



Utjecaj dugotrajnog tretmana saharozom u pitkoj vodi na ekspresiju gena Δ desaturaza te koncentraciju masnih kiselina i malondialdehida u jetri štakora

The influence of long-term sucrose drinking on Δ -desaturase gene expression, fatty acid concentration and malondialdehyde values in rat liver

Miljak¹, K., T. Mašek², K. Starčević³

Sažetak

Istraživanje je provedeno kako bi se istražio učinak dugotrajnog tretmana saharozom u pitkoj vodi na masnokiselinski profil jetre, ekspresiju Δ -desaturaza i lipidnu peroksidaciju. Istraživanje je provedeno na Wistar štakorima koji su bili podijeljeni u dvije skupine: kontrolnu i pokusnu, koja je dobivala 30 % saharoze u pitkoj vodi. Tretman je značajno promijenio masnokiselinski profil jetre. Najznačajnije su promjene bile porast C16:0, C16:1n7 i C18:1n9 i pad količine C18:0, C18:2n6, C18:3n3, C20:4n6 i C20:5n3. Sumirani profil masnih kiselina pokazao je značajan porast mononezasićenih masnih kiselina i zasićenih masnih kiselina. Primjena kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu pokazala je porast ekspresije Δ -9-desaturaze i smanjenje ekspresije Δ -5-desaturaze. Takav rezultat potvrđuje dobivene koncentracije masnih kiselina u jetri. Koncentracija malondialdehida je bila povećana u pokusnoj skupini u plazmi i jetri. Uzrok promjena bilo je djelovanje više čimbenika od kojih smatramo da su najbitniji: porast β -oksidacije C18:2n6 i C18:3n3, porast de novo lipogeneze kao i promjene u aktivnosti Δ -desaturaza. Povećana lipidna peroksidacija, mjerena stvaranjem malondialdehida, posljedica je povećane koncentracije glukoze i neenzimske glikozilacije. Dobiveni rezultati potvrđuju visok stupanj oštećenja tkiva kod dugotrajnog tretmana saharozom u pitkoj vodi, te daju posredan uvid u promjene koje nastaju konzumacijom velikih količina zaslađenih pića kao predispozicije za nastanak dijabetesa tipa 2.

Abstract

This study was conducted to investigate the effect of long-term treatment with sucrose in drinking water on the fatty acid profile of the liver, Δ -desaturase gene expression and lipid peroxidation. We used Wistar rats, divided into two groups: control and experimental, which received 30 % sucrose in their drinking water. The treatment significantly changed the fatty acid profile of the liver. The most significant alterations were an increase in C16:0, C16:1n7 and C18:1n9; and a decrease in C18:0, C18:2n6, C18:3n3, C20:4n6 and C20:5n3. The summarized fatty acid profile showed a significant increase in monounsaturated fatty acids and saturated fatty acids. The application of quantitative PCR revealed an increase in the expression of the Δ 9-desaturase and a decrease

¹ Katarina Miljak, studentica, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
² izv. prof. dr. sc. Tomislav Mašek, Zavod za prehranu i dijetetiku životinja, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
³ dr. sc. Kristina Starčević, viša znanstvena suradnica, Zavod za stočarstvo, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

*e-mail:
 kate.miljak@gmail.com

KLjučne riječi: saharoza, Δ -desaturaze, masne kiseline, malondialdehid, dijabetes tipa 2

Key words: sucrose, Δ -desaturase, fatty acids, malondialdehyde, diabetes type 2

in the expression of $\Delta 5$ -desaturase. The resulting concentration of fatty acids found in the liver, confirmed these results. The malondialdehyde content increased in the experimental group, in the plasma and liver. The observed changes were the results of several factors, of which the most important were: the increase in α -oxidation of C18:2n6 and C18:3n3, the increase in de novo lipogenesis and the changes in the activity of Δ -desaturases. Increased lipid peroxidation was measured by the formation of malondialdehyde, which originates from the increased concentration of glucose and non-enzymatic glycosylation. The obtained results confirm the high degree of tissue damage from long-term treatment with sucrose in drinking water. Moreover, they provide an indirect insight into the changes that are caused by consumption of large amounts of sweetened beverages, as a predisposition to type 2 diabetes.

UVOD

Diabetes mellitus ili šećerna bolest jest metabolički poremećaj obilježen kroničnom hiperglikemijom, promjenama u metabolizmu ugljikohidrata, masti i bjelančevina kao posljedica nedovoljne sinteze i/ili aktivnosti hormona inzulina (Who, 2014.). Inzulin je bjelančevinasti hormon koji sintetiziraju beta-stanice Langerhansovih otočića gušterače, a sastoji se od dvaju polipeptidnih lanaca povezanih disulfidnim mostovima. Inzulin se pohranjuje unutar stanice u obliku granula koje se, kao odgovor na specifične metaboličke signale, otpuštaju u cirkulaciju (Najjar, 2000.). Njegova je najvažnija uloga u regulaciji metabolizma ugljikohidrata i masti tako da potiče ulazak glukoze u stanice i skladištenje masti u masnom tkivu te inhibira sintezu glukoze u jetri (Sonksen i Sonksen, 2000.). Dijabetes tipa 2 (DM tipa 2, tip neovisan o inzulinu) pripada kategoriji dijabetesa u kojoj su stanice rezistentne na inzulin (Shoback i sur., 2011.). Bitnu ulogu u njegovu razvoju imaju promjene u načinu života, obilježene smanjenjem tjelesne aktivnosti i povećanjem konzumacije energetski bogatih namirnica, što dovodi do pretilosti koja je važan preduvjet za nastanak dijabetesa (Edelstein i Knowler Brain, 1997.). Ozbiljne dugoročne komplikacije dijabetesa uključuju bolesti kardiovaskularnog sustava, moždani udar, ulkuse na ekstremitetima te oštećenja leće i oka (Who, 2014.). Centar za kontrolu i prevenciju bolesti u SAD-u u lipnju 2014. godine objavio je statističke podatke o rasprostranjenosti dijabetesa u SAD-u, koji su pokazali da svaka jedanaesta osoba u SAD-u boluje od dijabetesa, dok 30 % oboljelih osoba ne zna da boluje od dijabetesa. Usporedno, svaka je treća osoba u stadiju predijabetesa, a 90 % ljudi s predijabe-

tesom nije svjesno svoga stanja. Podaci Centra za kontrolu i prevenciju bolesti iz 2010. godine navode dijabetes kao sedmi po redu uzrok smrti među Amerikancima (Who, 2014.).

Konzumacija zaslađenih napitaka u razvijenim zemljama postaje važan čimbenik u razvoju bolesti poput dijabetesa tipa 2 ili srčanih bolesti. Ljudi koji konzumiraju jednu do dvije limenke zaslađenih pića dnevno imaju 26 % veću šansu za razvoj dijabetesa tipa 2 u usporedbi s onima koji takva pića konzumiraju u mnogo manjim količinama (Malik i sur., 2010.a; Malik i sur., 2010.b). Višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA) osnovna su strukturna komponenta stanične membrane i njihova prisutnost u fosfolipidnom dvosloju omogućuje fluidnost i selektivnu propusnost membrane (Tosi i sur., 2014.). Zbog njihove važnosti u organizmu svaka promjena u njihovu metabolizmu ili strukturi dovodi do različitih patoloških promjena u tkivima (Tosi i sur., 2014.). Regulacija biokonverzije PUFA iz njihovih prekursora uključuje aktivnost enzima, poput desaturaza ($\Delta 9D$, $\Delta 6D$, $\Delta 5D$) i elongaza (Elovl2, Elovl4, Elovl5, Elovl6) (Tu i sur., 2010).

U dijabetesu tipa 1 postoje promjene u biokonverziji PUFA-e zbog pada u ekspresiji gena za $\Delta 9$ desaturazu (Montanaro i sur., 2005.), $\Delta 6$ desaturazu (Comte i sur., 2004.; Rimoldi i sur., 2001.) i $\Delta 5$ desaturazu (Montanaro i sur., 2005.), uz promjene u sastavu masnih kiselina u tkivima, poput smanjene količine palmitinske kiseline i jednostruko nezasićenih masnih kiselina (MUFA) (Comte i sur., 2004.; Montanaro i sur., 2005.). Nasuprot tomu, kod DM tipa 2 ekspresija gena za desaturaze je povišena (Imamura i sur. 2014.).

MATERIJALI I METODE

Životinje

U istraživanju koje je trajalo 20 tjedana, koristili smo 8 muških štakora koji su bili nasumično podijeljeni u dvije skupine: kontrolnu, koja je dobivala pitku vodu, i pokusnu, koja je dobivala 30 % saharoze (w/v) u pitkoj vodi. Svi su štakori držani u standardnim polikarbonatnim kavezima na piljevini i u kontroliranim uvjetima okoliša. Temperatura prostorije iznosila je $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, a svjetlosni se režim sastojao od 12 sati svjetla i 12 sati tame (svjetlo je bilo upaljeno od 7:00 do 19:00 sati). Hrana i voda su u svakom trenutku bili dostupni za konzumaciju (*ad libitum*). Razina glukoze u krvi analizirana je svaki dan u 8 sati pomoću Accu-Chek Go brzog analizatora.

Određivanje sastava masnih kiselina

Masne su kiseline izolirane iz jetrenog tkiva pomoću mješavine kloroforma i metanola (2 : 1, v/v) nakon čega je otapalo otpareno pod strujom dušika. Ukupni su lipidi nakon toga otopljeni u 100 μL mješavine kloroforma i metanola (2 : 1, v/v) uz dodatak 0,1 % betahidroksitoluena (BHT) kao antioksidansa. Takvi su lipidi pohranjeni na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do daljnje analize. Derivatizacija masnih kiselina u metil-estere napravljena je primjenom BF_3 u metanolu (20 %-tna otopina) tijekom tri sata. Dobiveni esteri masnih kiselina analizirani su na plinskom kromatografu (Gas Chromatograph GC 2010 Plus; Shimadzu, Kyoto, Japan) s kapilarnom kolonom ZB WAX (Phenomenex, Torrance, CA, USA) i helijem kao plinom nositeljem te uporabom FID detektora. Pojedine masne kiseline identificirane su primjenom eksternog standarda (37 Component FAME mix, Supelco, Bellefonte, PA, USA). Sastav masnih kiselina izračunat je kao postotak pojedinih masnih kiselina prema ukupnim masnim kiselinama.

Indeks za *de novo* lipogenezu izračunat je iz sastava masnih kiselina prema sljedećoj formuli: $[(\text{C16:1})+(\text{C18:1n-7})+(\text{C20:3n-9})]/[(\text{ukupne masne kiseline})]$.

Određivanje koncentracije malondialdehida

Opseg lipidne peroksidacije mjereno je određivanjem koncentracije malondialdehida (MDA) u plazmi kao reaktivne tvari tiobarbiturne kiseline (TBARS). Metoda se temelji na reakciji MDA s tiobarbiturnom kiselinom (TBA), pri čemu jedna molekula MDA reagira s dvije molekule TBA te nastaje stabilna ružičasta do crvena boja koja se najbolje očitava na 532 nm. Koncentracija MDA u plazmi služi kao biomarker lipidne peroksidacije i kao indikator oštećenja uzrokovanih slobodnim radikalima jer je malondialdehid relativno stabilan produkt koji nastaje degradacijom polinezasićenih masnih kiselina. Koncentraciju MDA (TBARS) mjerili smo metodom tekućinske kromatografije prema Agarwallu i Chaseu (2002.).

Ukratko, alikvot od 20 μL injektiran je u Shimadzu LC-2010HT tekućinski kromatograf s Inert-Sustain C18 kolonom (4,6 mm * 150 mm, 5 μm veličina čestica; GL Sciences, Tokyo, Japan). Standardna je krivulja pripremljena uporabom 1,1,3,3-tetraetoksipropana. Koncentracija MDA izražena je u nmol po gramu jetrenog tkiva ili nmol na mililitar plazme.

Lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja

Ukupnu RNK izdvojili smo iz jetrenog tkiva pomoću komercijalnog kita SV Total RNA Isolation (Promega GMBH, Mannheim Germany) prema priloženim uputama. Za izolaciju RNA korišteno je 30 mg jetrenog tkiva štakora. Homogenizacija i liza stanica odvaganog jetrenog tkiva provedena je u 175 μL pufera za lizu. Zatim je dodano 350 μL pufera za razrjeđenje RNA te je uzorak termostatiran u vodenoj kupelji na $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom tri minute. Nakon lize stanica dobivena reakcijska smjesa centrifugirana je na 12 000 okretaja/min tijekom deset minuta. Dobiveni bistri lizat prebačen je u novu mikroeprevetu sa silikagel membranom. Reakcijskoj smjesi dodano je 200 μL 95 %-tnog etanola i centrifugirana je tijekom jedne minute na 12 000 okretaja/min. Bistra je otopina uklonjena, a RNA vezana za silikagel membranu dva puta je isprana otopinom za pranje RNA. Zaostala DNA uklonjena je DNA-aza mješavinom. RNA vezana na silikagel membrani otpuštena je sa 100 μL vode očišćena od nukleaza. Pomoću spektrofotometra (Bio-

Drop μ LITE, BioDrop, Cambridge, UK) određena je količina i čistoća izolirane RNA. Uzorci su pohranjeni na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do daljnje analize.

Lačana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (qRT-PCR) provedena je pomoću komercijalnog kita One-Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II (TaKaRa Bio Inc. Shiga, Japan) prema uputama proizvođača u uređaju Stratagene MxPro3005 (Agilent Technologies, USA and Canada). Reakcija qRT-PCR provedena je u volumenu od $20\text{ }\mu\text{L}$. Program qRT-PCR reakcije započinje reakcijom obrnutog prepisivanja na $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ pet minuta nakon čega slijedi inaktivacija enzima reverzne transkriptaze na $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 sekundi. Nakon toga u drugom segmentu PCR reakcije slijedi reakcija umnažanja cDNA prema uvjetima iz literature (Huanga i sur., 2006.). Rezultati su normalizirani s unutarnjom kontrolom (β -actin i cyclophyllin gen). Metodom relativne kvantifikacije pomoću $\Delta\Delta\text{Ct}$ metode ($2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$) određena je ekspresija gena u uzorcima jetre. Smanjenu ekspresiju označuju vrijednosti od 0 do 1, a povećanu vrijednosti veće od 1.

Statistička obrada podataka

Podaci su analizirani primjenom statističkog programa Statistica 2010 program (Statistica, Tulsa, OK, USA). Prije utvrđivanja statističkih rezultata svi su podaci testirani na normalnost distribucije primjenom Shapiro-Wilks testa. Svi su rezultati izraženi kao srednja vrijednost i standardna pogreška. Kretanje koncentracije glukoze testirano je analizom varijance za ponovljena mjerenja i *post hoc* testom (Bonferonijeva korekcija). Primjenom t-testa analizirana je statistička značajnost razlika sastava masnih kiselina, sumiranog profila i koncentracije malondialdehida. Statistička značajnost razlike u ekspresiji gena utvrđena je pomoću vrijednosti Ct krivulja. Razlike su smatrane statistički značajnim ako je $p < 0,05$.

REZULTATI

Vrijednosti glukoze u krvi nisu se značajno razlikovale između skupina sve do 16. i 20. tjedna kada postaju značajno više u skupini tretiranoj saharozom (slika 1).

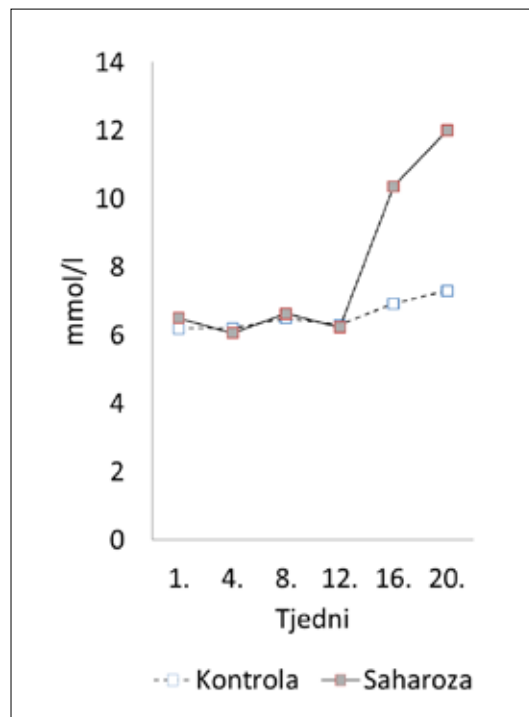
Usporedbom rezultata kontrolne i pokusne skupine vidljive su značajne promjene u sastavu

masnih kiselina u uzorcima jetre, one uključuju promjene u sastavu zasićenih masnih kiselina pokusne skupine poput značajnog porasta C16:0 ($p = 0,001$) i pada C18:0 ($p = 0,001$). Sumirani profil masnih kiselina (slika 2.a) poklapa se s ovim rezultatima, odnosno pokazuje povećan udio zasićenih masnih kiselina u jetri pokusnih štakora u odnosu na jetru kontrolne skupine ($p = 0,001$).

U sastavu MUFA-e kod pokusne skupine može se uočiti izrazit porast C16:1n7 ($p = 0,001$), C18:1n9 ($p = 0,011$), C18:1n7 ($p = 0,005$). Rezultati se podudaraju s onima na sumiranom profilu masnih kiselina (slika 2.a), gdje se vidi izrazito povećanje udjela MUFA-e u jetri pokusnih životinja ($p = 0,006$).

Kod PUFA pokusne skupine vidljiv je drastičan pad C18:2n6 ($p = 0,000$), C18:3n3 ($p = 0,000$), C20:4n6 ($p = 0,005$) i C20:5n3 ($p = 0,000$). Sumirani profil masnih kiselina (slika 2.a) odgovara ovim rezultatima, odnosno prikazuje znatno smanjenje udjela PUFA-e u jetri pokusnih životinja ($p = 0,006$).

Uz promjene sastava masnih kiselina nakon tretmana saharozom mjerili smo i koncentraciju MDA u plazmi (slika 2.b) i tkivu jetre (slika 2.c)



Slika 1. Utjecaj tretmana saharozom na razinu glukoze u krvi. Razina glukoze mjerena je svako jutro u 8 sati (non-fasting). □, kontrola; ■, saharoza. Kretanje koncentracije glukoze testirano je analizom varijance za ponovljena mjerenja i *post hoc* testom (Bonferonijeva korekcija).

pokusnih štakora kao pokazatelja stupnja oksidacijskog oštećenja tkiva. Koncentracija MDA u plazmi pokusne skupine bila je povećana u odnosu na koncentraciju kod kontrolne skupine ($p = 0,044$), što prate i rezultati mjerenja koncentracije MDA u jetrenom tkivu, gdje također nalazimo povišenu koncentraciju MDA u odnosu na kontrolnu skupinu ($p = 0,015$).

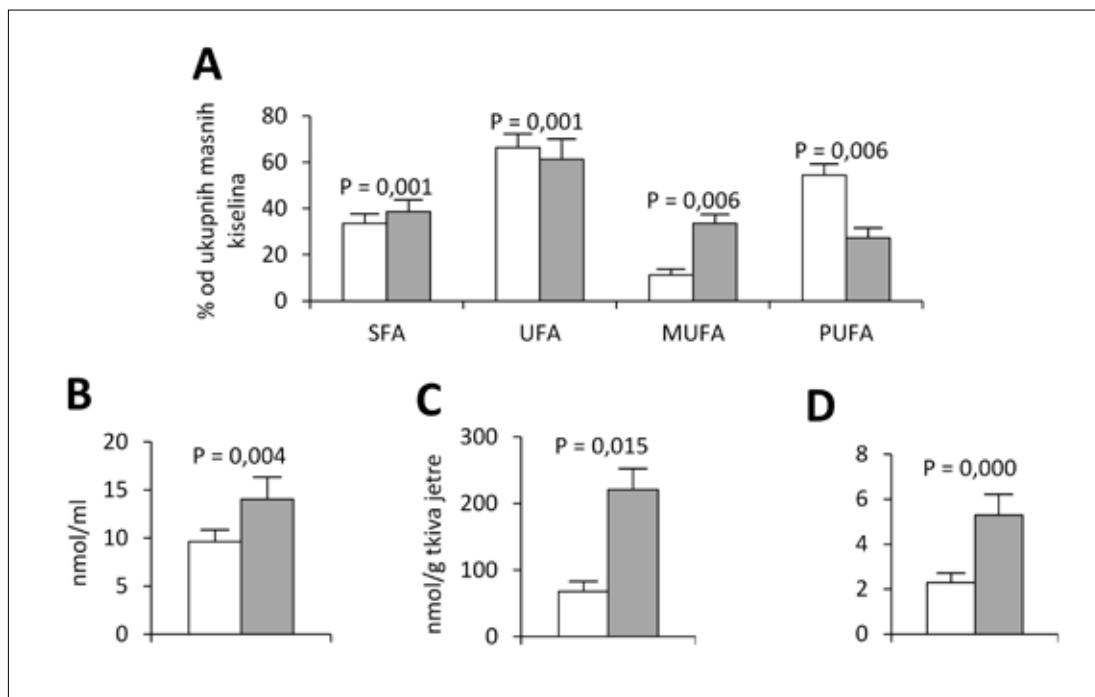
Indeks za de novo lipogenezu pokazao je značajno povišene vrijednosti kod pokusne skupine ($p < 0,001$) (slika 2.d).

Primjena qRT-PCR dokazala je smanjenu ekspresiju $\Delta 5$ desaturaze ($p = 0,023$) u odnosu na kontrolnu skupinu i izrazito povišenu ekspresiju $\Delta 9$ desaturaze ($p = 0,000$) (slika 3).

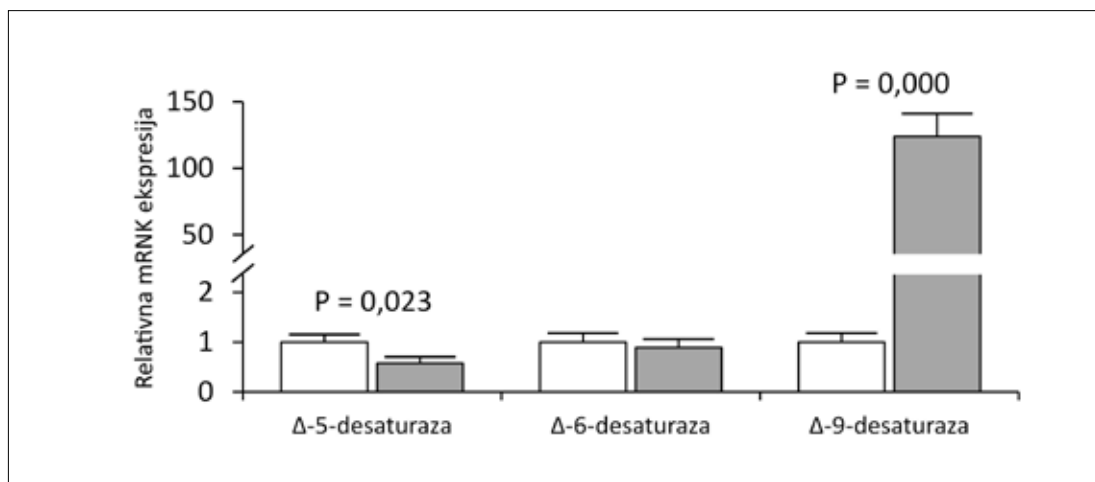
RASPRAVA

Istraživanje je potvrdilo našu pretpostavku kako dugotrajno uzimanje visoke količine saharoze putem pitke vode dovodi do porasta razine glukoze. Prema Kawasakiju i suradnicima (2005.) objašnjenje za ovakvu hiperglikemiju

Slika 2. Utjecaj tretmana saharozom na: A) sumirani profil masnih kiselina u jetri štakora (SFA, zasićene masne kiseline; UFA, nezasićene masne kiseline; MUFA, mononezasićene masne kiseline; PUFA, polinezasićene masne kiseline, B) razinu MDA u plazmi, C) razinu MDA u jetri pokusnih štakora i D) indeks za de novo lipogenezu izračunat iz sastava masnih kiselina $[(C16:1)+(-C18:1n-7)+(C20:3n-9)]/[ukupne\ masne\ kiseline]$. □, kontrola; ■, saharoza. Statistička značajnost utvrđena je primjenom t-testa.



Slika 3. Relativna ekspresija mRNA desaturaza pokusne skupine relativno prema kontrolnoj skupini. Ekspresija je utvrđena primjenom kvantitativnog PCRa u realnom vremenu i izračunata iz Ct krivulja primjenom $\Delta\Delta Ct$ metode ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Smanjenu ekspresiju označuju vrijednosti od 0 do 1, a povećanu vrijednosti veće od 1. Statistička je značajnost utvrđena primjenom t-testa na vrijednosti Ct krivulja.



su: povećanje tjelesne mase kao predispozicija za dijabetes, visoka razina saharoze koja sama dovodi do hiperinzulinemije i hiperglikemije te genetska predispozicija štakora za hiperglikemiju. Vrijeme nastanka hiperglikemije varira i ovisi o soju štakora, prehrani i stresu. U našem istraživanju hiperglikemija je bila vidljiva od 16. tjedna. Kod Wistar štakora, hranjenih uobičajenom laboratorijskom hranom, hiperglikemija se pojavljuje već od 8. tjedna (Kawasaki i sur., 2005.; Carvalho i sur., 2012.), što je usporedivo s rezultatima našeg istraživanja.

Analiza masnih kiselina jetre otkrila je velike modifikacije u sastavu. Ukupna razina zasićenih masnih kiselina bila je povišena, i to zbog izrazito visokog porasta palmitinske kiseline. Takvo povećanje razine C16:0 može biti posljedica smanjenja β -oksidacije i/ili povišenja *de novo* sinteze. Razinu *de novo* sinteze mjerili smo indirektno putem indeksa *de novo* sinteze te je taj indeks pokazao značajan porast *de novo* sinteze. Nasuprot tomu, razina C18:0 bila je značajno smanjena. Na razinu C18:0, osim biosinteze elongacijom iz C16:0, utječe i razina biokonverzije u C18:1n9. U našem je istraživanju vidljivo izrazito povećanje mononezasićenih masnih kiselina, C18:1n9 i C18:1n7. Tako visoko povećanje upućuje na pojačanu ekspresiju Δ -9-desaturaze. Tu činjenicu potvrđuje i rezultat qRT-PCR koji je pokazao visoko povećanje ekspresije gena za Δ -9-desaturazu. Povećanje aktivnosti Δ -9-desaturaze povezano je s hiperinzulinemijom (Montanaro i sur., 2005.) jer inzulin povećava ekspresiju Δ -9-desaturaza kod životinja i u staničnim kulturama (Comte i sur., 2004.).

Pokusna skupina štakora imala je izrazito smanjenu razinu C18:2n6. Takvo smanjenje može biti posljedica nedostatnog iskorištavanja iz obroka (Hafidi i sur., 2001.) ili, prema našem mišljenju, vjerojatnije je posljedica povećane β -oksidacije u tkivima. Takva povećana β -oksidacija primijećena je kod dijabetesa tipa 2 (Imamura i sur., 2014.). Izravna posljedica velikog pada razine C18:2n6 jest i drastično smanjenje razine C20:4n6. No, na nisku razinu C20:4n6 osim smanjenja supstrata za elongaciju i desaturaciju odgovorna je i smanjena ekspresija Δ -5-desaturaze. Tretman glukozom doveo je do smanjenja C20:3n6 koji prelazi izravno u C20:4n6 pomoću Δ -5-desaturaze. Ako bi smanjenje aktivnosti Δ -5-desaturaze bilo ključno,

došlo bi do nagomilavanja C20:3n6 koja ne bi mogla prijeći u C20:4n6. Budući da naši rezultati to ne pokazuju, logično je pretpostaviti da je smanjenje C18:2n6 kao prekursora imalo odlučujuću ulogu u drastičnom padu koncentracije C20:4n6. Smanjenje u razini ekspresije Δ -5-desaturaze dodatno smo potvrdili primjenom qRT-PCR. Desaturaze su ključni enzimi u biosintezi mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina. Samim time imaju ključnu ulogu u kontroli masnokiselinskog sastava staničnih membrana što izravno utječe na promjene strukture membrana kod bolesnih stanja i poremećaja. Promjene u masnokiselinskom sastavu utječu na fizičko stanje membrana. Pri tome je odlučujući utjecaj broja i pozicija dvostrukih veza na acilnim ostacima fosfolipida na fizičke karakteristike lipidnog dvosloja (Stubbs i sur., 1981.). Do sada je utvrđeno kako upravo porast udjela (koncentracije, količine) mononezasićenih masnih kiselina dovodi do visoke razine nesklada u membranama (Hafidi i sur., 2001.; Stubbs i sur., 1981.) čime je poremećena osnovna funkcija stanične membrane.

Oksidacijski stres nastaje zbog povećane proizvodnje kisikovih radikala te istodobnog izraženog smanjenja antioksidacijske obrane organizma. Nastanak slobodnih radikala, kao posljedice oksidacijskog stresa, dovodi do razgradnje lipida. Peroksidacija lipida je autokatalitički proces pod djelovanjem slobodnih radikala u kojemu polinezasićene masne kiseline u staničnim membranama tvore hidroperokside. Klinička ispitivanja važnosti lipidne peroksidacije značajno su usporena zbog nedostatka dovoljno kvalitetnog biomarkera. Malondialdehid je jedan od biomarkera koji služi kao glavni pokazatelj peroksidacije lipida i oksidacijskog stresa (Nielsen i sur., 1997.). Malondialdehid nastaje lipidnom peroksidacijom, ali je i nusprodukt sinteze prostaglandina i tromboksana. Njegova je koncentracija značajno povećana u dijabetesu (Gallou i sur., 1993.; Tangvarasittichai i sur., 2009.) i može se pronaći u aterosklerotičnim plakovima kod dijabetesa (Slatter i sur., 2000.). U skladu s navedenim istraživanjima i naše istraživanje pokazalo je povišenu koncentraciju MDA u plazmi i jetrenom tkivu. Povećanje razine MDA u pokusnoj skupini prati i povišenje razine u krvi te smanjenje koncentracije PUFA-e u jetrenom tkivu. Ovi rezultati potvrđuju činjenicu da stanje

hiperglikemije rezultira povećanom peroksidacijom lipida te samim time i povišenjem razine MDA što predstavlja znatan doprinos stanju oksidacijskog stresa.

ZAKLJUČCI

Dugotrajan unos saharoze vodom za piće rezultira hiperglikemijom i stanjem oksidacijskog stresa. Razvoj hiperglikemije rezultirao je stanjem oksidacijskog stresa što se očituje povećanjem koncentracije MDA u plazmi i jetrenom tkivu kao indikatorom lipidne peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina. Hiperglikemija dovodi i do promjena u ekspresiji desaturaza koje su odgovorne za biosintezu masnih kiselina, ali i masnokiselinski sastav staničnih membrana. Budući da je funkcija membrana jedan od najvažnijih fizioloških procesa, naše istraživanje pokazuje dalekosežne implikacije koje kronični unos glukoze putem vode može imati na promjenu sastava masnih kiselina, desaturacijsku aktivost i lipidnu peroksidaciju. Dobiveni rezultati potvrđuju da su uzroci patoloških promjena višestruki te uključuju: promjene u β -oksidaciji, *de novo* sintezi i ekspresiji gena.

LITERATURA

- AGARWAL, R., S. D. CHASE (2002): Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *J. Chromatogr.* 775, 121-126.
- CARVALHO, A. A. F., A. C. S. NAKAMUNE, B. G. BIFFE, M. J. Q. LOUZADA (2012): High-sucrose effect on bone structure, hardness and biomechanics in an obesity model using Wistar male rats. *J. Morphol. Sci.* 29, 32-37.
- COMTE, C., S. BELLENGER, J. BELLENGER, C. TESSIER, J. P. POISSON, M. NARCE (2004): Effects of streptozotocin and dietary fructose on delta-6 desaturation in spontaneously hypertensive rat liver. *Biochimie.* 86, 799-806.
- EDELSTEIN, S. L., R. P. KNOWLER BRAIN (1997): Predictors of progression from impaired glucose tolerance to NIDDM: an analysis of six prospective studies. *Diabetes.* 46, 701-710.
- GALLOU, G., A. RUELLAND, B. LEGRAS, D. MAUGENDRE, H. ALLANNIC, L. CLOAREC (1993): Plasma malondialdehyde in type 1 and type 2 diabetic patients. *Clin. Chim. Acta.* 214, 227-234.
- HAFIDI, M., A. CUELLAR, J. RAMIREZ, G. BANOS (2001): Effect of sucrose addition to drinking water, that induces hypertension in the rats, on liver microsomal D9 and D5-desaturase activities. *J. Nutr. Biochem.* 12, 396-403.
- HUANGA, T., H.-W. Q. YANGB, M. HARADAC, J. UBERAIA, J. RADFORDD, Q. L. GEORGE, J. YAMAHAHARAE, J. ROUFOGALISA, D. BASIL, Y. LI (2006): Salacia oblonga root improves cardiac lipid metabolism in Zucker diabetic fatty rats: Modulation of cardiac PPAR- α -mediated transcription of fatty acid metabolic genes. *Tox. Appl. Pharm.* 210, 78-85.
- IMAMURA, S., T. MORIOKA, Y. YAMAZAKI, R. NUMAGUCHI, H. URATA, K. MOTOYAMA, K. MORI, S. FUKUMOTO, T. SHOJI, M. EMOTO, M. INABA (2014): Plasma polyunsaturated fatty acid profile and delta-5 desaturase activity are altered in patients with type 2 diabetes. *Metabolism.* 63, 1432-1438.
- KAWASAKI, T., A. KASHIWABARA, T. SAKAI, K. IGARASHI, N. OGATA, H. WATANABE, K. ICHIYANAGI, T. YAMANOUCI (2005): Long-term sucrose-drinking causes increased body weight and glucose intolerance in normal male rats. *Brit. J. Nutr.* 93, 613-618.
- MALIK, V. S., B. M. POPKIN, G. A. BRAY, J. P. DESPRÉS, F. B. HU (2010A): Sugar Sweetened Beverages, Obesity, Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease risk. *Circulation.* 121, 1356-1364.
- MALIK, V. S., B. M. POPKIN, G. A. BRAY, J. P. DESPRÉS, W. C. WILLETT, F. B. HU (2010B): Sugar-Sweetened Beverages and Risk of Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes: A meta-analysis. *Diabetes Care.* 33, 2477-2483.
- MONTANARO, M. A., A. M. BERNASCONI, M. S. GONZALEZ, O. J. RIMOLDI, R. R. BRENNER (2005): Effects of fenofibrate and insulin on the biosynthesis of unsaturated fatty acids in streptozotocin diabetic rats. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 73, 369-378.
- NAJJAR, S. M. (2000): Insulin Action: Molecular Basis of Diabetes. U: www.els.net <http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0001402.html>, (pristupljeno 23. veljače 2015).
- NIELSEN, F., B. B. MIKKELSEN, J. B. NIELSEN, H. R. ANDERSEN, P. GRANDJEAN (1997): Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative

- stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin. Chem.* 43, 1209-1214.
- RIMOLDI, O. J., G. S. FINARELLI, R. R. BRENNER (2001): Effects of diabetes and insulin on hepatic delta6 desaturase gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283, 323-326.
 - SHOBACK, D., G. DAVID, A. GARDNER (2011): Greenspan's basic & clinical endocrinology. 9th ed., New York: McGraw-Hill Medical.
 - SLATTER, D. A., C. H. BOLTON, A. J. BAILEY (2000): The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia.* 43, 550-555.
 - SONKSEN, P., J. SONKSEN (2000): Insulin: understanding its action in health and disease. *Br. J. Anaesth.* 85, 69-79.
 - STUBBS, C. D., T. KOUYAMA, K. KINOSITA, A. IKEGAMI (1981): Effect of double bonds on the dynamic properties of the hydrocarbon region of lecithin bilayers, *Biochemistry.* 20, 4257-4262.
 - TANGVARASITTICHAJ, S., P. POONSUB, O. TANGVARASITTICHAJ, V. SIRIGULSATIEN (2009): Serum Levels of Malondialdehyde in Type 2 Diabetes Mellitus Thai Subjects. *Siriraj Med. J.* 61, 20-23.
 - TOSI, F., F. SARTORI, P. GUARINI, O. OLIVIERI, N. MARTINELLI (2014): Delta-5 and delta-6 desaturase: crucial enzymes in polyunsaturated fatty acid-related pathways with pleiotropic influences in health and disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 824, 61-81.
 - TU, W. C., R. J. COOK-JOHNSON, M. J. JAMES, B. S. MÜHLHÄUSLER, R. A. GIBSON (2010): Omega-3 long chain fatty acid synthesis is regulated more by substrate levels than gene expression. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 83, 61-68.
 - WORLD HEALTH ORGANIZATION (2014): About diabetes. U: <http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/statsreport14/national-diabetes-report-web.pdf>, (pristupljeno: 12. 3. 2015).