

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

MARJAN URLIĆ, dr. med.

**UTJECAJ RAZLIČITIH OMJERA $n6/n3$ VIŠESTRUKO NEZASIĆENIH MASNIH
KISELINA U HRANI NA SRČANU DIJABETIČKU NEUROPATIJU I IZRAŽAJ
KONEKSINA 37 I 43 U SRČANOM MIŠIĆU ŠTAKORA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Split, 2023.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za eksperimentalnu neurokardiologiju pri Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Splitu.

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

ZAHVALA

Neizmjerno hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Nataliji Filipović, bez koje ovaj rad ne bi bio moguć niti ostvaren, na nesebičnoj pomoći i strpljenju, od samog idejnog začetka do kraja, na bezuvjetnoj podršci koju mi je pružala tijekom godina izrade ove disertacije, na neiscrpnoj motivaciji i velikodušnoj dostupnosti.

Zahvaljujem svim suradnicima Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju na pomoći tijekom istraživanja.

Zahvaljujem svojoj supruzi Ivanki na pomoći, potpori i razumijevanju.

Neizmjerno hvala obitelji, ocu Anti na podršci i poticanju.

SADRŽAJ PREMA POGLAVLJIMA

1. UVOD	1
1.1. Šećerna bolest.....	2
1.1.1 Šećerna bolest tipa 1	2
1.1.2. Idiopatska šećerna bolest.....	3
1.1.3. Šećerna bolest tipa 2 (diabetes mellitus type 2 - DM2)	3
1.2. SRČANA INERVACIJA	4
1.2.1. Autonomna inervacija srca	5
1.2.2. Osjetna inervacija srca	6
1.2.3. Srčana neuronalna hijerarhija	6
1.2.4. Srčana inervacija u dijabetesu	8
1.3. Polinezasićene masne kiseline.....	11
1.3.1. Omega 6 i omega 3 PUFA-e.....	11
1.3.2. Utjecaj PUFA na perifernu i autonomnu inervaciju	12
1.4. Koneksini	14
1.4.1. Koneksini u dijabetesu	16
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	18
3. HIPOTEZE.....	20
4. METODE ISTRAŽIVANJA	22
4.1. Pokusne životinje	23
4.2. Postupci	24
4.3. Materijali	25
4.4. Statistički postupci	27
5. REZULTATI.....	28
5.1. Broj i gustoća PgP 9.5- imunoreaktivnih vlakana u srcu	32
5.2. Gustoća NF 200-imunoreaktivnih živčanih vlakana u subendokardijalnom dijelu septuma srca	34
5.3. Gustoća CGRP-imunoreaktivnih živčanih vlakana u subendokardijalnom dijelu septuma srca	35
5.4. Gustoća TH-imunoreaktivnih živčanih vlakana u subendokardijalnom dijelu septuma	37
5.5. Gustoća ChAT-imunoreaktivnih živčanih vlakana u subendokardijalnom dijelu septuma	38
5.6. Imunoreaktivnost Cx37 u septumu srca pokusnih štakora.....	40
5.7. Imunoreaktivnost Cx43 u septumu srca pokusnih štakora.....	42
6. RASPRAVA.....	44

7. ZAKLJUČCI.....	53
8. SAŽETAK.....	56
9. SUMMARY	59
10. LITERATURA	61
11. ŽIVOTOPIS	72

POPIS OZNAKA I KRATICA

^{123}I mIBG - radioaktivni izotop joda ^{123}I

ALA - alfa-linolenska kiselina (engl. *alpha-linolenic acid*)

ARA - arahidonska kiselina (engl. *arachidonic acid*)

C - cervikalni dio kralježnične moždine

CAN - srčana autonomna neuropatija (engl. *cardiac autonomic neuropathy*)

CGRP - peptid vezan za gen za kalcitonin (engl. *calcitonin gene related peptide*)

ChAT - kolin acetil transferaza (engl. *choline acetyltransferase*)

Cx 37 - koneksin 37 (engl. *connexin 37*)

Cx 43 - koneksin 43 (engl. *connexin 43*)

DHA - dokozahekseanoična kiselina (engl. *docosahexaenoic acid*)

DM - šećerna bolest (lat. *diabetes mellitus*)

DM1 - šećerna bolest tip 1 (engl. *diabetes mellitus type I*)

DM2 - šećerna bolest tipa 2 (engl. *diabetes mellitus type II*)

EPA - eikozapentaenoična kiselina (engl. *eicosapentaenoic acid*)

GAD 65 - glutamat dekarboksilaza 65 (engl. *glutamic acid decarboxylase*)

GJIC - kanal koji spaja dvije stanice (engl. *gap junctional intercellular communication*)

HbA1c - glikozilirani hemoglobin

HLA - humani leukocitni antigen (engl. *human leukocyte antigen*)

HMR - omjer srca u odnosu na medijastinum (engl. *heart to mediastinum ratio*)

IB4 - izolektin B4

n3 - omega 3 nezasićene masne kiseline

n6 - omega 6 nezasićene masne kiseline

NF200 - neurofilament 200 kD

NGF - faktor rasta živaca (engl. *nerve growth factor*)

PBS - otopina fosfatnog pufera (engl. *phosphate buffered saline*)

PGP 9.5 - protein gen vezani peptid 9.5 (engl. *protein gene related peptide 9.5*)

PUFA - višestruko nezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acids*)

ROS - reaktivni kisikovi spojevi (engl. *reactive oxygen species*)

SCD - iznenadna srčana smrt (engl. *sudden cardiac death*)

SP - tvar P (engl. *substance P*)

STZ - streptozotocin

SŽS - središnji živčani sustav

TH - tirozin hidroksilaza (engl. *tyrosine hydroxylase*)

Th - torakalni dio kralježnične moždine

ZnT8 - cinkov transporter 8

ŽS - živčani sustav

β AR - beta adrenergički receptori

1. UVOD

1.1. Šećerna bolest

Šećerna bolest (*diabetes mellitus* - DM) je metabolički poremećaj povezan sa mikrovaskularnim i makrovaskularnim komplikacijama, kao npr. retinopatija, nefropatija, neuropatija i kardiovaskularne bolesti, a čija patogeneza uključuje hiperglikemiju, inzulinsku rezistenciju, dislipidemiju, hipertenziju i disfunkciju imunskog sustava. Metabolički poremećaji tijekom šećerne bolesti dovode do difuzne ozljede perifernih i autonomnih živaca, kao i ozljede malih krvnih žila (1).

Dijabetička kardiomiopatija, čiji su patofiziološki mehanizmi još nedovoljno razjašnjeni, obuhvaća oštećenje kontraktilnih kardiomiocita, kao i autonomne i osjetne inervacije srca, koja posljedično tome vodi do malignih aritmija kao najčešćeg uzroka iznenadne srčane smrti (engl. sudden cardiac death - SCD (2)).

1.1.1 Šećerna bolest tipa 1

Na šećernu bolest tipa I (*diabetes mellitus type 1* - DM1), koja je prethodno nazivana i „o inzulinu - ovisna šećerna bolest” ili „juvenilna šećerna bolest”, otpada oko 5-10% slučajeva DM. Ona nastaje posljedično autoimunosnoj destrukciji gušteračinih beta stanica te je definirana prisutnošću jednog ili više biljega autoimunosti biljega (protutijela na stanice otočića, protutijela na glutamat dekarboksilazu 65 - GAD65, protutijela na inzulini, protutijela na tirozin fosfatazu IA-2 i IA2 β , protutijela na cink transporter 8 - ZnT8, itd) (1).

Destrukcija Langerhansovih otočića pa time i prezentacija kliničke slike varira, od galopirajućeg nastupa bolesti u vidu ketoacidoze kao prve manifestacije (većinom u novorođenčadi i djece) do sporijeg razvitka bolesti, manifestirajući se kao blaga dugogodišnja hiperglikemija natašte (u odraslih), godinama zadržavajući dovoljnu funkciju beta stanica, uz moguće brzo pogoršanje uslijed infekcije ili stresa. U kasnijoj fazi bolesti dolazi do niskih/nedetektabilnih razina C-peptida u plazmi, što označava sasvim nisko lučenje inzulina ili potpuni prestanak istog. DM1 se najčešće tipično očituje u djetinjstvu ili kasnoj adolescenciji, ali može se javiti u bilo kojoj dobi pa čak i kasnijim desetljećima života. Osim genetske predispozicije, povezan je i s okolišnim čimbenicima, iako još uvijek nedovoljno istraženim. Pacijenti koji boluju od DM1 karakteristično nisu pretili (kao oni s DM2), iako pretilost ne isključuje dijagnozu DM1. Skloniji su razvitku i drugih, pridruženih

autoimunskih poremećaja kao što je Gravesova bolest, Hashimotov tireoiditis, Addisonova bolest, vitiligo, autoimuni hepatitis, miastenija gravis i perniciozna anemija (3).

1.1.2. Idiopatska šećerna bolest

U skupinu idiopatske šećerne bolesti ubraja se manjina slučajeva pacijenata koji boluju od DM1, ali bez poznate etiologije, koji su skloniji razvitku epizodne ketoacidoze, uz različiti stupanj manjka inzulina između epizoda, ali kod njih ne postoji dokaz za autoimunosnu etiologiju bolesti. Ovaj tip šećerne bolesti je visoko nasljedan, ali mu nedostaju tipične karakteristike DM1: biljezi autoimunosti na beta stanice gušterače te HLA (human leukocyte antigen) tipična za DM1. Povremeno se mora liječiti nadoknadom inzulina (4).

1.1.3. Šećerna bolest tipa 2 (diabetes mellitus type 2 - DM2)

Ovaj oblik šećerne bolesti, ranije nazivan "šećerna bolest neovisna o inzulinu" ili "kasni tip šećerne bolesti", čini otprilike oko 90-95% slučajeva šećerne bolesti. DM2 zahvaća pojedince koji imaju inzulinsku rezistenciju i obično relativni (prije nego apsolutni) deficit inzulina. Na početku i često kroz život ovi pojedinci neće trebati liječenje inzulinom da bi preživjeli (2).

Uzroci DM2 su različiti. Iako je specifična etiologija nepoznata, tijekom DM2 ne dolazi do autoimune destrukcije beta stanica i nije prisutan neki drugi uzrok nastanka DM. Većina pacijenata koji boluju od DM2 su pretili. Sama pretilost uzrokuje određeni stupanj inzulinske rezistencije. Pacijenti koji nisu pretili po tradicionalnim kriterijima težine, mogu imati povećan postotak tjelesne masnoće distribuiran najviše u abdominalnoj regiji (3).

Ketoacidoza se rijetko pojavljuje u DM2, a kada se pojavi, uobičajeno je povezana sa stresom i drugim bolestima, kao npr. infekcijama. Često bude dugo nedijagnosticirana, jer se hiperglikemija razvija postepeno, a u ranijim fazama i ne uzrokuje ozbiljnije komplikacije da bi pacijent primijetio klasične simptome DM. Unatoč tome, takvi pacijenti imaju povećan rizik razvoja makrovaskularnih i mikrovaskularnih komplikacija (4).

Dok pacijenti oboljeli od DM2 imaju normalne ili povišene razine inzulina, povećane razine glukoze u krvi ovih pacijenata bi očekivano dovele do viših razina inzulina nego da je

funkcija njihovih beta stanica normalna. Izlučivanje inzulina je defektno u ovih pacijenata i nedostavno da kompenzira inzulinsku rezistenciju. Inzulinska rezistencija može se smanjiti smanjenjem tjelesne težine i/ili farmakološkim liječenjem hiperglikemije, ali se rijetko vraća na normalnu razinu.

Rizik razvoja DM2 se povećava s dobi, pretilošću i nedostatkom fizičke aktivnosti. Pojavljuje se češće u žena koje su prethodno oboljele od gestacijskog dijabetesa, u onih sa hipertenzijom ili dislipidemijom i u određenih rasnih/etničkih skupina (afroamerikanci, američki indijanci, latino, azijati amerikanci). Često je povezan s jakom genetičkom predispozicijom, više nego DM1. Međutim, genetika DM2 još nije dovoljno razjašnjena (2).

1.2. SRČANA INERVACIJA

Živčani sustav sastoji se od središnjeg i perifernog živčanog sustava. Središnji živčani sustav (SŽS) sačinjava mozak (veliki, mali mozak i produljena moždina) te kralježnična moždina. Funkcijski se živčani sustav dijeli na autonomni (simpatikus i parasimpatikus) i somatski sustav. Aksoni neurona autonomnog živčanog sustava (AŽS) koji opskrbljuju ciljna tkiva, uključujući i srce, mogu biti eferentni (motorni) i aferentni (osjetni). U slučaju AŽS, aferentna vlakna prenose informacije iz središnjeg živčanog sustava na periferiju - u glatke mišiće, srčani mišić, žlijezde i masno tkivo, dok aferentna prenose podražaje s periferije - iz osjetnih receptora, većinom u visceralnim organima do SŽS-a (5). Eferentni dio AŽS-a se nadalje može podijeliti na dva segmenta: simpatički i parasimpatički.

Autonomni motorni putevi se sastoje od dva motorna neurona: preganglijski neuron, sa tijelom u SŽS-u i aksonom koji ide do autonomnih ganglija (izvan SŽS-a) te postganglijski neuron, čije je tijelo smješteno u autonomnom gangliju, a akson se proteže do ciljnog organa (6). U slučaju simpatičkog živčanog sustava, tijelo preganglijskog neurona smješteno je u interemediolateralnoj kolumni kralježnične moždine prsnog i gornjeg slabinskog segmenta, a postganglijski neuroni nalaze se u paravertebralnim ganglijima simpatičkog lanca ili u prevertebralnim ganglijima smještenim ispred trbušne aorte. Tijela preganglijskih neurona parasimpatičkog živčanog sustava nalaze se bilo u moždanom deblu, bilo u lateralnim područjima sive tvari sakralnog segmenta kralježnične moždine, dok su postganglijski neuroni smješteni uz ciljne organe (6).

Srce je bogato inervirano heterogenom populacijom neurona, sadržanom u živčanom spletu nazvanim *plexus cardiacus*, koji je smješten ispred bifurkacije dušnika i iza luka aorte, a iznad bifurkacije plućnog debla te prateći velike krvne žile dolazi do baze srca, odakle pruža ogranke na njegove različite dijelove (6-8). *Plexus cardiacus* je formiran od parasimpatičkih i simpatičkih neurona i živčanih vlakana (9).

1.2.1. Autonomna inervacija srca

Tijela simpatičkih preganglijskih neurona koja inerviraju srce su smještena u intermediolateralnoj kolumni kralježnične moždine od osmog vratnog do petog torakalnog (T1-T5) segmenta. Preganglijska simpatička vlakna putuju do paravertebralnih simpatičkih ganglija simpatičkog lanca (*truncus sympathicus*), gdje se prekapčaju, u jednom od tri vratna i prva 3-4 prsna ganglija te potom kao postsinaptička vlakna direktno šalju informacije neuritima do srca (10-12). Simpatička vlakna u srcu inerviraju provodni sustav uključujući čvorove SA i AV, kao i miocite atrijske i ventrikularne (13, 14).

Parasimpatička preganglijska eferentna vlakna koja inerviraju srce projekcije su jezgara X. kranijalnoga živca. Tijela preganglijskih eferentnih neurona smještena su u moždanom deblu, u *nucleus dorsalis nervi vagi*, a neki podaci govore i da su dijelom smještena u *nucleus ambiguus* (13). Preganglijska vlakna idu direktno do srca, gdje se prespajaju u intrinzičnim srčanim ganglijima (15), gdje su smješteni postganglijski parasimpatički neuroni (10). Parasimpatikus u srcu pretežno inervira sinuatrijalni i atrioventrikularni čvor, kao i koronarne arterije, miokard atrijske, a tek u manjoj mjeri ventrikularni mišić (11).

Simpatikus i parasimpatikus djeluju antagonistički, modulirajući frekvenciju otkucaja srca (kronotropija) i brzinu provođenja (dromotropija), primarno djelovanjem na tkivo srčanog provodno-nadražajnog sustava. Nadalje, simpatička živčana vlakna inerviraju kardiomiocite pretkljetki i kljetki te utječu na snagu kontrakcije (inotropija) i opuštanja (lusitropija) (16-18).

Zandstra i sur. opisali su detaljno regionalne razlike u autonomnoj srčanoj inervaciji (8). Kod ljudi je gustoća inervacije veća u atrijima nego u ventrikulima, te u kljetkama postoji gradijent gustoće inervacije od baze prema apeksu (8, 19). U pretkljetkama

prevladavaju parasimpatički, a u ventrikulima simpatički živčani završetci; desni atrij ima a veću gustoću simpatičke inervacije od lijevog atrija dok desna strana srca (atrij i ventrikul) ima veću gustoću parasimpatičke inervacije nego lijeva (8, 19). Provodni sustav je gušće inerviran (i simpatičkim i parasimpatičkim vlaknima) od miokarda atrija i ventrikula, a inervacija je najgušća u sinoatrijskom čvoru te se smanjuje descendento. Sinoatrijski čvor i atrioventrikularni čvor pretežno su inervirani parasimpatičkim, dok su Hiss-ov snop i ogranci pretežno inervirani simpatičkim živčanim vlaknima (8, 20-22).

1.2.2. Osjetna inervacija srca

Aferentna autonomna vlakna šalju informacije o mehaničkim, kemijskim i nociceptivnim podražajima srca u viša središta. Osjetni neuroni koji inerviraju srce su pseudounipolarni. Tijela ovih osjetnih neurona su smještena u nodoznom i jugularnom gangliju, a centralni akson projicira se u *nucleus tractus solitarii* i *nucleus dorsalis n. vagi*, dok periferno vlakno putuje zajedno sa n. vagusom od srca i drugih ciljnih tkiva (15, 23). Dijelu aferentnih aksona srca tijela neurona se nalaze u spinalnim ganglijima, proksimalni nastavak ide do stražnjih rogova kralježnične moždine segmenata C6 do Th7, a distalni dolazi od srca (24-29). Osjetni neuroni koji se projiciraju u srce razlikuju se s obzirom na svoja morfološka, elektrofiziološka i neurokemijska svojstva. Većina neurona su nemijelinizirana C vlakna, koja mogu pripadati mehanoreceptivnim, kemoreceptivnim i nociceptivnim neuronima, a ostatak čine mijelinizirana, mehanoreceptivna A α vlakna (28, 30). Neurokemijski fenotip neurona nodoznog i spinalnog ganglija karakteriziran je prisustvom različitih neurotransmitera (glutamat, katekolamini, serotonin i acetilkolin), neuropeptida kao što su supstanca P (SP), neurokinin A, vazoaktivni intestinalni peptid, peptid vezan uz gen kalcitonina (CGRP, eng. calcitonin gene-related peptid), somatostatin, kolecistokinin, neuropeptid Y itd. te bjelančevinama koje vežu kalcij (kalretinin, kalbindin, parvalbumin) i drugih neuroaktivnih tvari, kao i sposobnošću vezanja izolektina B4 (IB4) (28, 30-33).

1.2.3. Srčana neuronalna hijerarhija

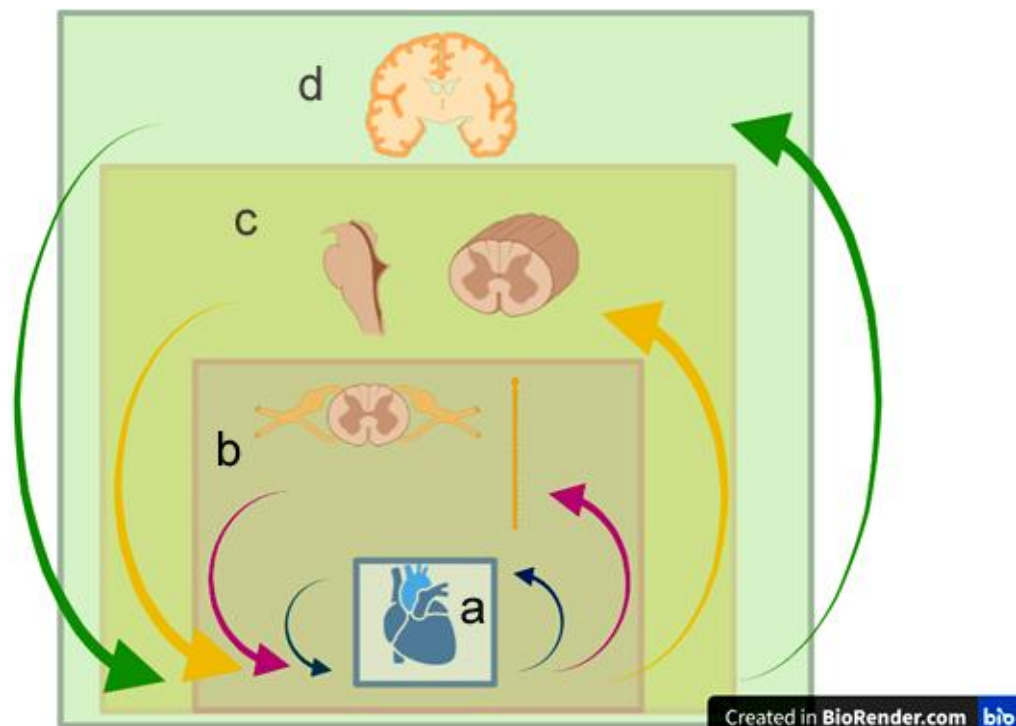
Neuroni s ulogom u regulaciji rada srca smješteni su od inzularnog korteksa do samog srca, a mogu se podijeliti na četiri funkcionalne i anatomske razine: Svaka razina se sastoji od lokalne mreže neurona koji komuniciraju kroz povratne veze između sebe i neurona na

drugim razinama. Prvu funkcionalnu razinu čine intrinzični srčani gangliji, drugoj razini pripadaju ekstrakardijalni intratorakalni gangliji, trećoj razini pripadaju simpatičke jezgre u kralježničnoj moždini te parasimpatičke jezgre u produljenoj moždini, zajedno sa središnjim projekcijama aksona nodoznih i spinalnih ganglija, dok četvrtu razinu predstavlja korteks s višim centrima (Slika 1). Svi neuroni uključeni u srčanu inervaciju u neprekidnoj su komunikaciji i interakciji, djelujući kao elementi brojnih refleksnih lukova (7).

Intrinzični srčani aferentni neuroni prenose informacije o lokalnom mehaničkom i kemijskom srčanom okruženju drugim neuronima u svom gangliju, ali i neuronima u različitim intrinzičnim i intratorakalnim ekstrakardijalnim ganglijima. Potom ti periferni neuroni komuniciraju s centralnim srčanim neuronima, uključivši na taj način cijelu srčanu neuronalnu hijerarhiju u regulaciju rada srca (Slika 1) (7, 34, 35).

„Srčani mozak” čini složenu živčanu mrežu srca te obuhvaća interakcije između neurona unutar intrakardijalnih ganglija s vezama među neuronima ekstrakardijalnih ganglija. „Srčani mozak”, kao završni koordinator, uz neprekidnu komunikaciju s neuronima smještenim u intratorakalnim ekstrakardijalnim ganglijima, a sve pod toničkim utjecajem SŽS-a i cirkulirajućih katekolamina, predstavlja srčanu neuronalnu hijerarhiju (36).

Ona osigurava modulaciju srčane aktivnosti, tj. koordinaciju srčanih parametara putem brojnih refleksnih lukova uz različite odgode aktivacije neurona drugog reda uključenog u srčano-krvožilne reflekse (odgoda, tj. latencija aktivacije ovisi prvenstveno o udaljenosti između osjetnih neuronalnih završetaka u ciljnom organu i njihovih tijela). Refleksi s kratkotrajnom odgodom (30-80 ms) moduliraju eferentne srčane neurone posredno djelujući na sinusatrijski čvor tijekom svakog srčanog ciklusa, a odvijaju se preko intrinzičnih srčanih ganglija. Na taj način reguliraju frekvenciju rada srca (7). Refleksi s odgodom srednjeg trajanja odvijaju se preko intratorakalnih ekstrakardijalnih ganglija i reguliraju rad srca unutar nekoliko srčanih ciklusa, dok se refleksi s dugom odgodom odvijaju preko kralježnične moždine i mozga, a imaju modulatorni učinak na funkciju srca tijekom nekoliko minuta ili sati te odražavaju tonus perifernog živčanog sustava (ŽS) (29).



Slika 1. Model srčane neuronalne hijerarhije. Prema (7, 34), rad srca je moduliran integracijskim centrima na četiri različite razine. Svaka razina se sastoji od lokalne mreže neurona koji komuniciraju kroz povratne veze između sebe i neurona na drugim razinama. Prvu funkcionalnu razinu čine intrinzični srčanim ganglijima (a), drugoj razini pripadaju ekstrakardijalni intratorakalni gangliji (b), trećoj razini pripadaju simpatičke jezgre u kralježničnoj moždini te parasimpatičke jezgre u produljenoj moždini, zajedno sa središnjim projekcijama aksona nodoznih i spinalnih ganglija (c). Četvrtu razinu predstavlja korteks s višim centrima (d). Interpretirano prema (35). Slika je izrađena u programu BioRender.

1.2.4. Srčana inervacija u dijabetesu

Srčana autonomna neuropatija (engl. *cardiac autonomic neuropathy* - CAN) je česta komplikacija šećerne bolesti, koja često biva nedijagnosticirana (37). Definirana je kao pogoršanje kardiovaskularne autonomne kontrole u dijabetičnih pacijenata nakon isključenja drugih uzroka, s prevalencijom od 17 do 90% (38).

Mehanizmi autonomnog živčanog oštećenja u DM1 su kompleksni, a najvažniji mehanizam je hiperglikemija, koja vodi do povećane proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i završnih proizvoda napredne glikacije, koji u konačnici dovode do upale i propadanja

autonomnih živaca (38). U DM1, uslijed hiperglikemije dolazi do patoloških mehanizama u vidu konverzije u anaerobni metabolizam i nakupljanja laktata, mitohondrijske disfunkcije, oksidativnog stresa, stresa endoplazmatskog retikuluma i oštećenja DNA, pospješene stvaranja poliola, heksozamina i aktivacije PKC signalnog puta, a što posljedično dovodi do endotelne disfunkcije i poremećene angiogeneze, rezultirajući smanjenom opskrbom živaca krvlju (39).

Suprotno od DM1, gdje je hiperglikemija glavni uzrok oštećenja živaca, u DM2 dislipidemija se smatra glavnim uzrokom neuropatije posljedično nakupljanju acilkarnitina, tvorbi oksisterola i promijenjenom mehanizmu sfingolipida (35, 39, 40).

CAN se manifestira varijabilnošću srčane frekvencije, tahikardijom u mirovanju, slabijom tolerancijom napora, intraoperativnom i perioperativnom nestabilnošću, ortostatskom hipotenzijom, tihom miokardijalnom ishemijom te se povezuje s povećanim mortalitetom (41, 42). Također, CAN može dovesti i do malignih aritmija, koje su najčešći uzrok iznenadne srčane smrti (38, 43, 44) (Slika 2).

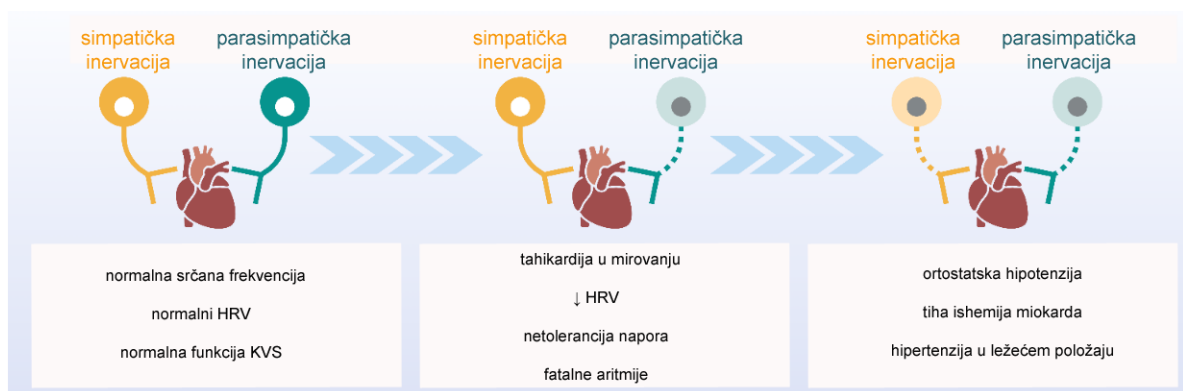
U većini studija je dokazano da upravo abnormalna inervacija u pacijenata koji boluju od šećerne bolesti prethodi kliničkoj manifestaciji narušene autonomne funkcije srca. U nekoliko studija su zapažene nepravilnosti u inferiornim dijelovima srca (45, 46), dok su izraženije nepravilnosti češće bile zapažene u bazi srca, a u uznapredovaloj neuropatiji zamijećena je perzistentna proksimalna inervacija lijevog ventrikula ili čak hiperinervacija proksimalnog dijela (46). Pacijenti s šećernom bolešću koji imaju i srčano zatajanje pokazuju nižu simpatičku aktivnost u usporedbi s pacijentima sa šećernom bolešću bez srčanog zatajenja ili pacijentima bez šećerne bolesti sa zatajenjem srca (47). Dijabetička autonomna neuropatija (DAN) je povezana s oslabljenim protokom krvi kroz srčani mišić, što se posebno očituje u oslabljenom vazodilatacijskom odgovoru koronarnih krvnih žila na simpatičku aktivaciju (48).

Proliferacija simpatičkih vlakana u srcu s posljedičnim smanjenjem gustoće parasimpatičkih vlakana koje vidimo u ranim fazama eksperimentalne šećerne bolesti može dovesti do parasimpatičke/simpatičke neravnoteže, što može objasniti povećani rizik od ventrikularnih aritmija u pacijenata sa šećernom bolešću (49-51).

Nedavni razvoj u neuroaksijalnoj terapiji, kao npr. stimulacija nervusa vagusa, električna stimulacija kralježnične moždine, torakalna epiduralna anestezija te terapija aktivacije baroreceptora se trenutno istražuju za prevenciju i liječenje iznenadne srčane smrti, aritmija, srčanog zatajenja i srčane boli (35).

Nepravilan rad autonomnog živčanog sustava može povećati kardiovaskularni rizik i iznenadnu srčanu smrt u pacijenata s DM2 (42), najviše zbog pojačane simpatičke aktivnosti. Kod pacijenata sa šećernom bolešću narušena je aktivnost i parasimpatičkog i simpatičkog dijela živčanog sustava te se ona povezuje s lošijom prognozom u tih pacijenata. U jednoj od studija je dokazano da pacijenti sa zatajenjem srca koji su bolovali od šećerne bolesti imaju nižu simpatičku aktivnost od pacijenata koji su također doživjeli srčano zatajenje, ali nisu bolovali od šećerne bolesti. Važno je istaknuti da je vrijednost HbA1c korelirala sa stupnjem redukcije simpatičke aktivnosti srca (47).

Na više studija istraživana je CAN u dijabetičara uz slikovne metode (^{123}I mIBG) te je dokazana subklinička disfunkcija lijevog ventrikula koja je povezana s preraspodjelom adrenergične srčane inervacije (52). Također je utvrđeno da je kasni omjer srca u odnosu na mediastinum (engl. *heart to mediastinum ratio*, HMR) značajno niži u dijabetičnih pacijenata, te da je kasni $\text{HMR} \leq 1.30$ nezavisni prediktor poremećaja rada srca u pacijenata sa šećernom bolešću i pacijenata bez šećerne bolesti (52). U jednoj od studija detektirana je viša prevalencija regionalnih abnormalnosti srca s (^{123}I mIBG) od one koja se inače očekuje u pacijenata sa šećernom bolešću bez simptoma autonomne neuropatije, što je dovelo do pretpostavke da se ozljeda srčanog autonomnog sustava u dijabetičnih pacijenata koji imaju uredne kardiovaskularne testove, događa i prije nego što se prije mislilo (53).



Slika 2. Razvoj simptoma kardijalne autonomne neuropatije (CAN) u šećernoj bolesti.

Pacijenti pokazuju smanjenu varijabilnost otkucaja srca i tahikardiju u mirovanju u ranoj fazi disfunkcije parasimpatikusa, koja je u podlozi smanjene tolerancije napora i povećane aritmogeneze. Kasniji stadiji CAN-a uključuju simpatičku denervaciju te uzrokuju

hemodinamsku disregulaciju i tihu ishemiju miokarda. Preuzeto i prilagođeno. Izvor: Sudo i sur., 2022 (44), <https://www.mdpi.com/2227-9059/10/12/3258>

1.3. Polinezasićene masne kiseline

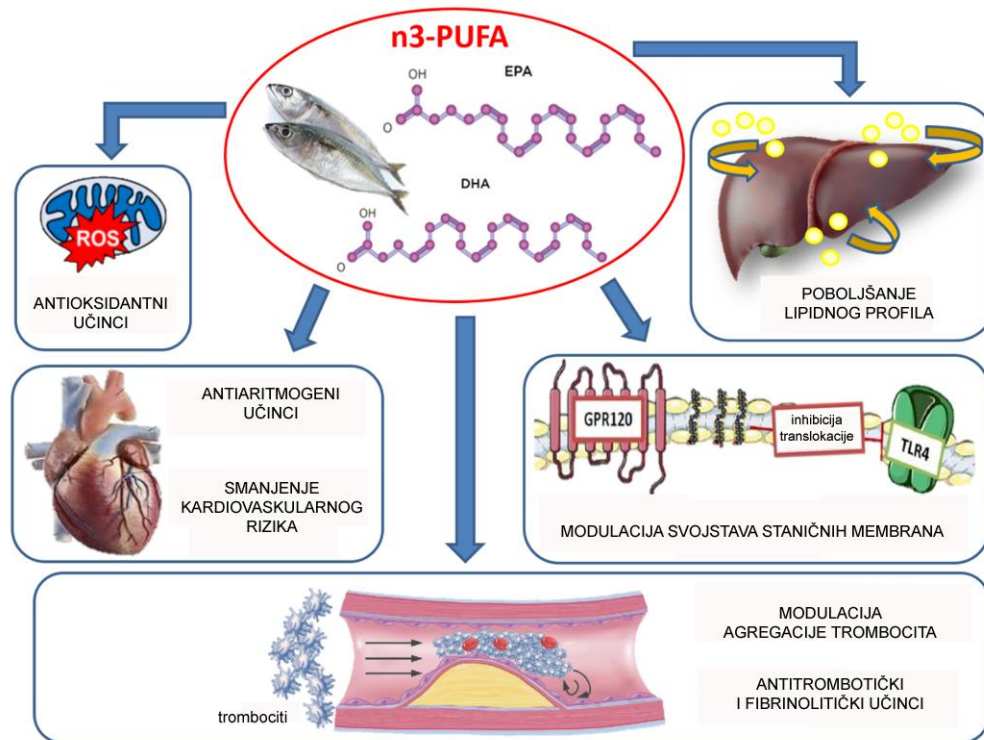
Masne kiseline pripadaju skupini karboksilne kiselina s ugljikovodičnom strukturom različite duljine. One su glavni sastojak lipida, a prema odsutnosti i prisutnosti dvostrukih veza dijele se na zasićene masne kiseline (bez dvostrukih veza), jednostruko nezasićene masne kiseline i višestruko nezasićene masne kiseline (*PUFA* – engl. *polyunsaturated fatty acids*) (54, 55). *PUFA* su građevni elementi fosfolipida integriranih u staničnoj membrani, a predstavljaju prekursore za eikozanoide (hormonima slični upalni medijatori), uključujući prostaglandine, leukotriene i tromboksane. Građene su od ugljikovodikovih lanaca koji sadrže dvije ili više dvostrukih veza. Oznaka n3 ili n6 se odnosi na položaj prve dvostruke veze u odnosu na metilni dio masne kiseline (56, 57). U prirodi, dvostruke veze su uobičajeno u *cis* (kosom) obliku. Ali, otprilike 2 – 5% masnih kiselina prisutno u mesu i mlijeku preživača i 5 – 20% u hidrogeniziranim uljima je u *trans* (uspravnom) obliku (57-59). Nedavna istraživanja su pokazala učinak *PUFA* i na regulaciju gena, s obzirom da dugi lanci *PUFA* imaju sposobnost regulacije staničnog metabolizma na razini jezgre, djelujući kao modulatori na niz transkripcijskih čimbenika (60).

1.3.1. Omega 6 i omega 3 *PUFA*-e

Omega 6 (n6) polinezasićene masne kiseline (npr. arahidonska kiselina, engl. *arachidonic acid* - ARA) i omega 3 (n3) *PUFA* (primjerice eikozapentaenoična kiselina, engl. *eicosapentaenoic acid* - EPA) su prekursori lipidnih signalnih molekula eikozanoida, koji su važni medijatori u upalnim procesima. Učinci eikozanoda koji nastaju iz n6 *PUFA* su proupalni, protrombotski i prooksidativni (61), dok su učinci eikozanoda iz n3 *PUFA* protuupalni.

Najrasprostranjenija omega 6 *PUFA* je linolenska kiselina, koja se može pretvoriti u dugolančanu omega 6 kiselinu, arahidonsku kiselinu, a koja služi za proizvodnju eikozanoida, i to većinom proupalnih. Omega 3 (n3) *PUFA* metaboliti su: EPA, dokozaheksaenoična

kiselina (engl. *docosahexaenoic acid* - DHA, 22:6 n-3) i alfa-linolenska kiselina (engl. *alpha-linolenic acid* - ALA), s protuupalnom, antiproliferativnom i antiaterosklerotskom aktivnošću. Utvrđeno je da suplementacija n6 PUFA-ma ima prooksidativne učinke, koji vode povećanju oksidativnog stresa u štakora s induciranim DM1 (61). Također, n6 PUFA-e povećavaju inzulinsku rezistenciju i rizik od pretilosti, doprinoseći pojavnosti šećerne bolesti (62). S druge strane, neke studije navode povoljan učinak n6 PUFA u dijabetesu (54, 63).



Slika 3. Multifaktorijalni učinci koji se pripisuju n-3 PUFA-ma u smanjenju kardiovaskularnog rizika. n-3 PUFA (EPA i DHA) poboljšavaju lipidni profil, modulišu sustavnu upalu i agregaciju trombocita; nadalje, pripisuju im se antiaritmogeni, antitrombotički, fibrinolitički i antioksidativni učinci, što sve doprinosi smanjenju rizika od srčanih bolesti. Preuzeto i prilagođeno. Izvor: Oppedisano i sur., 2020 (59); <https://www.mdpi.com/2227-9059/8/9/306>

1.3.2. Utjecaj PUFA na perifernu i autonomnu inervaciju

Općenito se smatra da zapadnjačka dijeta (s visokim omjerom n6/n3 PUFA) ima nepovoljne (uključivo pro-upalne) učinke, za razliku od prehrane bogate n3 PUFA-ma kojima

se pripisuju brojni protektivni (i protu-upalni) učinci, kako na krvožilni sustav općenito, tako i na komplikacije šećerne bolesti (Slika 3) (59).

Promjene u prehrani u posljednjih nekoliko desetljeća sa povećanim unosom n6 PUFA u odnosu na n3 PUFA su dovele do povećanja omjera n6/n3 PUFA i do 2-4 puta (10 – 20:1) više nego što je potrebno, a što se smatra poveznicom s većom incidencijom kardiovaskularnih bolesti i kroničnih upalnih bolesti (64). Učinci PUFA na krvožilni i živčani sustav intenzivno se istražuju, ali nisu u potpunosti razjašnjeni (65-67).

Dokazano je da prehrana s nemasnom ribom, povećavajući udio n3 PUFA u serumu i tkivima pretilih Zucker fa/fa štakora, može rezultirati poboljšanjem kardiovaskularnog statusa (68).

Funkcionalne i strukturalne abnormalnosti kardiomiocita izloženih visokim razinama glukoze koje rezultiraju njihovom hipertrofijom, mogu se prevenirati pretretmanom s konjugiranom linolenskom kiselinom (69).

U štakora kod kojih je šećerna bolest izazvana streptozotocinom uočava se oporavak srčane funkcije nakon konzumacije n3 PUFA, koji je praćen povećanjem srčanog minutnog volumena i ejekcijske frakcije, kao i udarnog volumena (70).

U štakorskom modelu metaboličkog sindroma etilni esteri eikozapentaenoične/dokozaheksaenoične kiseline su poboljšali metaboličke promjene, smanjili sistolički tlak i dijastoličku ukočenost lijevog ventrikula, također su smanjili infiltraciju upalnih stanica i kolagenskih depozita u srcu kao i nakupljanje lipida (71). Postoji mišljenje da n3 PUFA-e štite od iznenadne srčane smrti (72). Ali, neki autori su upozorili na nekonzistentnost pozitivnih efekata n3 PUFA na krvnožilni sustav, što je zabilježeno kroz klinička i eksperimentalna istraživanja (65). Kod pacijenata s dijabetesom, ali bez kardiovaskularne bolesti, nije bilo razlike u incidenciji vaskularnih komplikacija između pacijenata koji su dobivali n3 PUFA-e i onih koji su dobivali placebo, prema nekim istraživanjima (73).

Uz njihov izravni utjecaj na miokard, korisni utjecaj PUFA na krvnožilni sustav može biti posljedica smanjenja srčanog ritma u mirovanju, što je u korelaciji s utjecajem na povećanje bazičnog parasimpatičkog tonusa srčanog mišića (74).

Na dalje, postoje dokazi dobiveni istraživanjima na životinjskim modelima i *in vitro* da antiaritmički učinak n3 PUFA-a na srce može biti posredovan njihovim utjecajem na autonomu kontrolu ili tonus.

Pretpostavlja se da n3 PUFA-e (koje su prisutne u živčanom tkivu i u miokardu) mogu modulirati srčanu autonomnu kontrolu i potencijalno smanjiti rizik od razvoja aritmija (75).

Limitirani broj istraživanja o utjecajima n3 PUFA na perifernu eksperimentalnu neuropatiju i regeneraciju mrežnice u dijabetičnih štakora pokazale su njihov zaštitni učinak (76-78)(62–64).

Unatoč tome da su mnoga istraživanja pokazala da promjena omjera PUFA u prehrani utječe na funkcijske promjene u kardiovaskularnim komplikacijama šećerne bolesti, nijedno istraživanje nije razmatralo utjecaj promjene prehrane s različitim udjelom PUFA na promjene srčane inervacije uzrokovane šećernom bolešću.

1.4. Koneksini

Koneksini (Cx, engl. *connexins*) su transmembranski proteini, esencijalna građevna proteinska jedinica kanala tijesnih spojeva, koji omogućavaju brzi prijenos malih molekula i iona. Svaki kanal tijesnog spoja se sastoji od 12 koneksinskih jedinica, koje se formiraju u strukturu od 2 koneksiona, tj. 2 heksamerična hemikanala, koji u paru čine kanal tijesnog spoja (engl. *gap-junction channel* - GJC) (79).

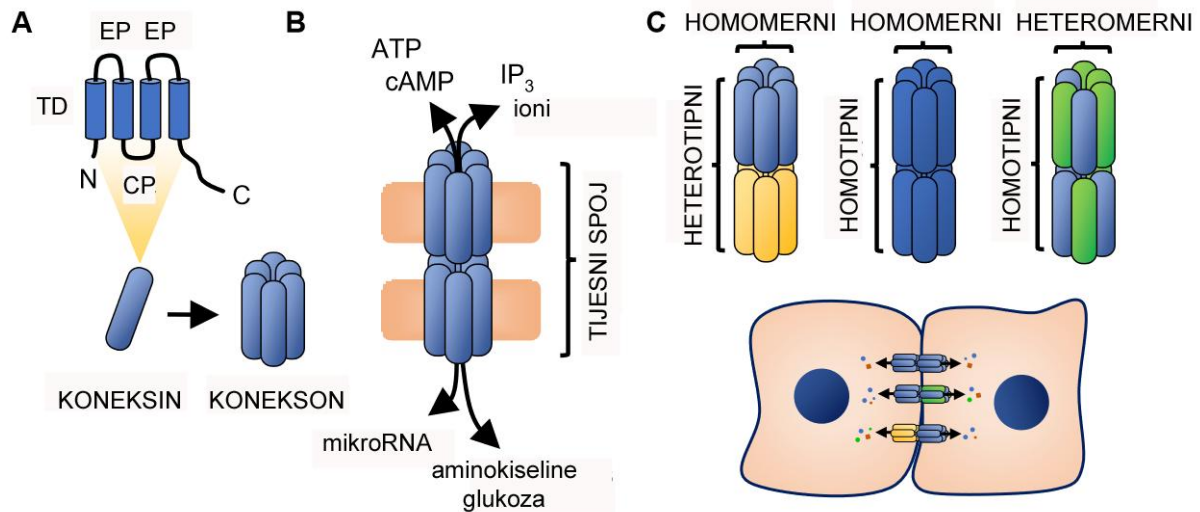
Koneksioni mogu biti homomerni ili heteromerni, ovisno o tome jesu li građeni od jedne ili više izoformi koneksina. Nadalje, ako se dva identična koneksiona spoje, formiraju homotipni kanal, a ako su različiti, kanali su heterotipni. Samo su homomerni homotipni kanali homogeni, sve druge kombinacije su heterogeni kanali (80, 81) (Slika 4).

Koneksionski kanali posreduju u izravnom međustaničnom komuniciranju te koordiniraju mehanizam srčane kontraktilnosti (82). Nadalje, kanali građeni od koneksina osiguravaju propagaciju električnog i molekularnog signala te doprinose određivanju brzine provođenja (83).

U ljudi je identificirana 21 izoforma koneksina, dok je u miševa nađeno samo 20. Multiple izoforme koneksina su različito zastupljene u različitim tkivima, što omogućuje selektivnost u provođenju iona kroz tijesne spojeve. U srcu su jako zastupljene izoforme Cx37, Cx40 i Cx43, koji je najvećim dijelom rasprostranjen u miocitima atrijske i ventrikularne stijenke te je polarno orijentiran, rjeđe lateralno (66), a manje u kondukcijskom sustavu srca. U ventrikulima Cx43 je rasprostranjen u endokardu, miokardu i epikardu. Polarna distribucija provodljivih kanala je preduvjet za uniformnu anizotropnu provodljivost kroz miokard. Stoga sadržaj i/ili distribucija tih koneksina ima velike implikacije na srčanu provodljivost (84).

Izmjena koneksina je jako brza u odnosu na druge proteine kardiomiocita, jer je njihovo poluvrijeme života 1-2 sata, te je stoga i njihova distribucija, koja nastaje kao

odgovor na srčanu ozljedu, jako brza. Rezistencija, odnosno moduliranje provodljivosti kanala ne ovisi samo o prisutnoj razini koneksina, već i o njihovom statusu fosforilacije, koja se odvija na serinskim, kao i na tirozinskim ostacima (70).



Slika 4. Uloga koneksina u međustaničnoj komunikaciji. (A) Molekula koneksina sadrži četiri transmembranske domene (TD), intracelularne N- i C-terminalne regije, dvije ekstracelularne petlje (EP) i jednu citoplazmatsku petlju (CP). C-terminalni rep i CP mjesta su posttranslacijskih modifikacija koje utječu na mnoge aspekte biologije koneksina. Šest koneksina tvori heksamerni kanal poznat kao konekson, koji čini visoko reguliranu vodenu poru. (B) Koneksoni su umetnuti u staničnu membranu, a koneksoni na staničnim membranama susjednih stanica spajaju se kako bi formirali tijesni spoj, sposoban za izravan prijenos malih molekula i iona. Interakcije između EP-ova važne su za formiranje tijesnih spojeva, dok druge domene posreduju u različitim aspektima propusnosti kanala. (C) Koneksoni sastavljeni od jedne vrste koneksina nazivaju se homomernim, dok su koneksoni formirani od višestrukih koneksina heteromerni. Tijesni spojevi formirani između istih kanala (homomernih ili heteromernih) nazivaju se homotipskim, dok se spajanje koneksiona različitih homomernih kanala naziva heterotipnim. Mnoštvo permutacija ovih kombinacija utječe na vrstu i usmjerenost prijenosa supstrata između stanica. Preuzeto i prilagođeno. Izvor: Jones i Bodenstein, 2022 (81); <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/17/10172>

1.4.1. Koneksini u dijabetesu

U dijabetičnim srcima štakora, utvrđena je abnormalna i nesređena distribucija Cx 43 pozitivnih propusnih veza, koja je karakterizirana promjenom njihove lokalizacije i pojačanim lateralnim bojenjem u usporedbi s kontrolnom skupinom štakora. Nadalje, utvrđen je protektivni učinak n3 PUFA na remodeliranje koneksina, kako u životinjskom modelu - obzirom da prethodno opisani obrazac distribucije koneksina nije nađen u štakora koji su u prehrani imali iste (70), tako i u ljudi. Naime, istraživanje je pokazalo da tretman s n3 PUFA-ma i antioksidativnim vitaminima smanjuje oksidativni i nitrozativni stres i na taj način prevenira lateralizaciju Cx 40 i Cx 43 u tkivu ljudskog atrijskog atrija (83).

Remodeliranje koneksina, koje je definirano spomenutom promjenom u distribuciji i razini njihove izražajnosti, ima proaritmogeni učinak (70, 83), stoga bi srčani Cx 43 mogao biti obećavajući cilj za prevenciju malignih ventrikularnih aritmija. Razina proteina, kao i distribucija je izmijenjena u dijabetičnom srcu, što može doprinijeti srčanoj disfunkciji (70, 83).

Abnormalnosti srčanog provođenja signala povezane s dijabetičkom kardiomiopatijom se očituju jako rano u DM1, uz malo poznate mehanizme njihova nastanka. Cx 43 je kritična struktura propusne veze, čije provođenje ovisi i o tirozin fosforilacijskom statusu. Promjena njegove količine, distribucije i/ili fosforilacijskog statusa, za što je utvrđeno da je promijenjeno u modelu štakora s DM1, može biti uključena u poremećaje srčanog ritma. Pritom oksidativna modifikacija tirozin posredovanog signaliziranja igra veliku ulogu, a što je i dokazano u studiji s štakorskim modelom DM1 izazvanim streptozotocinom (85).

Šećerna bolest narušava međustaničnu komunikaciju i protok električnog signala kroz stanice posljedično promjenama u tijesnim spojevima, a što može doprinijeti razvoju kardiovaskularnih abnormalnosti, uključujući i infarkt miokarda. Dijabetesom posredovane promjene u miokardijalnom izražaju Cx 43 doprinose povećanju opsega ishemijsko reperfuzijske miokardijalne ozljede. Navedeno je i dokazano u studiji sa štakorskim modelom DM1, pri čemu je došlo do smanjenja Cx 43 u srcima dijabetičnih štakora, a posljedično i do indukcije vaskularne disfunkcije te pojačanja ishemijsko reperfuzijske ozljede miokarda u dijabetičnih štakora (86).

U bubrezima dijabetičnih štakora pronađeno je smanjenje imunoekspresije Cx43 u usporedbi s kontrolnom skupinom, a prehrana bogata n6 ili n3 PUFA-ma je vratila imunoekspresiju Cx 43 na normalnu razinu (87).

Suplementacija n3 PUFA-ma ne rezultira istim učinkom na razinu Cx 43 u različitim tkivima, što pokazuje animalna studija na štakorima u kojih je induciran DM1, u kojoj se povoljan učinak n3 PUFA očituje u smanjenju povišene razine srčanog Cx 43 (70), što je u suprotnosti u odnosu na prethodno navedenu studiju.

Nadalje, različiti učinak suplementacije n3 PUFA-ma na izražaj Cx 43 je dokazan i u istim tkivima, u istraživanju provedenom na štakorskom modelu DM2, kod kojih je utvrđena povišena razina srčanog Cx 43 u usporedbi s kontrolnom skupinom, a prehrana s n3 PUFA-ma uzrokovala je njezin daljnji porast (88). U tom slučaju povoljan učinak n3 PUFA se očitovao značajno povišenim omjerom fosforiliranog i ukupnog Cx 43. Prehrana obogaćena s n3 PUFA-ma je povećala razine ukupnog i fosforiliranog Cx43 proteina u usporedbi sa dijabetičnom skupinom (88).

Utvrđeno je da visoke razine glukoze sprječavaju normalnu međustaničnu komunikaciju kroz tijesne spojeve te utječu na sintezu proteina (89), a moguće je i da mijenjaju transkripciju i translaciju gena koji kodiraju koneksine. Naime, hiperglikemija smanjuje razinu mRNA i proteina, što dovodi do manjka koneksina unutar tijesnih spojeva (90), ali s druge strane, može uzrokovati povećanje produkcije koneksina, kao mehanizam kompenzacije na smanjenje provodljivosti tijesnih spojeva i neadekvatne funkcije, s obzirom na gubitak povezanosti među stanicama, uslijed visoke razine šećera u krvi (89, 91).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Učinci PUFA na krvožilni i živčani sustav intenzivno se istražuju, ali nisu u potpunosti razjašnjeni. Koliko je nama poznato, do sada nisu provedena istraživanja koja bi proučavala utjecaj prehrane različitim omjerima n6 i n3 PUFA na promjene uzorka srčane inervacije uzrokovane šećernom bolešću. Ovi podaci doprinijeli bi boljem razumijevanju mehanizma djelovanja i potencijalnog utjecaja različitih omjera PUFA u prehrani dijabetičnih pacijenata na srčanu inervaciju te nastanak i ishod dijabetičke kardiomiopatije kod istih, a za koju očekujemo da će djelomično biti objašnjena njihovim utjecajem na re-distribuciju inervacije.

Ciljevi istraživanja bili su:

- utvrditi utjecaj različitog omjera n6/n3 PUFA na promjene uzorka srčane inervacije izazvane eksperimentalnim DM1 izazvanim streptozotocinom izražen kroz broj i površinu presjeka ukupnih živčanih vlakana imunoreaktivnih na panneuronalni biljeg PgP 9.5 koja se projiciraju u miokarda štakora;
- detektirati utjecaj različitog omjera n6/n3 PUFA na promjene subpopulacija živčanih vlakana izazvane eksperimentalnim DM1 korištenjem različitih imunohistokemijskih biljega: NF200 - biljega mijeliniziranih osjetnih živčanih vlakana, TH - biljega simpatičkih živčanih vlakana, biljega parasimpatičkih živčanih vlakana - ChAT te CGRP - biljega podtipa peptidergičkih vlakana važnih za regulaciju mikrocirkulacije;
- utvrditi utjecaj različitog omjera n6/n3 PUFA na promjene izražaja u srcu najučestalijih tipova koneksina (Cx37 i Cx43), izazvane eksperimentalnim DM1;
- definirati povezanost i povoljne ili štetne učinke n6 i n3 PUFA na dijabetičku kardiomiopatiju u štakorskom modelu eksperimentalnog DM1 izazvanog streptozotocinom.

3. HIPOTEZE

Hipoteza ovog istraživanja je da bi protektivni/nepovoljni učinci koje različite PUFA imaju na krvožilni sustav i funkciju miokarda u dijabetičnih pacijenata mogle biti (barem djelomično) posljedica njihovog utjecaja na promjene srčane inervacije, budući da je dokazan (iako nedovoljno istražen) utjecaj istih na inervaciju u drugim organima.

Također, uzevši u obzir dosada nedovoljno istražene podatke o utjecaju PUFA na izražaj i funkciju koneksina u srcu i drugim organima, pretpostavljamo da bi protektivni/nepovoljni učinci koje različite PUFA imaju na funkciju miokarda u dijabetičnih pacijenata mogle djelomično biti posljedica njihovog utjecaja na izražaj najčešćih tipova koneksina u srčanom mišiću.

4. METODE ISTRAŽIVANJA

Animalni eksperimenti financirani su u okviru projekata HRZZ IP-2014-09-8992 (voditelja prof. dr. sc. Tomislava Mašeka) i IP-2016-06-3163 (voditeljice doc. dr. sc. Kristine Starčević), nositelja Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, a provedeni su u Institutu za medicinska istraživanja u Zagrebu. Obrada i konzerviranje eksperimentalnih tkiva, uklapanja, rezanja, imunohistokemijska bojanja, mikroskopiranje i fotografiranje provedeno u Laboratoriju za eksperimentalnu neurokardiologiju, Laboratoriju za istraživanje ranog razvoja čovjeka te Laboratoriju za mikroskopiju Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Splitu.

Pokusni postupci obavljeni su u skladu s odredbama direktive EU (2010/63/EU) .

4.1. Pokusne životinje

Istraživanje je obavljeno na 20 Wistar štakora muškog spola, težine 350-410 g (Institut za medicinska istraživanja, Zagreb) uzgojenih u standardnim polikarbonatnim kavezima u kontroliranim okolišnim uvjetima (temperatura 22 ± 1 °C s 12 satnim dnevno/noćnim ciklusom te slobodnim pristupom hrani i vodi). Štakori su ćemo nasumićno raspoređeni u 4 pokusne skupine, po 5 životinja u svakoj. Standardna laboratorijska prehrana (s 20% sirovih proteina, 5% sirove masti, 5% sirovih vlakana) je prilagođena na različite omjerime n6/n3 korištenjem razlićitih mješavina suncokretovog, ribljeg i lanenog ulja (92). Kontrolna skupina (c) i dijabetićna skupina (stz) su hranjene istim protokolom (0,5% laneno ulje i 2 % suncokretovo ulje, s n6/n3 omjerom ≈ 7). Prehrana skupine stz + n6 sadržavala je 2,5 % suncokretovog ulja sa n6/n3 omjerom ≈ 60 . Prehrana stz + DHA skupine sadržavala je 2,5 % ribljeg ulja (16% eikosapenteanoićne kiseline – EPA i 19 % dokozaheksaenoićne kiseline – DHA), s n6/n3 omjerom ≈ 1 . Isti protokol prehrane trajao je do kraja istraživanja. Šećernu bolest smo inducirali u 3 skupine, dva tjedna nakon početka protokola specifićne prehrane, upotrebom intraperitonealne aplikacije streptozotocina (55mg/kg tjelesne težine), otopljenog u citratnom puferu (pH 4.5) nakon cjelonoćnog gladovanja. Kontrolnoj skupini (c) je ubrizgana ćista otopina citratnog pufera intraperitonealno (87, 92).

Kriteriji uključenja životinja bili su:

- odsustvo promjena zdravstvenog statusa na početku istraživanja;
 - glukoza u krvi $> 16,5$ mmol/L, izmjerena glukometrom, 4 dana nakon indukcije (za DM1 skupine).

• Kriteriji isključenja životinja bili su:

- promjena zdravstvenog statusa tijekom istraživanja;
- glukoza u plazmi $< 16,5$ mmol/L, izmjerena glukometrom, 4 dana nakon indukcije (za DM1 skupine).

4.2. Postupci

1. Priprema pokusnih životinja i tijek pokusa

Trideset dana nakon aplikacije streptozotocina/citratnog pufera, štakori su žrtvovani eksangvinacijom u dubokoj anesteziji (Narketan 80 mg/kg i Xylapan 12 mg/kg; Vétoquinol, Bern, Švicarska). Srca su ekstrahirana i pohranjena u puferiranu otopinu 4% paraformaldehida. Tkiva su potom dehidrirana u nizu vodenih otopina etanola rastućih koncentracija, prožeta ksilolom i uklopljena u parafin (92). Parafinski blokovi rezani na rezove debljine 5 μ m su postavljeni na histološka stakalca. Korištenjem imunohistokemijskih bojenja prikazana je prisutnost neuralnih biljega TH, NF200, ChAT, PgP 9.5 i CGRP-a, kao i izražaj Cx 37 i Cx 43.

2. Imunohistokemijsko bojenje

Preparati su deparafinirani ksilenom i rehidrirani vodenim otopinama etanola, potom su kuhani 12 minuta u puferu natrijevog citrata (pH 6,0) na 95 stupnjeva, ohlađeni su na sobnu temperaturu i isprani u otopini fosfatnog pufera (PBS, engl. *phosphate-buffered saline*). Slijedila je inkubacija tijekom noći s primarnim protutijelima (Tablica 1). Poslije višestrukih ispiranja u PBS-u, rezovi su inkubirani 1 sat sa odgovarajućim sekundarnim protutijelima (Tablica 1). Histološke rezove smo nakon toga isprali u PBS-u. Stakalca su potom osušena na zraku i prekrivena (ImmuMount, Shandon, Pittsburgh, PA, USA).

3. Prikupljanje podataka i analiza

Preparati su pregledani i fotografirani pod mikroskopom (BX61, Olympus, Tokyo, Japan) i slikani korištenjem hladene digitalne kamere (DP71, Olympus, Tokyo, Japan) i

Nikon DS-Ri1 kamere (Nikon Corporation, Tokyo, Japan). Korišten je objektiv UPLFLN40X (Olympus, Tokyo, Japan; uvećanje 40×; numerička apertura 0.75; radna udaljenost 0.51; s korekcijom kromatskog odstupanja Semiapochromat FL). Za analizu mikrofotografija korišten je ImageJ Software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD). Dobivene mikrofotografije prethodno su obrađene određivanjem graničnog praga korištenjem "Threshold" funkcije softvera Adobe Photoshop 7.0 (Adobe, San Jose, CA, SAD) sa konstantnim uvjetima od 25 %. Koristeći ImageJ, u obrađenim mikrofotografijama mjeren je udio površine pod pozitivnim signalom, s restrikcijom od minimalno 20 piksela veličine da bi se struktura proglasila živčanim vlaknom. Površina živčanih vlakana je izražena kao postotak površine srčanog tkiva, a za vlakana obilježena protutijelom protiv PgP 9.5 određen je i broj vlakana po jedinici površine.

Na sličan način određen je i imunohistokemijski izražaj koneksina 37 i 43. Mikrofotografije su u tome slučaju obrađene u ImageJ softveru, oduzimanjem crvene komponente slike, zatim filtera medijana sa širinom 7 piksela (za koneksin 37) i 10 piksela (za koneksin 43) te je primijenjen algoritam „MaxEntropy dark” za određivanje graničnog (treshold) praga za koneksin 43 a „Triangle“ za koneksin 37. Mjerenje % površine pod pozitivnim signalom vršeno je se bez restrikcije minimalne veličine objekta.

4.3. Materijali

- Standardna laboratorijska hrana i laboratorijska hrana s prilagođenim omjerima PUFA (Zavod za prehranu i dijetetiku životinja, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu)
- Glukometar (Accu-Check Go);
- Fosfatni pufer (PBS) (pH 7.4)
- Pufer natrijevog citrata (pH 6,0);
- Izofluran (Forane, Abbott Laboratories, Queenborough, Velika Britanija);
- Fiksativ (4% paraformaldehid u 0,1 M u fosfatnom puferu);
- Histološka stakalca (Histobond+Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Njemačka).
- Pufer za blokiranje nespecifičnog vezanja protutijela (ab64226, Abcam, Cambridge, UK)
- Medij za uklanjanje (Immuno-Mount, Shandon, Pittsburgh, PA, SAD);
- Olympus BX61 mikroskop (Olympus, Tokyo, Japan);
- Olympus DP71 kamera (Olympus, Tokyo, Japan);
- Nikon DS-Ri1 kamera (Nikon Corporation, Tokyo, Japan)

Tablica 1. Primarna i sekundarna protutijela korištena u istraživanju.

	Protutijelo (izvorni naziv)	Domaćin	Šifra br.	Razrjeđenje	Proizvođač
Primarna	Anti PGP9.5 Monoclonal Antibody (BH7)	Miš	480012	1:500	Invitrogen, Waltham, MA, SAD
	Anti- Neurofilament 200 kDa Antibody, clone N52	Miš	MAB5266	1:150	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, SAD
	Anti-CGRP antibody	Koza	ab36001	1:1000	Abcam, Cambridge, Velika Britanija
	Anti-Tyrosine Hydroxylase antibody	Ovca	ab113	1:500	Abcam, Cambridge, Velika Britanija
	Anti-Choline Acetyltransferase Antibody	Koza	AB144P	1:100	Millipore
	Anti- Cx37/GJA4 antibody - N- terminal	Kunić	ab181701	1:100	Abcam, Cambridge, Velika Britanija
	Anti-Connexin 43 / GJA1 antibody	Koza	ab87645	1:300	Abcam, Cambridge, Velika Britanija
	Anti-Mouse IgG Alexa Fluor@488AntiP ureDonkey (H+L)	Magarac	715-545-152	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Baltimore, PA, SAD
Anti-Goat IgG Alexa	Magarac	705-545-003	1:400	Jackson Immuno	

Fluor@488 AniPure Donkey (H+L)				Research Laboratories, Inc., Baltimore, PA, SAD
Anti-Sheep IgG H+L (Alexa Fluor® 488)	Magarac	ab150177	1:400	Abcam, Cambridge, Velika Britanija
Anti-Rabbit IgG (Alexa Fluor® 488)	Magarac	711-545-152	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Baltimore, PA, SAD

4.4. Statistički postupci

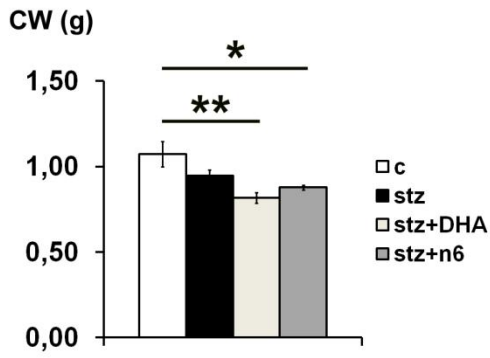
Potrebna minimalna veličina uzorka po eksperimentalnoj skupini izračunata je korištenjem Mead-ove jednadžbe resursa (93) i trebala bi biti minimalno 4, ali smo mi uključili po 5 životinja u svakoj skupini.

Statistička obrada je izvršena uz pomoć programa PAST 3.22 Software (94). Normalnost raspodjele podataka je testirana Shapiro Wilk-ovim testom. Za usporedbe gustoće živčanih vlakana i izražaja koneksina u srcu između kontrolne i dijabetičnih skupina te dijabetičnih skupina međusobno koristili smo jednosmjernu analizu varijance (ANOVA), kao i post hoc Tukey-ev test za usporedbu među pojedinim skupinama. U slučajevima odstupanja od normalne distribucije, podaci su bili transformirani logaritamski prije analize. U slučajevima nejednake varijance, korištena je ANOVA s Welch-ovom korekcijom. Rezultati su interpretirani na razini značajnosti $P < 0.05$.

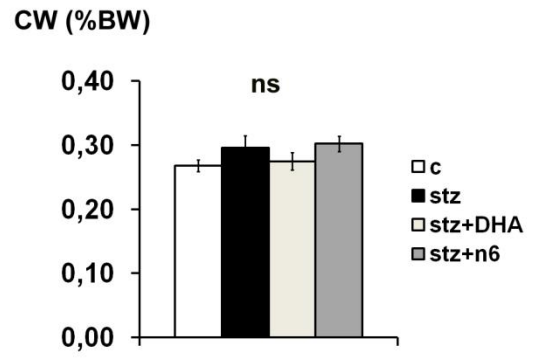
5. REZULTATI

U ovom istraživanju koristili smo različite imunohistokemijske biljege za određivanje gustoće inervacije septuma srca u štakora kod kojih je šećerna bolest tip I izazvana streptozotocinom kao i utjecaj prehrane različitim omjerima n6/n3 PUFA-ma na promjene u gustoći inervacije izazvane eksperimentalnim DM1. Težina srca štakora bila je značajno manja u stz + DHA ($p < 0.01$) i u stz+n6 ($p < 0.05$) skupinama u usporedbi s kontrolnom skupinom (Slika 1A). Unatoč tome, kada se izrazi kao postotak tjelesne težine, nije pronađena značajna razlika u težini srca između skupina (Slika 1B), što je povezano s značajnim smanjenjem tjelesne težine u sve tri dijabetične skupine (Slika 1C). Pronašli smo značajnu pozitivnu korelaciju između težine srca štakora (u gramima) i postotka promjene tjelesne težine (povećanje ili smanjenje početne težine) ($r = 0.72$; $p < 0.001$) i značajnu negativnu korelaciju između relativne težine srca izražene kao postotak tjelesne težine i promjene u tjelesnoj težini ($r = -0.47$; $p < 0.05$) (Slika 1D). Nadalje, istražili smo gustoću živčanih vlakana intramuralnog (središnji dio – Mid area) kao i subendokardijalnog dijela srčanog septuma (Slika 1E). Analizirajući sve vrste vlakana, pronašli smo mnogo gušću inervaciju subendokardijalno, dok je inervacija središnjeg dijela srčanog septuma karakterizirana rijetkim živčanim vlaknima (Slika 1F) bez značajne razlike u eksperimentalnim skupinama.

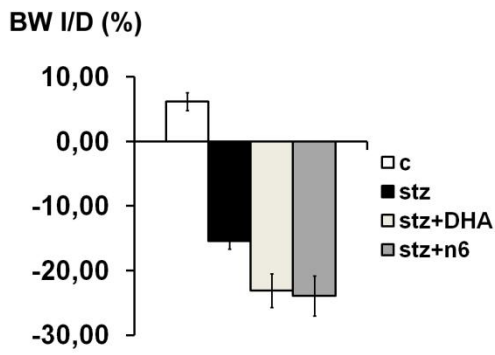
A



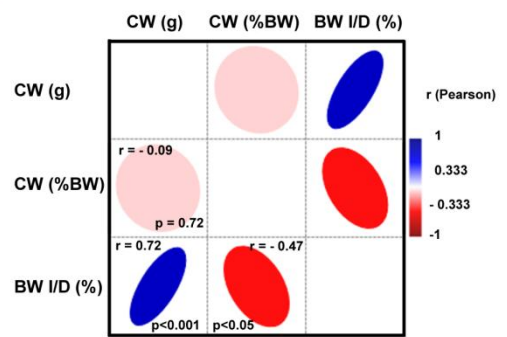
B



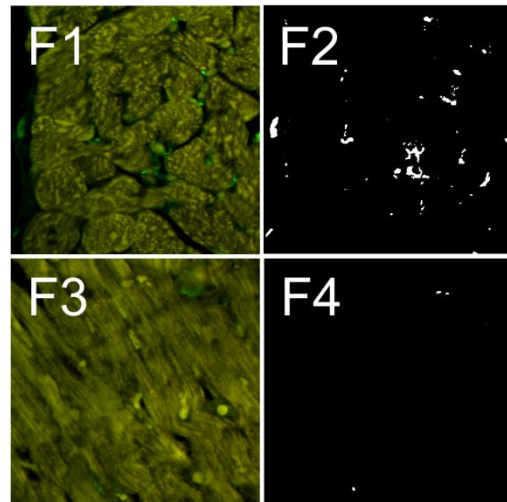
C



D



E



Slika 1. (A) težina srca (*cardiac weight*, CW; g) štakora u različitim eksperimentalnim skupinama: c – kontrolna skupina; stz – dijabetična skupina hranjena standardnom dijetom (omjer n6/n3 ~ 7), stz+DHA – dijabetična skupina hranjena hranom s dodatkom n3 PUFA (2,5% riblje ulje, sadržavalo je 16% eikozapentaenoične – EPA i 19% dokozaheksaenoične kiseline – DHA, omjer n6/n3 ~ 1), stz + n6 – dijabetična skupina hranjena s dijetom koja je sadržavala 2,5% suncokretovog ulja (n6/n3 ~ 60). * - p<0,05; ** - p <0,01 – razlika između označenih skupina.

(B) Težina srca izražena kao postotak tjelesne težine (%BW). Nisu nađene značajne razlike u težini srca izražene kao postotak tjelesne težine (%BW) (ns).

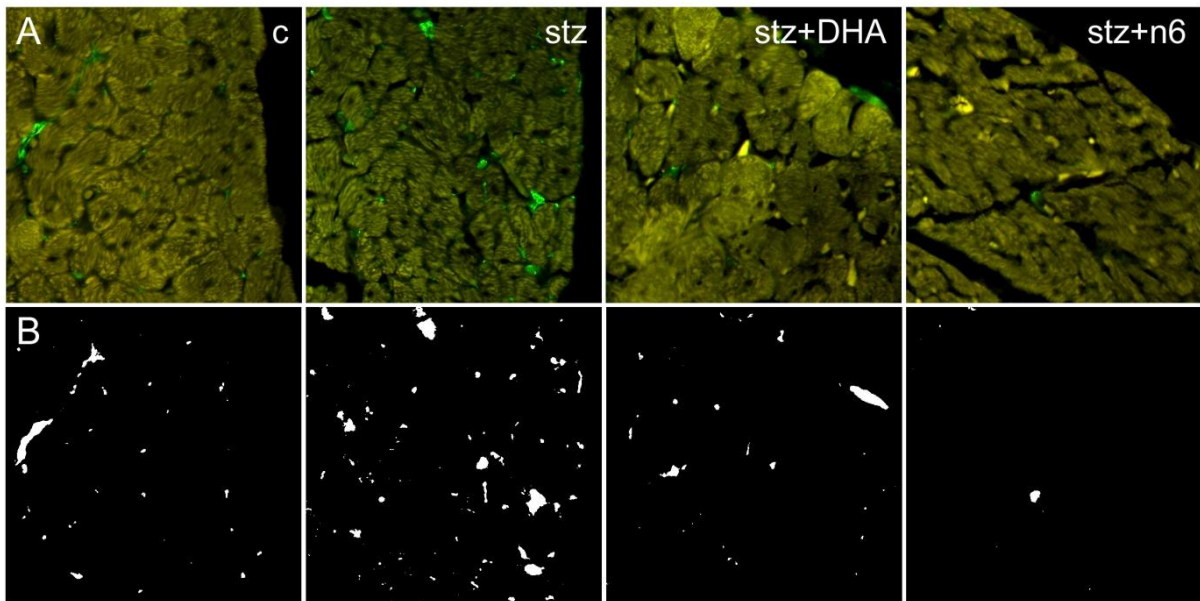
(C) Porast ili smanjenje tjelesne težine (BW I/D) izražen kao postotak početne tjelesne težine.

(D) Korelacijska analiza između CW (g), CW (%BW) i BW I/D (%) - Pearsonov koeficijent korelacije (r).

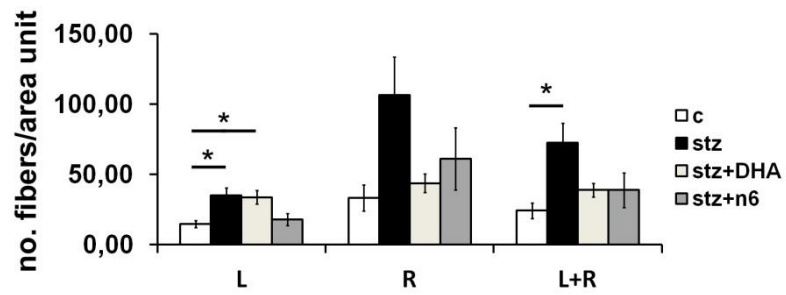
(E) Presjek kroz klijetke štakorskog srca (nepovezani uzorak) pokazuje način pozicioniranja vizualnih polja za analizu – M – intramuralni (srednji) dio srčanog septuma, R – desno subendokardijalno područje septuma, L – lijevo subendokardijalno područje septuma.

(F) Reprezentativne mikrofotografije koje pokazuju razliku u gustoći vlakana desne strane subendokardijalnog dijela septuma (F1 i F2), i središnjeg dijela septuma (F3 i F4) iste životinje, bojene s pan-neuronalnim biljekom PgP 9.5 (zeleno). Obradene slike F2 (obrađene iz F1) i F4 (obrađene iz F3). Značajno manja gustoća vlakana je nađena u srednjem dijelu (M), u usporedbi s desnim dijelom subendokardijalnog septuma R (ili lijevim L – nije prikazan).

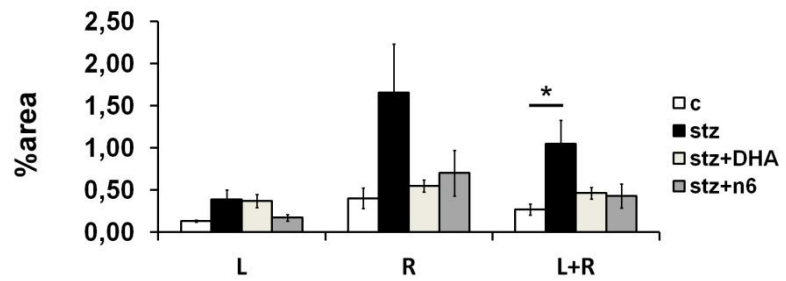
5.1. Broj i gustoća PgP 9.5- imunoreaktivnih vlakana u srcu



C



D

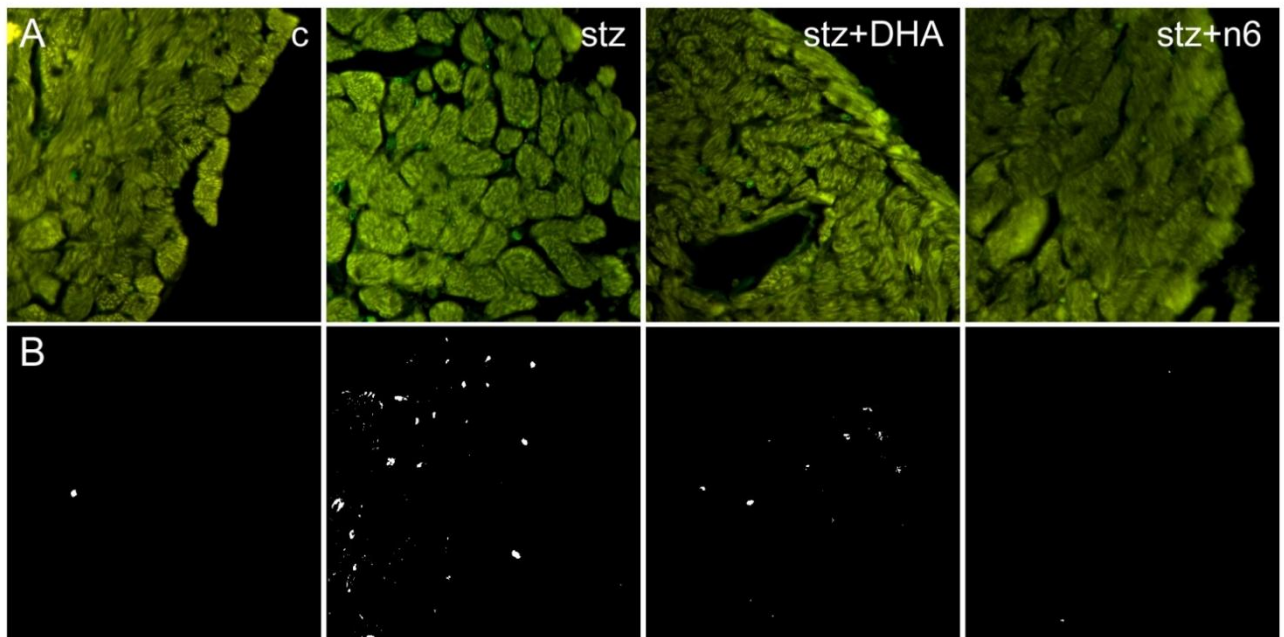


Slika 2. Gustoća PgP 9.5-imunoreaktivnih živčanih vlakana u subendokardijalnom dijelu septuma srca

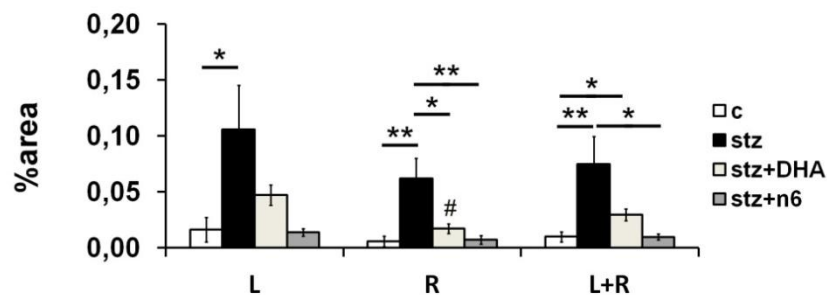
A) reprezentativne mikrofotografije desne strane subendokardijalnog dijela septuma srca bojane s pan-neuronalnim biljekom PgP 9.5 (zeleno), c – kontrolna skupina, stz – dijabetična skupina hranjena standardnom dijetom (omjer n6/n3 ~ 7), stz+DHA – dijabetična skupina hranjena hranom s dodatkom s n3 PUFA (2,5% riblje ulje, sadržavalo je 16% eikozapentaenoičnu – EPA i 19% dokozaheksaenoičnu kiselinu – DHA, omjer n6/n3~1), stz + n6 – dijabetična skupina hranjena s dijetom koja je sadržavala 2,5% suncokretovog ulja (n6/n3 ~ 60). (B) obradene slike iz A : bijelo – područje živčanih vlakana. (C) Gustoća živčanih vlakana izražena kao broj vlakana po jedinici površine. L – subendokardijalno područje okrenuto prema lijevom ventriklu, R – subendokardijalno područje okrenuto prema desnom ventriklu, L + R – prosjek između L i R, (D) gustoća živčanih vlakana izražena kao postotak presječne površine tkiva, * - $p < 0,05$ – razlika između označenih skupina.

U skupini štakora kod kojih je šećerna bolest izazvana streptozotocinom pronašli smo statistički značajan ($p < 0,05$) porast gustoće živčanih vlakana imunoreaktivnih na PgP 9.5, u usporedbi s kontrolnom skupinom, promatranih u subendokardijalnom tkivu septuma srca okrenutog desnom i lijevom ventrikulu. U skupinama s posebnom prehranom: stz + DHA skupina i stz + n6 skupina nije bilo detektabilne promjene u broju i gustoći živčanih vlakana obilježenih s PgP 9.5. Statistički značajan porast broja živčanih PgP 9.5-imunoreaktivnih vlakana je također pronađen u stz skupini, u usporedbi s kontrolnom skupinom, u subendokardijalnom tkivu septuma okrenutog lijevom ventrikulu, kao i u prosjeku, za tkivo subendokardijalnog septuma okrenutog desnom i lijevom ventrikulu (oba $p < 0,05$). Nadalje, na lijevoj strani značajan porast u PgP 9.5-imunoreaktivnih vlakana je također pronađen u stz + DHA skupini u usporedbi s kontrolnom skupinom ($p < 0,05$) (Slika 2).

5.2. Gustoća NF 200-imunoreaktivnih živčanih vlakana u subendokardijalnom dijelu septuma srca



C



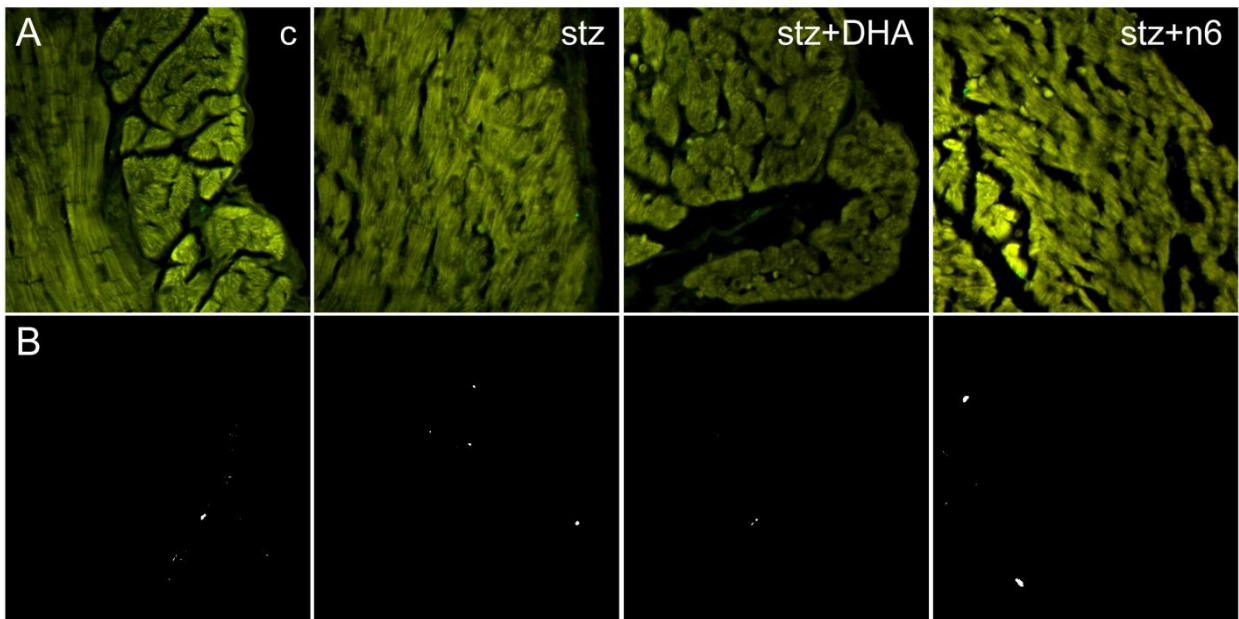
Slika 3. Gustoća NF 200-imunoreaktivnih živčanih vlakana u subendokardijalnom dijelu septuma.

(A) Reprezentativne mikrofotografije desne strane subendokardijalnog dijela srčanog septuma obojene na NF 200, biljeg teških mijeliniziranih živčanih vlakana (zeleno). C - kontrolna skupina; stz – dijabetična skupina hranjena standardnom dijetom (u obje dijetete sadržavale su omjer n6/n3 ~7); stz + DHA – dijabetična skupina hranjena hranom s dodatkom n3 PUFA (2,5% riblje ulje, sa sadržajem 16% eikozapentaenoične – EPA i 19% dokozaheksaenoične kiseline – DHA, omjer n6/n3~1), stz + n6 – dijabetična skupina hranjena s dijetom koja je sadržavala 2,5% suncokretovog ulja (n6/n3 ~ 60). (B) Obradene slike iz A : bijelo – područje živčanih vlakana. (C) Gustoća živčanih vlakana izražena kao postotak presjeka tkiva, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – razlika između označenih skupina

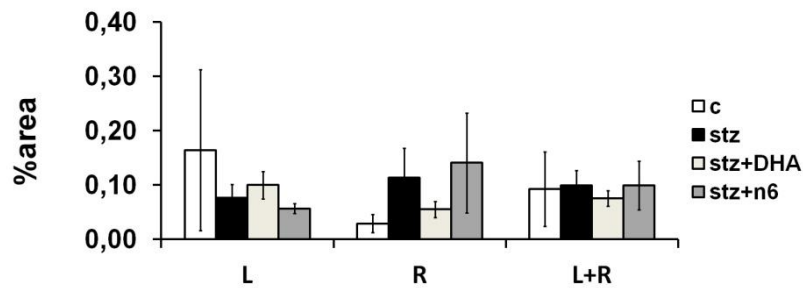
U stz skupini pronašli smo statistički značajan porast gustoće NF 200-imunoreaktivnih živčanih vlakana u usporedbi s kontrolnom skupinom u subendokardijalnom tkivu septuma okrenutog lijevom ($p < 0,05$) i desnom ($p < 0,01$) ventrikulu. U subendokardijalnom tkivu septuma okrenutog desnom ventrikulu prehrana obogaćena s n3 (stz+DHA skupina, $p < 0,05$) kao i s n6 (stz + n6 skupina, $p < 0,01$) PUFA-ma je rezultirala značajnim sniženjem gustoće NF 200 vlakana u usporedbi s dijabetičnom skupinom (stz). Iako je u subendokardijalnom tkivu septuma okrenutog lijevom i desnom ventrikulu gustoća NF 200 vlakana bila veća u stz+N6 ($p < 0,01$), ali također i u stz + DHA skupini u usporedbi s kontrolnom skupinom ($p < 0,05$), n6 suplementacija u prehrani je rezultirala smanjenjem gustoće NF 200-imunoreaktivnih živčanih vlakana, u usporedbi s stz skupinom ($p < 0,05$) (Slika 3).

5.3. Gustoća CGRP-imunoreaktivnih živčanih vlakana u subendokardijalnom dijelu septuma srca

U ovom istraživanju nismo pronašli statistički značajne promjene u gustoći CGRP-imunoreaktivnih vlakana uzrokovane šećernom bolešću niti različitim omjerima n6/n3 PUFA u prehrani (Slika 4).



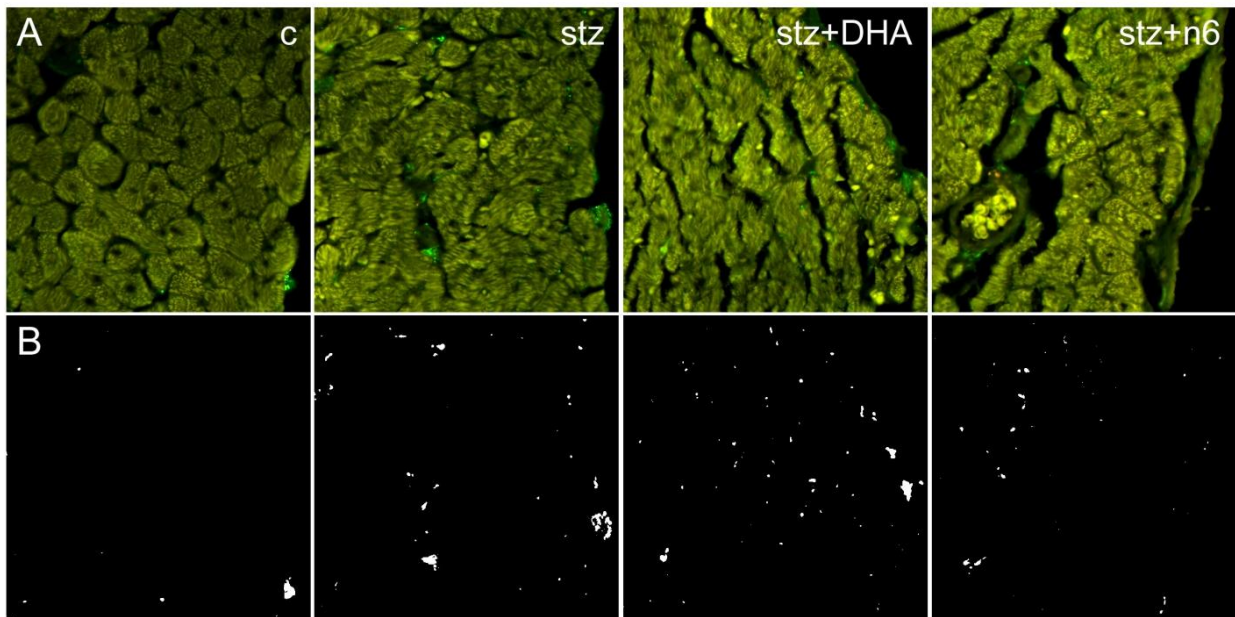
C



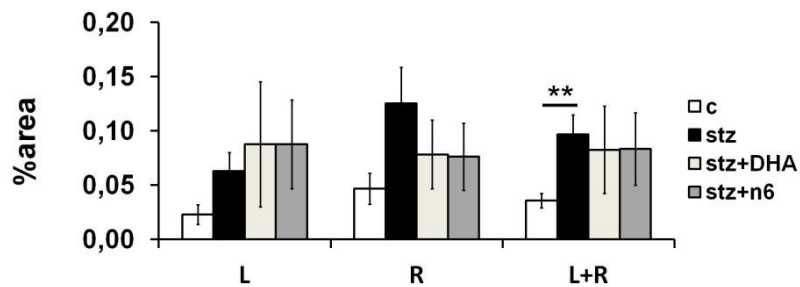
Slika 4. Gustoća CGRP-imunoreaktivnih živčanih vlakana u subendokardijalnom dijelu septuma

(A) Reprezentativne mikrofotografije desne strane subendokardijalnog dijela srčanog septuma obojane biljegom CGRP (zeleno). C - kontrolna skupina; stz – dijabetična skupina hranjena standardnom dijetom (obje dijetе sadržavale su omjer n6/n3 ~7); stz + DHA – dijabetična skupina hranjena hranom obogaćenom s n3 PUFA-ma (2,5% ribljeg ulja, sadržavalo je 16% eikozapentaenoične – EPA i 19% dokozaheksaenoične kiseline – DHA, omjer n6/n3~1), stz + n6 – dijabetična skupina hranjena s dijetom koja je sadržavala 2,5% suncokretovog ulja (n6/n3 ~ 60). (B) Obradene slike iz A : bijelo – područje živčanih vlakana. (C) Gustoća živčanih vlakana izražena kao postotak presjeka tkiva.

5.4. Gustoća TH-imunoreaktivnih živčanih vlakana u subendokardijalnom dijelu septuma



C



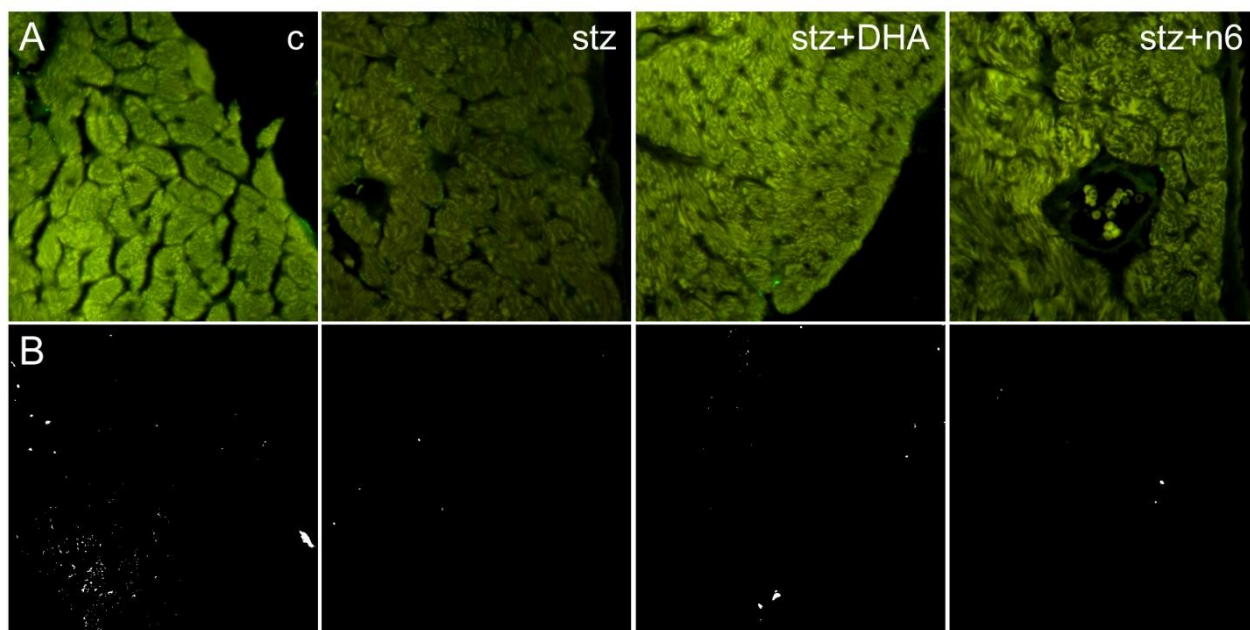
Slika 5. Gustoća TH-imunoreaktivnih živčanih vlakana u subendokardijalnom dijelu septuma

(A) reprezentativne mikrofotografije desne strane subendokardijalnog dijela srčanog septuma obojane za TH - biljeg simpatičkih neuronalnih vlakana (zeleno). C - kontrolna skupina; stz – dijabetična skupina hranjena standardnom dijetom (obje dijetete sadržavale su omjer n6/n3 ~7); stz + DHA – dijabetična skupina hranjena hranom s dodatkom n3 PUFA (2,5% riblje ulje, sadržavalo je 16% eikozapentaenoične – EPA i 19% dokozaheksaenoične kiseline – DHA, omjer n6/n3~1), stz + n6 – dijabetična skupina hranjena s dijetom koja sadrži 2,5% suncokretovog ulja (n6/n3 ~ 60). (B) obrađene slike iz A: bijelo – područje živčanih vlakana. (C) Gustoća živčanih vlakana izražena kao postotak presjeka tkiva, ** - $p < 0.01$ – razlika između označenih skupina.

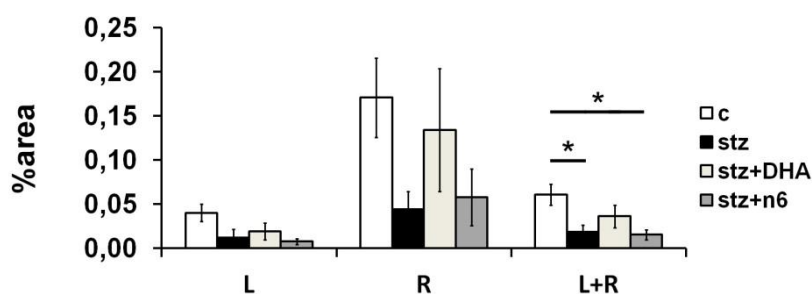
U stz skupini pronašli smo porast gustoće imunoreaktivnih živčanih vlakana osjetljivih na TH, u usporedbi s kontrolnom skupinom, u prosjeku lijevog i desnog interventrikularnog septuma ($p < 0,01$). Dodatak n3- ili n6-PUFA u prehrani nije vratio gustoću TH-imunoreaktivnih vlakana na razinu kontrole (Slika 5).

5.5. Gustoća ChAT-imunoreaktivnih živčanih vlakana u subendokardijalnom dijelu septuma

Pronašli smo značajno smanjenje gustoće ChAT imunoreaktivnih vlakana u interventrikulskom septumu okrenutom lijevoj i desnoj klijetci u stz skupini štakora u usporedbi s kontrolnom skupinom ($p < 0,05$). Dodatak n3 i n6 PUFA prehrani (stz + DHA skupina i stz + n6 skupina) nije uspio vratiti gustoću imunoreaktivnih vlakana na razinu kontrolne skupine. Dapače, gustoća vlakana je bila značajno niža u stz + n6 skupini u usporedbi s kontrolnom skupinom ($p < 0,05$) (Slika 6).



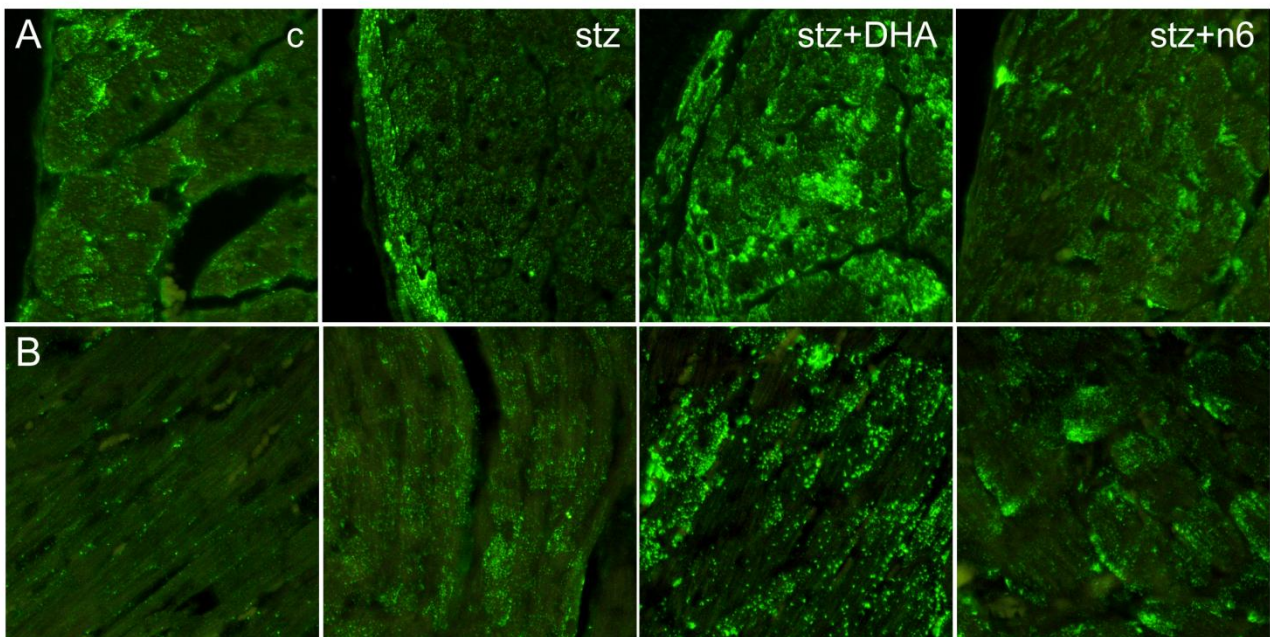
C



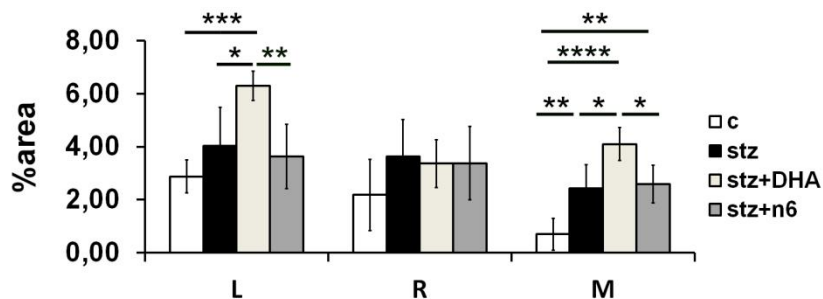
Slika 6. Gustoća ChAT-imunoreaktivnih živčanih vlakana u subendokardijalnom dijelu septuma.

(A) Reprezentativne mikrofotografije desne strane subendokardijalnog dijela srčanog septuma obojane za kolin acetil transferazu (ChAT) – u ovom slučaju biljeg parasimpatičkih živčanih vlakana (zeleno). C - kontrolna skupina; stz – dijabetična skupina hranjena standardnom prehranom (obje dijetе sadržavale su omjer n6/n3 ~7); stz + DHA – dijabetična skupina hranjena hranom s dodatkom n3 PUFA (2,5% riblje ulje, sa sadržaje 16% eikozapentaenoične – EPA i 19% dokozaheksaenoične kiseline – DHA, omjer n6/n3~1), stz + n6 – dijabetična skupina hranjena s dijetom koja je sadržavala 2,5% suncokretovog ulja (n6/n3 ~ 60). (B) Obradene slike iz A: bijelo – područje živčanih vlakana. (C) Gustoća živčanih vlakana izražena kao postotak presjeka tkiva, * - $p < 0,05$ – razlika između označenih skupina.

5.6. Imunoreaktivnost Cx37 u septumu srca pokusnih štakora



C



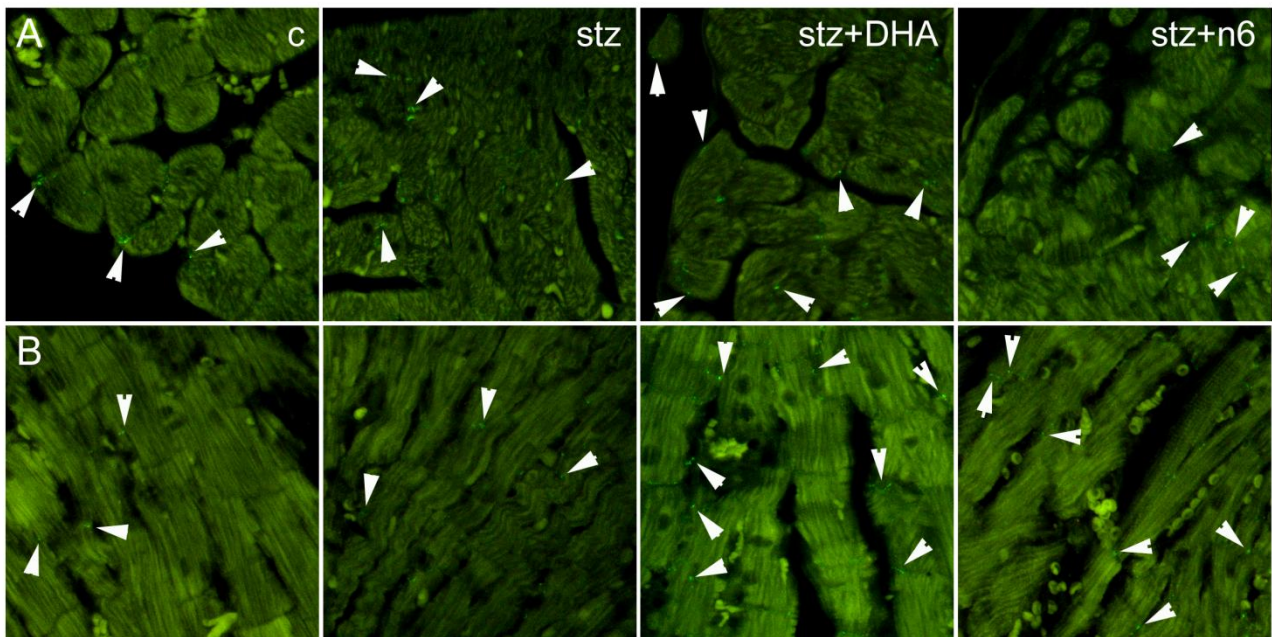
Slika 7. Gustoća Cx 37-imunoreaktivnosti u srčanom septumu pokusnih štakora

(A) Reprezentativne mikrofotografije lijeve strane subendokardijalnog dijela srčanog septuma obojene na Cx 37 (zeleno). C - kontrolna skupina; stz - dijabetična skupina hranjena standardnom dijetom (obje dijetete sadržavale su omjer n6/n3 ~7); stz + DHA - dijabetična skupina hranjena hranom s dodatkom n3 PUFA (2,5% riblje ulje, sadržavalo je 16% eikozapentaenoične - EPA i 19% dokozaheksaenoične kiseline – DHA, omjer n6/n3~1), stz + n6 - dijabetična skupina hranjena s dijetom koja je sadržavala 2,5% suncokretovog ulja (n6/n3

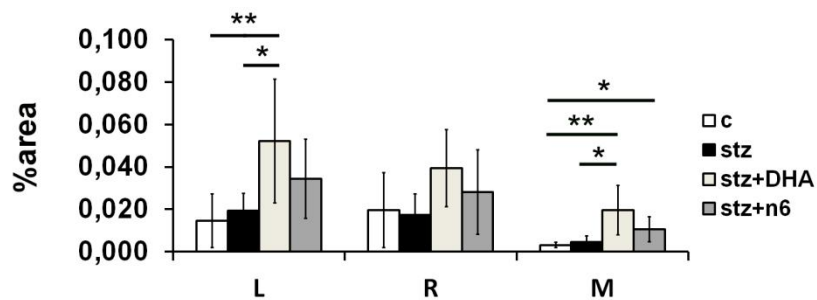
~ 60). (B) Reprezentativne mikrofotografije središnjeg dijela srčanog septuma obojanog na Cx 37 (zeleno). (C) Gustoća živčanih vlakana izražena kao postotak presjeka tkiva, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$ - razlika između označenih skupina.

U stz + DHA skupini pronašli smo statistički značajno veću gustoću Cx37 imunoreaktivnosti u usporedbi s: kontrolnom skupinom ($p < 0,001$), skupinom stz + n6 ($p < 0,01$) i stz skupinom ($p < 0,05$) u subendokardijalnom tkivu septuma okrenutom lijevom ventrikulu. U središnjem dijelu septuma srca (M), u stz + DHA skupini, pronašli smo značajno veću gustoću Cx37 imunoreaktivnosti u usporedbi s: kontrolnom skupinom ($p < 0,0001$), skupinom stz + n6 ($p < 0,05$) i stz skupinom ($p < 0,05$). Također, u središnjem dijelu septuma srca, pronašli smo značajno veću gustoću Cx37 imunoreaktivnosti u stz + n6 skupini u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,01$) i u stz skupini u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,01$) (Slika 7).

5.7. Imunoreaktivnost Cx43 u septumu srca pokusnih štakora



C



Slika 8. Gustoća Cx43-imunoreaktivnosti u srčanom septumu pokusnih štakora

(A) Reprezentativne mikrofotografije lijeve strane subendokardijalnog dijela srčanog septuma obojane na Cx43 (zeleno). C - kontrolna skupina; stz - dijabetična skupina hranjena standardnom dijetom (obje dijetе sadržavale su omjer n6/n3 ~7); stz + DHA - dijabetična skupina hranjena hranom s dodatkom n3 PUFA (s 2,5% ribljeg ulja, koje je sadržavalo 16% eikozapentaenoične - EPA i 19% dokozaheksaenoične kiseline – DHA, omjer n6/n3~1), stz + n6 - dijabetična skupina hranjena s dijetom koja je sadržavala 2,5% suncokretovog ulja (n6/n3 ~ 60). (B) reprezentativne mikrofotografije središnjeg dijela srčanog septuma obojanog na

Cx43 (zeleno). (C) Gustoća Cx43-imunoreaktivnosti izražena kao postotak presjeka tkiva, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ - razlika između označenih skupina.

U stz + DHA skupini pronašli smo statistički značajno veću gustoću Cx43-imunoreaktivnosti u usporedbi s kontrolnom skupinom ($p < 0,01$) i stz skupinom ($p < 0,05$) u subendokardijalnom tkivu septuma okrenutog lijevom ventrikulu. U središnjem dijelu septuma srca, u stz + DHA skupini, pronašli smo značajno veću gustoću Cx43-imunoreaktivnosti u usporedbi s kontrolnom skupinom ($p < 0,01$) i stz skupinom ($p < 0,05$). Također, u središnjem dijelu septuma srca, pronašli smo značajno veću gustoću Cx43 imunoreaktivnosti u stz + n6 skupini u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,05$) (Slika 8).

6. RASPRAVA

Promjene u osjetnoj i simpatičkoj gustoći inervacije u srcu štakora događaju se u različitim

fazama šećerne bolesti (95). Do sada je utjecaj PUFA na kardiovaskularni i živčani sustav intenzivno istraživano, ali mnoge nepodudarnosti o utjecaju n3 i n6 PUFA na kardiovaskularni sustav, zabilježene u kliničkim i eksperimentalnim studijama, ukazuju na potrebu daljnjih istraživanja o mehanizmima njihovog pozitivnog i mogućeg negativnog utjecaja (65-67).

Ograničeni broj istraživanja o utjecaju n3 PUFA na perifernu eksperimentalnu neuropatiju i istraživanja o regeneraciji mrežnice u dijabetičnih štakora pokazali su njihov zaštitni učinak (76-78). Međutim, prema našim saznanjima, ovo je prvo istraživanje o utjecaju PUFA na srčanu autonomnu neuropatiju. Cilj ovog istraživanja bio je definirati promjene srčane inervacije i utjecaj različitih n6/n3 omjera analizirajući različite vrste živčanih vlakana interventrikularnog septuma u štakora kod kojih je šećerna bolest tipa 1 izazvana streptozotocinom.

Šećerna bolest u štakora je rezultirala smanjenjem tjelesne težine, što je bilo posljedica metaboličkih poremećaja. Povećanje ili smanjenje tjelesne težine bilo je praćeno prilagodbom težine srca, koja se također smanjila, najviše u skupinama koje su dobivale posebnu prehranu s n3 ili n6 PUFA-ma, u usporedbi s kontrolnom skupinom. Srčanu prilagodbu promjeni tjelesne težine podupire i jaka pozitivna korelacija između razlike u tjelesnoj težini izražene kao postotak početne tjelesne težine i srčane težine. Međutim, negativna korelacija između relativne srčane težine izražene kao postotak tjelesne težine i promjene u tjelesnoj težini mogu indicirati da je smanjenje u tjelesnoj težini mnogo brže nego smanjenje u srčanoj težini. Za očekivati je da će se srčana inervacija možda uspjeti prilagoditi promjenama srčane mase.

Za detekciju svih živčanih vlakana u miokardu upotrijebili smo bojenje s pan-neuronalnim biljgom PgP9.5, s obzirom na njegovu široku rasprostranjenost u tijelima živčanih stanica i neuroendokrinih stanica u SŽS i PŽS (96). PgP 9.5 je lokaliziran u citoplazmi neurona i živčanim vlaknima. Protutijela za PgP 9.5 do sada su korištena kao glavni dijagnostički alat za neuropatiju malih živčanih vlakana, koja se povezuje sa statusom predijabetesa (96). PgP 9.5 je već bio korišten kao pan-neuralni biljeg za određivanje intrakardijalnih ganglija (97) kod periferne osjetne neuropatije. Također je korišten kao biljeg za procjenu srčane ozljede i regeneracije nakon kemijske simpatektomije (98). Povećanje gustoće PgP 9.5-imunoreaktivnih živčanih vlakana koje smo pronašli u dijabetičnih štakora 4 tjedna nakon indukcije DM1 je u skladu s prijašnjim istraživanjima iz našeg laboratorija (5), promatranih dva tjedna i dva mjeseca nakon indukcije DM1.

U ovom istraživanju pronašli smo značajne promjene u broju i površini živčanih vlakana obojenih na PgP 9.5. Zamijećen je porast broja i površine živčanih vlakana u subendokardijalnom dijelu srca u štakora mjesec dana nakon indukcije DM 1. Nije zamijećen porast gustoće subendokardijalnih živčanih vlakana u dijabetičnoj skupini koja je dobivala hranu s dodatkom n6 i n3 PUFA, što ukazuje na protektivni učinak masnih kiselina.

Uočene promjene nisu bile specifične za lijevu ili desnu stranu endokardijalnog dijela septuma, ali u skupini hranjenoj hranom s dodatkom n3 PUFA pronašli smo porast broja subendokardijalnih vlakana u dijelu septuma okrenutom prema lijevoj klijetki u odnosu na dio septuma okrenut prema desnoj klijetki. Utvrđeni porast gustoće PgP 9.5 imunoreaktivnih vlakana je u skladu s prijašnjim istraživanjima iz našeg laboratorija (5), gdje je isti detektiran u miokardu dva tjedna i dva mjeseca nakon indukcije DM 1. Međutim, u navedenom istraživanju gustoća vlakana PgP 9.5 u septumu nije se značajno promijenila. Uzimajući u obzir da je u istraživanju Baković i sur. (5), bio analiziran ukupan broj živčanih vlakana (subendokardijalni, kao i intramuralni), ovi podaci su u suglasju s činjenicom da u našem istraživanju nismo pronašli značajnu promjenu u gustoći živčanih vlakana u srčanom mišiću u sredini septuma, za razliku od subendokardijalnog područja. U našem istraživanju, analizirajući sve vrste živčanih vlakana, pronašli smo mnogo gušću inervaciju subendokardijalno, u odnosu na inervaciju središnjeg dijela septuma, gdje su pronađena rijetka živčana vlakna, bez značajne razlike između eksperimentalnih skupina (83).

Kako bismo detaljnije definirali promjene u srčanoj inervaciji upotrijebili smo specifične biljege za različite tipove živčanih vlakana. NF200 je korišten za identifikaciju mijeliniziranih osjetnih vlakana. Neurofilamenti su skupina intermedijarnih filamenata, koji čine glavnu strukturnu komponentu živčane stanice. Oni su ključni za komunikaciju s aksonalnim transportnim proteinima i proteinima povezanim s mikrotubulima. Neurofilamenti su strukturna potpora aksona i nužni su za njihov radijalni rast. Također osiguravaju strukturalnu stabilnost mijeliniziranih aksona, što utječe na brzinu provođenja živčanog impulsa (99). Ovisno o molekularnoj težini, razlikuju se tri podjedinice neurofilamenata. NF 200 je teški lanac s molekularnom težinom od 200 kDa, protutijela za koji se koriste za obilježavanje osjetnih mijeliniziranih neurona, koji najčešće pripadaju mehanoreceptorima i proprioreceptorima, kao i u subpopulaciji nociceptivnih neurona. Izvor NF200 imunoreaktivnih vlakana u srcu su spinalni gangliji (28) i projekcije vagusa u nodozni ganglij.

U našem istraživanju, našli smo najveće promjene u gustoći upravo u subpopulaciji NF 200-imunoreaktivnih živčanih vlakana. Primijećeno je smanjenje gustoće NF200 imunoreaktivnih živčanih vlakana u subendokardijalnom dijelu septuma okrenutog prema desnom u odnosu prema lijevom ventrikulu, u skupini hranjenoj hranom s dodatkom n3 PUFA.

Prijašnji rezultati iz našeg laboratorija su pokazali početni porast gustoće NF 200-imunoreaktivnih vlakana dva tjedna nakon indukcije šećerne bolesti streptozotocinom u Sprague Dawley štakora, što je bilo praćeno smanjenjem 12 mjeseci nakon indukcije (95).

Navedeno je u skladu s našim rezultatima, uzimajući u obzir da smo pronašli značajan porast NF 200-imunoreaktivnih živčanih vlakana u stz skupini u usporedbi s kontrolnom skupinom u subendokardijalnom dijelu septuma okrenutog desnom ventrikulu. Štoviše, u istom dijelu septuma, prehrana s n3 ili n6 PUFA-ma je rezultirala značajnim smanjenjem gustoće NF 200-imunoreaktivnih vlakana, u usporedbi sa skupinama koje su imale uobičajenu prehranu. Ovi rezultati upućuju na protektivnu ulogu i n3 i n6 PUFA na ozljedu teških mijeliniziranih živčanih vlakana u srčanom mišiću štakora izazvanu šećernom bolešću.

CGRP je neuropeptid koji se sastoji od 37 aminokiselina, a primarno je lokaliziran u C i A δ osjetnim vlaknima, koja su zastupljena u cijelom živčanom sustavu, većinom perivaskularno protežući se od adventicije do medije mišićnog sloja krvnih žila. Zastupljeniji su u arterijskim nego u venskim strukturama. Vežući se za receptor sličan calcitoninu, CGRP djeluje kao snažni mikrovaskularni vazodilatator u koronarnoj cirkulaciji, mozgu i bubrezima, s obzirom da ima 10 puta veću snagu od prostaglandina i 10 do 100 puta veću snagu od drugih vazodilatatora kao što su acetilkolin i tvar P (100). Djeluje protektivno na kardiovaskularni sustav i na cijeljenje rana. U senzornoj perifernoj neuropatiji, koja je jedna od komplikacija šećerne bolesti, pronađeno je smanjenje broja osjetnih neurona koji sadrže CGRP, posljedično zbog smanjenja proizvodnje čimbenika rasta živčanih stanica (NGF; engl. *nerve growth factor*) te se manifestira kao gubitak nociceptivnog osjeta koji je povezan i sa sporijim cijeljenjem rana (98). Moguće je da gubitak neuronalnog CGRP-a pogoršava kardiovaskularnu bolest u pacijenata koji boluju od DM-a, s obzirom da je dokazana niža razina cirkulirajućeg CGRP-a u pacijenata s DM-om, a koji kao komorbiditet imaju i neku od srčanih bolesti (100).

Međutim, u našem istraživanju, nismo pronašli značajne razlike u količini CGRP imunoreaktivnih živčanih vlakana jedan mjesec nakon indukcije DM1 u štakora, niti utjecaj prehrane različitim omjerima PUFA. Ovi rezultati mogu implicirati da bi nemijelinizirani C i A δ

senzorni neuroni mogli biti manje osjetljivi na promjene u prehrani s različitim omjerima PUFA, u usporedbi s teškim mijeliniziranim NF200 imunoreaktivnim vlaknima.

Šećerna bolest izaziva disfunkciju autonomnog živčanog sustava kao jednu od svojih komplikacija (s naglaskom na simpatički tonus) (101, 102).

TH-imunoreaktivnost se često koristi kao biljeg simpatičke inervacije. TH je ključan enzim u sintezi noradrenalina iz tirozina, kojeg TH konvertira u dihidroksifenilalanin. Noradrenalin je glavni katekolamin simpatičkog živčanog sustava koji aktivira beta adrenergičke receptore (β -AR). On potiče srčanu kontraktilnost, djelujući preko srčanih β -AR. Kao jednu od svojih komplikacija, DM uzrokuje srčanu autonomnu disfunkciju (naglašeniju u simpatičkom tonusu) (102).

Izražaj TH je snižen u srcima dijabetičnih miševa i štakora, dok su β -AR inaktivirani i sniženi, posljedično dovodeći do smanjene srčane kontraktilnosti, što može biti posljedica povećane simpatičke srčane ekscitacije u dijabetičnom srcu (103).

Smatra se da bi povećanje inducibilnosti ventrikulskih aritmija, u dugoročnom modelu dijabetesa kod štakora, moglo biti povezano s gubitkom simpatičko - parasimpatičke ravnoteže i relativnom simpatičkom hiperinervacijom (mjereno gustoćom tirozin hidroksilaza pozitivnih vlakana i izražaja odgovarajućih mRNA u proksimalnim i distalnim dijelovima lijevog ventrikula (51).

Utvrđeno je da tijekom streptozotocinom inducirane šećerne bolesti remodeliranje simpatičkih živčanih vlakana predominira kroz period od prvih 10 tjedana (102).

U prijašnjim istraživanjima iz našeg laboratorija, proučeno je najveće povećanje gustoće TH-vlakana u srcima štakora dva mjeseca nakon indukcije DM1, s početkom proliferacije simpatičkih živčanih završetaka već dva tjedna nakon indukcije DM1 te da nije bilo nikakve promjene detektirane u kasnijim fazama šećerne bolesti (6 i 12 mjeseci) (95). To je u skladu s rezultatima ovog istraživanja, gdje smo zaabilježili značajan porast gustoće TH imunoreaktivnih vlakana u subendokardijalnom dijelu septuma jedan mjesec nakon indukcije DM. Međutim, nismo pronašli značajan učinak prehrane s različitim omjerima PUFA na promjene simpatičke inervacije.

ChAT je enzim odgovoran za biosintezu neurotransmitora acetilkolina. Korišten je kao specifični indikator funkcije kolinergičkih neurona u centralnom i perifernom živčanom sustavu, a selektivno se sintetizira u perikarionu kolinergičkih neurona i transportira u živčane završetke (104).

Prijašnja istraživanja su pokazala da je parasimpatička denervacija miokarda (dokazana imunohistokemijski, koristeći ChAT kao biljeg), s pratećom simpatičkom denervacijom, u štakorskom modelu gdje je šećerna bolest također izazvana streptozotocinom, izražena nakon 3 mjeseca, a još izraženija 6 mjeseci nakon indukcije šećerne bolesti (51). Ove promjene mogu dovesti do pogoršanja parasimpatičke/simpatičke neravnoteže, što može povećati rizik za razvoj ventrikularnih aritmija.

Ovi rezultati su u skladu s obrascom ozljede živaca koji je primjećen i kod ljudi (49, 51, 105). Remodeliranje autonomnog živčanog sustava u srcima štakora je primjećeno već u prva tri tjedna nakon aplikacije streptozotocina, sa smanjenjem parasimpatičkog tonusa (102). Dapače, nakon 10 tjedana u parasimpatičkim živcima uočene su veće ozljede te su oni imali i sporiji oporavak u usporedbi sa simpatičkim živcima (102).

Promjene u srčanoj parasimpatičkoj inervaciji koje se manifestiraju kao smanjenje srčanih ganglija u veličini i broju, su uočene nakon 4, 8 i 12 tjedana nakon indukcije šećerne bolesti u štakora streptozotocinom (106). Rezultati našeg istraživanja su u skladu s gore navedenim s obzirom da smo također pronašli smanjenje gustoće ChAT imunoreaktivnih vlakana u srčanom mišiću dijabetičnih štakora u usporedbi s kontrolnom skupinom. Isti rezultat je zabilježen u dijabetičnoj skupini hranjenoj s n6 PUFA-ma. Međutim, u skupini dijabetičnih štakora hranjenoj s n3 PUFA-ma pad gustoće ChAT imunoreaktivnih vlakana je bio manji i nije bio značajan.

Dodatak prehrani ulja haringe (20:5/22:6 n3 EPA/DHA) i lanenog ulja (18:3 n-3, ALA) je umanjio ozljedu perifernih živaca uzrokovanu šećernom bolešću un štakorskom modelu DM2 (104), te su autori zaključili da dugolančane n6 i n3 pufe mogu biti korisne u liječenju periferne dijabetičke neuropatije.

Osim utjecaja na cirkulaciju u živčanom sustavu, restoracija Na, K-ATP-aze (107) i izražaja NGF-a, kao i povećana osjetljivost na inzulin (108) te širok spektar protuupalnih učinaka (109), bi mogli doprinijeti neuroprotektivnim učincima PUFA, posebice n3 (110). U šećernoj bolesti se događa značajan poremećaj metabolizma i sastava masnih kiselina u CNS-u i PNS-u (111), pa je za pretpostaviti da bi njihova nadoknada prehranom s pravilnim omjerom masnih kiselina bi mogla spriječiti ove poremećaje.

Iako su nedavna istraživanja (112) pokazala očuvanje srčane simpatičke funkcije tijekom DM1, razlog tome bi mogao biti selektivni kriterij uključenja za subjekte oboljele od šećerne bolesti, jer su bili uključeni samo pacijenti bez znakova mikrovaskularnih

komplikacija, dok su pacijenti koji su imali u anamnezi kardiovaskularne bolesti bili isključeni iz navedenog istraživanja.

Istraživanje provedeno od Stevensa i suradnika (46) je pokazalo proksimalnu simpatičku hiperinervaciju, s distalnom denervacijom, u dijabetičnih pacijenata sa DAN.

Mi smo se u ovom istraživanju fokusirali na inervaciju proksimalnog dijela septuma zbog toga što je ovo područje reprezentativno i pruža mogućnost usporedbe s drugim istraživanjima. Septum je važan jer sadržava dijelove provodnog sustava srca koji su ključni za normalnu srčanu aktivnost.

Hipoteza istraživanja je da bi protektivni/nepovoljni učinci koje različite PUFA imaju na funkciju miokarda u dijabetičnih pacijenata mogle biti (barem djelomično) posljedica njihovog utjecaja na promjene srčane inervacije i najčešćih tipova koneksina, budući da je dokazan (iako nedovoljno istražen) utjecaj istih na inervaciju u drugim organima. Budući da do sada nisu provedena istraživanja utjecaja visokog omjera n6/n3 PUFA i suplementacije s n3 PUFA na promjene uzorka srčane inervacije uzrokovane DM (broj i presjek živčanih projekcija u miokard), koje su nedvojbeno sastavna komponenta/patofiziološki mehanizam razvitka dijabetičke kardiomiopatije, rezultati ovog istraživanja doprinose boljem razumijevanju mehanizma djelovanja različitih PUFA na razvoj dijabetičke kardiomiopatije, a djelomično se mogu objasniti njihovim utjecajem na re-distribuciju inervacije i izražaja koneksina, uz praćenje različitih „populacija“ živčanih vlakana putem različitih biokemijskih biljega. Došli smo do preciznijih informacija o ovim mehanizmima, s obzirom na široki spektar uloga koje imaju pojedine neuronalne projekcije u srčanom mišiću.

Do sada postoji samo jedno istraživanje koje je uključilo mjerenje izražaja Cx43 u srcu dijabetičnih štakora s prehranom obogaćenom n3 PUFA-ma (56). Istraživanja drugih, u srcu jako zastupljenih koneksina, uključujući Cx37 te utjecaj prehrane s visokim udjelom n6 PUFA na ove pokazatelje do sada nisu istraživani.

U spomenutoj studiji, koja je istraživala *in vivo* funkcionalne promjene srca u ranim stadijima STZ-om inducirane dijabetičke kardiomiopatije te učinke na iste uz unos n3 PUFA dokazan je njihov koristan, kardioprotektivni mehanizam na modulaciju abnormalnosti srčanog Cx43 (70). U dijabetičnom srčanom tkivu je detektiran značajan porast ukupne, ali i funkcionalne fosforilirane forme Cx43, uz njegovu abnormalnu distribuciju među kardiomicitima, dok su se te iste promjene normalizirale uz unos n3 PUFA, tj. došlo je do smanjenja povišenog izražaja srčanog Cx43 proteina i supresije njegove hiperfosforilacije, što u konačnici barem

djelomično umanjuje abnormalnu srčanu međustaničnu komunikaciju, koja se razvila kao komplikacija dijabetesa. Također je detektirana i lokacijska heterogenost srčanog Cx43, tj. promijenjena distribucija i/ili fosforilacija Cx43 kroz miokard. Navedena heterogenost može uzrokovati poremećenu srčanu sinkroniziranost, koja dalje može potaknuti razvoj srčane disfunkcije i srčanih aritmija. Stoga je unos n3 PUFA, u konačnici djelovao povoljno višestruko: kroz smanjenje abnormalnog srčanog Cx43, njegovog fosforiliranog oblika te djelujući na njegovu distribuciju (70). Osim navedenog, u istom radu je u skupini s povećanim unosom n3 PUFA detektirano poboljšanje srčane funkcije kroz povećanje srčanog minutnog volumena i ejeckijske frakcije te poboljšanje udarnog volumena, kao i rada srca.

Tijekom ovog istraživanja utvrdili smo veći izražaj Cx43 u stz + DHA skupini u usporedbi s kontrolnom skupinom i stz skupinom u subendokardijalnom tkivu septuma okrenutog lijevom ventrikulu. Nadalje, u središnjem dijelu septuma srca, u stz + DHA skupini, pronašli smo značajno veću gustoću Cx43-imunoreaktivnosti u usporedbi s kontrolnom i stz skupinom, kao i veću gustoću Cx43 imunoreaktivnosti u stz + n6 skupini u odnosu na kontrolnu skupinu. Navedeno ukazuje da bi suplementacija n3 ili n6 PUFA-ma u dijabetičkim uvjetima, mogla djelovati u smislu porasta izražaja Cx43, koji nije zabilježen sam od sebe kod dijabetičnih štakora s uobičajenim udjelom PUFA u prehrani. Razlike u odnosu na rezultate prethodno spomenutog istraživanja se mogu djelomično objasniti činjenicom da nismo detektirali posebno ukupni, a posebno hiperfosforilirani oblik Cx43, kao ni njegovu dislociranost tj. lateralizaciju.

Abnormalnosti u koneksinima sudjeluju i u nastanku srčanih aritmija. Usporenje ili blokada provođenja signala je posljedica aktivnih i pasivnih svojstava stanične membrane kardiomiocita, koje uključuju promjene u sastavu stanične membrane, kao i disfunkciju međustanične komunikacije među koneksinima te promjene kao što su suspresija Na-ovisnih kanala i nakupljanje ekstracelularnih proteina (83).

U uznapređovalim oblicima atrijske fibrilacije, abnormalnosti u koneksinima Cx43, Cx40 i Cx45 u području atrija se smatraju okidačima produljenja aritmije (82). U slučaju ventrikularne fibrilacije dolazi do ektopične aktivnosti uslijed simpatičko-vagalne neravnoteže i poremećaja Ca-ovisnih kanala, a re-entry je olakšan usporenjem ili blokadom provođenja, koje može nastati uslijed smanjene membranske ekscitabilnosti, smanjenog međukanalnog uparivanja koneksina pa time i smanjene međustanične komunikacije (83).

Neselektivni međustanični koneksinski srčani kanali osiguravaju propagaciju električnog i molekularnog signala i doprinose u brzini njegova provođenja (82, 83). Stoga njihovo smanjenje, a pogotovo onog najviše zastupljenog u srcu Cx43, kao i gubitak

uparenosti rezultira visoko proaritmogenim učinkom, promovirajući trigerirajuću aktivnost, disperziju repolarizacije i refrakciju, usporavajući i blokirajući provođenje (82, 83). Suplementacija s n3 PUFA-ma u modelu hipertenzivnih štakora je rezultirala multiplim kardioprotektivnim učincima: smanjenjem krvnog tlaka, supresijom VF preko 50%, smanjenjem aritmogenih supstrata, očuvanjem integriteta stanične membrane kardiomiocita, smanjenjem dislokacije Cx43, kao i smanjenjem povišenog izražaja mRNA Cx43, a pojačanjem izražaja ukupnog Cx43 i/ili njegove funkcionalne fosforilirane forme (88). Navedene promjene uočene u razini Cx43 su u skladu s rezultatima iz našeg istraživanja.

U drugoj studiji na modelu nasljedne hipetrigliceridemije u štakora je dokazano da prehrana s omega-3 PUFA-ma ili uzimanje atorvastatina povisuje prag za nastanak VF-a, uz smanjenje abnormalno povišenog izražaja srčanog Cx43, djelujući na njegovu distribuciju i lateralizaciju, uz smanjenje hiperfosforiranog oblika Cx43 (113, 114). Time su i navedeni rezultati donekle u suglasju s našim istraživanjem.

Prema našem saznanju, utjecaj suplementacije PUFA-ma na druge u srčanom mišiću zastupljene izoforme koneksina, do sada nije bio istraživani. U našem istraživanju utvrdili smo znatno veći izražaj Cx37, u usporedbi s izražajem Cx43, u srčanom mišiću štakora. Suplementacija n3-PUFA-ma rezultirala je značajno većim izražajem Cx37 u subendokardijalnom dijelu srčanog septuma okrenutom prema lijevom ventrikulu, u usporedbi sa svim drugim skupinama štakora. Međutim, u središnjem dijelu septuma srca, eksperimentalni DM1 izazvan streptozotocinom rezultirao je porastom izražaja Cx37 u sve tri dijabetične skupine, dok je suplementacija s n3 PUFA-ma rezultirala je dodatnim porastom njegova izražaja. Navedeno ukazuje da bi djelovanje n3 PUFA u dijabetičnim uvjetima bilo u smislu porasta izražaja Cx37, dok isto nije primjećeno za n6 PUFA, jer se u toj skupini životinja izražaj Cx37 u središnjem dijelu septuma nije razlikovao u usporedbi s dijabetičnom skupinom hranjenom standardnom dijetom.

U zaključku, učinci PUFA na krvožilni i živčani sustav intenzivno se istražuju, ali nisu u potpunosti razjašnjeni. Koliko je nama poznato, ovo je prvo istraživanje koje je razmatralo utjecaj prehrane različitim omjerima n6 i n3 PUFA na promjene uzorka srčane inervacije uzrokovane šećernom bolešću (u štakorskom modelu). Rezultati ovog istraživanja doprinose boljem razumijevanju mehanizma djelovanja i potencijalnog utjecaja različitih omjera PUFA u prehrani dijabetičnih pacijenata na srčanu inervaciju te nastanak i ishod dijabetičke kardiomiopatije putem njihovog utjecaja na re-distribuciju srčane inervacije i izražaj koneksina.

7. ZAKLJUČCI

Učinci višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA) na krvožilni i živčani sustav intenzivno se istražuju, ali nisu u potpunosti razjašnjeni. Koliko je nama poznato, ovo je prvo istraživanje koje je razmatralo utjecaj prehrane različitim omjerima n6 i n3 PUFA na promjene uzorka srčane inervacije uzrokovane šećernom bolešću (u štakorskom modelu). Rezultati ovog istraživanja doprinose boljem razumijevanju mehanizma djelovanja i potencijalnog utjecaja različitih omjera PUFA u prehrani dijabetičnih pacijenata na srčanu inervaciju te nastanak i ishod dijabetičke kardiomiopatije kod istih. Zaključci koji se mogu izvući iz ovog istraživanja su sljedeći:

Pokusni DM1 u štakora rezultira padom tjelesne težine, kojemu se prilagođava i miokard, uz popratno smanjenje mase srca, posebice u štakora suplementiranih s n3 i n6 PUFA-ma. Kao rezultat, omjer srčane i tjelesne mase ostaje stalan.

Gustoća živčanih vlakana svih istraživanih populacija veća je u subendokardijalnim područjima srčanog septuma štakora, u usporedbi sa središnjim „intramuralnim“ područjima, gdje su živčana vlakna iznimno rijetka.

Pokusni DM1 rezultira porastom broja i gustoće PgP9.5 imunoreaktivnih vlakana u subendokardijalnim dijelovima srčanog septuma štakora, dok suplementacija s n3 i n6 PUFA-ma pokazuje djelomičan protektivni učinak na ovaj porast.

Pokusni DM1 rezultira porastom gustoće NF200 imunoreaktivnih vlakana u subendokardijalnim dijelovima srčanog septuma štakora, dok suplementacija s n6 PUFA-ma pokazuje protektivni, a s n3 PUFA-ma djelomično protektivni učinak na ovaj porast.

Ni pokusni DM1, niti suplementacija PUFA-ma ne utječe značajno na gustoću CGRP imunoreaktivnih vlakana u subendokardijalnim dijelovima srčanog septuma štakora.

Pokusni DM1 rezultira porastom gustoće TH imunoreaktivnih vlakana u subendokardijalnim dijelovima srčanog septuma štakora, dok suplementacija s PUFA-ma nema protektivni učinak na ovaj porast.

Pokusni DM1 rezultira padom gustoće ChAT imunoreaktivnih vlakana u subendokardijalnim dijelovima srčanog septuma štakora, dok suplementacija s PUFA-ma nema protektivni učinak na ovaj porast.

Promjene gustoće srčane inervacije zahvaćaju konzistentnije subendokardijalne dijelove srčanog septuma okrenute lijevoj srčanoj klijetci.

Izražaj Cx 37 i Cx 43 veći je u subendokardijalnim područjima srčanog septuma štakora, u usporedbi sa središnjim „intramuralnim“ područjima, ali je on prisutan također i u središnjim područjima.

Pokusni DM1 sam po sebi ne rezultira promjenom izražaja Cx 43 u srčanom septumu štakora, međutim, DM1 u kombinaciji sa suplementacijom s n3 PUFA-ma dovodi do porasta njegovog izražaja u intramuralnom i subendokardijalnim dijelovima srčanog septuma okrenutim lijevoj klijetci, dok suplementacija s n6 PUFA-ma rezultira njihovim porastom samo u intramuralnom dijelu septuma.

Pokusni DM1 sam po sebi dovodi do porasta izražaja Cx 37 u intramuralnom dijelu srčanog septuma štakora. Ova promjena još je naglašenija kod suplementacije n3 PUFA-ma. Subendokardijalno dolazi do promjena samo s lijeve strane septuma, gdje DM1 u kombinaciji sa suplementacijom s n3 PUFA-ma dovodi do porasta izražaja Cx37.

Zbirno, eksperimentalni DM1 dovodi do poremećaja gustoće i rasporeda živčanih vlakana, kao i Cx 43 i Cx 37 u srčanom mišiću štakora, koje su samo djelomično kompenzirane, a u nekim slučajevima još i naglašenije, suplementacijom PUFA-ma. Pronašli smo konzistentniji protektivni učinak n6 PUFA na promjenu srčane inervacije, u usporedbi s prehranom s n3 PUFA-ma. Učinak suplementacije n3 i n6 PUFA-ma na tijek i ishod CAN nije jednoznačan, vjerojatno zbog složenih i višestrukih mehanizama djelovanja te interakcija sa zdravim i oboljelim tkivom. Stoga se njihovi učinci trebaju procjenjivati s oprezom, a nužna su i daljnja istraživanja kako bi se oni potpuno rasvijetlili.

8. SAŽETAK

Promatrali smo utjecaj eksperimentalno induciranog *diabetes mellitus*-a tipa 1 (DM1), u kombinaciji sa različitim omjerima n6/n3 višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA, engl. *polyunsaturated fatty acids*) na različite tipove živčanih vlakana u srčanom mišiću štakora, kako bi otkrili da li bi protektivni/nepovoljni učinci koje različite PUFA imaju na funkciju miokarda u dijabetičnih pacijenata mogle biti (barem djelomično) posljedica njihovog utjecaja na promjene srčane inervacije, kao i izražaja najčešćih tipova koneksina, budući da je dokazan (iako nedovoljno istražen) utjecaj istih na inervaciju u drugim organima. Kontrolna skupina i dijabetična skupina su hranjene hranom s n6/n3 PUFA omjerom oko 7; hrana stz + n6 skupine je imala omjer n6/n3 60, dok je hrana stz + DHA skupine sadržavala 2,5% ribljeg ulja (koje sadrži 16% eikozapentaenoične kiseline – EPA i 19% dokozaheksaenoične kiseline – DHA), n6/n3 omjer bio 1. DM1 je induciran intraperitonealnom injekcijom streptozotocina (55 mg/kg) 14 dana nakon početka prehrane eksperimentalnom dijedom, a štakori su eutanizirani 30 dana nakon indukcije DM1.

Korištena je imunohistokemija za detekciju i kvantifikaciju različitih tipova živčanih vlakana srčanog septuma i izražaj Cx 43 i Cx 37. Pronašli smo razlike u srčanoj inervaciji karakteristične za početnu fazu eksperimentalnog DM1, koja se manifestirala kao povećanje ukupnog broja i gustoće površine svih živčanih vlakana u subendokardijalnim područjima srčanog septuma, mjenjenih putem PgP 9.5 imunoreaktivnosti. Detaljnom analizom, pronašli smo da je ovaj porast sastoji većinom od teških mijeliniziranih NF 200 imunoreaktivnih vlakana i TH imunoreaktivnih simpatičkih vlakana, dok se gustoća Chat imunoreaktivnih parasimpatičkih vlakana smanjila. U intramuralnom miokarda, gdje su pronađena rijetka vlakna (svih istraživanih tipova), značajne razlike nije bilo. Iznenadujuće, pronašli smo konzistentniji protektivni učinak n6 PUFA, u usporedbi s prehranom s n3 PUFA-ma. Suprotno rasporedu živčanih vlakana, u intramuralnom dijelu septuma također je nađen izražaj oba istraživana koneksina. Pokusni DM1 sam po sebi nije doveo do promjene izražaja Cx 43, ali je u kombinaciji sa suplementacijom s n3 PUFA-ma rezultirao porastom izražaja u intramuralnom i subendokardijalnim dijelovima srčanog septuma okrenutim lijevoj klijetci, dok je suplementacija s n6 PUFA-ma rezultira njihovim porastom samo u intramuralnom dijelu septuma.

Pokusni DM1 sam po sebi dovodio je do porasta izražaja Cx 37 u intramuralnom dijelu srčanog septuma štakora. Ova promjena još je naglašenija kod suplementacije n3 PUFA-ma. Subendokardijalno dolazi do promjena samo s lijeve strane septuma, gdje je DM1 u kombinaciji sa suplementacijom s n3 PUFA-ma doveo do porasta izražaja Cx37.

Ovi rezultati pridonose boljem razumijevanju potencijalnog utjecaja različitih PUFA omjera u prehrani dijabetičnih pacijenata na srčanu inervaciju i genezu i rezultat dijabetičke autonomne kardiomiopatije.

9. SUMMARY

We investigated the effect of experimentally induced *diabetes mellitus* type 1 (DM1) in combination with different ratios of dietary n6/n3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) on different types of nerve fibers in rat cardiac muscle to determine, whether the protective/unfavorable effects of different PUFAs on myocardial function in diabetics could be a (at least partial) backlash of their effect on the changes in cardiac innervation as well as on the expression of the most abundant connexin types (Cx), since their influence on the innervation of other organs has been demonstrated. The control (c) and diabetic (stz) groups were fed an n6/n3 ratio of 7. The diet of the stz+n6 group had an n6/n3 ratio of 60, whereas the diet of the stz+ DHA group contained 2.5% fish oil (containing 16% eicosapentaenoic acid - EPA and 19% docosahexaenoic acid - DHA) and an n6/n3 ratio of 1. DM1 was induced by i.p. Injection of streptozotocin (55 mg/kg), and rats were euthanized 30 days after induction. Immunohistochemistry was used to detect and quantify various types of neuronal fibers as well as Cx37 and Cx43 in the cardiac septum. In the initial phase of experimental DM1, we found changes in the characteristics of cardiac innervation manifested by an increase in the total number and areal density of all neuronal fibers as measured by PgP 9.5 immunoreactivity. On detailed analysis, we found that this increase consisted mainly of heavy myelinated NF200 immunoreactive fibers and TH immunoreactive sympathetic fibers, whereas the density of ChAT immunoreactive parasympathetic fibers decreased. No significant differences were found in the deep (middle) part of the myocardium, where rare fibers (of all types studied) were found. Surprisingly, we found a more consistent protective effect of n6-PUFAs compared with supplementation with n3-PUFAs. In contrast to the nerve fiber arrangement, expression of the two connexins studied was also found in the intramural part of the septum. Experimental DM1 alone did not alter the expression of Cx 43, but in combination with supplementation with n3-PUFAs, it led to an increase in expression in the intramural and subendocardial parts of the cardiac septum facing the left ventricle, whereas supplementation with n6-PUFAs led to an increase only in the intramural part of the septum. Experimental DM1 alone resulted in an increase in the expression of Cx 37 in the intramural part of the rat cardiac septum. This change is even more pronounced when supplemented with n3 PUFAs. Subendocardial changes occur only on the left side of the septum, where DM1 combined with supplementation with n3-PUFAs led to an increase in Cx37 expression. These results may contribute to a better understanding of the potential effects of different PUFA ratios in the diet of diabetic patients on cardiac innervation and the development and progression of diabetic autonomic cardiomyopathy.

10. LITERATURA

1. Verhulst MJL, Loos BG, Gerdes VEA, Teeuw WJ. Evaluating All Potential Oral Complications of Diabetes Mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:56.
2. Chottova Dvorakova M, Kuncova J, Pfeil U, McGregor GP, Svirglerova J, Slavikova J, i sur. Cardiomyopathy in streptozotocin-induced diabetes involves intra-axonal accumulation of calcitonin gene-related peptide and altered expression of its receptor in rats. *Neuroscience*. 2005;134(1):51-8.
3. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes care*. 2022;45(Suppl 1):S17-S38.
4. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010;87(1):4-14.
5. Bakovic M, Juric Paic M, Zdrilic E, Vukojevic K, Ferhatovic L, Marin A, i sur. Changes in cardiac innervation during maturation in long-term diabetes. *Exp Gerontol*. 2013;48(12):1473-8.
6. Moore KL, Dalley AF, Agur AMR. *Clinically Oriented Anatomy (6th Ed)*2010.
7. Armour JA. Cardiac neuronal hierarchy in health and disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;287(2):R262-71.
8. Zandstra TE, Notenboom RGE, Wink J, Kies P, Vliegen HW, Egorova AD, i sur. Asymmetry and Heterogeneity: Part and Parcel in Cardiac Autonomic Innervation and Function. *Frontiers in physiology*. 2021;12:665298.
9. Ter Horst GJ, Hautvast RW, De Jongste MJ, Korf J. Neuroanatomy of cardiac activity-regulating circuitry: a transneuronal retrograde viral labelling study in the rat. *Eur J Neurosci*. 1996;8(10):2029-41.
10. Kukanova B, Mravec B. Complex intracardiac nervous system. *Bratisl Lek Listy*. 2006;107(3):45-51.
11. Hopkins DA, Armour JA. Localization of sympathetic postganglionic and parasympathetic preganglionic neurons which innervate different regions of the dog heart. *The Journal of comparative neurology*. 1984;229(2):186-98.
12. Armour JA, Hopkins DA. Activity of canine in situ left atrial ganglion neurons. *Am J Physiol*. 1990;259(4 Pt 2):H1207-15.
13. Wink J, van Delft R, Notenboom RGE, Wouters PF, DeRuiter MC, Plevier JWM, i sur. Human adult cardiac autonomic innervation: Controversies in anatomical knowledge and relevance for cardiac neuromodulation. *Auton Neurosci*. 2020;227:102674.
14. Taylor EW, Jordan D, Coote JH. Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. *Physiological reviews*. 1999;79(3):855-916.

15. Janig W. Neurobiology of visceral afferent neurons: neuroanatomy, functions, organ regulations and sensations. *Biol Psychol.* 1996;42(1-2):29-51.
16. Hasan W. Autonomic cardiac innervation: development and adult plasticity. *Organogenesis.* 2013;9(3):176-93.
17. Smith PG, Warn JD, Steinle JJ, Krizsan-Agbas D, Hasan W. Modulation of parasympathetic neuron phenotype and function by sympathetic innervation. *Auton Neurosci.* 2002;96(1):33-42.
18. Levy MN. Autonomic interactions in cardiac control. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1990;601:209-21.
19. Kawano H, Okada R, Yano K. Histological study on the distribution of autonomic nerves in the human heart. *Heart and vessels.* 2003;18(1):32-9.
20. Crick SJ, Wharton J, Sheppard MN, Royston D, Yacoub MH, Anderson RH, i sur. Innervation of the human cardiac conduction system. A quantitative immunohistochemical and histochemical study. *Circulation.* 1994;89(4):1697-708.
21. Chow LT, Chow SS, Anderson RH, Gosling JA. Autonomic innervation of the human cardiac conduction system: changes from infancy to senility--an immunohistochemical and histochemical analysis. *The Anatomical record.* 2001;264(2):169-82.
22. Chow LT, Chow SS, Anderson RH, Gosling JA. Innervation of the human cardiac conduction system at birth. *Br Heart J.* 1993;69(5):430-5.
23. Hayakawa T, Kuwahara-Otani S, Maeda S, Tanaka K, Seki M. Projections of calcitonin gene-related peptide immunoreactive neurons in the vagal ganglia of the rat. *J Chem Neuroanat.* 41(1):55-62.
24. Cervero F. Sensory innervation of the viscera: peripheral basis of visceral pain. *Physiological reviews.* 1994;74(1):95-138.
25. Kuo DC, Oravitz JJ, DeGroat WC. Tracing of afferent and efferent pathways in the left inferior cardiac nerve of the cat using retrograde and transganglionic transport of horseradish peroxidase. *Brain Res.* 1984;321(1):111-8.
26. Hopkins DA, Armour JA. Ganglionic distribution of afferent neurons innervating the canine heart and cardiopulmonary nerves. *Journal of the autonomic nervous system.* 1989;26(3):213-22.
27. Pan HL, Chen SR. Myocardial ischemia recruits mechanically insensitive cardiac sympathetic afferents in cats. *J Neurophysiol.* 2002;87(2):660-8.

28. Guic MM, Kosta V, Aljinovic J, Sapunar D, Grkovic I. Characterization of spinal afferent neurons projecting to different chambers of the rat heart. *Neurosci Lett*. 2010;469(3):314-8.
29. Armour J, Kember G. Cardiac sensory neurons. . In: JA A, JL A, editors. *Basic and clinical neurocardiology*. New York: Oxford University Press, Inc; 2004. p. p79-117.
30. Kosta V, Guic MM, Aljinovic J, Sapunar D, Grkovic I. Immunohistochemical characteristics of neurons in nodose ganglia projecting to the different chambers of the rat heart. *Auton Neurosci*. 2010;155(1-2):33-8.
31. Zhuo H, Ichikawa H, Helke CJ. Neurochemistry of the nodose ganglion. *Progress in neurobiology*. 1997;52(2):79-107.
32. Price TJ, Flores CM. Critical evaluation of the colocalization between calcitonin gene-related peptide, substance P, transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 immunoreactivities, and isolectin B4 binding in primary afferent neurons of the rat and mouse. *J Pain*. 2007;8(3):263-72.
33. Fang X, Djouhri L, McMullan S, Berry C, Waxman SG, Okuse K, i sur. Intense isolectin-B4 binding in rat dorsal root ganglion neurons distinguishes C-fiber nociceptors with broad action potentials and high Nav1.9 expression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(27):7281-92.
34. Huang WA, Boyle NG, Vaseghi M. Cardiac Innervation and the Autonomic Nervous System in Sudden Cardiac Death. *Card Electrophysiol Clin*. 2017;9(4):665-79.
35. Filipovic N, Marinovic Guic M, Kosta V, Vukojevic K. Cardiac innervations in diabetes mellitus-Anatomical evidence of neuropathy. *Anat Rec (Hoboken)*. 2022.
36. Armour JA. Potential clinical relevance of the 'little brain' on the mammalian heart. *Exp Physiol*. 2008;93(2):165-76.
37. Bissinger A. Cardiac Autonomic Neuropathy: Why Should Cardiologists Care about That? *J Diabetes Res*. 2017;2017:5374176.
38. Duque A, Mediano MFF, De Lorenzo A, Rodrigues LF, Jr. Cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes: Pathophysiology, clinical assessment and implications. *World J Diabetes*. 2021;12(6):855-67.
39. Rajbhandari J, Fernandez CJ, Agarwal M, Yeap BXY, Pappachan JM. Diabetic heart disease: A clinical update. *World J Diabetes*. 2021;12(4):383-406
40. Stino AM, Rumora AE, Kim B, Feldman EL. Evolving concepts on the role of dyslipidemia, bioenergetics, and inflammation in the pathogenesis and treatment of diabetic peripheral neuropathy. *J Peripher Nerv Syst*. 2020;25(2):76-84.

41. Vinik AI, Ziegler D. Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. *Circulation*. 2007;115(3):387-97.
42. Vinik AI, Erbas T, Casellini CM. Diabetic cardiac autonomic neuropathy, inflammation and cardiovascular disease. *J Diabetes Investig*. 2013;4(1):4-18.
43. Jungen C, Scherschel K, Flenner F, Jee H, Rajendran P, De Jong KA, i sur. Increased arrhythmia susceptibility in type 2 diabetic mice related to dysregulation of ventricular sympathetic innervation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2019;317(6):H1328-H41.
44. Sudo SZ, Montagnoli TL, Rocha BS, Santos AD, de Sa MPL, Zapata-Sudo G. Diabetes-Induced Cardiac Autonomic Neuropathy: Impact on Heart Function and Prognosis. *Biomedicines*. 2022;10(12).
45. Langer A, Freeman MR, Josse RG, Armstrong PW. Metaiodobenzylguanidine imaging in diabetes mellitus: assessment of cardiac sympathetic denervation and its relation to autonomic dysfunction and silent myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol*. 1995;25(3):610-8.
46. Stevens MJ, Dayanikli F, Raffel DM, Allman KC, Sandford T, Feldman EL, i sur. Scintigraphic assessment of regionalized defects in myocardial sympathetic innervation and blood flow regulation in diabetic patients with autonomic neuropathy. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31(7):1575-84.
47. Paolillo S, Rengo G, Pagano G, Pellegrino T, Savarese G, Femminella GD, i sur. Impact of diabetes on cardiac sympathetic innervation in patients with heart failure: a 123I meta-iodobenzylguanidine (123I MIBG) scintigraphic study. *Diabetes care*. 2013;36(8):2395-401.
48. Di Carli MF, Bianco-Batlles D, Landa ME, Kazmers A, Groehn H, Muzik O, i sur. Effects of autonomic neuropathy on coronary blood flow in patients with diabetes mellitus. *Circulation*. 1999;100(8):813-9.
49. Ziegler D, Gries FA, Muhlen H, Rathmann W, Spuler M, Lessmann F. Prevalence and clinical correlates of cardiovascular autonomic and peripheral diabetic neuropathy in patients attending diabetes centers. The Diacan Multicenter Study Group. *Diabete Metab*. 1993;19(1 Pt 2):143-51.
50. Thayer JF, Lane RD. The role of vagal function in the risk for cardiovascular disease and mortality. *Biol Psychol*. 2007;74(2):224-42.
51. Xuan YL, Wang Y, Xue M, Hu HS, Cheng WJ, Li XR, i sur. In rats the duration of diabetes influences its impact on cardiac autonomic innervations and electrophysiology. *Auton Neurosci*. 2015;189:31-6.

52. Kreiner G, Wolzt M, Fasching P, Leitha T, Edlmayer A, Korn A, i sur. Myocardial m-[123I]iodobenzylguanidine scintigraphy for the assessment of adrenergic cardiac innervation in patients with IDDM. Comparison with cardiovascular reflex tests and relationship to left ventricular function. *Diabetes*. 1995;44(5):543-9.
53. Giordano A, Calcagni ML, Verrillo A, Pellegrinotti M, Frontoni S, Spallone V, i sur. Assessment of sympathetic innervation of the heart in diabetes mellitus using 123I-MIBG. *Diabetes Nutr Metab*. 2000;13(6):350-5.
54. Shapiro H, Theilla M, Attal-Singer J, Singer P. Effects of polyunsaturated fatty acid consumption in diabetic nephropathy. *Nature reviews Nephrology*. 2011;7(2):110-21.
55. Brosolo G, Da Porto A, Marcante S, Picci A, Capilupi F, Capilupi P, i sur. Omega-3 Fatty Acids in Arterial Hypertension: Is There Any Good News? *International journal of molecular sciences*. 2023;24(11).
56. Buckley MT, Racimo F, Allentoft ME, Jensen MK, Jonsson A, Huang H, i sur. Selection in Europeans on Fatty Acid Desaturases Associated with Dietary Changes. *Molecular biology and evolution*. 2017;34(6):1307-18.
57. Kapoor B, Kapoor D, Gautam S, Singh R, Bhardwaj S. Dietary Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs): Uses and Potential Health Benefits. *Current nutrition reports*. 2021;10(3):232-42.
58. Saini RK, Prasad P, Sreedhar RV, Akhilender Naidu K, Shang X, Keum YS. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs): Emerging Plant and Microbial Sources, Oxidative Stability, Bioavailability, and Health Benefits-A Review. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(10).
59. Oppedisano F, Macri R, Gliozzi M, Musolino V, Carresi C, Maiuolo J, i sur. The Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of n-3 PUFAs: Their Role in Cardiovascular Protection. *Biomedicines*. 2020;8(9).
60. Moon YA. Emerging roles of polyunsaturated fatty acid synthesis pathway in colorectal cancer. *Animal cells and systems*. 2023;27(1):61-71.
61. Kopal M, Ondrejovicova I, Deakova Z, Ulicna O, Vancova O, Durackova Z, i sur. Effect of PUFA-rich plant oil on risk factors of STZ-induced diabetes in Wistar rats. *Redox report : communications in free radical research*. 2014;19(4):161-9.
62. Simopoulos AP. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients*. 2016;8(3):128.
63. Wu JHY, Marklund M, Imamura F, Tintle N, Ardisson Korat AV, de Goede J, i sur. Omega-6 fatty acid biomarkers and incident type 2 diabetes: pooled analysis of individual-

level data for 39 740 adults from 20 prospective cohort studies. *The lancet Diabetes & endocrinology*. 2017;5(12):965-74.

64. Harbige LS. Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: a question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. *Lipids*. 2003;38(4):323-41.

65. Billman GE. The effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on cardiac rhythm: a critical reassessment. *Pharmacol Ther*. 2013;140(1):53-80.

66. Clark LF, Thivierge MC, Kidd CA, McGeoch SC, Abraham P, Pearson DW, i sur. Fish oil supplemented for 9 months does not improve glycaemic control or insulin sensitivity in subjects with impaired glucose regulation: a parallel randomised controlled trial. *Br J Nutr*. 2016;115(1):75-86.

67. Clarke RJ, Aung T, Armitage J. Questioning the Associations of omega-3 Fatty Acid Supplement Use With Cardiovascular Disease Risks-Reply. *JAMA Cardiol*. 2018;3(8):781-2.

68. Vikoren LA, Drotningvik A, Bergseth MT, Mjos SA, Austgulen MH, Mellgren G, i sur. Intake of Baked Cod Fillet Resulted in Lower Serum Cholesterol and Higher Long Chain n-3 PUFA Concentrations in Serum and Tissues in Hypercholesterolemic Obese Zucker fa/fa Rats. *Nutrients*. 2018;10(7).

69. Aloud BM, Raj P, O'Hara K, Shao Z, Yu L, Anderson HD, i sur. Conjugated linoleic acid prevents high glucose-induced hypertrophy and contractile dysfunction in adult rat cardiomyocytes. *Nutr Res*. 2016;36(2):134-42.

70. Anna Z, Angela S, Barbara B, Jana R, Tamara B, Csilla V, i sur. Heart-protective effect of n-3 PUFA demonstrated in a rat model of diabetic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem*. 2014;389(1-2):219-27.

71. Bhandarkar NS, Kumar SA, Martin J, Brown L, Panchal SK. Attenuation of Metabolic Syndrome by EPA/DHA Ethyl Esters in Testosterone-Deficient Obese Rats. *Mar Drugs*. 2018;16(6).

72. Christensen JH, Schmidt EB. Autonomic nervous system, heart rate variability and n-3 fatty acids. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2007;8 Suppl 1:S19-22.

73. Bowman L, Mafham M, Wallendszus K, Stevens W, Buck G, Barton J, i sur. Effects of n-3 Fatty Acid Supplements in Diabetes Mellitus. *N Engl J Med*. 2018;379(16):1540-50.

74. Billman GE, Harris WS. Effect of dietary omega-3 fatty acids on the heart rate and the heart rate variability responses to myocardial ischemia or submaximal exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300(6):H2288-99.

75. Christensen JH. Omega-3 polyunsaturated Fatty acids and heart rate variability. *Frontiers in physiology*. 2011;2:84.

76. Coste TC, Gerbi A, Vague P, Pieroni G, Raccach D. Neuroprotective effect of docosahexaenoic acid-enriched phospholipids in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*. 2003;52(10):2578-85.
77. Pham TL, He J, Kakazu AH, Jun B, Bazan NG, Bazan HEP. Defining a mechanistic link between pigment epithelium-derived factor, docosahexaenoic acid, and corneal nerve regeneration. *J Biol Chem*. 2017;292(45):18486-99.
78. He J, Pham TL, Kakazu A, Bazan HEP. Recovery of Corneal Sensitivity and Increase in Nerve Density and Wound Healing in Diabetic Mice After PEDF Plus DHA Treatment. *Diabetes*. 2017;66(9):2511-20.
79. Kavvadas P, Abed A, Poulain C, Authier F, Labejof LP, Calmont A, i sur. Decreased Expression of Connexin 43 Blunts the Progression of Experimental GN. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2017;28(10):2915-30.
80. Cottrell GT, Burt JM. Functional consequences of heterogeneous gap junction channel formation and its influence in health and disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2005;1711(2):126-41.
81. Jones JC, Bodenshtein TM. Connexins and Glucose Metabolism in Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2022;23(17).
82. Desplantez T. Cardiac Cx43, Cx40 and Cx45 co-assembling: involvement of connexins epitopes in formation of hemichannels and Gap junction channels. *BMC cell biology*. 2017;18(Suppl 1):3.
83. Tribulova N, Szeiffova Bacova B, Egan Benova T, Knezl V, Barancik M, Slezak J. Omega-3 Index and Anti-Arrhythmic Potential of Omega-3 PUFAs. *Nutrients*. 2017;9(11).
84. Dhein S, Salameh A. Remodeling of Cardiac Gap Junctional Cell-Cell Coupling. *Cells*. 2021;10(9).
85. Joshi MS, Mihm MJ, Cook AC, Schanbacher BL, Bauer JA. Alterations in connexin 43 during diabetic cardiomyopathy: competition of tyrosine nitration versus phosphorylation. *Journal of diabetes*. 2015;7(2):250-9.
86. Liu X, Yang R, Bai W, Xu X, Bi F, Hao Y, i sur. Involvement of amylin B-H2S-connexin 43 signaling pathway in vascular dysfunction and enhanced ischemia-reperfusion-induced myocardial injury in diabetic rats. *Bioscience reports*. 2020;40(6).
87. Luetic M, Vitlov Uljevic M, Masek T, Benzon B, Vukojevic K, Filipovic N. PUFAs supplementation affects the renal expression of pannexin 1 and connexins in diabetic kidney of rats. *Histochem Cell Biol*. 2020;153(3):165-75.

88. Radosinska J, Kurahara LH, Hiraishi K, Viczenczova C, Egan Benova T, Szeiffova Bacova B, i sur. Modulation of cardiac connexin-43 by omega-3 fatty acid ethyl-ester supplementation demonstrated in spontaneously diabetic rats. *Physiological research*. 2015;64(6):795-806.
89. Yeshao W, Gu J, Peng X, Nairn AC, Nadler JL. Elevated glucose activates protein synthesis in cultured cardiac myocytes. *Metabolism: clinical and experimental*. 2005;54(11):1453-60.
90. Sato T, Haimovici R, Kao R, Li AF, Roy S. Downregulation of connexin 43 expression by high glucose reduces gap junction activity in microvascular endothelial cells. *Diabetes*. 2002;51(5):1565-71.
91. Hills C, Price GW, Wall MJ, Kaufmann TJ, Chi-Wai Tang S, Yiu WH, i sur. Transforming Growth Factor Beta 1 Drives a Switch in Connexin Mediated Cell-to-Cell Communication in Tubular Cells of the Diabetic Kidney. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2018;45(6):2369-88.
92. Vitlov Uljevic M, Starcevic K, Masek T, Bocina I, Restovic I, Kevic N, i sur. Dietary DHA/EPA supplementation ameliorates diabetic nephropathy by protecting from distal tubular cell damage. *Cell and tissue research*. 2019;378(2):301-17.
93. Mead R, Gilmour SG, Mead A. *Statistical Principles for the Design of Experiments: Applications to Real Experiments*. Cambridge University Press: Cambridge. 2012.
94. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. 2001;4(1):9.
95. Bakovic M, Filipovic N, Ferhatovic Hamzic L, Kunac N, Zdrilic E, Vitlov Uljevic M, i sur. Changes in neurofilament 200 and tyrosine hydroxylase expression in the cardiac innervation of diabetic rats during aging. *Cardiovasc Pathol*. 2018;32:38-43.
96. Van Acker N, Rage M, Sluydts E, Knaapen MW, De Bie M, Timmers M, i sur. Automated PGP9.5 immunofluorescence staining: a valuable tool in the assessment of small fiber neuropathy? *BMC Res Notes*. 2016;9:280.
97. Richardson RJ, Grkovic I, Anderson CR. Immunohistochemical analysis of intracardiac ganglia of the rat heart. *Cell and tissue research*. 2003;314(3):337-50.
98. Vo PA, Tomlinson DR. Effects of nerve growth factor on expression of GAP-43 in right atria after sympathectomy in diabetic rats. *Diabetes Obes Metab*. 2001;3(5):350-9.
99. Yuan A, Rao MV, Veeranna, Nixon RA. Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9(4).

100. Russell FA, King R, Smillie SJ, Kodji X, Brain SD. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*. 2014;94(4):1099-142.
101. Li X, Yang JL, Ma DF, Lin HQ, Xu XD, Jiang Yue H. [Effects of Different Compatibilities of Ramulus Cinnamomi and Peony in Guizhi Decoction on Diabetic Cardiac Autonomic Neuropathy]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 2015;35(6):741-5.
102. Li X, Jiang YH, Jiang P, Lin HQ, Yang JL, Ma DF, i sur. Analysis of Heart Rate Variability and Cardiac Autonomic Nerve Remodeling in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2015;123(5):272-81.
103. Nandi SS, Zheng H, Sharma NM, Shahshahan HR, Patel KP, Mishra PK. Lack of miR-133a Decreases Contractility of Diabetic Hearts: A Role for Novel Cross Talk Between Tyrosine Aminotransferase and Tyrosine Hydroxylase. *Diabetes*. 2016;65(10):3075-90.
104. Oda Y. Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol Int*. 1999;49(11):921-37.
105. Chessa M, Butera G, Lanza GA, Bossone E, Delogu A, De Rosa G, i sur. Role of heart rate variability in the early diagnosis of diabetic autonomic neuropathy in children. *Herz*. 2002;27(8):785-90.
106. Lund DD, Subieta AR, Pardini BJ, Chang KS. Alterations in cardiac parasympathetic indices in STZ-induced diabetic rats. *Diabetes*. 1992;41(2):160-6.
107. Scarpini E, Bianchi R, Moggio M, Sciacco M, Fiori MG, Scarlato G. Decrease of nerve Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity in the pathogenesis of human diabetic neuropathy. *J Neurol Sci*. 1993;120(2):159-67.
108. Huang JP, Cheng ML, Hung CY, Wang CH, Hsieh PS, Shiao MS, i sur. Docosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid are positively associated with insulin sensitivity in rats fed high-fat and high-fructose diets. *Journal of diabetes*. 2017;9(10):936-46.
109. Ma C, Xu Z, Lv H. Low n-6/n-3 PUFA ratio improves inflammation and myocardial ischemic reperfusion injury. *Biochem Cell Biol*. 2019;97(5):621-9.
110. Coppey LJ, Davidson EP, Obrosova A, Yorek MA. Enriching the diet with menhaden oil improves peripheral neuropathy in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. *J Neurophysiol*. 2015;113(3):701-8.
111. Horrobin DF. The roles of essential fatty acids in the development of diabetic neuropathy and other complications of diabetes mellitus. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1988;31(3):181-97.

112. Duvernoy CS, Raffel DM, Swanson SD, Jaiswal M, Mueller G, Ibrahim ES, i sur. Left ventricular metabolism, function, and sympathetic innervation in men and women with type 1 diabetes. *J Nucl Cardiol.* 2016;23(5):960-9.
113. Benova T, Knezl V, Viczenczova C, Bacova BS, Radosinska J, Tribulova N. Acute anti-fibrillating and defibrillating potential of atorvastatin, melatonin, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid demonstrated in isolated heart model. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society.* 2015;66(1):83-9.
114. Bacova B, Radosinska J, Knezl V, Kolenova L, Weismann P, Navarova J, i sur. Omega-3 fatty acids and atorvastatin suppress ventricular fibrillation inducibility in hypertriglyceridemic rat hearts: implication of intracellular coupling protein, connexin-43. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society.* 2010;61(6):717-23.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Marjan Urlić

E-mail: murlic@kbc-zagreb.hr

<https://orcid.org/0000-0003-0741-9333>

Školovanje :

- 2013. – upisao poslijediplomski studij 'Klinička medicina utemeljena na dokazima' na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu
- 2006. – 2012. – Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- 2002.-2006. - 3. prirodoslovno - matematička gimnazija, Split

Radno iskustvo :

- 2021. - danas - Klinički bolnički centar Zagreb – specijalist Kardiorakalne kirurgije
- 2017. - 2021. - Klinički bolnički centar Zagreb - specijalizant Kardiorakalne kirurgije
- 2015. - 2017.– Klinički bolnički centar Split - specijalizant Kardiorakalne kirurgije
- 2013. - 2015. – Zavod za hitnu medicinu Splitsko – dalmatinske županije – doktor u timu 1 hitne medicine : ispostava Hvar i ispostava Makarska, mrtvozornik za područje Makarske i okolice za vrijeme rada na Zavodu za hitnu medicinu
- 2012. – 2013. Dom zdravlja Metković – obavljanje pripravničkog staža

Profesionalno usavršavanje :

- EACTS – 36th annual meeting – pasivni sudionik, Milan, Italija 2022.
- 2. Nacionalni kongres Hrvatskog društva za kardijalnu kirurgiju - aktivni sudionik, Rovinj 2022.
- EACTS Fundamentals in cardiac surgery: mitral and tricuspid valve – 2021. Windsor, UK – aktivni sudionik tečaja

- “Mitralna akademija – Kirurški aspekti liječenja mitralne patologije” – pasivni sudionik tečaja, Zagreb 2021.
- AAF Salzburg Cleveland Clinic Seminar – 2018., 2019. i 2020. Salzburg, Austrija - aktivni sudionik
- Tečaj šivanja vaskularnih i kardiokirurških anastomoza – aktivni sudionik, Osijek 2019.
- 1. Nacionalni kongres Hrvatskog društva za kardijalnu kirurgiju i 14. Sastanak hrvatskih i slovenskih kardijalnih kirurga - pasivni sudionik, Dubrovnik 2018.
- položen tečaj - ALS-P (Advanced life support provider course), Split 2014.
- položen Stručni ispit za doktora medicine - 2014.
- 2006. - 2012. godine - Član Sportske udruge studenata medicine Zagreb - SportMEF - voditelj judo sekcije
- Član judo reprezentacije Hrvatske (2004.-2015.)
- 2012. godine - voditelj Kirurške sekcije na Medicinskom fakultetu u Zagrebu

Publikacije :

1. **Urlić M**, Urlić I, Urlić H, Mašek T, Benzon B, Vitlov Uljević M, Vukojević K, Filipović N. [Effects of Different n6/n3 PUFAs Dietary Ratio on Cardiac Diabetic Neuropathy.](#) Nutrients. 2020 Sep 10;12(9):2761. doi: 10.3390/nu12092761.
2. Gašparović H, Čerina P, Tokić T, **Urlić M**, Golubić Čepulić B, Kopjar T, Burcar I, Biočina B. Propensity-score matched comparison between minimally invasive and conventional aortic valve replacement. Croat Med J. 2022 Oct 31;63(5):423-430. doi: 10.3325/cmj.2022.63.423.
3. Mihaljevic MZ, Petricevic M, Konosic S, Svetina L, **Urlic M**, Starcevic Z, Krzelj K, Milosevic M, Kalamar V, Gasparovic H, Biocina B. The Association between Glycosylated Hemoglobin Level and Platelets Reactivity in Patients with Diabetes Mellitus Undergoing Elective Coronary Artery Bypass Grafting. Thorac Cardiovasc Surg. 2022 Jun 25. doi: 10.1055/s-0042-1748768.
4. Gasparovic H, Tokic T, Cikes M, **Urlic M**, Kopjar T, Cerina P, Knezevic I, Perkovic D, Milicic D, Biocina B. Recurrent HeartMate 3 Right Ventricular Assist Device Stoppages in a Biventricular Assist Device Carrier. Heart Surg Forum. 2023 Jan 31;26(1):E038-E039. doi: 10.1532/hsf.5165.

5. Boric K, Dosenovic S, Jelcic Kadic A, Batinic M, Cavar M, **Urlic M**, Markovina N, Puljak L. Interventions for postoperative pain in children: An overview of systematic reviews. *Paediatr Anaesth.* 2017 Sep;27(9):893-904. doi: 10.1111/pan.13203. Epub 2017 Jul 14.
6. Karlica-Utrobicic D, Batistic DJ, **Urlic M**. Changes in the eyelids and conjunctiva caused by ultraviolet radiation *Coll Antropol.* 2014 Dec;38(4):1111-3.
7. Ilic N, Juricic J, Krnic D, Orsulic D, Simundza I, **Urlic M**, Ilic NF, Ilic D. Uniportal VATS Lobectomy in the Treatment of NSCLC *Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2017 January 12(1):S764. doi: 10.1016/j.jtho.2016.11.1021
8. Cerina P, Kopjar T, Gasparovic H, **Urlic M**. Atrial fibrillation surgery at University Hospital Centre Zagreb 2020-2022, 2022 November *Cardiologia Croatica* 17(9-10):174-174, DOI: 10.15836/ccar2022.174
9. Gasparovic H, Cerina P, Golubic B, Tokic T, **Urlic M**, Kopjar T, Burcar I, Biocina B, Milicic D. Contemporary trends in the surgical management of aortic valve disease 2021 January *Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti Medicinske znanosti* 56-57:16-21. doi: 10.21857/y6zolbr1nm

Kongresna priopćenja :

1. Burcar I, **Urlic M**, Petricevic M, Kopjar T, Ivankovic S, Smiljanic R, Alduk AM, Grman – Fanfani A, Radeljic V, Manola S. How we managed to create grafts for coronary artery bypass grafting in a porcelain patient: a case report, *The Heart Surgery Forum - #3 HSF Meeting@Croatia / Levinson, Mark ; Rudež, Igor - Zagreb : Forum Multimedia Publishing, 2017 Dec, E207-E207*
2. Petricevic M; Knezevic J; Samoukovic G, Safradin I; **Urlic M**; Fucek H; Gasparovic H; Lekic A; Biocina B. Diagnosis and contemporary management of acquired von Willebrand deficiency in heart disease: a review of literature. *The Heart Surgery Forum - #3 HSF Meeting @ Croatia / Levinson, Mark ; Rudež, Igor - Zagreb : Forum Multimedia Publishing, 2017 Dec, E208-E208*
3. Petricevic M; Biocina B; Dirkmann D; Safradin I, **Urlic M**; Fucek H, Konosic S; Papastiev V, Madzar T, Rotim A; Goerlinger K. Aspirin sensitive platelet function assessed preoperatively by Multiplate and Rotem Platelet whole blood impedance

aggregometers in patients undergoing elective cardiac surgery, The Heart Surgery Forum - #3 HSF Meeting @ Croatia / Levinson, Mark ; Rudež, Igor - Zagreb : Forum Multimedia Publishing, 2017 Dec, E212-E212

4. **Urlic M**, Petricevic M, Safradin I, Svetina L, Gasparovic H, Biocina B. Angiosarcoma of the pulmonary artery – a case report. Oral presentation at 2. Croatian Slovenian cardiac surgery meeting, 2017 Oct, Maribor

5. Karlica-Utrobčić D, Batistić DJ, **Urlic M**. Changes in the eyelids and conjunctiva caused by ultraviolet radiation Coll Antropol. 2014 Dec;38(4):1111-3. Oral presentation 2014 April, Opatija

6. **Urlic M**, Kopjar T, Tokic T, Cerina P, Burcar I, Gasparovic H. Atrial undulation as a first symptom of myxoma in a patient after recovery of COVID 19 infection. October 2022 Drugi nacionalni kongres Hrvatskog društva za kardijalnu kirurgiju 12.-14.05.2022. Rovinj - poster

7. **Urlic M**, Kopjar T, Tokic T, Cerina P, Burcar I, Gasparovic H. Paravalvular regurgitation after implantation of aortic valve prosthesis secured with Cor-Knot automated fastener, October 2022 Drugi nacionalni kongres Hrvatskog društva za kardijalnu kirurgiju 12.-14.05.2022. Rovinj – poster

8. **Urlic M**, Petricevic M, Kopjar T, Ivankovic S, Safradin I, Gasparovic H, Biocina B. The association between timing of preoperative clopidogrel discontinuation, platelets reactivity and bleeding complications in patients undergoing coronary artery bypass grafting, oral presentation and poster at „World society of cardiovascular and thoracic surgeons” congress, Ljubljana 2018 Sep

Jezici :

Engleski - aktivno poznavanje u govoru i pismu, Talijanski - aktivno poznavanje