



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Petra Roginek

**UTJECAJ DODATKA
EIKOZAPENTAENSKE I
DOKOZAHEKSAENSKE MASNE KISELINE
NA UPALU, OKSIDACIJSKI STRES I
METABOLIZAM LIPIDA TIJEKOM
RAZVOJA METABOLIČKOGA SINDROMA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2026.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Petra Roginek

**UTJECAJ DODATKA
EIKOZAPENTAENSKE I
DOKOZAHEKSAENSKE MASNE KISELINE
NA UPALU, OKSIDACIJSKI STRES I
METABOLIZAM LIPIDA TIJEKOM
RAZVOJA METABOLIČKOGA SINDROMA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Izv. prof. dr. sc. Kristina Starčević

Prof. dr. sc. Donatella Verbanac

Zagreb, 2026.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Petra Roginek

**INFLUENCE OF EICOSAPENTAENOIC
AND DOCOSAHEXAENOIC FATTY ACID
ON INFLAMMATION, OXIDATIVE STRESS
AND LIPID METABOLISM IN THE
DEVELOPMENT OF METABOLIC
SYNDROME**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Associate Professor Kristina Starčević, PhD

Professor Donatella Verbanac, PhD

Zagreb, 2026

Doktorski rad predan je na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Doktorska disertacija izrađena je u Zavodu za kemiju i biokemiju i Zavodu za prehranu i dijetetiku životinja, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Eksperimenti na životinjama provedeni su u Jedinici za laboratorijske životinje na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.

Istraživanje je provedeno kao dio istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost „Debljina i starost majke uzrokuju spolno ovisne negativne učinke na metabolizam lipida i upalu kod podmlatka“, voditeljice izv. prof. dr. sc. Kristine Starčević (IP-2022-10-4578), te u sklopu projekta „Razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“ DOK-01-2018 financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.

Mentorice:

- izv. prof. dr. sc. Kristina Starčević, Zavod za kemiju i biokemiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- prof. dr. sc. Donatella Verbanac, Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

SAŽETAK

Dokozaheksaenska i eikozapentaenska kiselina višestruko su nezasićene n-3 masne kiseline koje imaju važnu ulogu u sprječavanju inzulinske rezistencije i razvoja kronične upale. Pozitivni učinci ovih masnih kiselina znanstveno su potvrđeni, ali molekularni mehanizmi njihova djelovanja još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj prehrane s dodatkom eikozapentaenske i dokozaheksaenske masne kiseline u eksperimentalnom životinjskom modelu na uspješnost prevencije metaboličkog sindroma. Također je ispitan i utjecaj spola kao biološke varijable na razvoj i prevenciju metaboličkog sindroma.

Istraživanje je provedeno na 30 Wistar štakora (15 mužjaka i 15 ženki) kod kojih je metabolički sindrom izazvan primjenom visoke koncentracije fruktoze u vodi. Istodobno su životinje bile tretirane dodatkom eikozapentaenske i dokozaheksaenske masne kiseline. Na dobivenim uzorcima tkiva jetre i bijelog masnog tkiva ispitan je utjecaj eikozapentaenske i dokozaheksaenske masne kiseline na glavne molekularne biljege inzulinske rezistencije, kronične upale i oksidacijskog stresa te na koncentraciju masnih kiselina u biološkim membranama.

Dodatak dokozaheksaenske i eikozapentaenske masne kiseline pokazao je pozitivan učinak na smanjenje biljega dislipidemije, oksidacijskog stresa te smanjenje ekspresije lipogenih i upalnih gena u tkivu jetre i bijelom masnom tkivu. Također, dodatak određenog omjera n-3 masnih kiselina smanjio je ekspresiju transkripcijskog faktora *Srebp-1c*. Posljedično je došlo do smanjenja ekspresije gena uključenih u *de novo* lipogenezu i povećanja ekspresije gena uključenih u β -oksidaciju. Pozitivan učinak dodatka DHA i EPA-e vidljiv je u snižavanju ekspresije proupalnih gena (*Tnf- α* , *Il-6*, *Tgf- β*) i povećanoj ekspresiji adiponektina u bijelom masnom tkivu, što ima za rezultat smanjenje kronične upale niskog stupnja. Utjecaj spola kao dodatne biološke varijable bio je vidljiv u razlici ekspresije lipogenih gena (*Acc1*, *Fasn*, *Scd1*) i gena β -oksidacije (*Ppar- α*).

Dokozaheksaenska i eikozapentaenska masna kiselina inhibiraju upalne procese, smanjuju lučenje proupalnih citokina te smanjuju sintezu triaciglicerola u jetri. Pokazano je da prehrana s dodatkom DHA i EPA-e može regulirati ekspresiju molekularnih biljega kronične upale i oksidacijskog stresa te time može biti učinkoviti način prevencije metaboličkog sindroma.

Ključne riječi: metabolički sindrom, fruktoza, upala, oksidacijski stres, inzulinska rezistencija, EPA i DHA

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: Metabolic syndrome is a condition involving a set of several high-risk factors, including insulin resistance, dyslipidemia, obesity and hypertension. Disturbance of lipid metabolism is an important component in the development of metabolic syndrome, therefore nutritional interventions that include changes in the composition of lipids in the food may present an important strategy for the prevention of metabolic syndrome and consequent diseases. Polyunsaturated fatty acids participate in the regulation of inflammatory responses by producing inflammatory mediators called eicosanoids. Fatty acids from the n-3 line and their metabolites have anti-inflammatory properties, while eicosanoids, which are formed as a product of the metabolism of n-6 fatty acids (arachidonic acid), have pro-inflammatory properties. Obesity occurs as a consequence of long-term positive energy balance, which promotes the development of chronic low-grade inflammation. The adipose tissue cells of an individual subject to obesity will hypertrophy in order to handle the increased need for excess lipid storage. Such hypertrophied adipocytes increase production of proinflammatory adipokines and cytokines, tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) and reduce production of adiponectin. Chronic inflammation promotes the development of oxidative stress, which is defined as a shift in the balance in cellular oxidation-reduction reactions in the direction of oxidation. Reactive forms of oxygen are produced both in physiological conditions as well as a result of many diseases, and cause direct and indirect damage to various tissues and organs. The antioxidant mechanism protects the organism from oxidative stress caused by excessive formation of reactive oxygen compounds. Factors that contribute to oxidative stress in obesity and therefore also in metabolic syndrome, include hyperglycemia, elevated tissue lipid levels, vitamin and mineral deficiencies, and chronic inflammation. Polyunsaturated fatty acids are a common target of free radicals thus formed, resulting in lipid peroxidation. The products of lipid peroxidation, such as malondialdehyde (MDA), 4-hydroxynonenal (HNE), isoprostane and others, are potential markers of oxidative stress. Intense lipid peroxidation in biological membranes leads to a loss of fluidity, a decrease in membrane potential, an increase in permeability to hydrogen and other ions, as well as a possible rupture of the cell and the release of its contents. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids maintain the fluidity and elasticity of cell membranes, inhibit inflammatory processes, reduce the secretion of proinflammatory cytokines by macrophages, and reduce the synthesis of

triacylglycerol in the liver. Moreover, the increased intake of polyunsaturated n-3 fatty acids can improve the sensitivity of cells to insulin and prevent changes to glucose homeostasis and insulin resistance. These effects are a consequence of the reduced accumulation of fatty acids in the muscle tissue and liver. Polyunsaturated n-3 fatty acids, especially eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids, reduce the level of triacylglycerol and free fatty acids in plasma by means of activation of transcription factors responsible for the suppression of lipogenesis genes and the expression of genes involved in the beta-oxidation of fatty acids. Furthermore, the sex hormones testosterone and estrogen have an influence on expression of genes involved in lipid metabolism, and thus on the composition of fatty acids as well. As of late, an increasing amount of research links these hormones with the incidence of metabolic syndrome and diabetes, although the molecular mechanism by which sex hormones affect lipogenesis is still not clear. Although the anti-inflammatory and hypolipidemic properties of eicosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acids are well known, their effects on obesity and their efficiency in the prevention and treatment of metabolic syndrome are still not fully explained. Controlled intake of polyunsaturated n-6 fatty acids and an increased intake of eicosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acids may be useful in the prevention of metabolic syndrome and related chronic diseases.

Objective: the main objective of this research was to examine the influence of eicosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acid supplemented diet and sex on the success of metabolic syndrome prevention in an experimental animal model. The second goal was to establish an experimental nutritional model of metabolic syndrome and to examine the related changes in lipogenesis, inflammation, and oxidation status, as well as to examine what impact if any the dietary supplement of eicosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acids has on changes in the molecular mechanisms characteristic of the development of metabolic syndrome. The third objective was to determine whether sex affects the molecular mechanisms by which eicosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acids can modulate the pathogenesis of metabolic syndrome.

Material and methods: The research was conducted on 30 Wistar Han rats (15 males and 15 females), at the Institute for Medical Research and Occupational Medicine in Zagreb. The experimental protocols were approved by the Veterinary Directorate of the Ministry of Agriculture of the Republic of Croatia (authorization EP 107-2/2017). The animals were housed in

polycarbonate cages under a lighting regime of 12 hours of light and 12 hours of darkness, at a temperature of 20 degrees Celsius. Some of the animals were administered fructose dissolved in water (15% w/v) so as to induce the development of metabolic syndrome, while they were simultaneously being treated with different ratios of n-6 and n-3 fatty acids. Different ratios of n-6/n-3 in food were achieved by using mixtures of linseed, sunflower and fish oil. The n-6/n-3 control ratio was 6, while the lowest ratio n-6/n-3 was 1. This resulted in a total of three groups for both sexes: first control group (n-6/n-3 = 6, no fructose administered), a second group (fructose administered, n-6/n-3 = 6), and a third group (fructose administered, n-6/n-3 ~ 1 (9% EPA and 11% DHA in diet)). Access to food and water was unlimited (ad libitum) for all animals during the experiment. The rats were weighed once a week on an electronic scale, and the glucose level in their capillary blood samples was measured using Accu-Chek Go.

Sampling: After 20 weeks, the animals were sacrificed, and the tissue and organ samples (blood, liver, white adipose tissue) were weighed and frozen in liquid nitrogen at -80 °C until analysis. Blood was collected in tubes (BD Vacutainer® tubes, Plymouth, UK) for biochemical tests. After clot formation, the blood collected in biochemical test tubes was centrifuged at 2000 revolutions for 15 minutes, after which the serum was separated and stored at -80 °C until biochemical analysis.

Analysis of blood and liver tissue: Biochemical blood composition was determined in the serum using an automatic analyzer (SABA 18, AMS, Italy). The concentration of glucose and triacylglycerol was determined. Insulin concentration was determined using the ELISA method and a commercially available kit (Rat insulin kit ELISA, Mercodia, Upsalla, Sweden). Insulin sensitivity was assessed using the HOMA-IR (homeostatic model assessment-Insulin Resistance) index according to the following equation:

$$\text{HOMA-IR} = \text{fasting glucose (mmol/l)} * \text{fasting insulin (mU/ml)} / 22.5$$

and sensitivity was additionally checked using the QUICKI index, according to an equation with a logarithmic transformation of glucose and insulin concentrations:

$$\text{QUICKI} = 1 / \log (\text{insulin concentration } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glucose concentration (mg/dL)})$$

The content of liver triacylglycerols was determined using a commercially available reagent (Free Glycerol Reagent, F6428, Sigma-Aldrich) following the manufacturer's instructions.

Fatty acid composition in liver tissue and white adipose tissue: Liver tissue and white adipose tissue lipids were extracted using a solvent mixture of chloroform and methanol (2 : 1, v/v). After extraction, the lipids were dried under nitrogen, resuspended in a solvent mixture of chloroform and methanol (2 : 1, v/v), with added BHT, and stored at -80°C . Neutral lipids (NL, mainly triacylglycerols) and polar lipids (PL, phospholipids) were further separated on solid phase extraction columns (SPE-columns, Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Methyl esters of liver tissue and white adipose tissue fatty acids were prepared using KOH in methanol solution. The prepared samples were analyzed by gas chromatography using a mass detector (QP2010 Ultra, Shimadzu, Kyoto, Japan) with a BPX70 capillary column (internal diameter 0.25 mm, film thickness 0.25 μm , length 30 m, SGE, Austin, TX, USA) under previously established conditions. Internal standards were used: methyl tricosanoate (C23:0) and 1,2-dinonedecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (19:0 PC).

Malondialdehyde determination: Malondialdehyde in serum and liver tissue was determined by liquid chromatography on a Shimadzu 2010 liquid chromatograph (Shimadzu, Japan) using an InertSustain C-18 column (4.6 mm – 150 mm – 5 μm) (GL Sciences Inc., Japan) and UV-vis detector. This method is based on the reaction of malonaldehyde with thiobarbituric acid, which forms and gives a red color to a complex of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), the concentration of which is determined.

Reverse Transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR): Total ribonucleic acid (RNA) was isolated from liver tissue and white adipose tissue using a commercially available kit (SV Total RNA Isolation System, Promega GMBH, Mannheim, Germany) and stored at -80°C . RNA concentration and purity were determined through the use of a spectrophotometer (BioDrop μLITE , Cambridge, UK). Isolated RNA was subjected to reverse transcription and one-step quantitative PCR using One Step TB Green PrimeScript RT-PCR set II (TaKaRa Bio Inc. Shiga, Japan) following the manufacturer's instructions on a qPCR device (Stratagene MxPro3005, Agilent Technologies, USA and Canada). Using the $\Delta\Delta\text{Ct}$ ($2\Delta\Delta\text{Ct}$) method, gene expression was analyzed and quantified according to a housekeeping gene (*β -actin* and *cyclophilin*) and the fold change factor of gene expression was calculated using the $\Delta\Delta\text{Ct}$ value. Some of the genes related to oxidative stress (*Chop/Gadd153*, *Nfe2l2*) inflammation (*Tnf- α* , *Tgf- β* , *Il-6*) and lipid metabolism

(*Srebp-1c*, *Acc1*, *Fasn*, *Fads1*, *Fads2*, *Scd1*, *Cpt-1a*, *Ppar- α*) were tested in the quantitative PCR reaction.

Western blotting analysis of target proteins: Total proteins were isolated from liver and white adipose tissue by homogenization in a lysing buffer (RIPA lysing buffer, EMD Millipore, Billerica, MA, USA) with added protease inhibitors (SIGMAFAST protease inhibitor tablets, Sigma-Aldrich, Germany). Target proteins determined in the liver are 4-HNE, NRF2, CD36, Δ 6D, L-FABP whereas adiponectin is determined in white adipose tissue.

Statistical analyses: The results were analyzed using the GraphPad Prism 8 program. The normality of the distribution was tested using the Shapiro-Wilks test. ANOVA and post hoc Tukey's test were applied to determine statistical differences between group mean values. Significant differences will be considered at $P < 0.05$.

Results: After 20 weeks, animals divided into groups based on different experimental treatment did not show significant differences in body weight in either fructose-fed rats or control groups. Similarly, body weight remained unchanged even in animals receiving n-3 fatty acid supplementation. Moreover, the nutritional treatment did not affect the level of glucose in the serum either. Hyperinsulinemia without hyperglycemia is possible in the early stages of development of metabolic syndrome, which indicates the initial dysfunction of pancreatic beta cells.

Although there were no changes in serum glucose levels, insulin sensitivity expressed as HOMA-IR and QUICKI index showed significant differences in both sexes. HOMA-IR showed a significant difference in the CON-HF and DHA-HF groups compared to the control group ($P < 0.01$). The QUICKI index showed the most significant difference in males in the CON-HF group compared to the CON group ($P < 0.01$), the difference being slightly smaller ($P < 0.05$) in the other groups.

The concentration of triacylglycerol in the serum increased significantly in the CON-HF group ($P < 0.05$) compared to the CON group and the DHA-HF group ($P < 0.01$) in both sexes. Cholesterol concentration also increased significantly in the CON-HF group of both males and females compared to the CON group ($P < 0.01$) and the DHA-HF group ($P < 0.01$). Food enriched with EPA and DHA (DHA-HF) maintained similar serum triacylglycerol and cholesterol levels to those

of the CON group, indicating a positive effect of n-3 fatty acids. Similar results were obtained in the liver tissue, the concentration of triacylglycerol also increased significantly in the CON-HF group of females compared to both the CON and DHA-HF groups ($P < 0.05$). A significant increase in the concentration of triacylglycerol in the liver is also visible in male CON-HF and DHA-HF groups compared to the CON group ($P < 0.01$).

After 20 weeks, the experimental treatment with 15% fructose in water significantly increased the values of MDA-TBARS in the CON-HF group in the serum of both males and females, compared to the CON group ($P < 0.01$) and DHA-HF group ($P < 0.01$). In addition, a significant difference was found in liver tissue in males in the CON-HF group compared to the CON group ($P < 0.05$) and in females in the CON-HF group compared to both the CON and DHA-HF groups ($P < 0.01$). The fatty acid profile of liver tissue and white adipose tissue shows a clear difference between the nutritional treatments. The most important differences between treatments were observed in the diet with 15% fructose in water (CON-HF), which caused an increase in the content of monounsaturated fatty acids (MUFA); while DHA-HF caused a decrease in n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA).

Food with 15% fructose has a strong effect on *de novo* lipogenesis (DNL). In the liver, insulin activates the transcription factor sterol regulatory element binding protein 1c (*Srebp-1c*), which increases the transcription of genes required for the synthesis of fatty acids and triacylglycerols. There is a tendency for increased gene expression in the CON-HF group compared to the CON group in males, while in females the increase in *Srebp-1c* expression is significant in the CON-HF group compared to both the CON and DHA-HF groups ($P < 0.05$). In line with the increased level of triacylglycerol in the serum and the increased expression of the transcription factor *Srebp-1c* in the liver tissue, the diet with 15% fructose in water (CON-HF) also significantly increased the expression of genes encoding enzymes involved in lipogenesis (*Acc1*, *Fasn*, *Scd1*). In both sexes, there is a significant expression of the *Acc1* gene in the CON-HF group compared to the CON group ($P < 0.01$), while the expression of the *Fasn* gene shows a significant increase in females and in the CON-HF group compared to both CON and DHA-HF group ($P < 0.01$). In males, the *Fasn* gene shows a tendency of increase in CON-HF compared to both CON and DHA-HF groups, however, the increase is not significant. The diet with the addition of EPA and DHA (DHA-HF) shows a tendency to reduce the expression of the mentioned genes, displaying the protective function of the fatty acids administered.

Furthermore, the expression of the *Scd1* gene both in the liver as well as in white adipose tissue shows a significant increase in the CON-HF group compared to the CON group in both sexes (in the liver $P < 0.01$ in males and in females $P < 0.05$, in white adipose tissue $P < 0.01$ in both sexes), while the addition of n-3 fatty acids was able to maintain a level of expression similar to that of the control group.

The expression of *Fads1* and *Fads2* genes, which code for $\Delta 5$ and $\Delta 6$ desaturase proteins, did not change significantly in the experimental groups compared to the control group. Corroborating this, the expression of the $\Delta 6$ desaturase protein tested using the western blot method also showed no significant changes in the tested groups.

In male rats the expression of the transmembrane protein CD-36 significantly increased under the influence of nutritional treatment in the CON-HF group ($P < 0.05$) compared to the CON group, while in females there was no statistically significant difference between the examined groups.

The expression of the *Ppar- α* gene, a transcription factor that regulates the expression of enzymes involved in fatty acid oxidation, was significantly reduced in the CON-HF group of females compared to the CON and DHA-HF groups ($P < 0.01$), while there were no significant differences in males. The *Ppar- α* gene is positively correlated with the *Cpt-1a* gene, which is significantly decreased in the CON-HF group of males compared to both the CON group ($P < 0.05$) and the DHA-HF group ($P < 0.01$), while in females it is significantly decreased in the CON-HF group compared to both experimental groups ($P < 0.01$).

The group fed 15% fructose in water (CON-HF) shows an increase in inflammatory genes expression compared to the CON and DHA-HF groups. This change is significant in the *Tgf- β* gene in both sexes in the liver as well as in white adipose tissue ($P < 0.01$). A significant change was also noticed in the expression *Il-6* gene in the liver, in the CON-HF group of males compared to the CON group ($P < 0.01$) as well as in the CON-HF group of females compared to the CON group ($P < 0.05$). In addition, the *Tnf- α* gene also shows an increased expression in the CON-HF group in both sexes in the liver compared to both the CON and DHA-HF groups, although this change is not significant. Accordingly, in white adipose tissue there is also a tendency of growth in the CON-HF group of males compared to the studied groups, while this change in females is significant in comparison to the CON group ($P < 0.01$) and DHA-HF group ($P < 0.01$). The influence of nutritional treatment is also clearly visible in the expression of the protein adiponectin in white adipose tissue. Adiponectin expression significantly decreased in the CON-HF group in both males

($P < 0.005$) and females ($P < 0.05$) compared to the control group, while in the DHA-HF group protein expression significantly increased compared to the CON-HF group in both sexes ($P < 0.005$ in males, $P < 0.01$ in females). In other words, the addition of n-3 fatty acids enabled the values to remain similar to those of the control group.

In order to gain insight into the protective effect of n-3 fatty acids in rats which had 15 % fructose solution added to their diets, the effect of DHA and EPA on the expression of the *Nfe2l2* and *Chop* genes and the NRF2 and 4-HNE proteins was observed. In accordance with increased lipid peroxidation in the liver, food with added 15% fructose solution reduces the expression of the transcription factor *Nfe2l2*, which regulates the antioxidant response, and it significantly increases the expression of oxidative stress proteins and genes. In the liver, the results of mRNA expression of the *Nfe2l2* gene, which codes for the NRF2 protein, show a decrease in the CON-HF group compared to the CON group, this decrease is significant when compared to the DHA-HF group ($P < 0.05$). In white adipose tissue, the decrease in the CON-HF group was significant in both sexes, in males compared to both the CON and DHA-HF groups ($P < 0.01$), and in females compared to the CON group ($P < 0.01$). Additional confirmation was obtained by measuring the expression of NRF 2 protein using the western blot method. Expression of the *Chop* gene as an indicator of endoplasmic reticulum stress was significantly increased in the CON-HF group compared to the CON and DHA-HF groups in both sexes ($P < 0.01$). The expression of 4-hydroxynonenal, an indicator of lipid peroxidation, shows a tendency to increase in the CON-HF group in both sexes, and this increase is significant in females compared to the CON and DHA-HF groups ($P < 0.001$). The addition of DHA and EPA displays a tendency to decrease the expression of 4-HNE in the DHA-HF group in males compared to both the CON and CON-HF groups ($P < 0.001$), whereas in females the expression was significantly reduced compared to the CON-HF group ($P < 0.001$).

Conclusion: A diet containing 15 % fructose in water solution caused changes in the expression of inflammatory markers, lipid peroxidation, fatty acid profile and oxidative stress. These changes indicate the presence of several metabolic risk factors that contribute to the development of metabolic syndrome. The addition of DHA and EPA to food resulted in a decrease in the expression of genes involved in de novo lipogenesis (*Fasn*, *Acc1* and *Scd1*) by promoting β -oxidation of fatty acids, which ultimately resulted in an improvement in insulin sensitivity and dyslipidemia. Furthermore, the addition of n-3 fatty acids to the diet resulted in a decrease in the expression of

inflammatory genes (*Tnf- α* and *Il-6*), a decrease in the ratio of n-6/n-3 fatty acids and a decrease in the concentration of arachidonic acid – all of this demonstrates a protective effect aiding the anti-inflammatory defense mechanism. Polyunsaturated n-3 fatty acids also showed antioxidant activity by reducing the concentration of lipid peroxidation products (MDA and 4-HNE), and they regulated the expression of *Nfe2l2* and *Chop* genes. Sex also had a significant effect on the results, with the biggest differences between male and female rats having been observed in the expression of lipogenic genes. A significant reduction in the expression of *Acc1* and *Fasn* genes in female rats fed n-3 fatty acids confirms the protective effect of female sex hormones, which have an important role in the prevention of MetSyn symptoms. Dietary intervention that includes increasing the intake of DHA and EPA can regulate the expression of molecular markers of insulin resistance, chronic inflammation and oxidative stress, and can therefore be an important strategy used to prevent metabolic syndrome.

Key Words: metabolic syndrome, fructose, inflammation, oxidative stress, insulin resistance, EPA and DHA

POPIS KRATICA

- **ACC1** – acetil-CoA karboksilaza 1 (engl. *acetyl-CoA carboxylase 1*)
- **ALA** – α -linolenska kiselina (engl. *alpha-linolenic acid*)
- **ANOVA** – analiza varijance (engl. *analysis of variance*)
- **ARA** – arahidonska kiselina (engl. *arachidonic acid*)
- **BMI** – indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)
- **BHT** – butilirani hidroksitoluen (engl. *butylated hydroxytoluene*)
- **CD36** – translokaza masnih kiselina (engl. *fatty acid translocase*)
- **Chop** – engl. *C/EBP homologous*
- **CPT-1a** – karnitin-palmitoil-transferaza 1a (engl. *carnitine palmitoyltransferase 1A*)
- **DGLA** – dihomogama-linolenska kiselina (engl. *dihomo-gamma-linolenic acid*)
- **DHA** – dokozaheksaenska kiselina (engl. *docosahexaenoic acid*)
- **DNL** – *de novo* lipogeneza (engl. *de novo lipogenesis*)
- **DPA** – dokozapentaenska kiselina (engl. *docosapentaenoic acid*)
- **Δ 5D** – delta-5 desaturaza (engl. *delta-5 desaturase*)
- **Δ 6D** – delta-6 desaturaza (engl. *delta-6 desaturase*)
- **EGIR** – Europska skupina za proučavanje inzulinske rezistencije (engl. *European Group for the Study of Insulin Resistance*)
- **ELISA** – enzimski imunosorbentni test (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)
- **EPA** – eikozapentaenska kiselina (engl. *eicosapentaenoic acid*)
- **FADS1** – desaturaze masnih kiselina 1 (engl. *fatty acid desaturase 1*)
- **FADS2** – desaturaze masnih kiselina 2 (engl. *fatty acid desaturase 2*)
- **FASN** – masnokiselinska sintaza (engl. *fatty acid synthase*)
- **GLA** – γ -linolenska kiselina (engl. *gamma-linolenic acid*)
- **GLUT4** – prijenosnik glukoze 4 (engl. *glucose transporter type 4*)
- **HDL** – lipoproteini visoke gustoće (engl. *high density lipoproteins*)
- **4-HNE** – 4-hidroksinonenal (engl. *4-hydroxynonenal*)
- **HOMA-IR** – homeostatski model procjene inzulinske rezistencije (engl. *Homeostatic Model Assessment – Insulin Resistance*)

- **IDF** – Međunarodna zaklada za dijabetes (engl. *International Diabetes Foundation*)
- **IL-6** – interleukin-6
- **KOH** – kalijev hidroksid (engl. *potassium hydroxide*)
- **LA** – linolna kiselina (engl. *linoleic acid*)
- **L-FABP** – jetreni protein koji veže masne kiseline (engl. *liver fatty acid binding protein*)
- **LDL** – lipoproteini niske gustoće (engl. *low density lipoproteins*)
- **MDA** – malondialdehid (engl. *malondialdehyde*)
- **MetSyn** – metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*)
- **MUFA** – jednostruko nezasićene masne kiseline (engl. *monounsaturated fatty acids*)
- **NCEP ATP III** – Nacionalni program obrazovanja o kolesterolu: Panel za liječenje odraslih III (engl. *National Cholesterol Education Program: Adult Treatment Panel III*)
- **Nfe2l2** – nuklearni faktor eritroid 2-povezan faktor 2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)
- **NL** – neutralni lipidi (engl. *neutral lipids*)
- **NRF2** – nuklearni faktor 2 povezan s eritroidnim faktorom 2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)
- **PL** – fosfolipidi (engl. *phospholipids*)
- **PPAR-α** – receptor aktiviran proliferatorom peroksisoma alfa (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor alpha*)
- **PUFA** – višestruko nezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acids*)
- **qPCR** – kvantitativna lančana reakcija polimerazom (engl. *quantitative PCR*)
- **QUICKI** – kvantitativni indeks provjere osjetljivosti na inzulin (engl. *Quantitative insulin-sensitivity check index*)
- **RIPA** – pufer za radioimunoprecipitaciju (engl. *radioimmunoprecipitation assay buffer*)
- **ROS** – reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)
- **RNA** – ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)
- **RT-qPCR** – reverzna transkripcija i kvantitativni PCR u stvarnom vremenu (engl. *reverse transcription quantitative PCR*)
- **Scd1** – stearoil-CoA desaturaza 1 (engl. *stearoyl-CoA desaturase 1*)
- **SFA** – zasićene masne kiseline (engl. *saturated fatty acids*)

- **SPE** – ekstrakcija na krutoj fazi (engl. *solid-phase extraction*)
- **Srebp-1c** – sterolni regulatorni element-vezujući protein 1c (engl. *sterol regulatory element-binding protein 1c*)
- **SZO** – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)
- **TBARS** – tvari reaktivne na tiobarbiturnu kiselinu (engl. *thiobarbituric acid reactive substances*)
- **TGF- β** – transformirajući čimbenik rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*)
- **TNF- α** – čimbenik tumorske nekroze alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*)
- **VLDL** – lipoproteini vrlo niske gustoće (engl. *very low density lipoproteins*)

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Definicija metaboličkog sindroma	2
1.2. Čimbenici rizika	3
1.2.1. Pretilost i abdominalna raspodjela tjelesne masti	3
1.2.2. Inzulinska rezistencija i netolerancija na glukozu	5
1.2.3. Dislipidemija	7
1.2.4. Hipertenzija	7
1.2.5. Okolišni i genetski čimbenici	8
1.3. Životinjski modeli metaboličkog sindroma	8
1.4. Masne kiseline	10
1.4.1. Višestruko nezasićene masne kiseline	11
1.4.2. Sinteza i metabolizam višestruko nezasićenih masnih kiselina	13
1.4.3. Funkcija višestruko nezasićenih masnih kiselina	15
1.5. Upala	16
1.6. Oksidacijski stres	17
1.6.1. Oksidacijski stres i slobodni radikali	17
1.6.2. Lipidna peroksidacija	18
1.6.3. Mehanizam lipidne peroksidacije	19
1.6.4. Produkti lipidne peroksidacije	21
2. OBRAZLOŽENJE TEME	24
3. MATERIJAL I METODE	26
3.1. Pokusne životinje	27
3.2. Hranidbeni tretman	27
3.3. Uzimanje uzoraka	29
3.4. Potvrda modela metaboličkog sindroma	30
3.4.1. Određivanje koncentracije inzulina u serumu	30
3.4.2. Homeostatski model procjene inzulinske rezistencije (HOMA-IR)	30
3.4.3. Kvantitativni indeks provjere osjetljivosti na inzulin (QUICKI)	31
3.5. Mjerenje koncentracije glukoze u punoj krvi	31
3.6. Određivanje koncentracije triacilglicerola i ukupnog kolesterola u serumu	31
3.6.1. Određivanje koncentracije triacilglicerola	31
3.6.2. Određivanje koncentracije ukupnog kolesterola	31

3.7.	Određivanje koncentracije malondialdehida u serumu i tkivu jetre	32
3.8.	Određivanje triacilglicerola u tkivu jetre.....	32
3.9.	Određivanje koncentracije masnih kiselina u tkivima.....	33
3.9.1.	Ekstrakcija lipida.....	33
3.9.2.	Ekstrakcija fosfolipida.....	34
3.9.3.	Metilacija masnih kiselina.....	34
3.9.4.	Analiza sastava masnih kiselina	34
3.10.	Određivanje ekspresije gena u tkivima.....	36
3.10.1.	Izdvajanje ukupne RNA	36
3.10.2.	Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR)	36
3.11.	Izdvajanje proteina i određivanje njihove koncentracije u tkivima.....	39
3.12.	Western blot analiza	40
3.12.1.	Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u uvjetima denaturacije	40
3.12.2.	Prijenos proteina iz gela na membranu	40
3.12.3.	Detekcija razdvojenih proteina.....	41
3.13.	Statistička analiza	42
4.	REZULTATI.....	43
4.1.	Uspostava i potvrda modela metaboličkog sindroma.....	44
4.2.	Učinak dodataka DHA i EPA-e na metabolizam lipida	46
4.2.1.	Koncentracija triacilglicerola i kolesterola u serumu i jetri.....	46
4.2.2.	Sastav masnih kiselina u tkivima	47
4.2.3.	Ekspresija lipogenih gena i proteina te gena povezanih s β -oksidacijom	56
4.3.	Učinak dodataka DHA i EPA-e na oksidacijski i upalni odgovor.....	63
4.3.1.	Markeri lipidne peroksidacije i oksidacijskog stresa.....	63
4.3.2.	Ekspresije upalnih gena i proteina u jetri i bijelom masnom tkivu	68
5.	RASPRAVA.....	73
6.	ZAKLJUČCI	83
7.	LITERATURA.....	86
8.	ŽIVOTOPIS	101
9.	PRILOZI.....	103

1. UVOD

1.1. Definicija metaboličkog sindroma

Definicija metaboličkog sindroma (MetSyn) mijenjala se tijekom posljednjih pola stoljeća i cijeli niz različitih organizacija i udruga predlagale su različite definicije, pri čemu su se koristile različitom terminologijom. MetSyn je stanje koje povezuje cijeli niz biokemijskih, metaboličkih i kliničkih čimbenika zbog čega je svjetski zdravstveni problem (1).

Metabolički sindrom prvi je put definiran 1923. godine kao skup metaboličkih poremećaja koje povezuje istodobna prisutnost visokog krvnog tlaka (hipertenzija), povišena razina glukoze u krvi (hiperglikemija) i giht (2). Kasnih 1940-ih abdominalna pretilost zajedno sa šećernom bolesti tipa 2, aterosklerozom i gihtom čini skup poremećaja koji obilježavaju MetSyn. Godine 1988. Raeven je skupinu kardiovaskularnih čimbenika rizika, koji uključuju hipertenziju, netoleranciju na glukozu, visoku razinu triacilglicerola i nisku razinu lipoproteina visoke gustoće (engl. *high density lipoproteins*, HDL) objedinio u jedan naziv – sindrom X (3). MetSyn se nazivao i smrtonosnim kvartetom, zbog četiriju čimbenika koji ga obilježavaju: pretilost gornjeg dijela tijela, netolerancija na glukozu, hipertrigliceridemija i hipertenzija (4).

Svjetska zdravstvena organizacija (SZO, engl. World Health Organization) 1998. godine pokušala je među prvima dati definiciju metaboličkog sindroma (5). Budući da se inzulinska rezistencija smatra glavnim čimbenikom patofiziologije MetSyn-a, dokaz o prisutnosti inzulinske rezistencije neizostavan je zahtjev u definiciji SZO-a. Uz prisutnost inzulinske rezistencije moraju biti zadovoljena barem dva dodatna kriterija, koja uključuju pretilost, dislipidemiju, hipertenziju i mikroalbuminuriju. Definicija SZO-a prva je povezala ključne komponente inzulinske rezistencije, pretilosti, dislipidemije i hipertenzije.

Godine 1999. Europska skupina za proučavanje inzulinske rezistencije (engl. European Group for the Study of Insulin Resistance, EGIR) predložila je izmjenu definicije SZO-a (6). Kao i SZO, EGIR smatra da je inzulinska rezistencija glavna u patofiziologiji metaboličkog sindroma. U ovom je slučaju inzulinska rezistencija definirana vrijednošću inzulina u plazmi natašte koja je veća od 75 %. Upotreba samo povišenog inzulina natašte kao odraza inzulinske rezistencije pojednostavljuje definiciju. Također, slično definiciji SZO-a, EGIR definicija zahtijeva dva dodatna kriterija, pretilost, hipertenziju ili dislipidemiju. Kriterij pretilosti pojednostavljen je samo na opseg struka, dok se definicija SZO-a koristila izborom omjera struka i bokova ili indeksom tjelesne mase. Kao dijagnostički kriterij eliminirana je mikroalbuminurija.

Nacionalni program obrazovanja o kolesterolu: Panel za liječenje odraslih III (engl. National Cholesterol Education Program: Adult Treatment Panel III, NCEP ATP III) 2001. godine, dao je svoju definiciju metaboličkog sindroma (7). Definicija koju donosi NCEP ATP III uključuje ključne značajke: hiperglikemiju/rezistenciju na inzulin, visceralnu pretilost, aterogenu dislipidemiju i hipertenziju. Važno je da ne zahtijeva ispunjenje ni jednog posebnog kriterija (npr. inzulinsku rezistenciju ili pretilost), već samo da su ispunjena najmanje tri od pet kriterija. Dakle, definicija ne ugrađuje ni jednu unaprijed stvorenu predodžbu o temeljnom uzroku metaboličkog sindroma.

Međunarodna zaklada za dijabetes (engl. International Diabetes Foundation, IDF) 2005. godine objavila je nove kriterije metaboličkoga sindroma (8). Iako uključuje iste opće značajke kao i druge definicije, zahtijeva prisutnost pretilosti, ali ne nužno inzulinske rezistencije. Zahtjev pretilosti zadovoljen je graničnim vrijednostima specifičnima za populaciju. To objašnjava činjenicu da različite populacije, etničke pripadnosti i nacionalnosti imaju različite distribucije normi za tjelesnu masu i opseg struka. Definicija također prepoznaje da se odnos između prethodno navedenih vrijednosti i rizika za razvoj šećerne bolesti tipa 2 ili kardiovaskularnih bolesti razlikuje u različitim populacijama. Iako je visceralna pretilost danas prepoznata kao važan čimbenik, definicija IDF-a vrlo je kritizirana zbog svog naglaska na pretilosti, a ne na rezistenciju na inzulin u patofiziologiji MetSyn-a (9).

Stoga se može zaključiti da je metabolički sindrom vrlo složen poremećaj s vrlo visokim socioekonomskim troškovima te se smatra svjetskom epidemijom. Najčešća je definicija MetSyn-a SZO-ova, prema kojoj se metaboličkim sindromom smatra patološko stanje obilježeno rezistencijom na inzulin, visceralnom pretilošću, dislipidemijom, i hipertenzijom (10).

1.2. Čimbenici rizika

1.2.1. Pretilost i abdominalna raspodjela tjelesne masti

Moderno društvo obilježava sjedilački način života te konzumacija jeftine i kalorične hrane što je dovelo do epidemije pretilosti u svijetu (11). Pretilost je često povezana s kroničnom upalom, metaboličkim i vaskularnim promjenama koje prethode razvoju MetSyn-a.

Masno je tkivo po strukturi heterogeno tkivo koje se sastoji od adipocita, preadipocita, fibroblasta, endotelnih stanica i matičnih stanica koje se mogu diferencirati u različite tipove

stanica. Masno tkivo je važna energetska zaliha, koji pohranjuje višak energije koji se ne može iskoristiti na drugi način. Osim skladištenja energije, masno tkivo ima aktivnu ulogu u mnogim homeostatskim procesima, uključujući potrošnju energije, regulaciju teka i regulaciju glukoze. Osim toga, masno je tkivo ključno za funkciju štitnjače, imunosti odgovor, održavanje zdravlja kostiju, reprodukciju i zgrušavanje krvi. Aktivan je endokrini organ koji luči mnoge čimbenike koji reguliraju metaboličku i vaskularnu funkciju. Postoje znatne razlike u različitim depovima masnog tkiva. Nakupljanje masti intraabdominalno i potkožno oko trbuha (središnja, abdominalna, visceralna, gornji dio tijela ili pretilost u obliku jabuke) povezano je višestrukim bolestima, kao i s metaboličkim sindromom (12). S druge strane, nakupljanje masti u potkožnom dijelu kukova, bedara i donjeg dijela trupa (donji dio tijela ili pretilost u obliku kruške) smatra se manje štetnim ili čak zaštitnim od kardiometaboličkih komplikacija (13).

Prekomjeren unos visokokalorične hrane i povećanje tjelesne mase uzrokuje nakupljanje masnog tkiva, povećanje volumena (hipertrofija) i broja (hiperplazija) adipocita. U hipertrofiranim adipocitima toksini se mogu akumulirati i inducirati unutarstanični stres što dovodi do autofagije kao zaštitnog staničnog mehanizma ili apoptoze (14). Na razini tkiva ovi mehanizmi mogu pridonijeti infiltraciji imunosti stanica u masnom tkivu, hipoksiji, poremećenoj adipogenezi, nepovoljnoj raspodjeli masti i kronično promijenjenim signalima iz masnog tkiva (metaboliti, adipokini, citokini, imunosti stanice). Nemogućnost masnog tkiva da skladišti svu mast, uzrokuje veći protok slobodnih masnih kiselina u portalnu cirkulaciju, što dovodi do ektopičnog nakupljanja lipida, ponajprije u jetri i skeletnim mišićima (15). Osim toga, adipociti u depovima visceralne masti pokazuju povećano izlučivanje proupalnih adipokina (npr. čimbenika tumorske nekroze alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- α) i interleukina-6 (IL-6)) i smanjeno lučenje adiponektina, što smanjuje osjetljivost na inzulin i aktivira proupalne puteve u masnom tkivu, jetri i skeletnim mišićima. Promijenjena ekspresija ili aktivnosti adiponektina mogu biti važan čimbenik u razvoju metaboličkog sindroma.

Adiponektin je protuupalni citokin koji luče isključivo adipociti i važan je u homeostazi glukoze i lipida te metabolizmu cijelog tijela. Povećava transport glukoze u mišićima i potiče oksidaciju masnih kiselina (16). Također, inhibira jetrene glukoneogene enzime i brzinu proizvodnje endogene glukoze u jetri. Adiponektin istodobno povećava osjetljivost na inzulin i inhibira mnoge korake upalnog procesa. Njegove su smanjene razine povezane s visokim indeksom

tjelesne mase (engl. *body mass index*, BMI), inzulinskom rezistencijom, nepovoljnim profilima lipida u plazmi i razvojem kardiovaskularnih bolesti (17).

Faktor tumorske nekroze alfa (TNF- α) također je uključen u razvoj pretilosti i inzulinske rezistencije. Osim toga, može oslabiti aktivnost tirozin-kinaze inzulinskih receptora i poremetiti signalizaciju inzulina (18). Faktor tumorske nekroze alfa također narušava inzulinsku signalizaciju povećanjem serumskih neesterificiranih masnih kiselina, koje mogu inducirati inzulinsku rezistenciju u perifernim tkivima (19). Ove promjene moduliraju imunski odgovor, stvaranje lipidnih medijatora i upalu, što u konačnici inducira pokretanje i razvoj MetSyn-a. Većina osoba s prekomjernom tjelesnom masom ima povišene razine leptina koje ne potiskuju tek, odnosno otpornost na leptin, što uzrokuje prekomjerno lučenje TNF- α i IL-6.

Interleukin-6 povezan je i s inzulinskom rezistencijom i pretilošću, a njegova ekspresija i koncentracija u pozitivnoj su korelaciji s pretilošću, poremećenom tolerancijom na glukozu i inzulinskom rezistencijom. Osim toga, koncentracija IL-6 u plazmi predviđa razvoj šećerne bolesti tipa 2. Interleukin-6 smanjuje inzulinsku signalizaciju u perifernim tkivima smanjujući ekspresiju signalnih komponenti inzulinskih receptora. Nedavno je otkriveno da je IL-6 važan čimbenik kroničnog upalnog stanja i jetrene inzulinske rezistencije kod pretilosti (20).

Štetni signali iz masnog tkiva (adipociti, makrofagi, endotelne i druge stanice masnog tkiva) mogu aktivirati puteve osjetljive na stres kao odgovor na različite stresne podražaje, što može dovesti do disfunkcije stanica i pridonijeti upali i MetSyn-u povezanom s pretilošću.

1.2.2. Inzulinska rezistencija i netolerancija na glukozu

Inzulin je najsnažniji anabolički hormon u tijelu, s brojnim učincima na metabolizam lipida i proteina, transport iona i aminokiselina, proliferaciju staničnog ciklusa, diferencijaciju stanica i sintezu dušikova oksida (21).

Inzulin proizvode β -stanice gušterače kao odgovor na hiperglikemiju te on stimulira korištenje glukoze na različite načine u različitim tkivima. Tkiva koja uklanjaju glukozu iz cirkulacije i utječu na korištenje glukoze najviše su skeletni mišići, jetra i masno tkivo. U skeletnim mišićima i masnom tkivu inzulin stimulira unos glukoze translokacijom GLUT4 transportera glukoze na površinu stanice (22). U skeletnim mišićima i jetri inzulin potiče sintezu glikogena iz glukoze i inhibira glikogenolizu. U jetri inzulin također smanjuje jetrenu glukoneogenezu, sprječavajući povećan dotok glukoze u krvotok. U masnom tkivu inzulin inhibira razgradnju masti,

odnosno lipolizu, i potiče unos glukoze. Neto učinak svih tih promjena jest povećanje unosa glukoze, smanjenje razine glukoze u cirkulaciji i povećanje pretvorbe glukoze u molekule za skladištenje poput glikogena ili masti.

Kod inzulinske rezistencije masne, mišićne i jetrene stanice ne reagiraju na odgovarajući način na inzulin, a razine glukoze u cirkulaciji ostaju visoke (10). β -stanice gušterače najprije kompenziraju perifernu inzulinsku rezistenciju povećanjem bazalne i postprandijalne sekrecije inzulina kako bi održale euglikemiju. U nekom trenutku β -stanice više ne uspijevaju učinkovito reagirati i dolazi do pogoršanja homeostaze glukoze, što dovodi do razvoja intolerancije na glukozu. Oslabljeno djelovanje inzulina i hiperinzulinemija uzrokuju razne abnormalnosti u jetri, mišićima i masnom tkivu koje rezultiraju povećanim koncentracijama neesterificiranih slobodnih masnih kiselina i triacilglicerola, niskim razinama HDL-a, hiperglikemijom, poremećenim odlaganjem glukoze, protrombotičkim stanjem i povećanim vaskularnim otporom (23). Stupanj uklanjanja glukoze iz cirkulacije posredovane inzulinom može se razlikovati zbog pretilosti (24). Inzulinska je rezistencija snažan prediktor šećerne bolesti tipa 2, a hiperinzulinemija je zamjenski biljeg za inzulinsku rezistenciju. Dakle, inzulinska signalizacija koordinirano utječe na perifernu upotrebu glukoze, vaskularni tonus i protok krvi. Uobičajeni mehanizmi koji pridonose inzulinskoj rezistenciji mogu stoga utjecati i na vaskularnu funkciju, uključujući hiperglikemiju, uznapredovale produkte glikacije, toksičnost od slobodnih masnih kiselina, pretilost, dislipidemiju i druga proupalna stanja.

Jedan je od modela kojim se procjenjuje inzulinska rezistencija homeostatski model procjene inzulinske rezistencije (engl. *Homeostatic model assesment for insulin resistention*, HOMA-IR). Računa se na temelju vrijednosti glukoze i inzulina u serumu natašte, prema jednadžbi (25):

$$\text{HOMA-IR} = \text{koncentracija inzulina (mU/L)} \times \text{koncentracija glukoze (mmol/L)} / 22,5$$

Uz HOMA-IR koristi se i kvantitativni indeks provjere osjetljivosti na inzulin (engl. *Quantitative insulin-sensitivity check index*, QUICKI) što je empirijski izvedena matematička jednadžba koja je varijacija HOMA-IR jednadžbe s logaritamskom transformacijom koncentracije glukoze i inzulina (26).

$$\text{QUICKI} = 1/\log (\text{koncentracija inzulina } (\mu\text{U/mL}) \times \text{koncentracija glukoze (mg/dL)})$$

1.2.3. Dislipidemija

Povišene razine triacilglicerola i niske razine HDL kolesterola obilježavaju dislipidemiju u metaboličkom sindromu. Povećani triacilgliceroli u prisutnosti inzulinske rezistencije i hiperinzulinemije rezultat su povećane količine slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji. Kako se inzulinska rezistencija povećava, mehanizmi inhibicije lipolize inzulina na masnom tkivu smanjuju se i stvara se više slobodnih masnih kiselina. Također, s više inzulina koji cirkulira na periferiji, lipoprotein lipaza se stimulira i povećava oslobađanje triacilglicerola. Hipertrigliceridemija je povezana s promjenama, i u strukturi i u metabolizmu HDL-a i LDL-a (27). Ipak, hipertrigliceridemija je izvrstan odraz stanja inzulinske rezistencije i jedan je od važnih kriterija za dijagnozu metaboličkog sindroma (28).

Drugi veliki poremećaj lipoproteina u metaboličkom sindromu jest smanjenje HDL kolesterola. To je smanjenje posljedica promjena u sastavu i metabolizmu HDL-a. Prisutnost niskog HDL kolesterola u metaboličkom sindromu djelomično je posljedica visoke koncentracije triacilglicerola. Kako se triacilgliceroli povećavaju, esteri HDL kolesterola zamjenjuju se za triacilglicerole djelovanjem proteina kolesterol-estera, čineći česticu HDL kolesterola manjom i gušćom. Mehanizmima koji nisu dobro shvaćeni manja HDL čestica metabolizira se i čisti nenormalno velikom brzinom, što rezultira niskim razinama HDL-a. Pomak na manje čestice čini ih manje antiaterogenim, jer što su veće i plutajuće, to više slobodnog kolesterola mogu ukloniti iz stanica i aterosklerotskog plaka (29).

Osim HDL-a, na sličan se način mijenja i sastav LDL-a. Manje i gušće čestice LDL-a toksičnije su za endotel, također sposobnije su proći kroz endotelnu bazalnu membranu, što je povezano s povećanim kardiovaskularnim rizikom (15).

1.2.4. Hipertenzija

Uzrok je hipertenzije u metaboličkom sindromu multifaktorski i vjerojatno uključuje sve elemente sindroma, pretilost, inzulinsku rezistenciju i dislipidemiju. Pretilost može biti najvažniji čimbenik, no i ostali elementi sindroma sudjeluju u stvaranju i posredovanju promjena koje u konačnici rezultiraju hipertenzijom (30).

1.2.5. Okolišni i genetski čimbenici

Budući da je MetSyn kombinirani učinak više od jednog čimbenika rizika, njegova se povećana prevalencija u populaciji može djelomično objasniti čimbenicima okoliša koji se odnose na socioekonomsku tranziciju, neuravnotežene prehrambene navike (konzumacija hrane bogate mastima, ugljikohidratima i soli, smanjena konzumacija voća i povrća) i nisku razinu tjelesne aktivnosti. Osim okolišnih čimbenika i genetske predispozicije mogu utjecati na veći populacijski rizik od MetSyn-a, kao što je povećan rizik od povišene razine šećera u krvi, povišenog krvnog tlaka, dislipidemije i pretilosti. Istraživanja u cijelom genomu uspjela su pronaći nekoliko genetskih varijanti koje povećavaju rizik od MetSyn-a, koje su uglavnom bile povezane s genetskim komponentama koje utječu na metabolizam lipida, osjet glukoze, signalizaciju inzulina i kontrolu apetita (31, 32).

1.3. Životinjski modeli metaboličkog sindroma

Patogeneza metaboličkog sindroma vrlo je složena, a temeljni mehanizmi još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Da bi se oni rasvijetlili, mnogi se eksperimentalni životinjski modeli koriste u znanstvene svrhe. Kako je metabolički sindrom skup različitih stanja, a čimbenici koji pridonose značajkama MetSyn-a mogu biti nasljedni ili okolišni, odabir adekvatnog eksperimentalnog modela koji najbolje predstavlja patofiziologiju MetSyn-a u ljudi može biti prilično izazovan. Štakori i miševi najčešći su životinjski modeli koji se koriste u istraživanjima MetSyn-a, a uključuju manipulaciju hranom, genetsku modifikaciju i lijekove.

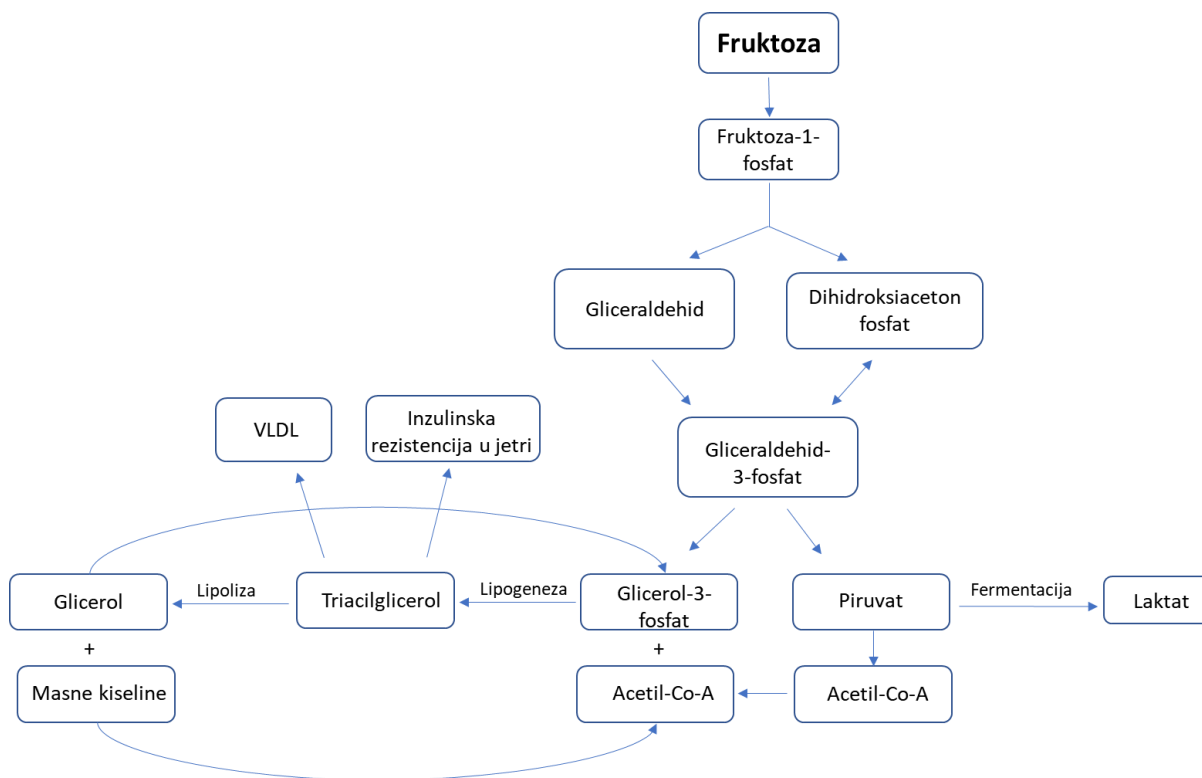
U posljednjih su desetak godina zabilježeni brojni hranidbeni modeli koji mogu inducirati MetSyn u životinja, poput hrane s visokim udjelom fruktoze/saharoze, s visokim udjelom masti, ili kombinacija prehrane s visokim udjelom fruktoze i masti ili visok udio saharoze i masti. Brojna su istraživanja o prehrani postala kamen temeljac za ispitivanje MetSyn-a s obzirom na to da prehrana utječe na metabolizam i regulaciju cijelog tijela pomoću učinka na hormone, metabolizam glukoze i puteve metabolizma lipida. Najčešće korišteni sojevi glodavaca u istraživanju MetSyn-a uzrokovanog prehranom jesu Sprague-Dawley štakori, Wistar štakori, C57BL/6 J miševi i zlatni sirijski hrčak (33).

Tablica 1. Učinci različitih hranidbenih tretmana na razvoj MetSyn-a

Hranidbeni tretman	Trajanje tretmana	Sojevi životinja	Komponente metaboličkog sindroma			
			P	HG	HT	DL
60 % fruktoze u hrani(34)	8 tjedana	Sprague-Dawley štakori	-	-	+	+
10 % fruktoze u vodi(35)	12 tjedana	Wistar štakori	+	+	+	+
Hrana s visokim udjelom fruktoze(36)	8 tjedana	Wistar štakori	x	+	-	+
30 % saharoze u vodi(37)	21 tjedan	Wistar štakori	+	-	+	+
Hrana s visokim udjelom masti(38)	8 tjedana	C57BL/6 J miševi	+	+	-	+
Hrana s visokim udjelom ugljikohidrata i masti(39)	16 tjedana	Wistar štakori	+	+	+	+

Tablica prikazuje učinke različitih hranidbenih tretmana na svaku komponentu MetSyn-a. Simboli "+" i "x" označuju prisutnost odnosno odsutnost značajnog učinka MetSyn-a, dok "-" označuje komponentu koja se u istraživanju ne evaluira. P – pretilost, HG – hiperglikemija, HT – hipertenzija, DL – dislipidemija.

Obrok na bazi fruktoze u štakora ne uzrokuje istu razinu sitosti kao obrok na bazi glukoze. Kada su fruktoza i glukoza dodane u vodu za piće štakora, uočeni su različiti učinci (1). Većina se pojedene fruktoze metabolizira u jetri, a prvi je korak fosforilacija fruktoze u fruktoza-1-fosfat pomoću fruktokinaze (slika 1). Fruktoza-1-fosfat zatim se razlaže na gliceraldehid i dihidroksiaceton-fosfat, koji je međuprodukt glikolize. Gliceraldehid se potom fosforilira u još jedan produkt glikolize, gliceraldehid-3-fosfat, koji je prekursor za sintezu triacilglicerola. U jetri triacilglicerol ometa signalizaciju inzulina te pogoduje sintezi lipoproteina vrlo niske gustoće (VLDL) (40).



Slika 1. Sažet prikaz učinaka fruktoze na cjelokupni metabolizam

1.4. Masne kiseline

Abnormalnosti u metabolizmu lipida i lipoproteina u metaboličkom sindromu uglavnom se objašnjavaju povećanom masnoćom, inzulinskom rezistencijom i promjenama transkripcijskih čimbenika svojstvenih lipogenezi i lipolizi, i u jetri i u masnom tkivu. Nekoliko je ovih stanja posljedica količine i kvalitete prehrambenih masti.

Masne su kiseline važan izvor energije u organizmu, važni su gradivni blokovi složenih lipida te su prekursori za izgradnju fosfolipida staničnih membrana. Ne samo da pružaju raznolikost i kemijsku specifičnost složenim lipidima koji se nalaze u membranama nego su povezane i s opskrbom energijom i regulacijom širokog spektra staničnih procesa, uključujući ekspresiju gena.

Sadržavaju ugljikovodični lanac s karboksilnom skupinom na jednom kraju i metilnom skupinom na drugom kraju. Unatoč sličnosti među masnim kiselinama, suptilna razlika u njihovoj strukturi može uzrokovati relevantne razlike u metaboličkim odgovorima uključenima u metabolizam lipida u plazmi i lipoproteina (41). Biološka aktivnost ovih spojeva uvelike ovisi o

dužini ugljikovodičnog lanca masnih kiselina, njihovu stupnju nezasićenosti, ali i o poziciji dvostrukih veza u lancu (n-6 i n-3 masne kiseline) (42). Ovisno o prisutnosti dvostrukih veza masne kiseline možemo podijeliti u tri skupine:

- zasićene masne kiseline koje ne sadržavaju dvostruke veze (engl. *saturated fatty acid*, SFA)
- jednostruko nezasićene masne kiseline koje sadržavaju jednu dvostruku vezu (engl. *monounsaturated fatty acid*, MUFA)
- višestruko nezasićene masne kiseline koje sadržavaju dvije ili više dvostrukih veza (engl. *polyunsaturated fatty acid*, PUFA).

Zasićene masne kiseline potječu ponajprije iz životinjskih izvora, kao što su masno meso (svinjetina, govedina, teletina, janjetina, šunka) te jaja i mliječni proizvodi (punomasno mlijeko, vrhnje, maslac i sir). No i neki su biljni proizvodi (kao što su kokosovo ulje i ulje palminih koštica) bogati zasićenim mastima. Zasićene masne kiseline pridonose inzulinskoj rezistenciji ne samo reguliranjem aktivnosti enzima uključenih u metabolizam lipida i moduliranjem ekspresije upalnih gena nego i kontrolom transkripcijskih čimbenika koji moduliraju metabolizam glukoze i lipida (43).

Jednostruko nezasićene masne kiseline u velikim se količinama nalaze u suncokretovu, kukuruznom, sojinom, sezamovu i maslinovu ulju (44). Smatra se da MUFA može pridonijeti inzulinskoj rezistenciji svojim učincima na sastav masnih kiselina stanične membrane (45), modulaciju fluidnosti membrane, ionsku permeabilnost, vezanje/afinitet inzulinskih receptora i regulaciju prijenosnika glukoze.

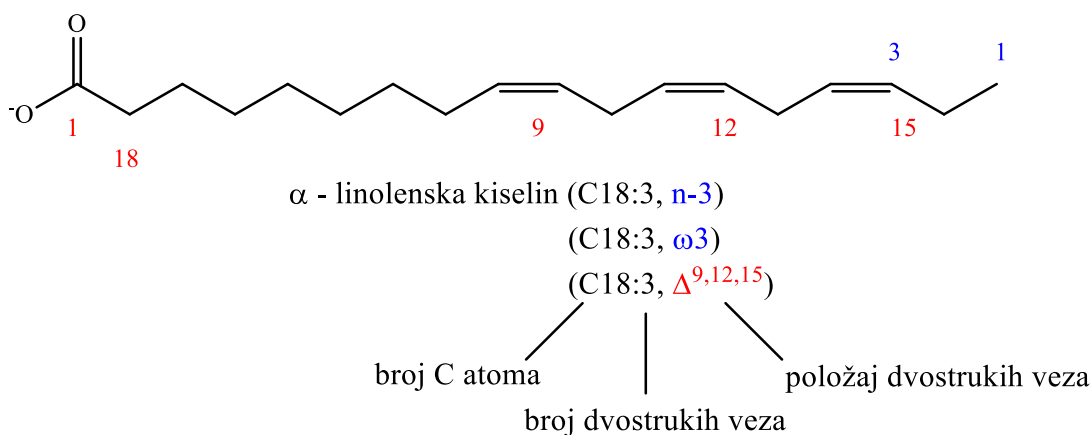
1.4.1. Višestruko nezasićene masne kiseline

Esencijalne masne kiseline jesu masne kiseline koje ljudi i životinje ne mogu sintetizirati i stoga ih moraju unositi hranom. One su potrebne za osiguravanje odgovarajućeg okruženja, za optimalno funkcioniranje receptora, enzima vezanih na membranu, transportera i ionskih kanala (46). Osim toga, ove masne kiseline također osiguravaju i moduliraju fluidnost membrane. Poznato je da se u ljudskoj prehrani pojavljuju dvije obitelji esencijalnih masnih kiselina, a to su n-6 i n-3 masne kiseline.

N-6 masne kiseline zajedno s n-3 masnim kiselinama pripadaju obitelji višestruko nezasićenih masnih kiselina. To su dugolančane masne kiseline koje obilježava prisutnost dviju ili

više dvostrukih veza u molekuli. U ugljikovodičnom lancu prva se dvostruka veza računa od metilnog kraja (ili omega ili n-kraja). Te su masne kiseline razvrstane na temelju različitih sustava nomenklature. Uobičajeni nazivi (npr. α -linolenska kiselina, najjednostavnija n-3) jesu narodni nazivi koji često ne slijede nikakvu klasifikaciju. Sustavni nazivi (npr. *all-cis*-9,12,15-oktadekatrienska kiselina) opisuju molekulu koja broji dvostruku vezu, počevši od karboksilne skupine; dvostruka je veza označena kao *cis* ili *trans*, ovisno o njezinoj i obliku molekule. Skraćena nomenklatura temelji se na broju ugljikovih atoma u molekuli te broju i položaju dvostrukih veza (slika 2.). Postoje tri različite skraćene nomenklature:

- (a) n-x gdje je "x" broj položaja dvostruke veze, računajući od terminala "n" metilnih skupina (CH₃) (npr. α -linolenska kiselina, C18:3 n-3)
- (b) omega-x (ω -x), gdje je "x" broj položaja dvostruke veze, računajući od terminala " ω " metilnih skupina (CH₃) (npr. α -linolenska kiselina, C18:3 ω -3)
- (c) delta-x (Δ^x), gdje se dvostruka veza računa od karboksilne kiseline (npr. α -linolenska kiselina, C18:3 $\Delta^{9,12,15}$) (47)



Slika 2. Prikaz skraćene nomenklature masnih kiselina

N-3 masne kiseline mogu se naći u zelenom lisnatom povrću, sjemenkama kao što su laneno sjeme i njegovo ulje, orašastim plodovima i mahunarkama. Plodovi mora dobar su izvor n-3 masnih kiselina. Ipak, potrebno je razlikovati različite vrste ribe jer se količina i vrsta n-3 masnih kiselina razlikuju. Bijela riba, poput bakalara, pohranjuje lipide u jetru, dok plava riba poput lososa, tune, skuše i sardine, pohranjuje lipide u cijelom tijelu (48).

N-6 masne kiseline pretežno se nalaze u mesu, jajima i biljnim uljima. Biološki je najvažnija n-6 masna kiselina arahidonska kiselina (ARA; 20:4 n-6), koja je glavna komponenta fosfolipida staničnih membrana. Glavna je funkcija ARA-e da služi kao prekursor za sintezu eikozanoida, koji imaju proupalno djelovanje. Arahidonska je kiselina također ligand za nuklearne receptore koji sudjeluju u supstancijskoj kontroli metaboličkih puteva. Kovalentna modifikacija proteina acilacijom masnih kiselina omogućuje njihovu ugradnju u membrane. Stupanj nezasićenosti masnih kiselina u membranskim fosfolipidima diktira biofizička svojstva membrane, što zauzvrat utječe na mnoge kritične funkcije povezane s membranom, uključujući aktivnosti proteina vezanih za membranu kao što su ionski kanali te endocitoza i egzocitoza (49). Smanjenje ARA-e iz membrana može promijeniti fizička i funkcionalna svojstva membrana. ARA također funkcionira kao regulator transkripcije, modulirajući transdukciju signala na površini stanice, promjenom fluidnosti membrane ili interakcijama između stanice i površine aciliranjem membranskih proteina (47).

Najvažnije su n-3 masne kiseline α -linolenske kiseline (ALA; 18:3n-3), eikozapentaenske kiseline (EPA) i dokozaheksaenske kiseline (DHA). ALA je prekursor za sintezu EPA-e i DHA-e. No ova je konverzija vrlo mala i s godinama se sve više smanjuje (50).

Općenito, n-6 i n-3 masne kiseline proizvode suprotne učinke u kontekstu oksidacijskog stresa i upale (51).

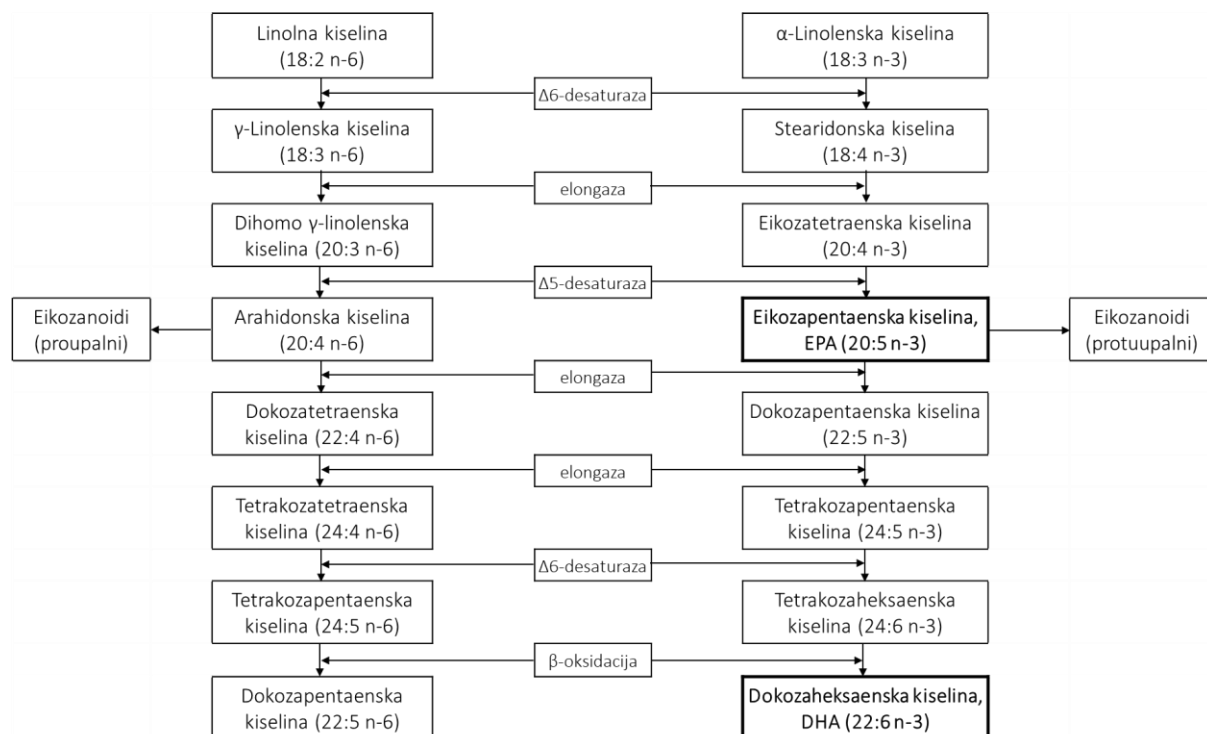
1.4.2. Sinteza i metabolizam višestruko nezasićenih masnih kiselina

N-6 i n-3 masne kiseline mogu se sintetizirati iz svojih prekursora, linolne kiseline (LA, 18:2 n-6) i α -linolenske kiseline (ALA, 18:3 n-3), različitim koracima koji uključuju serije enzima elongaza i desaturaza, smještenih u endoplazmatskom retikulu hepatocita.

Alfa-linolenska kiselina može se pretvoriti u stearidonsku kiselinu (18:4 n-3) pomoću delta-6 desaturaze, a zatim se stearidonska kiselina može produžiti do 20:4 n-3 (slika 3). Ova se masna kiselina može dodatno desaturirati Δ 5-desaturazom kako bi se dobila eikozapentaenska kiselina (EPA, 20:5 n-3). Postoji put za daljnju pretvorbu EPA-e u dokozaheksaensku kiselinu (DHA, 22:6 n-3), a on uključuje dodavanje dva ugljika kako bi se dobila dokozapentaenska kiselina (DPA, 22:5 n-3), dodavanje dva daljnja ugljika kako bi se dobilo 24:5 n-3, desaturaciju u 24:6 n-3 i translokaciju 24:6 n-3 iz endoplazmatskog retikula do peroksisoma, gdje se dva ugljika uklanjaju ograničenom β -oksidacijom kako bi se dobila DHA (48).

Biosinteza n-6 masnih kiselina zahtijeva isti niz koraka desaturacije i elongacije kataliziranih elongazama i $\Delta 5$ - i $\Delta 6$ -desaturazama. Linolna kiselina (LA, 18:2 n-6) pretvara se u γ -linolensku kiselinu (GLA, 18:3 n-6) uz pomoć enzima $\Delta 6$ -desaturaze, koja se zatim produljuje u dihomo- γ -linolensku kiselinu (DGLA, 20:3 n-6). Iz DGLA pomoću enzima $\Delta 5$ -desaturaze nastaje najvažnija n-6 masna kiselina, arahidonska kiselina (ARA, 20:4 n-6). $\Delta 6$ -desaturacija masnih kiselina korak je koji ograničava brzinu u pretvorbi LA-e u ARA-u (50).

U jetri mnogi nutritivni, hormonski i fiziološki čimbenici moduliraju biosintezu ARA-e. Dakle, dijetna ALA inhibira $\Delta 6$ -desaturaciju LA. Produkti desaturacije ARA, EPA i DHA inhibiraju $\Delta 6$ -desaturaciju LA-e i $\Delta 5$ -desaturaciju DGLA-e. S obzirom na hormone, inzulin i tiroksin nužni su za aktivnosti $\Delta 6$ -desaturacije i $\Delta 5$ -desaturacije, dok drugi hormoni (glukagon, epinefrin, glukokortikoidi) inhibiraju desaturaciju (47, 50). I DGLA i ARA su supstrati za ciklooksigenaze (COX), koja nizom reakcija slobodnih radikala metabolizira DGLA-u i ARA-u u različite bioaktivne tvari.



Slika 3. Metabolizam n-6 i n-3 masnih kiselina

Nekoliko čimbenika može utjecati na ravnotežu $\Delta 5$ -desaturaze i $\Delta 6$ -desaturaze, uključujući prehranu, koncentraciju inzulina, oksidacijski stres i bolest jetre. Visok unos n-6 masnih kiselina u prehrani mijenja aktivnost $\Delta 5$ -desaturaze i $\Delta 6$ -desaturaze, povećavajući proizvodnju ARA-e i smanjujući proizvodnju EPA-e. U fiziološkim i patološkim stanjima COX i LOX mogu pretvoriti ARA-u i EPA-u u eikozanoide.

Eikozanoidi su lipidne molekule sa signalnim funkcijama, koje imaju važnu ulogu u reguliranju upale, a uključuju prostaglandine, prostacikline, tromboksane i leukotriene. Prehrana bogata n-6 masnim kiselinama uzrokuje nakupljanje ARA-e u staničnoj membrani, utječući na transport stanice i pogodujući proizvodnji eikozanoida dobivenih iz ARA-e. Eikozanoidi s visokim udjelom ARA-e dovode do sinteze prostaglandina i tromboksana serije 2 (s dvije dvostruke veze u ugljikovu lancu) i leukotriena iz serije 4 (s četiri dvostruke veze u ugljikovu lancu) (47). Ovi su eikozanoidi ključni u regulaciji proizvodnje proupalnih citokina. Prekomjerna proizvodnja eikozanoida povezana je s povećanim oslobađanjem proupalnih citokina, aktivacijom neutrofila, povećanom proizvodnjom reaktivnih vrsta kisika i povećanom propusnošću krvnih žila. Ovaj učinak povećava rizik od agregacije trombocita, krvarenja i vazokonstrukcije. Eikozanoidi dobiveni iz EPA-e su prostaglandini i tromboksani serije 3 (s tri dvostruke veze u ugljikovu lancu) i leukotrieni serije 5 (s pet dvostrukih veza u ugljikovu lancu) te imaju protuupalan učinak u usporedbi s eikozanoidima dobivenim iz arahidonske kiseline (52, 53).

1.4.3. Funkcija višestruko nezasićenih masnih kiselina

Dobro je poznato da su inzulinska rezistencija, upala niskog stupnja, hipertenzija i disfunkcija endotelne stanice usko povezani s patofiziologijom MetSyn-a. Masne kiseline n-3 linije inhibiraju upalu, snižavaju krvni tlak, poboljšavaju funkciju vaskularnih endotelne stanice i povećavaju osjetljivost na inzulin (54). Studije metaanalize na ljudima potvrdile su da n-3 masne kiseline ne samo da smanjuju inzulinsku rezistenciju u pacijenata sa šećernom bolesti tipa II i MetSyn nego i smanjuju razine triacilglicerola. Pokazalo se i da su zasićene, mononezasićene i transmasti znatno povezane s rizikom od razvoja MetSyn-a. Nasuprot tome, pokazalo se da n-3 masne kiseline imaju zaštitnu ulogu u riziku od MetSyn-a. N-3 masne kiseline induciraju ekspresiju snažnog protuupalnog, antisteatotskog i inzulinskog adipokina, adiponektina (55).

Upala masnog tkiva barem je djelomično odgovorna za inzulinsku rezistenciju povezanu s pretilošću. Inzulinska rezistencija jetre, u kojoj su povećane i proizvodnja glukoze i lipogeneza,

karakteristična je za metaboličku disregulaciju koja se vidi kod pretilosti i šećerne bolesti tipa II. Ova se disregulacija pripisuje smanjenju proksimalnih inzulinskih signalnih kinaza, kao što su P13K i AKT, koje ometaju glukoneogenezu, kao i aktivaciji mTORC1 i p70S6K, koji kontroliraju lipogenezu. N-3 PUFA utječu na smanjenje hiperglikemije, hipertrigliceridemije i razine inzulina u plazmi (19). Ovo bi mogao biti potencijalni mehanizam kojim n-3 PUFA poboljšavaju rezistenciju na inzulin. Stoga n-3 PUFA mogu biti vrijedan nutritivni alat za prevenciju ili smanjenje mišićne i jetrene inzulinske rezistencije povezane s pretilošću (56).

Iako su protuupalna i hipotrigliceridemična svojstva n-3 PUFA dobro poznata, njihovi učinci na pretilost i učinkovitost protiv metaboličkog sindroma, posebno u ljudi, još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Na životinjskim modelima dokazi dosljedno upućuju na ulogu n-3 PUFA u smanjenju masne mase, posebno u retroperitonealnom i epididimskom području. Predloženi mehanizmi pomoću kojih n-3 PUFA mogu raditi na poboljšanju tjelesnog sastava i suzbijanju metaboličkih promjena povezanih s pretilošću uključuju moduliranje metabolizma lipida, reguliranje adipokina, kao što su adiponektin i leptin, ublažavanje upale masnog tkiva, promicanje adipogeneze i mijenjanje epigenetskih mehanizama (56).

1.5. Upala

Kronična supklinička upala dio je metaboličkog sindroma. Iako upalni markeri trenutačno, prema definiciji NCEP/ATP III ili SZO-a, nisu uključeni u dijagnostičke kriterije metaboličkog sindroma, smatra se da proupalno stanje također pridonosi razvoju metaboličkog sindroma.

Kroničnu upalu obilježava dugotrajna kronična aktivacija makrofaga u visceralnim organima te kontinuirana aktivacija NF- κ B i stvaranje medijatora upale. Trajna ekspresija i oslobađanje upalnih medijatora uzrokuju neravnotežu homeostaze upalnog ciklusa aktiviranjem dodatnih makrofaga u visceralnim tkivima, promičući daljnje oslobađanje upalnih citokina, kao što je TNF- α , IL-6 i interleukin-1 β (IL-1 β) (18).

Veza između upale i metaboličkog sindroma još uvijek nije u potpunosti shvaćena. Kronični višak energije u prehrani može uzrokovati poteškoće u metabolizmu glukoze, uzrokujući upalu i na kraju razvijajući MetSyn (14).

Upalni markeri koji su povezani s metaboličkim sindromom uključuju, među ostalima, visokoosjetljivi CRP, TNF- α , fibrinogen i IL-6. Dobro je poznato da je pretilost povezana sa

stanjem kronične upale niskog stupnja i da gubitak tjelesne mase smanjuje razinu CRP-a u cirkulaciji. Sada je poznato da adipociti luče nekoliko drugih signalnih molekula, adipocitokine, koji mogu utjecati na djelovanje inzulina, uključujući leptin, adiponektin, TNF- α , IL-6, CRP i rezistin. Pretpostavlja se da bi ovi adipokini mogli biti djelomično odgovorni za metaboličke abnormalnosti koje se povezuju s inzulinskom rezistencijom. U usporedbi s masnim tkivom mršavih osoba, masno tkivo pretilih luči povećane količine ovih molekula, kao i prokoagulantnih proteina poput inhibitora aktivatora plazminogena tipa-1 (PAI-1), tkivnog faktora i faktora VII (19, 57).

Pitanje je, ako je pretilost proupalno stanje, a upalni mehanizmi i posrednici ometaju inzulinsku signalizaciju, koji je temeljni izvor upale? Istraživanja sugeriraju da unos makronutrijenata može uzrokovati oksidacijski stres i inicirati upalni proces. Jedan je od produkata oksidacijskog stresa superoksid koji je aktivator najmanje dvaju proupalnih transkripcijskih faktora. Jedan je od njih NF- κ B, koji regulira najmanje 125 gena, od kojih je većina proupalna. Isti se fenomen opaža kod jednakih kalorija masti. Konzumiranje glukoze također rezultira povećanjem upalnih transkripcijskih čimbenika ili njihova vezanja te smanjenjem inhibitora transkripcijskih faktora.

1.6. Oksidacijski stres

1.6.1. Oksidacijski stres i slobodni radikali

Prehrana s visokim udjelom fruktoze u visceralnim organima izaziva oksidacijski stres, koji je obilježen znatnim povećanjem superoksidnih aniona, hidroksilnih, alkoksilnih i peroksilnih radikala, singletnog kisika i vodikova peroksida. Glavni su izvori oksidacijskog stresa mitohondrijski respiratorni lanac, ksantin/ksantin oksidaza, mijeloperoksidaza u citoplazmi, oksidacija arahidonske kiseline (ARA) ciklooksigenazom (COX), lipoksigenazom (LOX) i epoksigenazom (EPOX) u citoplazmi i NADPH oksidaza u plazma-membranama (58).

Slobodni radikal može se definirati kao bilo koja molekularna vrsta (atom, ion ili molekula) koja sadržava nespareni elektron u atomskoj orbiti i sposobna je za neovisno postojanje. Prisutnost nesparenog elektrona povećava kemijsku reaktivnost atoma ili molekule. Slobodni radikali ponašaju se kao oksidansi ili reducensi, odnosno oni mogu donirati elektron ili ga prihvatiti iz drugih atoma ili molekula (59).

Najvažniji slobodni radikali uključuju hidroksilni ($\cdot\text{OH}$), superoksidni ($\text{O}_2\cdot^-$), peroksilni ($\text{ROO}\cdot$), hidroperoksilni ($\text{HO}_2\cdot$), dušik-oksadni ($\text{NO}\cdot$) i peroksinitritni ($\text{ONOO}\cdot^-$) radikal (60).

Poremećaj ravnoteže između proizvodnje velike količine reaktivnih vrsta kisika (engl. *Reactive oxygen species*, ROS), odnosno slobodnih radikala i antioksidacijske obrane, rezultira oksidacijskim stresom, što može dovesti do oštećenja bioloških makromolekula i uzrokovati metaboličke poremećaje (58, 59).

Reaktivne kisikove vrste mogu nastati iz endogenih ili egzogenih izvora. Endogeni izvori ROS-a uključuju različite stanične organe, poput mitohondrija, peroksisoma i endoplazmatskog retikula, gdje je potrošnja kisika velika, dok egzogeni izvori uključuju alkohol, lijekove, ultraljubičasto zračenje, visoke temperature i dr (60).

U fiziološkim uvjetima antioksidacijski obrambeni sustavi (superoksid-dismutaza, katalaza, transferin i glutation-peroksid, glutation i vitamin C) unutar tijela mogu lako neutralizirati količinu ROS-a proizvedenih putem tri stanična antioksidacijska obrambena sustava. No poremećaj stroge kontrole visokim razinama ROS-a rezultira teškim oksidacijskim stresom. Niske razine ROS-a potrebne su u temeljnim staničnim funkcijama. Oni imaju ulogu u različitim signalnim kaskadama, poput odgovora na stimulaciju faktora rasta i kontrolu upalnih odgovora, te kontroliraju optimalno funkcioniranje imunskog sustava, koji je uključen u obranu od prodornih mikroorganizama. Sudjeluju u regulaciji mnogih staničnih procesa, uključujući diferencijaciju, proliferaciju, rast, apoptozu, regulaciju citoskeleta, migraciju i kontrakciju (61). U visokim koncentracijama ROS uzrokuje oksidaciju lipida, proteina i nukleinskih kiselina te pridonose širokom rasponu patoloških stanja, poput hipertenzije, šećerne bolesti tip II, inzulinske rezistencije, metaboličkog sindroma i drugih (62).

Peroksidacija lipida najopsežnije je proučavana posljedica napada slobodnih radikala i od potencijalne je važnosti u dijabetičkom vaskularnom oštećenju.

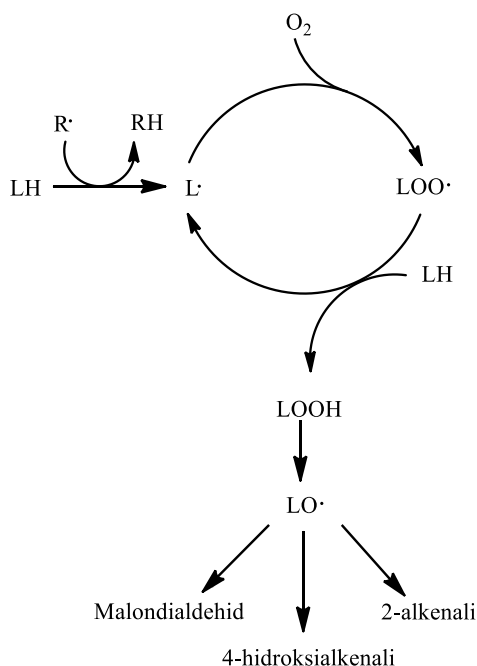
1.6.2. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija može se općenito opisati kao proces u kojem oksidansi poput slobodnih radikala ili neradikalnih vrsta napadaju lipide koji sadržavaju ugljik-ugljik dvostruke veze, uzrokujući oštećenje membrane. Biološke stanične membrane prepune su višestruko nezasićenih masnih kiselina koje su posebno osjetljive na peroksidaciju, poput ARA-e i DHA-e, bilo u izoliranom obliku bilo u obliku inkorporiranom u triacilgliceride i fosfolipide (63).

Peroksidacija lipida jedno je od najopsežnijih proučavanih posljedica djelovanja ROS-a na strukturu i funkciju membrane. U fiziološkim uvjetima, odnosno niskim stupnjevima peroksidacije lipida (suptoksični uvjeti), stanice stimuliraju svoje održavanje i preživljavanje putem konstitutivnih antioksidacijskih obrambenih sustava ili aktivacije signalnih puteva koji povećavaju regulaciju proteina antioksidansa, što rezultira adaptivnim odgovorom na stres. Nasuprot tome, pod srednjim ili visokim stupnjevima peroksidacije lipida (toksični uvjeti) opseg oksidacijskog oštećenja nadmašuje sposobnost popravka, a stanice induciraju apoptozu ili nekrozu. Oba procesa na kraju dovode do oštećenja molekularnih stanica, što može olakšati razvoj različitih patoloških stanja i ubrzano starenje (63, 64).

1.6.3. Mehanizam lipidne peroksidacije

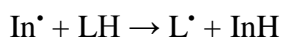
U fiziološkim uvjetima niska razina peroksidacije lipida prirodan je metabolički proces. Višestruko nezasićene masne kiseline osobito su sklone napadu slobodnih radikala jer prisutnost dvostruke veze slabi vezu ugljik-vodik na susjednom atomu ugljika. Slobodni radikali koji mogu oksidirati PUFA-e su $\cdot\text{OH}$, $\text{HO}_2\cdot$, $\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, dok $\text{O}_2^{\cdot-}$ nije dovoljno reaktivan da apstrahira atom vodika iz molekule lipida (64).



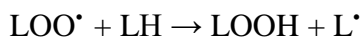
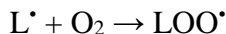
Slika 4. Shematski prikaz peroksidacije lipida

Peroksidacija lipida bioloških membrana može se podijeliti u tri stupnja: inicijacija, propagacija (umnažanje) i terminacija (završetak) (slika 4) (65).

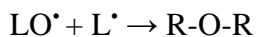
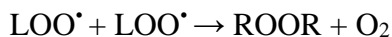
Inicijacija



Propagacija



Terminacija



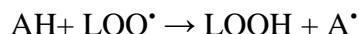
Inicijalna faza peroksidacije lipida započinje najčešće napadom hidroksilnog radikala sposobnog da izdvoji atom vodika iz metilenske skupine (-CH₂-), ostavljajući za sobom nespareni elektron na ugljiku (-CH•). Nastali radikal masnih kiselina vrlo je reaktivan i vrlo lako reagira s molekularnim kisikom stvarajući peroksilni radikal (LOO•). Peroksilni radikal također je vrlo nestabilna vrsta, koja brzo reagira s drugom masnom kiselinom, pri čemu dolazi do oblikovanja lipidnih hidroperoksida (LOOH).

Ovaj se ciklus nastavlja jer novi radikal na isti način reagira s novom molekulom, što rezultira propagacijom. Razgradnjom lipidnog hidroperoksida (LOOH) dolazi do nakupljanja radikala i štetnih aldehida.

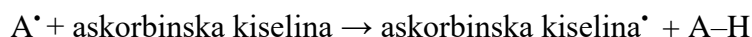
Reakcija terminacije započinje kad se sav supstrat iscrpi te dva radikala kombiniraju nesparene elektrone i tvore neradikalni produkt (66).

Lančanu reakciju mogu prekinuti i antioksidansi (A-H), koji daju lako dostupan vodik za apstrakciju peroksilnim radikalima ili se kombiniraju s lipidnim radikalima kako bi se zaustavilo daljnje širenje. Radikal nastao iz antioksidansa (A•) može se bezopasno dimerizirati u A₂ ili se pretvoriti natrag u A-H reakciju s drugom molekulom; također može reagirati s drugim ROO• i

postati neradikal. Najvažniji antioksidans koji cijepa lance u ljudskim lipidima jest α -tokoferol (64).



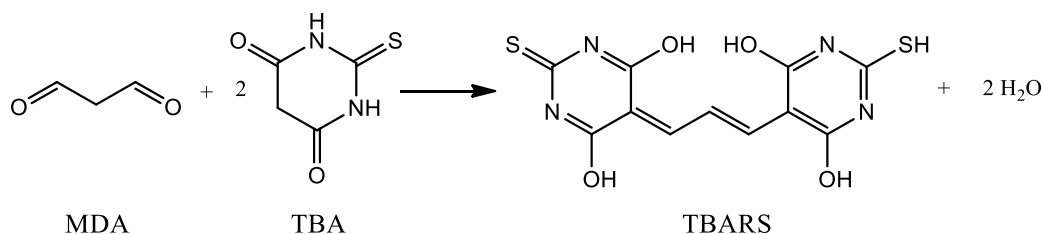
Rezultirajući tokoferoksilni radikal relativno je stabilan i u normalnim okolnostima nedovoljno reaktivan da započne peroksidaciju lipida. *In vitro* je dokazano da se radikal α -tokoferola može pretvoriti natrag u α -tokoferol redukcijom s askorbinskom kiselinom na površini bioloških membrana.



1.6.4. Produkti lipidne peroksidacije

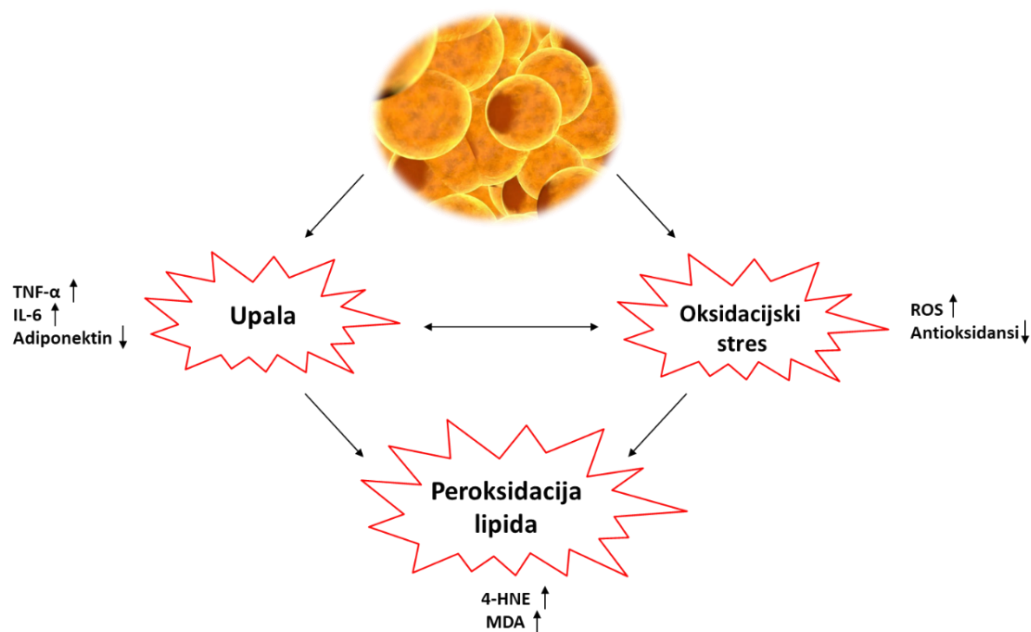
Peroksidacija lipida ili reakcija kisika s nezasićenim masnim kiselinama proizvodi velik broj oksidacijskih produkata koje možemo podijeliti na primarne i sekundarne produkte. Glavni su primarni produkti peroksidacije lipida lipidni hidroperoksidi (LOOH). Među mnogim različitim aldehydima koji mogu nastati kao sekundarni produkti tijekom peroksidacije lipida jesu malondialdehid (MDA), propanal, heksanal i 4-hidroksinonenal (4-HNE) (67). Čini se da je MDA najmutageniji proizvod peroksidacije lipida, dok je 4-HNE najtoksičniji.

MDA se naširoko koristi dugi niz godina kao prikladan biomarker za peroksidaciju lipida n-3 i n-6 masnih kiselina zbog svoje lagane reakcije s tiobarbiturnom kiselinom (TBA) (shema 1). TBA test temelji se na reaktivnosti TBA prema MDA kako bi se dobio intenzivno obojen kromogen fluorescentno crveni produkt. Malondialdehid se zbog svoje visoke reaktivnosti i toksičnosti smatra jednim od najpouzdanijih markera za određivanje oksidacijskog stresa (63).



Shema 1. Shematski prikaz reakcije malondialdehida s tiobarbiturnom kiselinom

Budući da je MDA jedan od najpopularnijih i najpouzdanijih markera koji određuju oksidacijski stres u kliničkim situacijama, te zbog visoke reaktivnosti i toksičnosti, 4-hidroksialkenali su najvažniji proizvodi jer se proizvode u relativno velikim količinama i vrlo su reaktivni aldehidi koji djeluju kao drugi glasnici slobodnih radikala. Visoka toksičnost 4-HNE-a može se objasniti brzim reakcijama s tiolima i aminoskupinama. Reaktivni aldehidi, osobito 4-HNE, djeluju i kao signalne molekule i kao citotoksični proizvodi peroksidacije lipida, uzrokujući dugotrajne biološke posljedice, osobito kovalentnom modifikacijom makromolekula. 4-hidroksinonenal se smatra drugim otrovnim glasnikom slobodnih radikala, a također i jednim od fiziološki najaktivnijih lipidnih peroksida, jednim od glavnih generatora oksidacijskog stresa i glavnim produktom peroksidacije lipida. Stoga ne čudi što se 4-HNE danas smatra glavnim bioaktivnim markerom peroksidacije lipida i signalnom molekulom uključenom u regulaciju nekoliko transkripcijskih čimbenika osjetljivih na stres, kao što je faktor 2 povezan s eritroidom (Nrf2), aktivirajući protein-1 (AP-1), NF- κ B i receptor aktiviran proliferatorom peroksisoma (PPAR), u staničnoj proliferaciji i/ili diferencijaciji, preživljavanju stanica, autofagiji, starenju, apoptozi i nekrozi (63, 67).



Slika 5. Prikaz peroksidacije lipida uzrokovana nakupljanjem adipocita

Kronična upala niskog stupnja bijelog masnog tkiva obilježje je pretilosti i glavni je doprinos oksidacijskom stresu i peroksidaciji lipida (slika 5). 4-HNE smanjuje ekspresiju protuupalnog hormona adiponektina koji je osjetljiv na inzulin, povezujući tako nusproizvode peroksidacije lipida i kroničnu upalu (68).

2.OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovog istraživanja jest ispitati utjecaj prehrane s dodatkom eikozapentaenske i dokozaheksaenske masne kiseline i spola u eksperimentalnom životinjskom modelu na uspješnost prevencije metaboličkog sindroma.

Specifični ciljevi:

- uspostaviti eksperimentalni hranidbeni model metaboličkog sindroma i ispitati nastale promjene u lipogenezi, upali i oksidacijskom statusu
- ispitati ima li hranidbeni dodatak eikozapentaenske i dokozaheksaenske masne kiseline utjecaj na promjene u molekulskim mehanizmima koji karakteriziraju razvoj metaboličkog sindroma
- utvrditi utječe li spol na molekulske mehanizme kojima eikozapentaenska i dokozaheksaenska masna kiselina mogu modulirati patogenezu metaboličkog sindroma.

Hipoteza

Prehrana s dodatkom eikozapentaenske i dokozaheksaenske masne kiseline može znatno regulirati ekspresiju molekulskih biljega rezistencije na inzulin, kronične upale i oksidacijskog stresa, te time može biti učinkovit način prevencije metaboličkog sindroma.

Mehanizam djelovanja eikozapentaenska i dokozaheksaenska masna kiselina ovisi o spolu, što ima znatne implikacije za uspješnost prevencije.

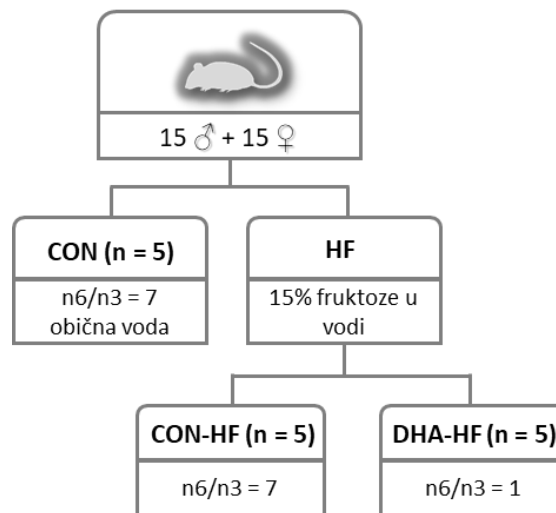
3.MATERIJAL I METODE

3.1. Pokusne životinje

Istraživanje je provedeno na 30 Wistar Han štakora (15 mužjaka i 15 ženki), na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Eksperimentalne protokole odobrila je Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane, Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske (ovlaštenje EP 107-2/2017) te Povjerenstvo za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Životinje su bile smještene u polikarbonatnim kavezima sa svjetlosnim režimom od 12 sati svjetla i 12 sati mraka, pri temperaturi od 20 stupnjeva. Životinje su bile podijeljene prema hranidbenom tretmanu i spolu. Pristup hrani i vodi bio je neograničen (*ad libitum*) za sve štakore tijekom eksperimenta. Štakori su vagani jedanput tjedno elektroničkom vagom (PLS 1200-3A, Kern & Sohn, Balingen, Njemačka) te im je mjerena razina glukoze natašte (12 sati post) u uzorku krvi iz repne vene.

3.2. Hranidbeni tretman

Nakon dva tjedna aklimatizacije životinje su nasumično podijeljene u skupine prema hranidbenom tretmanu, dodatku fruktoze i spolu, na kontrolnu skupinu (CON) i skupinu tretiranu fruktozom u vodi (15 w/v) (HF).



Slika 6. Podjela životinja prema hranidbenom tretmanu

Skupina tretirana fruktozom zatim je dodatno podijeljena na dvije skupine u odnosu na hranidbeni tretman s različitim omjerima n-6/n-3 masnih kiselina (slika 6). Korišteni kontrolni

omjer n-6/n-3 iznosio je 7, a niski n-6/n-3 iznosio je 1. Time su dobivene ukupno po 3 skupine s 5 životinja za oba spola: 1. kontrolna skupinu (n-6/n-3 = 7, bez tretmana fruktozom, CON), 2. skupina tretirana fruktozom (n-6/n-3 = 7, tretman fruktozom u vodi, 15 % w/v, CON-HF), 3. skupina tretirana fruktozom (n-6/n-3 ~ 1, 9 % EPA i 11 % DHA u hrani, tretman fruktozom u vodi, 15 % w/v, DHA-HF). Nutritivni sastav hrane prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Nutritivni sastav pokusne hrane (suha tvar)

Hranjiva tvar	Pokusna hrana (% ukoliko nije drugačije označeno)
Sirova bjelančevina	20,2
Sirova mast	4,9
Sirova vlaknina	4,9
Sirovi pepeo	6,7
Kalcij	1,0
Fosfor	0,8
Lizin	1,2
Metionin	0,4
Metabolička energija (MJ/kg)	12,5

Različiti omjeri n-6/n-3 u hrani postignuti su mješavinama lanenog, suncokretova i ribljeg ulja. Masnokiselinski sastav hrane prikazan je u tablici 3.

Tablica 3. Masnokiselinski sastav (% od ukupnih masnih kiselina) pokusne hrane

Masne kiseline	CON i CON-HF	DHA-HF
Palmitinska (C16:0)	7,15	15,20
Stearinska (C18:0)	2,76	4,30
Oleinska (C18:1 n9)	28,97	31,21
Linolna (C18:2 n6)	52,25	26,78
α -Linolenska (C18:3 n3)	7,35	0,87
Eikozapentaenska (C20:5 n3)	nd	9,15
Dokozaheksaenska (C22:6 n3)	nd	10,98
n-6/n-3 omjer	7,11	1,28

3.3. Uzimanje uzoraka

Nakon 20 tjedana svim štakorima uskraćena je hrana 12 sati prije žrtvovanja, uz slobodan pristup vodi. Štakori su prije žrtvovanja izvagani te im je izmjerena razina glukoze u krvi. Životinje su usmrćene srčanom punkcijom u dubokoj anesteziji, koja je postignuta koktelom anestetika ketamina 80 mg/kg (Narketan, 100 mg/mL, Vetoquinol, Bern, Switzerland) i ksilazina 12 mg/kg (Xylapan, 20 mg/mL, Vetoquinol, Bern, Switzerland).

U epruvete bez antikoagulansa prikupljena je krv za biokemijske pretrage kako bi se dobio uzorak seruma. Krv je centrifugirana 10 minuta na 3000 okretaja u minuti (engl. *revolution per minute*, rpm) (Boeco U-320R, Njemačka), serum je odvojen od krvnih stanica i pohranjen na -80 °C do analiza. Nakon žrtvovanja uzeti su uzorci tkiva jetre i bijelog masnog tkiva, izvagani i zamrznuti na -80 °C do provedbe analiza.

3.4. Potvrda modela metaboličkog sindroma

3.4.1. Određivanje koncentracije inzulina u serumu

Koncentracija inzulina u serumu određena je imunokemijskom metodom ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Primijenjen je komercijalno dostupan ELISA set za inzulinske antitijela za štakora (Rat insulin kit ELISA, Mercodia, Upsalla, Švedska). U mikrotitarsku pločicu obloženu monoklonskim antitijelima specifičnim za inzulinske dodano je 10 μL standarda/uzorka. Koncentracije standarda iznosile su 0,148 $\mu\text{g/L}$, 0,408 $\mu\text{g/L}$, 1,06 $\mu\text{g/L}$, 3,09 $\mu\text{g/L}$, 5,52 $\mu\text{g/L}$. Zatim je u jažice dodano 100 μL mišjeg monoklonskog antitijela konjugiranog s HRP-om (engl. *horseradish peroxidase*) specifičnim za inzulinske. Slijedila je inkubacija 120 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije mikrotitarska je ploča ispirana šest puta sa 700 μL otopine za ispiranje. Nakon ispiranja u jažice je dodano 200 μL kromogena i mikrotitarska je ploča inkubirana 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. U zadnjem koraku dodano je 50 μL otopine za zaustavljanje reakcije. Apsorbancija nastalog produkta očitana je na 450 nm na spektrofotometru (Bio-Tek uQuant Universal Microplate Spectrophotometer, SAD). Koncentracija inzulina u uzorcima izračunata je pomoću baždarnog pravca standarda poznate koncentracije i izražena je u mU/L.

3.4.2. Homeostatski model procjene inzulinske rezistencije (HOMA-IR)

HOMA-IR modelom procijenjeno je stanje inzulinske rezistencije iz koncentracije glukoze i inzulina u serumu natašte, prema sljedećoj jednačini (25):

$$\text{HOMA-IR} = \text{koncentracija inzulina (mU/L)} \times \text{koncentracija glukoze (mmol/L)} / 22,5$$

3.4.3. Kvantitativni indeks provjere osjetljivosti na inzulin (QUICKI)

QUICKI indeksom dodatno je provjerena osjetljivost na inzulin prema jednadžbi s logaritamskom transformacijom koncentracija glukoze i inzulina (26):

$$\text{QUICKI} = 1/\log (\text{koncentracija inzulina } (\mu\text{U/mL}) \times \text{koncentracija glukoze } (\text{mg/dL}))$$

3.5. Mjerenje koncentracije glukoze u punoj krvi

Koncentracija glukoze mjerena je jedanput tjedno, nakon 12 sati posta, u uzorku pune krvi iz repne vene, pomoću glukometra Accu-Chek Go (69).

3.6. Određivanje koncentracije triacilglicerola i ukupnog kolesterola u serumu

Koncentracija triacilglicerola i ukupnog kolesterola u serumu štakora određena je na automatskom analizatoru SABA 18 (AMS, Rim, Italija) korištenjem originalnih reagensa tvrtke Roche Diagnostics (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka).

3.6.1. Određivanje koncentracije triacilglicerola

Koncentracija triacilglicerola u serumu određena je koloroenzimskom (PAP) metodom. Metoda se temelji na hidrolizi triacilglicerola na glicerol i masne kiseline uz prisutnost određenih enzima. Dobiveni glicerol uz dodatak kromogena prevodi se u obojeni produkt koji se može mjeriti spektrofotometrijski pri 510 nm. Izmjerena apsorbancija proporcionalna je koncentraciji prisutnog glicerola, odnosno triacilglicerola, te je izražena u mmol/L.

3.6.2. Određivanje koncentracije ukupnog kolesterola

Koncentracija ukupnog kolesterola u serumu određena je kolorimetrijskom enzimskom metodom (PAP). Metoda se temelji na hidrolizi esterificiranog kolesterola uz prisutnost enzima,

pri čemu nastaje produkt koji se može mjeriti spektrofotometrijski pri 510 nm. Koncentracija ukupnog kolesterola izražena je u mmol/L.

3.7. Određivanje koncentracije malondialdehida u serumu i tkivu jetre

Metoda se temelji na reakciji MDA s tiobarbiturnom kiselinom koja daje crvenu boju i tvori kompleks reaktivnih supstancija tiobarbiturne kiseline čija se koncentracija određuje (70). Koncentracija MDA određena je u nerazrijeđenom serumu i 10 %-tnom homogenatu jetre, koji je pripremljen od 100 mg tkiva jetre homogeniziranog u 1 mL fosfatnog pufera.

Postupak određivanja:

1. 150 μL seruma/homogenata jetre/standarda pomiješano je s 50 μL Mili-Q H_2O i 50 μL 3N NaOH.
2. Smjesa je vorteksirana 1 min zatim inkubirana 30 min na 60 $^{\circ}\text{C}$.
3. U ohlađenu smjesu dodano je 250 μL 6 % H_3PO_4 i 250 μL 0,8 % TBA.
4. Smjesa je ponovno vorteksirana 1 min zatim inkubirana 45 min na 95 $^{\circ}\text{C}$.
5. U ohlađenu smjesu dodano je 100 μL 10% SDS i 600 μL n-butanola.
6. Smjesa je vorteksirana 1 min i centrifugirana 10 min na 3000 rpm.

Nakon odvajanja slojeva gornji sloj n-heksana izdvojen je u novu mikroeprijetu, zatim je 200 μL standarda/uzorka nanoseno na mikrotitarsku ploču s 96 mjesta te je apsorbancija očitana na spektrofotometru pri 532 nm (Bio-Tek uQuant Universal Microplate Spectrophotometer, SAD). Koncentracija MDA u uzorcima izračunata je pomoću baždarnog pravca standarda poznate koncentracije i izražena je u μM (71).

3.8. Određivanje triacilglicerola u tkivu jetre

Koncentracija triacilglicerola u tkivu jetre određena je spektrofotometrijski pomoću komercijalno dostupnog reagensa (Free glycerol reagent, Sigma-Aldrich, SAD). U 100 mg tkiva jetre dodano je 350 μL 30 % KOH u etanolu te je inkubirano tijekom noći na 55 $^{\circ}\text{C}$ u termobloku (IKA, Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Njemačka). Zatim je dodana smjesa otapala etilnog

alkohola i vode (EtOH/H₂O) u omjeru 1:1 do ukupnog volumena od jednog mililitra te centrifugirana pet minuta na 10000 rpm. Supernatant je izdvojen u novu mikoepruvetu, dodana je smjesa otapala EtOH/H₂O u omjeru 1:1 do ukupnog volumena od 1,2 mL i vorteksiran jednu minutu. Ukupno 200 µL supernatanta izdvojeno je u novu mikoepruvetu uz dodatak 215 µL magnezijeva klorida (MgCl₂). Dobivena smjesa vorteksirana je jednu minutu i ostavljena na ledu 10 minuta. Nakon toga smjesa se ponovno centrifugira pet minuta na 10 000 rpm te se čisti supernatant izdvoji u novu mikoepruvetu. U mikrotitarske ploče pipetira se 20 µL vode + 10 µL standarda koncentracija 0,16, 0,31, 0,63, 1,25, 2,5 mg/mL (Glycerol Standard Solution, Sigma-Aldrich, SAD) te 30 µL uzorka i doda se 200 µL reagensa. Smjesa je inkubirana 15 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbancija nastalog produkta očitana je na 540 nm. Koncentracija triacilglicerola u uzorcima izračunata je pomoću baždarnog pravca standarada poznatih koncentracija.

3.9. Određivanje koncentracije masnih kiselina u tkivima

3.9.1. Ekstrakcija lipida

Ukupni lipidi iz tkiva jetre i bijelog masnog tkiva ekstrahirani su prema metodi Folcha i suradnika (72) na sljedeći način:

1. U 1 g tkiva dodano je 6,7 mL MeOH s 3 mg/mL BHT i 13,3 mL kloroforma.
2. Smjesa je homogenizirana pomoću ručnog homogenizatora (Polytron, Kinematica GMBH, Luzern, Schweiz) 3 x 10 s i ostavljena na miješalici 20 min na 230 rpm na sobnoj temperaturi.
3. Zatim je dodano 4 mL 0,9 % NaCl.
4. Smjesa je vorteksirana 1 min te centrifugirana 5 min na 2000 rpm.
5. Nakon odvajanja slojeva prikupljen je donji sloj kloroforma.
6. Otapalo je uklonjeno u struji dušika.

3.9.2. Ekstrakcija fosfolipida

Ukupni lipidi dalje su odvojeni ekstrakcijom na čvrstoj fazi na neutralne lipide (triacilglicerole) i polarne lipide (fosfolipide). Za ekstrakciju je korištena silica na koju je vezan aminopropil (Supelclean, Supelco, Bellefonte, PA, SAD), uz upotrebu smjese otapala kloroforma/izopropanola (2:1, v/v) za neutralne lipide i metanola za polarne lipide.

3.9.3. Metilacija masnih kiselina

Metilni esteri masnih kiselina iz jetrenih triacilglicerola i fosfolipida te iz triacilglicerola i fosfolipida iz bijelog masnog tkiva dalje su pripremljeni prema sljedećem protokolu:

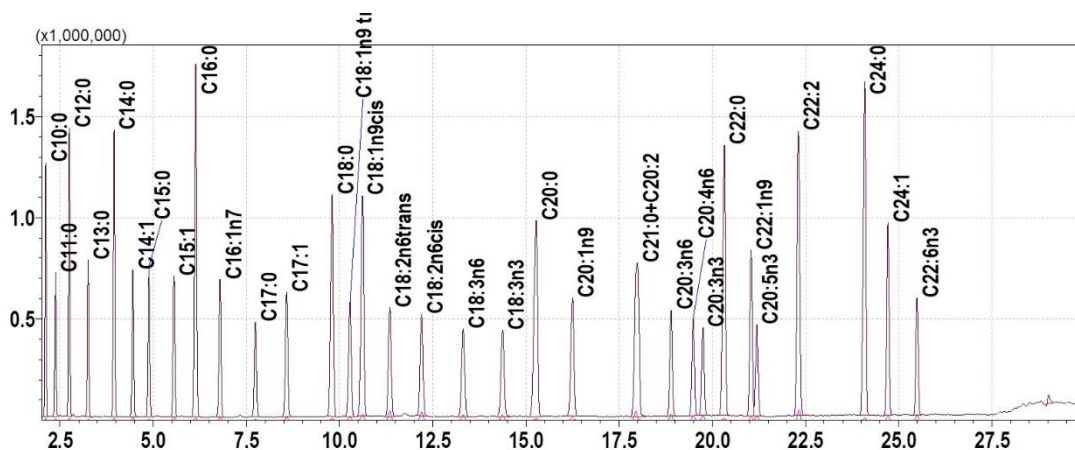
1. 10 mg izoliranih lipida otopljeno je u 2 mL n-heksana.
2. Dodano je 0,2 mL 2 M KOH u metanolu.
3. Smjesa je vorteksirana 1 min te je dodan 1 g NaH₂SO₄ monohidrat.
4. Smjesa je zatim centrifugirana 5 min na 2000 rpm.
5. Nakon odvajanja slojeva metilni esteri masnih kiselina ekstrahirani su u gornjem sloju n-heksana i prikupljeni u vijale za GC-MS analizu.

3.9.4. Analiza sastava masnih kiselina

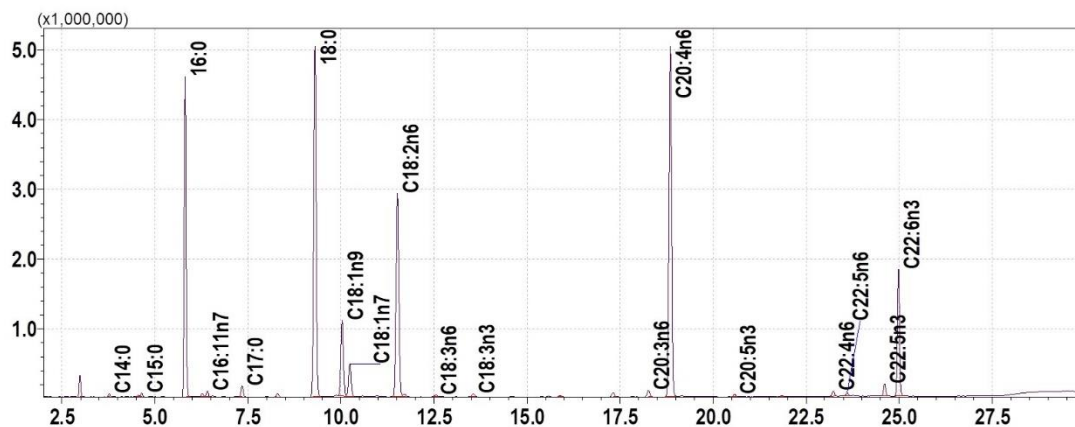
Nakon ekstrakcije metiliranih masnih kiselina n-heksanom pripremljeni uzorci analizirani su metodom plinske kromatografije s masenim detektorom GC-MS (QP2010 Ultra, Shimadzu, Kyoto, Japan). Za analizu je korištena BPX70 kapilarna kolona (dužina kolone 30 m, unutarnji promjer kolone 0,25 mm i debljina filma stacionarne faze 0,25 μm, SGE, Austin, TX, SAD) s helijem kao plinom nosiocem. Temperatura injektora iznosila je 250 °C, omjer razdvajanja (*split*) 1:80, volumen injektiranja 1 μL, a brzina protoka helija iznosila je 35 cm/s. Početna temperatura kolone postavljena je na 150 °C. koja je zadržana 1 minutu, zatim se postupno povećavala brzinom od 1 °C/min do temperature od 180 °C, uz zadržavanje temperature 2 minute, nakon čega je uslijedilo postupno povećanje do 220 °C brzinom od 5 °C/min.

Molekule su ionizirane pod udarom elektrona od 70 eV, a raspon skeniranja na masenom selektivnom detektoru bio je 45 – 500 (m/z). Upotrijebljeni su interni standardi: metil-trikozanoat (C23:0) i 1,2-dinonadekanoil-sn-glicero-3-fosfokolin (19:0 PC).

Kvantifikacija masnih kiselina provedena je normalizacijom površina nakon identifikacije odijeljenih masnih kiselina uz pomoć eksternog standarda (37 component FAME mix i PUFA No3, Sigma-Aldrich, SAD) (slika 7). Sastav masnih kiselina ispitivanih lipida izražen je kao % od ukupnih masnih kiselina (slika 8).



Slika 7. Kromatogram standarda 37 Component FAME mix (Supelco, Bellfonte, PA, USA) upotrijebljen za identifikaciju masnih kiselina



Slika 8. Reprezentativni kromatogram masnih kiselina sadržanih u tkivu jetre

3.10. Određivanje ekspresije gena u tkivima

3.10.1. Izdvajanje ukupne RNA

Za izdvajanje ukupne RNA iz tkiva jetre i bijelog masnog tkiva korišten je komercijalno dostupan komplet za izolaciju (SV Total RNA Isolation System, Promega®, SAD) prema uputama proizvođača.

Koncentracija i čistoća ukupne izdvojene RNA određena je analizom na spektrofotometru BioDrop μ L ITE (BioDrop, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo). Čistoća izdvojene RNA određena je pomoću omjera apsorbancija valnih dužina 260/280 nm.

3.10.2. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR)

Pripremljena razrjeđenja RNA (50 μ g) podvrgnuta su reverznoj transkripciji i kvantitativnom PCR-u u jednom koraku koristeći se One-Step TB Green PrimeScript RT-PCR setom II (TaKaRa Bio Inc. Shiga, Japan). Reakcijom RT-qPCR analizirana je ekspresija gena od interesa čije su početnice prikazane u tablici 4.

U svakoj RT-qPCR reakciji, ukupnog volumena 20 μ L, upotrijebljeno je:

1. 2X One Step TB Green RT-PCR pufer 4 ($V = 10,0 \mu$ L)
2. PrimeScript 1 step enzim Mix 2 ($V = 0,8 \mu$ L)
3. početnice za oba ispitivana gena ($V = 0,8 \mu$ L)
4. sterilna destilirana voda (RNase free water) ($V = 5,2 \mu$ L)
5. ROX referentna boja ($V = 0,4 \mu$ L)
6. RNA ($V = 2 \mu$ L)

Tablica 4. Početnice ispitivanih gena od interesa

Gen	Sekvenca 5' – 3'	Enzim
<i>Tgf-β</i>	F: AAT ACG TCA GAC ATT CGG GAA GCA R: TCA ATG TAC AGC TGC CGT AC	TGF-β
<i>Tnf-α</i>	F: ACT GAA CTT CGG GGT GAT TG R: GCT TGG TGG TTT GCT ACG AC	TNF-α
<i>Il-6</i>	F: TGA TGG ATG CTT CCA AAC TG R: GAG CAT TGG AAG TTG GGG TA	IL-6
<i>Nfe2l2</i>	F: CAC ATC CAG ACA GAC ACC AGT R: CTA CAA ATG GGA ATG TCT CTG C	NRF 2
<i>Chop</i>	F: GAG GAG AGA GAA ACC GGT CC R: TCA GTC AGC CAA GCT AGG GA	CHOP
<i>Fads1</i>	F: TGG AGA GCA ACT GGT TTG TG R: GTT GAA GGC TGA CTG GTG AA	Δ5D
<i>Fads2</i>	F: TGT CCA CAA GTT TGT CAT TGG R: ACA CGT GCA GGC TCT TTA TG	Δ6D
<i>Scd1</i>	F: ACA TTC AAT CTC GGG AGA ACA R: CCA TGC AGT CGA TGA AGA AC	Δ9D
<i>Acc1</i>	F: TGA AGG CTG TGG TGA TGG AT R: CCG TAG TGG TGG AGG TTG GA	ACC
<i>Fasn</i>	F: AAG CCC TTG GGA GTC AAA GT R: TAG ACG TCA GCA CGA TG	FAS
<i>Cpt-1a</i>	F: TGC CTC TAT GTG GTG TCC AA R: GGC TTG TCT CAA GTG CTT CC	CPT1
<i>Srebp-1c</i>	F: GTT GAT CAC GCA CAT CTT GGA R: TCG TTC AGA ATC AAG TTC TCA ATT TC	SREBP-1c
<i>Ppar-α</i>	F: GAC AAG GCC TCA GGA TAC CA R: GTC TTC TCA GCC ATG CAC AA	PPAR-α
<i>β-aktin</i>	F: ACT ATT GGC AAC GAG CGG TT R: TGT CAG CAA TGC CTG GGT ACA	β-aktin
<i>Ciklofilin</i>	F: CTT CTT GCT GGT CTT GCC ATT CCT R: GGA TGG CAA GCA TGT GGT CTT TG	Ciklofilin

Za izvođenje lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu korišten je uređaj Stratagene MxPro3005 (Agilent Technologies, SAD i Kanada), a reakcija se zbivala prema uvjetima navedenim u tablici 5.

Tablica 5. Uvjeti RT-qPCR reakcija

	Temperatura / °C	Trajanje ciklusa / s	Broj ciklusa
Reverzna transkripcija	42	300	1
	95	10	1
PCR reakcija	95	5	40
	60	40	40
	72	60	40
Protokol disocijacije	95	60	1
	55	30	1
	95	30	1

Sve Ct-vrijednosti dobivene u kvantitativnoj PCR reakciji upotrijebljene su za izračunavanje relativne promjene ekspresije cDNA gena od interesa pokusnih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu. Metodom $\Delta\Delta Ct$ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) analizirana je i kvantificirana ekspresija gena, prema genu za normalizaciju (engl. *housekeeping gene*, β -aktinu i ciklofilinu), te je pomoću $\Delta\Delta Ct$ -vrijednosti izračunat faktor promjene ekspresije gena (engl. *fold change*). Ekspresija je izračunata prema formuli:

$$\Delta\Delta Ct = (C_T \text{ ciljni gen P} - C_T \text{ gen za normalizaciju P}) - (C_T \text{ ciljni gen K} - C_T \text{ gen za normalizaciju K})$$

K – kontrolna skupina; P – pokusna skupina

Pomoću izračunate $\Delta\Delta Ct$ -vrijednosti izračunati je faktor promjene (engl. *fold change*) ekspresije gena od interesa u odnosu na kontrolnu skupinu prema formuli:

$$\text{Relativna promjena} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Dobiveni broj označuje koliko je puta ekspresija mRNA gena od interesa pokusne skupine veća ili manja u odnosu na kontrolnu skupinu.

3.11. Izdvajanje proteina i određivanje njihove koncentracije u tkivima

Za izolaciju ukupnih proteina iz tkiva izvagano je 200 mg tkiva jetre ili bijelog masnog tkiva i dodano 1 mL RIPA pufera (Ripa Lysis Buffer 10x, Milipore, Merck, SAD) s inhibitorima proteaza (SigmaFast Protease Inhibitor Coctail Tablets, Sigma-Aldrich, SAD). Tkivo je homogenizirano tri puta po 10 s pomoću ručnog homogenizatora (IKA, Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Njemačka) i zatim sonicirano tri puta po 10 s pomoću ultrazvučnog homogenizatora (Qsonica Q55A Sonicator, Ultrasonic Homogenizer, SAD). Na ovaj je način prekinut kontinuitet stanične membrane i oslobođeni su proteini koji su pohranjeni na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Koncentracija ukupnih proteina u lizatu jetre i bijelom masnom tkivu određena je BCA metodom (Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination, Sigma-Aldrich, SAD). Metoda se temelji na redukciji iona bakra (Cu^{2+} u Cu^{+}) u lužnatom mediju, pomoću reagensa koji sadržava bicinkoninsku kiselinu (engl. *Bicinchoninic acid*, BCA), pri čemu nastaje ljubičasti produkt čiji se intenzitet određuje spektrofotometrijski na 562 nm i proporcionalan je koncentraciji proteina u uzorku. Kao standard za izradu kalibracijske krivulje korišten je goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA) u koncentracijama od 31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$, koje su dobivene serijskim razrjeđivanjem matične otopine koncentracije 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Protien Standard, Sigma-Aldrich, SAD).

Standard/uzorak (25 μL) nanese se u duplikatu na mikrotitarsku ploču s 96 mjesta, dodano je 200 μL BCA radnog reagensa te je inkubirano 30 minuta na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Apsorbancija nastalog produkta očitana je na 562 nm na spektrofotometru (Bio-Tek uQuant Universal Microplate

Spectrophotometer, SAD). Iz apsorbancije uzoraka uz kalibracijsku krivulju određena je koncentracija proteina u uzorcima i izražena je u mikrogramima po mikrolitru ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

Uzorci su razrijeđeni na $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ dodatkom koncentriranog pufera za nanošenje uzoraka (2x Leammi Sample Buffer, Bio-Rad, SAD). Uzorci su grijani pet minuta na $95 \text{ }^\circ\text{C}$ kako bi se pospješila denaturacija te su zatim pohranjeni na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ do analize.

3.12. Western blot analiza

3.12.1. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u uvjetima denaturacije

Proteini iz lizata tkiva jetre i bijelog masnog tkiva razdvojeni su na temelju molekulske mase koristeći okomitu diskontinuiranu elektroforezu u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (engl. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE). Za razdvajanje proteina korišten je gradijentni gel gustoće 4 – 15 % (BioRad, SAD).

Volumen uzorka koji se nanosio na gel za elektroforezu odgovarao je koncentraciji proteina od $50 \mu\text{g}$. Elektroforeza se provodila u puferu za elektroforezu (25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1 %-tna otopina SDS-a, pH 8,3) uz napon od 110 volti tijekom 65 minuta. Kao standard za određivanje molekulske mase proteina korišten je Precision Plus Protein Standards Dual Color (BioRad, SAD), koji na gelu daje 10 obojenih proteinskih vrpca u rasponu od 10 do 250 kDa.

3.12.2. Prijenos proteina iz gela na membranu

Nakon razdvajanja proteina SDS-PAGE metodom razdvojene su vrpce prenesene na nitroceluloznu membranu kako bi se omogućila specifična detekcija razdvojenih proteina. Prijenos proteina na membranu izveden je koristeći uređaj za elektroprijenos proteina Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, SAD) i komercijalni kit za prijenos (Trans-Blot Turbo RTA Transfer Kit, Bio-Rad, SAD) pri naponu struje od 13 volti tijekom sedam minuta. Provjera uspješnosti prijena proteina na membranu učinjena je bojenjem ostalih proteina na gelu 0,1 %-tnom otopinom Coomassie plavila R-250 u smjesi 40 %-tnog metanola i 10 %-tne octene kiseline. Gelovi su nakon bojenja vizualno pregledani.

Nakon učinjenog prijenosa na membranu membrana je blokirana u puferu za blokiranje (Immobilone Block – CH, Merck, SAD) tijekom 30 minuta. Time je onemogućeno nespecifično vezanje antitijela u sljedećim koracima analize.

3.12.3. Detekcija razdvojenih proteina

Membrana je zatim inkubirana tijekom noći na 4 °C sa specifičnim primarnim antitijelima za ciljne proteine kako slijedi:

- Za detekciju NRF 2 korištena su anti-NRF 2 mišja monoklonska antitijela (Abcam, SAD) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za blokiranje).
- Za detekciju 4-HNE korištena su anti-4-HNE kozja poliklonska antitijela (BioRad, SAD) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za blokiranje).
- Za detekciju CD-36 korištena su anti-CD-36 mišja monoklonska antitijela (Santa Cruz Biotechnology, SAD) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za blokiranje).
- Za detekciju L-FABP korištena su anti-L-FABP mišja monoklonska antitijela (Santa Cruz Biotechnology, SAD) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za blokiranje).
- Za detekciju adiponektina korištena su anti-adiponektin zečja monoklonska antitijela (Abcam, SAD) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za blokiranje).

Nakon inkubacije s primarnim antitijelom membrana se ispirala tri puta po pet minuta puferom za ispiranje (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 %-tni Tween20 pH 7,6, u ultračistoj vodi).

Membrana je zatim inkubirana 60 minuta koristeći se sekundarnim antitijelom obilježenim peroksidazom iz hrena, koje se veže za epitope primarnih antitijela. Korištena su sljedeća sekundarna antitijela:

- Za detekciju mišjih antitijela (pri analizi ekspresije NRF 2, CD-36, L-FABP) upotrijebljena su m-IgGκBP-HRP obilježena antitijela iz seruma miša (Mouse IgGκ light chain binding protein (m-IgGκBP) conjugated to horseradishperoxidase (HRP) Santa Cruz Biotechnology, SAD) (razrjeđenje 1:2000 u puferu za blokiranje).

- Za detekciju zečjih antitijela (pri analizi ekspresije adiponektina) upotrijebljena su obilježena antitijela iz seruma miša (mouse anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, SAD) (razrjeđenje 1:2000 u puferu za blokiranje).
- Za detekciju kozjih antitijela (kod analize ekspresije 4-HNE) upotrijebljena su obilježena antitijela iz seruma majmuna (donkey anti-goat IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, SAD) (razrjeđenje 1:2000 u puferu za blokiranje).

Nakon završetka inkubacije sa sekundarnim antitijelima membrana je ispirana puferom za ispiranje (tri puta po pet minuta), a prikaz proteinskih vrpki postignut je inkubacijom membrane tijekom dvije minute u mraku s komercijalno dostupnim reagensom za kemiluminescenciju (Western Blotting Luminol Reagent, Santa Cruz Biotechnology, SAD). Enzim u prisutnosti kemiluminescentog supstrata emitira svjetlo, što omogućuje prikaz proteinskih vrpki (tamne pruge) pomoću uređaja za detekciju (LI-COR Bioscience, Njemačka).

U svrhu dobivanja polukvantitativnog rezultata provedeno je denzitometrijsko mjerenje razdvojenih vrpki. Nakon denzitometrijskog mjerenja membrane su inkubirane 15 minuta na 37 °C u puferu za skidanje (Restore Western Blot Stripping Buffer, Thermo Fisher Scientific, SAD) kako bi se uklonila antitijela vezana u prvom koraku. Naknadno su membrane inkubirane s anti-aktin mišjim monoklonskim antitijelom iz ptičjeg želuca (β -Actin (C4); Santa Cruz Biotechnology, SAD) (razrjeđenje 1:2000 u puferu za blokiranje) za detekciju β -aktina istovjetnom metodom.

Rezultati denzitometrijske analize dobivenih vrpki izraženi su u relativnim denzitometrijskim jedinicama.

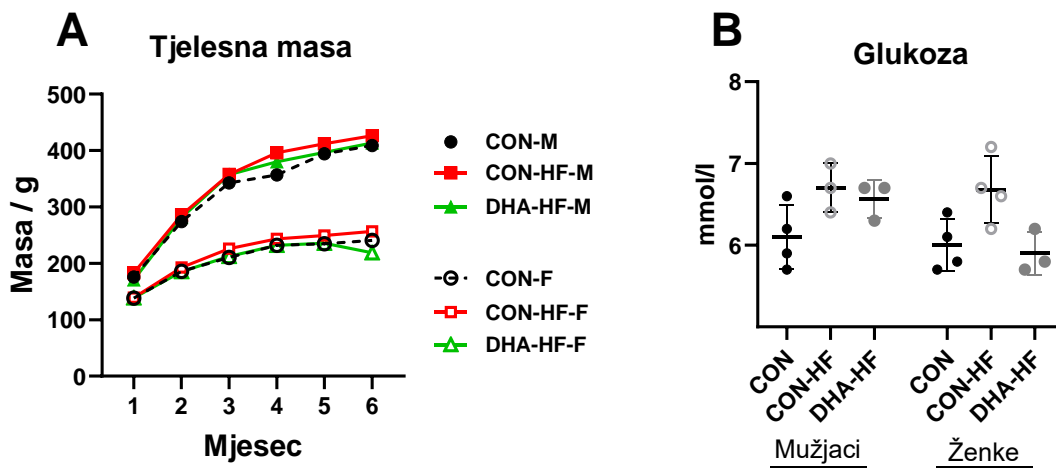
3.13. Statistička analiza

Podaci su obrađeni u računalnom statističkom programu GraphPad Prism 9. Normalnost distribucije podataka provjerena je Shapiro-Wilksovim testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($SV \pm SD$). ANOVA i *posthoc* Tukeyev test primijenjeni su kako bi se utvrdile statističke razlike između srednjih vrijednosti skupina. Razlike su smatrane statistički značajnima ako je $P < 0,05$.

4.REZULTATI

4.1. Uspostava i potvrda modela metaboličkog sindroma

Jedan od ciljeva ovog rada bio je razviti životinjski model metaboličkog sindroma prikladan za procjenu učinka dokozaheksaenske (DHA) i eikozapentaenske (EPA) masne kiseline na metabolizam lipida, upalne procese i oksidacijski stres. Model je uspostavljen primjenom 15 %-tne otopine fruktoze u vodi za piće uz istodobnu primjenu hranidbenih tretmana s različitim omjerima n-6/n-3 masnih kiselina (7:1 i 1:1). Rezultati nakon 20 tjedana hranidbenog tretmana upućuju na uspješnu uspostavu modela metaboličkog sindroma. Između skupina nije zabilježena značajna razlika u tjelesnoj masi niti u koncentraciji glukoze natašte (slika 9), što je u skladu s činjenicom da fruktoza primarno narušava inzulinsku osjetljivost, a ne nužno i ukupnu tjelesnu masu.

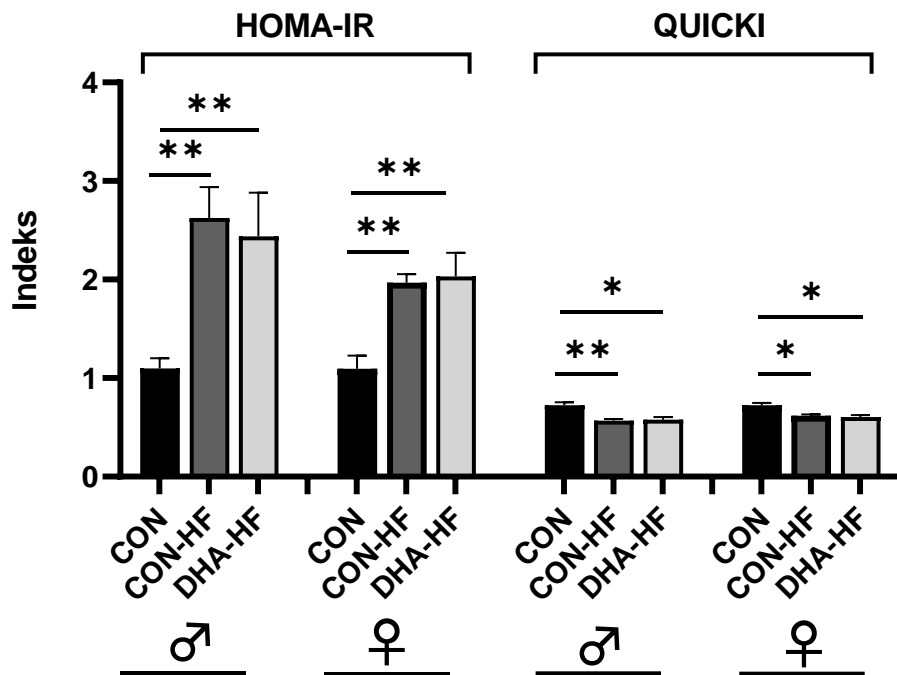


Slika 9. Utjecaj hranidbenog tretmana na tjelesnu masu (A) i koncentraciju glukoze u serumu (B). CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 7, DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 1.

Mjerenje inzulinske rezistencije pokazalo je da su životinje u skupini s visokim unosom fruktoze (CON-HF) i prehranom obogaćenom DHA/EPA-om (DHA-HF) imale značajno povećane vrijednosti indeksa HOMA-IR ($P < 0,01$) te snižene vrijednosti indeksa QUICKI u usporedbi s kontrolnom skupinom ($P < 0,01$, slika 10). Ovaj učinak bio je izraženiji u mužjaka nego u ženki, što upućuje na spolno specifične razlike u odgovoru na prehranu bogatu fruktozom. Takav obrazac

odgovara kliničkim obilježjima metaboličkog sindroma u ljudi, gdje se često bilježi spolna dimenzija u prevalenciji i manifestaciji bolesti.

Prehrana obogaćena DHA/EPA-om (DHA-HF) pokazala je trend laganog smanjenja vrijednosti HOMA-IR i povećanja indeksa QUICKI u odnosu na skupinu CON-HF, pri čemu je pozitivan učinak tretmana zabilježen u oba spola. Ovi nalazi sugeriraju da dodatak DHA/EPA-e može djelovati protektivno u prevenciji razvoja inzulinske rezistencije izazvane visokim unosom fruktoze, čime potvrđuje svoj potencijal u prevenciji metaboličkih poremećaja.



Slika 10. Osjetljivost na inzulin prikazana kao HOMA-IR i QUICKI indeks.

CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 7,

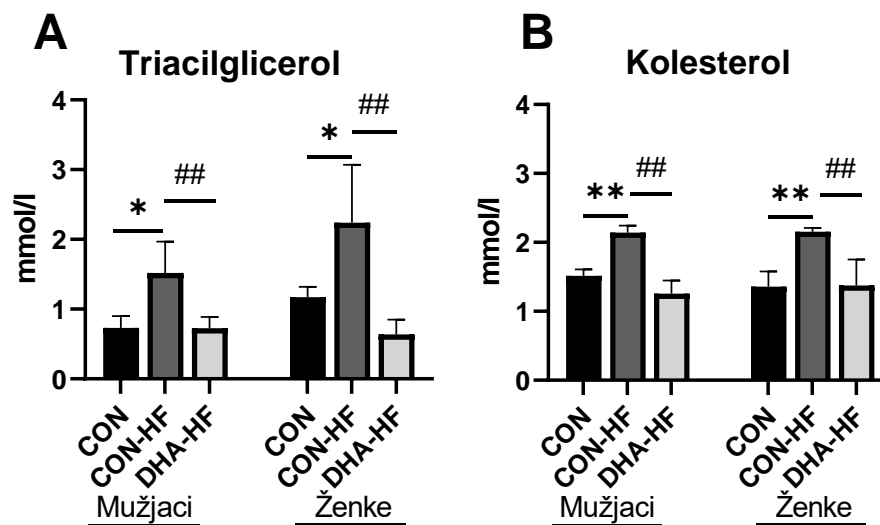
DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 1

Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti * $P < 0,05$ ili ** $P < 0,01$ za CON-HF i DHA-HF skupinu u odnosu na CON skupinu.

4.2. Učinak dodataka DHA i EPA-e na metabolizam lipida

4.2.1. Koncentracija triacilglicerola i kolesterola u serumu i jetri

Ekperimentalni model metaboličkog sindroma u mužjaka i kod ženki (CON-HF) doveo je do značajnog porasta koncentracije triacilglicerola ($P < 0,01$, slika 11 A) i ukupnog kolesterola ($P < 0,01$, slika 11 B) u usporedbi s kontrolnom skupinom. Obogaćivanje hrane DHA-om i EPA-om u skupini DHA-HF u ženki i mužjaka dovelo je do statistički značajnog smanjenja vrijednosti triacilglicerola i ukupnog kolesterola u odnosu na skupinu CON-HF ($P < 0,01$, $P < 0,01$). Vrijednosti triacilglicerola i ukupnog kolesterola u skupinama hranjenima hranom obogaćenom DHA-om i EPA-om (DHA- HF mužjaci i ženke) smanjene su na razinu vrijednosti kontrolne skupine (CON mužjaci, CON ženke). To upućuje na potencijalno zaštitno djelovanje n-3 masnih kiselina, a učinci su vidljivi u oba spola.

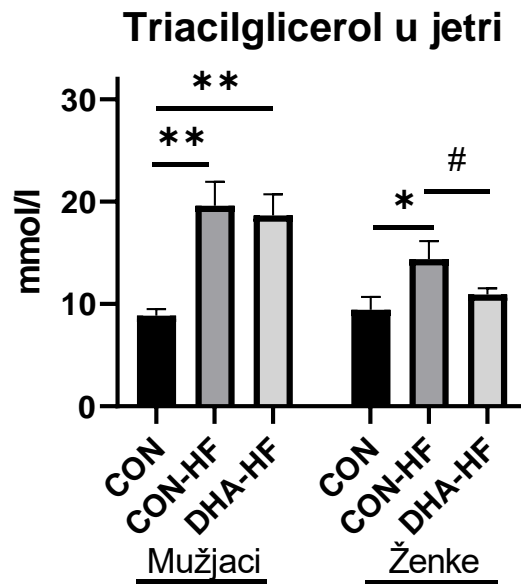


Slika 11. Utjecaj hranidbenog tretmana na koncentraciju triacilglicerola (A) i ukupnog kolesterola (B) u serumu.

CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 7, DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 1. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti * $P < 0,05$ ili ** $P < 0,01$ za CON-HF i DHA-HF skupinu u odnosu na CON skupinu i ## $p < 0,01$ za DHA-HF skupinu u odnosu na CON-HF skupinu.

Utjecaj eksperimentalnog modela metaboličkog sindroma (CON-HF) vidljiv je kroz statistički značajno povećanje koncentracije triacilglicerola u tkivu jetre u odnosu na kontrolnu skupinu (CON) u mužjaka i kod ženki ($P < 0,01$, $P < 0,05$, slika 12).

Dodatak DHA i EPA-e nije u potpunosti spriječio povećanje triacilglicerola u jetri, no vidljivo je značajno smanjenje njihove koncentracije u usporedbi sa skupinom CON-HF. Smanjenje je osobito izraženo u ženki DHA-HF u odnosu na skupinu CON-HF ($P < 0,05$).



Slika 12. Utjecaj hranidbenog tretmana na koncentraciju triacilglicerola u tkivu jetre.

CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 7, DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 1. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti * $P < 0,05$ ili ** $P < 0,01$ za CON-HF i DHA-HF skupinu u odnosu na CON skupinu i # $P < 0,05$ za DHA-HF skupinu u odnosu na CON-HF skupinu.

4.2.2. Sastav masnih kiselina u tkivima

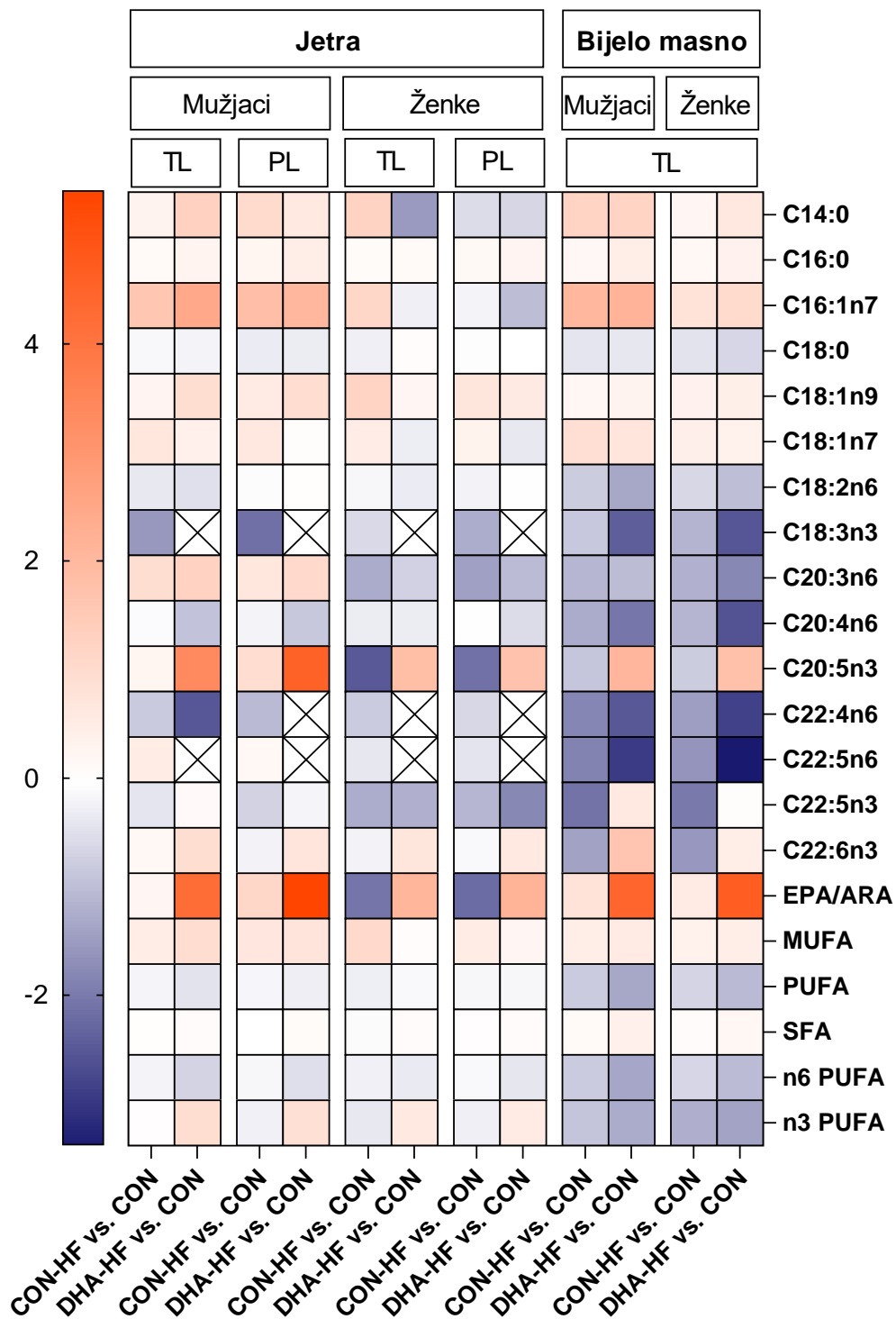
Toplinska mapa (slika 13) prikazuje promjene u sastavu masnih kiselina u jetri i bijelom masnom tkivu (WAT) mužjaka i ženki, s fokusom na promjene uzrokovane dodatkom 15 % fruktoze u vodi za piće (CON-HF vs. CON) i njezinom modulacijom dodatkom DHA i EPA-e (DHA-HF vs. CON). Boje označavaju smjer promjena: crveno – porast, plavo – smanjenje, a X označava nedostatak značajnosti.

U jetri i masnom tkivu skupina DHA-HF pokazuje značajan porast (crveno) sadržaja n-3 PUFA, posebno C22:6n3 (DHA) i C20:5n3 (EPA), potvrđujući uspješnu inkorporaciju DHA u membrane. Ova je promjena prisutna u oba spola i u oba tkiva, s izraženijim učinkom u perifernom masnom tkivu ženki.

Dodatak HF-a u vodu za piće povećava udio n-6 PUFA C18:2n6 (LA) i C20:4n6 (ARA), dok suplementacija DHA i EPA-e to značajno smanjuje (plavo), čime se poboljšava n-6/n-3 omjer, koji je ključan za regulaciju upale i homeostaze. Posebno je vidljivo smanjenje arahidonske kiseline u jetri mužjaka i ženki.

U skupini CON-HF vidljiv je porast mononezasićenih masnih kiselina (npr. C18:1n9 i C16:1n7), što se povezuje s aktivacijom *de novo* lipogeneze pod utjecajem fruktoze i aktivnosti enzima SCD-1. DHA-HF skupina pokazuje smanjenje MUFA-e, osobito u jetri mužjaka, što upućuje na inhibiciju aktivnosti SCD-1. Zasićene masne kiseline ne pokazuju značajan odgovor na dodatak DHA/EPA-e.

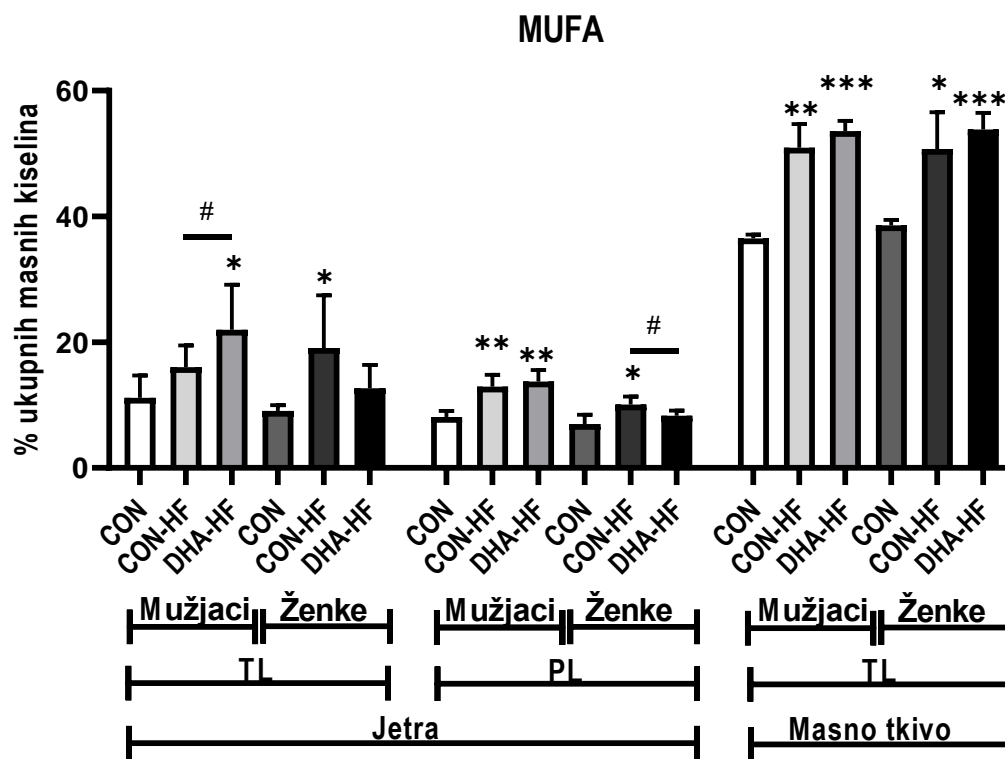
Povećanje omjera EPA/ARA-e (crveno) u skupini DHA-HF upućuje povratak protuupalne ravnoteže u lipidnim medijatorima.



Slika 13. Utjecaj tretmana na profil masnih kiselina jetrenih fosfolipida i ukupnih lipida u tkivu jetre i bijelom masnom tkivu.

CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 7, DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 1

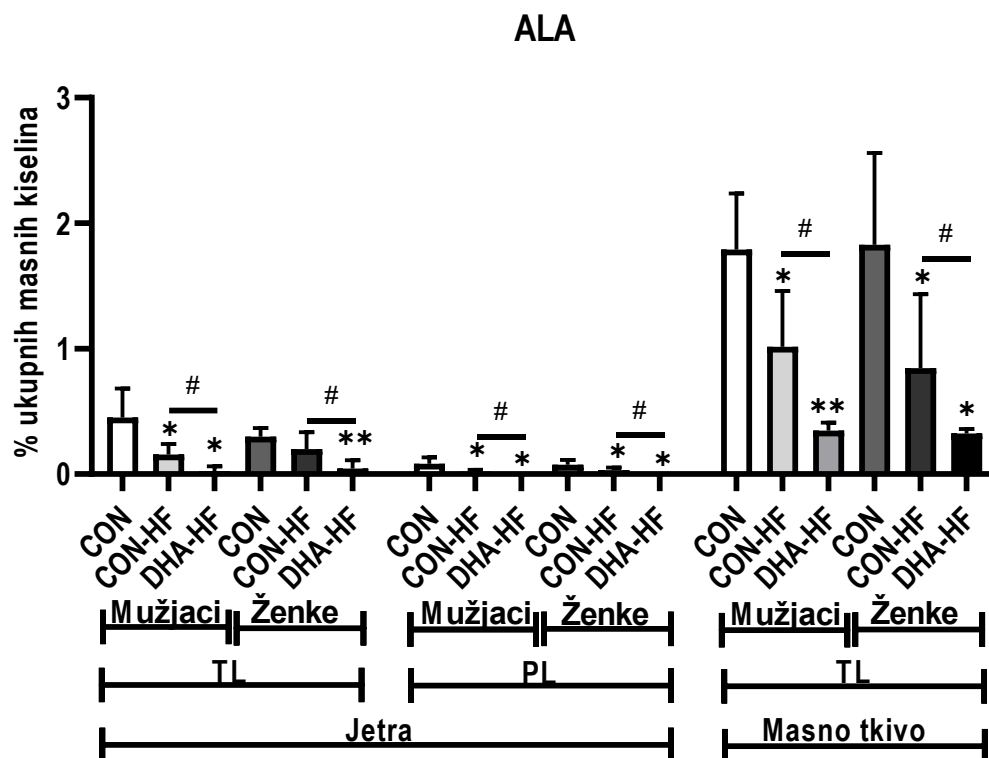
U jetri je u skupini CON-HF došlo do značajnog porasta MUFA-e, posebice u ženki, i to u frakciji ukupnih lipida u odnosu na kontrolnu skupinu ($P < 0,05$). Dodatak DHA/EPA-e rezultirao je smanjenjem MUFA-e, osobito u ženki u frakciji ukupnih lipida i fosfolipida u jetri u odnosu na skupinu CON-HF ($P < 0,05$). U bijelom masnom tkivu visokofruktozna hrana ($P < 0,01$ mušjaci, $P < 0,005$ ženke) i dodatak DHA i EPA-e ($P < 0,005$) doveli su do značajnog povećanja MUFA-e u oba spola, što može upućivati na povećano skladištenje lipida u ovom tkivu (slika 14).



Slika 14. Utjecaj hranidbenog tretmana na koncentraciju MUFA-e u jetri i bijelom masnom tkivu.

CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina $n-6/n-3 = 7$, DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina $n-6/n-3 = 1$. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti * $P < 0,05$ ili ** $P < 0,01$ ili *** $P < 0,005$ za skupine CON-HF i DHA-HF u odnosu na skupinu CON i # $P < 0,05$ za skupinu DHA-HF u odnosu na skupinu CON-HF.

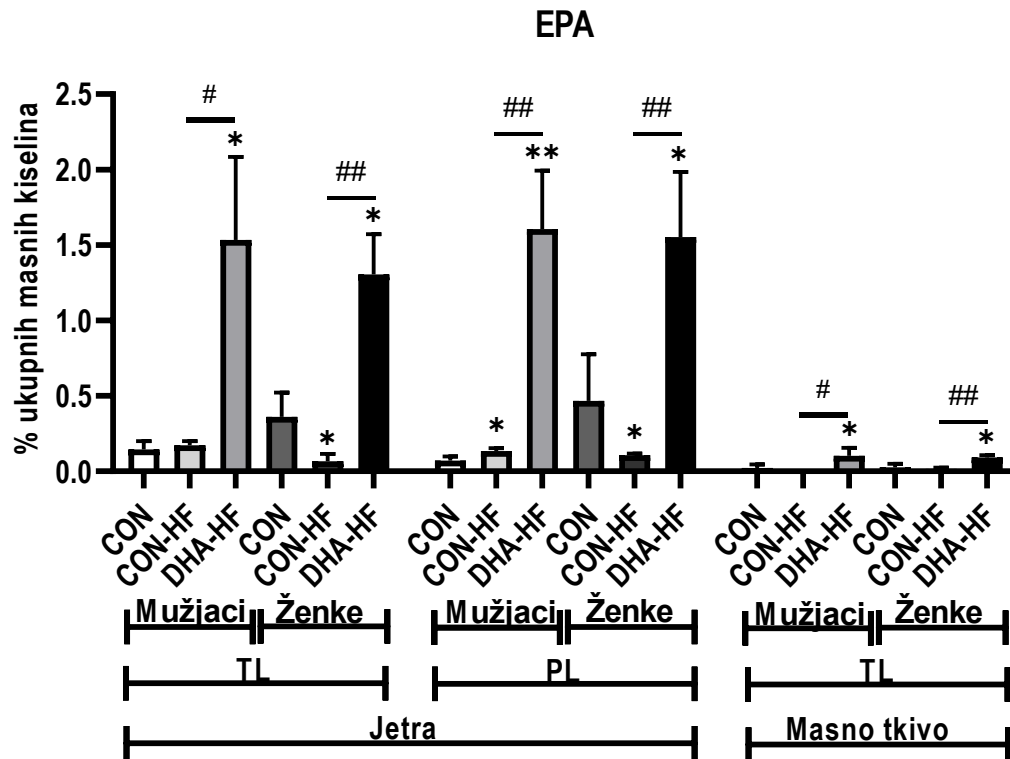
Alfa-linolenska kiselina (ALA) u jetri je niža u eksperimentalnim skupinama u oba spola ($P < 0,05$). U masnom tkivu najveći udjeli ALA-e zabilježeni su u kontrolnoj skupini CON. Uvođenje DHA i EPA-e rezultira značajnim smanjenjem ALA-e i u mužjaka ($P < 0,01$) i u ženki ($P < 0,05$) u odnosu i na skupine CON i CON-HF (slika 15).



Slika 15. Utjecaj hranidbenog tretmana na koncentraciju alfa-linolenske kiseline u jetri i bijelom masnom tkivu.

CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 7, DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 1. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti * $P < 0,05$ ili ** $P < 0,01$ za skupine CON-HF i DHA-HF u odnosu na skupinu CON i # $P < 0,05$ za skupinu DHA-HF u odnosu na skupinu CON-HF.

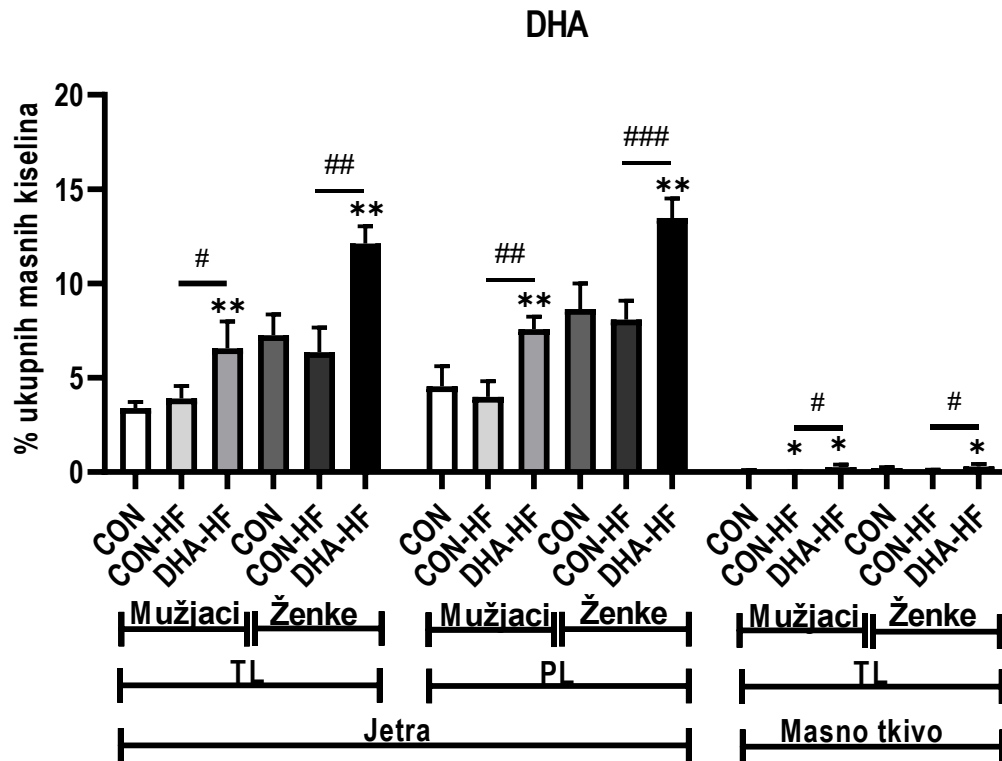
Na slici 16 koncentracija eikozapentaenske kiseline u jetri značajno je povećana u skupini DHA-HF u oba spola ($P < 0,05$ mužjaci, $P < 0,05$ ženke). Povećanje je vidljivo u ukupnim lipidima i u fosfolipidima. Eikozapentaenska kiselina u masnom tkivu općenito je niska u svim skupinama, no postoji blago povećanje u skupini DHA-HF, u oba spola ($P < 0,05$).



Slika 16. Utjecaj hranidbenog tretmana na koncentraciju eikozapentaenske kiseline u jetri i bijelom masnom tkivu.

CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 7, DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 1. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti * $P < 0,05$ ili ** $P < 0,01$ za skupine CON-HF i DHA-HF u odnosu na skupinu CON i # $P < 0,05$ ili ## $P < 0,01$ za skupinu DHA-HF u odnosu na skupinu CON-HF.

Na slici 17 prikazani su rezultati koncentracije DHA u jetri i bijelom masnom tkivu. Dodatak DHA/EPA-e uz HF hranu značajno povećava razinu DHA u usporedbi s kontrolnom skupinom ($P < 0,01$ mužjaci, $P < 0,05$ ženke) i CON-HF skupinom ($P < 0,05$ mužjaci, $P < 0,01$ ženke). U masnom je tkivu koncentracija DHA vrlo mala, ali postoji značajno povećanje u skupini DHA-HF u odnosu na kontrolnu skupinu u oba spola ($P < 0,05$).

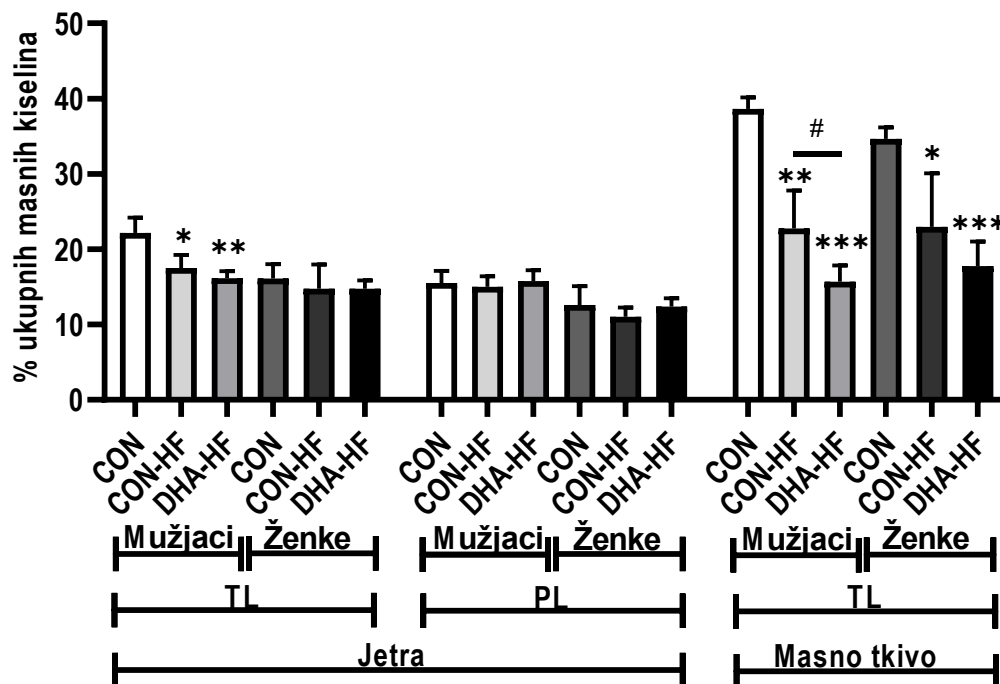


Slika 17. Utjecaj hranidbenog tretmana na koncentraciju dokozaheksaenske masne kiseline u jetri i bijelom masnom tkivu.

CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 7, DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 1. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti * $P < 0,05$ ili ** $P < 0,01$ za skupine CON-HF i DHA-HF u odnosu na skupinu CON i # $P < 0,05$ ili ## $P < 0,01$ ili ### $P < 0,005$ za skupinu DHA-HF u odnosu na skupinu CON-HF.

U jetri su koncentracije linolne kiseline uglavnom bez značajnih razlika među tretmanima, u oba spola (slika 18). U masnom tkivu prisutne su značajne razlike i u mužjaka ($P < 0,01$) i u ženki ($P < 0,05$), i to u skupini CON-HF koja pokazuje pad LA u odnosu na kontrolnu skupinu, dok dodatak n-3 masnih kiselina dodatno smanjuje razinu LA u odnosu na skupinu CON-HF, posebice u mužjaka ($P < 0,05$).

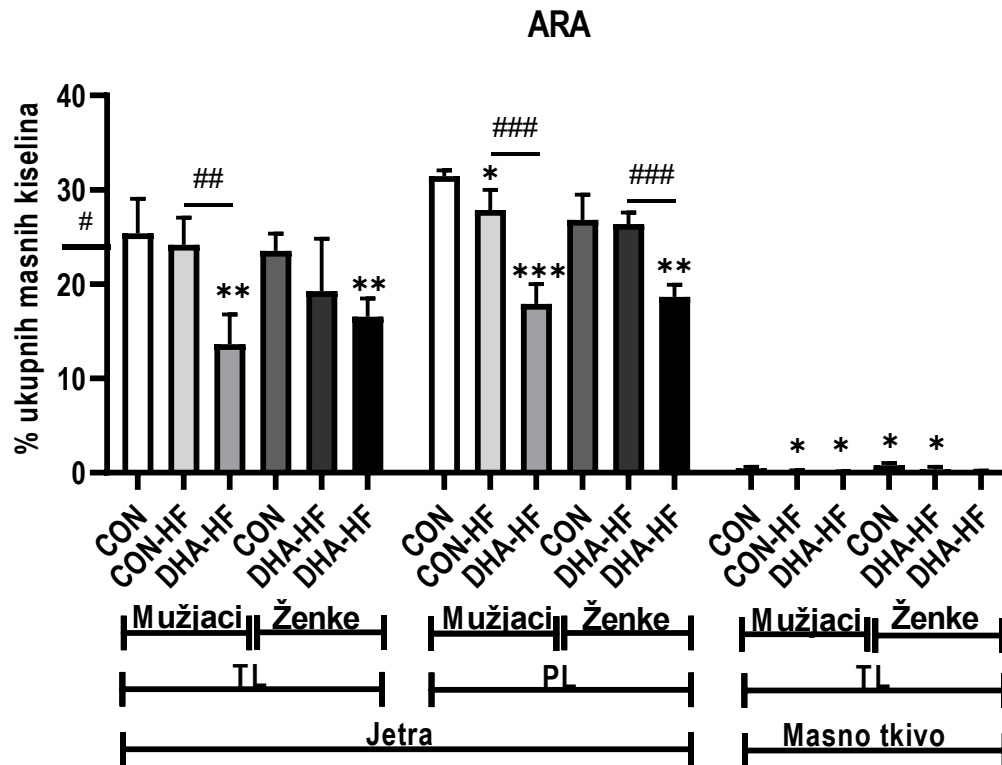
LA



Slika 18. Utjecaj hranidbenog tretmana na koncentraciju linolne kiseline u jetri i bijelom masnom tkivu.

CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 7, DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 1. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti * $P < 0,05$ ili ** $P < 0,01$ ili *** $P < 0,005$ za skupine CON-HF i DHA-HF u odnosu na skupinu CON i # $P < 0,05$ za skupinu DHA-HF u odnosu na skupinu CON-HF.

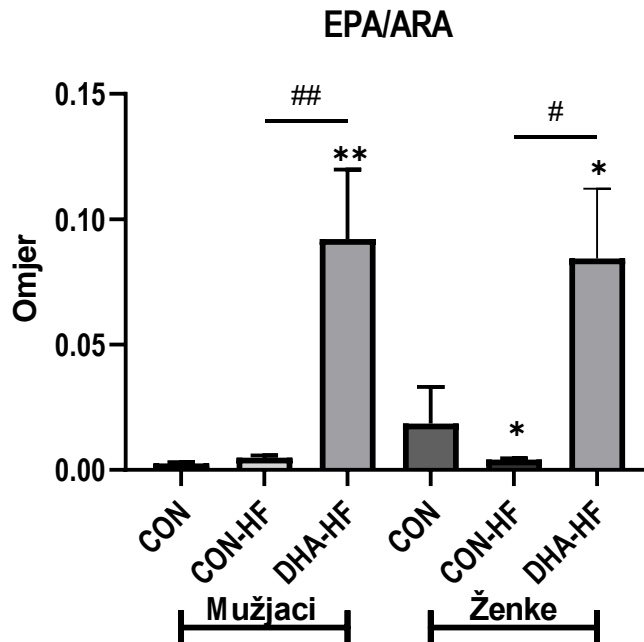
Dodatak n-3 masnih kiselina značajno smanjuje koncentraciju arahidonske kiseline u jetri, i to u oba spola, i u odnosu na skupinu CON ($P < 0,01$) i u odnosu na skupinu CON-HF ($P < 0,01$ mužjaci, $P < 0,05$ ženke). U fosfolipidima jetre također je vidljivo značajno smanjenje u oba spola i u obje eksperimentalne skupine, posebice nakon dodatka DHA i EPA-e u odnosu na skupinu CON ($P < 0,005$ mužjaci, $P < 0,01$ ženke). U masnom tkivu koncentracija je niska u svim skupinama, ali se primjećuje i trend smanjenja koncentracije nakon HF i DHA/EPA tretmana u odnosu na kontrolnu skupinu ($P < 0,05$) (slika 19).



Slika 19. Utjecaj hranidbenog tretmana na koncentraciju arahidonske kiseline u jetri i bijelom masnom tkivu.

CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina $n-6/n-3 = 7$, DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina $n-6/n-3 = 1$. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti * $P < 0,05$ ili ** $P < 0,01$ ili *** $P < 0,005$ za skupine CON-HF i DHA-HF u odnosu na skupinu CON i # $P < 0,05$ ili ## $P < 0,01$ ### $P < 0,005$ za skupinu DHA-HF u odnosu na skupinu CON-HF.

U jetri dodatak fruktoze u vodi značajno snižava omjer EPA/ARA-e u odnosu na kontrolnu skupinu u ženki ($P < 0,05$). Skupina s dodatkom DHA pokazuje značajno povećanje omjera EPA/ARA-e u odnosu na skupinu CON-HF ($P < 0,01$ mužjaci, $P < 0,05$ ženke) i skupinu CON ($P < 0,01$ mužjaci, $P < 0,05$ ženke) (slika 20).



Slika 20. Utjecaj hranidbenog tretmana na omjer EPA/ARA u jetri.

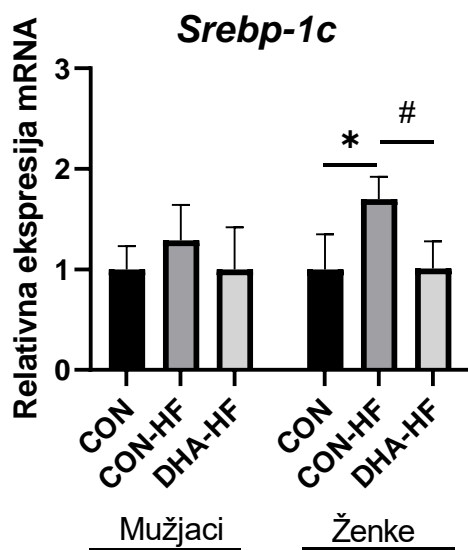
CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 7, DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 1. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti * $P < 0,05$ ili ** $P < 0,01$ za skupine CON-HF i DHA-HF u odnosu na skupinu CON i # $P < 0,05$ ili ## $P < 0,01$ za skupinu DHA-HF u odnosu na skupinu CON-HF.

4.2.3. Ekspresija lipogenih gena i proteina te gena povezanih s β -oksidacijom

Ekspresija transkripcijskog faktora *Srebp-1c* u jetri mužjaka i ženki nakon različitih hranidbenih tretmana prikazana je na slici 21. U mužjaka nije uočena statistički značajna razlika među ispitivanim skupinama. U skupini koja je primala hranu s dodatkom fruktoze (CON-HF) zabilježena je tendencija povećanja ekspresije u odnosu na kontrolnu skupinu (CON), dok je dodatak DHA u prehrani (DHA-HF) pokazao blagu tendenciju vraćanja na vrijednosti kontrolne skupine, ali bez postizanja značajnosti.

Nasuprot tome, u ženki je uočena jasna razlika među skupinama. Fruktoza je značajno povećala ekspresiju *Srebp-1c* u odnosu na kontrolu skupinu ($P < 0,05$). Međutim, suplementacija

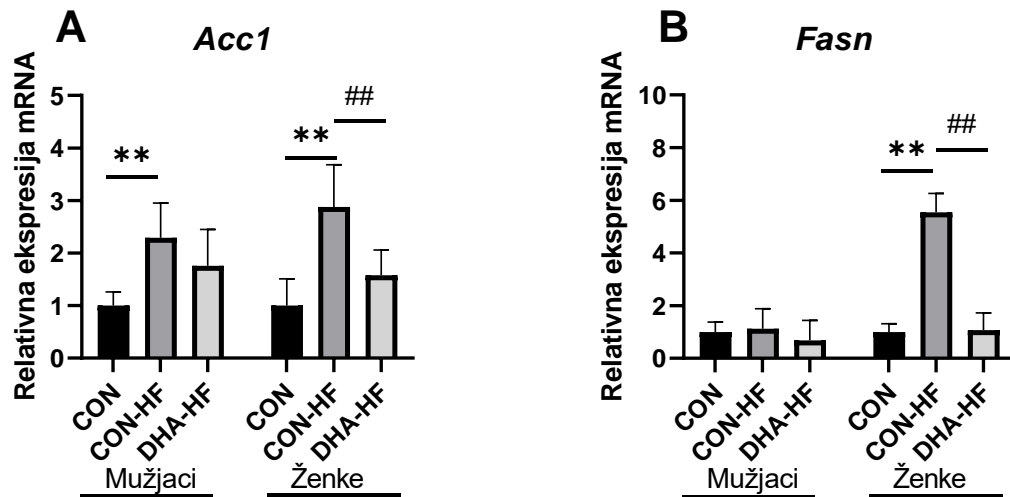
DHA uz fruktozu (DHA-HF) dovela je do značajnog smanjenja ekspresije u odnosu na skupinu CON-HF ($P < 0,05$), pri čemu su vrijednosti bile usporedive s kontrolnom skupinom.



Slika 21. Utjecaj hranidbenog tretmana na ekspresiju transkripcijskog faktora *Srebp-1c*.

CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 7, DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 1. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti * $P < 0,05$ za skupine CON-HF i DHA-HF u odnosu na skupinu CON i # $P < 0,05$ za skupinu DHA-HF u odnosu na skupinu CON-HF.

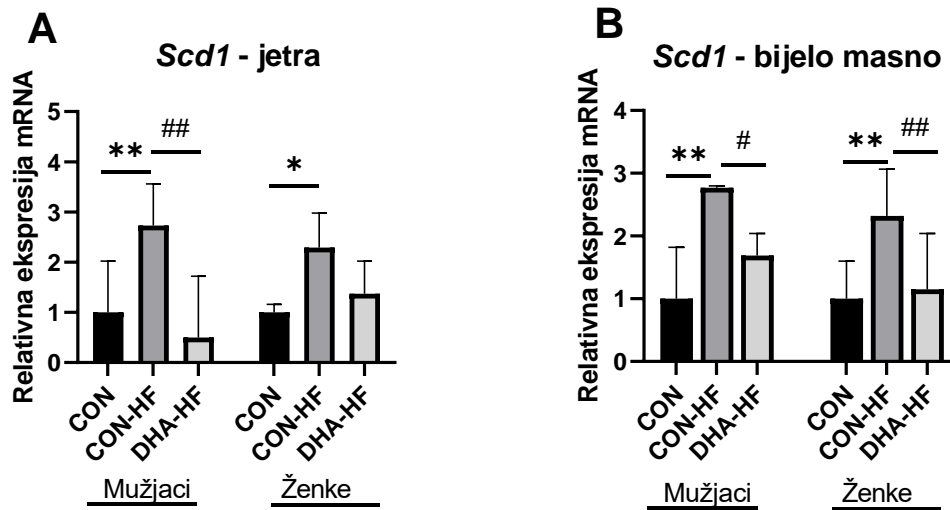
U skladu s povećanom razinom triacilglicerola u serumu i povećanom ekspresijom transkripcijskog faktora *Srebp-1c* u tkivu jetre, dodatak 15 % fruktoze u vodi također je značajno povećao ekspresiju gena koji kodiraju ključne enzime uključene u sintezu masnih kiselina (*Acc1*, *Fasn*, $P < 0,05$). Nasuprot tome hrana s dodatkom DHA pokazuje tendenciju smanjivanja ekspresije navedenih gena, posebice u ženki ($P < 0,01$ za *Acc1* i *Fasn*), što upućuje na djelomičnu normalizaciju lipogenog odgovora (slika 22A i 22B)



Slika 22. Utjecaj hranidbenog tretmana na ekspresiju gena *Acc1* (A) i *Fasn* (B).

CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 7, DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 1. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti ** $P < 0,01$ za skupine CON-HF i DHA-HF u odnosu na skupinu CON i ## $P < 0,01$ za skupinu DHA-HF u odnosu na skupinu CON-HF.

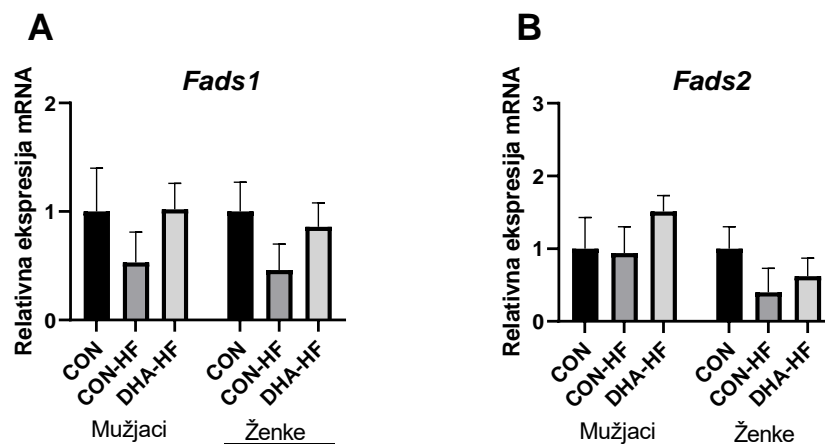
U oba spola dodatak fruktoze izaziva snažno povećanje ekspresije *Scd1* ($P < 0,01$ za oba spola u jetri), dok je u skupini DHA-HF ekspresija značajno smanjena u odnosu na skupinu CON-HF ($P < 0,01$ mužjaci). U bijelom masnom tkivu obrazac je vrlo sličan onome u jetri, fruktoza snažno inducira *Scd1* ($P < 0,01$), dok dodatak DHA/EPA-e ublažava taj porast ($P < 0,05$ mužjaci, $P < 0,01$ ženke) u odnosu na skupinu CON-HF (slika 23A i 23B).



Slika 23. Utjecaj hranidbenog tretmana na ekspresiju gena *Scd1* u jetri (A) i bijelom masnom tkivu (B).

CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 7, DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 1. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ za skupine CON-HF i DHA-HF u odnosu na skupinu CON i # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ za skupinu DHA-HF u odnosu na skupinu CON-HF.

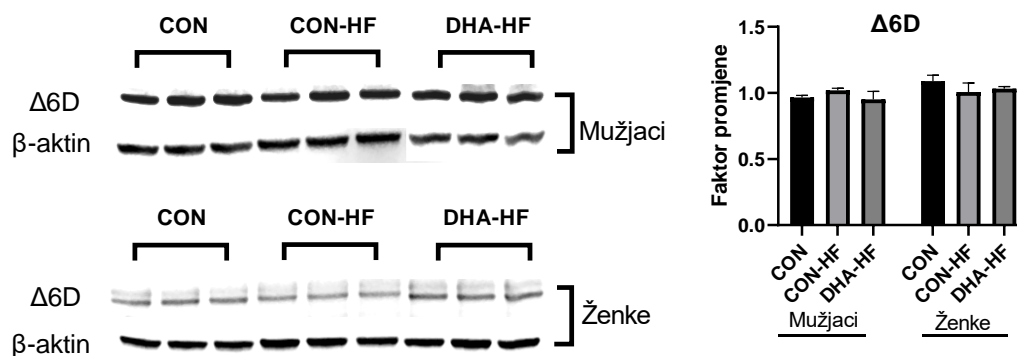
Ekspresija gena *Fads1* i *Fads2*, koji kodiraju za $\Delta 5$ i $\Delta 6$ desaturaze, nije se značajno promijenila u eksperimentalnim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu (slika 24A i 24B). Vidljiva je tendencija smanjenja ekspresije i *Fads1* i *Fads2* u skupini CON-HF u odnosu na kontrolnu, te povećanje ekspresije u skupini DHA-HF za oba spola i oba gena, na vrijednosti sličnim kontrolnima.



Slika 24. Utjecaj hranidbenog tretmana na ekspresiju gena *Fads1* (A) i *Fads2* (B).

CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 7, DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 1. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika nije utvrđena između ispitivanih skupina.

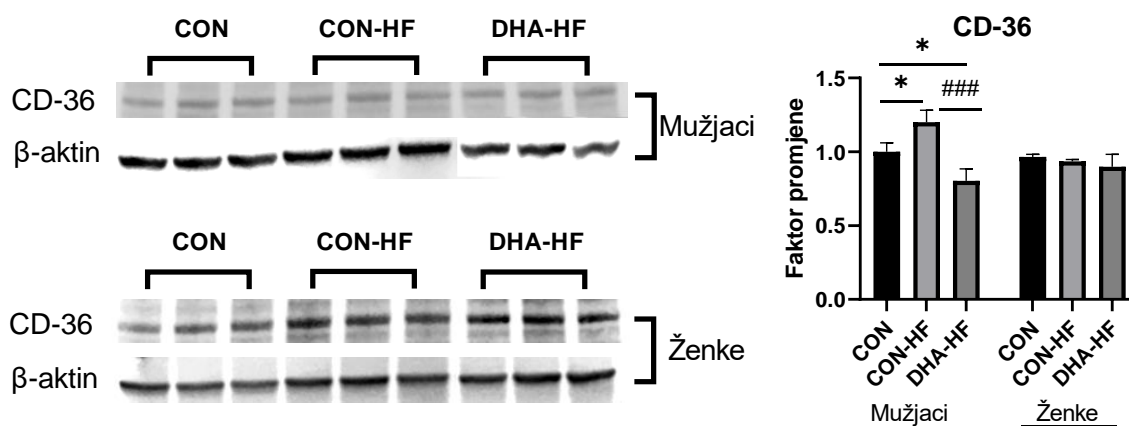
U prilog tome, ekspresija proteina $\Delta 6$ desaturaze, ispitana metodom Western blot, također se nije značajno promijenila u ispitivanim skupina, ali postoji sličan obrazac, posebice u ženki (slika 25). Rezultati pokazuju da ni hrana bogata fruktozom ni suplementacija DHA ne utječu značajno na ekspresiju navedenih gena i proteina uključenih u desaturaciju masnih kiselina.



Slika 25. Utjecaj hranidbenog tretmana na ekspresiju proteina $\Delta 6D$.

CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 7, DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 1. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika nije utvrđena između ispitivanih skupina.

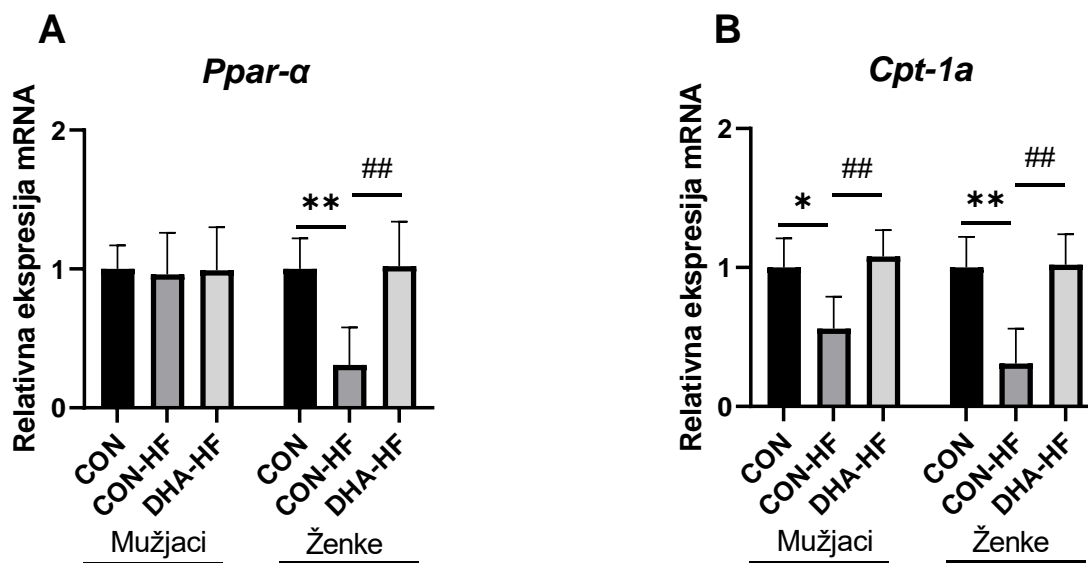
Ekspresija transmembranskog proteina CD-36, pod utjecajem hranidbenog tretmana, značajno se promijenila u mužjaka u ispitivanim skupina ($P < 0,05$) u odnosu na CON, dok u ženki nije bilo statistički značajne razlike između skupina (slika 26). U mužjaka je dodatak DHA smanjio ekspresiju CD-36 u odnosu na obje kontrolne skupine, dovodeći vrijednosti ispod razina zabilježenih u skupini tretiranoj fruktozom ($P < 0,005$), a ujedno i ispod kontrolnih vrijednosti ($P < 0,05$). U ženki u skupini DHA-HF vidljiva je tendencija smanjenja ekspresije CD-36 u odnosu na skupine CON i CON-HF.



Slika 26. Utjecaj hranidbenog tretmana na ekspresiju proteina CD-36.

CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 7, DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 1. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti * $P < 0,05$ za skupine CON-HF i DHA-HF u odnosu na skupinu CON i ### $P < 0,005$ za skupinu DHA-HF u odnosu na skupinu CON-HF.

Na slici 27 prikazana je relativna ekspresija gena *Ppar- α* i njegova ciljnog gena *Cpt-1a* u jetri mužjaka i ženki nakon različitih hranidbenih tretmana. U mužjaka nema značajnih promjena u ispitivanim skupinama, dok je u ženki primjena fruktoze (CON-HF) dovela do značajnog smanjenja ekspresije *Ppar- α* u odnosu na kontrolnu skupinu ($P < 0,01$). U skupini koja je, uz fruktozu, primala i DHA i EPA (DHA-HF), zabilježeno je značajno povećanje ekspresije obaju gena (*Ppar- α* i *Cpt-1a* – $P < 0,01$) u odnosu na skupinu CON-HF, pri čemu su vrijednosti približene onima u kontrolnoj skupini.



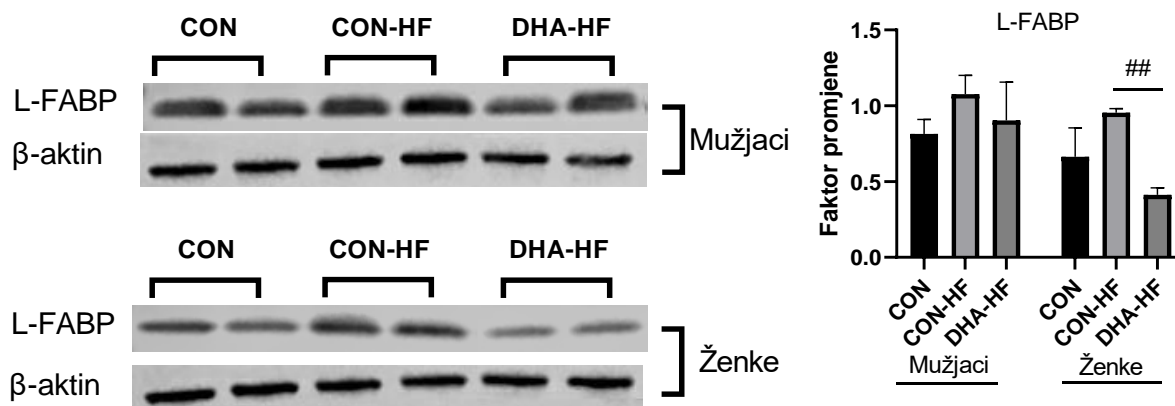
Slika 27. Utjecaj hranidbenog tretmana na ekspresiju transkripcijskog faktora *Ppar-α* (A) i *Cpt-1a* (B) u tkivu jetre.

CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 7, DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 1. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti * $P < 0,05$ i ** $P < 0,01$ za skupine CON-HF i DHA-HF u odnosu na skupinu CON i ## $P < 0,01$ za skupinu DHA-HF u odnosu na skupinu CON-HF.

U mužjaka je primjena fruktoze (CON-HF) dovela do povećanja ekspresije L-FABP-a u odnosu na kontrolnu skupinu, ali ta promjena nije bila statistički značajna. U skupini koja je primala fruktozu uz dodatak DHA (DHA-HF), vrijednost L-FABP-a ostala je na sličnoj razini kao u skupini CON-HF, što pokazuje da dodatak DHA nije imao značajan učinak na ekspresiju ovoga proteina kod mužjaka. Međutim u ženki je primjena fruktoze (CON-HF) također dovela do povećanja ekspresije L-FABP-a u odnosu na kontrolnu skupinu. U skupini koja je uz fruktozu primala DHA (DHA-HF), ekspresija L-FABP bila je značajno smanjena u odnosu na skupinu CON-HF ($P < 0,01$), vraćajući vrijednosti bliže onima u kontrolnoj skupini (slika 28).

Ovi rezultati upućuju na to da fruktoza potiče povećanje ekspresije L-FABP-a, osobito u ženki, dok je dodatak DHA pokazao supresivni učinak na ekspresiju ovog proteina samo u ženki. U mužjaka DHA nema značajan utjecaj. Uočene razlike između mužjaka i ženki naglašavaju

postojanje spolno specifičnih mehanizama regulacije metabolizma masnih kiselina putem puta L-FABP.



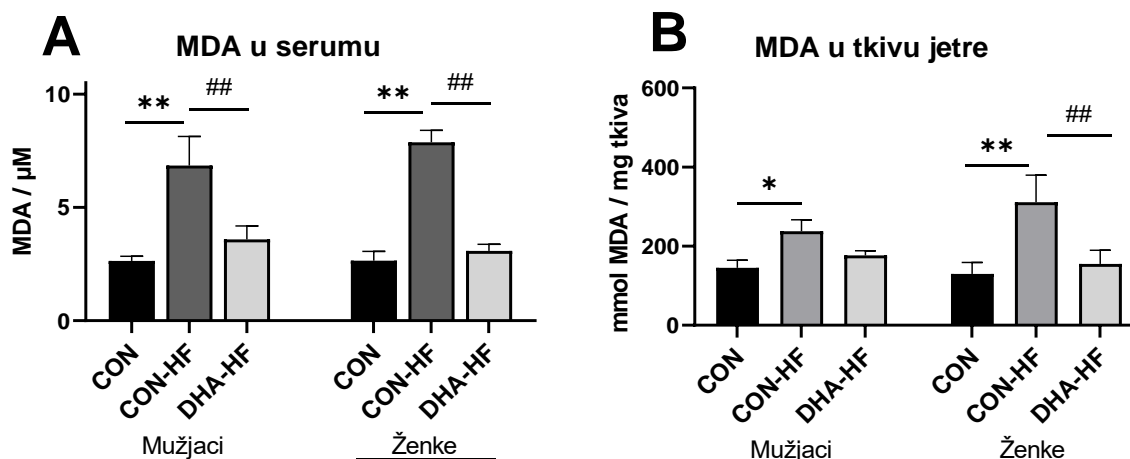
Slika 28. Utjecaj hranidbenog tretmana na ekspresiju proteina L-FABP

CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 7, DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 1. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti ## $P < 0,01$ za skupinu DHA-HF u odnosu na skupinu CON-HF.

4.3. Učinak dodataka DHA i EPA-e na oksidacijski i upalni odgovor

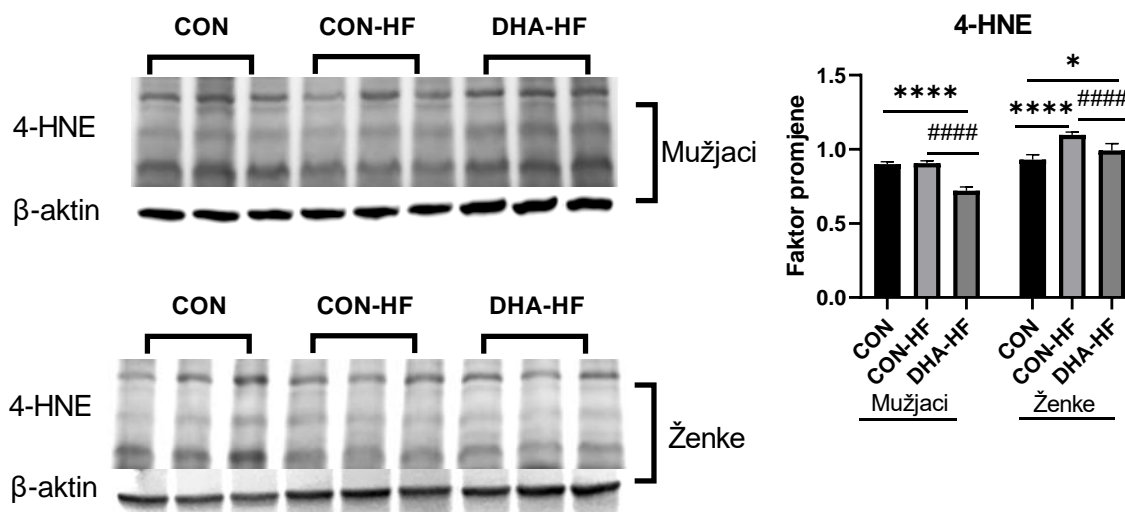
4.3.1. Markeri lipidne peroksidacije i oksidacijskog stresa

Kao marker oksidacijskog stresa analizirana je koncentracija malondialdehida (MDA) u serumu i u tkivu jetre (slika 29A i 29B). U skupini CON-HF zabilježen je značajan porast MDA u serumu u odnosu na kontrolnu skupinu ($P < 0,01$), pri čemu je učinak bio prisutan u oba spola. Suplementacija DHA/EPA (DHA-HF) značajno je smanjila koncentraciju MDA u serumu u mužjaka i ženki ($P < 0,01$), gotovo do vrijednosti zabilježenih u kontrolnoj skupini. Sličan je obrazac uočen i u jetri, gdje je prehrana obogaćena fruktozom dovela do povećanja koncentracije MDA u oba spola, s izraženijim porastom u ženki ($P < 0,05$; $P < 0,01$). Dodatak DHA/EPA rezultirao je smanjenjem koncentracije MDA u jetri. U mužjaka je uočen trend smanjenja koji nije dosegnuo statističku značajnost, dok je u ženki smanjenje bilo statistički značajno ($P < 0,01$).



Slika 29. Utjecaj hranidbenog tretmana na peroksidaciju lipida u serumu (A) i tkivu jetre (B). CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 7, DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 1. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti * $P < 0,05$ ili ** $P < 0,01$ za skupine CON-HF i DHA-HF u odnosu na skupinu CON i ## $P < 0,01$ za skupinu DHA-HF u odnosu na skupinu CON-HF.

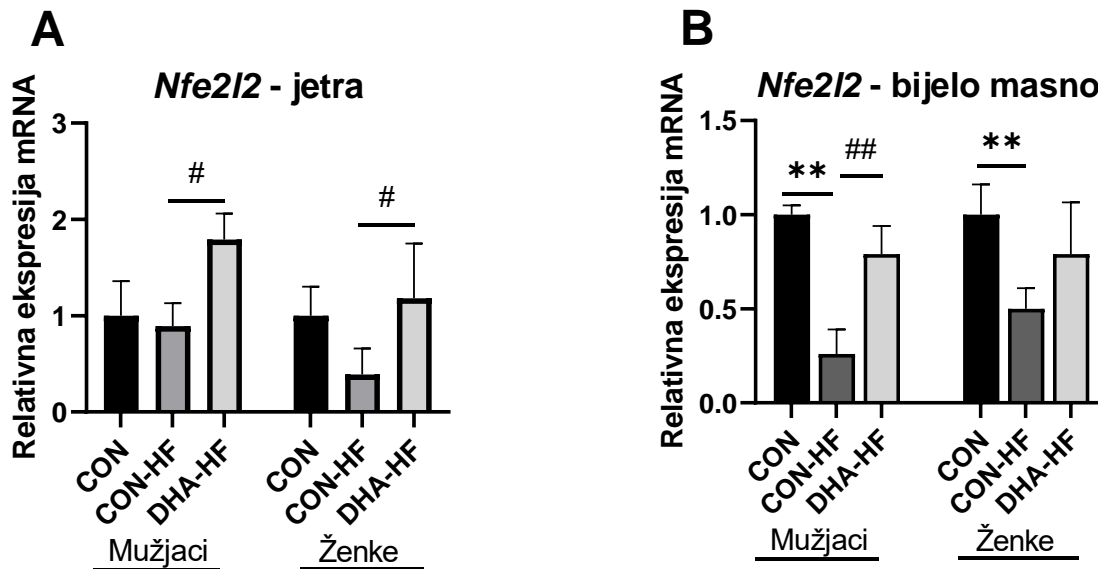
Na slici 30 prikazana je ekspresija proteina 4-hidroksi-2-nonenala (4-HNE) u jetri mužjaka i ženki nakon hranidbenih tretmana. U ženki u skupini CON-HF zabilježeno je značajno povećanje ekspresije 4-HNE-a u odnosu na kontrolnu skupinu ($P < 0,001$), što upućuje na pojačanu lipidnu peroksidaciju i oksidacijski stres u jetri. Dodatak DHA/EPA rezultirao je značajnim smanjenjem razine 4-HNE-a u odnosu na CON-HF ($P < 0,001$), vraćajući vrijednosti bliže kontrolnim razinama. U mužjaka u skupini CON-HF također je uočen porast 4-HNE-a u usporedbi sa skupinom CON. U skupini DHA-HF ekspresija proteina 4-HNE-a bila je značajno smanjena u odnosu na skupinu CON-HF ($P < 0,001$), no vrijednosti su ostale nešto niže u odnosu na kontrolne.



Slika 30. Utjecaj hranidbenog tretmana na ekspresiju proteina 4-HNE.

CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 7, DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 1. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti * $P < 0,05$, i **** $P < 0,001$ za skupine CON-HF i DHA-HF u odnosu na skupinu CON i ##### $P < 0,001$ za skupinu DHA-HF u odnosu na skupinu CON-HF.

Kako bi se dobio uvid u zaštitni učinak n-3 masnih kiselina u štakora hranjenih s 15 % fruktoze, promatran je njihov učinak na ekspresiju gena *Nfe2l2* i *Chop* te proteina NRF2 i 4-HNE. U skladu s povećanom peroksidacijom lipida u jetri, hrana s 15 % fruktoze u vodi suprimira ekspresiju transkripcijskog faktora *Nfe2l2* u oba tkiva i u oba spola (slika 31A i 31B). S druge strane, DHA i EPA suplementacija pokazuje protektivni učinak, sa značajnim povećanjem u odnosu na skupinu CON-HF ($P < 0,05$ u jetri u oba spola), vraćajući vrijednosti sličnima kontrolnoj skupini.

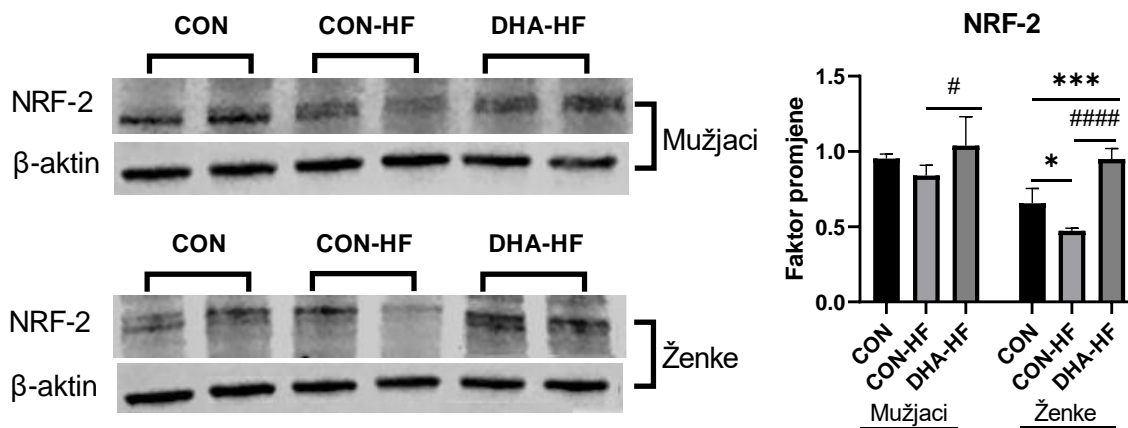


Slika 31. Utjecaj hranidbenog tretmana na ekspresiju gena *Nfe2l2* u jetri (A) i bijelom masnom tkivu (B).

CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 7, DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 1. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti ** $P < 0,01$ za skupine CON-HF i DHA-HF u odnosu na skupinu CON i # $P < 0,05$ i ## $P < 0,01$ za skupinu DHA-HF u odnosu na skupinu CON-HF.

Rezultati ekspresije mRNA u bijelom masnom tkivu pokazuju značajno smanjenje *Nfe2l2* u skupini CON-HF u odnosu na skupinu CON ($P < 0,01$ za oba spola), dok u skupini DHA-HF pokazuju trend povećanja ekspresije i vraćanje vrijednostima sličnima kontrolnoj skupini. Povećanje ekspresije značajno je u mužjaka u skupini DHA-HF u odnosu na skupinu CON-HF ($P < 0,01$).

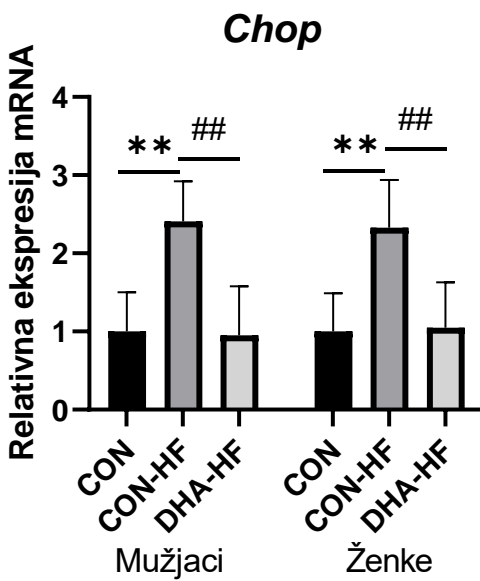
Dodatna potvrda dobivena je ekspresijom proteina NRF-2 metodom Western Blot (slika 32). U skupini CON-HF u ženki zabilježen je značajan pad ekspresije NRF-2 u odnosu na kontrolnu skupinu ($P < 0,05$), što upućuje na smanjenu aktivaciju antioksidacijskih mehanizama u jetri, a u mužjaka postoji trend smanjivanja ekspresije. Dodatak n-3 masnih kiselina (DHA-HF) doveo je do značajnog porasta proteina NRF-2 u odnosu na skupinu CON-HF vraćajući vrijednosti gotovo na kontrolnu razinu ($P < 0,05$ mužjaci, $P < 0,001$ ženke).



Slika 32. Utjecaj hranidbenog tretmana na ekspresiju proteina NRF-2.

CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 7, DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 1. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti * $P < 0,05$ i *** $P < 0,005$ za skupine CON-HF i DHA-HF u odnosu na skupinu CON i # $P < 0,05$ i ##### $P < 0,001$ za skupinu DHA-HF u odnosu na skupinu CON-HF.

Na slici 33 prikazana je ekspresija gena *Chop* u jetri nakon različitog hranidbenog tretmana. U skupini CON-HF zabilježeno je značajno povećanje ekspresije gena *Chop* u odnosu na kontrolnu skupinu i u mužjaka ($P < 0,01$) i u ženki ($P < 0,01$). U skupini koja je, uz fruktozu, primala DHA i EPA (DHA-HF), ekspresija gena *Chop* bila je značajno smanjena u odnosu na CON-HF, u oba spola ($P < 0,01$), vraćajući vrijednosti bliže kontrolnim razinama.

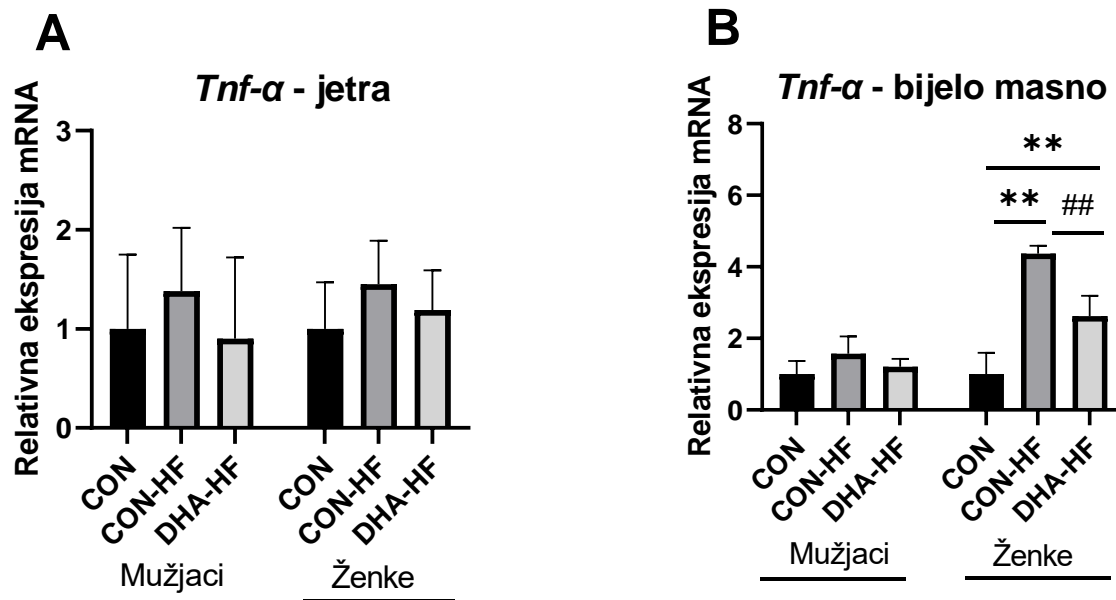


Slika 33. Utjecaj hranidbenog tretmana na ekspresiju gena *Chop* u jetri.

CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 7, DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 1. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti $** P < 0,01$ za skupine CON-HF i DHA-HF u odnosu na skupinu CON i $## P < 0,01$ za skupinu DHA-HF u odnosu na skupinu CON-HF.

4.3.2. Ekspresije upalnih gena i proteina u jetri i bijelom masnom tkivu

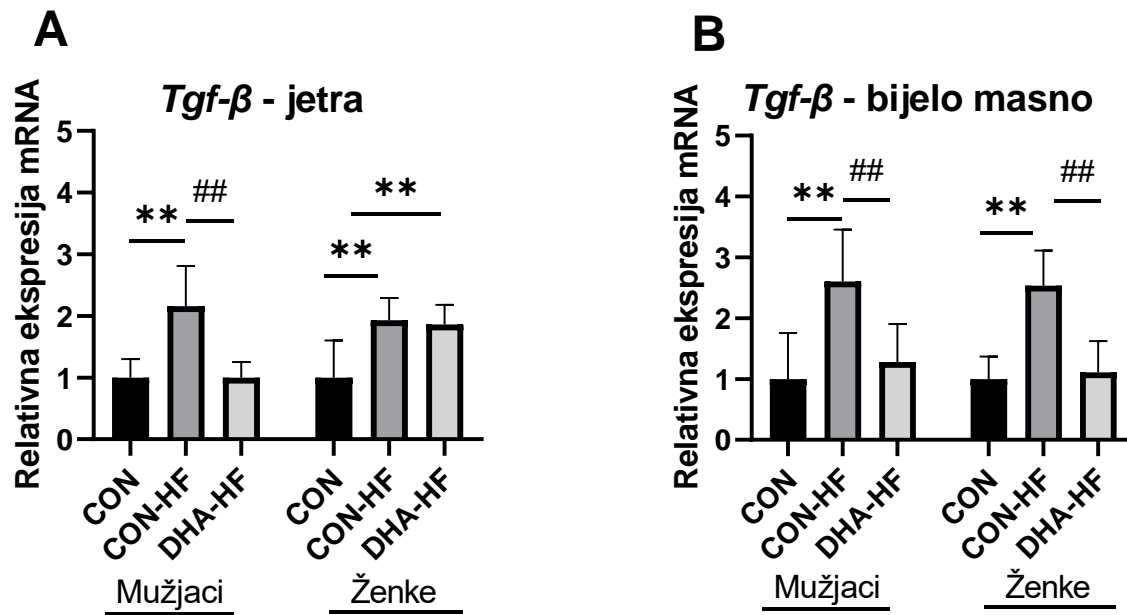
Na slici 34 prikazana je ekspresija gena *Tnf- α* u jetri (A) i bijelom masnom tkivu (B) mužjaka i ženki nakon različitih hranidbenih tretmana. Ni u jetri ni u bijelom masnom tkivu mužjaka nije došlo do značajnih promjena, što pokazuje da hranidbeni tretmani nemaju izražen učinak na razinu *Tnf- α* . Međutim, u bijelom masnom tkivu (B) uočene su izraženije promjene u ženki. U skupini CON-HF zabilježeno je značajno povećanje ekspresije *Tnf- α* u odnosu na kontrolnu skupinu ($P < 0,01$), što upućuje na pojačanu aktivaciju upalnog odgovora zbog visokog unosa fruktoze. Dodatak DHA i EPA-e značajno je smanjio ekspresiju *Tnf- α* u odnosu na skupinu CON-HF ($P < 0,01$), vraćajući vrijednosti prema razini kontrolne skupine. DHA/EPA suplementacija pokazuje protektivni učinak u ženki, smanjujući povećanje ekspresije *Tnf- α* uzrokovano fruktozom, dok u mužjaka nema značajan utjecaj.



Slika 34. Utjecaj hranidbenog tretmana na ekspresiju gena *Tnf-α* u jetri (A) i bijelom masnom tkivu (B).

CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 7, DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 1. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti ** $P < 0,01$ za skupine CON-HF i DHA-HF u odnosu na skupine CON i ## $P < 0,01$ za skupine DHA-HF u odnosu na skupinu CON-HF.

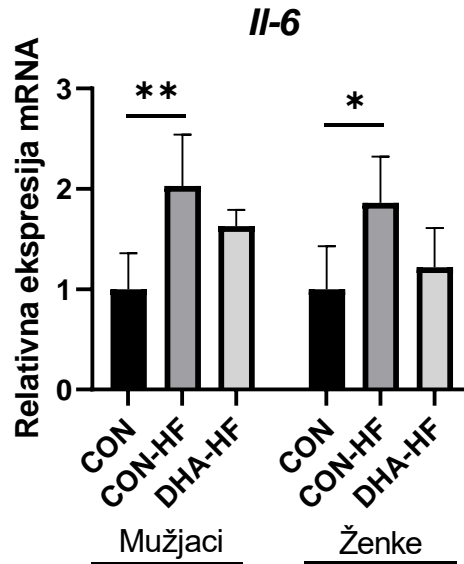
Na slici 35 prikazana je ekspresija *Tgf-β* u jetri (A) i bijelom masnom tkivu (B). I u mužjaka i u ženki primjena fruktoze dovodi do značajnog povećanja ekspresije *Tgf-β* i u jetri i u bijelom masnom tkivu ($P < 0,01$ za oba spola i oba tkiva). Dodatak DHA i EPA-e (DHA-HF) doveo je do značajnog smanjenja ekspresije u odnosu na skupinu CON-HF u mužjaka u tkivu jetre ($P < 0,01$), dok u ženki nije bilo značajne razlike. U bijelim masnom tkivu dodatak n-3 masnih kiselina doveo je do značajnog smanjenja ekspresije *Tgf-β* u oba spola ($P < 0,01$), vraćajući vrijednosti na razinu blisku kontrolnoj skupini.



Slika 35. Utjecaj hranidbenog tretmana na ekspresiju gena *Tgf-β* u jetri (A) i bijelom masnom tkivu (B).

CON – kontrolna skupina, CON-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 7, DHA-HF pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 1. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti ** $P < 0,01$ za skupine CON-HF i DHA-HF u odnosu na skupinu CON i ## $P < 0,01$ za skupinu DHA-HF u odnosu na skupinu CON-HF.

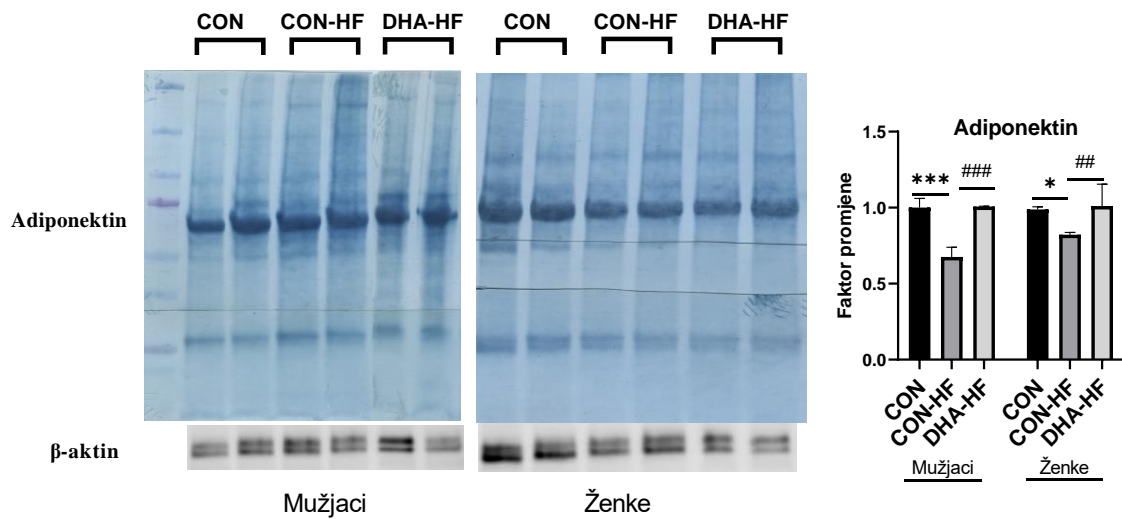
Na slici 36 prikazan je utjecaj hranidbenog tretmana na interleukin 6. I u mužjaka i u ženki primjena fruktoze (CON-HF) dovela je do značajnog povećanja ekspresije *Il-6* u odnosu na kontrolnu skupinu, ($P < 0,01$ u mužjaka, $P < 0,05$ u ženki), što upućuje na pojačanu aktivaciju upalnog odgovora u jetri. Dodatak n-3 masnih kiselina (DHA-HF) doveo je do smanjenja ekspresije *Il-6* u odnosu na skupinu CON-HF, no razlika nije bila statistički značajna.



Slika 36. Utjecaj hranidbenog tretmana na ekspresiju gena *Il-6* u jetri.

CON – kontrolna skupina, *CON-HF* pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 7, *DHA-HF* pokusna skupina s 15 % fruktoze u vodi i omjerom masnih kiselina n-6/n-3 = 1. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ za skupinu *CON-HF* i skupinu *DHA-HF* u odnosu na skupinu *CON*.

Utjecaj hranidbenog tretmana jasno je vidljiv i u ekspresiji proteina adiponektina u bijelom masnom tkivu (slika 37). U oba je spola primjena fruktoze (*CON-HF*) dovela do značajnog smanjenja ekspresije adiponektina u odnosu na kontrolnu skupinu ($P < 0,005$ mužjaci, $P < 0,05$ ženke), što upućuje na poremećaj u regulaciji metabolizma masnog tkiva izazvan visokim unosom fruktoze. U skupini koja je, uz fruktozu, primala DHA i EPA (*DHA-HF*), zabilježeno je značajno povećanje ekspresije adiponektina u odnosu na skupinu *CON-HF* ($P < 0,005$ mužjaci, $P < 0,01$ ženke), a vrijednosti su bile usporedive s onima u kontrolnoj skupini.



Slika 37. Utjecaj hranidbenog tretmana na ekspresiju proteina adiponektina u bijelom masnom tkivu.

Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Statistički značajna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti * $P < 0,05$, i *** $P < 0,005$ za skupine CON-HF i DHA-HF u odnosu na skupinu CON i ## $P < 0,01$ i ### $P < 0,005$ za skupinu DHA-HF u odnosu na skupinu CON-HF.

5.RASPRAVA

Uspostava i potvrda metaboličkog sindroma

Za induciranje metaboličkog sindroma (MetSyn) u glodavaca najčešće se primjenjuju prehrambene intervencije, genetske modifikacije ili farmakološki pristupi, pri čemu su najčešći životinjski modeli štakori i miševi. Prehrambeni modeli obično uključuju hranu obogaćenu saharozom (73), fruktozom (74, 75), mastima (76, 77) ili njihovim kombinacijama (78).

Fruktozom inducirani MetSyn može se postići hranom s visokim udjelom fruktoze (60 %) (34) ili dodavanjem fruktoze u vodu za piće u koncentracijama od približno 10 – 20 % (79, 80, 81, 82). U ovom istraživanju primijenjen je model u kojem su štakori dobivali vodu s dodatkom 15 % fruktoze.

Glavni cilj bio je ispitati može li suplementacija DHA/EPA-om modulirati razvoj i napredovanje metaboličkog sindroma te razlikuju li se odgovori između spolova.

Dosadašnja istraživanja pokazuju da prehrana bogata fruktozom dovodi do inzulinske rezistencije, hipertenzije, prekomjerne tjelesne mase, dislipidemije i povišenih vrijednosti glukoze natašte (83), premda stanični i molekularni mehanizmi tih učinaka još nisu u potpunosti razjašnjeni (84).

U istraživanjima provedenima na mužjacima Wistar štakora značajne metaboličke promjene zabilježene su već nakon osam tjedana izloženosti fruktozi (80, 81), dok su neka istraživanja pokazala porast glukoze natašte tek nakon duljeg razdoblja i viših koncentracija fruktoze (82).

U ovom radu primjena 15 %-tne fruktoze tijekom 20 tjedana nije značajno utjecala na koncentraciju glukoze u serumu, ali je dovela do povećanih vrijednosti inzulina natašte, što je karakteristično za rane faze poremećaja funkcije β -stanica.

Hiperinzulinemija, uz održane vrijednosti glukoze, česta je u početnim fazama razvoja pretilosti i metaboličkog sindroma (34, 84).

Mjereni indeksi inzulinske osjetljivosti pokazali su da je HOMA-IR bio povišen, a QUICKI snižen u svim skupinama tretiranim fruktozom, neovisno o spolu. Iako ovi indeksi nisu zamjena za

izravno mjerenje inzulinske osjetljivosti, koriste se kao prihvatljiva i pouzdana alternativa u pretkliničkim i kliničkim istraživanjima.(85).

Na izraženost promjena inzulinske osjetljivosti mogu utjecati trajanje izloženosti, količina fruktoze, sastav osnovne hrane te metabolička obilježja životinja (86). Istodobno su zabilježeni i poremećaji lipidnog metabolizma (hipertrigliceridemija, povišeni kolesterol i nakupljanje triacilglicerola u jetri), čime je potvrđeno da primijenjeni model fruktozom inducirano metaboličkog sindroma pouzdano inducira ključna obilježja metaboličkog sindroma.

Učinak dodataka DHA i EPA-e na metabolizam lipida

Kronični unos 15 %-tne fruktoze doveo je do izraženih poremećaja lipidnog metabolizma unatoč izostanku statistički značajnih promjena u tjelesnoj masi. Ovakvi poremećaji u metabolizmu lipida proizlaze iz specifičnog načina metaboliziranja fruktoze u odnosu na glukozu.

Za razliku od glukoze koja ulazi u hepatocite putem mehanizama ovisnih o inzulinu, fruktoza se metabolizira gotovo isključivo u jetri, preko fruktokinaze i aldolaze B. Ovaj proces zaobilazi regulacijski korak fosfofruktokinaze u glikolizi, što dovodi do nekontrolirane sinteze acetyl-CoA i glicerol-3-fosfata. Ovi supstrati potiču *de novo* lipogenezu (DNL), esterifikaciju triacilglicerola i pohranu lipida u hepatocitima (87).

U skupinama koje su primale fruktozu, uočena hipertrigliceridemija, hiperkolesterolemija i povećano nakupljanje triacilglicerola u jetri upućuju na snažnu aktivaciju hepatične lipogeneze (88). Ovaj rezultat u potpunosti je u skladu s prethodnim radovima koji pokazuju da dugotrajna izloženost fruktozi dovodi do povećanog stvaranja acetyl-CoA, poticanja lipogeneze i progresije metaboličkih poremećaja, uključujući inzulinsku rezistenciju i nealkoholnu masnu bolest jetre (89). Međutim, u skupinama koje su uz fruktozu primale dodatak DHA i EPA-e zabilježen je znatno povoljniji metabolički profil, uz smanjenu akumulaciju lipida i blaže izražene poremećaje u usporedbi s fruktoznim skupinama bez dodataka, što upućuje na izražen zaštitni učinak n-3 višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA) na fruktozom inducirano DNL-om. Ovakav učinak u skladu je s rezultatima drugih istraživanja (90, 91).

Promjene u sastavu masnih kiselina zabilježene u jetri i bijelom masnom tkivu dodatno su potvrdile aktivaciju lipogenih puteva. U fruktoznim skupinama zabilježene su povišene koncentracije mononezasićenih masnih kiselina (MUFA), osobito palmitoleinske (C16:1n-7) i oleinske kiseline (C18:1n-9). Istodobno su bile snižene vrijednosti višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA), uključujući linolnu, α -linolensku, arahidonsku i eikozapentaensku kiselinu.

Ovakav obrazac karakterističan je za metaboličke modele u kojima je aktivirana stearoil-CoA-desaturaza 1 (*Scd1*), enzim odgovoran za pretvorbu zasićenih masnih kiselina u MUFA. Fruktaza je snažan induktor *Scd1* i povećava njezinu ekspresiju putem *Srebp-1c*, što objašnjava naglašeni porast MUFA-e u jetri i bijelom masnom tkivu u ovom istraživanju (92). Nasuprot tome, u DHA-HF skupini ženki porast MUFA-e bio je blaže izražen, uz očuvanje većeg udjela PUFA-e, što upućuje na djelomičnu inhibiciju *Scd1* i smanjenu aktivaciju lipogenih puteva pod utjecajem DHA i EPA (91, 93).

Smanjene koncentracije PUFA-e upućuju na poremećaje u endogenoj sintezi dugolančanih n-3 i n-6 masnih kiselina. U tom procesu ključnu ulogu imaju desaturirani enzimi $\Delta 5$ - i $\Delta 6$ -desaturaza, kodirani genima *Fads1* i *Fads2* (94). *Fads2* katalizira početni i ograničavajući korak pretvorbe LA i ALA u njihove dugolančane derivate, dok *Fads1* omogućuje stvaranje ARA i EPA iz intermedijarnih supstrata. Pokazano je da fruktoza mijenja ekspresiju gena uključenih u biosintezu PUFA-e (uključujući *Fads1* i *Fads2*), pri čemu se u pojedinim modelima bilježi narušena konverzija prekursora u EPA-u i DHA te snižen omjer EPA/ARA (95).

Iako ekspresija *Fads1* i *Fads2* nije pokazala statistički značajne promjene, uočen trend smanjene ekspresije u fruktoznim skupinama u skladu je s padom omjera PUFA-e i EPA/ARA te može upućivati na funkcionalno narušenu konverziju prekursora. Kako je ARA osnova za stvaranje proupalnih eikozanoida, a EPA i DHA za protuupalne derivate, snižen omjer EPA/ARA, u skupinama s 15 % fruktoze u vodi, odražava jasno izražen pomak prema proupalnom fenotipu koji pogoduje razvoju inzulinske rezistencije, oksidacijskog stresa i hepatosteatoze (96).

Poremećaji u profilu masnih kiselina dodatno su pojačani promjenama u unosu i intracelularnom transportu lipida. U ovom radu utvrđeno je povećanje ekspresije proteina CD-36 (osobito u mužjaka), jednog od glavnih transportera dugolančanih slobodnih masnih kiselina (FFA).

Prekomjerna ekspresija CD-36 povezuje se s razvojem lipotoksičnosti i progresijom masne jetre (97).

Budući da CD-36 može biti induciran hiperinzulinemijom te pozitivno reguliran preko *Ppar-α*, hiperinzulinemija izazvana fruktozom i poremećena regulacija *Ppar-α* vjerojatno su pridonijeli njegovoj povećanoj ekspresiji (98). U ovom modelu važnu ulogu ima i protein L-FABP (engl. *liver fatty acid binding protein*), intracelularni nosač masnih kiselina koji povećava transport i usmjeravanje FFA unutar hepatocita. U uvjetima povećanog priljeva masnih kiselina, uključujući porast CD-36 induciran fruktozom, povećana aktivnost L-FABP-a dodatno podupire nakupljanje lipida u hepatocitima, čime se pogoduje razvoju NAFLD-a.

U skupinama koje su uz fruktozu dobivale DHA i EPA-u (DHA-HF), većina navedenih promjena bila je znatno blaže izražena. Dodatak n-3 PUFA-e očuvao je višu razinu PUFA-e, uključujući LA, ALA-u i EPA-u, te poboljšao omjer EPA/ARA, čime je ublažen proupalni pomak u metabolizmu masnih kiselina. Porast MUFA-e bio je manje izražen nego u fruktoznim skupinama, što upućuje na djelomičnu inhibiciju *Scd1*. DHA i EPA, kao gotove dugolančane PUFA-e, mogu djelomično nadoknaditi smanjenu aktivnost sustava FADS. Istodobno inhibiraju *Srebp-1c* i smanjuju ekspresiju lipogenih enzima *Acc1*, *Fasn* i *Scd1* (99, 100).

Smanjena aktivnost lipogenih enzima *Acc1*, *Fasn*, *Scd1* izravno je pridonijela nižoj stopi stvaranja novosintetiziranih masnih kiselina, čime je smanjena dostupnost lipogenih supstrata i značajno ublažen razvoj hepatične steatoze. Povoljan učinak PUFA vidljiv je i u regulaciji unosa masnih kiselina, budući da su DHA i EPA smanjile prekomjernu ekspresiju proteina CD-36, s izraženim učinkom u mužjaka. Supresivni učinak DHA/EPA-e na L-FABP prisutan je samo u ženki. Ovi rezultati u skladu su s literaturom koja opisuje da n-3 PUFA-e mogu modulirati unos masnih kiselina i smanjiti lipotoksičnost (101).

Regulacija oksidacije masnih kiselina dodatno potvrđuje povoljan učinak n-3 PUFA-e. Dodatak fruktoze u ovom je modelu smanjio ekspresiju *Ppar-α* i *Cpt-1*, što je u skladu s rezultatima Nagai i suradnika (102) koji su opisali smanjenu ekspresiju ovih gena u životinja hranjenih fruktozom. DHA i EPA, međutim, djeluju kao ligandi *Ppar-α* i mogu povećati njegovu aktivnost, čime potiču oksidaciju masnih kiselina i smanjuju njihovu akumulaciju u jetri. Slične rezultate opisali su

Neschen i suradnici (103), koji su utvrdili da n-3 PUFA-e povećavaju kapacitet β -oksidacije i normaliziraju sadržaj jetrenih triglicerida.

Učinak dodataka DHA i EPA-e na oksidacijski i upalni odgovor

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da kronični unos fruktoze ne narušava samo lipidni metabolizam nego i značajno povećava oksidacijski stres, što je ključni patofiziološki mehanizam u razvoju metaboličkog sindroma. Smatra se da neravnoteža prooksidansa/antioksidansa može imati važnu ulogu u njegovu razvoju (104). U fruktoznim skupinama zabilježene su povišene razine markera lipidne peroksidacije, malondialdehida (MDA) i 4-hidroksinonenala (4-HNE). Ovakav porast upućuje na pojačano stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i posljedično oksidacijsko oštećenje membranskih lipida (105, 106).

Ovi rezultati nadovezuju se na ranije opisanu aktivaciju lipogeneze i nakupljanje zasićenih i mononezasićenih masnih kiselina. Povećana dostupnost lipida dodatno pogoršava proizvodnju ROS-a i potiče oksidacijska oštećenja (107, 108).

Povišene razine 4-HNE-a u fruktoznim skupinama imaju veliku biološku važnost jer 4-HNE nije samo produkt lipidne peroksidacije nego i aktivni signalni posrednik. On može modificirati proteine inzulinskog signalnog puta te aktivirati *NF- κ B* i *Tgf- β* signalizaciju. Time 4-HNE povezuje oksidacijski stres s razvojem upale i inzulinske rezistencije (109, 110). Dobiveni podaci jasno pokazuju da su ti procesi bili aktivno prisutni u skupinama CON-HF.

Suprotno tome, u skupinama DHA–HF zabilježeno je značajno smanjenje koncentracija MDA i 4-HNE-a, što pokazuje da dodatak DHA i EPA-e učinkovito smanjuje lipidnu peroksidaciju (111). Ovaj učinak vjerojatno proizlazi iz dvaju mehanizama: ublažavanja lipogeneze inducirane fruktozom te povećane stabilnosti membrana zbog većeg udjela dugolančanih n-3 PUFA, koje su manje podložne oksidacijskim oštećenjima (100). Istodobno smanjenje razina 4-HNE-a sugerira prekid začaranog kruga u kojem lipidna peroksidacija potiče upalu, a upala dodatno povećava stvaranje ROS-a (112).

Promjene u peroksidacijskim markerima pratile su promjene u antioksidacijskim obrambenim mehanizmima. U našem modelu kronični unos fruktoze bio je povezan sa smanjenom ekspresijom *Nfe2l2*, što upućuje na iscrpljeni antioksidacijski odgovor. Gen *Nfe2l2* kodira za protein NRF2, ključni transkripcijski faktor endogenog antioksidacijskog sustava (113). Sniženje proteina NRF2 u uvjetima povećanog MDA i 4-HNE-a odražava iscrpljenost antioksidacijskog kapaciteta stanica, što pogoduje daljnjem oštećenju hepatocita.

Nasuprot tome, DHA i EPA značajno su povećale ekspresiju *Nfe2l2* i aktivaciju NRF2 u skupinama DHA-HF, što upućuje na aktivaciju antioksidacijskog odgovora. NRF2 aktivira ekspresiju niza antioksidacijskih enzima poput glutation-peroksidaze, superoksid-dismutaze i katalaze, čime štiti hepatocite od oštećenja posredovanih ROS-om (114).

Osim toga, smanjena ekspresija *Nfe2l2* u fruktoznim skupinama pogoduje aktivaciji upalnih puteva jer je poznato da NRF2 negativno regulira *NF-κB* signalizaciju (115). Time se potvrđuje da se u fruktoznim skupinama razvila samoodrživa interakcija između oksidacijskog stresa i upale, dok je u DHA-HF skupini taj ciklus prekinut aktivacijom NRF2, smanjenjem lipidne peroksidacije i smanjenom aktivacijom proupalnih signala.

Fruktoza je u fruktoznim skupinama potaknula i stres endoplazmatskog retikula (ER), što potvrđuje povećana ekspresija gena *Chop*, transkripcijskog faktora uključenog u apoptozu ovisnu o ER-u i razvoj inzulinske rezistencije (116, 117). Povišen *Chop* odražava preopterećenje ER-a zbog nakupljanja lipida i oksidacijskog oštećenja proteina (118). U skupinama DHA-HF ekspresija gena *Chop* bila je značajno niža, što upućuje na ublažen ER stres, vjerojatno posredovan poboljšanom osjetljivošću na inzulin, nižim 4-HNE-om i aktivacijom NRF2 (119)

Uz oksidacijski stres, kronični unos fruktoze u ovom istraživanju aktivirao je i izražen upalni odgovor karakterističan za rane stadije metaboličkog sindroma. U fruktoznim skupinama zabilježeno je povećanje ključnih proupalnih citokina, uključujući *Tnf-α*, *Il-6* i *Tgf-β*, što se podudara s povišenim 4-HNE-om i smanjenom ekspresijom NRF2, potvrđujući povezanost oksidacijskog stresa i upale(14, 17).

Povišen *Tnf- α* odražava pojačanu infiltraciju imunskih stanica i aktivaciju makrofaga, pri čemu *Tnf- α* dodatno pogoršava inzulinsku rezistenciju putem serinske fosforilacije IRS-1 i potiče lipolizu u masnom tkivu, povećavajući priljev masnih kiselina u jetru (120).

Interleukin 6 (Il-6), još jedan važan medijator kronične upale, bio je povišen u fruktoznim skupinama, što je u skladu s njegovom ulogom u poticanju hepatične inzulinske rezistencije i stvaranju akutnofaznih proteina, te dodatno destabilizira ravnotežu između lipogeneze i oksidacije (121).

Tgf- β , glavni profibrotični citokin, također je bio značajno povećan u fruktoznim skupinama, upućujući na to da fruktoza osim steatoze, potiče ranu fibrogenezu i progresiju NAFLD-a prema naprednijim stadijima (122).

Nasuprot tome, u skupinama DHA-HF razine *Tnf- α* , *Il-6* i *Tgf- β* bile su značajno niže, što upućuje na snažan protuupalni i antifibrotični učinak DHA i EPA-e. Ovaj se učinak može djelomično pripisati smanjenju oksidacijskog stresa, ali i modulaciji signalnih puteva poput NF- κ B, Ppar- γ i Tgf- β /SMAD, na koje n-3 PUFA-e dokazano djeluju (123, 124).

Za razliku od fruktoznih skupina, u skupinama DHA-HF zabilježeno je i povećanje adiponektina, što dodatno potvrđuje smanjenje upale i poboljšanje inzulinske osjetljivosti. Adiponektin potiče β -oksidaciju putem *Ppar- α* , smanjuje lipotoksičnost i inhibira upalu ovisnu o *Tnf- α* , što ga čini važnim zaštitnim čimbenikom (125, 126).

Lonzetti Bargut i suradnici, također su u svojem istraživanju prikazali utjecaj fruktoze kao i dodatak n-3 masnih kiselina na upalne markere (127). Slično našim rezultatima, pokazali su da prilikom unosa visokofruktozne hrane dolazi do razvoja upale bijelog masnog tkiva te izlučivanja povećane koncentracije proupalnih citokina, poput *Tnf- α* , te smanjenja koncentracije adiponektina.

Dodatak DHA i EPA-e u hranu štakora pokazao je smanjenje koncentracije proupalnih medijatora te povećanje protuupalnih medijatora, što dodatno potvrđuje ove rezultate. Iako sve promjene nisu bile statistički značajne, jasno je uočljiv trend poboljšanja, što potvrđuje da dodatak DHA i EPA-e može pozitivno utjecati na kroničnu upalu niskog stupnja čak i u ranom hiperinzulinemijskom stadiju metaboličkog sindroma.

Ključni mehanizam protuupalnog djelovanja n-3 masnih kiselina uključuje smanjenu sintezu proupalnih eikozanoida iz n-6 masne kiseline (arahidonske kiseline) (128) i povećanu sintezu protuupalnih eikozanoida koje potječu iz EPA-e i DHA (npr. resolvini, protektini, marezini) (129). Osim toga, DHA i EPA imaju i protuupalne učinke koji nisu izravno povezani s proizvodnjom eikozanoida, uključujući utjecaj na ekspresiju adhezijskih molekula na staničnoj površini, inhibiciju sinteze upalnih citokina i modulaciju ekspresije upalnih gena (119).

Suprotno našim istraživanjima, Almasri i suradnici u svom istraživanju nisu dobili značajne razlike u ekspresiji upalnih markera kod životinja hranjenih fruktozom (130). Razlog tome može biti u korištenju različitog soja životinja, trajanju i intenzitetu fruktoznog opterećenja.

Utjecaj spola

Iako u ovom radu nisu izravno određivane koncentracije spolnih hormona, opažene su značajne razlike između mužjaka i ženki. Pokazalo se da ženke imaju izraženiji odgovor na suplementaciju DHA/EPA-om, što je u skladu s opsežnom literaturom koja potvrđuje da spolni hormoni, posebice estrogen, mogu modulirati metabolizam lipida i utjecati na ekspresiju lipogenih gena i enzima (131). Ženke su često pokazivale izraženije promjene u sadržaju PUFA-e te različit odgovor na dodatak DHA i EPA-e u odnosu na mužjake.

Estrogen je poznat po svojoj ulozi u aktivaciji antioksidacijskih gena i očuvanju aktivnosti NRF2, što može objasniti bolju zaštitu kod ženki (132). Osim toga, ženke pokazuju bolju endogenu konverziju ALA-e u EPA-u i DHA putem delta-5 i delta-6 desaturaza (*Fads1* i *Fads2*), što dodatno poboljšava njihov n-3 PUFA status i posljedično protuupalne učinke (133).

Nasuprot tome, mužjaci su pokazali izraženiji razvoj metaboličkog sindroma nakon izlaganja fruktozi, uključujući veći porast upalnih markera, narušenu inzulinsku osjetljivost i povećanu inzulinsku rezistenciju. Ovi su rezultati u skladu s literaturom koja navodi da je niža razina testosterona u uvjetima metaboličkog stresa povezana s povećanim rizikom od inzulinske rezistencije, dislipidemije, nakupljanja visceralnog masnog tkiva i pretilosti trupa, tj. čimbenicima koji pridonose razvoju metaboličkog sindroma (134). Za razliku od estrogena, testosteron ne pruža snažnu zaštitu od dislipidemije, hiperinzulinemije i pretilosti (135, 136).

Spolne razlike postojale su i u regulaciji transportnih proteina. U mužjaka je DHA/EPA snažno smanjila ekspresiju CD-36, glavnog transportera dugolančanih masnih kiselina, što sugerira da njihova zaštitna adaptacija djeluje primarno na razini ograničavanja ulaska masnih kiselina u hepatocite. U ženki, međutim, DHA/EPA više utječe na intracelularno vezanje i preraspodjelu masnih kiselina preko L-FABP-a, što je u skladu s hormonskom regulacijom ovog proteina (131). Ove razlike pokazuju da se žene i muškarci koriste različitim, hormonski određenim strategijama za održavanje lipidne homeostaze.

Sveukupno, rezultati ovog istraživanja pokazuju da spolni hormoni imaju presudnu ulogu u određivanju metaboličkog odgovora na fruktozu i povećan unos n-3 masnih kiselina. Ženke, zahvaljujući snažnoj estrogenskoj i progesteronskoj signalizaciji, pokazuju veću metaboličku fleksibilnost, učinkovitiju regulaciju lipogeneze i oksidacije, jači antioksidacijski odgovor i povoljniji protuupalni profil. Mužjaci, zbog slabijeg estrogenskog signala, manjeg antioksidacijskog kapaciteta i veće osjetljivosti na upalu, razvijaju teži metabolički fenotip i slabije reagiraju na DHA/EPA-u. Ovakvi rezultati naglašavaju važnost uključivanja spola kao ključne biološke varijable u translacijskim i kliničkim istraživanjima metaboličkih poremećaja te sugeriraju da prehrabene intervencije temeljene na n-3 PUFA-i mogu imati različite učinke ovisno o hormonskom profilu pojedinca.

6. ZAKLJUČCI

- Kronični unos fruktoze u koncentraciji od 15 % u vodi za piće doveo je do razvoja ranih metaboličkih poremećaja koji predstavljaju početne faze metaboličkog sindroma, neovisno o promjenama tjelesne mase.
- Najizraženija metabolička promjena bila je pojava hiperinzulinemije uz očuvane vrijednosti glukoze u krvi, što upućuje na smanjenu osjetljivost perifernih tkiva na inzulin i poremećenu funkciju β -stanica. Povišene vrijednosti HOMA-IR i sniženi QUICKI indeksi dodatno potvrđuju razvoj inzulinske rezistencije.
- Fruktoza je značajno poremetila metabolizam lipida u jetri, što se očitovalo pojačanom lipogenezom, povišenim koncentracijama triacilglicerola i kolesterola te povećanom akumulacijom triacilglicerola u jetri.
- Profil masnih kiselina pokazao je pomak prema povećanom udjelu mononezasićenih masnih kiselina i smanjenju višestruko nezasićenih masnih kiselina, uz snižen omjer EPA/ARA, što upućuje na narušenu ravnotežu lipidnog metabolizma i proupalni metabolički profil.
- Poremećena regulacija transporta i oksidacije masnih kiselina potvrđena je povišenom ekspresijom CD-36 i L-FABP te sniženom ekspresijom *Ppar- α* i *Cpt-1*, što upućuje na smanjen kapacitet jetre za β -oksidaciju i povećanu sklonost razvoju steatoze.
- Kronični unos fruktoze doveo je do izraženog oksidacijskog stresa i aktivacije kronične upale niskog stupnja, što se očitovalo povećanim razinama lipidne peroksidacije, smanjenom aktivnošću antioksidacijskog sustava te povišenim koncentracijama proupalnih citokina.
- Suplementacija DHA i EPA-e imala je izražene zaštitne metaboličke učinke, uključujući smanjenje lipogeneze, očuvanje udjela višestruko nezasićenih masnih kiselina i normalizaciju omjera EPA/ARA.
- DHA i EPA ublažile su nakupljanje lipida u jetri smanjenjem ekspresije CD-36 i L-FABP-a te su poboljšale oksidacijski metabolizam masnih kiselina povećanjem ekspresije gena *Ppar- α* i *Cpt-1*.

- Suplementacija n-3 masnim kiselinama učinkovito je smanjila oksidacijski stres i kroničnu upalu niskog stupnja, uz obnovu antioksidacijske obrane i sniženje razina proupalnih citokina, čime je pridonijela poboljšanoj inzulinskoj osjetljivosti.
- Uočen je jasan spolno specifičan odgovor na fruktozu i suplementaciju DHA/EPA-e, pri čemu su ženke pokazale povoljniji metabolički profil, snažniji antioksidacijski odgovor i izraženije smanjenje upalnih pokazatelja u usporedbi s mužjacima.
- Rezultati ovog istraživanja potvrđuju da DHA i EPA predstavljaju učinkovitu prehrambenu intervenciju za modulaciju ranih metaboličkih poremećaja induciranih fruktozom, uz značajan utjecaj spolnih razlika na intenzitet metaboličkog odgovora.

7.LITERATURA

1. Aydin S, Aksoy A, Aydin S, Kalayci M, Yilmaz M, Kuloglu T, et al. Today's and yesterday's of pathophysiology: biochemistry of metabolic syndrome and animal models. *Nutrition*. 2014;30(1):1–9.
2. Balkau B, Valensi P, Eschwège E, Slama G. A review of the metabolic syndrome. *Diabetes Metab*. 2007;33(6):405–13.
3. Reaven GM. Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Nutrition*. 1997;13(1):1595–607.
4. Kaplan NM. The deadly quartet: upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med*. 1989;149:1514–20.
5. Alberti KGMM, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*. 1998;15(7):539–53.
6. Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the WHO consultation. *Diabet Med*. 1999;16(5):442–3.
7. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001;285(19):2486–97. doi:10.1001/jama.285.19.2486.
8. Zimmet P, Magliano D, Matsuzawa Y, Alberti G, Shaw J. The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. *J Atheroscler Thromb*. 2005;12(6):295–300.
9. Reaven GM. The metabolic syndrome: is this diagnosis necessary? *Am J Clin Nutr*. 2006;83(6):1237–47.
10. Huang PL. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech*. 2009;2(5–6):231–7.

11. Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(6):2595–600.
12. Cameron AJ, Magliano DJ, Söderberg S. A systematic review of the impact of including both waist and hip circumference in risk models for cardiovascular diseases, diabetes and mortality. *Obes Rev.* 2013;14(1):86–94. doi:10.1111/j.1467-789X.2012.01051.x.
13. Kwon H, Kim D, Kim JS. Body fat distribution and the risk of incident metabolic syndrome: a longitudinal cohort study. *Sci Rep.* 2017;7:10923. doi:10.1038/s41598-017-09723-y.
14. Klötting N, Blüher M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord.* 2014;15(4):277–87.
15. Weiss R. Fat distribution and storage: how much, where, and how? *Eur J Endocrinol.* 2007;157:39–45.
16. Nawrocki AR, Scherer PE. The delicate balance between fat and muscle: adipokines in metabolic disease and musculoskeletal inflammation. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4(3):281–9.
17. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose tissue remodeling: its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016;7:30. doi:10.3389/fendo.2016.00030.
18. Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;105(2):141–50.
19. Monteiro R, Azevedo I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:289645. doi:10.1155/2010/289645.
20. Hameed I, Masoodi SR, Mir SA, Nabi M, Ghazanfar K, Ganai BA. Type 2 diabetes mellitus: from a metabolic disorder to an inflammatory condition. *World J Diabetes.* 2015;6(4):598–612. doi:10.4239/wjd.v6.i4.598.

21. Low Wang CC, Goalstone ML, Draznin B. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes*. 2004;53(11):2735–40. doi:10.2337/diabetes.53.11.2735.
22. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol Rev*. 2018;98(4):2133–2223. doi:10.1152/physrev.00063.2017.
23. Samuel VT, Shulman GI. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest*. 2016;126(1):12–22.
24. Roche HM. Fatty acids and the metabolic syndrome. *Proc Nutr Soc*. 2005;64:23–9.
25. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28:412–9.
26. Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, Quon MJ. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:2402–10.
27. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005;366:1415–28.
28. Ginsberg HN, Zhang Y, Hernandez-Ono A. Metabolic syndrome: focus on dyslipidemia. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14(Suppl 1):41S–49S. doi:10.1038/oby.2006.281.
29. Leavens KF, Birnbaum MJ. Insulin signaling to hepatic lipid metabolism in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2011;46(3):200–15.
30. Morse SA, Zhang R, Thakur V, Reisin E. Hypertension and the metabolic syndrome. *Am J Med Sci*. 2005;330(6):303–10. doi:10.1097/00000441-200512000-00008.
31. Chang YC, Yu YH, Chuang LM. Molecular genetics of metabolic syndrome. In: eLS. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. doi:10.1002/9780470015902.a0024320.
32. Brown AE, Walker M. Genetics of insulin resistance and the metabolic syndrome. *Curr Cardiol Rep*. 2016;18:75. doi:10.1007/s11886-016-0755-4.

33. Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Fairus A, Ima-Nirwana S. Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutr Metab (Lond)*. 2016;13:65. doi:10.1186/s12986-016-0123-9.
34. Sánchez-Lozada LG, Tapia E, Jiménez A, Bautista P, Cristóbal M, Nepomuceno T, et al. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;292(1):F423–9.
35. Mahmoud AAA, Elshazly SM. Ursodeoxycholic acid ameliorates fructose-induced metabolic syndrome in rats. *PLoS One*. 2014;9(9):e106993. doi:10.1371/journal.pone.0106993.
36. Shahraki MR, Harati M, Shahraki AR. Prevention of high fructose-induced metabolic syndrome in male Wistar rats by aqueous extract of *Tamarindus indica* seed. *Acta Med Iran*. 2011;49(5):277–83.
37. Aguilera AA, Díaz GH, Barcelata ML, Guerrero OA, Oliart Ros RM. Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor- α in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. *J Nutr Biochem*. 2004;15(6):350–7.
38. Rossmeisl M, Rim JS, Koza RA, Kozak LP. Variation in type 2 diabetes-related traits in mouse strains susceptible to diet-induced obesity. *Diabetes*. 2003;52(8):1958–66.
39. Poudyal H, Panchal S, Brown L. Comparison of purple carrot juice and β -carotene in a high-carbohydrate, high-fat diet-fed rat model of the metabolic syndrome. *Br J Nutr*. 2010;104(9):1322–32.
40. Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab (Lond)*. 2005;2:1–14.
41. Lottenberg AM, Afonso MS, Lavrador MSF, Machado RM, Nakandakare ER. The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. *J Nutr Biochem*. 2012;23(9):1027–40. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.03.004.
42. Wiktorowska-Owczarek A, Berezińska M, Nowak JZ. PUFAs: structures, metabolism and functions. *Adv Clin Exp Med*. 2015;24(6):931–41.

43. Rioux V, Legrand P. Saturated fatty acids: simple molecular structures with complex cellular functions. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007;10(6):752–8.
44. Cascio G, Schiera G, Di Liegro I. Dietary fatty acids in metabolic syndrome, diabetes and cardiovascular diseases. *Curr Diabetes Rev*. 2011;8(1):2–17.
45. Risérus U, Willett WC, Hu FB. Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. *Prog Lipid Res*. 2009;48(1):44–51.
46. Martínez-Fernández L, Laiglesia LM, Huerta AE, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ. Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic syndrome. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2015;121:24–41.
47. Scorletti E, Byrne CD. Omega-3 fatty acids, hepatic lipid metabolism, and nonalcoholic fatty liver disease. *Annu Rev Nutr*. 2013;33:231–48.
48. Calder PC, Yaqoob P. Understanding omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Postgrad Med*. 2009;121(6):148–57. doi:10.3810/pgm.2009.11.2083.
49. Spector AA, Yorek MA. Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res*. 1985;26(9):1015–35.
50. Sprecher H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1486(2–3):219–31.
51. Guo X, Sinclair AJ, Kaur G, Li D. Differential effects of EPA, DPA and DHA on cardio-metabolic risk factors in high-fat diet fed mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2018;136:47–55.
52. Galli C, Calder PC. Effects of fat and fatty acid intake on inflammatory and immune responses: a critical review. *Ann Nutr Metab*. 2009;55(1–3):123–39.
53. Robinson LE, Buchholz AC, Mazurak VC. Inflammation, obesity, and fatty acid metabolism: influence of n-3 polyunsaturated fatty acids on factors contributing to metabolic syndrome. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2007;32(6):1008–24.

54. Krygsman A. Importance of dietary fatty acid profile and experimental conditions in the obese insulin-resistant rodent model of metabolic syndrome. In: *Glucose Tolerance*. InTech; 2012. doi:10.5772/53805.
55. Siriwardhana N, Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N. Health benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Adv Food Nutr Res*. 2012;65:211–22.
56. Albracht-Schulte K, Kalupahana NS, Ramalingam L, Wang S, Rahman SM, Robert-McComb J, et al. Omega-3 fatty acids in obesity and metabolic syndrome: a mechanistic update. *J Nutr Biochem*. 2018;58:1–16. doi:10.1016/j.jnutbio.2018.02.012.
57. Lee YH, Pratley RE. The evolving role of inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Curr Diab Rep*. 2005;5:70–75. doi:10.1007/s11892-005-0071-7.
58. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism*. 2000;49:3–8.
59. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010;4(8):118–26. doi:10.4103/0973-7847.70902.
60. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem*. 2015;30(1):11–26.
61. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr, Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*. 2012;142:w13659. doi:10.4414/smw.2012.13659.
62. Monserrat-Mesquida M, Quetglas-Llabrés M, Capó X, Bouzas C, Mateos D, Pons A, et al. Metabolic syndrome is associated with oxidative stress and proinflammatory state. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(3):236. doi:10.3390/antiox9030236.
63. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:360438. doi:10.1155/2014/360438.

64. Desai SN, Farris FF, Ray SD. Lipid peroxidation. In: Encyclopedia of Toxicology. 2nd ed. 2014;2:89–93.
65. Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. Chem Rev. 2011;111(10):5944–72. doi:10.1021/cr200084z.
66. Saldaña MDA, Martínez-Montegudo SI. Oxidative stability of fats and oils measured by differential scanning calorimetry for food and industrial applications. In: Applications of Calorimetry in a Wide Context. InTech; 2013. doi:10.5772/54486.
67. Reppeto M, Semprine J, Boveris A. Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. In: Catalá A, editor. Lipid Peroxidation. InTech; 2012. doi:10.5772/45943.
68. Pillon NJ, Soulage CO. Lipid peroxidation by-products and the metabolic syndrome. In: Catalá A, editor. Lipid Peroxidation. InTech; 2012. doi:10.5772/46019.
69. Hawkins RC. Evaluation of Roche Accu-Chek Go and Medisense Optium blood glucose meters. Clin Chim Acta. 2005;353:127–31.
70. Starčević K, Krstulović L, Brozić D, Maurić M, Stojević Z, Mikulec Ž, et al. Production performance, meat composition and oxidative susceptibility in broiler chicken fed with different phenolic compounds. J Sci Food Agric. 2015;95:1172–8.
71. Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charão MF, Moro AM, et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. J Pharm Biomed Anal. 2007;43(2):619–24.
72. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem. 1957;226:497–509.
73. Acosta-Cota SJ, Aguilar-Medina EM, Ramos-Payán R, Ruiz-Quiñónez AK, Romero-Quintana JG, Montes-Avila J, et al. Histopathological and biochemical changes in the development of nonalcoholic fatty liver disease induced by high-sucrose diet at different times. Can J Physiol Pharmacol. 2019;97(1):23–36.

74. Hsieh CC, Liao CC, Liao YC, Hwang LS, Wu LY, Hsieh SC. Proteomic changes associated with metabolic syndrome in a fructose-fed rat model. *J Food Drug Anal.* 2016;24(4):754–61.
75. Sil R, Chakraborti SA. Oxidative inactivation of liver mitochondria in high fructose diet-induced metabolic syndrome in rats: effect of glycyrrhizin treatment. *Phytother Res.* 2016;30(9):1503–12.
76. Yao L, Wei J, Shi S, Guo K, Wang X, Wang Q, et al. Modified linguizhugan decoction incorporated with dietary restriction and exercise ameliorates hyperglycemia, hyperlipidemia and hypertension in a rat model of the metabolic syndrome. *BMC Complement Altern Med.* 2017;17(1):1–12.
77. Ramalho L, da Jornada MN, Antunes LC, Hidalgo MP. Metabolic disturbances due to a high-fat diet in a non-insulin resistant animal model. *Nutr Diabetes.* 2017;7(3):e245.
78. Hao L, Lu X, Sun M, Li K, Shen L, Wu T. Protective effects of L-arabinose in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. *Food Nutr Res.* 2015;59:28886.
79. Dai S, McNeill JH. Fructose-induced hypertension in rats is concentration- and duration-dependent. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1995;33(2):101–7.
80. Ramirez-Higuera A, Montes CP, Herrera-Meza S, Mendoza-Lopez R, Valerio-Alfaro G, Oliart-Ros RM. Preventive action of sterculic oil on metabolic syndrome development on a fructose-induced rat model. *J Med Food.* 2019;23(3):1–7.
81. Kubacka M, Kotańska M, Syafarz M, Pocięcha K, Waszkielewicz AM, Marona H, Filipiek B, Mogilski S. Beneficial effects of non-quinazoline α 1-adrenolytics on hypertension and altered metabolism in fructose-fed rats: a comparison with prazosin. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2019;29(7):751–60.
82. Korkmaz OA, Sadi G, Kocabas A, Yildirim OG, Sumlu E, Koca HB, Nalbantoglu B, Pektas MB, Akar F. *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus plantarum* modulate renal

- antioxidant status in a rat model of fructose-induced metabolic syndrome. *Arch Biol Sci.* 2019;71(2):265–73.
83. Choi Y, Abdelmegeed MA, Song BJ. Diet high in fructose promotes liver steatosis and hepatocyte apoptosis in C57BL/6J female mice: role of disturbed lipid homeostasis and increased oxidative stress. *Food Chem Toxicol.* 2017;103:111–21. doi:10.1016/j.fct.2017.02.039.
84. Balakumar M, Raji L, Prabhu D, Sathishkumar C, Prabu P, Mohan V, et al. High-fructose diet is as detrimental as high-fat diet in the induction of insulin resistance and diabetes mediated by hepatic/pancreatic endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biochem.* 2016;423(1–2):93–104.
85. Bowe JE, Franklin ZJ, Hauge-Evans AC, King AJ, Persaud SJ, Jones PM. Assessing glucose homeostasis in rodent models. *J Endocrinol.* 2014;222(3):13–25.
86. Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest.* 2009;119(5):1322–34.
87. Geidl-Flueck B, Postic C. Fructose drives de novo lipogenesis affecting metabolic homeostasis. *Nutrients.* 2023;15(3):654.
88. Sakamuri A, Sakamuri SSVP, Kona SR, Jeyapal S, Ibrahim A. Diets with low n-6:n-3 PUFA ratio protects rats from fructose-induced dyslipidemia and associated hepatic changes: comparison between 18:3 n-3 and long-chain n-3 PUFA. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2020;155:102082.
89. Federico A, Dallio M, Masarone M, Persico M. The role of fructose in non-alcoholic steatohepatitis: old relationship and new insights. *Nutrients.* 2021;13(4):1314. doi:10.3390/nu13041314.

90. Esteves GP, Oliveira FL, Gomes FS, Lima MR, Souza GR. A fish oil-rich diet leads to lower adiposity and serum triglycerides in fructose-fed rats. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2020;122(5):2000045.
91. Musa-Veloso K, Binns MA, Kocenas AC, Chung C, Rice H, Oppedal-Olsen H, et al. Systematic review and meta-analysis of controlled intervention trials with EPA/DHA and triglycerides. *Nutr Rev.* 2018;76(8):581–602.
92. Shimano H, Sato R. SREBP-regulated lipid metabolism: convergent physiology—divergent pathophysiology. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13(12):710–30.
93. de Castro GS, Calder PC, Jordão AA, Vannucchi H. Dietary docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid effects on fructose-induced lipogenesis in rats. *J Nutr Biochem.* 2015;26(12):1501–8.
94. Nakamura MT, Nara TY. Structure, function, and dietary regulation of $\Delta 6$, $\Delta 5$, and $\Delta 9$ desaturases. *Annu Rev Nutr.* 2004;24:345–76.
95. Calder PC. Functional roles of fatty acids and their effects on human health. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2015;39(1 Suppl):18S–32S.
96. Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1851(4):469–84.
97. Koonen DPY, Jacobs RL, Febbraio M, Young ME, Soltys CLM, Ong H, et al. Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes.* 2007;56(12):2863–71.
98. Starčević K, Roškarić P, Šperanda M, Đidara MG, Kurilj AG, Maurić M, et al. High dietary n-6/n-3 ratio decreases eicosapentaenoic to arachidonic acid ratios and upregulates NF κ B/p50 expression in short-term low-dose streptozotocin and high-fructose rat model of diabetes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2019;149:1–7.

99. Zheng J, Xiao H, Duan W, Zhang Y, Wang T, Zhang J, et al. Docosahexaenoic acid alleviates fructose-induced hepatic steatosis via suppressing lipogenesis and promoting fatty acid oxidation. *Biomed Res Int*. 2016;2016:8529704.
100. Jump DB, Depner CM, Tripathy S. Omega-3 fatty acid supplementation and cardiovascular disease. *J Lipid Res*. 2012;53(12):2525–45.
101. Silverstein RL, Febbraio M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal*. 2009;2(72):re3.
102. Nagai Y, Nishio Y, Nakamura T, Maegawa H, Kikkawa R, Kashiwagi A. Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPAR α . *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;282(5):E1180–90.
103. Neschen S, Moore I, Regittnig W, Yu CL, Wang Y, Pypaert M, Petersen KF, Shulman GI. Contrasting effects of fish oil and safflower oil on hepatic peroxisomal and tissue lipid content. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;282:E395–401.
104. Vona R, Gambardella L, Cittadini C, Straface E, Pietraforte D. Biomarkers of oxidative stress in metabolic syndrome and associated diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:8267234. doi:10.1155/2019/8267234.
105. Softic S, Cohen DE, Kahn CR. Role of dietary fructose and hepatic de novo lipogenesis in fatty liver disease. *Dig Dis Sci*. 2016;61(5):1282–93.
106. Tappy L, Lê KA. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev*. 2010;90(1):23–46.
107. Lambert JE, Ramos-Roman MA, Browning JD, Parks EJ. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2014;146(3):726–35.
108. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*. 2000;49:1939–45.

109. Sachdeva M, Karan M, Singh T, Dhingra S. Oxidants and antioxidants in complementary and alternative medicine: a review. *Spat DD - Peer Rev J Complement Med Drug Discov.* 2014;4(1):1.
110. Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res.* 2003;42(4):318–43.
111. Calder PC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. *Nutrients.* 2010;2(3):355–74.
112. Calder PC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochem Soc Trans.* 2017;45(5):1105–15.
113. Yang M, Jiang ZH, Li CG, Zhu YJ, Li Z, Tang YZ, et al. Apigenin prevents metabolic syndrome in high-fructose diet-fed mice by Keap1-Nrf2 pathway. *Biomed Pharmacother.* 2018;100:1283–90.
114. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1–Nrf2–ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:89–116.
115. Abrescia P, Treppiccione L, Rossi M, Bergamo P. Modulatory role of dietary polyunsaturated fatty acids in Nrf2-mediated redox homeostasis. *Prog Lipid Res.* 2020;80:101066.
116. Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Yoshiuchi K, Hatazaki M, Matsuoka TA, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J Biol Chem.* 2005;280(1):847–51.
117. Zhu W, Niu X, Wang M, Li Z, Jiang HK, Li C, et al. Endoplasmic reticulum stress may be involved in insulin resistance and lipid metabolism disorders of the white adipose tissues induced by high-fat diet containing industrial trans-fatty acids. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2019;12:1625–38.

118. Suzuki T, Gao J, Ishigaki Y, Kondo K, Sawada S, Izumi T, et al. ER stress protein CHOP mediates insulin resistance by modulating adipose tissue macrophage polarity. *Cell Rep.* 2017;18(8):2045–57.
119. Roškarić P, Šperanda M, Mašek T, Verbanac D, Starčević K. Low dietary n-6/n-3 ratio attenuates changes in the Nrf2 gene expression, lipid peroxidation, and inflammatory markers induced by fructose overconsumption in the rat abdominal adipose tissue. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(12):2005. doi:10.3390/antiox10122005.
120. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860–7.
121. Park EJ, Lee JH, Yu GY, He G, Ali SR, Holzer RG, et al. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell*. 2010;140(2):197–208.
122. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008;134(6):1655–69.
123. Zhao G, Etherton TD, Martin KR, Gillies PJ, West SG, Kris-Etherton PM. Dietary alpha-linolenic acid reduces inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women. *J Nutr*. 2004;134(11):2991–7.
124. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF- β in hepatic fibrosis. *Front Biosci*. 2002;7:d793–807.
125. Hernández-Rodas MC, Valenzuela R, Videla LA. Relevant aspects of nutritional and dietary interventions in non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6):1321. doi:10.3390/ijms18061321.
126. Straub LG, Scherer PE. Metabolic messengers: adiponectin. *Nat Metab*. 2019;1(3):334–9. doi:10.1038/s42255-019-0041-z.
127. Bargut TCL, Santos LP, Machado DGL, Aguilá MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Eicosapentaenoic acid (EPA) vs docosahexaenoic acid (DHA): effects in epididymal white

- adipose tissue of mice fed a high-fructose diet. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2017;123:14–24. doi:10.1016/j.plefa.2017.07.004.
128. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Biochem Soc Trans*. 2005;33(2):423–7.
129. Duvall MG, Levy BD. DHA- and EPA-derived resolvins, protectins, and maresins in airway inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2016;15:144–55.
130. Almasri F, Sus N, Collotta D, Mastrocola R, Collino M, Frank J. Preliminary findings on the effects of high intakes of fructose and galactose with or without fructooligosaccharides on inflammatory markers and blood lipid in rats. *Curr Dev Nutr*. 2022;6:973. doi:10.1093/cdn/nzac068.002.
131. Palmisano BT, Zhu L, Stafford JM. Role of estrogens in the regulation of liver lipid metabolism. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1043:227–56.
132. Viña J, Gambini J, García-García FJ, Rodríguez-Mañas L, Borrás C. Role of oestrogens on oxidative stress and inflammation in ageing. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2013;16(2):65–72.
133. Burdge GC, Wootton SA. Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *Br J Nutr*. 2002;88(4):411–20.
134. Kelly DM, Jones TH. Testosterone: a metabolic hormone in health and disease. *J Endocrinol*. 2013;217:25–45.
135. Shen M, Shi H. Sex hormones and their receptors regulate liver energy homeostasis. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:294278. doi:10.1155/2015/294278.
136. De Paoli M, Zakharia A, Werstuck GH. The role of estrogen in insulin resistance: a review of clinical and preclinical data. *Am J Pathol*. 2021;191(9):1490–8.

8. ŽIVOTOPIS

Petra Roginek rođena je 6. svibnja 1992. godine u Varaždinu. Nakon završene Prve gimnazije Varaždin (opći smjer), 2011. godine upisala je Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, studij Primijenjene kemije. Tijekom studija nagrađena je Dekanovom nagradom za znanstveno-istraživački rad. U ljetnom semestru akademske godine 2016./2017. obavila je četveromjesečnu stručnu praksu u Toulouseu (Francuska) u istraživačkom laboratoriju za agroindustriju u sklopu Institut National Polytechnique de Toulouse. Diplomski studij završila je 2017. godine te stekla akademski naziv magistra primijenjene kemije.

Po završetku studija zaposlila se na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, gdje je sudjelovala u izvođenju praktičnog dijela nastave iz kolegija Organska kemija te bila neposredna voditeljica izrade dvaju diplomskih i jednoga završnog rada. Od rujna 2018. do lipnja 2025. bila je zaposlena na Zavodu za kemiju i biokemiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu kao asistentica u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ). Trenutno je zaposlena na Zavodu za fiziologiju i radiobiologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, na radnom mjestu stručnog suradnika. Od akademske godine 2018./2019. polaznica je Doktorskog studija farmaceutsko-biokemijskih znanosti.

Tijekom doktorskog studija sudjelovala je na više stručnih radionica i ljetnih škola te se dodatno usavršavala u području suvremenih laboratorijskih metoda. U okviru istraživačkog rada stekla je iskustvo u izolaciji RNA i proteina, analizi ekspresije gena metodom RT-qPCR te detekciji i analizi proteina metodom Western blot. Kao autorica i koautorica objavila je ukupno 6 znanstvenih radova.

9.PRILOZI



Article

Low Dietary n6/n3 Ratio Attenuates Changes in the NRF 2 Gene Expression, Lipid Peroxidation, and Inflammatory Markers Induced by Fructose Overconsumption in the Rat Abdominal Adipose Tissue

Petra Roškarić¹, Marcela Šperanda² , Tomislav Mašek³ , Donatella Verbanac⁴ and Kristina Starčević^{1,*}

¹ Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Heinzelova 55, 10000 Zagreb, Croatia; petra.roskaric@vef.hr

² Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Osijek, Vladimira Preloga 1, 31000 Osijek, Croatia; marcela.speranda@fazos.hr

³ Department of Animal Nutrition and Dietetics, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Heinzelova 55, 10000 Zagreb, Croatia; tomislav.masek@vef.hr

⁴ Department of Medical Biochemistry and Hematology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia; donatella.verbanac@pharma.unizg.hr

* Correspondence: kristina.starcevic@vef.hr



Citation: Roškarić, P.; Šperanda, M.; Mašek, T.; Verbanac, D.; Starčević, K. Low Dietary n6/n3 Ratio Attenuates Changes in the NRF 2 Gene Expression, Lipid Peroxidation, and Inflammatory Markers Induced by Fructose Overconsumption in the Rat Abdominal Adipose Tissue. *Antioxidants* **2021**, *10*, 2005. <https://doi.org/10.3390/antiox10122005>

Academic Editor: Stanley Omaye

Received: 1 November 2021

Accepted: 14 December 2021

Published: 16 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The objective of this study was to examine the benefits of different n6/n3 polyunsaturated fatty acid ratios on the lipid metabolism, insulin resistance, and oxidative stress in the adipose tissue of rats fed a high-fructose diet. Male and female rats were divided into four groups: a control group (CON) (n6/n3 ratio ~7), a high-fructose group (HF) (n6/n3 ratio ~7), an N6-HF group (n6/n3 ratio ~50), and the DHA-HF group (n6/n3 ratio ~1, with the addition of docosahexaenoic (DHA) and eicosapentaenoic (EPA) acid). The CON group received plain water and the HF group received 15% fructose in their drinking water. Fructose induced an increase in the content of serum triglycerides, serum cholesterol, and HOMA-IR index. Among the fatty acids, elevated proportions of C18:1n9 and C16:1n7, as well as an increase in total monounsaturated fatty acid (MUFA), were found in the adipose tissue of the HF group. Fructose treatment also changed oxidative parameters, including a marked increase in the serum malondialdehyde (MDA) content. Meanwhile, DHA supplementation caused a significant decrease in the serum MDA concentration in comparison with the HF group. In addition, DHA/EPA supplementation attenuated oxidative stress by increasing NRF 2 gene expression. Fructose treatment also significantly decreased the adiponectin level, while DHA supplementation ameliorated it. The changes observed in this trial, including the decrease in the content of DHA and EPA, the decreased EPA/ARA ratio, and the increase in the expression of inflammatory genes, are characteristics of the low-grade inflammation caused by fructose treatment. These changes in the rat adipose tissue could be prevented by dietary intervention consisting of DHA supplementation and a low n6/n3 ratio.

Keywords: adipose tissue; metabolic syndrome; oxidative stress; DHA; fatty acids

1. Introduction

Increased fructose intake caused by overconsumption of soft drinks plays an important role in the development of metabolic syndrome, dyslipidaemia, and adipose tissue dysfunction [1,2]. Abdominal obesity, dyslipidaemia, hyperglycaemia, hypertension, and low-grade inflammation are the hallmarks of metabolic syndrome [3].

A key component of the development of metabolic syndrome is dysfunction of the lipid metabolism characterised by changes in lipogenesis and fatty acid concentrations in different tissues. Adipose tissue represents the main storage of fatty acids (FA) in the form of triglycerides and is also an active endocrine organ with different signalling and

regulatory properties that affect local and systemic metabolic responses [4]. Hypertrophy of adipocytes caused by obesity leads to the altered secretion of adiponectin and inflammatory cytokines [5].

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are the major component of the membrane phospholipids which influence the membranes' physical properties and cell functions [6,7]. It is generally considered that a change in the whole body's fatty acid composition can be attributed to different sources of fatty acids, mainly diet, de novo lipogenesis (DNL), and bioconversion. Fatty acids derived from the diet or generated de novo are bioconverted by a series of highly regulated steps of desaturation, elongation, and β -oxidation, into different saturated and unsaturated fatty acids [8,9]. The bioconversion rate of linolenic acid into important n3 PUFA, eicosapentaenoic acid (EPA), and docosahexaenoic acid (DHA) is very low, and therefore, a percentage of these fatty acids must be obtained by diet [10]. A large number of recent studies suggest that n3 PUFA, EPA, and DHA, have a wide range of beneficial biological effects, including prevention of obesity, insulin resistance, decreasing oxidative stress, and anti-inflammatory effects [11]. The alteration of n6/n3 polyunsaturated fatty acids ratio in favour of n3 PUFA has an important role in the prevention and treatment of metabolic disorders, such as metabolic syndrome [12].

Adipose tissue is a reservoir of polyunsaturated fatty acids for other tissues, and the alteration of its fatty acid composition may have important effects on the other tissues, and animal and human health in general. Therefore, we aimed to characterise the efficiency of diets with different amounts of EPA and DHA, and different n6/n3 ratios on the prevention of the pathological changes in fructose-induced metabolic syndrome. In addition, we investigated whether this nutritional manipulation is sex specific.

2. Materials and Methods

2.1. Animals, Study Design, and Experimental Diets—Experimental Design

All experiments were approved by the Croatian National Ethics Committee and the Ministry of Agriculture, Republic of Croatia (Authorisation EP 107/2017), and conducted in accordance with the Croatian Animal Welfare Act. The experiment was performed on 40 Wistar HAN rats (20 males 177 ± 6 g and 20 females 140 ± 4 g). At the beginning of the experiment, after two weeks' acclimation, the rats were assigned to the different dietary treatment and fructose supplementation into control (CON) or high-fructose (HF) groups. The control group was given plain water, while the HF group received 15% fructose in the drinking water. The HF group was additionally divided on the basis of the dietary n6/n3 ratio and DHA/EPA supplementation (Figure 1). The n6/n3 ratio was ~7 for the CON and HF groups, ~50 for the N6-HF group, and ~1 for the DHA-HF group (Tables 1 and 2). The experiments lasted for 22 weeks, with 2 weeks of acclimation and 20 weeks of treatment. The rats were kept in polycarbonate cages and housed under the conditions of a 12 h light/dark cycle at 25 ± 2 °C. Access to food and water (tap water) was unlimited to all. Body weight was measured daily at the same time (8:00 a.m.) using a digital scale.

Table 1. Nutrient composition of the experimental diet (dry weight basis).

Nutrients (% Unless Otherwise Stated)	Exp. Diet
Crude protein	20.2
Crude fat	4.9
Crude fibre	4.9
Ash	6.7
Calcium	1.0
Phosphorus	0.8
Lysine	1.2
Methionine	0.4
ME (MJ) ²	12.5

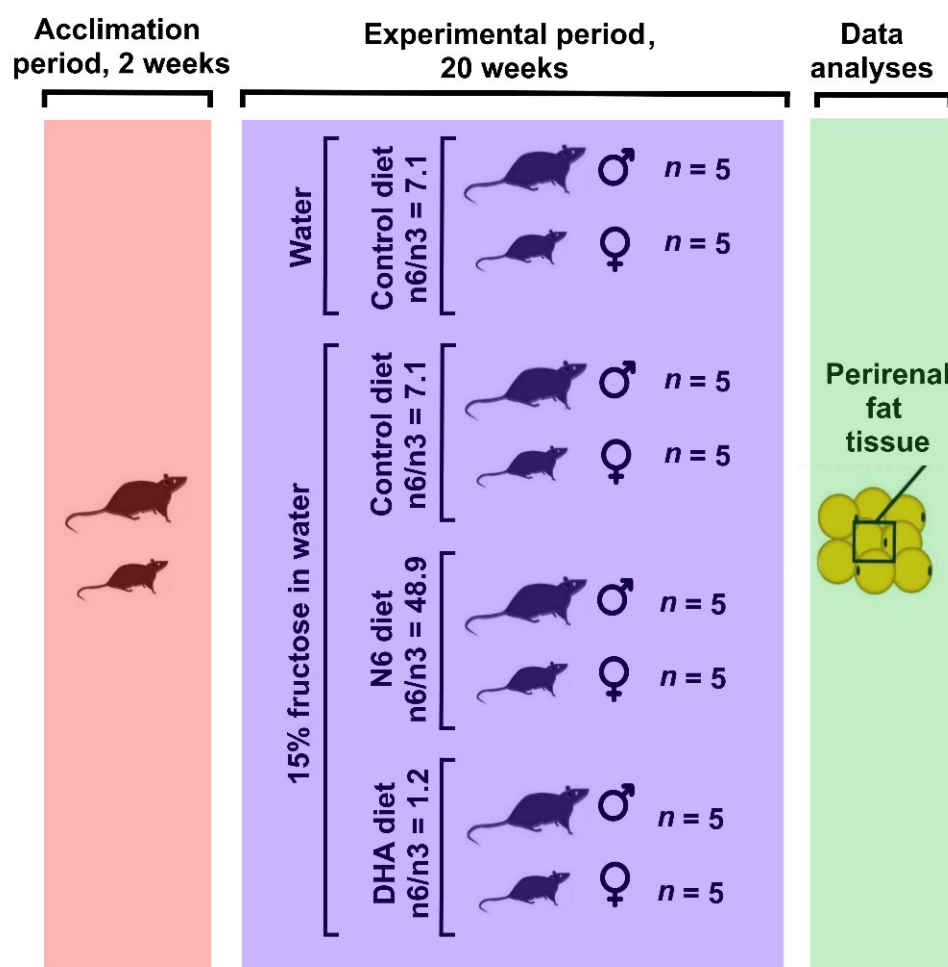


Figure 1. Graphical representation of the experimental groups of rats. The rats were divided into four groups based on their diet.

Table 2. Fatty acid composition (% of fatty acids) of diets supplemented to the rats.

Fatty Acids	CON & HF	N6	DHA
Palmitic (C16:0)	7.15	7.36	15.20
Stearic (C18:0)	2.76	2.21	4.30
Oleic (C18:1n9)	28.97	29.09	31.21
Linoleic (C18:2n6)	52.25	58.69	26.78
Linolenic (C18:3n3)	7.35	1.20	0.87
Eicosapentaenoic (C20:5n3)	nd	nd	9.15
Docosahexaenoic (C22:6n3)	nd	nd	10.98
n6/n3 ratio	7.11	48.91	1.28

nd, below quantification level.

2.2. Sample Collection

After 20 weeks, rats were sacrificed by exsanguination in deep anaesthesia (Narketan, 80 mg kg⁻¹ b.m. and Xylapan, 12 mg kg⁻¹ b.m., i.p., Vetoquinol, Bern, Switzerland). Blood samples were collected by cardiac puncture into serum tubes, and serum was obtained after centrifugation at 1500× g for 5 min. The abdominal adipose tissue was excised promptly after the animals were sacrificed, divided, and stored in an RNA-preserving agent (RNAlater, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.3. Serum Biochemistry

The fasting blood glucose levels were analysed by glucose meter Accu-Chek Go [13]. The levels of triglycerides and total cholesterol were analysed by an automatic analyser (SABA-18, Analyser Medical System, Roma, Italy). Commercial rat insulin ELISA kit was used to determine insulin concentration (Rat insulin kit ELISA, Mercodia, Upsalla, Sweden). Insulin sensitivity was measured as HOMA-IR [14] and QUICKI [15] indices, using the following equations:

$$\text{HOMA IR} = (\text{fasting insulin} \times \text{fasting glucose}) / 22.5 \quad (1)$$

$$\text{QUICKI} = 1 / (\log(\text{fasting insulin}) + \log(\text{fasting blood glucose})) \quad (2)$$

2.4. Determination of Oxidative Status Measurement

Following a previously described method, the HPLC method was used for analysing malondialdehyde (MDA) content as MDA-TBARS (thiobarbituric acid-reacting substances) [16].

Briefly, an aliquot of 20 μL of serum was injected onto a Shimadzu LC-2010CHT with an Inert Sustain C18 column (4.6 mm 150 mm, 5 μm particle size; GL Sciences, Tokyo, Japan). The standard curve was prepared using 1,1,3,3-tetraethoxypropane. MDA-TBARS were expressed as μM .

2.5. Lipid Extraction and Quantitation of Fatty Acid Composition

Total lipids from the tissue were extracted using a chloroform/methanol mixture (2:1, *v/v*) [17]. After extraction, the lipids were dried under N_2 , dissolved in the same mixture (150 μL), with the addition of 0.3 mg/mL butylated hydroxytoluene (BHT), and stored at -80°C . The analysis of fatty acid was performed by GC-MS (QP2010 Ultra, Shimadzu, Kyoto, Japan), with BPX70 capillary column (0.25 mm internal diameter, 0.25 μm film thickness, 30 m long, SGE, Austin, TX, USA). Analytical conditions were described previously [18]. The internal standard used for quantification of fatty acid methyl esters was nonadecanoic fatty acid (C19:0). The results of fatty acid composition were expressed as the percentage of total fatty acids.

2.6. Western Blotting Analysis

Total proteins were extracted by homogenisation in lysis buffer (RIPA lysis buffer, EMD Millipore, Billerica, MA, USA), containing a protease inhibitor cocktail (SIGMAFAST Protease Inhibitor Tablets, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany). The samples were centrifuged for 30 min at $14,000 \times g$ at 4°C , and the supernatant was collected into clear tubes. BCA assay (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) was performed for the determination of the protein concentration. Denaturation of 20 μg of total proteins in Laemmli SDS loading buffer was performed at 95°C for 5 min. After loading, 10% SDS polyacrylamide gel electrophoresis was carried out and then proteins were transferred to nitrocellulose membranes. Afterwards, the membranes were blocked in blocking buffer (ImmobilonBlock-CH (Chemiluminescent Blocker), MerckKGaA, Darmstadt, Germany) and incubated overnight at 4°C with primary antibody dissolved in ImmobilonBlock-CH (Chemiluminescent Blocker). After the membranes were washed three times for five minutes each with Tris-buffered saline with 0.5% Tween 20 (TBST), they were incubated in the corresponding secondary antibody for 1 h at room temperature. After being washed again three times with TBST, the membranes were processed for enhanced chemiluminescence (ECL) Clarity Max Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and captured using Odyssey Fc (LICOR, Bad Homburg, Germany). The primary antibody used was anti-adiponectin (dilution 1:500, Anti-Adiponectin antibody: ab133347, Abcam) and corresponding secondary HRP-conjugated IgG antibody (dilution 1:1000, mouse anti-rabbit IgG-HRP: sc-2357, Santa Cruz Biotechnology). Equality of loading and normalisation of the bands was assessed by using Amidoblack.

2.7. RT-qPCR Analysis

Total RNA was extracted from frozen adipose tissue using SV Total RNA Isolation System (Promega GMBH, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions. The quantity and purity of the isolated RNA samples were checked by spectrophotometry (BioDrop μ LITE, BioDrop, Cambridge, UK). Total RNA was subjected to a one-step RT-qPCR reaction using One-Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II, according to the manufacturer's manual (Perfect Real Time, TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan). The qPCR was performed using a Stratagene MxPro3005 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA and Mississauga, ON, Canada) thermocycler. Melt curve analyses verified the formation of a single desired PCR product in each PCR reaction. The expression level of each sample was normalised against the expression of β -actin as the internal control. The ratio of the relative expression of target genes to the housekeeping genes was calculated using the comparative C_T method $2^{(-\Delta\Delta CT)}$, and values were normalised to β -actin and cyclophilin levels [19]. All reactions were performed in triplicate for each sample. The primer sequences are listed in Table 3.

Table 3. Primer sequences and cycling conditions for polymerase chain reactions to evaluate the impact of the treatment in gene expression.

Gene	Sequence 5'-3'	Access. No.	Ann. Tm.	Cycles
TGF β	F: AAT ACG TCA GAC ATT CGG GAA GCA R: AAT ACG TCA GAC ATT CGG GAA GCA	NM_021578.2	60 °C	40
TNF α	F: CAC CAC GCT CTT CTG TCT ACT GAA C R: CCG GAC TCC GTG ATG TCT AAG TAC T	NM_012675.3	60 °C	40
$\Delta 9D$	F: ACA TTC AAT CTC GGG AGA ACA R: CCA TGC AGT CGA TGA AGA AC	NM_139192.2	60 °C	40
NRF 2	F: CAC ATC CAG ACA GAC ACC AGT R: CTA CAA ATG GGA ATG TCT CTG C	NM_031789.2	60 °C	40
β -actin	F: CAT TGT CAC CAA CTG GGA CGA TA R: GGA TGG CTA CGT ACA TGG CTG	XM_039089807.1	60 °C	40
Cyclophilin	F: GGA TGG CAA GCA TGT GGT CTT TG R: CTT CTT GCT GGT CTT GCC ATT CCT	M19533	60 °C	40

2.8. Statistical Analyses

The GraphPad Prism 8 program was used for statistical analysis of the obtained experimental results. Shapiro–Wilk test was used to test data normality. Data are expressed as means \pm SD. A one-way ANOVA, followed by post hoc Tukey tests, was used to compare the treated groups to the control. The standard deviations of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ equation for the tested gene expression were determined according to the established procedure [19]. Significant differences set up was at $p < 0.05$ and $p < 0.01$.

3. Results

3.1. Body Weight and Insulin Resistance Confirmation

After 20 weeks, the animals assigned to different experimental diets did not show significant differences in body weight or blood glucose level (Figure 2A,B). Although there were no changes in the blood glucose level, insulin sensitivity expressed as HOMA-IR and QUICKI indices were affected in all fructose supplemented groups (Figure 2C). Significant differences in insulin sensitivity ($p < 0.001$) were observed between the control group (CON) and all the other experimental groups. Additionally, fructose treatment in the male N6-HF group worsened insulin sensitivity indices, compared with the group with basal n6/n3 ratio (Figure 2C).

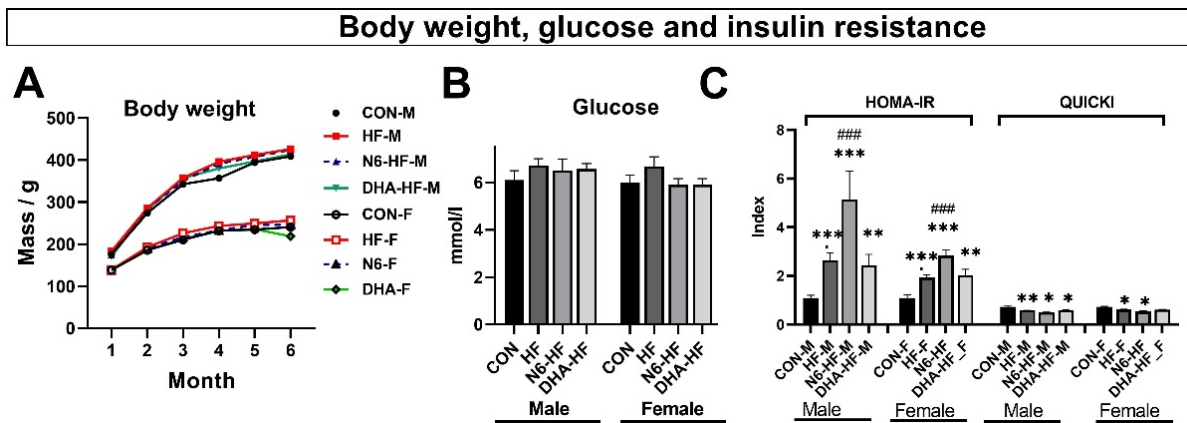


Figure 2. The influence of the treatments on body weight (A) and fasting blood glucose values (B). Insulin sensitivity was assessed as insulin concentration and insulin sensitivity indices, HOMA-IR, and QUICKI (C). Values are means \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ for HF, N6-HF, and DHA-HF groups versus the CON group and ### $p < 0.001$ for N6-HF, and DHA-HF groups versus the HF group. All values were compared between the groups within each sex.

3.2. Biochemical Parameters

The serum triglycerides in females of the HF group showed an increase, in comparison with male rats fed an HF diet (Figure 3). When the fructose diet also contained DHA/EPA supplementation, the high levels of serum triglycerides and cholesterol concentrations returned to levels similar to those of the control group ($p < 0.01$).

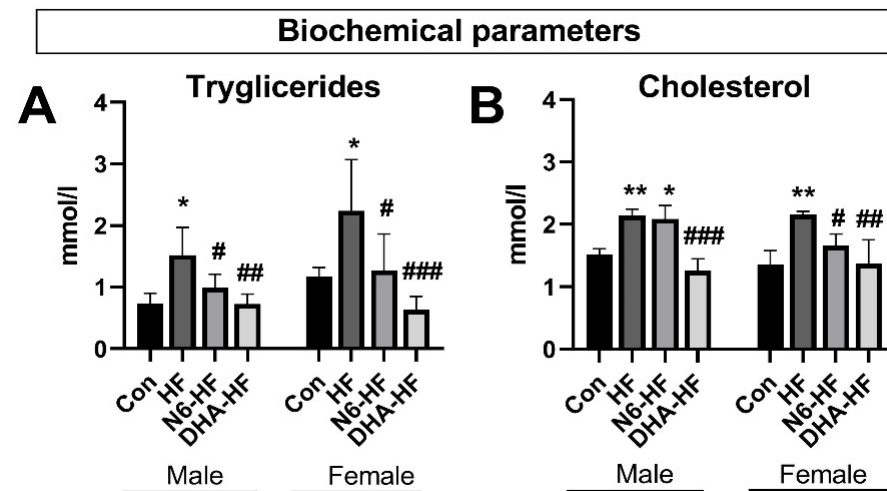


Figure 3. Influence of treatments on serum triglycerides (A) and cholesterol level (B). Values are means \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, for HF, N6-HF, and DHA-HF groups versus the CON group and # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ for N6-HF and DHA-HF groups versus the HF group.

3.3. Lipid Peroxidation and NRF 2 Expression

After 20 weeks of administrating a high-fructose diet, the values of MDA-TBARS were increased in the serum of the HF and N6-HF groups but not in the DHA-HF group. The results were the same for both sexes (Figure 4A). A significant decrease ($p < 0.001$) in MDA-TBARS serum values was observed in the DHA-HF group, compared with the N6-HF and HF groups in both sexes. The mRNA expression of NRF 2 decreased significantly in the HF and N6-HF groups in comparison with the CON group, in both males and females ($p < 0.001$) in adipose tissue (Figure 4B). In contrast, the DHA-HF group had NRF 2 expression similar to the values of the CON group.

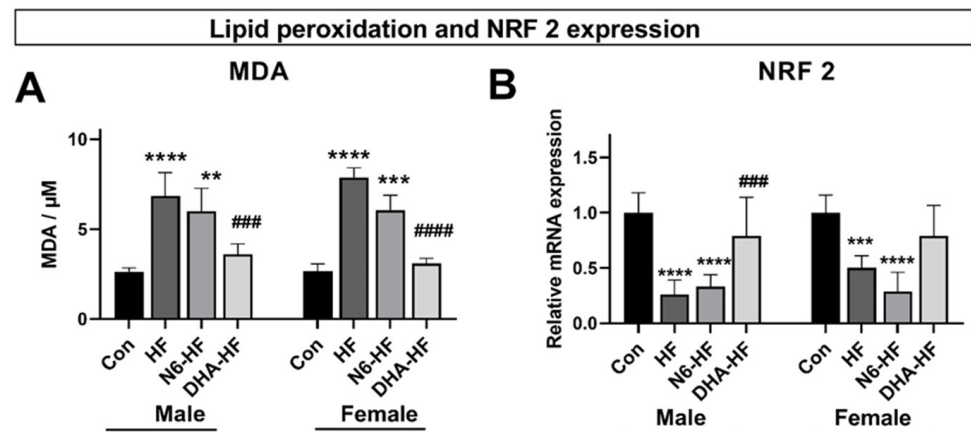


Figure 4. Effects of treatments on the lipid peroxidation measured as MDA-TBARS value in serum (A) and antioxidative response as mRNA expression of NRF 2 in adipose tissue (B). Values are means \pm SD, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ for HF, N6-HF, and DHA-HF versus the CON group and ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$ for N6-HF, and DHA-HF versus the HF group.

3.4. Expression of Inflammatory Markers and Adiponectin

In the adipose tissue, we investigated the expression of inflammatory adipokines, tumour necrosis factor α (TNF α), and transforming growth factor β (TGF β) (Figure 5A,B). An increase in TNF α expression was observed in the high-fructose-fed groups, compared with the CON group in female rats ($p < 0.01$), while in male rats, the difference did not reach a significant level. The DHA-HF female group had significantly lower TNF α expression in comparison with the HF female group ($p < 0.01$).

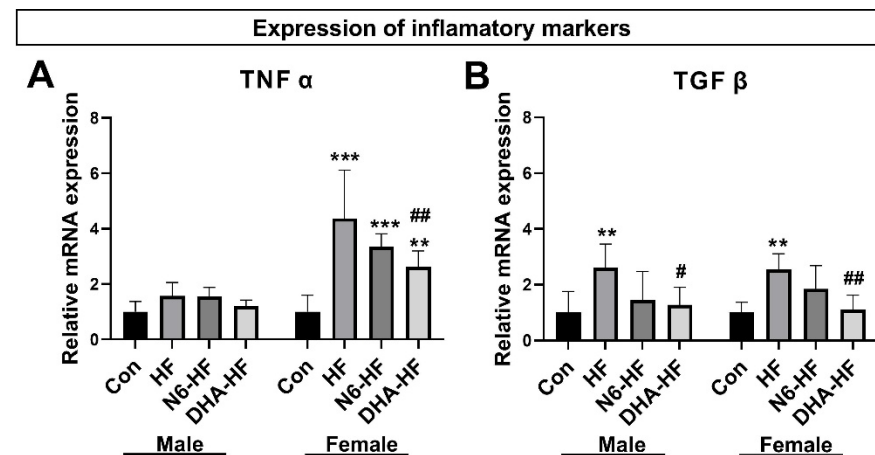


Figure 5. The gene expression of the inflammation markers TNF α (A) and TGF β (B) in adipose tissue. Values are means \pm SD, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, for HF, N6-HF, and DHA-HF versus the CON group and # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, for N6-HF and DHA-HF versus the HF group.

The expression of TGF β was significantly increased ($p < 0.01$) in the HF group, in both female and male rats. In the DHA-HF group, TGF β gene expression was significantly lower in comparison with the HF group, in males and females ($p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively).

The influence of high-fructose treatment was clearly visible on the expression of adiponectin protein abundance in adipose tissue (Figure 6). Adiponectin expression significantly decreased in the HF and N6-HF groups in male and female rats but not in the DHA-HF group ($p < 0.001$). The DHA-HF group also had higher adiponectin expression compared with the N6-HF and HF groups.

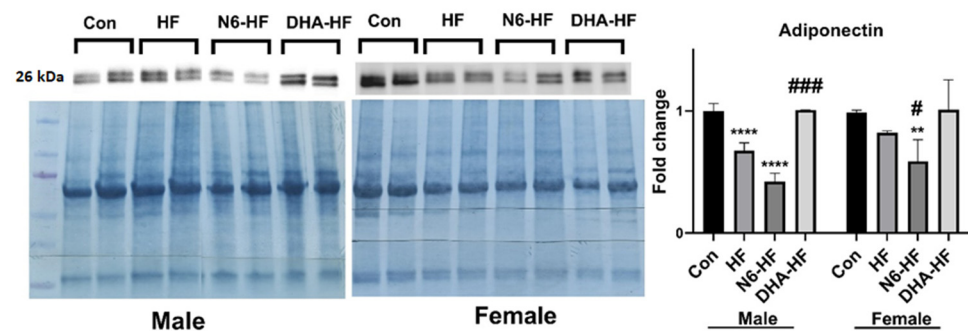


Figure 6. Adiponectin protein abundance in adipose tissue was determined by Western blotting relative to total protein. Values are means \pm SD., ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ for HF, N6-HF, and DHA-HF groups versus the CON group and # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ for N6-HF and DHA-HF groups versus the HF group.

3.5. Delta 9 Desaturase Expression ($\Delta 9D$)

Quantitative PCR revealed a significant increase in $\Delta 9$ desaturase (stearoyl-CoA desaturase-1) gene expression in adipose tissue in the high-fructose-fed male and female rats (Figure 7B). The DHA supplementation in the diet showed a lowering effect on $\Delta 9$ desaturase expression in adipose tissue. The lowering effect was more pronounced in female animals. The desaturation index (C16:1/C16:0) showed an increase in DNL in the HF group and N6-HF group (Figure 7A). The positive effect of DHA supplementation was observed in the decrease in $\Delta 9$ desaturase activity.

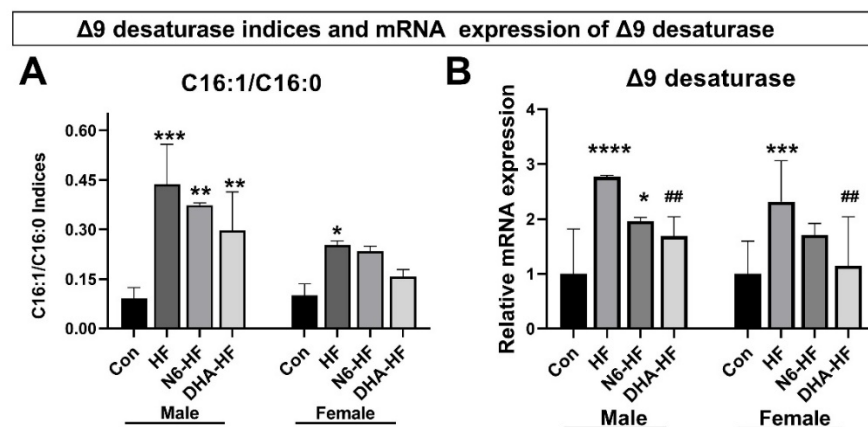


Figure 7. Effects of treatments on the desaturase indices C16:1/C16:0 (A) and mRNA expression of the $\Delta 9$ desaturase (B) in adipose tissue. Values are means \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ for HF, N6-HF, and DHA-HF groups versus the CON group and ## $p < 0.01$, for N6-HF and DHA-HF groups versus the HF group.

3.6. Adipose Tissue Fatty Acid Profile

The fatty acid composition of the adipose tissue is presented in a heat map (Figure 8). The characteristic differences were an increase in the content of monounsaturated fatty acids (MUFA) C16:1n7, C18:1n9, and C18:1n7. The influence of the treatments was also observed in the content of important n6 and n3 PUFAs. The content of arachidonic acid (ARA, C20:4n6) was significantly decreased in all treated groups, in both males and females ($p < 0.001$). The content of EPA (C20:5n3) was significantly higher in the DHA-HF group ($p < 0.001$). In addition, the content of EPA decreased significantly in the HF and N6-HF groups ($p < 0.05$), compared with the CON group, in both sexes. Changes in ARA and DHA content in the DHA-HF group resulted in a very high EPA/ARA ratio in this group (Figure 8). The DHA-HF group showed a significantly ($p < 0.01$) higher EPA/ARA ratio in comparison with the CON group in both sexes. The content of DHA (C22:6n3) decreased significantly in the N6-HF and HF groups in comparison with the CON group, in both

sexes ($p < 0.05$). Additionally, the DHA-HF group had a significantly higher content of DHA compared with the HF and N6-HF groups.

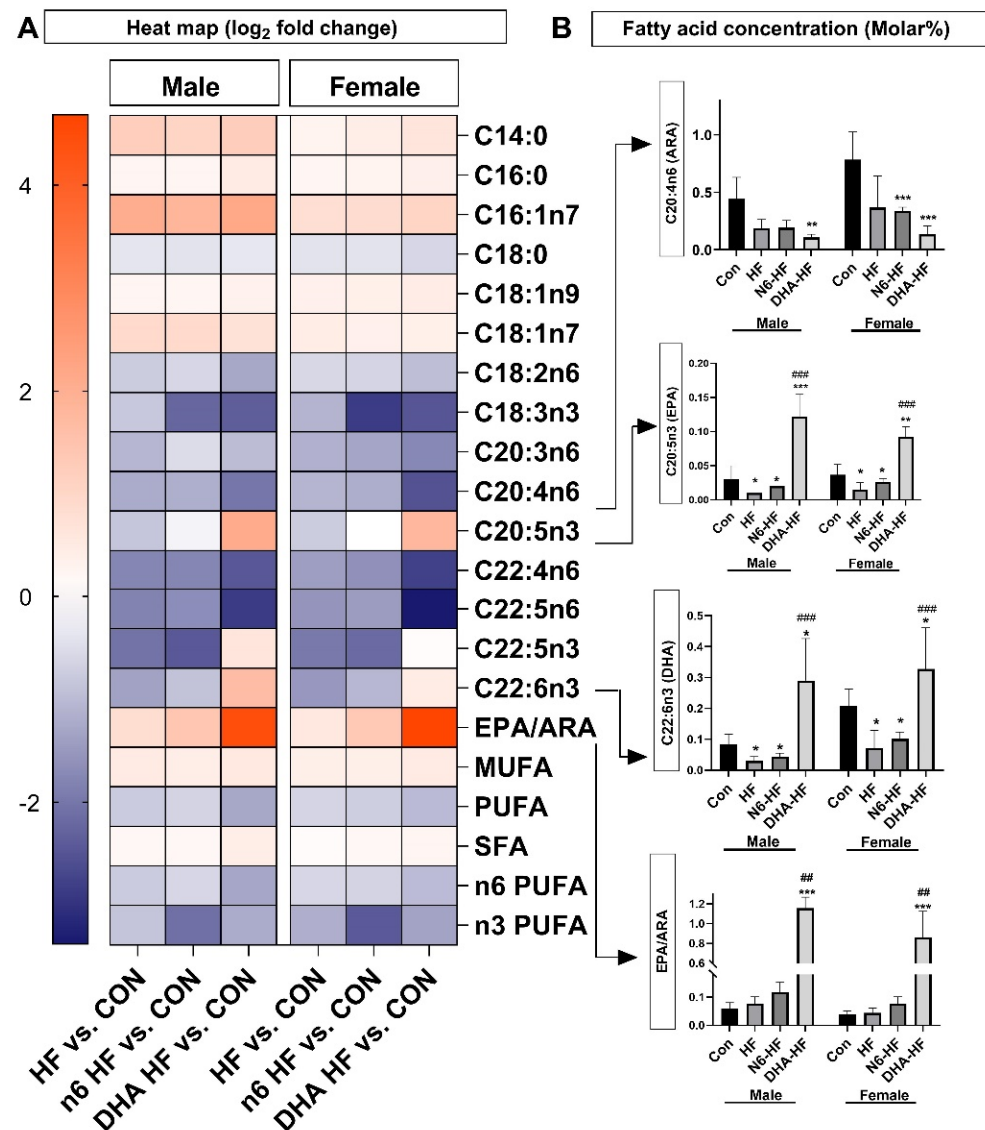


Figure 8. The influence of the treatments on the fatty acid profile of the adipose tissue is presented as a heat map. Values are means \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, for HF, N6-HF, and DHA-HF groups versus the CON group and, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ for N6-HF and DHA-HF groups versus the HF group.

4. Discussion

Obesity is nowadays widely accepted as a significant health problem worldwide, and many studies are trying to elucidate the mechanisms associated with the diet and the onset of obesity. However, there are still many unknowns connected with this highly relevant and timely topic. The association of obesity and dysfunction of lipid metabolism is acknowledged as an important factor related to the genesis of metabolic syndrome. In the present study, long-term fructose administration via drinking water increased fasting insulin values without an increase in the fasting glucose, indicating the early stages of β -cell dysfunction. This finding is not atypical in the early stages of obesity and metabolic syndrome studies characterised by hyperinsulinemia without hyperglycaemia [20]. Different stages of progression to diabetes, characterised by different relationships between insulinemia and glycaemia, are described in human diabetes [21]. Factors that could contribute to the insulin sensitivity indices include study duration, dosage, and the type of diet

used to induce obesity (fructose, sucrose, and fat), weight gain, age, and baseline insulin sensitivity [22]. In addition, insulin sensitivity, determined by measuring HOMA-IR and QUICKI indices, was affected in all fructose treated groups and in both sexes. Nevertheless, from the results of this study, it is evident that a high n6/n3 ratio has a worse effect on insulin sensitivity. It should be noted that insulin sensitivity expressed as HOMA-IR and QUICKI indices cannot be considered as a replacement for direct measurement of insulin resistance, but both provide a reliable approximation of direct measures of insulin resistance in rodents and humans [23].

Although unexpected, a high-fructose diet did not cause a significant increase in body weight, a finding similar to some previous studies [24–26]. Nevertheless, an important observation was that in human studies with fructose-supplemented diets, in which body weight did not increase, the deleterious effects on inflammation were still present [27,28].

Previous research established that fructose overconsumption causes the accumulation of visceral fat [22,29], increases the production of pro-inflammatory adipokines, and activates oxidative stress [30,31]. To evaluate oxidative stress as a key component of metabolic syndrome, the concentration of MDA, as a biomarker of lipid peroxidation, was measured [32,33], as well as NRF 2 expression, which is a key transcription factor with a central role in the endogenous antioxidant cellular defence system. An increase in the MDA concentration is a regular finding in various metabolic disorders [34], and therefore, a marked increase in the serum MDA values was expected in this trial (Figure 3A). Nevertheless, an interesting finding was that a low n6/n3 ratio attenuated an increase in the MDA content, showing that DHA can exhibit antioxidative properties. The antioxidative properties of DHA are still controversial due to the differences in the experimental designs and dose-dependent effects (antioxidative in the smaller dosage and prooxidative in the higher dosage) [35,36], and because the underlying molecular mechanisms are not completely elucidated [37].

As previously established, the changes in NRF 2 expression are associated with different metabolic disorders and inflammation [38]. In this study, fructose significantly decreased the NRF 2 expression. Decreased NRF 2 activity caused by fructose overfeeding was previously observed as a consequence of Keap1 upregulation, which results in inactivation of the NRF 2 antioxidant pathway [39]. The potential modulatory effect of low n6/n3 ratio on NRF 2 expression and overall antioxidative defence was clearly visible in the trial because groups with a low n6/n3 ratio reverted the NRF 2 expression to the values of the control animals [40].

The results showed an increase in the expression of measured inflammatory markers, TNF α , and TGF β . These results are in accordance with the well-known fact that TNF α and TGF β are increased in obesity and related metabolic diseases [41,42]. Moreover, in obesity, infiltration of macrophages into adipose tissue results in the increased secretion of proinflammatory cytokines which further contributes to insulin resistance [43]. It is important to note that a low n6/n3 fatty acid ratio decreased the expression of measured inflammatory markers to the value of the control animals. Although attenuation of the increased expression of inflammatory markers was not visible in all groups, it is evident that a low n6/n3 ratio can modulate chronic low-grade inflammation even in the early hyperinsulinemic stage of metabolic syndrome. In recent decades, it has become obvious that the long-chain n3 fatty acids (particularly DHA and EPA) could ameliorate inflammation associated with different disorders, but the underlying molecular mechanisms are still heavily investigated [35]. The key mechanism of DHA and EPA anti-inflammatory action is a decrease in the production of proinflammatory eicosanoids originating from arachidonic acid [44] and an increase in the production of anti-inflammatory molecules originating from EPA and DHA (e.g., resolvins, protectins, maresins) [45]. In addition, DHA and EPA also have anti-inflammatory effects that are not directly related to eicosanoid production including the influence on the cell surface expression of adhesion molecules [46], inhibition of the synthesis of inflammatory cytokines [47,48], and modulation of the inflammatory gene expression [49,50].

In addition to inflammatory markers, the expression of adiponectin also reverted to physiologic values in rats with a low n6/n3 ratio. Adiponectin is a specific hormone with insulin-sensitising and anti-inflammatory activity and plays a role in glucose and lipid homeostasis [51,52]. Thus, imbalance in adiponectin production in the adipose tissue and in relation to oxidative stress could contribute to the development of insulin resistance and consequently metabolic syndrome [22].

Diets enriched with easily absorbable carbohydrates, such as fructose, are able to potentially stimulate de novo lipogenesis DNL [53]. We measured DNL indirectly by calculating an index based on the fatty acids that are synthesised de novo: palmitoleic (C16:1n7) and oleic (C18:1n9). The results showed increased DNL in all high-fructose-fed groups in comparison with the CON group. C18:1n9 and C16:1n7 and total MUFA were found in increased quantities in the adipose tissue of the high-fructose-fed groups, indicating an increase in the $\Delta 9$ desaturase activity. Furthermore, $\Delta 9$ desaturase catalyses the conversion of C16:0 and C18:0 fatty acids into their monounsaturated forms (C16:1n7 and C18:1n9) [54,55]. We further investigated the calculated indices with RT-qPCR, which confirmed an increase in the quantity of $\Delta 9$ desaturase mRNA. The low n6/n3 ratio decreased $\Delta 9$ desaturase expression, which is in agreement with the well-established role of PUFAs on the expression of $\Delta 9$ desaturase in rodents [18,56,57].

In contrast to MUFA, PUFA content was decreased after fructose treatment in both sexes. The content of essential fatty acids, linoleic and linolenic acid, was also decreased in other investigations with a high content of carbohydrates [18,58]. Linoleic and linolenic acid are precursors for the synthesis of other important n3 and n6 fatty acids in the series of steps of desaturation, elongation, and β oxidation. Therefore, a decrease in either of these two acids results in the decreased content of important PUFAs—namely, ARA, EPA, and DHA [18,59].

Considering PUFA content, EPA and DHA content decreased in the fructose-treated groups, except for the group with the low n6/n3 ratio. This was expected, as the low n6/n3 ratio group had a high content of DHA and EPA in their diet.

The content of arachidonic acid (ARA) significantly decreased in all fructose-treated groups. Arachidonic acid is a precursor for prostaglandins, thromboxanes, and leukotrienes, and is considered a predominant proinflammatory PUFA [60]. In contrast, EPA is considered anti-inflammatory because it is a precursor for less inflammatory eicosanoids and different resolvins, and is a competitive inhibitor of ARA for oxygenases (cyclooxygenase and lipoxygenase). Consequently, the EPA/ARA ratio could be a significant indicator of the degree of inflammatory processes and the development of inflammatory diseases [61].

5. Conclusions

In the present research, we established that the dietary treatment with 15% fructose-induced significant changes in the expression of inflammatory markers, lipid peroxidation, and fatty acid profile (decrease in EPA/ARA ratio and increase in MUFA content) in rat abdominal adipose tissue. These changes undoubtedly point to the susceptibility to chronic low-grade inflammation as a hallmark of many important metabolic and other chronic diseases. The addition of high quantities of dietary DHA and EPA to the fructose-challenged rats, which resulted in a drastic decrease in the n6/n3 ratio, showed a protective effect in a defence mechanism against insulin resistance, inflammation, oxidation, dyslipidaemia, and changes in the fatty acid composition of the rat adipose tissue. In light of the fact that adipose tissue is a source of important PUFAs for other organs, as well as a source of inflammatory cytokines, these changes could have an important role in the development of many chronic diseases in humans and animals. Therefore, all dietary interventions, including supplementation with DHA and EPA and decreasing the n6/n3 ratio, which could attenuate these pathological changes in the adipose tissue, represent interesting strategies in preventing metabolic diseases for which an unmet medical need still exists.

Author Contributions: Conceptualisation, K.S. and T.M.; methodology, T.M.; software, K.S.; validation, K.S. and T.M.; formal analysis, P.R., M.Š. and T.M.; investigation, K.S. and T.M.; resources, K.S.; data curation, K.S.; writing—original draft preparation, K.S., P.R. and D.V.; writing—review and editing, K.S., P.R., D.V., M.Š. and T.M.; visualisation, P.R. and K.S.; supervision, K.S.; project administration, K.S.; funding acquisition, K.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the Croatian Science Foundation as the part of a project “Dietary lipids, sex and age in pathogenesis of metabolic syndrome (IP-2016-06-3163) granted to Kristina Starčević.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Croatian National Ethics Committee and the Ministry of Agriculture, Republic of Croatia (Authorisation EP 107/2017).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Zhang, D.M.; Jiao, R.Q.; Kong, L.D. High dietary fructose: Direct or indirect dangerous factors disturbing tissue and organ functions. *Nutrients* **2017**, *9*, 335. [[CrossRef](#)]
2. Lim, J.S.; Mietus-Snyder, M.; Valente, A.; Schwarz, J.M.; Lustig, R.H. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2010**, *7*, 251–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Cornier, M.A.; Dabelea, D.; Hernandez, T.L.; Lindstrom, R.C.; Steig, A.J.; Stob, N.R.; Van Pelt, R.E.; Wang, H.; Eckel, R.H. The Metabolic Syndrome. *Endocr. Rev.* **2008**, *29*, 777–822. [[CrossRef](#)]
4. Scherer, P.E. Adipose tissue: From lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* **2006**, *55*, 1537–1545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ballak, D.B.; Stienstra, R.; Tack, C.J.; Dinarello, C.A.; van Diepen, J.A. IL-1 family members in the pathogenesis and treatment of metabolic disease: Focus on adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Cytokine* **2015**, *75*, 280–290. [[CrossRef](#)]
6. Calder, P.C.; Yaqoob, P. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and human health outcomes. *BioFactors* **2009**, *35*, 266–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Das, U.N. Essential fatty acids—A review. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2006**, *7*, 467–482. [[CrossRef](#)]
8. Jump, D.B. Mammalian fatty acid elongases. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *579*, 375–389. [[CrossRef](#)]
9. Tu, W.C.; Cook-Johnson, R.J.; James, M.J.; Muhlhausler, B.S.; Gibson, R.A. Omega-3 long chain fatty acid synthesis is regulated more by substrate levels than gene expression. *Prostag. Leukotr. Essent.* **2010**, *83*, 61–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Brenna, J.T. Efficiency of conversion of alpha-linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man. *Curr. Opin. Clin. Nutr.* **2002**, *5*, 127–132. [[CrossRef](#)]
11. Oppedisano, F.; Macri, R.; Gliozzi, M.; Musolino, V.; Carresi, C.; Maiuolo, J.; Bosco, F.; Nucera, S.; Zito, M.C.; Guarnieri, L.; et al. The anti-inflammatory and antioxidant properties of n-3 pufas: Their role in cardiovascular protection. *Biomedicines* **2020**, *8*, 306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Sakamuri, A.; Sakamuri, S.; Kona, S.R.; Jeyapal, S.; Ibrahim, A. Diets with low n-6:n-3 PUFA ratio protects rats from fructose-induced dyslipidemia and associated hepatic changes: Comparison between 18:3 n-3 and long-chain n-3 PUFA. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2020**, *155*, 102082. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Hawkins, R.C. Evaluation of Roche Accu-Chek Go and Medisense Optium blood glucose meters. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **2005**, *353*, 127–131. [[CrossRef](#)]
14. Matthews, D.R.; Hosker, J.P.; Rudenski, A.S.; Naylor, B.A.; Treacher, D.F.; Turner, R.C. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **1985**, *28*, 412–419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Katz, A.; Nambi, S.S.; Mather, K.; Baron, A.D.; Follmann, D.A.; Sullivan, G.; Quon, M.J. Quantitative insulin sensitivity check index: A simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2000**, *85*, 2402–2410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Starcevic, K.; Krstulovic, L.; Brozic, D.; Mauric, M.; Stojevic, Z.; Mikulec, Z.; Bajic, M.; Masek, T. Production performance, meat composition and oxidative susceptibility in broiler chicken fed with different phenolic compounds. *J. Sci. Food Agric.* **2015**, *95*, 1172–1178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497–509. [[CrossRef](#)]
18. Masek, T.; Filipovic, N.; Vuica, A.; Starcevic, K. Effects of treatment with sucrose in drinking water on liver histology, lipogenesis and lipogenic gene expression in rats fed high-fiber diet. *Prostag. Leukotr. Essent.* **2017**, *116*, 1–8. [[CrossRef](#)]

19. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)]
20. Sanchez-Lozada, L.G.; Tapia, E.; Jimenez, A.; Bautista, P.; Cristobal, M.; Nepomuceno, T.; Soto, V.; Avila-Casado, C.; Nakagawa, T.; Johnson, R.J.; et al. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **2007**, *292*, F423–F429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Weir, G.C.; Bonner-Weir, S. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* **2004**, *53*, S16–S21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Stanhope, K.L.; Schwarz, J.M.; Keim, N.L.; Griffen, S.C.; Bremer, A.A.; Graham, J.L.; Hatcher, B.; Cox, C.L.; Dyachenko, A.; Zhang, W.; et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J. Clin. Investig.* **2009**, *119*, 1322–1334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Bowe, J.E.; Franklin, Z.J.; Hauge-Evans, A.C.; King, A.J.; Persaud, S.J.; Jones, P.M. Metabolic phenotyping guidelines: Assessing glucose homeostasis in rodent models. *J. Endocrinol.* **2014**, *222*, G13–G25. [[CrossRef](#)]
24. Karsenty, J.; Landrier, J.F.; Rousseau-Ralliard, D.; Robbez-Masson, V.; Margotat, A.; Deprez, P.; Lechene, P.; Grynberg, A.; Lairon, D.; Planells, R.; et al. Beneficial effects of omega-3 fatty acids on the consequences of a fructose diet are not mediated by PPAR delta or PGC1 alpha. *Eur. J. Nutr.* **2013**, *52*, 1865–1874. [[CrossRef](#)]
25. Baena, M.; Sanguesa, G.; Davalos, A.; Latasa, M.J.; Sala-Vila, A.; Sanchez, R.M.; Roglans, N.; Laguna, J.C.; Alegret, M. Fructose, but not glucose, impairs insulin signaling in the three major insulin-sensitive tissues. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 26149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Starcevic, K.; Roskaric, P.; Speranda, M.; Didara, M.; Kurilj, A.G.; Mauric, M.; Masek, T. High dietary n6/n3 ratio decreases eicosapentaenoic to arachidonic acid ratios and upregulates NFkappaB/p50 expression in short-term low-dose streptozotocin and high-fructose rat model of diabetes. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2019**, *149*, 1–7. [[CrossRef](#)]
27. Sievenpiper, J.L.; de Souza, R.J.; Cozma, A.I.; Chiavaroli, L.; Ha, V.; Mirrahimi, A. Fructose vs. glucose and metabolism: Do the metabolic differences matter? *Curr. Opin. Lipidol.* **2014**, *25*, 8–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Jegatheesan, P.; De Bandt, J.P. Fructose and NAFLD: The multifaceted aspects of fructose metabolism. *Nutrients* **2017**, *9*, 230. [[CrossRef](#)]
29. Jurgens, H.; Haass, W.; Castaneda, T.R.; Schurmann, A.; Koebnick, C.; Dombrowski, F.; Otto, B.; Nawrocki, A.R.; Scherer, P.E.; Spranger, J.; et al. Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice. *Obes. Res.* **2005**, *13*, 1146–1156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Kadowaki, T.; Yamauchi, T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr. Rev.* **2005**, *26*, 439–451. [[CrossRef](#)]
31. Matsuzawa, Y. Adiponectin: Identification, physiology and clinical relevance in metabolic and vascular disease. *Atheroscler. Suppl.* **2005**, *6*, 7–14. [[CrossRef](#)]
32. Nielsen, F.; Mikkelsen, B.B.; Nielsen, J.B.; Andersen, H.R.; Grandjean, P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: Reference interval and effects of life-style factors. *Clin. Chem.* **1997**, *43*, 1209–1214. [[CrossRef](#)]
33. Inoguchi, T.; Li, P.; Umeda, F.; Yu, H.Y.; Kakimoto, M.; Imamura, M.; Aoki, T.; Etoh, T.; Hashimoto, T.; Naruse, M.; et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* **2000**, *49*, 1939–1945. [[CrossRef](#)]
34. Matsuda, M.; Tamura, R.; Kanno, K.; Segawa, T.; Kinoshita, H.; Nishimoto, O.; Nishiyama, H.; Kawamoto, T. Impact of dyslipidemic components of metabolic syndrome, adiponectin levels, and anti-diabetes medications on malondialdehyde-modified low-density lipoprotein levels in statin-treated diabetes patients with coronary artery disease. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2013**, *5*, 77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Calzada, C.; Colas, R.; Guillot, N.; Guichardant, M.; Laville, M.; Véricel, E.; Lagarde, M. Subgram daily supplementation with docosahexaenoic acid protects low-density lipoproteins from oxidation in healthy men. *Atherosclerosis* **2010**, *208*, 467–472. [[CrossRef](#)]
36. Guillot, N.; Caillet, E.; Laville, M.; Calzada, C.; Lagarde, M.; Véricel, E. Increasing intakes of the long-chain omega-3 docosahexaenoic acid: Effects on platelet functions and redox status in healthy men. *FASEB J.* **2009**, *23*, 2909–2916. [[CrossRef](#)]
37. Li, G.; Li, Y.; Xiao, B.; Cui, D.; Lin, Y.; Zeng, J.; Li, J.; Cao, M.J.; Liu, J. Antioxidant Activity of Docosahexaenoic Acid (DHA) and Its Regulatory Roles in Mitochondria. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 1647–1655. [[CrossRef](#)]
38. He, F.; Ru, X.; Wen, T. NRF2, a transcription factor for stress response and beyond. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Zhao, X.J.; Yu, H.W.; Yang, Y.Z.; Wu, W.Y.; Chen, T.Y.; Jia, K.K.; Kang, L.L.; Jiao, R.Q.; Kong, L.D. Polydatin prevents fructose-induced liver inflammation and lipid deposition through increasing miR-200a to regulate Keap1/Nrf2 pathway. *Redox Biol.* **2018**, *18*, 124–137. [[CrossRef](#)]
40. Abrescia, P.; Treppiccione, L.; Rossi, M.; Bergamo, P. Modulatory role of dietary polyunsaturated fatty acids in Nrf2-mediated redox homeostasis. *Prog. Lipid Res.* **2020**, *80*, 101066. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Xu, H.; Barnes, G.T.; Yang, Q.; Tan, G.; Yang, D.; Chou, C.J.; Sole, J.; Nichols, A.; Ross, J.S.; Tartaglia, L.A.; et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Investig.* **2003**, *112*, 1821–1830. [[CrossRef](#)]
42. Hotamisligil, G.S.; Arner, P.; Caro, J.F.; Atkinson, R.L.; Spiegelman, B.M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Investig.* **1995**, *95*, 2409–2415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

43. Samad, F.; Yamamoto, K.; Pandey, M.; Loskutoff, D.J. Elevated expression of transforming growth factor-beta in adipose tissue from obese mice: A potential role in the obesity-linked increase in plasminogen activator inhibitor-1? *Thromb. Haemost.* **1997**, *3*, O1632.
44. Calder, P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, *33*, 423–427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Duvall, M.G.; Levy, B.D. DHA- and EPA-derived resolvins, protectins, and maresins in airway inflammation. *Eur. J. Pharm.* **2016**, *785*, 144–155. [[CrossRef](#)]
46. De Caterina, R.; Cybulsky, M.I.; Clinton, S.K.; Gimbrone, M.A., Jr.; Libby, P. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arter. Thromb.* **1994**, *14*, 1829–1836. [[CrossRef](#)]
47. Khalfoun, B.; Thibault, F.; Watier, H.; Bardos, P.; Lebranchu, Y. Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human endothelial cell production of interleukin-6. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1997**, *400b*, 589–597.
48. Lo, C.J.; Chiu, K.C.; Fu, M.; Lo, R.; Helton, S. Fish oil decreases macrophage tumor necrosis factor gene transcription by altering the NF kappa B activity. *J. Surg. Res.* **1999**, *82*, 216–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Chandrasekar, B.; Fernandes, G. Decreased pro-inflammatory cytokines and increased antioxidant enzyme gene expression by omega-3 lipids in murine lupus nephritis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *200*, 893–898. [[CrossRef](#)]
50. Robinson, D.R.; Urakaze, M.; Huang, R.; Taki, H.; Sugiyama, E.; Knoell, C.T.; Xu, L.; Yeh, E.T.; Auron, P.E. Dietary marine lipids suppress continuous expression of interleukin-1 beta gene transcription. *Lipids* **1996**, *31*, S23–S31. [[CrossRef](#)]
51. Turer, A.T.; Scherer, P.E. Adiponectin: Mechanistic insights and clinical implications. *Diabetologia* **2012**, *55*, 2319–2326. [[CrossRef](#)]
52. Yamauchi, T.; Kadowaki, T. Adiponectin receptor as a key player in healthy longevity and obesity-related diseases. *Cell Metab.* **2013**, *17*, 185–196. [[CrossRef](#)]
53. Roberts, R.; Hodson, L.; Dennis, A.L.; Neville, M.J.; Humphreys, S.M.; Harnden, K.E.; Micklem, K.J.; Frayn, K.N. Markers of de novo lipogenesis in adipose tissue: Associations with small adipocytes and insulin sensitivity in humans. *Diabetologia* **2009**, *52*, 882–890. [[CrossRef](#)]
54. Flowers, M.T.; Ntambi, J.M. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* **2008**, *19*, 248–256. [[CrossRef](#)]
55. Flowers, M.T.; Ntambi, J.M. Stearoyl-CoA desaturase and its relation to high-carbohydrate diets and obesity. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1791*, 85–91. [[CrossRef](#)]
56. Zheng, J.; Peng, C.; Ai, Y.; Wang, H.; Xiao, X.; Li, J. Docosahexaenoic acid ameliorates fructose-induced hepatic steatosis involving ER stress response in primary mouse hepatocytes. *Nutrients* **2016**, *8*, 55. [[CrossRef](#)]
57. Hofacer, R.; Magrisso, I.J.; Jandacek, R.; Rider, T.; Tso, P.; Benoit, S.C.; McNamara, R.K. Omega-3 fatty acid deficiency increases stearoyl-CoA desaturase expression and activity indices in rat liver: Positive association with non-fasting plasma triglyceride levels. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2012**, *86*, 71–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Brenner, R.R.; Rimoldi, O.J.; Lombardo, Y.B.; Gonzalez, M.S.; Bernasconi, A.M.; Chicco, A.; Basabe, J.C. Desaturase activities in rat model of insulin resistance induced by a sucrose-rich diet. *Lipids* **2003**, *38*, 733–742. [[CrossRef](#)]
59. El Hafidi, M.; Cuellar, A.; Ramirez, J.; Banos, G. Effect of sucrose addition to drinking water, that induces hypertension in the rats, on liver microsomal Delta9 and Delta5-desaturase activities. *J. Nutr. Biochem.* **2001**, *12*, 396–403. [[CrossRef](#)]
60. Calder, P.C. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* **2006**, *83*, 1505S–1519S. [[CrossRef](#)]
61. Nelson, J.R.; Raskin, S. The eicosapentaenoic acid:arachidonic acid ratio and its clinical utility in cardiovascular disease. *Postgrad. Med.* **2019**, *131*, 268–277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Long-term supplementation with EPA and DHA changes the fatty acid profile of rat tissues, upregulates NRF2 expression and downregulates TGF β expression

Kristina Starčević^{1*}, Petra Roškarić¹, Valentina Percan¹ and Tomislav Mašek²

¹Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

²Department of Animal Nutrition and Dietetics, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

STARČEVIĆ, K., P. ROŠKARIĆ, V. PERCAN, T. MAŠEK: Long-term supplementation with EPA and DHA changes the fatty acid profile of rat tissues, upregulates NRF2 expression and downregulates TGF β expression. *Vet. arhiv* 93, 709-718, 2023.

ABSTRACT

We studied the influence of long-term treatment with eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) on the liver, and kidney lipogenesis, inflammation and antioxidative gene expression. Male Wistar rats were divided into three groups on the basis of the different n6/n3 fatty acid ratios achieved by using different dietary oil blends: the control (CON, n6/n3 ratio was ~7), the N6 group (n6/n3 ratio was ~50) and the DHA group (n6/n3 ~1). Treatment significantly influenced the fatty acid profile of the liver and kidney tissues. The most characteristic changes were an increased content of EPA and DHA in the DHA group in both tissues, of the kidney and liver. The expression of transforming growth factor beta (TGF- β) was downregulated in the liver tissue by long-term EPA/DHA supplementation. This could be attributed to a decrease in the production of arachidonic acid-derived proinflammatory mediators, and an increase in EPA and DHA derived eicosanoids. DHA and EPA supplementation also significantly increased expression of the NRF 2 gene. This finding suggests that n3 PUFA could influence the activation of the NRF 2 pathway, which is important in cell antioxidative defense. In conclusion, we have shown that long-term dietary supplementation with DHA and EPA could influence lipid metabolism, inflammation and antioxidative defense. Therefore, the long-term addition of dietary DHA and EPA could potentially influence the most important pathological processes in aging.

Key words: n6/n3 ratio; NRF2; DHA; lipogenesis; oxidative stress; aging

*Corresponding author:

Kristina Starčević, Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Heinzelova 55, 10000 Zagreb, Croatia, e-mail: kristina.starcevic@vef.hr

Introduction

Polyunsaturated fatty acids are an important family of lipid compounds, which constitute and influence the physical properties of lipid bilayers, and consequently cell functions (LOPEZ et al., 1995; CALDER, 2006; DAS, 2006). In addition, they are precursors for inflammatory mediators, and act as signaling molecules in cells (SHAIKH and BROWN, 2013). Therefore, a change in the composition of fatty acids could result in different pathological processes in tissues (FRITSCHKE, 2015; LEE et al., 2016). The fatty acid composition of different tissues could be influenced by diet, *de novo* lipogenesis and bioconversion. Fatty acids derived from diet or generated *de novo* are further metabolized by a series of highly regulated steps of desaturation, elongation and β oxidation, into different saturated and unsaturated fatty acids (JUMP, 2009; TU et al., 2010). The bioconversion rate of linolenic acid into the important n3 long chain PUFAs (polyunsaturated fatty acids, eicosapentaenoic acid, EPA and docosahexaenoic acid, DHA) is very low, which implies that a certain percentage of these fatty acids must be obtained from the diet (BRENNAN, 2002). There has been a great deal of research focused on the potentially protective role of n3 PUFA, EPA and DHA against cardiovascular diseases, different metabolic disorders (diabetes, non-alcoholic fatty liver disease), cancer, neurological disorders and inflammatory processes, and related diseases (BONAFINI et al., 2015; OPPEDISANO et al., 2020). The alteration of the PUFA n6/n3 ratio in favor of n3 PUFA could have an important role in the prevention and treatment of metabolic disorders, such as metabolic syndrome (MAŠEK et al., 2018; STARČEVIĆ et al., 2018; SAKAMURI et al., 2020). Lipid metabolism also has an important role in the aging process. There are many scientific studies about the role of PUFA in the development of senile changes in the nervous and musculoskeletal systems, and the beneficial effects of their supplementation on degenerative changes during aging (LOPEZ et al., 1995; CUTULI et al., 2016; LALIA et al., 2017).

The purpose of this study was to investigate the influence of long-term supplementation with EPA

and DHA on the liver and kidney lipid metabolism. Our focus was on characterization of the efficiency of a long-term diet with EPA/DHA for prevention of oxidative and inflammatory injury during aging.

Materials and methods

Animals, experimental design, and diets. The experiments were performed in accordance with the Croatian Animal Welfare Act and were approved by the Croatian National Ethics Committee and the Ministry of Agriculture, Republic of Croatia (authorization EP 107/2017). Animal experiments were performed on 18 male, Wistar HAN rats (initial live weight, 170 ± 6 g, 7 weeks of age). The animals were kept in the animal laboratory facility of the Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb, Croatia. After 2 weeks of acclimation, the rats were divided according to the dietary treatment that included different n6/n3 fatty acid ratios. Different n6/n3 ratios were obtained with the usage of sunflower/linseed/fish oil blends. The resulting groups were: control (CON, n6/n3 ratio was ~ 7), the N6 group (n6/n3 ratio was ~ 50) and the DHA group (n6/n3 ~ 1 , supplemented with fish oil) (Table 1). The rats were kept in polycarbonate cages (61 x 43 x 20 cm, L x W x H) and housed under the conditions of a 12 h light/dark cycle at $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Access to food and water (tap water) was unlimited to all. The rats were weighed in plastic containers at weekly intervals, always at the same time (8 h), using an electronic balance with 0.5g precision.

Sample collection. After 18 months the rats were sacrificed under Narketan/Xylapan anesthesia (Narketan, 80 mg kg^{-1} b.m. and Xylapan, 12 mg kg^{-1} b.m., i.p., Vetoquinol, Bern, Switzerland) followed by exsanguination. Blood was collected by cardiac puncture into ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes. Plasma was obtained by centrifugation at $1500 \times g$ for 5 min. Immediately after the animals were sacrificed, the liver tissue was divided into two samples: (1) stored in an RNA preserving agent (RNA later, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for extraction of mRNA, and (2) frozen at -80°C for the fatty acid analyses.

Analysis of the lipid composition. Total lipids from the liver and kidney tissue were extracted using a chloroform/methanol mixture (2:1, v/v) (FOLCH et al., 1957). After extraction, the lipids were dried under N₂, dissolved in the same mixture (150 µL) with the addition of 0.3 mg/mL BHT, and stored at -80 °C. The analyses of fatty acids were performed by GC-MS (QP2010 Ultra,

Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with a BPX70 capillary column (0.25 mm internal diameter, 0.25 µm film thickness, 30 m long, SGE, Austin, TX, USA). Analytical conditions were set as described previously (MAŠEK et al., 2017). Nonadecanoic fatty acid (C19:0) was used as an internal standard. The results of fatty acid composition were expressed as the percentage of total fatty acids.

Table 1. Fatty acid composition (% of fatty acids) of diets supplemented to the rats

Fatty acids	CON	N6	DHA
Palmitic (C16:0)	7.15	7.36	15.25
Stearic (C18:0)	2.76	2.21	4.25
Oleic (C18:1n9)	28.97	29.10	31.20
Linoleic (C18:2n6)	52.15	58.92	26.38
Linolenic (C18:3n3)	7.39	1.21	0.86
Eicosapentaenoic (C20:5n3)	nd	nd	9.05
Docosahexaenoic (C22:6n3)	nd	nd	10.95
n6/n3 ratio	6.92	48.69	1.26

nd, below quantification level

Desaturation indices. The $\Delta 9$ desaturase activity was estimated as the product to precursor ratio: $\Delta 9 (18) = 18:1n9/18:0$

Analysis of liver gene expression by real-time quantitative PCR. Total RNA was isolated from the frozen liver tissue using the SV Total RNA Isolation System (Promega GMBH, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instruction. The purity and quantity of the RNA samples were checked by spectrophotometry (BioDrop µLITE, BioDrop, Cambridge, UK). One step RT qPCR reaction (One-Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II) of total RNA was conducted according to the manufacturer's manual (Perfect Real Time, TaKaRa Bio Inc. Shiga, Japan). The qPCR was performed using a Stratagene MxPro3005 (Agilent Technologies, US and Canada) thermocycler. The ratio of the relative expression of target genes to

the housekeeping genes was calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method ($2^{(-\Delta\Delta C_t)}$) and values were normalized to housekeeping genes, β -actin and cyclophilin (LIVAK and SCHMITTGEN, 2001). All reactions were performed in triplicate. The primer sequences used in the qPCR reaction are listed in Table 2.

Statistical analyses. The experimental results were analyzed using the GraphPad Prism 8 program. Data were expressed as the means \pm SD. Normality of distribution was tested with the Shapiro–Wilks test. ANOVA and the post-hoc Tukey test were used to determine statistical differences between the group means. Standard deviations of fold changes for the tested gene expression were determined according to the established procedure (LIVAK and SCHMITTGEN, 2001). Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Table 2. Primer sequences and cycling conditions for polymerase chain reactions to evaluate the impact of the treatment in gene expression

Gene	Sequence 5' - 3'	Access. No.	Ann. Tm.	Cycles
TGFβ	F: AAT ACG TCA GAC ATT CGG GAA GCA	NM_021578.2	60°C	40
	R: AAT ACG TCA GAC ATT CGG GAA GCA			
Δ9D	F: ACA TTC AAT CTC GGG AGA ACA	NM_139192.2	60°C	40
	R: CCA TGC AGT CGA TGA AGA AC			
NRF2	F: CAC ATC CAG ACA GAC ACC AGT	NM_031789.2	60°C	40
	R: CTA CAA ATG GGA ATG TCT CTG C			
β-actin	F: CAT TGT CAC CAA CTG GGA CGA TA	XM_039089807.1	60°C	40
	R: GGA TGG CTA CGT ACA TGG CTG			
Cyclophilin	F: GGA TGG CAA GCA TGT GGT CTT TG	M19533	60°C	40
	R: CTT CTT GCT GGT CTT GCC ATT CCT			

TGFβ, Transforming growth factor beta; Δ9D, delta 9 desaturase; NRF 2, Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

Results

After 18 months, the animals assigned to the different experimental diets showed significant differences ($P<0.05$) in body weight (Fig. 1). There was a significant weight reduction ($P<0.05$) in the experimental groups in comparison to the CON group.

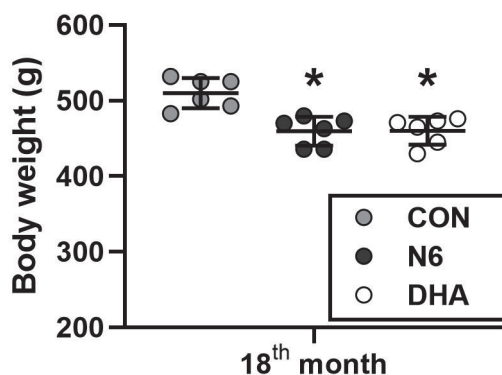


Fig. 1. The influence of different n6/n3 fatty acid ratios on the body weight of the experimental rats. Values are means \pm SD. * $P<0.05$ for N6, and DHA versus the CON group

Quantification of individual fatty acids revealed significant differences between the experimental and control groups in the liver tissue (Fig. 2). The changes that were noticed in the liver tissue were: a significant increase in C18:1n9 ($P<0.05$) and a significant decrease in C18:2 n6 ($P=0.05$) in the N6 group compared to the CON group, and a decrease in the content of arachidonic acid and an increase in the content of DHA and EPA in the DHA group compared to the CON group.

It is noteworthy that a very low content (below quantification level) of EPA groups was observed in the CON and N6 groups after 18 months. In addition, differences between the N6 and DHA groups were also observed. The DHA group had significantly higher values for C18:2 n6 ($P<0.05$), C20:5 n3 and C22:6 n3 ($P<0.001$) and a lower content of C20:4 n6 ($P<0.01$).

Similar patterns were observed in the kidney tissue in the experimental groups. In the N6 group, a significant increase was visible in C 18:1n9 ($P<0.001$) and a significant decrease in C18:2 n6, C22:6 n3 and C20:5 n3 ($P<0.05$, $P<0.01$ and $P<0.01$) in comparison to the DHA group.

The desaturation index for C18 (C18:1n9/C18:0) revealed a significant increase in the N6 group compared to the CON group (Fig. 2).

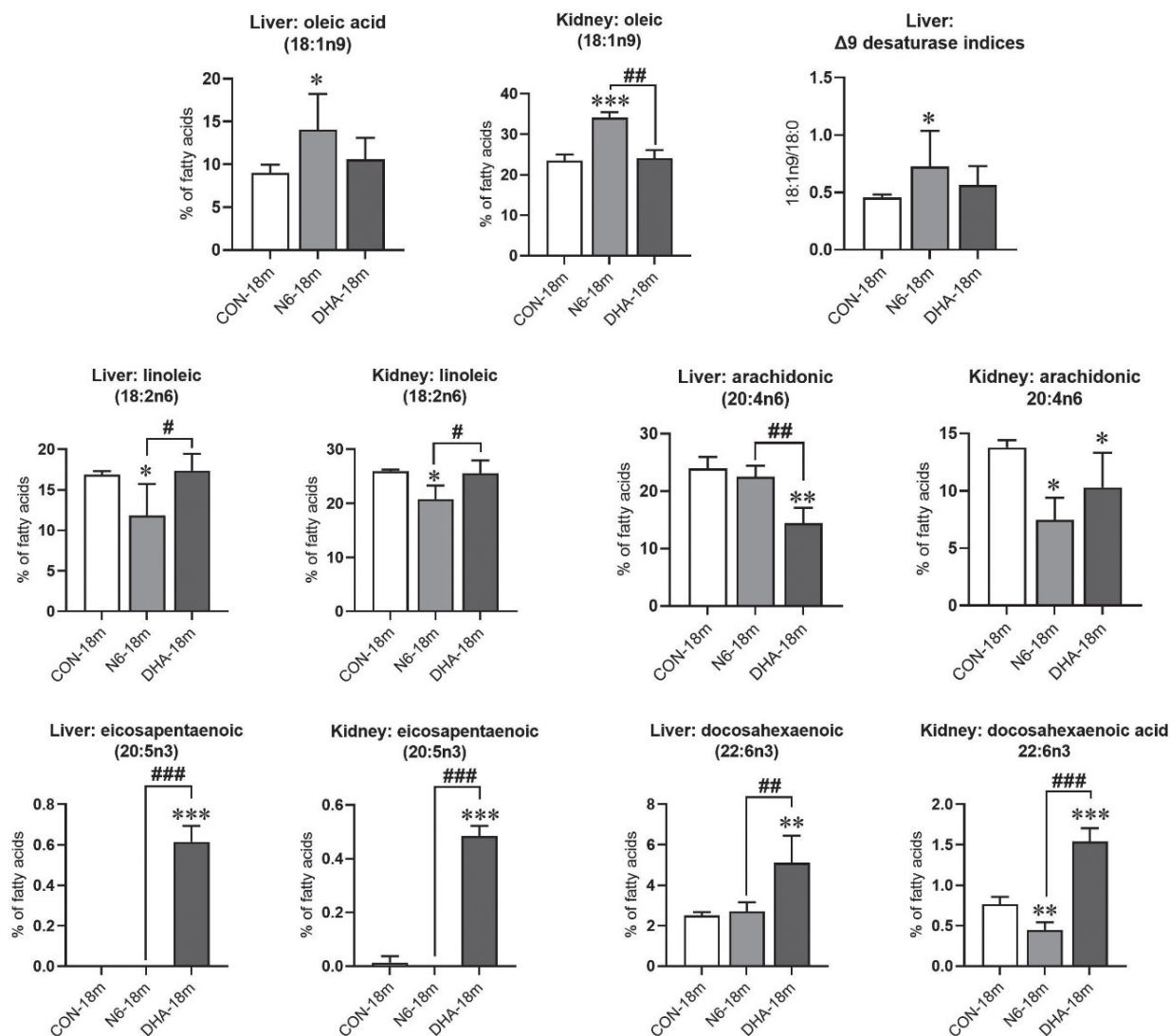


Fig. 2. The influence of long-term supplementation with different n3/n6 ratios on the fatty acid profile of the liver and kidney tissue

Values are means \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, for N6, and DHA versus the CON group and # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, for DHA versus the N6 group

In the liver tissue, we investigated the mRNA expression of $\Delta 9$ desaturase, transforming growth factor β (TGF β) and NRF2 (Fig. 3). Quantitative PCR revealed a significant increase in the $\Delta 9$ desaturase (steroyl-CoA desaturase-1) gene expression in the liver tissue in the N6 group compared to the CON and DHA groups ($P < 0.05$) (Fig. 3). DHA/EPA

supplementation in the diet showed a lowering effect on the TGF β expression in the liver tissue. The mRNA expression of NRF 2 decreased significantly in the N6 group in comparison with the CON group ($P < 0.05$) in the liver tissue (Fig. 3). In contrast, the DHA group showed a significant increase in NRF 2 expression in comparison to the CON group.

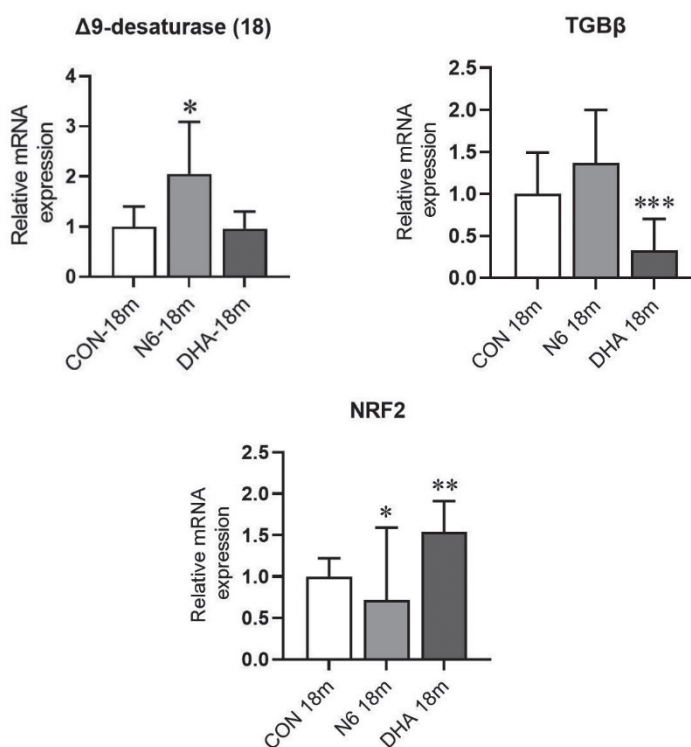


Fig. 3. The effects of treatment on mRNA expression of $\Delta 9$ desaturase, inflammation marker (TGF β) and antioxidative response (NRF2) in the liver tissue

Values are means \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, for N6, and DHA versus the CON group and # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, for the DHA versus the N6 group

Discussion

The purpose of the present study was to assess the effect of long-term EPA/DHA supplementation on the fatty acid composition, inflammation, and oxidative stress markers in liver and renal tissue. The increase in lifespan leads to the emergence of chronic diseases, including those of the cardiac, immune, and nervous systems. In recent decades, the beneficial impact of EPA and DHA supplementation on the prevention of aging-related changes has been observed (VALENCAK and

RUF, 2011). Our study included 18 month long EPA/DHA supplementation in order to study the effects of a long-term low dietary n6/n3 ratio.

Experimental rats fed a low n6/n3 ratio showed a significant reduction in body weight. Similar results were already documented from chronic feeding with a DHA-rich diet which reduced body weight (FELIX-SORIANO et al.; 2021, YANG et al., 2021). In our trial, we observed that long-term supplementation with a low n6/n3 fatty acid ratio (high quantities of DHA and EPA) changed the fatty

acid composition of liver and renal tissue. EPA/DHA supplementation decreased the content of oleic acid and $\Delta 9$ desaturase expression, indicating decreased *de novo* lipogenesis. This result supports the well-established role of PUFAs in the expression of $\Delta 9$ desaturase in rodents (HOFACER et al., 2012; MAŠEK et al., 2017; ROŠKARIĆ et al., 2021).

Oxidative stress is recognized as a trigger for the development of many different metabolic disorders which are related to a prolonged lifespan, because adaptive response to oxidative stress declines with aging (LIGUORI et al., 2018). Therefore, we studied the effect of prolonged feeding with EPA/DHA on nuclear factor erythroid 2-like 2 (NRF2). NRF2 is a transcriptional factor that has emerged as the most important cellular defense pathway against oxidative stress (CIGLIANO et al., 2019). The potential effect of long-term EPA/DHA supplementation on NRF 2 expression and overall antioxidative defense was visible in our trial, because supplementation increased NRF2 mRNA expression in the liver tissue. Therefore, slowing the aging process by regulating transcription factor NRF2 could be an interesting strategy to attenuate age-related diseases (BRUNS et al., 2015; ROŠKARIĆ et al., 2021).

The content of arachidonic acid (ARA) was significantly decreased in the liver and kidney tissue in the group supplemented with EPA/DHA. Arachidonic acid is a precursor for a variety of bioactive lipid molecules that have an important role in the development of inflammation. In contrast, EPA-derived eicosanoids are less inflammatory, therefore, the EPA/ARA ratio could be used as an indicator of inflammatory processes. EPA content was extremely low in 18-month-old rats (CON group), as well as in the group fed a high n6/n3 ratio (N6 group). The supplementation with EPA/DHA significantly improved the EPA/ARA ratio by increasing the level of EPA in the liver and kidneys.

From the obtained results it is evident that prolonged feeding with different PUFAs could also influence the expression of TGF β , which is a pleiotropic cytokine that plays an important role in physiological tissue homeostasis, and various pathological conditions (TOMINAGA and

SUZUKI, 2019). The decrease in TGF β expression observed in the DHA/EPA supplemented group could be an indicator of the capability of DHA and EPA to attenuate low-grade inflammation, which is nowadays considered as a hallmark of many metabolic diseases and tumors (MICCADEI et al., 2016). The key mechanism of DHA and EPA's anti-inflammatory action is a decrease in the production of ARA-derived proinflammatory mediators, and an increase in the production of eicosanoids originating from EPA and DHA, as well as EPA and DHA-derived resolvins, protectins and maresins (DUVALL and LEVY, 2016). Additionally, DHA and EPA exert anti-inflammatory effects that are not directly related to eicosanoid production, such as: modulation of inflammatory gene expression (CHANDRASEKAR and FERNANDES, 1994; ROBINSON et al., 1996), their influence on the cell surface expression of adhesion molecules (DE CATERINA et al., 1994), and inhibition of the synthesis of inflammatory cytokines (LO et al., 1999).

Conclusions

The positive effects of n3 PUFA on health could be attributed to many different pathways. Our trial showed that among these different pathways, long-term n3 PUFA supplementation could substantially influence lipid metabolism, oxidation, and inflammation. Therefore, the long-term addition of dietary DHA and EPA could potentially influence the most important pathological processes in aging.

References

- BONAFINI, S., F. ANTONIAZZI, C. MAFFEIS, P. MINUZ, C. FAVA (2015): Beneficial effects of omega-3 PUFA in children on cardiovascular risk factors during childhood and adolescence. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 120, 72-79.
DOI:10.1016/j.prostaglandins.2015.03.006
- BRENNAN, J. T. (2002): Efficiency of conversion of alpha-linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 5, 127-132.
DOI: 10.1097/00075197-200203000-00002
- BRUNS, D. R., J. C. DRAKE, L. M. BIELA, F. F. PEELOR 3rd, B. F. MILLER, K. L. HAMILTON (2015): Nrf2 Signaling and the Slowed Aging Phenotype: Evidence

- from Long-Lived Models. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 732596.
DOI:10.1155/2015/732596
- CALDER, P. C. (2006): n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, S1505-S1519.
DOI:10.1093/ajcn/83.6.1505S
- CHANDRASEKAR, B., G. FERNANDES (1994): Decreased pro-inflammatory cytokines and increased antioxidant enzyme gene expression by omega-3 lipids in murine lupus nephritis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200, 893-898.
DOI:10.1006/bbrc.1994.1534
- CIGLIANO, L., M. S. SPAGNUOLO, F. BOSCAINO, I. FERRANDINO, A. MONACO, T. CAPRIELLO, E. COCCA, L. IANNOTTA, L. TREPPICIONE, D. LUONGO, F. MAURANO, M. ROSSI, P. BERGAMO (2019): Dietary Supplementation with Fish Oil or Conjugated Linoleic Acid Relieves Depression Markers in Mice by Modulation of the Nrf2 Pathway. *Mol. Nutr. Food Res.* 63, e1900243.
DOI:10.1002/mnfr.201900243
- CUTULI, D., M. PAGANI, P. CAPORALI, A. GALBUSERA, D. LARICCHIUTA, F. FOTI, C. NERI, G. SPALLETTA, C. CALTAGIRONE, L. PETROSINI, A. GOZZI (2016): Effects of Omega-3 Fatty Acid Supplementation on Cognitive Functions and Neural Substrates: A Voxel-Based Morphometry Study in Aged Mice. *Front. Aging Neurosci.* 8, 38.
DOI:10.3389/fnagi.2016.00038
- DAS, U. N. (2006): Essential fatty acids - A review. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 7, 467-482.
DOI: 10.2174/138920106779116856
- DE CATERINA, R., M. I. CYBULSKY, S. K. CLINTON, M. A. GIMBRONE JR., P. LIBBY (1994): The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb.* 14, 1829-1836.
DOI:10.1161/01.atv.14.11.1829
- DUVALL, M. G., B. D. LEVY (2016): DHA- and EPA-derived resolvins, protectins, and maresins in airway inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* 785, 144-155.
DOI:10.1016/j.ejphar.2015.11.001
- FELIX-SORIANO, E., N. SAINZ, E. GIL-ITURBE, M. COLLANTES, M. FERNANDEZ-GALILEA, R. CASTILLA-MADRIGAL, L. LY, J. DALLI, M. J. MORENO-ALIAGA (2021): Changes in brown adipose tissue lipid mediator signatures with aging, obesity, and DHA supplementation in female mice. *FASEB J.* 35, e21592.
DOI:10.1096/fj.202002531R
- FOLCH, J., M. LEES, G. H. SLOANE STANLEY (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- FRITSCHKE, K. L. (2015): The science of fatty acids and inflammation. *Adv. Nutr.* 6, 293S-301S.
DOI:10.3945/an.114.006940
- HOFACER, R., I. J. MAGRISSO, R. JANDACEK, T. RIDER, P. TSO, S. C. BENOIT, R. K. MCNAMARA (2012): Omega-3 fatty acid deficiency increases stearoyl-CoA desaturase expression and activity indices in rat liver: positive association with non-fasting plasma triglyceride levels. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 86, 71-77.
DOI:10.1016/j.plefa.2011.10.003
- JUMP, D. B. (2009): Mammalian fatty acid elongases. *Methods Mol. Biol.* 579, 375-389.
DOI:10.1007/978-1-60761-322-0_19
- LALIA, A. Z., S. DASARI, M. M. ROBINSON, H. ABID, D. M. MORSE, K. A. KLAUS, I. R. LANZA (2017): Influence of omega-3 fatty acids on skeletal muscle protein metabolism and mitochondrial bioenergetics in older adults. *Aging* 9, 1096-1129.
DOI:10.18632/aging.101210
- LEE, J. M., H. LEE, S. KANG, W. J. PARK (2016): Fatty Acid Desaturases, Polyunsaturated Fatty Acid Regulation, and Biotechnological Advances. *Nutrients* 8, 23.
DOI:10.3390/nu8010023
- LIGUORI, I., G. RUSSO, F. CURCIO, G. BULLI, L. ARAN, D. DELLA-MORTE, G. GARGIULO, G. TESTA, F. CACCIATORE, D. BONADUCE, P. ABETE (2018): Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin. Interv. Aging.* 13, 757-772.
DOI:10.2147/CIA.S158513
- LIVAK, K. J., T. D. SCHMITTGEN (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
DOI:10.1006/meth.2001.1262
- LO, C. J., K. C. CHIU, M. FU, R. LO, S. HELTON (1999): Fish oil decreases macrophage tumor necrosis factor gene transcription by altering the NF kappa B activity. *J. Surg. Res.* 82, 216-221.
DOI:10.1006/jsre.1998.5524
- LOPEZ, G. H., M. G. ILINCHETA DE BOSCHERO, P. I. CASTAGNET, N. M. GIUSTO (1995): Age-associated changes in the content and fatty acid composition of brain glycerophospholipids. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 112, 331-343.
DOI:10.1016/0305-0491(95)00079-8
- MAŠEK, T., N. FILIPOVIĆ, A. GALAN, K. STARČEVIĆ (2018): Chronic sucrose intake increases expression of SREBP-1c and inflammatory response genes in rat kidneys

- without significant changes in long chain polyunsaturated fatty acid content. *Vet. arhiv* 88, 497-510.
DOI:10.24099/vet.arhiv.0025
- MAŠEK, T., N. FILIPOVIĆ, A. VUICA, K. STARČEVIĆ (2017): Effects of treatment with sucrose in drinking water on liver histology, lipogenesis and lipogenic gene expression in rats fed high-fiber diet. *Prostaglandins Leukot. Eessent. Fatty Acids* 116, 1-8.
DOI:10.1016/j.plefa.2016.11.001
- MICCADEI, S., R. MASELLA, A. M. MILEO, S. GESSANI (2016): ω 3 Polyunsaturated Fatty Acids as Immunomodulators in Colorectal Cancer: New Potential Role in Adjuvant Therapies. *Front. Immunol.* 7, 486.
DOI:10.3389/fimmu.2016.00486
- OPPEDISANO, F., R. MACRI, M. GLIOZZI, V. MUSOLINO, C. CARRESI, J. MAIUOLO, F. BOSCO, S. NUCERA, M. C. ZITO, L. GUARNIERI, F. SCARANO, C. NICITA, A. R. COPPOLETTA, S. RUGA, M. SCICCHITANO, R. MOLLACE, E. PALMA, V. MOLLACE (2020): The Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of n-3 PUFAs: Their Role in Cardiovascular Protection. *Biomedicines* 8, 306.
DOI: 10.3390/biomedicines8090306
- ROBINSON, D. R., M. URAKAZE, R. HUANG, H. TAKI, E. SUGIYAMA, C. T. KNOELL, L. XU, E. T. YEH, P. E. AURON (1996): Dietary marine lipids suppress continuous expression of interleukin-1 beta gene transcription. *Lipids* 31, S23-S31.
DOI:10.1007/BF02637046
- ROŠKARIĆ, P., M. ŠPERANDA, T. MAŠEK, D. VERBANAC, K. STARČEVIĆ (2021): Low Dietary n6/n3 Ratio Attenuates Changes in the NRF 2 Gene Expression, Lipid Peroxidation, and Inflammatory Markers Induced by Fructose Overconsumption in the Rat Abdominal Adipose Tissue. *Antioxidants* 10, 2005.
DOI:10.3390/antiox10122005
- SAKAMURI, A., S. SAKAMURI, S. R. KONA, S. JEYAPAL, A. IBRAHIM (2020): Diets with low n-6:n-3 PUFA ratio protects rats from fructose-induced dyslipidemia and associated hepatic changes: Comparison between 18:3 n-3 and long-chain n-3 PUFA. *Prostaglandins Leukot. Eessent. Fatty Acids* 155, 102082.
DOI:10.1016/j.plefa.2020.102082
- SHAIKH, S. R., D. A. BROWN (2013): Models of plasma membrane organization can be applied to mitochondrial membranes to target human health and disease with polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot. Eessent. Fatty Acids* 88, 21-25.
DOI:10.1016/j.plefa.2012.03.004
- STARČEVIĆ, K., M. MAURIĆ, A. GALAN, A. GUDAN KURILJ, T. MAŠEK (2018): Effects of different n6/n3 ratios and supplementation with DHA and EPA on the testicular histology and lipogenesis in streptozotocin-treated rats. *Andrologia* 50, e13067.
DOI:10.1111/and.13067
- TOMINAGA, K., H. I. SUZUKI (2019): TGF-beta Signaling in Cellular Senescence and Aging-Related Pathology. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 5002.
DOI:10.3390/ijms20205002
- TU, W. C., R. J. COOK-JOHNSON, M. J. JAMES, B. S. MUHLHAUSLER, R. A. GIBSON (2010): Omega-3 long chain fatty acid synthesis is regulated more by substrate levels than gene expression. *Prostaglandins Leukot. Eessent. Fatty Acids* 83, 61-68.
DOI: 10.1016/j.plefa.2010.04.001
- VALENCAK, T. G., T. RUF (2011): Feeding into old age: long-term effects of dietary fatty acid supplementation on tissue composition and life span in mice. *J. Comp. Physiol. B* 181, 289-298.
DOI:10.1007/s00360-010-0520-8
- YANG, J., N. SÁINZ, E. FÉLIX-SORIANO, E. GIL-ITURBE, R. CASTILLA-MADRIGAL, M. FERNÁNDEZ-GALILEA, J. A. MARTÍNEZ, M. J. MORENO-ALIAGA (2021): Effects of Long-Term DHA Supplementation and Physical Exercise on Non-Alcoholic Fatty Liver Development in Obese Aged Female Mice. *Nutrients* 13, 501.
DOI: 10.3390/nu13020501

Received: 6 April 2022

Accepted: 24 May 2022

STARČEVIĆ, K., P. ROŠKARIĆ, V. PERCAN, T. MAŠEK: Dugotrajno dodavanje EPA i DHA mijenja profil masnih kiselina u tkivima štakora, povećava ekspresiju gena NRF2 i smanjuje ekspresiju TGFβ. Vet. arhiv 93, 709-718, 2023.

SAŽETAK

Istraživali smo utjecaj dugotrajnog dodatka EPA i DHA u hrani na ekspresiju gena upalnog odgovora, oksidacijski status i lipogenezu. Mužjaci Wistar štakora podijeljeni su u tri skupine: kontrolnu skupinu (CON, omjer n6/n3 bio je ~7), skupinu N6 (omjer n6/n3 ~50) i DHA skupinu (n6/n3 ~1). Dodatak je znakovito utjecao na sastav masnih kiselina tkiva jetre i bubrega. Najznakovitija promjena vezana je uz povećanje koncentracije EPA i DHA u tkivu bubrega i jetre kod DHA skupine. Ekspresija TGFβ smanjena je u tkivu jetre nakon dugotrajnog dodatka EPA/DHA. Takav učinak EPA i DHA dodatka u hrani povezuje se s njihovim pozitivnim utjecajem na sintezu protuupalnih eikozanoida. Dodatak DHA i EPA također je znakovito povećao ekspresiju NRF2 gena. Ovo otkriće sugerira da n3 PUFA može utjecati na aktivaciju NRF2 puta koji je važan u antioksidacijskoj obrani stanice. Rezultati su pokazali da dugotrajni dodatak DHA i EPA može utjecati na metabolizam lipida, upalu i antioksidacijsku obranu. Stoga bi dugotrajno dodavanje DHA i EPA u hrani moglo pozitivno utjecati na sprječavanje razvoja patoloških procesa tijekom starenja.

Ključne riječi: n6/n3 omjer; NRF2; DHA; lipogeneza; oksidacijski stres; starenje
