze od tog kraja govorimo o omega-3, omega-6, odnosno omega-9 masnim kiselinama (Sl. 3).

Prehrambene esencijalne masne kiseline koje se ne mogu sintetizirati u organizmu sisavaca su n-6 PUFA, linolna kiselina (18:2, n-6, LA) i n-3 PUFA, alfa-linoleinska kiselina (18:3, n-3, ALA), sve s duljinom od 18 ugljikovih atoma u lancu, a dobivaju se iz biljaka (sjemenki, orašastih plodova i ulja) (67). Te su masne kiseline neophodne u prehrani, a ljudi i životinje nemaju potrebne desaturaze ( $\Delta_{12}$  i  $\Delta_{15}$ ) da bi ih sintetizirali (68). Za razliku od njih, dugolančane PUFA ( $\geq 20$  atoma ugljika): dokozaheksaenoična kiselina (22:6, n-3, DHA), eikozapentaenoična kiselina (20:5, n-3, EPA) i arahidonska kiselina (20:4, n-6, AA) mogu se sintetizirati od svojih 18-karbonskih prekursora produljenjem lanca PUFA i desaturacijom, ali se mogu dobiti i konzumacijom mesa (AA) i morskih plodova (EPA, DHA) (64, 66). Ipak, ove

dugolančane PUFA nazivaju se uvjetno esencijalnim jer u novije vrijeme postoji sve veći interes za osiguravanje dovoljne količine prehrambenih 20 ili 22-C PUFA, kao i osiguravanje pravilnog omjera prehrambenih n-6/n-3 PUFA na 3-4, što je znatno niže nego u mnogim trenutnim „zapadnjačkim“ dijetama (69, 70). Glavne n-3 LC-PUFA u izvorima hrane su ALA, DHA, EPA i dokosapentaenoična kiselina (DPA), dok n-6 LC-PUFA uključuju LA i AA (71). Prehrambeni izvori n-3 PUFA su plava riba (sardina, skuša, tuna, inćuni) te riba iz hladnih mora (haringa, losos), alge, zooplankton i plodovi mora te sjemenke i orašasti plodovi (72).



**Slika 3. Esencijalne masne kiseline** - linolna kiselina (LA) kao omega-6 višestruko nezasićena masna kiselina s prvom dvostrukom vezom na ugljikovom atomu broj 6; alfa-linoleinska kiselina (ALA) kao omega-3 višestruko nezasićena kiselina s prvom dvostrukom vezom na ugljikovom atomu broj 3. Izvor: E. Generalić, Kemijski rječnik [Internet]. 2022. [citirano 19. 1. 2023.]. Dostupno na: <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=masna+kiselina> (73).

### 1.3.2 Biološki učinci višestruko nezasićenih masnih kiselina

Masne kiseline n-3 i n-6 PUFA, posebice dužih lanaca, igraju ključnu ulogu u ljudskom zdravlju od začeca, kroz različite faze ljudskog razvoja, sazrijevanja i starenja, uključujući uloge u metabolizmu, transdukciji, pojačavanju signala, sastavu stanične membrane te u ekspresiji gena (74). Uloga n-6 i n-3 PUFA u organizmu i njihov utjecaj na upalu istražen je u brojnim kliničkim studijama. Tako su n-3 PUFA pokazale protuupalni učinak (75), dok n-6



PUFA, zbog pretvorbe u AA i metaboliziranja u omega-6 eikozanoide (prostaglandine i leukotriene), imaju proinflamatorni učinak (76, 77).

Poznato je da omjer n-6/n-3 PUFA ima veliku nutritivnu važnost jer je ključan za uravnoteženu sintezu eikozanoida u tijelu, što je posljedica kompeticije n-3 i n-6 PUFA za iste metaboličke enzime - ciklooksigenazu i lipooksigenazu (78). Većina vrsta posjeduje enzime za pretvorbu esencijalnih masnih kiselina s 18 ugljikovih atoma u duži lanac, međutim sisavci i većina drugih životinja ovise o prehranbenim izvorima masnih kiselina (79). Procjenjuje se da se u zapadnim zemljama u kojima se kozumira visok udio zasićenih masti, rafiniranih ugljikohidrata i prerađene hrane, taj omjer kreće između 10 i 20:1 (80, 81) te da je u posljednja 3 desetljeća unos n-3 PUFA nedovoljan (82). Posljedica je to povećane potrošnje ulja sjemenki bogatih s n-6 poput soje, kukuruza i ulja šafranke, a koja imaju omjer n-6/n-3 od približno 60:1 odnosno 77:1 (83). Također, prerađena biljna ulja često su skrivena u konzumiranoj hrani poput preljeva za salatu, majoneze, kruha, žitarica, pržene hrane i unaprijed pakiranih pekarskih proizvoda (83).

Dokazano je da dodatni unos n-3 u starijih od 60 godina značajno smanjuje razinu upalnih biljega (CRP i IL-6) te umanjuje inzulinsku rezistenciju (84). Prehrana s najnižim udjelom n-6/n-3 (1:1) minimizira stvaranje aterosklerotskih lezija, koje raste s povećanjem omjera n-6/n-3 (85). Učinci n-3 PUFA u smanjenju upale niskog stupnja dokazani su u brojnim kroničnim bolestima kao što su reumatoidni artritis, ateroskleroza, dislipidemija, šećerna bolest, pretilost i zatajenje srca, dok veće količine n-6 PUFA mogu imati suprotan učinak (86, 81). Recentna istraživanja pokazala su da bi pravilan omjer n-6/n-3 PUFA mogao biti obećavajući nutritivni čimbenik i u prevenciji nealkoholne bolesti jetre kao i depresivnih poremećaja (87, 88). Udio n-3 masnih kiselina u tkivima može biti izražen pojmom "indeks - n-3" koji je uveden u znanstvenu terminologiju, a predstavlja sadržaj EPA + DHA u eritrocitima izražen kao postotak u ukupnim masnim kiselinama (89). Indeks n-3 neovisan je faktor rizika za smrtnost od CAD te je obrnuto proporcionalno povezan s biljezima upale (CRP i IL-6) u bolesnika sa stabilnom CAD (90, 91). Osim ovih učinaka, n-3 PUFA uključene su u formiranje stanične membrane, imunološku regulaciju, metaboličke putove različitih tvari, prijenos signala, snižavanje triglicerida i krvnog tlaka (92).

Svakako, ovaj povoljan biološki učinak PUFA dijelom može biti pojašnjen membranskom fluidnošću i elastičnošću koja je posljedica prisutnosti brojnih dvostrukih veza u PUFA, a koje utječu na formiranje slobodnih prostora, za razliku od učinka rigidnih zasićenih masnih kiselina (93).

Zbog niza dokaza u prilog zdravstvenih benefita PUFA, Europski znanstveni odbor za hranu (SCF, engl. *Scientific Committee on Food, Commission of the European Communities*) 1992. godine je po prvi put utvrdio referentne unose stanovništva za PUFA kao udio u ukupnom dnevnom unosu energije koji odgovara dnevnom unosu od približno 6 g/dan (5 g n-6 PUFA/dan + 1 g n-3 PUFA/dan) za žene i 8 g/dan (6,4 g n-6 PUFA/dan + 1,6 g n-3 PUFA/dan) za muškarce (94). Slijedilo ga je Međunarodno društvo za proučavanje masnih kiselina i lipida (ISSFAL, engl. *International Society for the Study of Fatty acids and Lipids*) koje je 2003. objavilo svoje preporuke za unos PUFA u zdravih odraslih osoba s minimalnim unosom EPA i DHA u kombinaciji od 500 mg/dan (95). Slične preporuke za unos PUFA dale su i Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA, engl. *European Food Safety Authority*), Odbor za hranu i prehranu Američkog instituta za medicinu, Američko udruženje za srce (AHA, engl. *American Heart Association*), Japansko društvo za lipidnu prehranu i Svjetska zdravstvena organizacija (WHO, engl. *World Health Organisation*) (96-98). Primjerice, AHA za osobe bez dokumentirane CAD preporuča uključivanje ribe u obroke najmanje dva puta tjedno, uz konzumiranje ulja i hrane bogate omega-3 polinezasićenom masnom kiselinom ALA. Osobama s dokumentiranim CAD-om savjetuje se da konzumiraju otprilike 1 g/dan EPA + DHA (97).

U nefronima, kao i u cijelom organizmu, neuravnotežen omjer n-6/n-3 PUFA izaziva upalne procese te posljedično bolesti bubrega. Gopinath i koautori otkrili su da povećani unos dugolančanih n-3 PUFA smanjuje učestalost kronične bolesti bubrega (99). Brojne bolesti bubrega posljedica su upale, osobito u nefronima na koje, kako je ranije pojašnjeno, znatno može utjecati neuravnotežen omjer unosa n-6/n-3 PUFA. Protuupalna svojstva kao i zaštitni učinak EPA, DHA i njihove prekursorske ALA, koje su sve klasificirane kao n-3 PUFA, dokazan je u liječenju IgA nefropatije (100, 101), lupus nefritisa (102), dijabetičke bubrežne bolesti (21), ishemijske bubrežne ozljede (103) i nefrolitijaze (104). Ipak, bez obzira na brojne kliničke studije o povoljnim učincima n-3 PUFA na bubreg, specifični mehanizmi njihovog učinka još uvijek nisu pojašnjeni.

### **1.3.3 Metabolizam višestruko nezasićenih masnih kiselina**

Masne kiseline imaju važnu ulogu u izgradnji staničnih membrana, strukturi lipida te funkciji i transportu u membranama. Sve membrane stanica sastavljene su od masnih kiselina u fosfolipidima koji tvore fosfolipidni dvosloj (105). Masne kiseline n-3 PUFA iz različitih prehrambenih izvora ugrađuju se u različite tipove stanica (106) što ukazuje na to da mogu promijeniti biokemijski sastav membranskih lipidnih mikrodomena, a što može utjecati na propusnost membrane. Promjena membranskih mikrodomena ima utjecaj na staničnu

signalizaciju moduliranjem unutarstaničnog prometa i utjecajem na vezikularni transport, kao i na lokalizaciju membranskih proteina što predstavlja mogući molekularni mehanizam za brojne zdravstvene dobrobiti u ljudskom organizmu (107,108). Istraživanja koja su razmatrala potencijalno povoljan / štetan učinak primjene n-3 PUFA u liječenju ventrikularnih aritmija, pokazala su da n-3 PUFA imaju učinke na proteine ionskih kanala gotovo svih vrsta povezanih s lipidnim mikrodomenama. Pretpostavlja se da su povoljni učinci na aritmije povezani s modulacijom srčanih ionskih kanala uključenih u genezu te na održavanje srčanog akcijskog potencijala (109, 110).

Dugolančane PUFA-e se preferencijalno ubacuju u membranske fosfolipide na položaju sn2 i služe kao oksigenirani PUFA prekursori (64). Oksigenirane PUFA-e sudjeluju u regulaciji stanične i tkivne funkcije modulirajući ionske kanale i transkripcijske čimbenike. Tako eikozanoidi proizašli iz različitih PUFA mogu imati i različita svojstva, što se odražava i na ljudske imunosne stanice jer sastav njihovih membrana utječe i na njihovu funkciju. Promjena sastava masnih kiselina u membranama imunosnih stanica utječe na učinak antigena, fagocitozu i signalizaciju T-stanica. Pretpostavlja se da PUFA selektivno mijenjaju sastav proteina unutarne membrane lipida T stanica, a vjerojatan mehanizam za pomicanje proteina iz lipidne membrane je upravo ugradnja PUFA u membranske lipide (111, 112). Isto tako, u pretkliničkim modelima dokazano je da n-3 PUFA moduliraju aktivnost B stanica (primarni limfociti humoralnog imunološkog odgovora) što se odražava na imunološki odgovor (113).

PUFA se metaboliraju u eikozanoide - oksigenirane masne kiseline, stanične signalne molekule koje imaju ulogu u pojačavanju ili inhibiranju upale, alergijama i drugim imunološkim odgovorima, u percepciji boli, reguliranju rasta stanica, u održavanju bubrežne funkcije, homeostaze tjelesne tekućine i krvnog tlaka (114). Eikozanoidi (grč. *eikos* - dvadeset, jer njihov prekursor sadrži 20 atoma ugljika) su podkategorija oksilipina, a postoji više podskupina eikozanoida, uključujući najistaknutije prostaglandine, tromboksane, leukotriene, lipoksine, resolvine i eoksine (115). Razlika među podskupinama je važna jer količina konzumiranih n-6 i n-3 PUFA direktno utječe na razine tkivnih n-6 i n-3 eikozanoidnih metabolita (116). Metaboliti n-3 i n-6 imaju gotovo dijametralno suprotnu patološku i fiziološku aktivnost. Suprotstavljeni učinci eikozanoida izvedenih iz n-6/n-3 PUFA na ključne ciljne stanice temelj su štetnih i blagotvornih učinaka prehrane bogate n-6/n-3 PUFA-ma na hipertenziju, aterosklerozu, upalu i alergijske reakcije, rast malignih stanica i niz drugih procesa (114). Primjerice, AA se metabolizira u n-6 eikozanoide prostaglandine i leukotriene serije 4 koji imaju proinflamatorni učinak i mogu izazvati agregaciju trombocita i vazokonstrikciju (117). Za razliku od n-6 masnih kiselina, metabolizam EPA i DHA stvara prostanoide serije 3 i

leukotriene serije 5. Ova skupina eikozanoida pokazuje protuupalna, antitrombocitna i antiaritmička svojstva (93) (Tablica 1).

Ipak, potrebno je naglasiti da su zbog dvostrukih veza PUFA posebno osjetljive na oksidaciju slobodnim radikalima proizvedenim u prekomjernim količinama za vrijeme oksidativnog stresa. Kao posljedica oksidacije PUFA, dolazi do promjena u fizičkim svojstvima stanične membrane (smanjenje razlika u električnom potencijalu s obje strane membrane) što rezultira gubitkom funkcionalnog i strukturnog integriteta stanične membrane (118).

U svom istraživanju Di Stasi i suradnici dokazali su da različite količine EPA i DHA mogu brzo promijeniti sastav masnih kiselina u membranama krvnih stanica, a vjerojatno i u drugim tkivima (119).

Zanimljivo je da nekoliko istraživanja ističe da sinteza dugolančanih PUFA može biti narušena kod pacijenata koji boluju od DM-a tipa 2 kao rezultat smanjene aktivnosti desaturaze 5, koja je ključni regulator u sintezi dugolančanih PUFA (120-123). Ovi podaci pojašnjavaju zašto prehrana bogata ribom ili ribljim uljem donosi korist oboljelima od šećerne bolesti (103, 124-126).

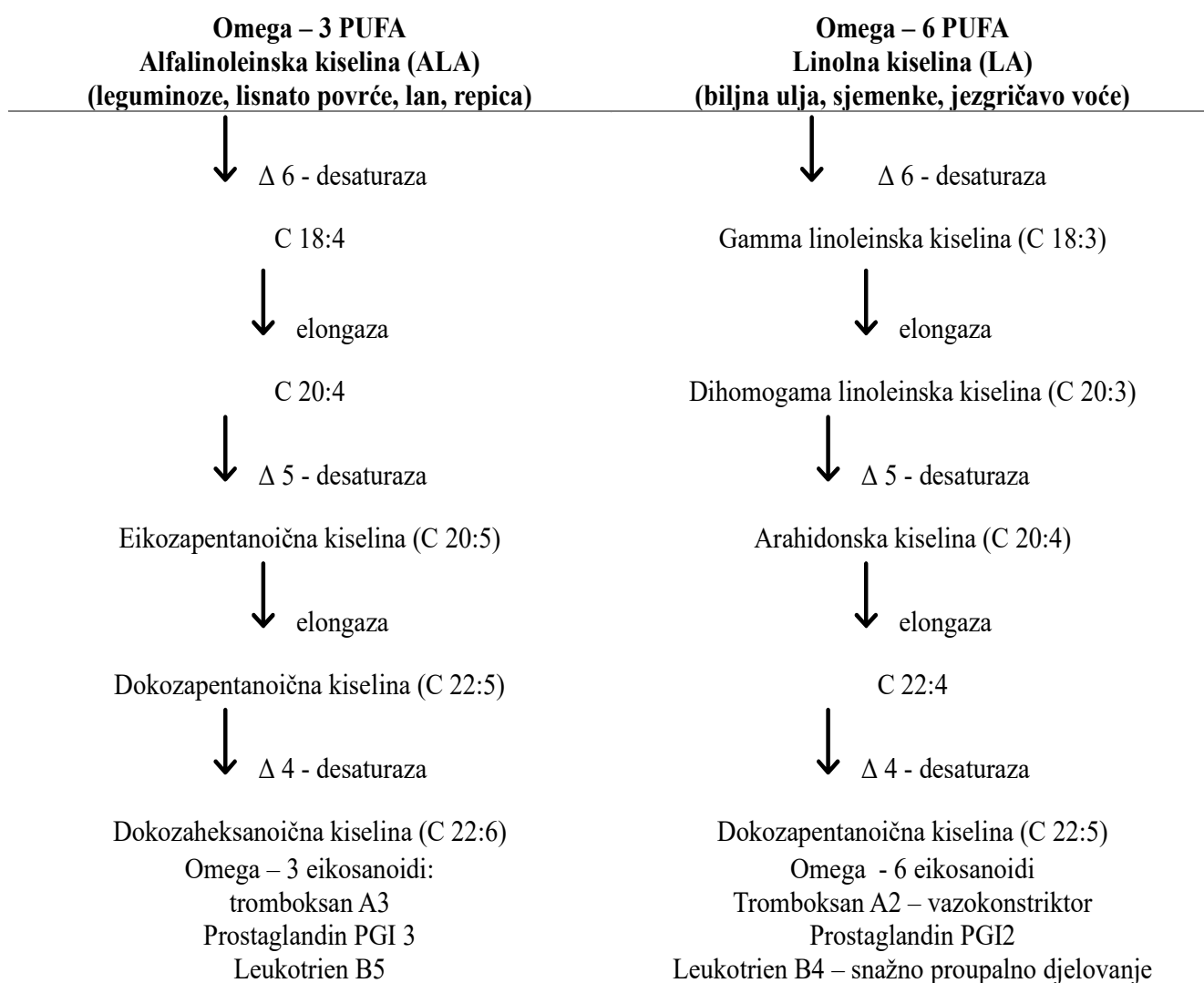
U svom istraživanju Kelton i suradnici pokazali su da se povećanjem razine n-3 PUFA i istovremenim smanjenjem razine n-6 PUFA u bubrežnim fosfolipidima može utjecati na razinu eikozanoida (127). Tako je moguće smanjiti upalni odgovor u tkivima, manipulacijom razina PUFA dostupnih za njihovu sintezu i smanjenjem proizvodnje proupalnih eikozanoida u bubregu (128). Zapravo, homeostatska ravnoteža između n-3 i n-6 masnih kiselina u staničnim membranama održava neinflamatornu eikozanoidnu ravnotežu (77).

Također, u istraživanju Janga i suradnika dokazano je da je prehrana s nižim omjerima n-6/n-3 PUFA (1:1 i 5:1) značajno smanjila razinu ukupnog kolesterola u serumu, kolesterola lipoproteina niske gustoće i proinflammatoryh citokina u usporedbi sa skupinom čiji je omjer n-6/n-3 PUFA u prehrani bio 20:1. Osim toga, posljednja skupina imala je značajno povećane brojne biljege oksidativnog stresa u serumu u usporedbi s drugim skupinama, uz značajna oštećenja funkcije endotela (129).

Osim upale, još jedan mogući mehanizam uključen u blagotvoran učinak n-3 PUFA u bubregu mogla bi biti regulacija dislipidemijskih signala u bubregu. Chin i suradnici pokazali su da n-3 PUFA preveniraju oštećenje bubrega učinkom na smanjenje ekspresije SREBP-1 i smanjenjem razine triglicerida u dijabetičnom bubregu te na taj način sprječavaju albuminuriju, hiperfiltraciju bubrega, ekspanziju mezangija, ozljedu podocita i upalne signale (130).

Također, moguće dobiti n-3 mogle bi proizlaziti i iz smanjenog djelovanja izoprostana, spojeva nalik prostaglandinima, koji imaju jaku proinflatornu aktivnost, a nastaju oksidacijom iz AA (131).

**Tablica 1. Metabolizam višestruko nezasićenih masnih kiselina.** Prilagođeno prema izvoru: Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. Am J Clin Nutr. 1991;54(3):438-63. (132)



## **2. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA**

1. *Diabetes mellitus* tipa 1 utječe na masnokiselinski sastav fosfolipida i stupanj lipidne peroksidacije u bubrezima štakora.

2. Suplementacija s različitim omjerima n-6/n-3 PUFA utječe na:

2.1. masnokiselinski sastav fosfolipida i stupanj lipidne peroksidacije;

2.2. stupanj patoloških promjena;

2.3. promjene izražaja VEGF, NF- $\kappa$ B i SATB1 u bubregu štakora uzrokovane DM1.

### **3. CILJ ISTRAŽIVANJA**



Cilj istraživanja je istražiti potencijalno pozitivan / štetan učinak prehrane različitim omjerima n-6/n-3 PUFA na masnokiselinski sastav fosfolipida u tkivu bubrega štakora korištenjem modela DM-a tipa 1 induciranog streptozotocinom (STZ). U središtu ovog istraživanja su patohistološke promjene nastale pod utjecajem DM-a tipa 1 te utjecaj prehrane s različitim udjelima n-6/n-3 PUFA na stupanj oštećenja, ishode DN, kao i izražaj čimbenika VEGF, NF- $\kappa$ B i SATB1 u bubregu dijabetičnih štakora.

## **4. METODE ISTRAŽIVANJA**

## a) Pokusne životinje

U pokus je bilo uključeno 25 mužjaka Wistar štakora, držanih u kontroliranim uvjetima okoliša (temperatura  $22 \pm 1$  °C s ciklusom izmjene svjetla/tame od 12/12 sati). Štakori su nasumično podijeljeni u 4 skupine koje su dobivale različite omjere n-6/n-3 u obroku. Standardni obrok sadržavao je 20% sirovih proteina, 5% sirove masti i 5% sirovih vlakana. Suplementacija s različitim omjerima n-6/n-3 postignuta je korištenjem različitih mješavina ulja (suncokretovog, ribljeg i lanenog), kako je detaljno prethodno objavljeno (123). Hranu i vodu štakori su dobivali *ad libitum*. Kontrolna skupina (C, engl. *control*) dobivala je hranu s 0,5% lanenog ulja i 2% suncokretovog ulja kako bi omjer n-6/n-3 bio približno 7. Dijabetična skupina (STZ) imala je isti protokol hranjenja, dok je obrok treće skupine (STZ+N6) suplementiran s 2,5% suncokretovog ulja da bi se postigao omjer n-6/n-3 od oko 60, a obrok četvrte skupine (STZ+DHA) suplementiran je s 2,5% ribljeg ulja s 16% EPA i 19% DHA, a kako bi se postigao omjer n-6/n-3 oko 1. Dva tjedna nakon početka prilagodbe prehrani, kako bi inducirali DM1, svim je životinjama, izuzev onih iz kontrolne skupine, apliciran intraperitonealno STZ (55 mg/kg tjelesne težine) otopljen u citratnom puferu (pH 4,5), nakon cjelonoćnog gladovanja. Kontrolnoj skupini ubrizgan je na isti način čisti citratni pufer (133). Za mjerenje težine korištena je elektronička vaga, dok je koncentracija glukoze u plazmi mjerena pomoću glukometra (Accu-Check Go, Roche Diabetes Care, Inc., SAD). Štakori koji su imali koncentraciju glukoze  $>16$  mmol/L smatrani su dijabetičnima.

## b) Postupci

### Priprema pokusnih životinja i tijek pokusa

Trideset dana nakon ubrizgavanja STZ-a / citratnog pufera, štakori su žrtvovani u dubokoj anesteziji (Narketan 80 mg/kg i Xylapan 12 mg/kg; Vétoquinol, Bern, Švicarska). Uzorci krvi za mjerenje koncentracije malondialdehida (MDA) uzimani su direktno iz srca, centrifugirani su na  $1500 \times g$  tijekom 5 minuta, nakon čega je izdvojena plazma. Bubrezi su izvađeni i tkivo bubrega dijelom je odmah zamrznuto radi ekstrakcije proteina i masti, a dijelom je fiksirano imerzijom u puferiranom 4% formalinu radi histološke analize.

### 4.1 Mjerenje stupnja lipidne peroksidacije

Sadržaj MDA u plazmi mjereno je metodom tekućinske kromatografije pod visokim pritiskom (HPLC; engl. *high-pressure liquid chromatography*) te izražen kao koncentracija produkata koji su reagirali s tiobarbituratnom kiselinom (MDA-TBARS) (123). Dvadeset  $\mu$ L

pripravka plazme ubrizgano je na Shimadzu LC-2010HT s Inert-Sustain C18 kolonom ( $4,6 \times 150$  mm, veličinom čestica od  $5 \mu\text{m}$ ; GL Sciences, Tokyo, Japan), a standardna krivulja pripremljena je primjenom 1,1,3,3-tetraetoksipropana.

#### 4.2 Ekstrakcija lipida i kvantifikacija sastava fosfolipida u tkivu bubrega

Ukupni lipidi (TL, engl. *total lipids*) iz bubrežnog tkiva ekstrahirani su prema Folchu (134) s kloroformom/metanolom (2:1, v/v). Kao antioksidans korišten je butilirani hidroksitoluen (BHT, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) (30 mg/100 ml). Ekstrakcija je provedena u čvrstoj fazi s 500 mg aminopropila vezanog na silikonsku podlogu (Supelclean, Supelco, Bellefonte, PA, SAD), a kako bi se odvojili neutralni lipidi (NL, engl. *neutral lipids*) i ukupni fosfolipidi i to primjenom kloroforma/izopropanola (2:1, v/v) za neutralne lipide te metanola za fosfolipide. Separirani fosfolipidi su osušeni pod strujom  $\text{N}_2$ , ponovno otopljeni u  $200 \mu\text{l}$  kloroform - metanola (2:1, v/v) s dodatkom BHT i uskladišteni na  $-80^\circ\text{C}$ . Masne kiseline iz fosfolipida transmetilirane su korištenjem  $\text{BF}_3$  u metanolu na  $64^\circ\text{C}$  tijekom 3 sata, ekstrahirane u n-heksanu i prebačene u bočice koje sadrže bezvodni  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Za kvantifikaciju metilnih estera masnih kiselina korišten je GC-MS (QP2010 Ultra; Shimadzu, Kyoto, Japan) opremljen kapilarnom kolonom BPX70 ( $0,25$  mm unutarnji promjer, debljina filma  $0,25 \mu\text{m}$ , duljina  $30$  m; SGE, Austin, TX, USA). Analitički uvjeti su postavljeni kako je prethodno već objavljeno (123, 135). Kao unutarnji standard korištena je nonadekanska kiselina (C19:0). Rezultati su izraženi kao molarni postotak od ukupnih masnih kiselina.

#### 4.3 Western blot - protokol

Tkivo bubrega homogenizirano je u puferu za lizu (RIPA pufer za lizu, EMD Millipore, Billerica, MA, SAD) s inhibitorima proteaze (SIGMAFAST™ tablete inhibitora proteaze, Sigma-Aldrich, Njemačka). Lizati su centrifugirani 10 minuta na  $15\ 000 \times g$  (na temperaturi  $4^\circ\text{C}$ ), a supernatanti su prebačeni u čiste epruvete. Koncentracija proteina mjerena je BCA testom (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka); pri čemu je albumin goveđeg seruma korišten kao standard. Četrdeset mikrograma ukupnih proteina denaturirano je kuhanjem (5 minuta) u Laemmli SDS puferu. U daljnjem postupku provedena je elektroforeza u 10% SDS poliakrilamidnom gelu, a proteini su elektrotransferirani na nitroceluloznu membranu. Membrane su blokirane u puferu za blokiranje (1% nemasnog mlijeka i 0,5% l-blok proteina - reagens za blokiranje; Applied Biosystems), otopljenog u Tris-puferu sa 0,5% (v/v) Tween (TBST) tijekom 1 sata na sobnoj temperaturi. Slijedila je inkubacija na  $4^\circ\text{C}$  s različitim

primarnim protutitijelima: kunića anti-VEGF protutitijela (ab46154; Abcam, Cambridge, UK) i kuniće anti-NF- $\kappa$ B p65 protutijelo (ab7970; oba razrijeđena na 1:250). Membrane su isprane tri puta s TBST puferom i inkubirane tijekom 1 sata na sobnoj temperaturi s kozjim sekundarnim protutitijelima protiv imunoglobulina kunića konjugiranim s peroksidazom hrena (sc-2004; Santa Cruz Biotehnologija; razrijeđeno na 1:2000). Dokumentiranje je provedeno mjerenjem kemiluminescencije (Odyssey Fc, LI-COR, Bad Homburg, Njemačka). Razina izražaja proteina kvantificirana je u odnosu na kemiluminiscenciju  $\beta$ -aktina kao unutarnje kontrole (sc-130657; Biotehnologija Santa Cruz; razrijeđeno na 1: 250), korištenjem programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD).

#### 4.4 Histologija i imunohistokemija

Nakon ispiranja u fosfatnom puferu (PBS, engl. *phosphate-buffered saline*; pH 7,2), tkiva su dehidrirana u nizu otopina etanola i uklopljena u parafin prema standardnom protokolu (131). Mikrotomom su napravljeni histološki rezovi od 5  $\mu$ m koji su stavljeni na stakalca. Nakon deparafinizacije ksilenom, tkiva su rehidrirana u vodenim otopinama etanola padajuće koncentracije, kratko isprana destiliranom vodom te su provedena standardna histološka bojenja: PAS bojenje i trokromno bojenje po Malloryju (8, 136).

Za imunohistokemijsko bojenje, nakon deparafinizacije, rezovi su grijani 12 minuta u citratnom puferu (pH 6,0), ohlađeni i isprani u PBS-u te zatim inkubirani preko noći s primarnim protutitijelima. Nakon ponovnog ispiranja PBS-om, primijenjena su sekundarna protutijela tijekom jednog sata. Rezovi su nakon toga isprani u PBS-u, a jezgre su obojene primjenom 4',6-diamidino-2-fenilindola (DAPI). Stakalca su zatim osušena na zraku i prekrivena pokrovnim stakalcem, uz korištenje medija za pokrivanje (Immu-Mount, Shandon, Pittsburgh, PA, SAD).

Kao alternativa uklapanju u parafin, uzorci bubrežnog tkiva (N = 5 po eksperimentalnoj skupini) isprani su u PBS-u, krioprotekcija je napravljena s 30%-tnom saharozom te su smrznuti u OCT mediju (OCT, Tissue Tek, Tokyo, Japan) korištenjem izopentana prethodno ohlađenog u tekućem dušiku. Primjenom kriotoma (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA, SAD) dobiveni su presjeci debljine 5 $\mu$ m koji su postavljeni na Histobond+ stakalca. Nakon ispiranja u PBS-u, stakalca su obojena otopinom Oil Red O (C.I. 26125, BioGnost d.o.o., Zagreb, Hrvatska) tijekom 2 minute, jezgre su kontrastno obojene u hematoksilinu tijekom 2 minute, rezovi su isprani i prekriveni pokrovnim stakalcem.

**Tablica 2. Popis korištenih primarnih i sekundarnih protutijela**

	<b>Protutijelo</b>	<b>Tvornički naziv</b>	<b>Kataloški broj</b>	<b>Domaćin</b>	<b>Razrjeđenje</b>	<b>Proizvođač</b>
Primarna protutijela	Poliklonsko kunićje protutijelo anti-VEGF	Anti-VEGF A antibody	ab46154	kunić	1:200 (IHC i TEM); 1:250 (WB)	Abcam, Cambridge, Velika Britanija
	Poliklonsko kunićje protutijelo anti-NF-kB	Anti-NF-kB p65 antibody	ab7970		1:250 (IHC); 1:1000 (WB)	Abcam, Cambridge, Velika Britanija
	Poliklonsko kozje protutijelo anti-SATB1	SATB1 (E-15)	sc-5990	koza	1:100	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, SAD
Sekundarna protutijela	Magareće protutijelo protiv imunoglobulina kunića konjugirano s rodaminom	Rhodamine Red™	711-295-152	magarac	1:300	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Baltimore, PA, SAD
	Magareće protutijelo protiv imunoglobulina koze konjugirano s rodaminom	Rhodamine Red™	705-295-003		1:400	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Baltimore, PA, USA
	Magareće protutijelo protiv kunićje IgG konjugirano sa zlatom	Gold anti-rabbit IgG	13064; 2 nm;		1:1000	British Biocell International, Velika Britanija
	Kozje protutijelo protiv imunoglobulina kunića konjugirano peroksidazom hrena	Goat anti-rabbit IgG-HRP	sc2004	koza	1:2000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, SAD

IHC – imunohistokemija; WB – Western blot; TEM – transmisijska elektronska mikroskopija

#### **4.5 Priprema tkiva za transmisijsku elektronsku mikroskopiju**

Nakon ispiranja u PBS-u, tkivo je izrezano na vibratomu. Rezovi debljine 20  $\mu\text{m}$  inkubirani su u 50% etanolu radi permeabilizacije; zatim su isprani u PBS-u te inkubirani 48 sati u primarnom protutijelu protiv VEGF (1: 200) na + 4°C. Nakon ispiranja, inkubirani su preko noći u sekundarnom kozjem-protutijelu protiv imunoglobulina kunića konjugiranom sa zlatom (13 064; 2 nm; British Biocell International, Velika Britanija; Razrjeđenje 1: 1000). Nakon ispiranja, uzorci su fiksirani u 1% osmij tetroksidu tijekom 1 sata, dehidrirani u nizu otopina etanola rastućih koncentracija i uklopljeni u DURCUPAN smolu. Ultratanki rezovi (debljine 0,05  $\mu\text{m}$ ) kontrastirani su s 1% uranil acetatom i olovnim citratom te su promatrani transmisijskim elektronskim mikroskopom (JEM JEOL 1400, Japan).

#### **4.6 Prikupljanje i analiza podataka**

Pripremljeni rezovi pregledani su i fotografirani pomoću mikroskopa (BX61, Olympus, Tokio, Japan) s hlađenom digitalnom kamerom (DP71, Olympus, Tokio, Japan). Za daljnje analize korišten je ImageJ Software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD). Za slijepo PAS bodovanje i analizu fotografirani su u cijelosti kortikalni dijelovi rezova bubrega pod povećanjem 100 $\times$ . Slijepo PAS bodovanje glomerula provedeno je prema modificiranoj metodi (137), a analizirano je između 62 i 123 glomerula po životinji (svi glomeruli na jednome rezu), kao što je prethodno opisano (8).

Za analizu oštećenja distalnih kanalića fotografirano je 10-12 mikrofotografija rezova obojenih trikromnim bojenjem po Malloryju, pod povećanjem 200 $\times$ . Na dobivenim fotografijama prebrojani su svi distalni kanalići te vakuolizirani distalni kanalići i izračunat je udio vakuoliziranih distalnih kanalića.

Cijelo područje kortikalnog dijela presjeka Oil-Red-om obojenih uzoraka fotografirano je pod povećanjem od 400 $\times$  te je analizirano postojanje, gustoća i veličina crveno obojenih lipidnih kapljica u proksimalnim kanalićima. Broj negativnih, slabo pozitivnih (nekoliko kapljica) i jako pozitivnih proksimalnih kanalića prebrojan je te su izračunati njihovi udjeli. Ukupan broj, kao i broj SATB1-imunoreaktivnih DTC, pobrojan je korištenjem brojača stanica u programu ImageJ na 10 vidnih polja slikanih pod povećanjem od 400 $\times$  te je izračunat udio SATB1-imunoreaktivnih DTC.

Za analizu izražaja VEGF-a izbrojen je ukupan broj, kao i broj proksimalnih kanalića s VEGF-pozitivnim granuliranim uzorkom na 6 vidnih polja slikanih pod povećanjem od 400 $\times$  te je izračunat njihov udio u ukupnom broju analiziranih proksimalnih kanalića.

## 4.7 Statistički postupci

Za statističke analize korišten je softver GraphPad Prism 5 (McIntosh, CA, SAD). N je 5-6 po skupini za svako mjerenje, osim analize sastava masnih kiselina (N = 4-5) i analize Western blot (N = 3-4). Kako bi se testiralo postojanje značajnih razlika među pojedinim skupinama, korištena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) s Tukey-Kramer testom za višestruke usporedbe, u slučaju normalne distribucije podataka prema Kolmogorov-Smirnovljevom testu. U slučaju odstupanja od normalne distribucije (Kolmogorov-Smirnovljev test  $p < 0,05$ ), primijenjen je neparametarski Kruskal-Wallisov i Dunnov test za višestruke usporedbe. Statistički značajnom razlikom smatrano je  $p < 0,05$ .

Izračun potrebne veličine uzorka proveden je korištenjem mrežnog programa koji se nalazi na mrežnoj stranici <http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/>. Za izračun veličine uzorka korišteni su podaci dobiveni pilot istraživanjem, gdje su uspoređene skupine DHA i odgovarajuća kontrola. Srednje vrijednosti (SV) MDA iznosile su 29,44 i 11,51, uz SD 1,85; SV udjela n3 u fosfolipidima tkiva bubrega iznosile su 4,94 i 1,99 uz SD 0,28; SV izražaja NF-kB proteina izmjerene metodom Western Blot iznosile su 1,23 i 0,19 uz SD 0,40. Izračunom veličine uzorka dobiven je minimalan broj od 3 štakora po skupini da bi studija imala snagu od 80% ( $1-\beta$ ) uz razinu značajnosti od  $\alpha = 5\%$ .



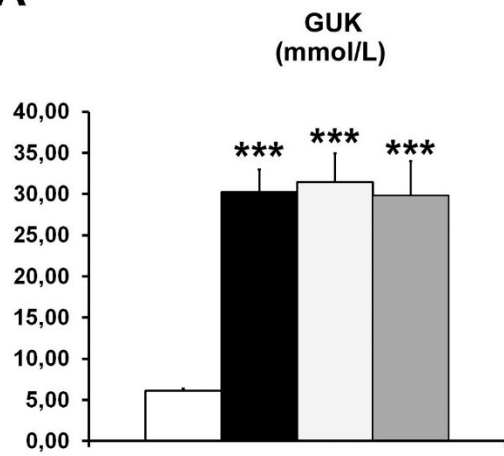
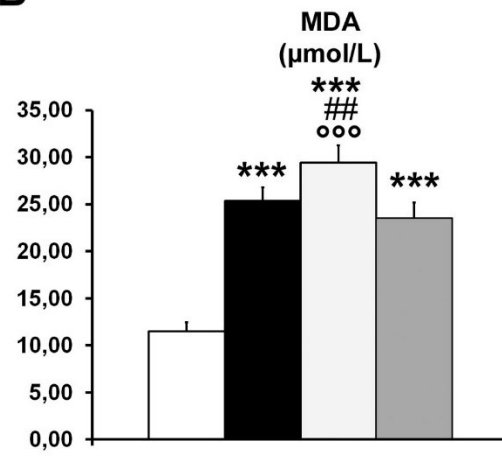
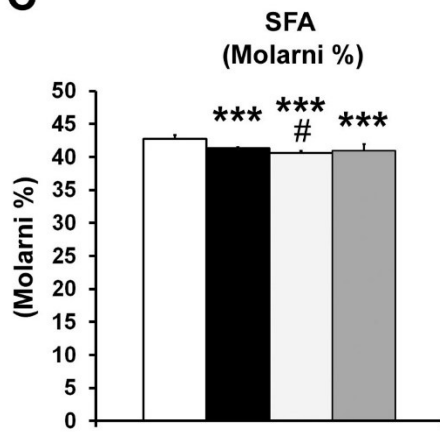
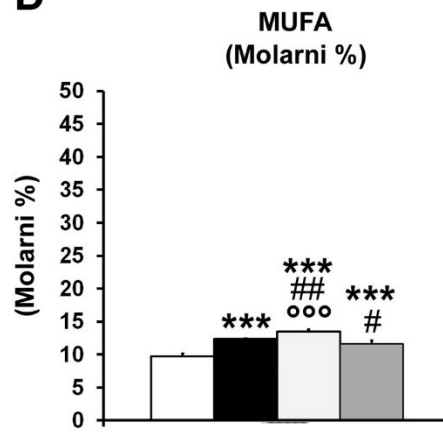
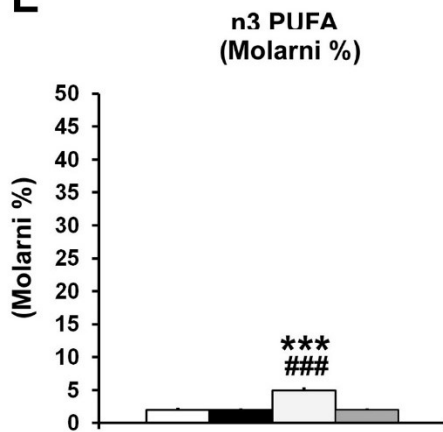
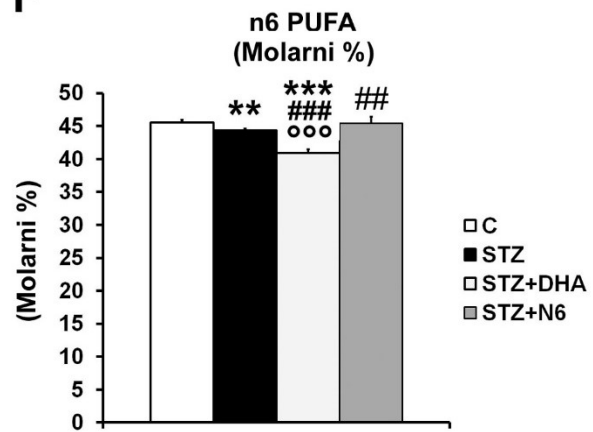
## **5. REZULTATI**

## 5.1 Razina glukoze u krvi i oksidacijski status u plazmi

Srednja razina glukoze u krvi (mmol/L) kod sve tri dijabetične skupine štakora bila je znatno viša u usporedbi s kontrolnom skupinom (Sl. 4a;  $p < 0,001$ ). Različiti sastav prehrane nije rezultirao promjenom razine glukoze u krvi u STZ+DHA ili STZ+N6, u usporedbi s normalno hranjenim štakorima sa šećernom bolešću (STZ skupina;  $p > 0,05$ ). Razina MDA u plazmi bila je značajno povećana u sve tri dijabetične skupine, u usporedbi s kontrolnom skupinom (Sl. 4b;  $p < 0,001$ ). Osim toga, razina MDA bila je viša u skupini STZ+DHA, u usporedbi sa skupinama STZ ( $p < 0,01$ ) i STZ+ N6 ( $p < 0,001$ ).

## 5.2 Masnokiselinski sastav fosfolipida u tkivu bubrega

Pojedinosti masnokiselinskog sastava fosfolipida u tkivu bubrega prikazane su u tablici 3. Sumirano, DM1 je rezultirao značajnim smanjenjem sadržaja zasićenih masnih kiselina (SFA;  $p < 0,001$ ) (Sl. 4c). To je smanjenje bilo vidljivo i u STZ+N6 i STZ+DHA eksperimentalnim skupinama ( $p < 0,001$  u usporedbi s C). Štoviše, suplementacija s DHA uzrokovala je dodatno smanjenje sadržaja SFA u analiziranom tkivu, u usporedbi sa skupinom STZ. Nasuprot tome, molarni postotak MUFA povećao se u sve tri dijabetične skupine, u usporedbi s kontrolnom ( $p < 0,001$ ; Sl. 4d). Međutim, suplementacija s n-6 PUFA rezultirala je smanjenjem udjela MUFA u skupini STZ+N6, u usporedbi sa skupinom STZ ( $p < 0,05$ ). S druge strane, molarni postotak MUFA u skupini STZ+DHA bio je najviši, što je više u usporedbi sa skupinama STZ i STZ+N6 ( $p < 0,01$  odnosno  $p < 0,001$ ). Očekivano, udio n-3 PUFA bio je najviši u skupini STZ+DHA, značajno viši u usporedbi s kontrolnom i ostalim STZ skupinama ( $p < 0,001$ ). Ipak, na udio n-3 PUFA nije utjecao DM1 kao ni dodatak n-6 PUFA (Sl. 4e). Za razliku od n-3, udio n-6 PUFA bio je najniži u skupini STZ+DHA ( $p < 0,001$ , u usporedbi s C, STZ i STZ+N6). DM1 kao zaseban faktor, uzrokovao je značajno smanjenje udjela n-6 PUFA, dok je u podskupini STZ+N6 n-6 PUFA udio na razini kontrolne skupine (Sl. 4f).

**A****B****C****D****E****F**

□ C  
 ■ STZ  
 □ STZ+DHA  
 ■ STZ+N6

**Slika 4. Razina glukoze u krvi, koncentracije malondialdehida i masnokiselinski sastav fosfolipida u tkivu bubrega.** (a) Razina glukoze u krvi na kraju eksperimenta u 4 skupine životinja. (b) Razine malondialdehida u plazmi (MDA). (c–f) Molarni udio različitih masnih kiselina u sastavu fosfolipida tkiva bubrega u 4 eksperimentalne skupine štakora. (c) Molarni % - zasićene masne kiseline; (d) mononezasićene masne kiseline; (e) omega 3 i (f) omega 6 PUFA. \*\*p < 0,01; p < 0,001 naspram C; #p < 0,05; ##p < 0,01; ###p < 0,001 naspram STZ; °°°p < 0,001 naspram STZ+N6

**Kratice:** GUK - glukoza u krvi, MDA – malondialdehid u plazmi, MUFA - mononezasićene masne kiseline, SFA - zasićene masne kiseline; n-3 PUFA - omega 3 višestrukonezasićene masne kiseline, n-6 PUFA - omega 6 višestrukonezasićene masne kiseline, C - kontrolna skupina; STZ - DM1 skupina, STZ+DHA - DM1 skupina hranjena s omjerom n-6/n-3 od 1 (16% EPA i 19% DHA), STZ+N6 - DM1 skupina s omjerom n-6/n-3 od 60.

**Tablica 3. Masnokiselinski sastav fosfolipida u tkivu bubrega**

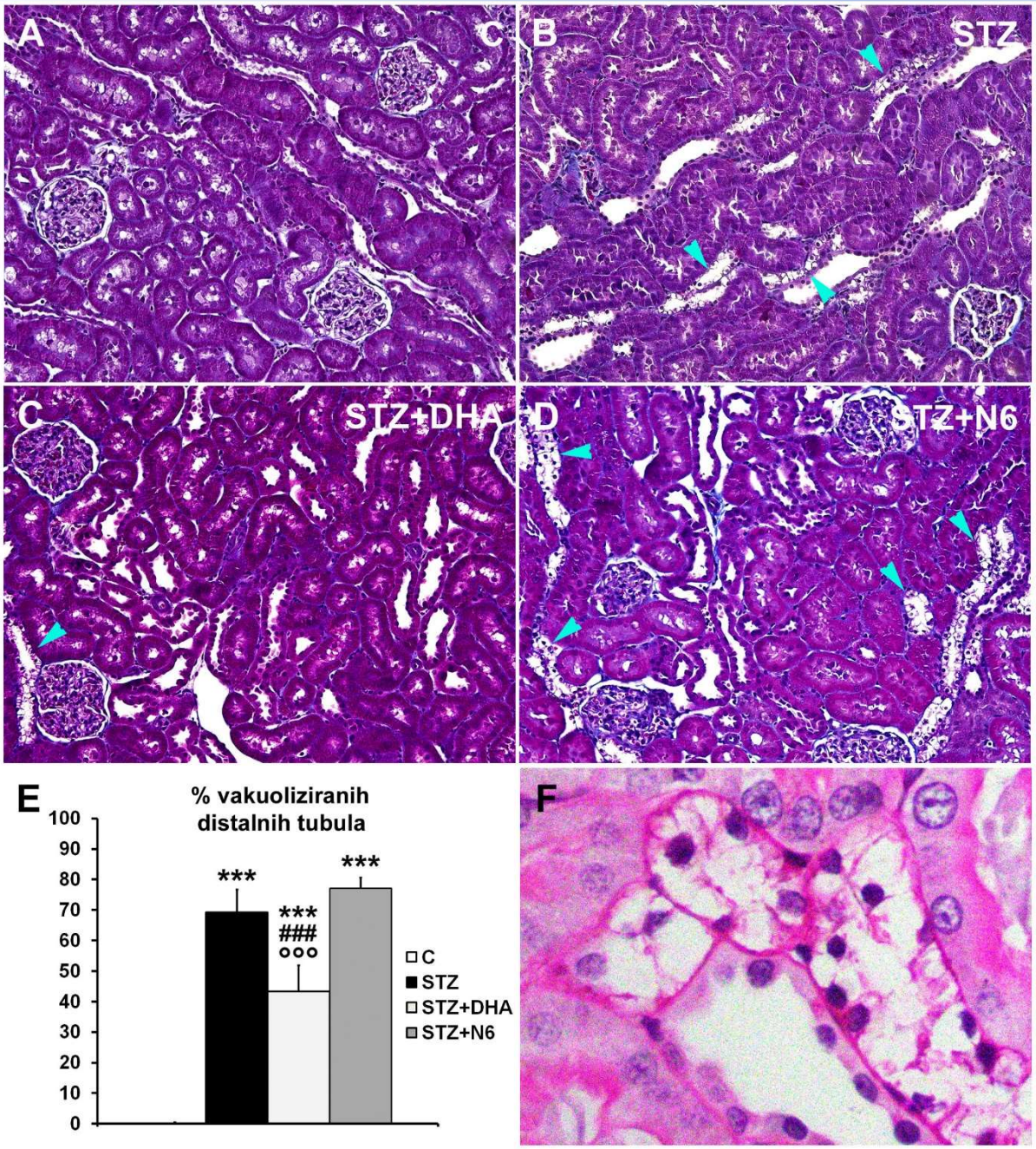
	Kontrola (C)		STZ		STZ+DHA			STZ+N6		P		
	M±SD		M±SD		M±SD			M±SD				
C14:0	0.13	±0.01	0.07	±0.01	***	0.08	±0.01	***	0.10	±0.02	**#	<0.0001
C16:0	21.52	±0.18	21.57	±0.10		21.31	±0.62	°	20.20	±0.30	**###	0.0002
C16:1	0.23	±0.05	0.04	±0.01	***	0.21	±0.03	°°###	0.07	±0.02	***	<0.0001
C18:0	21.10	±0.48	19.69	±0.12	***	19.23	±0.49	***°°°	20.67	±0.21	##	<0.0001
C18:1n-9	7.91	±0.33	10.92	±0.12	***	10.99	±0.20	***°°	10.11	±0.52	**#	<0.0001
C18:1n-7	1.60	±0.14	1.38	±0.03	*	2.31	±0.13	***###°°	1.43	±0.07		<0.0001
C18:2n-6	10.75	±0.75	12.34	±0.14	*	16.15	±0.81	***###	13.14	±0.67	***	<0.0001
C18:3n-3	0.03	±0.02	0.06	±0.01		0.00	±0.00	*###°°	0.13	±0.02	**###	<0.0001
C20:3n-6	0.47	±0.08	0.62	±0.02	*	0.60	±0.05	*	0.61	±0.07	*	0.0112
C20:4n-6	34.09	±0.96	31.06	±0.28	***	24.17	±0.68	***###°°	31.48	±1.05	**	<0.0001
C20:5n-3	0.22	±0.07	0.03	±0.02		1.28	±0.22	***###°°	0.11	±0.04		<0.0001
C22:4n-6	0.21	±0.04	0.30	±0.03	*	0.02	±0.04	***###°°	0.18	±0.04	###	<0.0001
C22:5n-3	0.15	±0.03	0.15	±0.01		0.23	±0.04	*#°	0.16	±0.04		0.0067
C22:6n-3	1.60	±0.05	1.77	±0.05		3.43	±0.23	***###°°	1.62	±0.11		<0.0001

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost (engl. *mean*, M) ± standardna devijacija (engl. *standard deviation*, SD) pri čemu \* označava značajnu razliku naspram C - kontrolne skupine životinja za 3 eksperimentalne skupine životinja; STZ, DM1 skupina; STZ+DHA, DM1 skupina hranjena s omjerom n-6/n-3 od 1 (16% EPA i 19% DHA); STZ+N6, DM1 skupina s omjerom n-6/n-3 od 60. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001. # označava značajnu razliku naspram skupine STZ za 2 eksperimentalne skupine životinja STZ+DHA i STZ+N6; ## p < 0,01; ### p < 0,001. ° označava značajnu razliku naspram skupine STZ+N6 za STZ+DHA skupinu; ° p < 0,05; °° p < 0,01; °°° p < 0,001.

## **5.3 Utjecaj šećerne bolesti tipa 1 i suplementacije višestrukonezasićenim masnim kiselinama na distalne kanaliće bubrega štakora**

### **5.3.1 Histološka bojenja**

Histološki presjeci bubrega obojeni trikromnim bojenjem po Malloryju u kontrolnoj skupini štakora pokazali su normalnu strukturu DTC-a (Sl. 5a). Dijelovi bubrega u sve tri dijabetične skupine sadržavale su mnoge vakuolizirane distalne kanaliće, čija je stanična struktura bila potpuno uništena (Sl. 5b–d). Analiza je pokazala značajno veći udio distalnih kanalića s vakuoliziranim stanicama bubrega svih dijabetičnih štakora, ali je značajno niži postotak bio prisutan u skupini STZ+DHA (Sl. 5e). Sadržaj u vakuolama naknadno je posredno ispitan oil red bojenjem (Sl. 10). PAS bojenje pokazalo je da u DTC nema nakupljanja glikogena (Sl. 5f).



**Slika 5. Trikromno bojenje po Malloryju u bubregu eksperimentalnih štakora.**

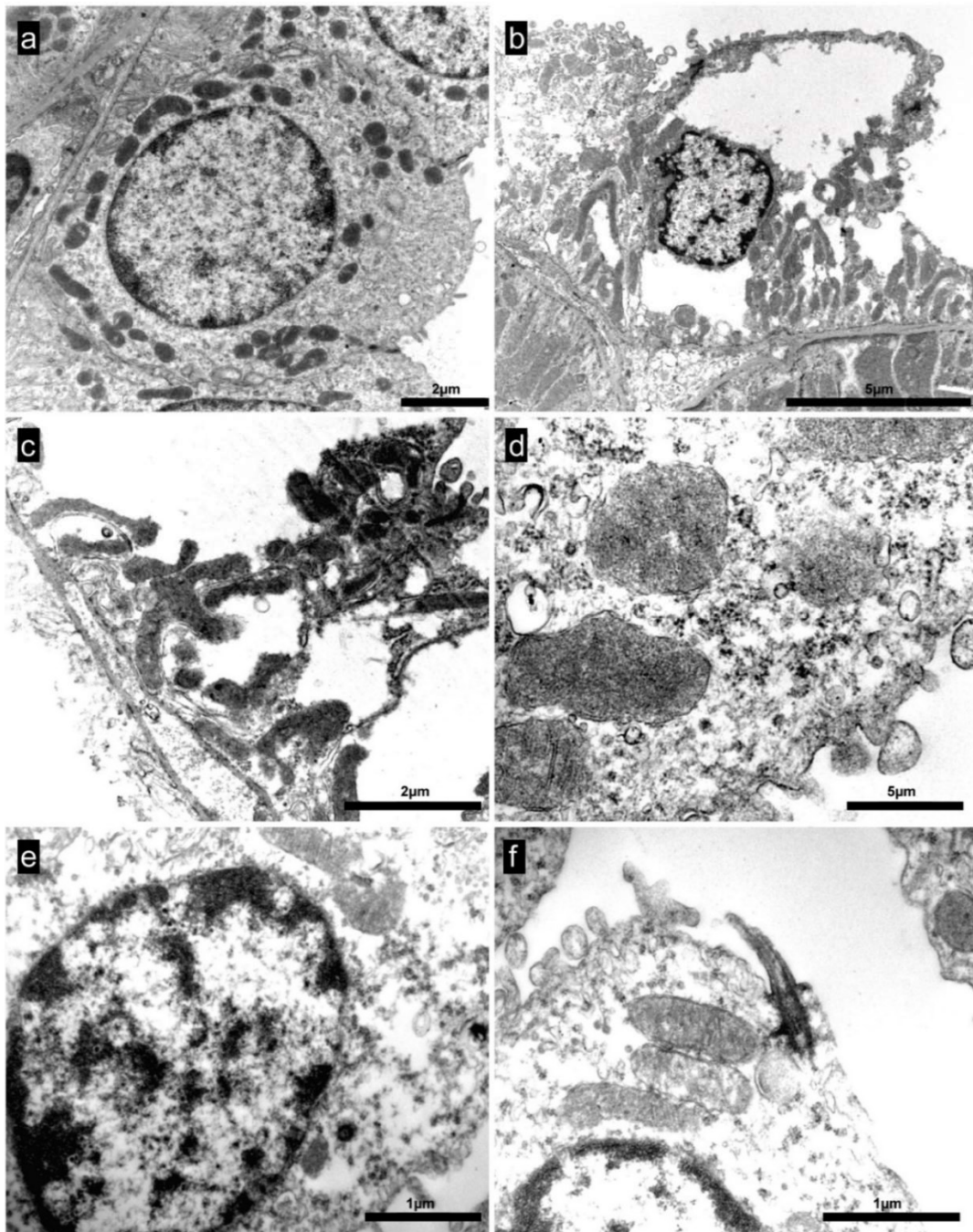
Normalna struktura stanica distalnih kanalića (DTC) u histološkom presjeku bubrega, u kontrolnoj skupini štakora (a). Uništena stanična struktura s vakuoliziranim distalnim kanalićima vidljiva je u svim podskupinama eksperimentalnih životinja s DM1 (STZ, STZ+DHA, STZ+N6); (b–d). Kvantifikacija postotka vakuoliziranih distalnih kanalića (e). Reprezentativne fotografije preparata bojenih PAS bojenjem pokazuju uništene, vakuolizirane distalne kanaliće (pored sačuvanih kanalića) i otkrivaju da ove vakuole nisu posljedica nakupljanja glikogena (f). \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  naspram C. Mjerna skala na d = 40  $\mu\text{m}$  (odnosi se na a–d); mjerna skala na f = 20  $\mu\text{m}$ .

**Kratice:** C - kontrolna skupina. STZ - DM1 skupina, STZ+DHA - DM1 skupina hranjena hranom s omjerom n-6/n-3 od 1 (s 16% EPA i 19% DHA). STZ+N6 - DM1 skupina hranjena hranom s omjerom n-6/n-3 od 60.



### **5.3.2 Ultrastruktura stanica distalnih kanalića**

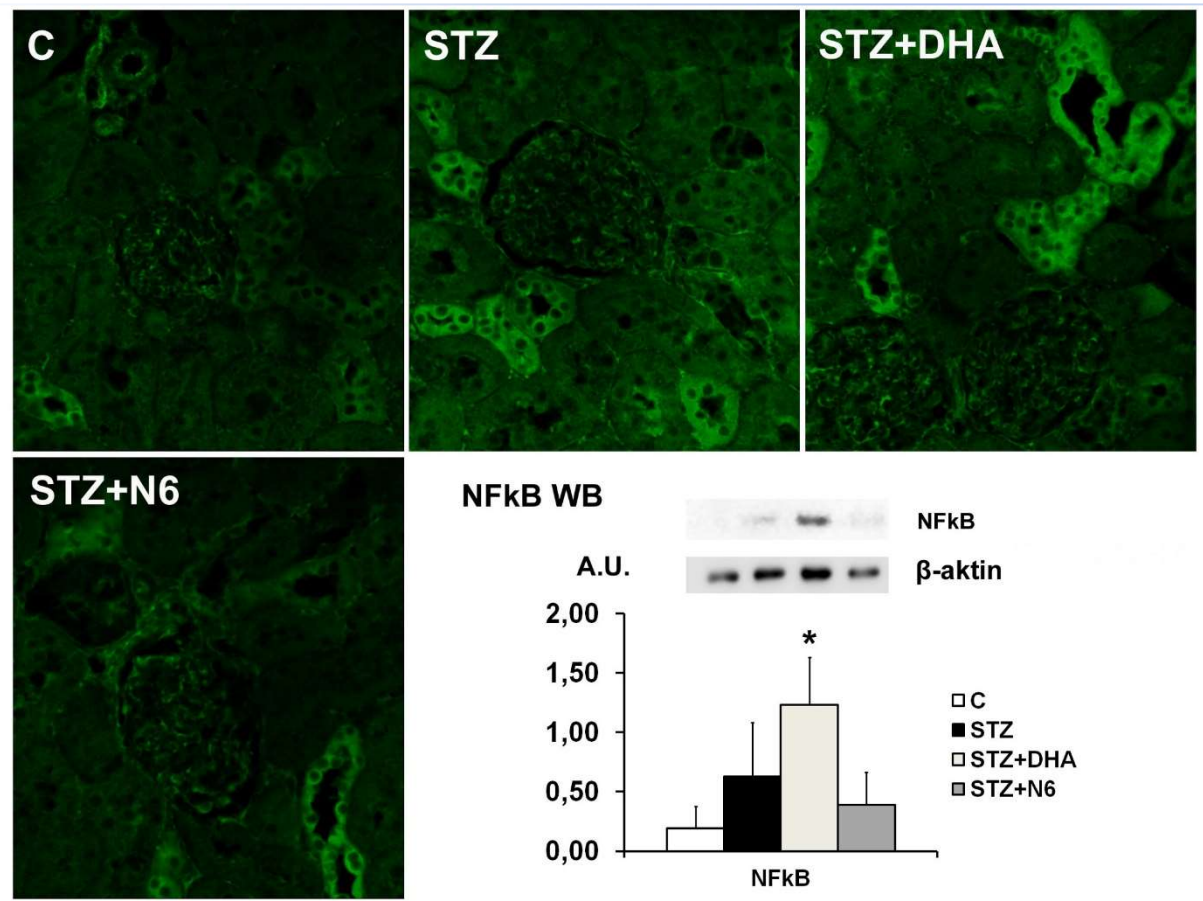
Ultrastruktorna analiza DTC u dijabetičnim skupinama štakora pokazala je skvrčavanje jezgara, uz kondenzaciju kromatina i gotovo potpuni gubitak citoplazme (Sl. 6b–f). Mitohondriji su bili oštećeni i, zajedno s ostalim organelama, gurnuti prema bazalnom dijelu citoplazme. Ultrastruktorna analiza potvrdila je da nije bilo nakupljanja lipida niti glikogena u DTC.



**Slika 6. Mikrofotografije stanica distalnih kanalića napravljene transmisijom elektronskim mikroskopom (TEM).** Reprezentativne TEM mikrofotografije distalnih kanalića (a–f). (a) Očuvana stanica distalnog kanalića (DTC). Ultrastrukturalna analiza DTC dijabetičnog štakora otkrila je gubitak citoplazme (b–d), skvrčavanje jezgara (b) i kondenzaciju kromatina (b i e). Mitohondriji i ostale organele su oštećene (c i d) i potisnute u bazolateralni stanični odjeljak (b i c). (f) Apikalni dio oštećenih DTC, s primarnom cilijom. Nije primijećeno nakupljanje lipida ili glikogena (b–f).

### **5.3.3 Izražaj nuklearnog čimbenika kappa B (NF-kB)**

Rezultati imunohistokemijskog bojenja protutijelom protiv NF-kB pokazali su najjaču NF-kB imunofluorescenciju u distalnim kanalićima (Sl. 7a–d). Rezultati Western blot analize pokazali su značajno povećanje izražaja NF-kB u bubrezima štakora iz skupine STZ+DHA u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $p < 0,05$ ; Sl. 7e). Nije bilo statistički značajne razlike između kontrolne, STZ i STZ+N6 skupine.

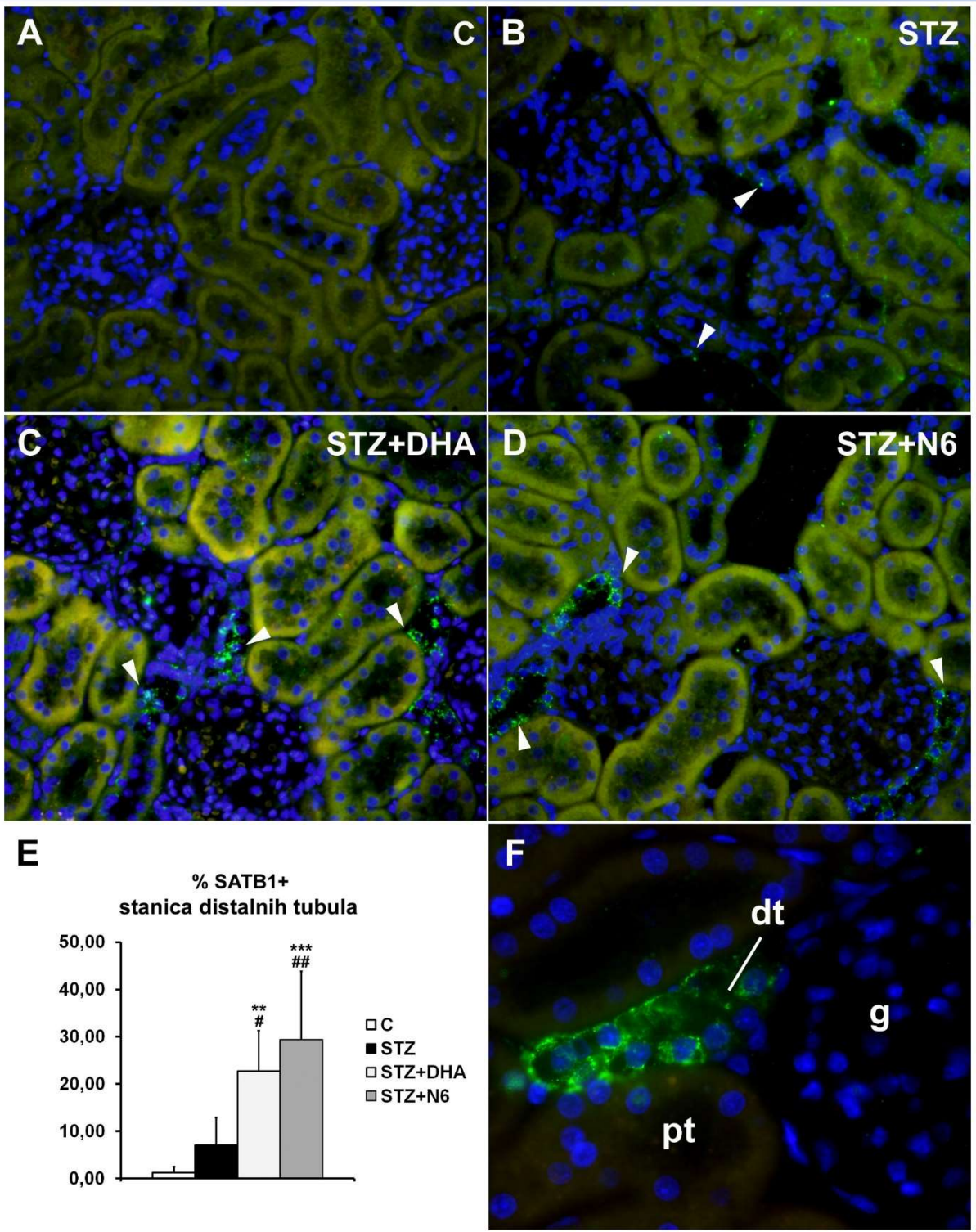


**Slika 7. Izražaj nuklearnog čimbenika kappa B (NF-kB) u bubrezima eksperimentalnih štakora.** Reprezentativne mikrofotografije izražaja NF-kB u bubrezima. Najjača NF-kB imunofluorescencija opažena je u distalnim kanalićima. (a) kontrolna grupa; (b) STZ grupa; (c) STZ+DHA grupa; (d) STZ + N6 grupa. (e) Western blot (WB) - kvantifikacija izražaja NF-kB-a pokazuje statistički značajno povećanje u skupini STZ+DHA u usporedbi s C (\* $p < 0,05$ ). Mjerna skala = 20  $\mu$ m

**Kratice:** C – kontrolna skupina, STZ - DM1 skupina, STZ+DHA - DM1 skupina hranjena hranom s n-6/n-3 omjerom 1 (16% EPA i 19% DHA), STZ+N6 - DM1 skupina na prehrani s n-6/n-3 omjerom 60, WB – Western blot, A.U. – engl. *arbitrary units* – proizvoljne jedinice

#### **5.3.4 Izražaj proteina koji organizira kromatin / globalnog transkripcijskog regulatora (SATB1)**

Primjenom imunohistokemije analizirali smo izražaj SATB1 u presjecima kore bubrega eksperimentalnih štakora. Pronašli smo vrlo slab izražaj SATB1 u proksimalnim kanalićima. U suprotnosti s izražajem u proksimalnim kanalićima, vrlo jaka imunofluorescencija SATB1 pronađena je u distalnim kanalićima dijabetičnih štakora (Sl. 8). Imunofluorescencija SATB1 pronađena je vrlo rijetko u DTC kontrolnih, nedijabetičnih štakora. Analizirali smo ukupan broj DTC, kao i broj DTC s pozitivnim izražajem SATB1 u bubregu svih skupina životinja. Povećani postotak SATB1-imunoreaktivnih DTC pronađen je u skupinama STZ+DHA i STZ+N6, u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $p < 0,01$ ). Također smo analizirali broj SATB1 pozitivnih stanica po glomerulu, ali nismo pronašli statistički značajne razlike između skupina (podaci nisu prikazani).

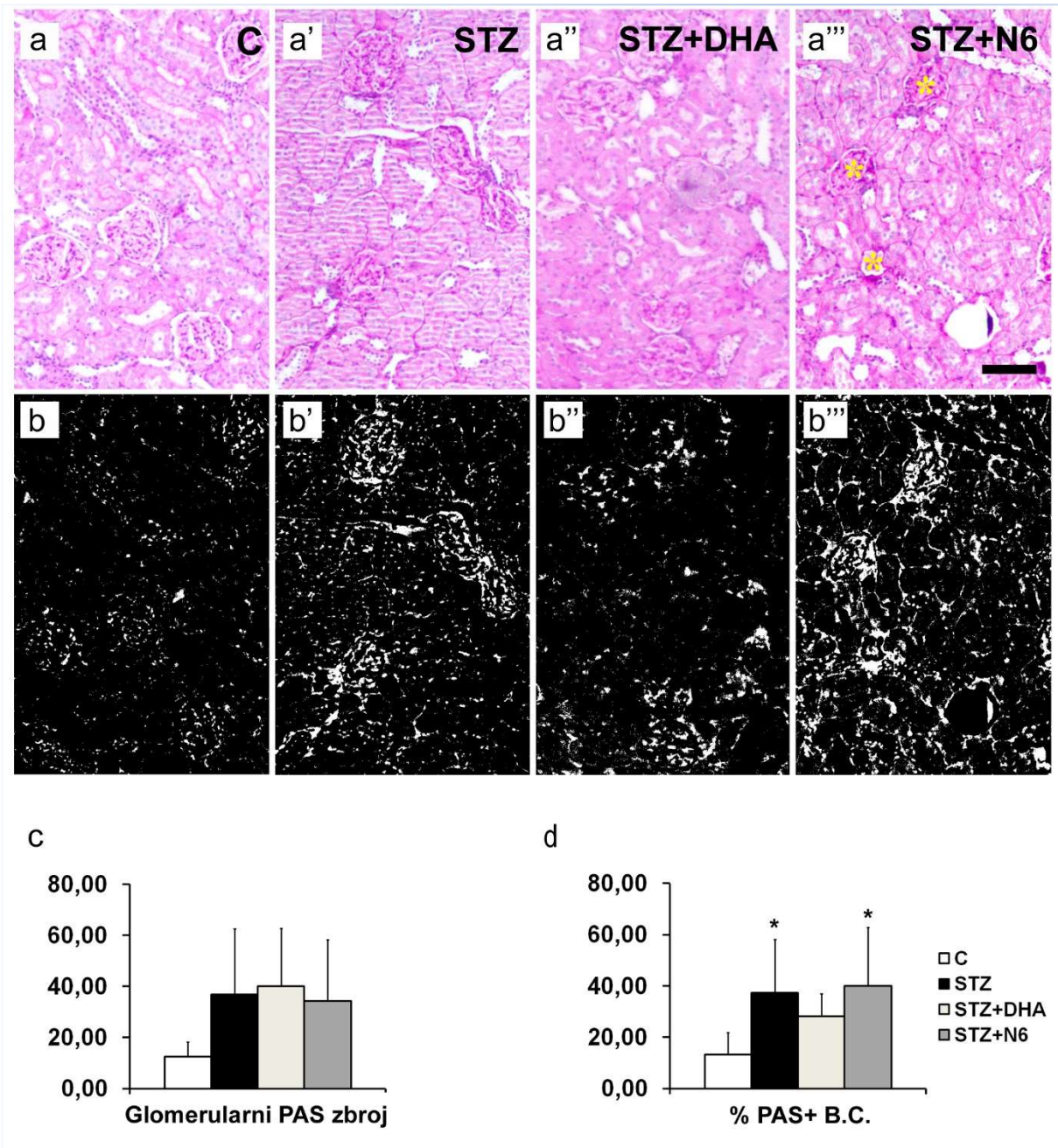


**Slika 8. Izražaj proteina koji organizira kromatin / globalnog transkripcijskog regulatora (SATB1) u bubrezima eksperimentalnih štakora.** Reprezentativne mikrofotografije izražaja SATB1 u bubrezima eksperimentalnih štakora. (a) kontrolna grupa životinja, (b) STZ skupina, (c) STZ+DHA skupina i (d) STZ+N6 skupina životinja. Strelice prikazuju SATB1-imunoreaktivne stanice distalnih kanalića (DTC). Kvantifikacija stanica s pozitivnim izražajem SATB1 pokazuje povećani ukupni udio stanica DTC s izražajem SATB1 u STZ+DHA i STZ+N6 skupinama u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $p < 0,01$ ; e). Reprezentativna mikrofotografija izražaja SATB1 u distalnim kanalićima STZ+N6 skupine eksperimentalnih životinja s najvišim izražajem ( $100\times$  uvećanje; f), mjerna skala na  $d = 20 \mu\text{m}$  (odnosi se na a–d); skala za f =  $20 \mu\text{m}$ .

**Kratice:** **g** – glomerul, **pt** - proksimalni kanalići, **dt** - distalni kanalići; **C** - kontrolna skupina. **STZ** - DM1 skupina, **STZ+DHA** - DM1 skupina hranjena hranom s omjerom n-6/n-3 od 1 (s 16% EPA i 19% DHA). **STZ+N6** - DM1 skupina hranjena hranom s omjerom n-6/n-3 od 60.

### 5.3.5 Bojenje perjodnom kiselinom i Shiffovim reagensom (Periodic acid–Shiff PAS)

PAS bojenje u glomerulima pokazalo je veću ekspanziju mezangija u DM1 skupinama štakora (Sl. 9a–c). Analiza je pokazala istaknutu akumulaciju PAS bojenja u Bowmanovoj čahuri štakora u podskupini STZ+N6 (Sl. 9d).





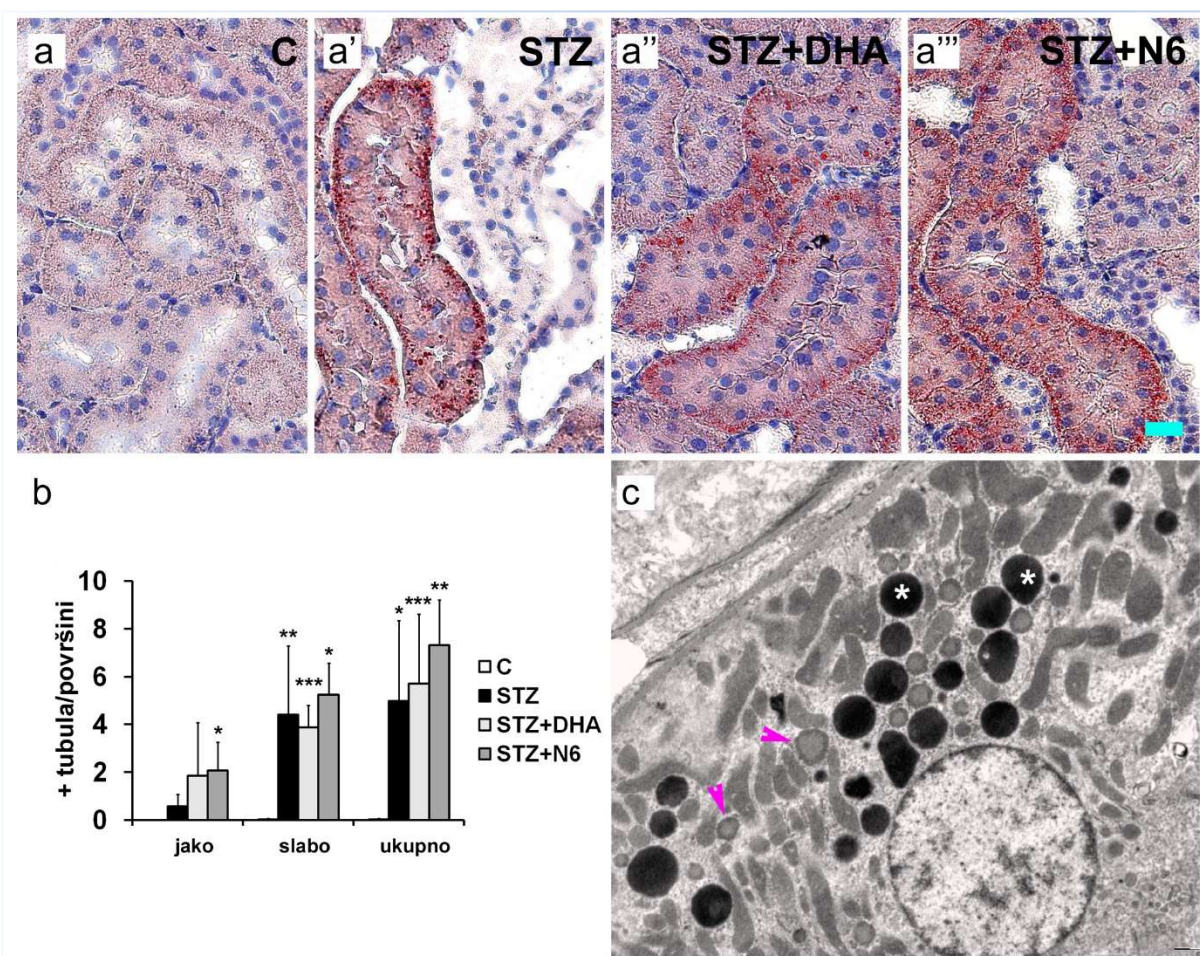
**Slika 9. Bojenje perjodnom kiselinom i Shiffovom reagensom (Periodic acid–Shiff - PAS) u tkivima bubrega eksperimentalnih štakora.** (a–a'') Reprezentativne fotografije površine presjeka bubrega eksperimentalnih skupina štakora obojenih PAS bojenjem. (b–b'') Iste fotografije ukupne PAS površine s oduzetom pozadinom i označenom površinom intenzivnog ružičastog bojenja metodom graničnog praga; (c) Glomerularni PAS zbroj; (d) kvantifikacija glomerula sa zadebljanom Bowmanovom čahurom (B.C.) pokazala je naglašenu akumulaciju PAS bojenja u skupini štakora STZ + N6. (a, b) – kontrolna skupina (C); (a', b') – STZ skupina; (a'', b'') – STZ+DHA skupina; STZ+N6 skupina. (a''', b'''). \*  $p < 0,05$  naspram C; \*  $p < 0,05$  naspram STZ+N6. Mjerna skala = 100  $\mu\text{m}$ .

**Kratice:** B.C. - Bowmanova čahura, C - kontrolna skupina. STZ - DM1 skupina, STZ+DHA - DM1 skupina hranjena hranom s omjerom n-6/n-3 od 1 (s 16% EPA i 19% DHA). STZ+N6 - DM1 skupina hranjena hranom s omjerom n-6/n-3 od 60.

## **5.4 Utjecaj šećerne bolesti tipa 1 i suplementacije višestrukonezasićenim masnim kiselinama na proksimalne kanaliće bubrega štakora**

### **5.4.1 Ektopično nakupljanje lipida u proksimalnim kanalićima dijabetičnih štakora**

Nisu pronađeni znakovi nakupljanja lipida u bubrezima kontrolnih štakora. Oil red bojenje pokazalo je da DM1 može uzrokovati izraženo nakupljanje neutralnih lipida u PTC (Sl. 10a–a" i b). Nakupljanje lipida nije pronađeno u DTC ili u glomerulima. Rezovi bubrega štakora iz skupine STZ+N6 imali su najveći postotak intenzivno i ukupno (intenzivno + slabo) obojenih oil red-pozitivnih proksimalnih kanalića (10b). TEM je potvrdila postojanje lipidnog nakupljanja u citoplazmi stanica PT, koje je bilo najizraženije u skupini STZ+N6. Lipidne kapljice pronađene u PTC bile su koncentrirane u bazalateralnom staničnom odjeljku; bile su veće u promjeru od endocitoznih vezikula i s velikom elektronskom gustoćom. (Sl. 10c; Sl. 12a–d).

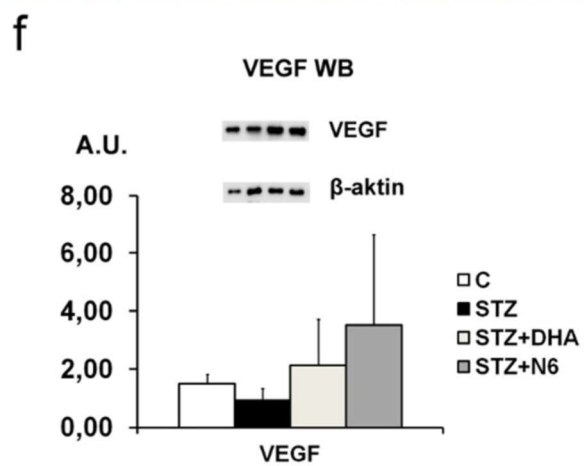
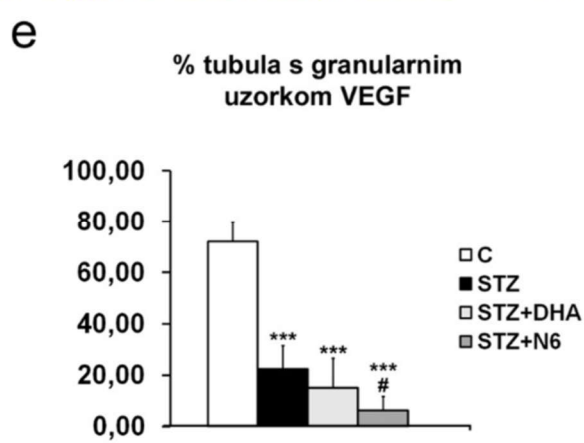
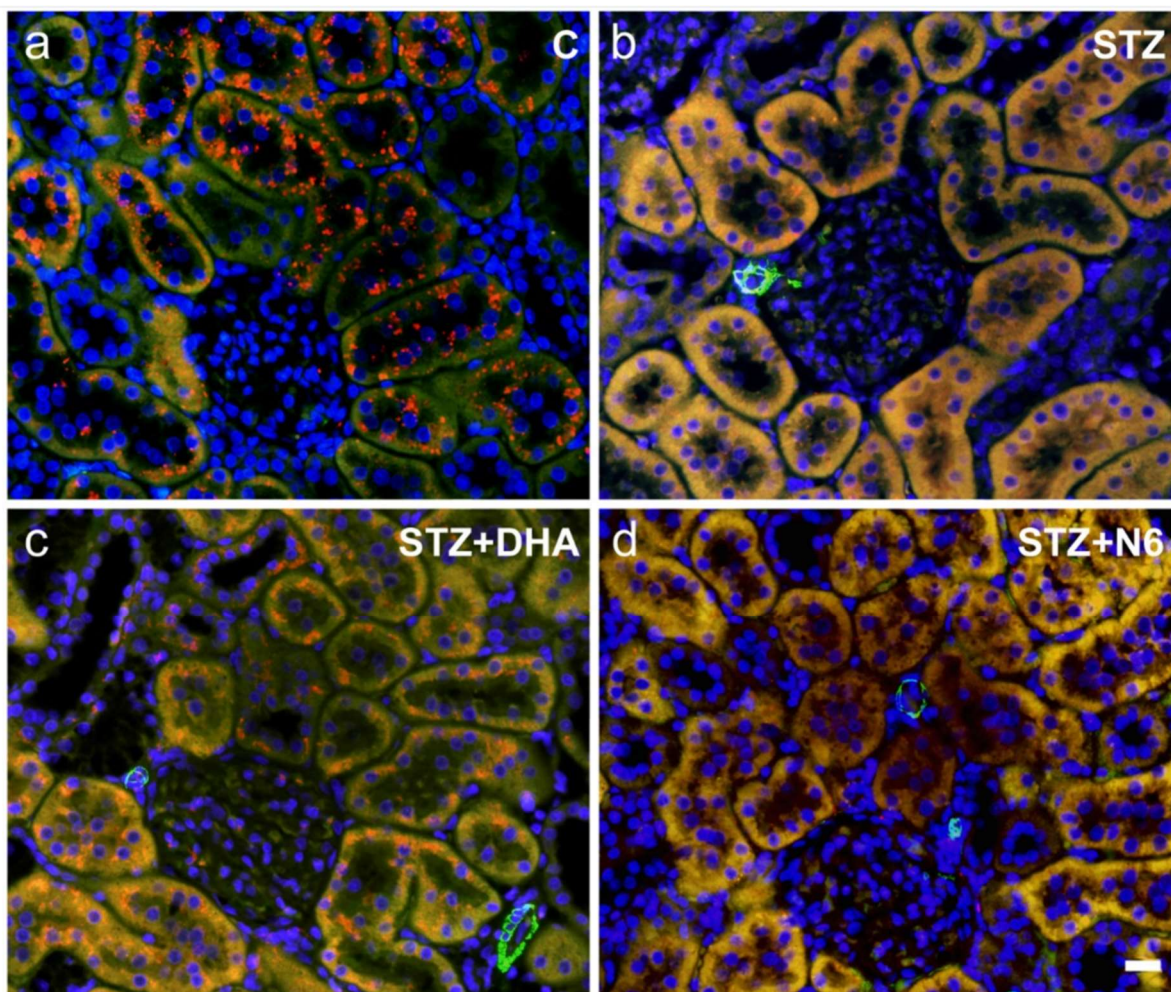


**Slika 10. Ektopično nakupljanje lipida u bubrezima eksperimentalnih štakora.** (a–a'') Reprezentativne fotografije bojenja oil red metodom u stanicama proksimalnih kanalića (PTC) u različitim skupinama životinja bez nakupljanja lipida u PTC kontrolnih štakora i s učestalim nakupljanjem lipida u PTC bubrega štakora skupina STZ, STZ+N6 i STZ+DHA. (b) Kvantifikacija oil red-pozitivnih proksimalnih kanalića. (c) Reprezentativna TEM fotografija PTC s LD koja pokazuje jaku gustoću (zvjezdica) u većem povećanju. (a) – kontrolna skupina; (a') – STZ skupina; (a'') – STZ+DHA skupina; a''' – STZ+N6 skupina. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs.C. Mjerna skala je  $a = 20 \mu\text{m}$ .

**Kratice:** LD – masne kapljice, C - kontrolna skupina, STZ - DM1 skupina, STZ+DHA - DM1 skupina hranjena hranom s n-6/n-3 omjerom 1 (sa 16% EPA i 19% DHA), STZ+N6 - DM1 grupa hranjena hranom s n-6/n-3 omjerom 60.

#### **5.4.2 Utjecaj šećerne bolesti tipa 1 i suplementacije višestrukonezasićenim masnim kiselinama na izražaj čimbenika rasta vaskularnog endotela u stanicama proksimalnih kanalića**

Bubrezi kontrolne skupine štakora pokazali su znatno veći broj proksimalnih kanalića s VEGF-imunoreaktivnim granulama citoplazmi u usporedbi sa svim ostalim skupinama životinja ( $p < 0,001$ ; Sl. 11e). U svim skupinama koje su dobile STZ, još uvijek je primijećena vrlo intenzivna VEGF imunofluorescencija, ali je ona difuzna te nije koncentrirana u obliku granuliranog uzorka kao u kontrolnoj skupini štakora. Najmanji broj kanalića s očuvanim granuliranim uzorkom pronađen je u skupini STZ+N6 ( $p < 0,05$ ). Međutim, unatoč značajnoj promjeni uzorka izražaja, Western blot analiza nije pokazala značajne razlike u VEGF izražaju među različitim skupinama ( $p > 0,05$ ; Sl. 11f).

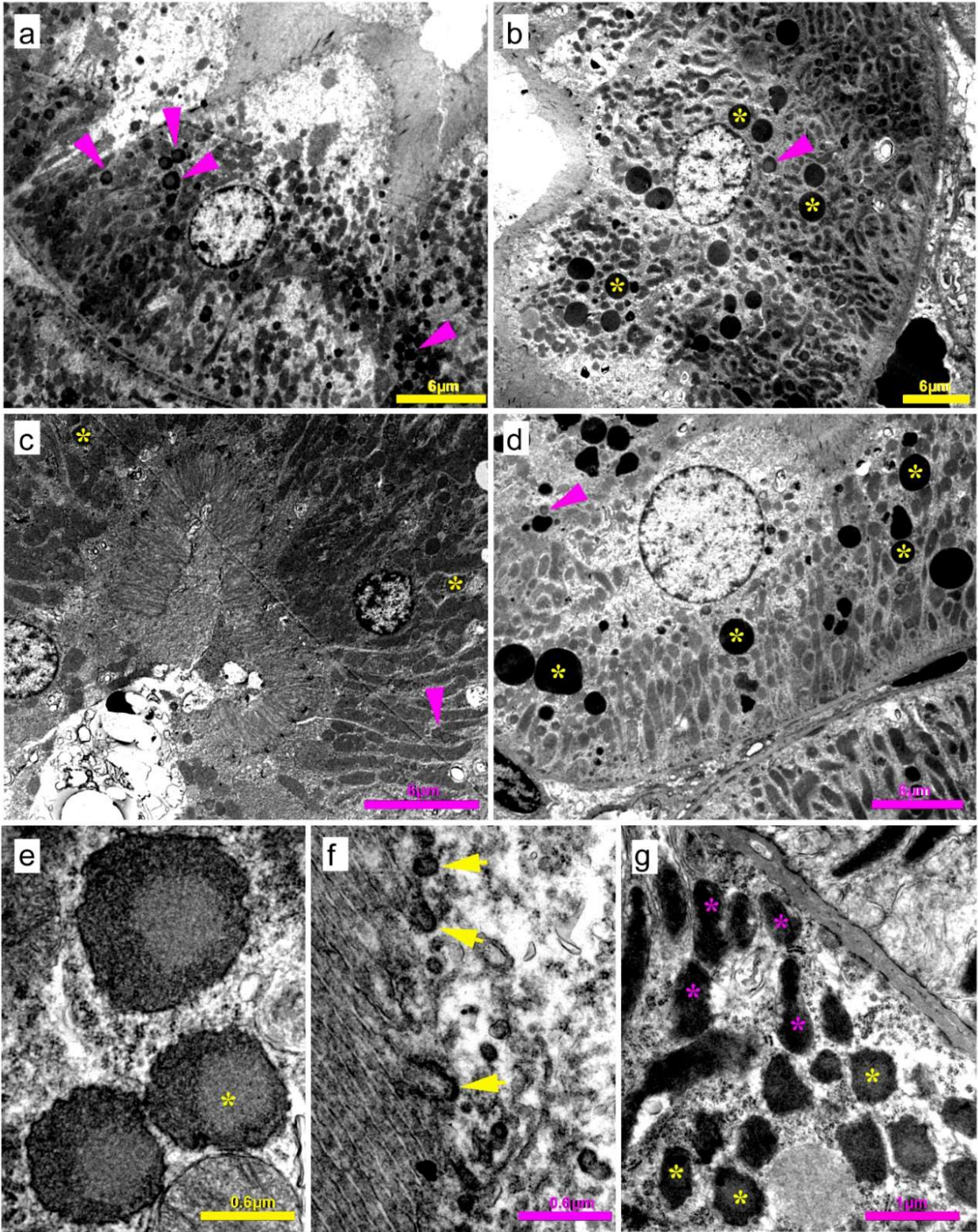


**Slika 11. Izražaj čimbenika rasta vaskularnog endotela (VEGF) u proksimalnim kanalićima eksperimentalnih štakora.** (a) Reprezentativna fotografija izražaja VEGF (crveno) koji je vidljiv kao granulirani uzorak u stanicama proksimalnih kanalića (PTC) kontrolne skupine životinja. Rezovi su kontrastno obojeni alfa glatkim aktinom (zeleno, u stjenci žile), a jezgre su obojene DAPI-jem (plavo). (b–d) Reprezentativne mikrofotografije bubrega štakora iz DM1 skupine s difuznijim VEGF bojenjem PT i vrlo rijetkim VEGF-imunoreaktivnim granulama u citoplazmi. (e) Kvantifikacija je otkrila najmanji postotak kanalića s očuvanim VEGF granuliranim uzorkom u svim DM1 skupinama ( $p < 0,001$ ). Skupina STZ+N6 imala je značajno manji broj kanalića s očuvanim granuliranim uzorkom u usporedbi s DM1 skupinom ( $p < 0,05$ ). (f) Unatoč značajnoj promjeni uzorka izražaja, Western blot analiza (WB) nije pokazala značajne razlike izražaja VEGF-proteina između skupina. \*\*\* $p < 0,001$  naspram C; #  $p < 0,05$  naspram STZ. Mjerna skala = 20  $\mu\text{m}$

**Kratice:** **WB** – Western blot, **C** - kontrolna skupina, **STZ** - DM1 skupina, **STZ+DHA** - DM1 skupina hranjena hranom s n-6/n-3 omjerom 1 (sa 16% EPA i 19% DHA), **STZ+N6** - DM1 skupina štakora hranjena hranom s omjerom n-6/n-3 60.

### **5.4.3 Transmisijska elektronska mikroskopija bubrega obojenih na čimbenik rasta vaskularnog endotela (VEGF) imunogold tehnikom**

TEM je dodatno potvrdila rezultate svjetlosne mikroskopije vezano za ektopično nakupljanje lipida i uzorak izražaja VEGF (Sl. 12). U stanicama PT bubrega štakora iz kontrolne skupine nađen je veliki broj VEGF-imunoreaktivnih vezikula u citoplazmi, dok su u bubrezima štakora iz skupine STZ VEGF-imunoreaktivne vezikule još uvijek bile prisutne, ali u znatno manjem broju. U toj skupini citoplazma je sadržavala brojne masne kapljice koje su bile veće od VEGF-imunoreaktivnih vezikula i imale su vrlo visoku gustoću (tamno na fotografijama). Citoplazma u PTC štakora iz skupine STZ+DHA također je sadržavala masne kapljice, dok su VEGF-imunoreaktivne vezikule bile vrlo rijetke. U citoplazmi PTC štakora iz skupine STZ+N6 pronađene su velike masne kapljice zajedno s rijetkim VEGF-imunoreaktivnim vezikulama. Veliko povećanje pokazalo je da je VEGF imunoreaktivnost prisutna u površinskim dijelovima vezikula i njihovoj membrani. Jaka VEGF imunoreaktivnost povremeno je bila prisutna na bazi četkaste prevlake apikalne membrane PTC. Oštećeni mitohondriji i deformirane endocitne vezikule opažene su u PTC dijabetičnih štakora. Snažna VEGF imunoreaktivnost bila je prisutna i u nožicama podocita kod dijabetičnih štakora, što potvrđuje kontinuiranu proizvodnju VEGF-a u bubregu.





**Slika 12. Mikrofotografije proksimalnih kanalića bubrega obojenih na čimbenik rasta vaskularnog endotela (VEGF) tehnikom imunogold, snimljene transmisivnim elektronskim mikroskopom.** Reprezentativne TEM mikrofotografije proksimalnih kanalića (a–f). (a) Stanice proksimalnih kanalića (PTC) iz kontrolne skupine (C skupine) s velikim brojem VEGF-imunoreaktivnih vezikula (primjeri su naznačeni ružičastim vrhovima strelica) u citoplazmi, potvrđuju nalaz fluorescencijske svjetlosne mikroskopije. (b) U bubrezima iz skupine DM1 (STZ), VEGF-imunoreaktivne vezikule još uvijek prisutne, ali u manjem broju. Prisutan je veliki broj masnih kapljica (LD; primjeri su označeni žutom zvjezdicom) u citoplazmi, koje su veće od vezikula i imaju vrlo visoku gustoću. (c) Citoplazma PTC u DM1 skupini hranjenoj omjerom n-6/n-3 od 1 (16% EPA i 19% DHA; STZ+DHA) sadrži masne kapljice, dok su VEGF-imunoreaktivne vezikule vrlo rijetke. (d) U citoplazmi PTC DM1 skupine hranjene s omjerom n-6/n-3 od 60 (STZ+N6) pronađen je veliki broj masnih kapljica s rijetkim VEGF-imunoreaktivnim vezikulama. (e) VEGF-imunoreaktivne vezikule u kontrolnoj skupini štakora prikazane pod velikim povećanjem. Imunoreaktivnost VEGF-a kondenzirana je na površinskim dijelovima vezikule i njihovoj membrani. (f) Detalj stvaranja endocitne vezikule (strelice) u podnožju mikrovila apikalne membrane u PTC, jaka imunoreaktivnost VEGF-a. (g) Oštećeni mitohondriji (označeni ružičastom zvjezdicom) i deformirane endocitne vezikule (označene žutom zvjezdicom) u PTC dijabetičnih štakora, prikazani pod velikim povećanjem.

## **6. RASPRAVA**

Rezultati ovog istraživanja na STZ-om induciranom štakorskom modelu DM1 pokazali su značajne promjene u masnokiselinskom sastavu fosfolipida u bubregu na koji je snažno utjecao prehrambeni sastav PUFA. Suplementacija n-6 PUFA-ma u prehrani dijabetičnih štakora spriječila je smanjenje n-6 u fosfolipidima uzrokovano DM1, ali je rezultirala nižom razinom MUFA u fosfolipidima. S druge, strane suplementacija s DHA/EPA rezultirala je povećanjem udjela n-3 PUFA i MUFA u fosfolipidima bubrega, ali i smanjenjem udjela n-6 PUFA. Naši podaci su u suglasju s rezultatima istraživanja koje su proveli Di Stasi i suradnici, koji su dokazali da dodatak prehrani s različitim količinama EPA i DHA može brzo promijeniti sastav masnih kiselina u membranama krvnih stanica, a vjerojatno i u drugim tkivima (119).

Većina masnih kiselina u stanicama esterificirana je u fosfolipidima (138). Smanjenje udjela SFA i istodobno povećanje sadržaja MUFA u fosfolipidima bubrega koje je uočeno tijekom DM1 moglo bi se objasniti pojačanim izražajem stearoil-CoA desaturaze-1 (SCD-1), ključnog enzima odgovornog za pretvaranje lipotoksičnih SFA u manje lipotoksične MUFA, što bi moglo odgovarati mehanizmu prilagodbe koji je povezan s metaboličkim poremećajima (139, 140), uz gubitak lipogenog utjecaja inzulina na sintezu masnih kiselina (123). Lipotoksičnost povezana s nakupljanjem SFA dovodi do disfunkcije mitohondrija te rezultira fibrozom i oštećenjem stanica bubrega. In vitro istraživanja pokazala su da nakupljanje SFA potiče stres endoplazmatskog retikuluma, mitohondrijsku disfunkciju, upalni odgovor i apoptozu u podocitima i tubularnim stanicama. Za razliku od SFA, MUFA imaju učinak na povećanje  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina te na taj način štite podocyte od ozljeda izazvanih djelovanjem SFA (141-144). Općenito možemo reći da lipotoksičnost ovisi o duljini lanca masnih kiselina pa primjerice tako dugolančane SFA pokazuju snažan citotoksični učinak na stanice koje proizvode inzulin za razliku od onih kratkog lanca (145).

Najviši udio n-3 PUFA, poglavito EPA i DHA, u sastavu fosfolipida bubrega u podskupini štakora STZ+DHA, vjerojatno je posljedica veće dostupnosti n-3 iz prehrane. Najniži udio n-6 PUFA u sastavu fosfolipida u skupini STZ+DHA vjerojatno je rezultat spomenute n-3/n-6 kompeticije za iste metaboličke enzime ciklooksigenazu i lipooksigenazu (78, 146).

Najistaknutija patološka promjena koju smo uočili u bubrezima štakora svih STZ-DM1 podskupina bila je dramatična vakuolizacija DTC. Slične promjene pronašli smo i u ostalim studijama na modelima DM-a tipa 1 (neobjavljeni podaci). Međutim, važno je napomenuti da u našem modelu dugotrajnom hiperglikemijom izazvanog metaboličkog sindroma nismo uočili vakuolizaciju DTC, unatoč znatnim oštećenjima bubrega (8). Uzimajući u obzir izostanak oil red i PAS bojenja u DTC, možemo isključiti da bi se ovdje radilo o nakupljanju lipida ili

glikogena. Ovi nalazi potvrđeni su i na razini elektronskog mikroskopa, što nas je navelo na zaključak da se radi o nakupljanju tekućine. Vezano uz to, možemo pretpostaviti da bi nakupljanje vode koju smo pronašli u DTC štakora s DM1 moglo biti posljedica štetnog učinka hiperglikemije i/ili nedostatka inzulina na membranski transport u DTC. Međutim, rezultati ovog istraživanja pokazali su da je suplementacija s DHA/EPA djelomično smanjila štetan utjecaj DM1 na DTC. Od ranije je poznato da dugolančane PUFA ugrađene u membranske fosfolipide služe kao oksigenirani prekursori PUFA (64). Oksigenirane PUFA sudjeluju u regulaciji stanične i tkivne funkcije, koja je posredovana izmijenjenom aktivnošću funkcionalnih proteina od stanične membrane do jezgre, kao i modulacijom ionskih kanala i čimbenika transkripcije (111, 112). Ovo bi moglo biti objašnjenje zaštitnog učinka povećanog udjela DHA/EPA u sastavu fosfolipida bubrega na vakuolizaciju DTC uzrokovanu DM1.

Dodatno objašnjenje za zaštitni učinak suplementacije s n-3 može, barem djelomično, pružiti uočeno povećanje izražaja NF- $\kappa$ B, utjecajem na regulaciju upalnog odgovora te pozitivnim učinkom na preživljenje stanica (147), a čiji smo najviši izražaj pronašli u bubrezima skupine STZ-DHA i bio je najistaknutiji u DTC.

Oštećenje DTC moglo bi biti povezano i s uočenom povećanim izražajem SATB1. Naime, pronašli smo intezivan izražaj SATB1 u oštećenim DTC. Ipak, samo bubrezi dijabetičnih štakora koji su dodatno suplementirani s PUFA su imali znatno povećan broj SATB1-imunoreaktivnih DTC. U našem prethodnom radu (28), utvrdili smo promjene u izražaju SATB1 u štakorskom modelu DN inducirane STZ-om, koja bi mogla ukazati ulogu ovog čimbenika u patofiziologiji DN. U spomenutom istraživanju uočen je najjači izražaj SATB1 u DTC. U skladu s prethodnim istraživanjima (148, 149), izražaj SATB1 bio je vrlo nizak u zdravim DTC, što ukazuje na njegovu moguću ulogu u patofiziologiji oštećenja DTC. Međutim, ulogu SATB1 u štetnom / potencijalno zaštitnom učinku na DTC tijekom dijabetičke hiperglikemije, kao i njezin odnos sa suplementacijom PUFA-ma, potrebno je dodatno istražiti.

U dosadašnjim istraživanjima patofiziologije DN najveći naglasak stavljen je na oštećenje glomerula. Također, uočeno je da tubularna hipoksija ima važnu ulogu u patogenezi kronične bolesti bubrega te su kao inicijalni cilj za sprječavanje oštećenja bubrega u šećernoj bolesti prepoznate PTC čija disfunkcija uzrokuje oštećenje glomerularne filtracijske membrane (7). Međutim, znatno manje pozornosti u istraživanjima pridano je oštećenju distalnih kanalića, unatoč njihovoj ključnoj ulozi u regulaciji acido-bazne ravnoteže i krvnog tlaka. Drastična oštećenja distalnih kanalića, koja smo uočili u više eksperimenata sa štakorima na modelu DM1 izazvanom STZ-om, ukazuju na nužnost dodatnog istraživanja učestalosti, patofizioloških mehanizama i posljedica ove komponente patofiziologije DN.

Kako bismo otkrili dodatne patološke promjene, primijenjeno je i PAS bojenje. Očekivana ekspanzija mezangija u glomerulima dijabetičnih štakora nije bila naglašena i njena pojava bila je promjenjiva. Najistaknutija promjena bila je zadebljanje Bowmanove čahure s akumulacijom PAS-pozitivnog materijala u glomerulima dijabetičnih štakora koji su dobivali veći udio n-6 PUFA u prehrani. Unatoč blagotvornom učinku suplementacije s n-3 PUFA na DTC, upravo je najviša intersticijska akumulacija PAS utvrđena kod podskupine dijabetičnih štakora STZ-DHA. Paralelno s time, najviša razina MDA, kao indikatora lipidne peroksidacije, pronađena je u plazmi iste eksperimentalne skupine. To ne čudi, ako uzmemo u obzir da su PUFA glavni supstrati za lipidnu peroksidaciju (150). Povećani unos ribljeg ulja povezan je s povišenom osjetljivošću membrana na oksidaciju (151, 152). U eritrocitima štakora sa šećernom bolešću uzrokovanom STZ-om, razina MDA bila je viša u skupini dijabetičnih štakora koji su dobivali riblje ulje (152). Membrane bogate PUFA-ma potencijalno su osjetljive na oksidacijska oštećenja, a osjetljivost masnih kiselina na oksidaciju reaktivnim kisikom povećava se s brojem nezasićenih veza (153). DHA i EPA imaju veći broj nezasićenih veza (6 i 5), dok n-6 masne kiseline kao LA i ALA imaju 2 ili 3 nezasićene veze. Upravo tom činjenicom možemo pojasniti podatak dobiven našim istraživanjem u kojem je skupina suplementirana s DHA/EPA imala najvišu razinu MDA u plazmi.

DM1 je uzrokovao izraženo nakupljanje neutralnih lipida u PTC, koje je bilo prisutno i u skupinama dijabetičnih štakora koji su dobivali n-6 kao i DHA. Akumulacija lipida bila je ograničena gotovo isključivo na PTC i nije pronađena u DTC ili u glomerulima. To nakupljanje lipida bilo je najizraženije u bubrezima dijabetičnih štakora dodatno suplementiranih s n-6 masnim kiselinama. Kod dijabetičnih štakora suplementiranih s DHA/EPA, nakupljanje lipida u PTC također je bilo vidljivo, ali je bilo varijabilno i manje istaknuto u usporedbi sa skupinama STZ i STZ+N6. Naši rezultati su u suglasju s rezultatima brojnih istraživanja na ljudima i životinjama, a koji ukazuju na vezu između ektopičnog nakupljanja lipida u bubregu i šećerne bolesti (154-159).

Pretpostavljeni mehanizmi na kojima se temelji nakupljanje lipida u bubregu uključuju povećanu aktivnost SREPB-1 i -2 s povećanim izražajem sintaze masnih kiselina i acil CoA karboksilaze (154, 155, 160); intenziviranje puteva uključenih u tubularnu reapsorpciju filtriranih lipida vezanih s proteinima putem megalin-kubilin kompleksa; povećano opterećenje glukozom po nefronu; priljev oksidiranih lipoproteina (161); povećani unos masnih kiselina prenošenih na filtriranom albuminu u bubrežne kanaliće zbog povećanog urinarnog izlučivanja albumina (162); kao i disrupciju negativne povratne sprege kolesterola uzrokovanu krajnjim proizvodima glikacije (AGE) (159). Dugolančane masne kiseline djeluju kao ligandi

peroksisomskih proliferator-aktiviranih receptora (163) koji reguliraju skladištenje lipida (164). Osim toga, PUFA, ali ne i SFA ili MUFA, mogu suzbiti indukciju lipogenih gena inhibicijom izražaja i obrade SREBP-1c (165).

Ranije je već dokazano da među dugolančanim masnim kiselinama EPA i DHA suzbijaju stvaranje masnih kapljica i skladištenje masti u masnim kapljicama (166, 167). To bi moglo biti pojašnjenje za manje nakupljanje lipida koje smo pronašli u PTC štakora koji su suplementirani s n-3 PUFA, u usporedbi s uobičajeno hranjenim i dijabetičnim štakorima suplementiranim s n-6.

Naposljetku, također smo istražili izražaj VEGF u bubrezima eksperimentalnih životinja. Rezultati Western blot analize nisu pokazali značajne promjene u proteinskom izražaju VEGF-a. Taj podatak je u suglasju sa snažnim izražajem VEGF-a u podocitima koji smo uočili pomoću TEM-a. Međutim, u našem istraživanju pronašli smo dramatične promjene u uzorku izražaja VEGF-a u proksimalnim kanalićima. Bubrezi kontrolne skupine štakora pokazali su veći broj proksimalnih kanalića s VEGF imunoreaktivnim granulama u citoplazmi. U svim ostalim skupinama životinja kojima je apliciran STZ, uzorak VEGF-imunofluorescencije potpuno je promijenjen i granulirani oblik opažen je samo povremeno u preparatima bubrega štakora iz skupina tretiranih STZ-om. U našem prethodnom radu, u DM modelu tipa 2, tijekom duljeg razdoblja pronašli smo dinamičku preraspodjelu VEGF-a u PTC s VEGF-om prisutnim u vezikularnom aparatu zdravog bubrega štakora te njegovom translokacijom u apikalnu membranu PT u bubrežnom tkivu oštećenom saharozom, što nas je dovelo do zaključka da VEGF za svoj promet koristi sustav endocitoze kako bi bio reapsorbiran u PTC (8).

Podaci iz našeg istraživanja upućuju na to da je vezikularni promet u sustavu PTC oštećen u DM1. Masne kiseline imaju važnu ulogu u rasporedu membrane, strukturi i funkciji lipidnog sloja te prometu membranom. Masne kiseline iz skupine n-3 PUFA unesene hranom ugrađuju se u različite tipove stanica (106) mijenjajući biokemijski sastav membranskih mikrodomena, što može utjecati na membransku fuziju i transport proteina (107, 108).

U našem istraživanju otkrili smo da suplementacija PUFA-ma nije pomogla u obnovi vezikularnog transporta VEGF koji je bio oštećen tijekom DM1. Nadalje, na temelju izostanka pojave VEGF-imunoreaktivnih vezikula u PTC, kao i na temelju ultrastrukturnih saznanja, vjerujemo da je suplementacija s n-3 i n-6, u uvjetima šećerne bolesti, rezultirala većom nestabilnošću endocitnih vezikula.

Ukratko, naši podaci pokazali su da DM1 i sadržaj PUFA u prehrani imaju znatan utjecaj na masnokiselinski sastav bubrežnih fosfolipida. Osim ovih promjena, zamijetili smo i

dramatičnu vakuolizaciju DTC u DM1, koja je bila smanjena u skupini štakora dodatno suplementiranih s n-3. Promjene u procesu vakuolizacije DTC bile su praćene većim izražajem SATB1 u DTC, osobito kod dijabetičnih životinja dodatno suplementiranih s n-6 i n-3 PUFA. Ektopična akumulacija lipida pronađena je u PTC svih dijabetičnih skupina, ali je bila pogoršana u štakora dodatno suplementiranih s n-6 PUFA. Osim toga, u DM1 otkrili smo poremećaj u VEGF transportnom vezikularnom sustavu PTC, koji je bio dodatno pogoršan kod skupina suplementiranih s n-6 i n-3 PUFA. Sukladno ovim saznanjima, SATB1 bi se mogao koristiti kao histološki biljeg za oštećenje DTC. Možemo zaključiti da je uloga oštećenja DTC u ranoj fazi DN uvelike podcijenjena te da sastav masnih kiselina u prehrani i suplementacija PUFA-ma može bitno utjecati na ishode DN, iako njihovi učinci nisu jednoznačni. Kliničari bi trebali više pažnje posvetiti što skorijem smanjenju hiperglikemije u ranoj fazi liječenja DM - a tipa 1, kako bi se spriječilo oštećenje stanica DTC te posljedične daljnje komplikacije.

## **7. ZAKLJUČCI**



- DM1 mijenja masnokiselinski sastav fosfolipida i povećava stupanj lipidne peroksidacije u bubrezima štakora.
- Suplementacija s različitim omjerima n-6/n-3 PUFA utječe na masnokiselinski sastav fosfolipida i stupanj lipidne peroksidacije, kao i na stupanj patoloških promjena uzrokovanih šećernom bolešću.
- Suplementacija s različitim omjerima n-6/n-3 PUFA dodatno utječe na promjene izražaja VEGF, NF- $\kappa$ B i SATB1 u bubregu dijabetičnih štakora.
- Distalni kanalić bubrega drastično je oštećen u modelu DM1 izazvanog STZ-om, a suplementacija DHA/EPA djelomično smanjuje štetan utjecaj DM1 na DTC.

## **8. SAŽETAK**

Šećerna bolest (DM, *diabetes mellitus*) je poremećaj metabolizma karakteriziran brojnim ozbiljnim komplikacijama, od kojih je jedna od najčešćih dijabetička nefropatija (DN, engl. *diabetic nephropathy*) - kronično propadanje funkcije bubrega kod bolesnika s DM, kao posljedica koje dolazi do gubitka serumskog albumina u urinu, pada glomerularne filtracije i bubrežnog zatajenja. Višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA; engl. *polyunsaturated fatty acids*) posljednjih su desetljeća istraživane zbog svoje nutritivne vrijednosti i potencijalnih zdravstvenih dobrobiti unošenja u organizam. Brojna patološka stanja i promjene u tkivima povezani su s promjenom udjela PUFA u tkivima.

Cilj ovog istraživanja bio je istražiti utjecaj eksperimentalne šećerne bolesti tipa 1 (DM1, *diabetes mellitus type 1*) te odrediti potencijalno zaštitan / štetan učinak različitih omjera omega-6/omega-3 (n-6/n-3) PUFA u hrani na masnokiselinski sastav fosfolipida u tkivu bubrega i patološke promjene uzrokovane DM1. 25 mužjaka Wistar štakora podijeljeno je u 4 skupine koje su hranjene različitim omjerima n-6/n-3 PUFA u obroku. Kontrolna skupina (engl. *control C*) i dijabetična skupina (STZ) dobivale su hranu s omjerom n-6/n-3  $\approx 7$ , skupina STZ+N6 hranu s omjerom n-6/n-3 od  $\approx 60$  i skupina STZ+DHA hranu s omjerom n-6/n-3 od  $\approx 1$  koji se sastojao od 16 % eikozapentanoične (EPA engl. *eicosapentaenoic acid*) i 19% dokozaheksanoične kiseline (DHA engl. *docosahexaenoic acid*). Životinjama je intraperitonealno apliciran streptozotocin ili fosfatni pufer te su 30 dana nakon indukcije DM1 štakori žrtvovani. Tkivo bubrega i uzorci krvi prikupljeni su kako bi se analizirao masnokiselinski sastav fosfolipida te kako bi se proučile patohistološke promjene, ektopično lipidno nakupljanje, kao i izražaj čimbenika rasta vaskularnog endotela (VEGF eng. *Vascular endothelial growth factor*), jezgrinog čimbenika kappa B (NF-kB engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) i proteina koji organizira kromatin / globalnog transkripcijskog regulatora (SATB1 engl. *special AT-rich sequence-binding protein-1*). Patološke promjene proučavane su korištenjem transmisijskog elektronskog mikroskopa (TEM) nakon bojenja na VEGF. Rezultati su pokazali da DM1 te različiti omjeri n-6/n-3 PUFA u hrani dovode do značajnih promjena u masnokiselinskom sastavu fosfolipida u bubregu.

Isto tako, DM1 je posljedično doveo do opsežne vakuolizacije stanica distalnih kanalića, ali je ona bila značajno umanjena u skupini STZ+DHA u kojoj je zabilježen i najviši bubrežni izražaj Nf-KB.

Izraženo nakupljanje neutralnih lipida primijećeno je u stanicama proksimalnih kanalića svih dijabetičnih životinja, ali je nakupljanje bilo značajno veće u skupini STZ+N6.

Kod svih dijabetičnih životinja uočen je poremećaj vezikularnog transporta VEGF-a u proksimalnim kanalićima koji je bio značajno pogoršan u skupinama STZ+N6 i STZ+DHA.

Također smo određivali i analizirali imunoreaktivnost novog biljega oštećenja u distalnim kanalićima i glomerulima- SATB1, a obzirom na njegovu ključnu ulogu u patofiziologiji DN. Tako je vrlo jaka imunofluorescencija SATB1 pronađena u distalnim kanalićima dijabetičnih štakora, a povećani postotak SATB1-imunoreaktivnih stanica distalnih kanalića pronađen je u skupinama STZ+DHA i STZ+N6.

Ultrastrukturalna analiza potvrdila je da VEGF za svoj promet koristi sustav endocitoze, ali i da primjena PUFA nije pomogla u obnovi vezikularnog transporta VEGF koji je bio oštećen u DM1.

Rezultati istraživanja pokazali su da je u ranoj fazi dijabetičke nefropatije primjetno opsežno oštećenje i vakuolizacija stanica distalnog kanalića, što može biti ublaženo suplementacijom EPA/DHA. Ovaj podatak stavlja u fokus distalni kanalić kao važan segment u ranom liječenju i prevenciji oštećenja bubrega. S obzirom na mali broj postojećih istraživanja, potrebno je dodatno istražiti patofiziološke promjene i mehanizme distalnog tubularnog oštećenja. Možemo zaključiti da masnokiselinski sastav, nastao kao posljedica manipulacije prehranom, može snažno utjecati na ishode DN. Odgovarajući omjer n-3/n-6 PUFA u prehrani ima povoljan učinak na smanjenje oštećenja distalnih kanalića. Potrebna su dodatna istraživanja koja će rasvijetliti mehanizam učinka različitih omjera n-3/n-6 PUFA na oštećenje distalnih tubula.

## **9. SUMMARY**

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease characterized by numerous serious complications. One of the most common is diabetic nephropathy (DN), a chronic deterioration of renal function in patients with DM, leading to a loss of serum albumin in the urine, a decrease in glomerular filtration, and consequent renal failure. Long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFA; polyunsaturated fatty acids) have been studied in recent decades for their nutritional value and potential health benefits when absorbed into the body. Numerous pathological conditions in tissues have been associated with a change in the proportion of PUFA in tissues.

The aim of this study was to investigate the effects of experimental type 1 diabetes (DM1, diabetes mellitus type 1) and to determine the potentially protective/harmful effect of the different ratio of dietary n-6/n-3 PUFA on the fatty acid composition of phospholipids in renal tissue and the pathological changes caused by DM1.

Twenty-five male Wistar rats were divided into 4 groups and fed different ratios of n-6/n-3 PUFA in the meal. The control group (eng. control C) and the diabetic group (STZ) were fed diets with an n-6/n-3 ratio of  $\approx 7$ , the STZ+N6 group was fed diets with an n-6/n-3 ratio of  $\approx 60$ , and the STZ+DHA group was fed diets with an n-6/n-3 ratio of  $\approx 1$ , which consisted of 16% eicosapentaenoic acid (EPA) and 19% docosahexaenoic acid (DHA). Streptozotocin or phosphate buffer was administered intraperitoneally to the animals. Thirty days after DM1 induction, the rats were sacrificed. Kidney tissue and blood samples were collected to analyze the fatty acid composition of phospholipids and to examine pathohistological changes, ectopic lipid accumulation, and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), nuclear factor kappa B (NF-kB), and chromatin organizing/global transcriptional regulator protein (SATB1 English special AT-rich sequence-binding protein-1). Pathological changes were examined by transmission electron microscopy (TEM) after VEGF staining.

As a result of this experiment, DM1 and the different levels of n-6/n-3 PUFA in the diet led to significant changes in the fatty acid composition of phospholipids.

DM1 consequently led to extensive vacuolization of distal tubule cells, but this was significantly lower in the STZ+DHA group, in which the highest renal Nf- KB expression was also recorded. The pronounced accumulation of neutral lipids was observed in the cells of proximal tubules of all diabetic animals, but the accumulation was significantly higher in the STZ+N6 group.

To our knowledge, there is no study that has investigated the effects of the n6/n3 PUFA ratio in experimentally induced DM1 on the expression of VEGF, NF-kB, and SATB1.

In all diabetic animals we found disturbance of VEGF- transporting vesicular proximal tubules cell system, which was substantially worsened in the groups STZ+N6 and STZ+DHA.

We also determined and analyzed the immunoreactivity of a new marker of damage in the distal tubuli and glomeruli- SATB-1, due to its key role in the pathophysiology of diabetic nephropathy. Thus, very strong immunofluorescence SATB1 was found in distal tubuli of diabetic rats, and an increased percentage of SATB1-immunoreactive distal tubular cells were found in the STZ+DHA and STZ+N6 group.

Ultrastructural analysis confirmed that VEGF uses an endocytosis system for its transport, addition of PUFA did not help in the restoration of vesicular VEGF transport that was damaged in DM1.

The results have shown that in the early stages of DN there is extensive damage and vacuolization of the cells of the distal tubules, which can be attenuated by EPA/DHA supplementation. These data focus on the distal tubules as an important segment in the early treatment and prevention of renal injury. Considering the paucity of studies, it is necessary to further investigate the pathophysiological changes and mechanisms of distal tubule damage. We can conclude that the fatty acid composition resulting from dietary manipulation may strongly influence the outcomes of DN. An appropriate ratio of n-3/n-6-PUFA in the diet has a beneficial effect on reducing distal tubule damage. Further studies are needed to confirm or refute the above results and to further clarify the effects of different n-3/n-6-PUFA ratios on distal tubule damage.

## **10. LITERATURA**



1. Koye DN, Magliano DJ, Nelson RG, Pavkov ME. The Global Epidemiology of Diabetes and Kidney Disease. *Adv in Chronic Kidney Disease*. 2018;25(2):121-32.
2. American Diabetes Association. Diabetes.org. [Internet]. How COVID-19 impacts people with diabetes. Arlington: American Diabetes Association; 2022 [citirano 1. prosinca 2022.]. Dostupno na <https://diabetes.org/coronavirus-covid-19/how-coronavirus-impacts-people-with-diabetes>
3. Zhou Y, Chi J, Wenshan L, Wang Y. Obesity and diabetes as high-risk factors for severe coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Diabetes Metab Res Rev* 2020. doi: 10.1002/dmrr.3377.
4. Satirapoj, B. Nephropathy in diabetes. *Adv Exp Med Biol*. 2012;771:107-22.
5. Mora-Fernandez C, Dominguez-Pimantel V, Muros de Fuentes M, Gorriz JL, Martinez-Castelao A, Navarro-Gonzalez JF. Diabetic kidney disease: from physiology to therapeutics. *J Physiol*. 2014; 592(18):3997-4012.
6. Blantz RC, Singh P. Glomerular and tubular function in the diabetic kidney. *Adv Chronic Kidney. Dis* 2014;21(3): 297-303.
7. Gilbert RE. Proximal Tubulopathy: Prime Mover and Key Therapeutic Target in Diabetic Kidney Disease *Diabetes*. 2017;66(4):791-800.
8. Vitlov Uljević M, Bočina I, Restović I, Kunac N, Mašek T, Kretzschmar G i sur. Reabsorption in the proximal tubuli-ultrastructural evidence for a novel aspect of renal VEGF trafficking. *Cell Tissue Res* 2018;374(1):189-201.
9. Gobe GC, Johnson DW. Distal tubular epithelial cells of the kidney: Potential support for proximal tubular cell survival after renal injury. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39(9):1551-61.
10. Mašek T, Filipović N, Ferhatović Hamzić L, Puljak L, Starčević K. Long-term streptozotocin diabetes impairs arachidonic and docosahexaenoic acid metabolism and 5 desaturation indices in aged rats. *Exp Gerontol*. 2014;60:140-6.
11. Tosi F, Sartori F, Guarini P, Olivieri O, Martinelli N. Delta-5 and delta-6 desaturases: crucial enzymes in polyunsaturated fatty acid-related pathways with pleiotropic influences in health and disease. *Adv Exp Med Biol*. 2014;824:61-81.
12. Takahashi M. The ratio of serum n-3 to n-6 polyunsaturated fatty acids is associated with diabetes mellitus in patients with prior myocardial infarction: a multicenter cross-sectional study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2017;17(1):41.
13. Bang HO, Dyerberg J, Hjoorne N. The composition of food consumed by Greenland Eskimos. *Acta Med Scand*. 1976;200(1-2):69-73.

14. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in the prevention-management of cardiovascular disease. *Can J Physiol Pharmacol.* 1997;75(3):234-9.
15. Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, Matazzawa Y, Saito Y, Ishikawa Y i sur. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet.* 2007;369(9567):1090-8.
16. Shoji T, Kakiya R, Hayashi T, Tsujimoto Y, Sonoda M, Shima H i sur. Serum n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid profile as an independent predictor of cardiovascular events in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 2013;62(3):568-76.
17. Hamazaki T, Takazakura E, Osawa K, Urukaze M, Yano S. Reduction in microalbuminuria in diabetics by eicosapentaenoic acid ethyl ester. *Lipids.* 1990;25(9):541-5.
18. Mollsten AV, Dahlquist GG, Stattin EL, Rudberg S. Higher intakes of fish protein are related to a lower risk of microalbuminuria in young Swedish type 1 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2001;24(5):805-10.
19. Barcelli UO, Weiss M, Beach D, Motz A; Thompson B. High linoleic acid diets ameliorate diabetic nephropathy in rats. *Am J Kidney Dis.* 1990;16(3):244-51.
20. Fujikawa M, Yamazaki K, Hamazaki T, Wakaki K, Koizumi F, Yano S i sur. Effect of eicosapentaenoic acid ethyl ester on albuminuria in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 1994;40(1):49-61.
21. Garman JH, Mulrone S, Manigrasso M, Flynn E, Maric C. Omega-3 fatty acid rich diet prevents diabetic renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009; 296(2):306-16.
22. Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res.* 2008;47(2):147-55.
23. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int.* 1999;56(3):794-814.
24. Majumder S, Advani A. VEGF and the diabetic kidney: More than too much of a good thing. *J Diabetes Complications.* 2017;31(1):273-79.
25. Day RT, de Cassia Cavaglieri R, Tabatabaimir H, Mantravadi V, Lee MJ, Barnes JL, Kasinath BS i sur. Acute hyperglycemia rapidly stimulates VEGF mRNA translation in the kidney. Role of angiotensin type 2 receptor (AT2). *Cell Signal.* 2010;22(12):1849-57.
26. Feliars D, Kasinath BS. Mechanism of VEGF expression by high glucose in proximal tubule epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;314(1):136-42.

27. Doi K, Noiri E, Fujita T. Role of vascular endothelial growth factor in kidney disease. *Curr Vasc Pharmacol*. 2010;8(1):122-8.
28. Delic Jukic IK, Kostić S, Filipović N, Gudelj Ensor L, Ivandić M, Dukić JJ i sur. Changes in expression of special AT-rich sequence binding protein 1 and phosphatase and tensin homologue in kidneys of diabetic rats during ageing. *Nephrol Dial Transplant*. 2018;33(10):1724-41.
29. Suryavanshi SV, Kulkarni YA. NF-kappabeta: A Potential Target in the Management of Vascular Complications of Diabetes. *Front Pharmacol*. 2017; 8:798.
30. Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. Anatomija čovjeka. 2. izdanje Zagreb: Medicinska naklada; 2007, str. 353-59.
31. Fanghanel J, Anderhuber F, Pera F i sur. Waldeyerova anatomija čovjeka. 17. izdanje. Zagreb: Golden marketing-tehnička knjiga; 2009, str. 486-89.
32. Wallace MA. Anatomy and physiology of the kidney. *AORNJ*. 1998; 68(5):803-16.
33. Young B, O'Dowd G, Woodford P. Wheater's Functional Histology. 6. izdanje. Philadelphia: Elsevier; 2014, str. 293.
34. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Bubrež [Internet]. Zagreb Leksikografski zavod Miroslav Krleža; 2021 [citirano 30. travnja 2022.]. Dostupno na: <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=9912>.
35. Suh JH, Miner JH. The glomerular basement membrane as a barrier to albumin. *Nat Rev Nephrol*. 2013;9(8):470-7.
36. Sapin MR, Bilich GL. Anatomija čovjeka, 1. izdanje. Moskva: Onix; 1989, str. 253.
37. Junqueira LC, Carneiro J. O Kelley R. Osnove histologije. 1. izdanje. Zagreb: Školska knjiga; 2005, str. 383-01.
38. Nikityuk BA, Chetsova VP. Fiziologija i funkcija bubrega čovjeka. 2. Izdanje. Moskva, Onix; 1990, str. 211.
39. Agadzhanian NA, Chesnokova SA, Tel LZ, Tsirkin VI. Osnove ljudske fiziologije. 2. izdanje. Moskva, 2000, str. 318.
40. Šercer A. Medicinska enciklopedija, 2. izdanje. Zagreb: Leksikografski zavod Miroslav Krleža; 1970, str. 605.
41. Subramanya AR, Ellison DH. Distal Convolutated Tubule. *Clin J Am Nephrol*. 2014,9 (12):2147-63.
42. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37(1):81-90.

43. World Health Organisation. Diabetes - key facts [Internet]. Geneva: World Health Organisation; 2022 citirano [9. Studenog 2022.]. Dostupno na: [Diabetes \(who.int\)](https://www.who.int/diabetes)
44. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes-2022 Abridged for primary care providers. *Clin Diabetes*. 2022;40(1):10-38.
45. Petersmann A, Nauck M, Muller-Wieland D, Kerner W, Muller UA, Landgraf R i sur. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2019;126(7):406-410.
46. Taplin CE, Barker JM. Autoantibodies in type 1 diabetes. *Autoimmunity*. 2008;41(1):11-8.
47. Thomas CC, Philipson LH. Update on Diabetes Classification. *Med Clin North Am*. 2014;99(1):1-16.
48. Lebovitz HE. Insulin resistance: definition and consequences. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2001;109(2):135-48.
49. Petersen KF, Befroy D, Dufout S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL i sur. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science*. 2003;300(5662),1140-2.
50. Abdul-Ghani MA, DeFronzo RA. Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *J Biomed Biotechnol*. 2010. doi: 10.1155/edt.476279.
51. Deshpande AD, Harris-Hayes M, Schootman M. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Phys Ther*. 2008;88(11):1254-64.
52. Faselis C, Katsimardou A, Imprialos K, Deligkaris P, Kallistratos M, Dimitriadis K i sur. Microvascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Curr Vasc Pharmacol*. 2019;18(2):117-124.
53. Viigimaa M, Sachinidis A, Toumpourleka M, Koutsampasopoulos K, Allikso S, Toumpourleka M i sur. Macrovascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Curr Vasc Pharmacol*. 2019;18(2):110-116.
54. Sifuentes-Franco S, Padilla-Tejeda DE, Carrillo-Ibarra S, Miranda-Diaz AG. Oxidative Stress, Apoptosis, and Mitochondrial Function in Diabetic Nephropathy. *Int J Endocrinol*. 2018. doi: 10.1155/edt.1875870.
55. Lei L, Mao Y, Meng D, Zhang X, Cui L, Huo Y i sur. Percentage of circulating CD8 + T lymphocytes is associated with albuminuria in type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2014;122(1):27-30.
56. Wolf G, Ritz E. Diabetic nephropathy in type 2 diabetes prevention and patient management, *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(5):1396-405.

57. Gheith O, Farouk N, Nampoory N, Halim M, Al-Otaibi T. Diabetic kidney disease: world wide difference of prevalence and risk factors. *J Nephropharmacol.* 2015;5(1):49-56.
58. El Mesallamy HO, Ahmed HH, Bassyouni AA, Ahmed AS. Clinical significance of inflammatory and fibrogenic cytokines in diabetic nephropathy. *Clin Biochem.* 2012;45(9): 646-50.
59. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414(6865):813-20.
60. Dronavalli S, Duka I, Bakris GL. The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Clin Pract. Endocrinol Metab* 2008;4(8):444-52.
61. Yiu WH, Wong DWL, Jia Wu H, Li RX, Yam I, Chan LYY i sur. Kallistatin protects against diabetic nephropathy in db/db mice by suppressing AGE-RAGE-induced oxidative stress. *Kidney Int.* 2016;89(2):386-98.
62. Umanath K, Lewis JB. Update on Diabetic Nephropathy: Core Curriculum 2018. *Am J Kidney Dis.* 2018;71(6):884-95.
63. Duran-Salgado MB, Rubio-Guerra A. Diabetic nephropathy and inflammation. *World J Diabetes.* 2014;5(3):393-8.
64. Shapiro H, Theilla M, Attal-Singer J, Singer P. Effects of polyunsaturated fatty acid consumption in diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol.* 2010;7(2):110-21.
65. Wong E. V. Molecules and mechanisms. [Internet] Cell and molecular biology. Axolotl Academica Publishing; 2021 [ citirano 20. svibnja 2022.]. Dostupno na: [2.7: Fatty Acids - Biology LibreTexts](#)
66. Buckley MT, Racimo F, Allentoft ME, Jensen MK, Jonsson A, Huang H. i sur. Selection in Europeans on Fatty Acid Desaturases Associated with Dietary Changes. *Mol Biol Evol.* 2017;34(6):1307-18.
67. Spector AA, Kim HY. Discovery of essential fatty acids. *J Lipid Res.* 2014;56(1):11-21.
68. Gurr MI., Harwood JL., Frayn KN., Murphy DJ. i Michell RH. *Lipids: biochemistry, biotechnology and health.* 6. Izdanje. Oxford, Wiley/Blackwell 2016.
69. Cunnane SC. Problems with essential fatty acids: time for a new paradigm? *Prog Lipid Res.* 2003;42(6):544-68.
70. Harwood JL. Algae: critical sources of very long-chain polyunsaturated fatty acids. *Biomolecules.* 2019;9(11):708
71. Abedi E, Ali Sahari M. Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties. *Food Sci Nutr.* 2014;2(5):443-63.

72. Vrandešić Bender D. Omega-3 masne kiseline - svojstva i djelovanje. *Medix*. 2011;92/93:234-40.
73. Generalic E. Kemijski riječnik [Internet]. 2022 [citirano 19.1.2023.]. Dostupno na: <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=masna+kiselina>
74. Sioen I, Lieshout L, Eilander A, Fleith M, Lohner S, Szommer A i sur. Systematic Review on N-3 and N-6 Polyunsaturated Fatty Acid Intake in European Countries in Light of the Current Recommendations - Focus on Specific Population Groups. *Ann Nutr Metab*. 2017;70(1):39-50.
75. Din JN, Newby DE, Flapan AD. Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease-fishing for a natural treatment. *BMJ* 2004;328(7430):30-5.
76. Heller A, Koch T, Schmeck J, van Ackern K. Lipid Mediators in Inflammatory Disorders. *Drugs*. 1998;55(4):487-496.
77. Grosso G, Galvano F, Marventano S, Malaguarnera M, Bucolo C, Drago F i sur. Omega-3 Fatty Acids and Depression: Scientific Evidence and Biological Mechanisms. *Oxid Med Cell Longev*. 2014. doi: 10.1155/edt.313570
78. Mariamenatu AH, Abdu EM. Overconsumption of Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) versus Deficiency of Omega-3 PUFA in Modern-Day Diets: The Disturbing Factor for Their “Balanced Antagonistic Metabolic Functions” in the Human Body. *J Lipids*. 2021. doi: 10.1155/edt.8848161
79. Burdge GC. *Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism*, 1. izdanje, Aocs Press; 2018. 15-30. str.
80. Simopoulos AP, Leaf A, Salem N Jr. Workshop on the Essentiality of and Recommended Dietary Intakes of Omega-6 and Omega-3 Fatty Acids. *J Am Coll Nutr*. 1999;18(5):487-9.
81. Simopoulos AP. Importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids: evolutionary aspects, *World Rev Nutr Diet*. 2003;92:1-22.
82. Simopoulos AP. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients*. 2016;8(3):128.
83. DiNicolantonio JJ I O’Keefe JH. Importance of maintaining a low omega-6/omega-3 ratio for reducing inflammation. *Open Heart*. 2018. doi: 10.1136/ edt.000946.
84. Tsitouras PD, Gucciardo F, Salbe AD, Heward C, Harman SM. High omega-3 fat intake improves insulin sensitivity and reduces CRP and IL6, but does not affect other endocrine axes in healthy older adults. *Horm Metab Res*. 2008;40(3): 199-205.

85. Wang S, Wu D, Matthan N, Lamon-Fava S, Lecker JL, Lichtenstein AH. Reduction in dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid plus docosahexaenoic acid ratio minimizes atherosclerotic lesion formation and inflammatory response in the LDL receptor null mouse. *Atherosclerosis*. 2009; 204(1):147-55.
86. Barceló-Coblijn G, Murphy EJ. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Prog Lipid Res*. 2009;48(6):355-74.
87. Bogl LH, Kaprio J, Pietiläinen KH. Dietary n-6 to n-3 fatty acid ratio is related to liver fat content independent of genetic effects: Evidence from the monozygotic co-twin control design. *Clin Nutr*. 2019;39(7): 2311-14.
88. Husted KS, Bouzinova EV. The importance of n-6/n-3 fatty acids ratio in the major depressive disorder, *Medicina (Kaunas)*. 2016;52(3):139-47.
89. Harris WS, Von Schacky C. The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease? *Prev Med*. 2004;39(1):212-20.
90. Harris WS. The omega-3 index as a risk factor for coronary heart disease. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(6):1997-2002.
91. Farzaneh-Far R, Harris WS, Garg S, Na B, Whooley MA. Inverse association of erythrocyte n-3 fatty acid levels with inflammatory biomarkers in patients with stable coronary artery disease: The Heart and Soul Study. *Atherosclerosis*. 2009; 205(2):538-43.
92. Davidson MH. Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol*. 2006;98(4A):27-33.
93. Wiktorowska-Owczarek A, Berezinska M, Nowak JZ. PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. *Adv Clin Exp Med*. 2015;24(6):931-41.
94. Scientific Committee on Food. Commission of the European Communities. Reports of the Scientific Committee for Food: Nutrient and energy intakes for the European Community. ISC; 1992 [citirano 20. svibnja 2022.] Dostupno na: [scf\\_reports\\_27.pdf \(europa.eu\)](#)
95. International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids. Report on Dietary Intake of Essential Fatty Acid (ISSFAL). Recommendations for Dietary Intake of Polyunsaturated Fatty Acids in Healthy Adults. Washington: ISSFAL; 2003 [citirano 20. svibnja 2022.]. Dostupno na: [PUFA Recommendations \(issfal.org\)](#)
96. European Food Safety Authority. Scientific Opinion: Labelling reference intake values for n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *The EFSA Journal*. 2009; 1176,1-11.

97. American Heart Nutrition Committee; Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, Franch HA I sur. Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation*. 2006;114(1):82-96.
98. Hamazaki T, Okuyama H. The Japan Society for Lipid Nutrition recommends to reduce the intake of linoleic acid. A review and critique of the scientific evidence. *World Rev Nutr Diet*. 2003;92:109-32.
99. Gopinath B, Harris DC, Flood VM, Burlutsky G, Mitchell P. Consumption of long-chain n-3 PUFA, alpha-linolenic acid and fish is associated with the prevalence of chronic kidney disease. *B J Nutr*. 2011;105(9):1361-8.
100. Shi Y, Pestka JJ. Attenuation of mycotoxin-induced IgA nephropathy by eicosapentaenoic acid in the mouse: dose response and relation to IL-6 expression. *J Nutr Biochem*. 2006;17(10):697-706.
101. Donaldio JV, Grande JP. The role of fish oil/omega-3 fatty acids in the treatment of IgA nephropathy. *Semin Nephrol*. 2004;24(3):225-43.
102. Pestka JJ, Vines LL, Bates MA, He K, Langohr I. Comparative effects of n-3, n-6 and n-9 unsaturated fatty acid-rich diet consumption on lupus nephritis, autoantibody production and CD4+ T cell-related gene responses in the autoimmune NZBWF1 mouse. *PLoS One*. 2014. doi: 10.1371/ed.100255.
103. Miller ER 3rd, Juraschek S, Anderson CA, Guallar E, Henoch-Ryugo K, Charleston J i sur. The effects of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation on biomarkers of kidney injury in adults with diabetes: results of the GO-FISH trial. *Diabetes care*. 2013;36(6):1462-9.
104. Buck AC, Davies RL, Harrison T. The protective role of eicosapentaenoic acid [EPA] in the pathogenesis of nephrolithiasis. *J Urol*. 1991;146(1):188-94.
105. Nelson DL, Cox MM. (2005). *Principles of Biochemistry*. 4. izdanje. New York: W. H. Freeman ISBN; 2005, 0-7167-4339-6.
106. Fan YY, Ly LL, Barhoumi R, McMurray D., Chapkin R. Dietary docosahexaenoic acid suppresses T cell protein kinase C theta lipid raft recruitment and IL-2 production. *J Immunol*. 2004;173(10): 6161-60.
107. Ma DW, Seo J, Switzer KC, Fan YY, McMurray DN, Lupton JR i sur. n-3 PUFA and membrane microdomains: a new frontier in bioactive lipid research. *J Nutr Biochem*. 2004;15(11):700-6.



108. Seo J, Barhoumi R, Johnson AE, Lupton JR, Chapkin RS. Docosahexaenoic acid selectively inhibits plasma membrane targeting of lipidated proteins. *FASEB J*. 2006;20(6):770-2.
109. Kones R, Howell S, Rumana U. n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiovascular Disease: Principles, Practices, Pitfalls, and Promises - A Contemporary Review. *Med Princ Pract*. 2017;26(6):497-508.
110. Moreno C, De la Cruz A, Oliveras A, Kharche SR, Guizy M, Comes N i sur. Marine n-3 PUFAs modulate IKs gating, channel expression, and location in membrane microdomains. *Cardiovasc Res* 2015;105(2):223-32.
111. Calder PC. Immunomodulation by omega-3 fatty acids, Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2007;77(5-6): 327-35.
112. Simopoulos AP. Evolutionary aspects of dietary omega-6/omega-3 fatty acid ratio: medical implications. *World Rev Nutr Diet*. 2009;100:1-21.
113. Whelan J, Gowdy KM, Shaikh SR. N-3 polyunsaturated fatty acids modulate B cell activity in pre-clinical models: Implications for the immune response to infections. *Eur J Pharmacol*. 2016; 785:10-17.
114. Guichardant M, Calzada C, Bernoud-Hubac N, Lagarde M, Véricel E. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and oxygenated metabolism in atherothrombosis. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1851(4):485-95
115. Beare-Rogers J, Dieffenbacher A, Holm JV. IUPAC Lexicon of Lipid Nutrition. *Pure Appl Chem*. 2001;73(4):685-744.
116. Edwards IJ, O'Flaherty JT. Omega-3 Fatty Acids and PPARgamma in Cancer". *PPAR Research*. 2008. doi: 10.1155/edt.358052.
117. Hao CM, Breyer MD. Physiologic and pathophysiologic roles of lipid mediators in the kidney. *Kidney Int*. 2007;71(11):1105-15.
118. Tao L. Oxidation of Polyunsaturated Fatty Acids and its Impact on Food Quality and Human Health. *Adv Food Technol Nutr Sci*. 2015;1(6):135-142.
119. Di Stasi D, Bernasconi R, Marchioli R, Marfisi RM, Rossi G, Tognioni G i sur. Early modifications of fatty acid composition in plasma phospholipids, platelets and mononucleates of healthy volunteers after low doses of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Eur J Clin Pharmacol*. 2004;60(3):183-90.

120. Perassolo MS, Almeida JC, Pra RL, Mello VD, Maia AL, Moulin CC i sur. Fatty acid composition of serum lipid fractions in type 2 diabetic patients with microalbuminuria. *Diabetes Care*. 2003;26(3):613-8.
121. Zhou YE, Kubow S, Dewailly E, Julien P, Egeland G. Decreased activity of desaturase 5 in association with obesity and insulin resistance aggravates declining long-chain n-3 fatty acid status in Cree undergoing dietary transition. *B J Nutr*. 2009;102(6):888-94.
122. Tilvis RS, Taskinen MR, Miettinen TA. Effect of insulin treatment on fatty acids of plasma and erythrocyte membrane lipids in type 2 diabetes. *Clin Chim Acta*. 1988;171(2-3):293-303.
123. Starcevic K, Filipovic N, Galan A, Micek V, Gudan Kurilj A, Masek T i sur. Hepatic Lipogenesis and Brain Fatty Acid Profile in Response to Different Dietary n6/n3 Ratios and DHA/EPA Supplementation in Streptozotocin Treated Rats. *Mol Nutr Food Res*. 2018. doi: 10.1002/ed.1701007.
124. Kurt A, Andican G, Siva ZO; Andican A, Burcak G. The effects of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation on AGEs and sRAGE in type 2 diabetes mellitus. *J Physiol Biochem*. 2016;72(4):679-687.
125. Mazaherioun M, Saedisomeolia A, Javanbakht M, Koohdani F, Eshraghian M, Djalali M. Beneficial effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adiponectin levels and AdipoR gene expression in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Arch Med Sci*. 2017;13(4):716-724.
126. Jacobo-Cejudo MG, Valdes-Ramos R, Guadarrama-Lopez AL, Pardo-Morales RV, Martinez-Carrillo BE, Harbige LS. Effect of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation on Metabolic and Inflammatory Biomarkers in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Nutrients*. 2017;9(6):573.
127. Kelton D, Lysecki C, Aukema H, Anderson B, Kang JX, Ma DWL. Endogenous synthesis of n-3 PUFA modifies fatty acid composition of kidney phospholipids and eicosanoid levels in the fat-1 mouse. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2013;89(4):169-77.
128. Pischon T, Hankinson s, Hotamisligil GS, Rifai N, Willet WC, Rimm EB. Habitual dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids in relation to inflammatory markers among US men and women. *Circulation*. 2003;108(2):155-60.
129. Yang LG, Song ZX, Yin H, Wang YY, Shu GF, Lu HX i sur. Low n-6/n-3 PUFA Ratio Improves Lipid Metabolism, Inflammation, Oxidative Stress and Endothelial Function in Rats Using Plant Oils as n-3 Fatty Acid Source. *Lipids*. 2015;51(1):49-59.

130. Chin HJ, Fu YY, Ahn JM, Young Na K, Kim YS, Kim S i sur. Omacor, n-3 polyunsaturated fatty acid, attenuated albuminuria and renal dysfunction with decrease of SREBP-1 expression and triglyceride amount in the kidney of type II diabetic animals. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;25(5):1450-7.
131. Roy J, Le Guennec JY, Galano JM, Thireau J, Bultel-Ponce V, Demion M i sur. Non-enzymatic cyclic oxygenated metabolites of omega-3 polyunsaturated fatty acid: Bioactive drugs. *Biochimie* January. 2016;120:56-61.
132. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr*. 1991;54(3):438-63.
133. Vuica A, Ferhatović-Hamzić L, Vukojević K, Jerić M, Puljak L, Grković I i sur. Aging and a long-term diabetes mellitus increase expression of 1 alpha-hydroxylase and vitamin D receptors in the rat liver. *Exp Gerontol*. 2015;72:167-176.
134. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226(1):497-509.
135. Masek T, Filipović N, Vuica A, Starčević K. Effects of treatment with sucrose in drinking water on liver histology, lipogenesis and lipogenic gene expression in rats fed high-fiber diet. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2017;116:1-8.
136. Agnic I, Vukojević K, Saraga-Babić M, Filipović N, Grković I. Isoflurane post-conditioning stimulates the proliferative phase of myocardial recovery in an ischemia-reperfusion model of heart injury in rats. *Histol Histopathol*. 2013;29:89-99.
137. Yabuki A, Tahara T, Taniguchi K, Matsumoto M, Suzuki S. Neuronal nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in diabetic nephropathy of type 2 diabetic OLETF rats. *Exp Anim*. 2006;55:17-25.
138. Choi J, Yin T, Shinozaki K, Lampe JW, Stevens JF, Becker LB, Kim J. Comprehensive analysis of phospholipids in the brain, heart, kidney, and liver: brain phospholipids are least enriched with polyunsaturated fatty acids. *Mol Cell Biochem*. 2018; 442(1-2): 187-201.
139. Pinnamaneni SK, Southgate RJ, Febbraio MA, Watt MJ. Stearoyl CoA desaturase 1 is elevated in obesity but protects against fatty acid-induced skeletal muscle insulin resistance in vitro. *Diabetologia*. 2006;49:3027-37.
140. Paton CM, Ntambi JM. Loss of stearoyl-CoA desaturase activity leads to free cholesterol synthesis through increased Xbp-1 splicing. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;299(6):1066-75.

141. Noels H, Lehrke M, Vanholder R, Jankowski J. Lipoproteins and fatty acids in chronic kidney disease: molecular and metabolic alterations. *Nat Rev Nephrol.*2021;17:528–542.
142. Xu, S, Nam SM, Kim J-H, Das R, Choi S-K, Nguyen TT. i sur. Palmitate induces ER calcium depletion and apoptosis in mouse podocytes subsequent to mitochondrial oxidative stress. *Cell Death Dis.* 2015;6(11).
143. Yamamoto T, Takabatake Y, Takahashi A, Kimura T, Namba, Matsuda J. i sur. High-fat diet-induced lysosomal dysfunction and impaired autophagic flux contribute to lipotoxicity in the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2017;28,1534–1551.
144. Soumura M, Kume S, Isshiki K, Takeda N, Araki S-I, Tanaka Y. i sur. Oleate and eicosapentaenoic acid attenuate palmitate-induced inflammation and apoptosis in renal proximal tubular cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010;402:265–271.
145. Chen Y, Cruzat VF, Newsholme P. *Molecular Nutrition and Diabetes:  $\beta$ -Cell Metabolism, Insulin Production and Secretion: Metabolic Failure Resulting in Diabetes.* 1. izdanje Academic press; 2016; 3, str. 29-40.
146. Holman RT, Johnson SB, Gerrard JM, Mauer SM, Kupcho-Sandberg S, Brown DM. Arachidonic acid deficiency in streptozotocin induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80:2375-79.
147. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009. doi: 10.1101/edt.001651.
148. Alvarez JD, Yasui DH, Niida H, Joh T, Loh DY, Kohwi-Shigematsu T. The MAR-binding protein SATB1 orchestrates temporal and spatial expression of multiple genes during T-cell development. *Genes Dev.* 2000;14(5):521-35.
149. Zhang S, Gao X, Ma Y, Jiang J, Dai Z, Yin X i sur. Expression and significance of SATB1 in the development of breast cancer. *Genet Mol Res.* 2015;14:3309-17.
150. Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev.* 2011;111(10):5944-72.
151. Ibrahim W, Lee US, Szabo J, Bruckner G, Chow CK. Oxidative stress and antioxidant status in mouse kidney: effects of dietary lipid and vitamin E plus iron. *J Nutr Biochem.* 1999; 10(11):674-78.
152. Yilmaz O, Ozkan Y, Yildirim M, Ozturk AI, Ersan Y, Ersan Y. Effects of alpha lipoic acid, ascorbic acid-6-palmitate, and fish oil on the glutathione, malonaldehyde, and fatty

- acids levels in erythrocytes of streptozotocin induced diabetic male rats. *J Cell Biochem.* 2002; 86(3):530-39.
153. Liu J, Yeo HC, Doniger SJ, Ames BN. Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatography-mass spectrometry compared to thiobarbituric acid. *Anal Biochem.* 1997;245(2):161-66.
154. Sun L, Halaihel N, Zhang W, Rogers T, Levi M. Role of sterol regulatory element-binding protein 1 in regulation of renal lipid metabolism and glomerulosclerosis in diabetes mellitus. *J Biol Chem.* 2002;277:18919-27.
155. Wang Z, Jiang T, Li J, Proctor G, McManaman J, Lucia S i sur. Regulation of renal lipid metabolism, lipid accumulation, and glomerulosclerosis in FVBdb/db mice with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2005;54(8):2328-35.
156. Herman-Edelstein M, Scherzer P, Tobar A, Levi M, Gafter U. Altered renal lipid metabolism and renal lipid accumulation in human diabetic nephropathy. *J Lipid Res.* 2013; 55(3):561-72.
157. Proctor G, Jiang T, Iwahashi M, Wang Z, Li J, Levi M. Regulation of renal fatty acid and cholesterol metabolism, inflammation, and fibrosis in Akita and OVE26 mice with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2006;55:2502-2529.
158. Ishizaka N, Hongo M, Matsuzaki G, Furuta K, Saito K, Sakurai R i sur. Effects of the AT(1) receptor blocker losartan and the calcium channel blocker benidipine on the accumulation of lipids in the kidney of a rat model of metabolic syndrome. *Hypertens Res.* 2010;33(3):263-268.
159. Yuan Y, Sun H, Sun Z. Advanced glycation end products (AGEs) increase renal lipid accumulation: a pathogenic factor of diabetic nephropathy (DN). *Lipids Health Dis.* 2017;16(1):126
160. Jun H, Song Z, Chen W, Zanhua R, Yonghong S, Shuxia L i sur. In vivo and in vitro effects of SREBP-1 on diabetic renal tubular lipid accumulation and RNAi-mediated gene silencing study. *Histochem Cell Biol.* 2009; 131(3):327-345.
161. Kim HJ, Moradi H, Yuan J, Norris K, Vaziri DN. (2009) Renal mass reduction results in accumulation of lipids and dysregulation of lipid regulatory proteins in the remnant kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;296(6):1297-306.
162. Thomas ME, Morrison A, Schreiner G. Metabolic effects of fatty acid-bearing albumin on a proximal tubule cell line. *Am J Phys.* 1995; 268(6):1177-84.
163. Nakamura MT, Yudell BE, Loor JJ. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res.* 2013;53:124-44.

164. Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1302(2):93-109.
165. Nakamura MT, Cheon Y, Li Y, Nara TY. Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids. *Lipids*. 2005;39:1077-83.
166. Manickam E, Sinclair A, Cameron-Smith D. Suppressive actions of eicosapentaenoic acid on lipid droplet formation in 3T3-L1 adipocytes. *Lipids Health*. 2010;9:57.
167. Barber E, Sinclair AJ, Cameron-Smith D. Comparative actions of omega-3 fatty acids on in-vitro lipid droplet formation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2013;89:359-66.

## **11. ŽIVOTOPIS**

## **OSOBNI PODACI:**

**Ime i prezime:** Marija Vitlov Uljević

**Adresa:** Odakova 9, Split

**Mjesto rođenja:** Zadar, Hrvatska

**Datum rođenja:** 21. 8. 1976.

**Državljanstvo:** hrvatsko

**Narodnost:** Hrvatica

**Mobitel/Telefon:** 091 1505606

**Elektronička pošta:** [mvitlov@yahoo.com](mailto:mvitlov@yahoo.com)

## **OBRAZOVANJE:**

1.9.2005 - 9.4.2013.

**Magistar ekonomije (MARKETING)** - Sveučilište u Splitu, Ekonomski fakultet Split,  
Poslijediplomski studij ekonomije

Tema magistarskog rada: Primjena marketinških strategija u životnom ciklusu lijekova

1.9.1994 - 15.2.2001. - Zagreb, Hrvatska

**Magistar farmacije** - Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Zagreb  
Diplomski rad: Određivanje konstante deprotonacije lantana i acethidroksamske kiseline

1990. - 1994.

1. Jezična gimnazija "Natko Nodilo", Split / Jezična gimnazija "Vladimir Nazor", Zadar  
Osnovna i osnovna glazbena škola u Zadru

## **RADNO ISKUSTVO:**

1.11.2020. - u tijeku - Split, Hrvatska

**VODITELJ KLJUČNIH KUPACA – MYLAN / VIATRIS**



1.1.2011. – 1.11.2020. - Split, Hrvatska

**SPECIJALIST ZA PROIZVODE – MYLAN / ABBOT PHARMACEUTICALS**

2008-2011

**REGIONALNI VODITELJ PRODAJE - SOLVAY PHARMACEUTICALS GMBH**

2002. - 2008.

**MEDICINSKI STRUČNI SURADNIK - SANOFI AVENTIS**

2001. - 2002.

**FARMACEUT - Ljekarne Splitsko-dalmatinske županije, Ljekarna "GRAD - TROGIR"**

### **POSLOVNE VJEŠTINE:**

Organizacijske vještine, jake prezentacijske vještine, kreiranje marketinških strategija i izrada promotivnih materijala za lijekove, redovito sudjelovanje na nacionalnim i međunarodnim kongresima s područja hipertenzije, dislipidemije, boli, urologije i ginekologije.

### **JEZICI:**

- Hrvatski jezik (materinski jezik)
- Engleski jezik (aktivno korištenje u govoru i pisanju)
- Talijanski jezik (bazično korištenje u govoru i pisanju)

### **ZNANSTVENI INTERESI:**

- Izražaj i promet VEGF-a u tkivu bubrega
- Utjecaj suplementacije EPA/DHA na dijabetičku nefropatiju i kardijalnu dijabetičku neuropatiju
- Izražaj receptora za vitamin D u različitim tkivima
- Izražaj sigma-1 receptora, koneksina 45 i paneksina 1 u tkivu bubrega

### **TEHNIČKE VJEŠTINE:**

Imunohistokemijsko bojenje, tehnike perfuzije i fiksacije tkiva, rezanje blokova na mikrotomu, rezanje smrznutih rezova na kriostatu, rezanje na vibratomu, korištenje fluorescencijskog mikroskopa (Olympus BX51) i digitalne kamere (Olympus DP71 camera).

## **POZNAVANJE RAČUNALNIH PROGRAMA:**

Microsoft Office paket (Word, Excel, Power Point, Outlook), EndNote, Adobe Photoshop, Image J, Cell A.

## **Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima:**

1. Milardović I, **Vitlov Uljević M**, Vukojević K, Kostić S, Filipović N. "Renal expression of sigma 1 receptors in diabetic rats." *Acta Histochem* 2020; 122(6): 151580 - prvi autor s jednakim doprinosom, JCR 2,479, SJR Q2.
2. Filipović N, Bočina I, Restović I, Kević N, Grobe M, Kretschmar G, Mašek T, **Vitlov Uljević M**, Vukojević K, Saraga-Babić M, Vuica A. "Ultrastructural characterization of vitamin D receptors and metabolizing enzymes in the lipid droplets of the fatty liver in rat." *Acta Histochem* 2020; 122(2): 151502 - dopisni autor, JCR 2,479, SJR Q2
3. **Vitlov Uljević M**, Bočina I, Restović I, Kunac N, Mašek T, Kretschmar G, Grobe M, Šarić M, Vukojević K, Saraga-Babić M, Filipović N. "Reabsorption in the proximal tubuli-ultrastructural evidence for a novel aspect of renal VEGF trafficking." *Cell Tissue Res* 2018; 374(1): 189-201 - prvi autor, JCR 5,249, SJR Q1.
4. Luetić M, Kretschmar G, Grobe M, Jerčić L, Bota I, Ivić V, Balog M, Zjalić M, **Vitlov Uljević M**, Heffer M., Gaspar R., Tabi T., Vukojević K., Vari S. G., Filipović N. "Sex-specific effects of metformin and liraglutide on renal pathology and expression of connexin 45 and pannexin 1 following long-term high-fat high-sugar diet." *Acta Histochem* 2021; 123(8): 151817 - koautor, JCR 2,479, SJR Q2.
5. Urlić M, Urlić I, Urlić H, Mašek T, Benzon B, **Vitlov Uljević M**, Vukojević K, Filipović N. "Effects of Different n6/n3 PUFAs Dietary Ratio on Cardiac Diabetic Neuropathy." *Nutrients* 2020; 12(9): 2761 - koautor, JCR 5,719, JCR Q1.
6. Luetić M, **Vitlov Uljević M**, Mašek T, Benzon B, Vukojević K, Filipović N. "PUFAs supplementation affects the renal expression of pannexin 1 and connexins in diabetic kidney of rats." *Histochem Cell Biol* 2019; 153(3): 165-175 - koautor, JCR 4,304, JCR Q1.

7. Jerčić L, Kostić S, **Vitlov Uljević M**, Vukušić Pušić T, Vukojević K, Filipović N. "Sigma-1 Receptor Expression in DRG Neurons During a Carrageenan-Provoked Inflammation." *Anat Rec (Hoboken)* 2019; 302(9): 1620-1627 - koautor, JCR 2,064, SJR Q2.

8. Delić Jukić IK, Kostić S, Filipović N, Gudelj Ensor L, Ivandić M, Dukić JJ, **Vitlov Uljević M**, Ferhatović Hamzić L, Puljak L, Vukojević K. "Changes in expression of special AT-rich sequence binding protein 1 and phosphatase and tensin homologue in kidneys of diabetic rats during ageing." *Nephrol Dial Transplant* 2018; 33(6): 1075, koautor, JCR 5,992, JCR Q1.

9. Baković M, Filipović N, Ferhatović Hamzić L, Kunac N, Zdrilić E, **Vitlov Uljević M**, Kostić S, Puljak L, Vukojević K. "Changes in neurofilament 200 and tyrosine hydroxylase expression in the cardiac innervation of diabetic rats during aging." *Cardiovasc Pathol* 2017; 32: 38-43 - koautor, JCR 2,185, SJR Q1.