

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Ana Vuica**

**UTJECAJ DOBI I ŠEĆERNE BOLESTI TIP 1 NA IZRAŽAJ  
RECEPTORA ZA VITAMIN D, 1 $\alpha$ -HIDROKSILAZE I  
24-HIDROKSILAZE U JETRI ŠTAKORA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**U Splitu, 2016.**

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

Voditeljica rada: doc. dr. sc. Natalija Filipović

## ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Nataliji Filipović na nesebičnoj pomoći, trudu i podršci tijekom izrade ove doktorske disertacije. Hvala Vam što ste u meni potaknuli istraživački duh i naučili me da se uporan i ustrajan rad, ma koliko težak bio, na kraju uvijek isplati. Hvala Vam od srca.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Katarini Vukojević na velikoj podršci, pomoći i motivacijskim govorima kojima ste me ohrabljivali i poticali da uvijek dam najbolje od sebe. Hvala Vam što ste uvijek stvarali poticajnu radnu okolinu i nesebično mi prenosili svoje znanje.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Ivici Grković na podršci i konstruktivnim savjetima i sugestijama pri izradi doktorske disertacije.

Također zahvaljujem svim kolegama Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju, posebice dr. sc. Lejli Ferhatović Hamzić na nesebičnoj pomoći pri izvođenju eksperimenta i sakupljanju uzoraka.

Posebna zahvala mojoj obitelji. Hvala Vam na toploj podršci, strpljenju i ljubavi koju mi pružate na svim mojim životnim putevima.

	Str.
<b>1. UVOD .....</b>	4
<b>1.1 Jetra .....</b>	5
1.1.1 Građa jetre .....	5
1.1.2 Histologija jetre .....	6
1.1.3 Funkcije jetre .....	9
1.1.4 Oštećenja jetre .....	9
1.1.4.1 Masna jetra .....	10
1.1.4.2 Alkoholna bolest jetre .....	11
1.1.4.3 Nealkoholna bolest jetre .....	12
1.1.4.4 Fibroza i ciroza jetre .....	12
<b>1.2 Šećerna bolest .....</b>	14
1.2.1 Šećerna bolest tipa 1 (DM1) .....	15
1.2.2 Šećerna bolest tipa 2 (DM2) .....	16
1.2.3 Komplikacije šećerne bolesti .....	16
1.2.4 Šećerna bolest i jetra .....	18
<b>1.3 Vitamin D .....</b>	19
1.3.1 Nedostatak vitamina D .....	19
1.3.2 Metabolizam vitamina D .....	20
1.3.3 Biološki učinci vitamina D .....	22
1.3.4 Receptor vitamina D (VDR) .....	22
1.3.5 Vitamin D 25-hidroksilaza (CYP27A1) .....	24
1.3.6 Vitamin D 1 $\alpha$ -hidroksilaza (CYP27B1) .....	24
1.3.7 Vitamin D 24-hidroksilaza (CYP24A1) .....	25
1.3.8 Vitamin D i autoimune bolesti .....	26
1.3.9 Vitamin D i šećerna bolest tipa 1 .....	26
1.3.10 Vitamin D i šećerna bolest tipa 2 .....	27
1.3.11 Vitamin D u patologiji jetre .....	27
1.3.12 Vitamin D i starenje .....	28
<b>1.4 Eksperimentalni model šećerne bolesti tipa 1.....</b>	28
<b>2. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA .....</b>	31
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....</b>	32
<b>4. METODE ISTRAŽIVANJA .....</b>	33
<b>4.1 Priprema banke tkiva i organa dijabetičnih štakora.....</b>	33
<b>4.2 Obrada prikupljenih tkiva i organa .....</b>	34
4.2.1 Priprema tkiva za imunofluorescencijsko bojanje .....	34
4.2.2 Bojanje s diaminobenzidinom (DAB-om) .....	35
4.2.3 TUNEL .....	35
4.2.4 Standardna histološka bojanja .....	36
<b>4.3 Analiza slika i kvantifikacija .....</b>	36
<b>4.4 Statistička analiza .....</b>	39
<b>5. REZULTATI .....</b>	40
<b>5.1 Izražaj 1<math>\alpha</math>-hidroksilaze (CYP27B1) u jetri štakora .....</b>	40
5.1.1 Izražaj 1 $\alpha$ -hidroksilaze tijekom starenja i dugoročnog DM1 .....	42

<b>5.2</b>	<b>Izražaj receptora za vitamin D (VDR) u jetri štakora .....</b>	<b>43</b>
5.2.1	Izražaj VDR-a u citoplazmi hepatocita tijekom starenja i dugoročnog DM1 .....	43
5.2.2	Izražaj VDR-a u jezgri hepatocita tijekom starenja i dugoročnog DM1 .....	45
5.2.3	Kolokalizacija TUNEL/VDR i TUNEL/1 $\alpha$ -OHaze .....	48
<b>5.3</b>	<b>Trikromno bojenje po Mallory-ju .....</b>	<b>49</b>
<b>5.4</b>	<b>Hemalaun i eozin bojenje .....</b>	<b>52</b>
<b>5.5</b>	<b>Izražaj 24-hidroksilaze (CYP24A1) u jetri štakora.....</b>	<b>35</b>
5.5.1	Izražaj 24-hidroksilaze u jetrenom tkivu tijekom starenja i dugoročnog DM1 .....	51
5.5.1.1	Izražaj 24-OHaze u neparenhimskim stanicama jetre.....	55
<b>5.6</b>	<b>Izražaj TGF-<math>\beta</math>1 u jetri štakora tijekom starenja i dugoročnog DM1 .....</b>	<b>57</b>
<b>5.7</b>	<b>Kolokalizacija 24-hidroksilaze s TGF-<math>\beta</math>1 i 24-hidroksilaze s GFAP u tkivu jetre</b>	<b>59</b>
<b>6.</b>	<b>RASPRAVA .....</b>	<b>61</b>
6.1	Izražaj 1 $\alpha$ -OHaze i VDR-a u jetri dijabetičnih štakora tijekom starenja i dugoročnog DM1 .....	61
6.2	Izražaj 24-OHaze i TGF- $\beta$ 1 u jetri dijabetičnih štakora tijekom starenja i dugoročnog DM1.....	66
<b>7.</b>	<b>ZAKLJUČCI .....</b>	<b>69</b>
<b>8.</b>	<b>SAŽETAK .....</b>	<b>70</b>
<b>9.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>71</b>
<b>10.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>72</b>
<b>11.</b>	<b>ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>86</b>

## POPIS OZNAKA I KRATICA

<b>[25(OH)<sub>2</sub>D3]</b>	25-hidroksivitamin D3; kalcidiol (engl. <i>25-hydroxyvitamin D3</i> )
<b>[1,25(OH)<sub>2</sub>D3]</b>	1,25-hidroksivitamin D3; kalcitriol (engl. <i>1,25-dihydroxyvitamin D3</i> )
<b>[24,25(OH)<sub>2</sub>D3]</b>	24, 25-dihidroksivitamin D3 (engl. <i>24,25-dihydroxyvitamin D3</i> )
<b>25-OHaza</b>	25-hidroksilaza (engl. <i>vitamin D-25 hydroxylase</i> , <b>CYP27A1</b> )
<b>1<math>\alpha</math>-OHaza</b>	1 $\alpha$ -hidroksilaza (engl. <i>25-hydroxyvitamin D3-1<math>\alpha</math>-hydroxylase</i> , <b>CYP27B1</b> )
<b>24-OHaza</b>	24-hidroksilaza (engl. <i>vitamin D3-24-hydroxylase</i> , <b>CYP24A1</b> )
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	$\alpha$ -glatki mišićni aktin (engl. <i><math>\alpha</math> smooth muscle actin</i> )
<b>ANOVA</b>	test jednosmjerne analize varijance (engl. <i>one-way analysis of variance</i> )
<b>D2</b>	ergokalciferol (engl. <i>ergocalciferol</i> )
<b>D3</b>	kolekalciferol (engl. <i>cholecalciferol</i> )
<b>DAPI</b>	4', 6-diamid-2-fenilindol (engl. <i>4', 6-diamidino-2-phenylindole</i> )
<b>DBP</b>	vitamin D vezujući protein (engl. <i>vitamin D binding protein</i> )
<b>DM</b>	šećerna bolest (engl. <i>diabetes mellitus</i> )
<b>DM1</b>	šećerna bolest tipa 1 (engl. <i>diabetes mellitus type I</i> )
<b>DM2</b>	šećerna bolest tipa 2 (engl. <i>diabetes mellitus type II</i> )
<b>DNK</b>	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , DNA)
<b>FLD</b>	masna bolest jetre (engl. <i>fatty liver disease</i> )
<b>GAD</b>	protutijela na dekarboksilazu glutaminske kiseline (engl. <i>glutamic acid decarboxylase</i> )
<b>GFAP</b>	glijalni fibrilarni kiseli protein (engl. <i>glial fibrillary acidic protein</i> )
<b>GDM</b>	šećerna bolest kod trudnica (engl. <i>gestational diabetes mellitus</i> )

<b>HSCs</b>	zvjezdaste, stelatne stanice jetre; Itove stanice (engl. <i>hepatic stellate cells, Ito cells</i> )
<b>IAA</b>	protutijela na endogeni inzulin (engl. <i>insulin autoantibody</i> )
<b>Iba1</b>	ionizirana kalcij-vezujuća adapterska molekula 1 (engl. <i>ionized calcium-binding adapter molecule 1</i> )
<b>ICA</b>	protutijela na Langerhansove otočiće (engl. <i>islet cell autoantigen</i> )
<b>IDF</b>	Međunarodna dijabetološka federacija (engl. <i>International Diabetes Federation</i> )
<b>KCs</b>	Kupfferove stanice (eng. <i>Kupffer cells</i> )
<b>LESCs</b>	endotelne sinusoidne stanice jetre ( engl. <i>liver endothelial sinusoidal cells</i> )
<b>LD</b>	masna kapljica (engl. <i>lipid droplet</i> )
<b>MAPK</b>	protein-kinaza aktivirana mitogenom (engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
<b>MHC</b>	glavni kompleks tkivne podudarnosti (engl. <i>major histocompatibility complex</i> )
<b>MS</b>	multipla skleroza (engl. <i>multiple sclerosis</i> )
<b>MPO</b>	mijeloperoksidaza (engl. <i>myeloperoxidase</i> )
<b>NAFLD</b>	nealkoholna bolest masne jetre (engl. <i>nonalcoholic fatty liver disease</i> )
<b>NASH</b>	nealkoholni steatohepatitis (engl. <i>nonalcoholic steatohepatitis</i> )
<b>NEFA</b>	neesterificirane masne kiseline (engl. <i>non-esterified fatty acid</i> )
<b>PBS</b>	fiziološka otopina u fosfatnom puferu (engl. <i>phosphate buffer saline</i> )
<b>PPARs</b>	receptori za aktivaciju proliferacije peroksisoma (engl. <i>peroxisome proliferators activated receptors</i> )
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	receptori za aktivaciju proliferacije peroksisoma $\alpha$ (engl. <i>peroxisome proliferators activated receptors <math>\alpha</math></i> )

<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	receptori za aktivaciju proliferacije peroksisoma $\gamma$ (engl. <i>peroxisome proliferators activated receptors <math>\gamma</math></i> )
<b>RA</b>	reumatoidni artritis (engl. <i>rheumatoid arthritis</i> )
<b>ROS</b>	reaktivni radikali kisika (engl. <i>reactive oxygen species</i> )
<b>RXR</b>	retinoid X receptor (engl. <i>retinoid X receptor</i> )
<b>SLE</b>	sistemni erimatozni lupus (engl. <i>systemic lupus erythematosus</i> )
<b>STZ</b>	streptozotocin (engl. <i>streptozotocin</i> )
<b>WHO</b>	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i> )
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	transformirajući čimbenik rasta $\beta$ (engl. <i>transforming growth factor beta</i> )
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	transformirajući čimbenik rasta $\beta$ 1 (engl. <i>transforming growth factor beta 1</i> )
<b>TUNEL</b>	TUNEL-test (engl. <i>terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labelling</i> )
<b>VEGF</b>	čimbenik rasta koji potiče stvaranje novih krvnih žila (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i> )
<b>VDR</b>	receptor za vitamin D (engl. <i>vitamin D receptor</i> )
<b>VDDR-I</b>	o vitaminu D ovisni rahitis tipa 1 (engl. <i>vitamin D-dependent rickets type I</i> )
<b>VDDR-II</b>	o vitaminu D ovisni rahitis tipa 2 (engl. <i>vitamin D-dependent rickets type II</i> )
<b>VDREs</b>	regulacijski odsječci gena čiji je izražaj kontroliran vitaminom D (engl. <i>vitamin D response elements</i> )



## 1. UVOD

Šećerna bolest (engl. *diabetes mellitus*, DM) danas je najčešći endokrini poremećaj i rastući zdravstveni problem u većini razvijenih zemalja (1). Kao metabolički poremećaj povezana je i s ozbiljnim jetrenim komplikacijama (2, 3). Jetra ima središnju ulogu u kontroli homeostaze glukoze i sudjeluje u složenoj regulaciji metaboličkih supstrata i hormona (4, 5). Metabolička bolest jetre uzrokovana šećernom bolešću uglavnom je posljedica oksidacijskog stresa (3). U posljednjih nekoliko desetljeća opsežno se proučavaju biološki učinci aktivnog oblika vitamina D (6-8). Novije spoznaje ukazuju na povoljne učinke vitamina D u različitim kroničnim bolestima kao što su kardiovaskularne, šećerna bolest, maligne i autoimune bolesti (9-12). Steroidni hormon, vitamin D, ostvaruje učinke vezanjem za receptore vitamina D (engl. *vitamin D receptors*; VDR) (7, 13). Istraživanja pokazuju da sustav vitamin D/VDR ima i potencijalni terapijski učinak na smanjenje razvoja jetrene fibroze. U modelu streptozotocinom inducirane šećerne bolesti, primjena vitamina D smanjuje metabolički i oksidacijski stres u jetri štakora (3).

Široka rasprostranjenost VDR-a i ključnih enzima aktivacije  $1\alpha$ -hidroksilaze (engl. *25-hydroxyvitamin D3-1 $\alpha$ -hydroxylase*,  $1\alpha$ -OHaze; CYP27B1) i inaktivacije 24-hidroksilaze (engl. *vitamin D3-24-hydroxylase*, 24-OHaze; CYP24A1) u većini stanica sisavaca ukazuje da stanice u različitim tkivima imaju potencijal za aktivaciju/deaktivaciju vitamina D, koji može djelovati autokrino ili parakrino (13, 14). Iako je dosada potvrđena prisutnost VDR-a u stanicama jetre (15-17) nisu razjašnjeni pozadinski mehanizmi djelovanja vitamina D koji rezultiraju smanjenjem jetrenih komplikacija šećerne bolesti (3). Osim toga ne postoje podaci o raspodjeli enzima  $1\alpha$ -OHaze u pojedinim stanicama jetrenog tkiva.

Unatoč tome, što su istraživanja o učincima vitamina D u stalnom porastu, mehanizmi ostvarivanja brojnih povoljnih učinaka nisu do kraja poznati. Osim učinaka vitamina D u regulaciji metabolizma kalcija i fosfata (18), utvrđene su i brojne druge uloge vitamina D, uključujući regulaciju lučenja hormona, regulaciju proliferacije i diferencijacije stanica i imunoregulaciju (19). Također brojna istraživanja pokazuju povoljne učinke vitamina D kod starenja i različitih bolesti povezanih sa starenjem (kardiovaskularne bolesti, šećerna bolest, maligne i autoimune bolesti) (9-11). Međutim, izražaj VDR-a i ključnih enzima metabolizma vitamina D u jetri dijabetičnih štakora nije do kraja razjašnjen.

## 1.1. Jetra

Jetra, najvažniji metabolički organ, ujedno je i najveća žlijezda u tijelu. Posrednik je između probavnog sustava i krvi. Zauzima središnje mjesto u metabolizmu i funkcioniranju izmjene tvari u organizmu. Osim pretvorbe i pohrane metabolita, jetra ima važnu ulogu u proizvodnji bjelančevina plazme, kao što je albumin. Uklanjanje otrovnih tvari iz jetre vrši se putem njenog egzokrinog sustava žučnih kanalića. Zbog svojih brojnih funkcija često se naziva "glavnom tvornicom organizma" (20).

### 1.1.1 Građa jetre

Jetra je smještena u desnom gornjem dijelu trbušne šupljine neposredno ispod ošita. Ima dvije površine, gornju koja je konveksna i u suodnosu je s ošitom (lat. *facies diaphragmatica hepatis*) i donja koja je u suodnosu s trbušnim organima (lat. *facies visceralis hepatis*). Sastoji se od 4 režnja. Na gornjoj površini dva, desni veći i lijevi manji. Na donjoj površini jetre razlikuju se još 2 manja režnja, *lobus quadratus* i *lobus caudatus*. Granicu između režnjeva jetre označavaju na njenoj gornjoj strani srpasta veza (lat. *lig. falciforme hepatis*). Na donjoj strani jetre nalaze se tri žlijeba, dva sagitalna i jedan poprečni, koji oblikuju slovo H. Poprečni žlijeb predstavlja hilus jetre (*porta hepatis*), kroz koji prolaze krvne žile, živci i žučni kanali. Desnu sagitalnu brazdu čini udubina za žučni mjehur (lat. *fossa vesicae biliaris*), te brazda za donju šuplju venu (lat. *sulcus venae cave*). Lijevu sagitalnu brazdu čine u svom prednjem dijelu sadrži *lig. teres hepatis*, a u svom zadnjem dijelu *lig. venosum* (21, 22). Jetra je obavijena fibroznom čahurom (Glissonova čahura), koja sadrži brojne veće limfne žile i u području porte hepatis neposredno se nastavlja u vezivne pretince smještene na kutovima jetrenih režnjića (interlobularni, portalni ili Kiernanovi prostori). Kiernanov prostor sadrži arteriju (ogranak jetrene arterije), venu (ogranak vene porte), žučni kanalić i limfne žile (23). Krvotok u jetri podijeljen je na hranidbeni i funkcionalni. Hranidbeni se odvija putem jetrene arterije, a funkcionalni putem *vene portae*. Većina krvotoka potječe od portalne vene (70-80%), a manji dio od jetrene arterije (24).

## 1.1.2 Histologija jetre

Osnovnu morfološku jedinicu jetre čini jetreni režnjić koji ima oblik šesterokuta ili pčelinje saće. U jetri čovjeka se oko jetrenog režnjića nalazi 3-6 portalnih prostora. Portalni prostor obuhvaća venulu, arteriolu, žučni kanalić i limfnu žilu. Hepatociti, osnovne građevne jedinice jetre, raspoređeni su zrakasto u jetrenom režnjiću. Poput opeke sačinjavaju stanične ploče (Remakovi nizovi) koji su usmjereni od periferije prema njegovom središtu gdje se između nalaze sinusoidne kapilare tj. jetrene sinusoide (25).

U jetri osim parenhima koji je izgrađen od hepatocita nalaze se i sljedeće ne-parenhimske stanice:

- endotelne stanice sinusoidnih kapilara (engl. *liver endothelial sinusoidal cells*, LSECs);
- Kupfferove stanice ili jetreni makrofazi (engl. *Kupffer cells*, KCs);
- Itove stanice ili stelatne stanice jetre (engl. *Ito cells or hepatic stellate cells*, HSCs);
- građevne komponente drugih tkiva: vezivnog, mišićnog i živčanog tkiva (23).

Endotelne stanice sinusoidnih kapilara (engl. *liver sinusoidal endothelial cells*, LSECs) - su fenestrirane stanice koje od hepatocita dijeli bazalna lamina i subendotelni ili Disseov prostor, u kojem se nalaze mikrovili hepatocita. Kad krvna plazma protiče kroz sinusoide ona se cijedi kroz fenestre endotelnih stanica i dolazi u odnos sa hepatocitima, što omogućuje izmjenu makromolekula. Stanice imaju funkciju „čistača organizma“ i odgovorne su za uklanjanje potencijalnih opasnih makromolekula iz krvi, te imaju važnu ulogu u imunskom sustavu jetre (26).

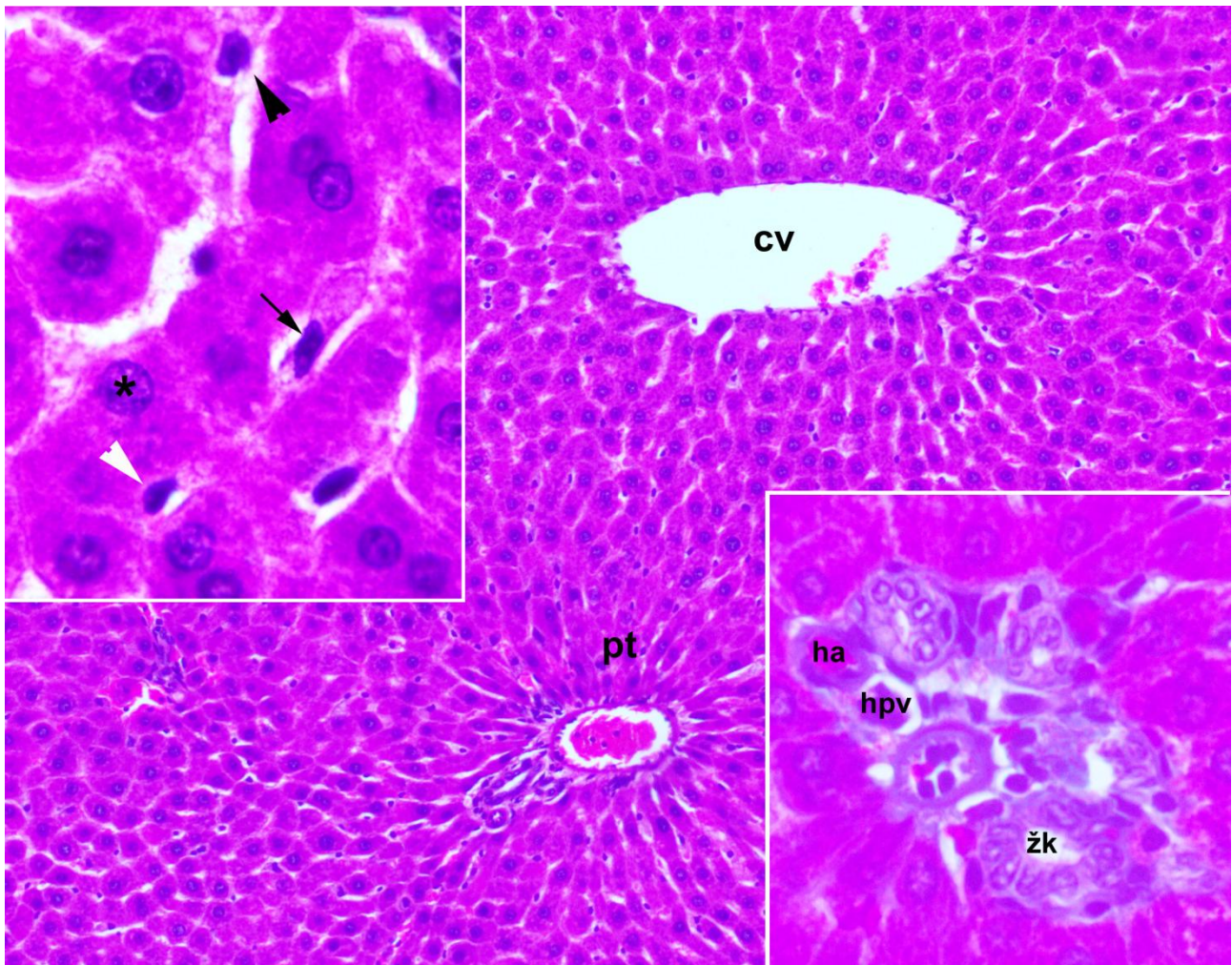
Kupfferove stanice (engl. *Kupffer cells*, KCs) ili jetreni makrofazi dio su retikuloendotelnog sustava jetre i imaju sposobnost fagocitiranja. Podrijetlom su iz koštane srži. Njihova diferencijacija započinje iz promonocita i monoblasta u monocite, zatim od monocita iz periferne krvi završavaju diferencijaciju u zrele Kupfferove stanice (27). Čine oko 15-20% jetrenih stanica. Sudjeluju i u razgradnji hemoglobina, izlučivanju bjelančevina vezanih za imunološke procese i stvaranju bilirubina (28). Kao jedan od biljega jetrenih makrofaga koristi se ionizirajuća kalcij-vezujuća adapterska molekula 1 (engl. *ionized calcium-binding adapter molecule 1*, Iba1) (29).

Itove stanice (engl. *Ito cells* or ; *hepatic stellate cells*, HSCs) ili stelatne (zvjezdaste) stanice jetre su periciti koji se nalaze Disseovom prostoru (perisinusoidalni prostor između jetrenih sinusoida i hepatocita). Predstavljaju oko 5-8 % jetrenih stanica. Svaka stanica ima nekoliko dužih izdanaka koji obavijaju sinusoide. Lipidne kapljice u stanicama pohranjuju vitamin A kao ester retinola. Osim funkcije u pohrani i otpuštanju retinoida imaju važnu ulogu u fibrozi jetre, odnosno, stvaranju ožiljkastog tkiva tijekom odgovora na oštećenje jetre. U normalnoj jetri Itove stanice su u "mirnom" stanju (30). Kada se jetra ošteti, Itove stanice mogu se promijeniti u "aktivno" stanje. Aktivirane stanice karakterizirane su sposobnošću proliferacije, kontraktilnosti i kemotaksije (31). Aktivirane Itove stanice također su odgovorne za lučenje kolagenskog ožiljkastog tkiva, jednog od obilježja fibroze/ciroze jetre (32). Biljeg stelatnih stanica u jetrenom tkivu je glijalni kiseli fibrilarni protein (engl. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) posebice kada su u stanju mirovanja, a u aktivnom stanju izražavaju biljeg alfa aktin glatkog mišića (engl. *alpha smooth muscle actin*,  $\alpha$ -SMA) (31).

Hepatociti (engl. *hepatocytes*) su parenhimske stanice i osnovne građevne jedinice jetre, višekutnog oblika, s jednom ili dvije jezgre. U Disseov prostor s površine hepatocita strše mikrovili. U skladu s brojnim funkcijama jetre, u citoplazmi hepatocita obilno su zastupljene citoplazmatske organele: zrnata i glatka endoplazmatska mrežica, Golgijev aparat (oko 50), mitohondriji (oko 2000), lizosomi i peroksisomi, a od paraplazmatskih tvari glikogen i kapljice masti. Citoplazma hepatocita je eozinofilna, što je odraz brojnih mitohondrija, dok je bazofilni izgled odraz velikih količina hrapavog endoplazmatske mrežice i slobodnih ribosoma. U glatkoj endoplazmatskoj mrežici odvijaju se različiti važni procesi kao što su oksidacija, metilacija i konjugacija (23). Hepatociti sadržavaju i glikogen. Jetreni glikogen je pričuvni oblik glukoze i on se počinje razgrađivati kad se razina glukoze u krvi spusti ispod dozvoljenih fizioloških raspona vrijednosti. Osim što sintetiziraju bjelančevine za vlastito održavanje, hepatociti proizvode i različite bjelančevine, koje se sintetiziraju na polisomima vezanim za hrapavu endoplazmatsku mrežicu. Jetra kao žlijezda s unutrašnjim i vanjskim lučenjem, osim endokrine funkcije, putem izlučivanja žuči ostvaruje i svoju egzokrinu funkciju. Upravo hepatociti primaju, mijenjaju i izlučuju sastojke krvi u žučne kapilare, a svojim dodirnim plohamo omeđuju tanki prostor koji je po funkciji žučna kapilara. Stoga glavne funkcije hepatocita uključuju stvaranje i izlučivanje žuči, regulaciju stabilnosti glikemije, sintezu lipida i sekreciju plazminih lipoproteina, reguliranje metabolizma kolesterola, stvaranje ureje,

serumskih albumina, čimbenika koagulacije, enzima i brojnih drugih proteina te konačno metabolizam i detoksikaciju lijekova i drugih supstanci u organizmu (23).

Hepatociti imaju također veliku sposobnost regeneracije. Štakorska jetra regenerira se u cijelosti ako joj se operativno odstrani 75% ukupne mase (parcijalna hepatektomija) (34). U čovjeka sposobnost regeneracije znatno je smanjena, ali je važna jer se dijelovi jetre mogu upotrijebiti za transplantaciju (35).



**Slika 1. Građa jetrenog režnja.** Jetra štakora, bojenje hemalaun-eozinom. cv – centralna vena; pt – portalna trijada; ha – hepatička arterija; hvp – hepatička portalna vena; žk – žučni kanalić; zvjezdica – hepatocit; strelica – jetreni makrofag; crni vršak strelice – stelatna stanica; bijeli vršak strelice – endotelna stanica sinusoide. (A. Vuica, iz zbirke Laboratorija za neurokardiologiju)

### 1.1.3 Funkcije jetre

U najvažnije funkcije jetre se ubrajaju: sinteza bjelančevina, stvaranje i izlučivanje žuči, pohranjivanje metabolita, regulacija homeostaze ugljikohidrata, kontrola metabolizma kolesterola, proizvodnja ureje, proizvodnja bilirubina te detoksikacija i inaktiviranje lijekova i drugih stranih tvari.

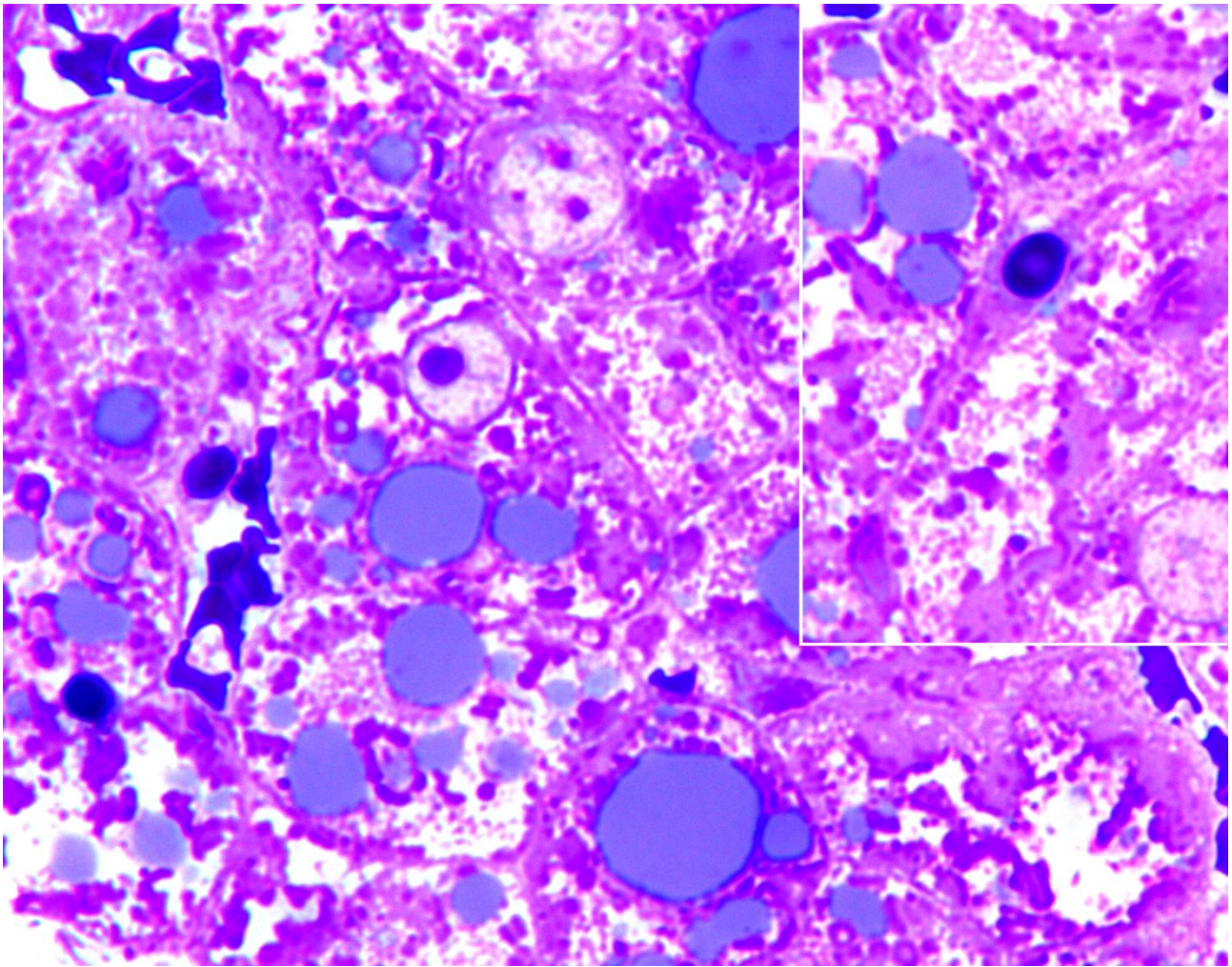
Hepatociti sintetiziraju bjelančevine za vlastito odražavanje i stvaraju bjelančevine plazme koje se luče u krv: albumine, protrombin, fibrinogen i apolipoproteine. Bjelančevine se sintetiziraju na hrapavoj endoplazmatskoj mrežici (36). Funkcija hepatocita nije da pohranjuju bjelančevine nego da ih stalno otpuštaju u krv. Egzokrina funkcija jetre proizvodnja je žuči jer hepatociti primaju, mijenjaju i izlučuju sastojke krvi u žučne kapilare (37). Lipidi i ugljikohidrati pohranjuju se u jetri u obliku triglicerida i glikogena (38). Procesom glukoneogeneze lipidi i aminokiseline pretvaraju se u glukozu. Hepatociti na taj način održavaju stalnu razinu glukoze u krvi (38). Sinteza kolesterola i lipida su neke od uloga peroksisoma, organela koje kao lizosomi sadržavaju enzime. U jetri se vrši i esterifikacija kolesterola, kao i metabolička razgradnja masnih kiselina, te stvaranje ketonskih tijela (39). Hepatocit je i glavno mjesto deaminacije aminokiselina, pri čemu nastaje urea koja se krvlju prenosi do bubrega (40). Proizvodnja bilirubina se zbiva u mononuklearnom fagocitnom sustavu kojemu pripadaju Kupfferove stanice (engl. *Kupffer cells*, KCs). U hepatocitima se bilirubin konjugira s glukuronskom kiselinom u bilirubin-glukuronid, koji se potom izlučuje u žučne kapilare (41). Različiti lijekovi i druge tvari mogu se detoksicirati oksidacijom, metilacijom i konjugacijom u jetri. Enzimi za taj proces nalaze se u glatkoj endoplazmatskoj mrežici.

### 1.1.4 Oštećenja jetre

Bolesti jetre danas su među najčešćim bolestima probavnog sustava. Mogu zahvatiti sve njezine dijelove - jetrene stanice, žučne vodove, krvne i limfne žile. Jetru također oštećuju razni otrovi, lijekovi, infekcije, smetnje u opskrbi krvlju i drugi poremećaji. Neki od najčešćih poremećaja su: masna jetra, alkoholni i nealkoholni steatohepatitis, fibroza i posljedično ciroza jetre.

#### 1.1.4.1 Masna jetra

Masna jetra (steatoza) (engl. *fatty liver disease, FLD*) difuzno je nakupljanje neutralnih masti (triglicerida) unutar jetrenih stanica, zbog čega je jetra blago do umjereno povećana. Masna infiltracija jetre početna je i najčešća posljedica pretjerane konzumacije alkohola. Ostali mogući uzroci masne jetre su debljina, šećerna bolest, lijekovi i kemikalije, kao i različiti poremećaji metabolizma. Potencijalno je reverzibilna. Masna jetra predstavlja makrovezikularne nakupine masti u obliku velikih kapljica triglicerida, koji dislociraju jezgre jetrenih stanica. Puno rjeđe mast se javlja u mikrovezikularnom obliku malih kapljica, koje ne dislociraju jezgru. Slobodne masne kiseline i citokini (npr. čimbenik nekroze tumora- $\alpha$ , engl. *tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF $\alpha$* ) su hepatotoksični i potiču molekularnu patogenezu masne jetre (42). Mikrovezikularna mast predstavlja oštećenje mitohondrija. Jetra se povećava i na prerezu je žute površine. Masna jetra najčešće nije povezana ni s kakvim simptomima, osobito ako se radi o kroničnom stanju (43).



**Slika 2. Masna degeneracija jetre.** Masno promijenjena jetra štakora. Bojanje toluidinom. Povećanje 1000x. Umetak prikazuje fibroblast u tkivu masno promijenjene jetre. (A. Vuica, iz zbirke Laboratorija za neurokardiologiju)

#### 1.1.4.2 Alkoholna bolest jetre

Alkoholna bolest jetre (engl. *alcoholic liver disease*, ALD) je kombinacija masne jetre, upale i nekroze jetre. Vrlo često je povezana s ozbiljnom prognozom i visokim mortalitetom kod težih oblika bolesti (44). Metabolizam alkohola može dovesti do povećanog metabolizma u jetri, uzrokujući hipoksiju i oštećenje lipida posredovano slobodnim radikalima. Oštećeni hepatociti su ili nabrekli sa znatom citoplazmom (balonska degeneracija) ili sadrže fibrilarni protein u citoplazmi (Malloryjeva ili alkoholna hijalina tjelešca). Teško oštećeni hepatociti postaju nekrotični. Nakupljanje kolagena i fibroza terminalnih jetrenih venula kompromitiraju perfuziju jetre i



doprinosu portalnoj hipertenziji. Histološke značajke koje mogu upućivati na razvoj ciroze su perivenularna fibroza, mikrovezikularna mast i divovski mitohondriji (43).

#### **1.1.4.3 Nealkoholna bolest jetre**

Nealkoholna bolest jetre (engl. *nonalcoholic fatty liver disease*, NAFLD) javlja se prvenstveno u sklopu metaboličkog sindroma (uz prekomjernu debljinu, šećernu bolest, povišene masnoće u krvi, povišeni krvni tlak) u podlozi kojeg je rezistencija na inzulin. Nealkoholna bolest masne jetre danas se smatra jednom od najčešćih bolesti jetre u razvijenim zemljama (45). Postoje tri klinička oblika, odnosno stadija NAFLD-a: steatoza jetre, steatohepatitis i fibroza/ciroza jetre. Dok je steatoza jetre reverzibilan poremećaj, pojava upale nealkoholnog steatohepatitisa (engl. *nonalcoholic steatohepatitis*, NASH) može dovesti do kroničnog oštećenja jetre praćenog progresivnom fibrozom, a uzrokovana je prekomjernim nakupljanjem masnoća (triglicerida) u jetri i rezultira abnormalnim metabolizmom lipida. Nealkoholni steatohepatitis je stanje histološki karakterizirano makrovezikularnom steatozom i lobularnim hepatitisom s ili nekrozom hepatocita i/ili fibrozom. Predstavlja promjene u jetri koje slične alkoholnoj bolesti jetre. Iako oštećenje jetre nalikuje promjenama uzrokovanim konzumacijom alkohola, kako i sam naziv govori, ova bolest nastaje u odsutnosti pretjerane konzumacije alkohola (46).

#### **1.1.4.4 Fibroza i ciroza jetre**

Fibroza jetre predstavlja nakupljanje vezivnog tkiva u jetri kao odgovor na razna hepatocelularna oštećenja. Nastaje uslijed neprimjerno jakog stvaranja ili nedostatnog propadanja izvanstaničnog matriksa. Fibroza može dovesti do ciroze jetre. Ciroza je kronična bolest jetre koju obilježava oštećenje jetrenog tkiva, stvaranje fibroznih ožiljaka i progresivno propadanje jetrene funkcije. Ciroza uključuje i pojavu regenerativnih nodula i fibroze.

Fibroza započinje aktivacijom jetrenih perivaskularnih stelatnih stanica (engl. *hepatic stellate cells*, HSCs, Ito cells). Aktivacija ovih stanica odnosi se na njihovu morfološku i funkcionalnu preobrazbu, iz stanica bogatih vitaminom A, u fibroblaste, odnosno miofibroblaste (47). Pri tom

dolazi do nesrazmjera između stvaranja i razgradnje međustanične tvari, jer miofibroblasti imaju veliku sposobnost proliferacije, kontrakcije, kao i veliki potencijal u izlučivanju izvanstaničnog matriksa (48). Ključnu ulogu u fibrozi imaju brojni drugi čimbenici, kao na primjer slobodni kisikovi radikali, apoptotska tjelešca hepatocita i lipopolisaharidi. Također, važna je međusobna parakrina stimulacija između stelatnih stanica i endotela sinusoidnih kapilara te hepatocita, Kupfferovih stanica i trombocita (47). Oštećeni hepatociti, trombociti i leukociti oslobađaju različite posrednike upale što ubrzava proces fibroze. Kao odgovor na ozljedu, stelatne stanice izlučuju i transformirajući čimbenik rasta  $\beta 1$  (engl. *transforming growth factor  $\beta 1$* , TGF- $\beta 1$ ), citokin koji potiče stelatne stanice da izlučuju kolagen tipa I, koji je ključan profibrogeni faktor. Djelovanje ovog čimbenika ima veoma važnu ulogu u pretvorbi stelatnih stanica u miofibroblaste (49). Važna značajka u fibrinogenezi je kontraktilnost aktiviranih stelatnih stanica kada značajno raste izražaj aktina (engl. *alpha smooth muscle actin*,  $\alpha$ -SMA) u ovim stanicama, što se koristiti kao biljeg kontraktilnog potencijala stanice. Povećana kontraktilnost stelatnih stanica dovodi do stezanja sinusoidnih kapilara (50). Tračci miofibroblasta spajaju ogranke aferentnih i eferentnih hepatičnih vena, limitirajući opskrbu hepatocita krvlju. Stoga, fibroza pridonosi ishemiji hepatocita (hepatocelularnoj disfunkciji) i portalnoj hipertenziji (51).

Fibroza ne uzrokuje simptome. Simptomi se mogu razviti zbog primarnog poremećaja ili portalne hipertenzije. Portalna hipertenzija je ipak asimptomatska do razvitka ciroze jetre. Biopsija jetre je jedini način dijagnoze fibroze. Citroza jetre završna je faza brojnih jetrenih bolesti, obilježena potpunim poremećajem njezine strukture i funkcije. Nastaje kada uslijed oštećenja jetrenog tkiva tj. nekroze dolazi do pokušaja njegove regeneracije i stvaranja ožiljaka (fibroze), što pretvara normalnu građu jetre u čvoriće. Uzročni čimbenici ciroze su: alkohol, virusni hepatitis B i C, poremećaji metabolizma (hemokromatoza, Wilsonova bolest, nealkoholna masna bolest jetre), autoimune bolesti jetre te dugotrajni zastoj žuči (primarna ili sekundarna bilijarna ciroza) (43).

Ciroza je uznapredovala bolest jetre za koju je karakteristična opsežna fibroza koja narušava normalnu anatomsku građu jetre. Količina masti kod ciroze je različita. Također je moguć i alkoholni hepatitis. Citroza može biti mikronodularna i makronodularna. Mikronodularna ciroza je obilježena jednoliko malim nodulima i debelim pravilnim pojasom vezivnog tkiva. Slab kompenzatorni pokušaj regeneracije jetre dovodi do stvaranja malih čvorića (mikronodularna ciroza) koji se skupljaju u jetri. S vremenom, pogotovo u apstinenciji to može dovesti do makronodularne ciroze. Makronodularna ciroza u kojoj se noduli razlikuju po veličini i sadrže nešto normalniju lobularnu organizaciju portalnih trijada i terminalnih hepatičnih venula (52). Inzulin, glukagon i intrahepatični krvni protok uz različite citokine i hepatične faktore rasta određuju gdje će

se noduli razviti (43). Povećan rizik od hepatocelularnog karcinoma (HCC) povezan je s cirozom jetre svih etiologija (53).

## 1.2 Šećerna bolest

Šećerna bolest (lat. *diabetes mellitus*, DM) danas je vodeći endokrini poremećaj i rastući zdravstveni problem u većini razvijenih zemalja (1). Predstavlja skup metaboličkih bolesti povezanih s poremećajem u metabolizmu ugljikohidrata, masti i proteina, koje karakterizira kronična hiperglikemija nastala zbog poremećaja u sekreciji i/ili djelovanju inzulina (54).

Prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO; engl. *World health organization*, WHO) iz 1999. godine (55) razlikuje se nekoliko tipova šećerne bolesti uzimajući u obzir etiologiju, terapijski pristup i prognozu:

- a) DM1 tip ("inzulin ovisni");
- b) DM2 tip ("inzulin neovisni");
- c) trudnički (gestacijski) dijabetes (engl. *gestation diabetes mellitus*, GDM);
- d) drugi specifični tipovi (npr. heterogena grupa: bolesti gušterače; DM uzrokovan lijekovima ili toksinima, MODY engl. *maturity onset diabetes of the young*) (56).

Prema procjenama Međunarodne dijabetološke federacije (engl. *International Diabetes Federation*, IDF) procjenjuje se da trenutno u svijetu 382 milijuna ljudi boluje od šećerne bolesti, te da će 2035. taj broj iznositi 592 milijuna oboljelih (57).

Šećerna bolest tipa 1 (engl. *diabetes mellitus type I*; DM1), poznata je pod nazivom dijabetes ovisan o inzulinu, a karakterizira je razaranje  $\beta$ -stanica gušterače i posljedični apsolutni nedostatak inzulina. Šećerna bolest tipa 2 (engl. *diabetes mellitus type II*; DM2), dijabetes neovisan o inzulinu, uzrokovan je smanjenom osjetljivošću stanica na inzulin i neadekvatnim lučenjem inzulina iz gušterače. Pored ova dva tipa, manje su zastupljeni i drugi specifični tipovi šećerne bolesti: uzrokovani kroničnim bolestima gušterače, uzimanjem nekih lijekova, šećerna bolest u sklopu nekih genetskih sindroma (npr. MODY) (58), šećerna bolest u trudnoći (GDM), pri čemu se

povišene razine glukoze u krvi pojavljuju prvi put tijekom trudnoće, a normaliziraju nakon trudnoće (59).

Prihvaćeni kriteriji za dijagnozu šećerne bolesti prema SZO:

1. Dijagnoza se postavlja temeljem prisutnosti klasičnih simptoma hiperglikemije (polidipsija, polifagija, poliurija) i abnormalnog nalaza GUK-a (glukoze u krvi).
2. GUK na tašte  $\geq 7,0$  mmol/L ili 126 mg/dl, nakon 8 sati neunošenja kalorija u organizam, (dvije izmjerene vrijednosti).
3. GUK  $\geq 11,1$  mmol/L ili 200 mg/dl, 2 sata nakon uzimanja otopine 75 g glukoze (55).

### 1.2.1 Šećerna bolest tipa 1

Šećerna bolest tipa 1 (engl. *diabetes mellitus type 1*, DM1; *insulin-dependent diabetes mellitus*, IDDM) je kronična multifaktorijalna autoimuna bolest obilježena uništenjem  $\beta$ -stanica gušterače koje proizvode inzulin (51). Češće se javlja u djece i adolescenata, ali može se pojaviti i u odraslih. Danas se smatra da poremećeno funkcioniranje imunološkog sustava, nasljedni čimbenici i čimbenici okoliša uzrokuju nastanak DM1. Genski biljezi vezani za DM1 smješteni su unutar glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*, MHC). U čovjeka su to humani leukocitni antigeni (engl. *human leukocyte antigen*, HLA) i smatraju se najvažnijim antigenima u nasljeđivanju DM1. HLA razred II DR4 i DR3 pokazuju najjaču povezanost s DM1 (60). Neki od imunosnih biljega koje također nalazimo u DM1 su autoantitijela kao što su: protutijela na Langerhansove otočiće (engl. *islet cell autoantigen*, ICA), protutijela na dekarboksilazu glutaminske kiseline (engl. *glutamic acid decarboxylase*, GAD), protutijela na endogeni inzulin (engl. *insulin autoantibody*, IAA). DM1 karakteriziran je različito dugim periodom prije ispoljavanja simptoma bolesti tzv. fazom predijabetesa (61). Bolest se neće očitovati sve dok nije uništeno više od 90% svih  $\beta$ -stanica gušterače. Pacijenti s DM1 često su skloni razvoju drugih autoimunih bolesti, kao što su Gravesova bolest, Hashimotov tireoiditis, Addison-ova bolest, vitiligo, autoimuni hepatitis, miastenija gravis (62). Klasičnu kliničku sliku DM1 čine polidipsija, polifagija, poliurija i gubitak težine. U nedostatku inzulina, ponekad prvi simptom može biti

dijabetička ketoacidoza ili hiperosmolarna koma. Osnovna osobina DM1 je nužnost inzulinske terapije (55).

### 1.2.2 Šećerna bolest tipa 2

Šećerna bolest tipa 2 (engl. *diabetes mellitus type 2*; DM2; *non-insulin-dependent diabetes mellitus*, NIDDM) karakterizirana je smanjenjem broja inzulinskih receptora na masnim i mišićnim stanicama i time nemogućnošću unosa glukoze u stanice (inzulinska rezistencija). Inzulinska rezistencija je dijelom genetski poremećaj, ali i vanjski čimbenici, kao što su debljina, povećana koncentracija slobodnih masnih kiselina u krvi, smanjena tjelesna aktivnosti starija životna dob doprinose njezinom razvoju (54). DM2 može se pojaviti u djece i mladih osoba (63), ali obično počinje u dobi nakon 30. godine i postaje sa starenjem sve češći. Pretilost je čimbenik rizika za DM2; 80% do 90% ljudi s tom bolešću je pretilo. Razvoj dijabetesa tipa 2, osim kombinacijom načina života, uzrokovan je i genetskim čimbenicima (62). Liječenje DM2 temelji se na lijekovima, zdravoj prehrani, tjelovježbi i zdravom načinu života (65).

### 1.2.3 Komplikacije šećerne bolesti

Tijek šećerne bolesti obilježen je razvojem akutnih i kroničnih komplikacija.

Akutne komplikacije koje predstavljaju po život opasna stanja, zahtijevajući hitno prepoznavanje i adekvatnu terapiju su: dijabetička ketoacidoza, hipoglikemija, hiperosmolarno neketotično stanje, dijabetična koma i acidoza mliječnom kiselinom.

*Dijabetička ketoacidoza* je akutna metabolička komplikacija DM obilježena hiperglikemijom, hiperketonemijom i metaboličkom acidozom. Najčešća je u DM1 i javlja se kad su razine inzulina nedovoljne za temeljne metaboličke potrebe organizma (43). Unatoč visokim razinama šećera u krvi većina stanica ne može iskoristiti šećer bez inzulina. Zbog toga dolazi do opsežne razgradnje masti, gomilanja octene kiseline vezena za koenzim A (acetil-CoA), koja u uvjetima nedostatka oksaloctene kiseline skreće u put tvorbe ketonskih tijela, kemijskih spojeva koji mogu krv učiniti kiselim (ketoacidoza). Početni simptomi dijabetičke ketoacidoze uključuju prekomjernu žeđ i mokrenje, gubitak težine, mučninu, povraćanje, umor i bol u truhu. Uslijed kompenzacije acidoze,

disanje postaje duboko i brzo, a dah miriše na aceton. Bez liječenja dijabetička ketoacidoza može napredovati do kome, katkada unutar nekoliko sati (66).

*Hipoglikemija* je definirana razinom glukoze u plazmi nižom od 3,88 mmol/L. Niski šećer u krvi uzrokuje loše funkcioniranje većine organskih sustava u tijelu. Mozak je naročito osjetljiv na niske razine šećera u krvi, jer je glukoza mozgu najveći izvor energije. Mozak odgovara na niske razine šećera u krvi te preko živčanog sustava potiče nadbubrežne žlijezde da luče adrenalin. Javljaju se simptomi kao što su znojenje, tremor, tahikardija, anksioznost, glavobolja, omaglica, stupor (67).

*Hiperosmolarno neketotično stanje* je metabolička komplikacija DM-a obilježena hiperglikemijom, teškom dehidracijom, hiperosmolarnošću plazme i suženjem svijesti. Većinom se javlja u tipu DM2, Komplikira se konvulzijama, komom i smrću. Dijagnoza se temelji na dokazu visoke hiperglikemije i hiperosmolarnosti bez značajne ketoze (68).

*Dijabetička koma* je najteža i najozbiljnija akutna komplikacija šećerne bolesti. Komi obično prethode hiperglikemija i acetonurija. Prisustvo acetona nije neophodno da bi se razvila koma. Karakterizira je hiperglikemija, apatija, umor, smanjeno reagiranje na direktne podražaje (68).

*Acidoza mliječnom kiselinom* nastaje kao posljedica pojačanog stvaranja i/ili smanjenog izlučivanja laktata. Arterijski pH je manji od 7.25, dok je razina laktata iznad 5 mmol/L. Tijelo može proizvoditi višak kiseline uslijed DM. Tada u nedostatku dovoljne perfuzije tkiva proizvodi i višak mliječne kiseline. Kliničkom slikom, uz simptome osnovne bolesti, dominiraju opća slabost, mučnina i povraćanje (68).

## Kronične komplikacije

Kronične komplikacije šećerne bolesti glavni su uzrok mortaliteta (69). Dijelimo ih na mikrovaskularne i makrovaskularne. Mikrovaskularna komplikacije pogađaju male krvne žile te uključuju retinopatiju, nefropatiju, neuropatiju, dijabetičko stopalo. Dok makrovaskularne komplikacije su kardiovaskularna bolest, cerebrovaskularne i periferne vaskularne bolesti. Dijabetičko stopalo izdvaja se kao posebna komplikacija zbog složenosti svog nastanka (62). Hiperglikemija negativno djeluje na cirkulirajuće i tkivne bjelančevine. Vezivanjem glukoze na bjelančevine (proces glikacije) i napredovanjem istog procesa nastaju konačni produkti glikacije, koji mijenjaju strukturu bjelančevina. Osnova nastanka kroničnih mikrovaskularnih komplikacija pojačana je produkcija reaktivnih metabolita kisika uzrokovana hiperglikemijom. Makrovaskularne komplikacije nastaju radi inzulinske rezistencije, uz pojačano oslobađanje slobodnih masnih

kiselina u krv, koje beta oksidacijom također potiču stvaranje superoksida te imaju slične patofiziološke putove kao i kod mikrovaskularnih komplikacija (70).

#### **1.2.4 Šećerna bolest i jetra**

Jetra ima središnju ulogu u kontroli homeostaze glukoze i sudjeluje u složenoj regulaciji metaboličkih supstrata i hormona (4). Zbog svog anatomskog položaja idealna je za kontrolu sustavne opskrbe apsorbiranim hranjivim tvarima, te je jedan od samo dva organa koji troše i proizvode značajne količine glukoze. DM i posljedična hiperglikemija s hipoinzulinemijom mogu uzrokovati smanjeni metabolizam glukoze i lipida u jetri. Cijeli spektar metaboličkih bolesti jetre, od masne do fibroze/ciroze, pruža kliničku sliku bolesnika sa šećernom bolešću (71, 72).

U normalnim fiziološkim uvjetima razina glukoze u krvi posljedica je djelovanja inzulina, glukagona i hormona rasta (koji luči hipofiza). Koncentracija glukoze u krvi ovisi o međusobnim koncentracijskim odnosima tih hormona u organizmu. Glukoza koja se natašte nalazi u krvi dolazi iz glikogenolize ili glukoneogeneze u jetri. Nakon obroka, koncentracija glukoze u krvi poraste te potiče lučenje inzulina. Inzulin potiče ulazak glukoze u stanice i njeno iskorištavanje. Na stanice jetre i mišića djeluje tako da u stanicama potiče pohranjivanje glukoze u obliku glikogena (rezervnog šećera) (73). U jetri obično inhibira otpuštanje glukoze. Međutim, prilikom pojave inzulinske rezistencije kao kod DM2, jetra neprikladno otpušta glukozu u krv (74).

Metabolička bolest jetre uzrokovana šećernom bolešću posljedica je oksidacijskog stresa koji u konačnici dovodi do smanjenja jetrene funkcije. U tom smislu, nedavne studije pokazale su kako uzimanje vitamina D doprinosi poboljšanju jetrene funkcije u šećernoj bolesti (3). S obzirom na prisutnost receptora vitamina D u stanicama jetre (16, 17, 75, 76) pozadinski mehanizmi uloge sustava vitamin D/VDR i njegovih supstrata (1 $\alpha$ -hidroksilaza i 24-hidroksilaza) u poboljšanju jetrenih funkcija uslijed šećerne bolesti nisu u potpunosti razjašnjeni.

## 1.3 Vitamin D

Prvi znanstveni opis nedostatka vitamina D, koji dovodi do rahitisa, zabilježen je u 17. stoljeću. Međutim, do otkrića vitamina D i njegove uloge u rahitisu prošla su tri stoljeća. Konačno, struktura vitamina D poznata je od početka 20. stoljeća (77), a biokemičar Adolf Windaus 1928. godine dobio je Nobelovu nagradu za identifikaciju kemijskog spoja vitamina D, istraživanje sterola i njihovog odnosa s vitaminima.

U prirodi vitamin D nalazimo u dva glavna oblika: D2 (ergokalciferol) i D3 (kolekalciferol). Kolekalciferol se proizvodi u koži djelovanjem sunčeva zračenja (otud naziv "sunčev vitamin"), a u hrani ga nalazimo pretežito u masnoj ribi, jajima, jetri, ulju bakalara. Ergokalciferol se proizvodi iz biljnog sterola ergosterola, čiji su izvor biljke, gljive i kvasci (6, 18).

Danas postoje brojna istraživanja vitamina D, koji nije tipičan vitamin, već pripada skupini steroidnih hormona poznatih kao sekosteroidi, s tri dvostruke veze između ugljikovih atoma. Osim učinaka na metabolizam kalcija i fosfata, poznati su i njegovi „ne-klasični“ učinci na hormonsku regulaciju, diferenciju i proliferaciju stanica te moduliranje imunološkog sustava. S obzirom na njegove brojne učinke može se zaključiti da vitamin D djeluje na mnoge organske sustave (18, 78).

### 1.3.1 Nedostatak vitamina D

Manjak vitamina D može nastati uslijed nedovoljnog unosa, smanjene apsorpcije, abnormalnog metabolizma ili otpornosti na učinke vitamina D.

Hipovitaminoza D obično se dijagnosticira mjerenjem koncentracije 25-hidroksivitamina D (kalcidiola) u krvi, koji je prekursor aktivnog oblika, kalcitriola. Nedostatak vitamina D utječe na mineralizaciju kostiju te uzrokuje bolesti omekšanja kostiju: u djece rahitis, a u odraslih osteomalaciju (79).

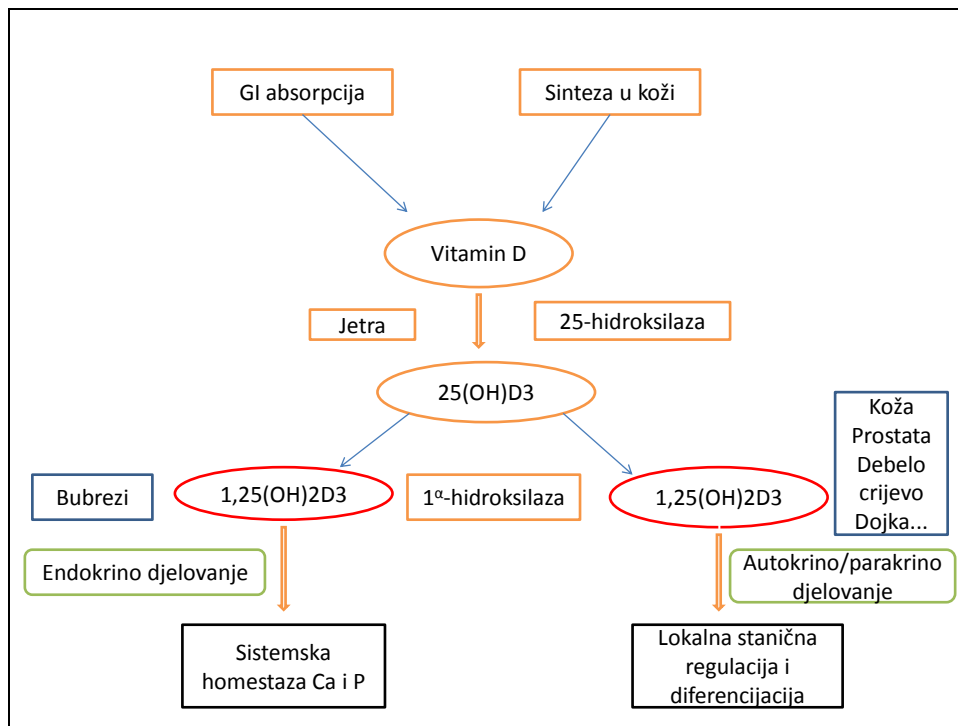
Manjak vitamina D uzrokuje hipokalcemiju, koja potiče stvaranje PTH, izazivajući hiperparatireozu. Hiperparatireoza povećava resorpciju i mobilizaciju minerala iz kostiju te bubrežno čuvanje Ca, ali povećava izlučivanje fosfata. Zbog toga, razina Ca u serumu može biti normalna, no zbog hipofosfatemije je poremećena mineralizacija kosti (80).



### 1.3.2 Metabolizam vitamina D

Metabolizam vitamina D složen je i uključuje više metaboličkih koraka aktivacije. Glavni izvor vitamina D je endogena sinteza vitamina u koži putem ultraljubičastih zraka (UV-B-zraka). Prvi korak u tom procesu je fotokonverzija 7-dehidrokolesterola termičkom izomerizacijom u vitamin D<sub>3</sub> (kolekalciferol) (81). Vitamin D stvoren u koži ulazi u cirkulaciju vezivanjem za vitamin D vezujući protein (engl. *vitamin D binding protein*, DBP) (82). Zatim ulazi u sastav u hilomikrona (lipoproteinske čestice čija je uloga transport lipida) i prenosi se specifičnim proteinima do jetre preko limfnog sustava i krvotoka. Dio vitamina D stvorenog u koži se sekvestrira i pohranjuje u masnom tkivu za kasniju uporabu.

Proces aktivacije (i deaktivacije) vitamina D uključuje niz reakcija hidroksilacije na različitim pozicijama, a koje se zbivaju u različitim organima. Prva hidroksilacija zbiva se na atomu C-25 u jetri pod djelovanjem mitohondrijskog enzima 25-hidroksilaze uz citokrom P450, pri čemu nastaje kalcidiol [ $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ], glavni cirkulirajući oblik vitamina D. Koncentracija kalcidiola određuje se kada želimo doznati status vitamina D u organizmu. Za razliku od kalcitriola, kalcidiol ima dugo vrijeme poluživota – 15 dana, pa je mjerodavniji pokazatelj serumske koncentracije vitamina D. Metabolizam vitamina D u ciljnim tkivima posreduju dva ključna enzima:  $1\alpha$ -hidroksilaza (CYP27B1), koji katalizira sintezu [ $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ] do kalcitriola i 24-hidroksilaza (CYP24A1), koja katalizira početni korak u pretvorbi kalcitriola u manje aktivne metabolite. Druga se hidroksilacija zbiva u proksimalnim tubulima bubrega na atomu C-1, pod djelovanjem ključnog mitohondrijskog enzima,  $1\alpha$ -hidroksilaze, pri čemu nastaje kalcitriol [ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ]. Dinamikom pretvorbe [ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ] upravlja njegova vlastita koncentracija, parathormon (PTH) te koncentracije kalcija i fosfata u serumu. Biološka aktivnost kalcitriola znatno je veća od cirkulirajućeg oblika vitamina D. On je najaktivniji oblik vitamina D (83). Suprotno tome, enzim 24-hidroksilaza, inaktivira aktivni kalcitriol u bubregu pretvarajući ga u 24, 25-dihidroksivitamin D [ $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ], inaktivni metabolit topljiv u vodi. Prema navedenome, omjeri tih dvaju enzima imaju važnu ulogu u određivanju intracelularne koncentracije metabolita vitamina D i njihovih bioloških aktivnosti (18).



**Slika 3. Metabolizam vitamina D.** Shematski prikaz metabolizma vitamina D u organizmu i njegovih glavnih učinaka. Prilagođeno prema: Welsh J, Wietzke JA, Zinser GM, Byrne B, Smith K, Narvaez CJ. Vitamin D-3 receptor as a target for breast cancer prevention. *J Nutr.* 2003 Jul;133(7 Suppl):2425S-33S (84).

Produkciju kalcitriola potiče paratireoidni hormon (PTH), koji izlučuje doštitna žlijezda (paratireoidna žlijezda), a inhibiraju ga ioni kalcija ( $\text{Ca}^{2+}$ ) i sam kalcitriol, preko inhibicije sinteze PTH i aktivnosti  $1\alpha$ -hidroksilaze. Osim bubrežne produkcije kalcitriola koja je visoko regulirana s primarnim ciljem održavanja normokalcemije, u brojnim tkivima i stanicama postoji i autonomna ekstrarenalna produkcija aktivnog oblika vitamina D, koja je neovisna o djelovanju PTH (13).

Kalcitriol ostvaruje učinke vezanjem za receptore vitamina D (engl. *vitamin D receptors*, VDR). VDR je nuklearni transkripcijski čimbenik koji pripada obitelji receptora za steroidne hormone. Otkriće VDR-a i poznata produkcija kalcitriola u bubregu dali su mu obilježja pravog steroidnog hormona (85).

### 1.3.3 Biološki učinci aktivnog vitamina D

Osim na klasične ciljane organe uključene u homeostazu kalcija i fosfora (crijevo, bubreg, kost i paratiroidna žlijezda) kalcitriol djeluje i na brojne druge organe i tkiva (npr. mišić, koža, gušterača, imunostni sustav). Stoga se biološke funkcije vitamina D mogu podijeliti na „klasične“ i „ne-klasične“.

„Klasični“ učinci obuhvaćaju poznatu ulogu vitamina D u regulaciji metabolizma Ca i P te mineralizaciji kostiju (13).

„Ne-klasični“ učinci uključuju ulogu vitamina D u regulaciji lučenja hormona, regulaciji proliferacije i diferencijacije stanica, te imunoregulaciji i apoptozi stanica (13, 86). Naime, poznato je da aktivni oblik vitamina D, kalcitriol [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>], inhibira proliferaciju i stimulira diferencijaciju stanica vezanjem za VDR (87). Djelujući putem VDR-a, vitamin D je snažan modulator imunološkog sustava. Izražaj VDR-a prisutan je u većini stanica imunološkog sustava, uključujući regulacijske T-stanice i antigen prezentirajuće stanice, kao što su dendritične stanice i makrofazi (77). Pod određenim okolnostima, stanice imunološkog sustava mogu izražavati i 1 $\alpha$ -hidroksilazu, enzim za proizvodnju aktivnog oblika vitamina D, koji djeluje lokalno regulirajući imunološki odgovor (88). Također vitamin D ima brojne učinke na imunološki sustav, stoga može poboljšati urođenu imunost i inhibirati razvoj autoimunosti. Obrnuto, nedostatak vitamina D može ugroziti integritet imunološkog sustava i rezultirati njegovim neodgovarajućim odgovorom. Istraživanja pokazuju povoljne učinke vitamina D kod starenja i različitih bolesti (kardiovaskularne bolesti, šećerna bolest, maligne i autoimune bolesti) (9-11).

### 1.3.4 Receptori vitamina D (VDR)

Receptor vitamina D je nuklearni transkripcijski čimbenik i pripada obitelji receptora za steroidne hormone (89). Vitamin D, odnosno njegov aktivni oblik, kalcitriol [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>], ostvaruje učinke vezanjem za VDR, koji se nalazi u jezgri, citoplazmi ili membrani stanica (7, 85). VDR je prisutan u brojnim tkivima i populacijama stanica. Upravo je otkriće tih receptora rasvijetlilo raznolike biološke uloge vitamina D (13, 86, 90).

Receptori vitamina D podjeljeni su na nuklearne i membranske:

- Nuklearni VDR-i nalaze se u brojnim ciljnim organima i različitim populacijama stanica.
- Membranski VDR-i: uz klasične učinke danas je poznato da su svi receptori za steroidne hormone pa tako i VDR dijelom vezani za staničnu membranu. Vezivanjem kalцитriola na membranske VDR-e ostvaruju se brzi učinci putem sekundarnih glasnika (85).

Kalcitriol se može vezati za citoplazmatski receptor, s kojim će se potom translocirati u jezgru, čime se generira niz signala koji vode k transkripciji. Stoga se aktivnost vitamina D ostvaruje preko genomskog i ne-genomskog učinka. Dva osnovna mehanizma djelovanja povezana su s vrstom receptora preko kojeg djeluju tj. vezivanjem bilo cis- ili trans- izomera vitamina D:

1. **Genomski (spori) učinci** uzrokovani su cis-izomerom, ostvaruju se vezanjem na visokospecifični VDR u jezgri stanice, gdje kompleks vitamina D i VDR-a uzrokuje transkripciju gena i sintezu bjelančevina (9);
2. **Ne-genomski (brzi) učinci** uzrokovani su trans-izomerom, ostvaruju se vezanjem za membranski VDR, kaskada događaja rezultira intracelularnim formiranjem drugih glasnika ili fosforilacijom intracelularnih bjelančevina, uzrokujući time aktivaciju intracelularnih enzima ili ionskih kanala, te u konačnici modulaciju aktivnosti stanica.

Glavni koraci u kontroli transkripcije gena putem VDR uključuju:

- 1) vezanje liganda;
- 2) heterodimerizaciju s receptorom za retinoid X (engl. *retinoid X receptor*, RXR);
- 3) vezanje heterodimera na regulacijske sekvence gena čiji je izražaj kontroliran vitaminom D (engl. *vitamin D response elements*, VDREs);
- 4) regrutiranje drugih nuklearnih bjelančevina u početni transkripcijski kompleks (91).

U prisutnosti kalcitriola, kompleks VDR/RXR veže se na male sekvence DNA i inicira kaskadu molekularnih interakcija, koje moduliraju transkripciju specifičnih gena. Tisuće VDREs su identificirani u ljudskom genomu, dok aktivacija sustava vitamin D/VDR izravno i/ili neizravno regulira 100 do 1250 gena (92).

Primjenom metode masivnog paralelnog sekvenciranja, istraživači su otkrili 2776 vezujućih mjesta za receptor vitamina D u ljudskom genomu nakon stimulacije kalcitriolom. Otkriveno je da su

vezujuća mjesta u genomu koja kodiraju te receptore lokalizirana u blizini gena koji su povezani s autoimunim bolestima kao što su šećerna bolest tipa 1, multipla skleroza, Chronova bolest, sistemski lupus i reumatoidni artritis, te i nekim genima raka, kao što su kronična limfocitna leukemija i kolorektalni karcinom (93).

Veliki doprinos razumijevanju funkcije vitamina D u tijelu pridonijelo je istraživanje na VDR miševima s izbačenim genom za VDR (engl. *VDR knockout mice*). *VDR knockout* miševi imali su zaostatak u rastu, kraći životni vijek te su razvili su osteoporozu, kifoza, zadebljanje kože i bora, alopeciju, progresivni gubitak sluha i ravnoteže (94).

### **1.3.5 Vitamin D-25-hidroksilaza (CYP27A1)**

Enzim 25-hidroksilaza vrši prvi korak u metaboličkoj aktivaciji vitamina D. Ta reakcija odvija se prvenstveno u jetri, iako druga tkiva, uključujući kožu, crijeva i bubrege imaju sposobnost katalize sinteze vitamina D 25-hidroksilacijom u kalcidiol. U jetri štakora postoje dvije vrste tog enzima: jedan mitohondrijski, drugi mikrosomalni. Mikrosomalni enzim prisutan u jetri štakora pokazuje veći afinitet prema vitaminu D. Doprinos izvan-jetrenih izvora cirkulirajućeg 25-hidroksivitamina D [ $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ] još je nerazjašnjen. 25-hidroksilacija u jetri uključuje citokrom P450 monooksigenazu/e. 25-hidroksilacija vitamina D slabo je regulirana i razinom povećanja  $25(\text{OH})_2\text{D}_3$  proporcionalano s količinom uzimanja vitamina D, zbog čega se upravo razina  $25(\text{OH})_2\text{D}_3$  u plazmi koristi kao pokazatelj statusa vitamina D (suficijencija ili insuficijencija/deficijencija) (95). Poluživot kalcidiola u plazmi je 2 tjedna i njegova koncentracija korelira s pojavnom sekundarnog hiperparatireoidizma, rahitisa i osteomalacije.

### **1.3.6 Vitamin D-1 $\alpha$ -hidroksilaza (CYP27B1)**

Enzim 1 $\alpha$ -hidroksilaza kodirana je genom CYP27B1. 1 $\alpha$ -hidroksilaza (1 $\alpha$ -OHaza) vrši hidroksilaciju  $25(\text{OH})_2\text{D}_3$  na poziciji 1 $\alpha$ , čime nastaje biološki aktivna forma vitamina D, kalcitriol. Proces 1 $\alpha$ -hidroksilacije  $25(\text{OH})_2\text{D}_3$  u bubregu visoko je reguliran, pri čemu je i sinteza kalcitriola stimulirana paratireoidnim hormonom, a suprimirana je visokom razinom  $\text{Ca}^{2+}$ , P i kalcitriola (96). Radi se o enzimu koji regulira razinu biološki aktivne forme vitamina D. Iako je 1 $\alpha$ -OHaza primarno bubrežni enzim, smješten na unutrašnjoj strani membrane mitohondrija proksimalnih tubula bubrega, nađen je i u mnogim izvan-bubrežnim tkivima u tijelu uključujući limfne čvorove,

kožu, pluća, crijevo, prostatu i stanice imunološkog sustava (14, 97-99). Izvan-bubrežno proizveden  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  prvenstveno djeluje kao autokrini/parakrini čimbenik sa specifičnim staničnim funkcijama.

Dosad su geni za  $1\alpha$ -hidroksilazu (CYP27B1) istraživani u čovjeka, miša i štakora (100-102). Mutacija na kodirajućim regijama CYP27B1 u pacijenata s nedostatkom  $1\alpha$ -hidroksilaze izaziva autosomno recesivni poremećaj - o vitaminu D ovisni rahitis I A (engl. *vitamin D-dependent rickets type I*, VDDR-I) (103). Kod ovog poremećaja koncentracija  $25(\text{OH})\text{D}_3$  u krvi je unutar fizioloških raspona vrijednosti, dok je koncentracija  $1,25\text{-OH}_2\text{D}_3$  značajno smanjena. VDDR-I može se razviti u miševa kojima nedostaje gen za CYP27B1 (engl. *CYP27B1 knockout mice*). Naime, CYP27B1 *knockout* miševi imaju zaostatak u rastu, hipokalcemiju, slabost mišića i smanjenu mineralizaciju kostiju (104).

### **1.3.7 Vitamin D-24 hidroksilaza (CYP24A1)**

Glavni katabolički enzim u metabolizmu vitamina D je 24-hidroksilaza (24-OHaza), mitohondrijski enzim koji potiče prvi korak u pretvorbi kalцитriola u manje aktivne metabolite. Spojevi vitamina D katabolizirani su prvenstveno oksidacijom bočnog lanca. Oksidacija bočnog lanca  $25(\text{OH})_2\text{D}_3$  i  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  započinje na C-23 i C-24. Svaki stupanj oksidacije dovodi do progresivnog gubitka biološke aktivnosti. Konačni produkt cijepanja kalцитriola je kalцитroična kiselina koja je biološki inertna (105). 24-hidroksilaza je prisutna u ciljanim tkivima vitamina D i izravno je regulirana VDR-om (106).

U eksperimentima u kojima su korišteni CYP24A1 *knockout* miševi, potvrđena je katabolička uloga enzima 24-OHaze. Nivo razgradnje kalцитriola bio je dramatično smanjen i poluživot hormona u plazmi bio je povećan 10 puta. Dakle riječ je o enzimu čija je normalna fiziološka uloga katabolizam  $25(\text{OH})_2\text{D}_3$  u cilju sprječavanja eventualne aktivacije kalцитriola u ciljnim stanicama te time reguliranja njegovih bioloških aktivnosti (107).

### 1.3.8 Vitamin D i autoimune bolesti

Autoimune bolesti kao što su šećerna bolest tip 1 (DM1), multipla skleroza (MS), reumatoidni artritis (RA) i sistemski erimatozni lupus (SLE) pojavljuju se kada tijelo reagira imunološkim odgovorom protiv vlastitih tkiva ili stanica. U DM1,  $\beta$  stanice gušterače koje luče inzulin postaju subjekt specifičnog napada vlastitog imunološkog sustava. U MS, pogođene su stanice koje proizvode mijelin središnjeg živčanog sustava, dok su u RA, cilj djelovanja imunološkog odgovora stanice koje proizvode kolagen u sinovijalnim membranama (108). SLE karakterizira prisutnost velikog spektra autoantitijela koji rezultiraju potencijalnim oštećenjem više tkiva (109). Autoimune reakcije su posredovane T-stanicama imunološkog sustava. Biološki aktivni oblik vitamina D, kalcitriol, modulira odgovor T-stanica, što posljedično smanjuje autoimunu reakciju. Također, vitamin D ima sposobnost regulacije proizvodnje kemokina, citokina i interleukina, suzbijajući autoimunu upalu i potičući diferencijaciju stanica imunološkog sustava. Rezultati nekoliko studija ukazuju da bi adekvatan unos vitamina D u različitim dobnih skupina (*in utero*, u ranom djetinjstvu i tijekom adolescencije) mogao smanjiti rizik od autoimunih bolesti.

### 1.3.9 Vitamin D i šećerna bolest tipa 1

DM1 razvija se zbog neadekvatnog funkcioniranja imunološkog sustava tj. dolazi do razaranja  $\beta$  stanica gušterače posredovanog autoimunim odgovorom. Studije pokazuju da vitamin D ima važnu ulogu u normalnom funkcioniranju imunološkog sustava. Nedostatak vitamina D može potaknuti vlastiti imunološki sustav počne napadati i razarati  $\beta$ -stanice gušterače, što uzrokuje razvoj DM1. Vitamin D kao važan imunomodulator i njegova aktivna forma  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inhibiraju proliferaciju T limfocita, koje posreduju imunološki odgovor protiv  $\beta$  stanica gušterače. Naime, preko svojih VDR receptora, koji su izraženi na aktiviranim T-stanicama i  $\beta$ -stanicama gušterače, vitamin D posreduje očuvanje  $\beta$ -stanica, prevenirajući upalnu komponentu razvoja DM1 (110). Također, studije su pokazale da primjena vitamina D u ne-pretilih dijabetičnih miševa (engl. *nonobese diabetic mice*, NOD) prevenira pojavu DM1 (111). U bolesnika s novodijagnosticiranim DM1 ustanovljene su niže koncentracije cirkulirajućeg vitamina D. Primjećena je veća prevalencija nedostatka vitamina D u djece koja su bila u stadiju predijabetesa. Štoviše, djeca kojima je tijekom prve godine života dijagonosticiran rahitis (teški nedostatak vitamina D) imali su značajno veći rizik za razvoj DM1 (112). Dokazano je da dodatak vitamina D u ranom djetinjstvu smanjuje

mogućnost razvoja DM1 (113). S obzirom na navedeno, nedostatan status vitamina D u djetinjstvu može imati dugoročne učinke na imunski odgovor kasnije u životu, kao što je razvoj autoimunskih bolesti.

### **1.3.10 Vitamin D i šećerna bolest tipa 2**

Osobe s metaboličkim sindromom imaju povećan rizik za DM2 (o inzulinu neovisan dijabetes) i kardiovaskularne bolesti (KVB). Metabolički sindrom odnosi se na nekoliko metaboličkih poremećaja, uključujući dislipidemiju, hipertenziju, otpornost na inzulin i pretilost. Nedavno istraživanje pokazalo je da je prevalencija šećerne bolesti tipa 2 povezana s nižim razinama serumskog 25-hidroksivitamina i metaboličkim sindromom. U zdravih ljudi, dostatnost vitamina D pozitivno korelira s osjetljivošću na inzulin i adekvatnom funkcijom  $\beta$ -stanica gušterače. Obrnuto, nedostatak vitamina D može utjecati na homeostazu glukoze i uzrokovati oslabljenu toleranciju glukoze i otpornost na inzulin (114). Trenutno, istraživanja pokazuju da vitamin D može poboljšati osjetljivost na inzulin u pojedinaca s intolerancijom glukoze ili manifestacijom šećerne bolesti tipa 2 (115).

### **1.3.11 Vitamin D u patologiji jetre**

Novije studije pokazuju da vitamin D ima važnu ulogu i u prevenciji nastanka i razvoja patoloških stanja jetre kao što je masna jetra i NAFLD, kroz suzbijanje međusobno povezanih putova koji uključuju apoptozu hepatocita, upalu i fibrozu jetre, oksidacijski stres, izražaj zaštitnih adipokina i promjene u sastavu crijevne mikroflore. Stelatne stanice jetre izlučuju izvanstanični matriks, koji služi kao matrica za staničnu rekonstituciju i formiranje fibroznog tkiva. Naime, aktivni  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  može direktno potisnuti sposobnost tih stanica za lučenje kolagena tipa I (116). Istraživanja *in vitro* pokazala su da određene količine vitamina D suprimiraju fibrogenu aktivnost TGF- $\beta$  u stelatnim stanicama, modificirajući ekspresiju SMAD2 bjelančevine. Biopsija jetrenog tkiva kod morbidno pretilih pacijenata s dokazanim NAFLD-om, pokazala je jetrenu fibrozu s povećanom fragmentacijom VDR proteina (117). Druge studije pokazuju da vitamin D može usporiti diferencijaciju stelatnih stanica u fibroblaste/miofibroblaste, utječući tako na sprječavanje razvoja jetrene fibroze (118). Također dokazno je da vitamin D može doprinijeti opstanaku jetrenog



transplatata, inhibirajući apoptozu hepatocita, a na što upućuje njegova sposobnost da regulira izražaj proteina povezanih s apoptozom u tkivu jetre (119).

### **1.3.12 Vitamin D i starenje**

Vitamin D generira brojne biološke reakcije koje uključuju, između ostalog, imunosni, kardiovaskularni, mišićni i živčani sustav; kao i kontrolu staničnog ciklusa i prevenciju nastanka novotvorina (120). Također, danas su poznati mnogi blagotvorni učinci vitamina D u borbi protiv starenja. To proizlazi iz detaljnog istraživanja različitih bioloških mehanizama i procesa gdje vitamin D djeluje u ublažavanju raznih patoloških stanja koji pridonose starenju.

Potrebe za vitaminom D se povećavaju tijekom starenja. Starije osobe imaju smanjeni kapacitet za sintezu vitamina D u koži kada su izloženi UVB zračenju te je vjerojatno da će ostati u kući ili više koristiti zaštitu od sunca, koja sprječava sintezu vitamina D. Procijenjeno je da se u Europi, Kanadi i SAD-u, prevalencija nedostatka vitamina D kreće između 20% - 100% u starijoj dobi (121). Također, starije su osobe koji ne uzimaju nadomjestak vitamina D u visokom riziku da razviju simptome insuficijencije vitamina D (122, 123).

### **1.4. Eksperimentalni model indukcije šećerne bolesti**

Eksperimentalni životinjski modeli indukcije šećerne bolesti danas su neophodani za napredak znanosti i razumijevanje različitih aspekata patogeneze i konačnog pronalaženja novih terapija i lijekova. Za indukciju šećerne bolesti u laboratorijskih životinja koristi se nekoliko modela.

Streptozotocin (engl. streptozotocin, STZ) i aloksan su daleko najčešći lijekovi koji se koriste za proučavanje više aspekata šećerne bolesti. Oba lijeka pokazuju svoje djelovanje kada se primjenjuju parenteralno (intravenozno, intraperitonealno, ili supkutano). Doza potrebna za indukciju šećerne bolesti ovisi o životinjskoj vrsti, putu primjene i prehranbenom stanju (124). Nedostatak tih modela očituje se u toksičnom djelovanju dijabetogenih tvari na druge organe u organizmu.

Streptozotocin je N-nitro derivat glukozamina, prirodni antibiotik širokog spektra, citotoksičan spoj koji uništava beta stanice gušterače u sisavaca (125). Sintetizira ga gljivica *Streptomyces achromogenes*. Nakon intraperitonealne ili intravenozne aplikacije ulazi u  $\beta$  - stanice gušterače

putem Glut-2 transportera i uzrokuje alkilaciju deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) (124). Indukcija šećerne bolesti u štakora pomoću streptozotocina vrlo je jednostavna za korištenje (126). Ubrizgavanje streptozotocina dovodi do degeneracije  $\beta$  - stanica Langerhansovih otočića gušterače (127). Primjenjuje se ili jednokratno u većoj količini ili višekratno u manjim dozama. Klinički simptomi šećerne bolesti jasno se vide u štakora u roku od 2 - 4 dana nakon jedne intravenozne ili intraperitonealne injekcije 60 mg/kg STZ-a (128).

Također za indukciju šećerne bolesti koristi se aloksan, toksičan analog glukoze, koji selektivno uništava  $\beta$ -stanice gušterače u glodavca i mnogih drugih životinjskih vrsta. Uzrokuje inzulin-ovisnu šećernu bolest u životinja sa sličnim svojstvima šećerne bolesti tipa 1 kao u ljudi. Aloksan je selektivno toksičan za beta stanica gušterače, jer se pretežno nakuplja u  $\beta$ -stanicama preko Glut-2 transportera. U prisutnosti unutarstaničnih tiola, stvara reaktivne radikale kisika (engl. *reactive oxygen species*, ROS) u cikličkoj reakciji s njegovim redukcijским produktom, dialuričnom kiselinom (129). Slobodni hidroksi-radikali nastali u redoks reakciji odgovorni su za fragmentaciju DNA  $\beta$ -stanica gušterače i toksično djelovanje aloksana.

Jedna od metoda za indukciju šećerne bolesti je i kirurško uklanjanje gušterače, međutim za izazivanje šećerne bolesti, potrebno je ukloniti 90-95% gušterače (130). Ograničenje tehnike je u tome što zahtjeva dobro poznavanje tehnički zahtjevnih kirurških postupaka, adekvatno kirurško okruženje, postoperativnu primjenu analgetika i antibiotika, suplementaciju enzimima gušterače te povećava rizik od infekcije životinja (131).

Za izazivanje eksperimentalne šećerne bolesti tipa 1 u novije vrijeme koristi se i indukcija pomoću virusa, dok se šećerna bolest tipa 2 u životinja najčešće inducira opterećenjem glukozom i masnim kiselinama (132).

Indukcija šećerne bolesti tipa 1 u našem laboratoriju provedena je prethodno u sklopu projekta MEMODIN (HRZZ 02.05/28, voditeljica projekta izv. prof. dr. sc. Livia Puljak) pri čemu je skupljena banka tkiva, između ostalog i jetre koja je upotrijebljena u izradi ove doktorske disertacije. Indukcija je prethodno provedena prema dosad opisanom modelu (133) jednokratnim intraperitonealnim ubrizgavanjem streptozotocina (STZ) otopljenog u svježe pripremljenom citratnom puferu (pH=4,5), u dozi od od 55 mg/kg. Kontrolnim životinjama ubrizgana je čista otopina citratnog pufera. Štakori su bili hranjeni *ad libitum* uobičajnom hranom za pokusne životinje koja je sadržavala 9% masti, 27% proteina i 64% ugljikohidrata (4RF24 GLP, Mucedola srl, Settimo Milanese, Italija). Životinje su bile smještene u plastične kaveze, s podlogom od

piljevine i kukuruzne stelje u omjeru 3:1. U prostoriji u kojoj su štakori bili smješteni za vrijeme istraživanja održavana je konstantna temperatura od  $\sim 22^{\circ}\text{C}$ , a automatska izmjena dnevno-noćnih ciklusa odvijala se svakih 12 h.

Za provjeru uspješnosti indukcije dijabetesa, 4 dana nakon indukcije štakorima izmjerena je koncentracija glukoze u plazmi (134). U daljnja istraživanja uključeni su štakori kojima je izmjerena koncentracija u plazmi bila  $\geq 300$  mg/dL ili 16,67 mmol/L. Krv za određivanje koncentracije glukoze u plazmi štakora vađena je iz repne vene, a mjerenje je obavljeno pomoću One Touch Vita glukometra (LifeScan, High Wycombe, Velika Britanija). Koncentracija glukoze u plazmi je mjerena na sljedeće dane: prije injiciranja, na dan injekcije STZ-a ili citratnog pufera (dan 0) te svakih sljedećih 30 dana do kraja eksperimenta štakorima koji su živjeli 6 mjeseca odnosno 12 mjeseci nakon injekcije. Štakori iz DM1 skupine primali su jednom tjedno intramuskularno jednu jedinicu dugodjelujućeg inzulina (Lantus Solostar, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, Njemačka), kako se ne bi razvila ketoacidoza i smanjenje tjelesne mase, koje bi moglo dovesti do lošeg općeg stanja pokusne životinje. To je minimalna doza inzulina koja je dovoljna za održavanje dobrog stanja štakora.

Kriteriji uključenja životinja bili su odsustvo promjena zdravstvenog statusa na početku istraživanja i glukoza u plazmi  $\geq 300$  mg/dL 4 dana nakon indukcije (za DM1 skupine). Dok su kriteriji isključenja životinja bili promjena zdravstvenog statusa tijekom istraživanja i glukoza u plazmi  $\leq 300$  mg/dL 4 dana nakon indukcije (za DM1 skupine).

Šest ili dvanaest mjeseci nakon indukcije modela šećerne bolesti tipa 1, štakori su anestetizirani 5%-tnim izofluranom te dekapitirani u dubokoj anesteziji. Nakon žrtvovanja životinja, jetra je izvađena, te fiksirana u Zambonijevu fiksativu (4% paraformaldehid i 0,20% pikrinska kiselina u 0,1M fosfatnom puferu – PBS pH 7,4). U izradi ove doktorske disertacije upotrijebljena je upravo jetra tih životinja (streptozotocinom inducirane šećerne bolesti tipa 1) a u skladu s Direktivom 2010/63/EU Europskog parlamenta i vijeća iz 2010. godine o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe.

## 2. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

1. Starenje i dugoročni DM1 uzrokovat će povećan izražaj VDR pozitivnih hepatocita.
2. Starenje i dugoročni DM1 uzrokovat će povećan broj  $1\alpha$ -OHaza imunoreaktivnih stanica.
3. Starenje i dugoročni DM1 uzrokovat će povećan broj 24-OHaza pozitivnih stanica u različitim subpopulacijama stanica jetrenog tkiva.
4. VDR,  $1\alpha$ -OHaza i 24-OHaza izraženi su u specifičnim populacijama jetrenih stanica

### 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je odrediti lokalizaciju i distribuciju receptora za vitamin D (VDR-a) u tkivu jetre mladih i starih štakora na modelu šećerne bolesti tipa 1 induciranom streptozotocinom. S obzirom na biološke učinke starenja i komplikacije koje izaziva šećerna bolest opisat ćemo utjecaj starenja i kroničnog dijabetesa na promjenu izražaja glavnih enzima u sintezi i katabolizmu aktivnog oblika vitamina D ( $1\alpha$ -OHaze i 24-OHaze) u različitim populacijama stanica jetrenog tkiva. S pomoću različitih imunohistokemijskih biljega posebnih staničnih linija detektirati ćemo subpopulacije stanica u kojima je prisutan izražaj navedenih enzima. Objasniti ćemo utjecaj starenja i dugoročnog dijabetesa na promjene u histološkoj građi jetre te utvrditi postoji li povezanost između patoloških promjena u tkivu jetre i izražaja navedenih čimbenika. Na taj način želimo rasvijetliti potencijalnu ulogu kalcitriola i njegovih metabolita u liječenju dijabetesom oštećene jetre u procesu starenja.

## 4. METODE ISTRAŽIVANJA

### 4.1 Priprema banke tkiva i organa dijabetičnih štakora

Indukcija šećerne bolesti tipa 1 provedena je sklopu projekta MEMODIN (Hrvatska zaklada za znanost, 02.05/28) pri čemu je prikupljena banka tkiva jetre, sukladno Direktivi 2010/63/EU Europskog parlamenta i vijeća od 22. rujna 2010. o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (Službeni list Europske unije L 276/33), preuzete zakonodavstvom RH, a koja inzistira na razmjeni tkiva i organa u zemljama članicama te sugerira da se dugotrajni i prema direktivi klasificirani teški eksperimenti ne ponavljaju bez znanstveno opravdanog razloga. Navedeni visoki etički standardi već su nekoliko godina preuzeti uobičajenom praksom Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, iz čega su proizašle vrijedne publikacije i doktorske disertacije (133, 135, 136) slično kako je već dugi niz godina uobičajena praksa Medicinskog fakulteta korištenje banaka tkiva i organa humanog porijekla. Istraživanje je provedeno isključivo uz strogo poštivanje postojećih propisa o upotrebi životinja u znanstvene svrhe i prethodne uobičajene prakse postupka stjecanja doktorata znanosti pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu.

Zbog očekivanog visokog pomora u kroničnu studiju je ušlo 45 životinja, a 5 ih nije dočekalo kraj istraživanja (8 mjeseci ili 14 mjeseci starosti). U banku tkiva uključene su samo dijabetične životinje koje su do kraja istraživanja zadržale odgovarajuću razinu glikemije (minimalno 20 mmol/L). Kako bi se usporedio utjecaj starenja, uvedena je i skupina 3 mjeseca starih životinja (n = 4). Nakon žrtvovanja životinja, uzorci tkiva jetre su pohranjeni u Zambonijevom fiksativu.

Utjecaj starosti uključivao je sljedeće skupine:

- štakori starosti 3 mjeseca (n=4) - c-3m
- štakori starosti 8 mjeseci (n=7) - c-8m
- štakori starosti 14 mjeseci (n=7) - c-14m

Utjecaj DM1 uključivao je sljedeće skupine:

- štakori s DM1 u trajanju od 6 mjeseci starosti 8 mjeseci (n=7) - dm-8m
- štakori s DM1 u trajanju od 12 mjeseci starosti 14 mjeseci (n=6) - dm-14m

## 4.2 Obrada prikupljenih tkiva i organa

Uzorci su ispirani fosfatnom puferu (PBS-u) tijekom 24h na temperaturi 4°C, uz 10 izmjena PBS-a. Isprani uzorci inkubirani su prvo u 25%-tnom etanolu, uz tri izmjene, tijekom 90 minuta. Uslijedila je inkubacija u 50%-tnom etanolu uz tri izmjene, tijekom 90 minuta. Nakon toga, uzorci su inkubirani u 70% etanolu preko noći na 4°C, uz tri izmjene svježe otopine etanola. Sljedećeg dana tkivo je inkubirano tri puta u 96%-tnom etanolu, tijekom 120 minuta. Uslijedila je konačna dehidracija tkiva u 100%-tnom etanolu preko noći, na 4°C, uz tri izmjene alkohola. Sljedećeg dana, uzorci su inkubirani u ksilolu tri puta po 30 minuta, na sobnoj temperaturi, nakon čega su uronjeni u tekući parafin na temperaturi 60°C. Tkivo je inkubirano u tekućem parafinu tijekom ukupno 120 minuta, uz tri izmjene svježeg parafina. Uslijedilo je uklapanje u kalupe te brzo hlađenje parafinskih blokova. Parafinski blokovi rezani su na debljinu 5µm, pomoću mikrotoma (LEICA RM 2155, Leica Microsystem Nussloch GmbH, Nussloch, Njemačka), uz stalno hlađenje korištenjem ledenih blokova. Ravnanje rezova provedeno je uz pomoć vodene kupelji zagrijane na 45°C, nakon čega su rezovi montirani na silanizirana predmetna stakalca (Histobond +, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Njemačka).

### 4.2.1 Priprema za imunofluorescencijsko bojanje

Nakon deparafinizacije, histološki rezovi su kratko isprani u destiliranoj vodi, kuhani u puferu natrijevog citrata (pH 6,0) 12 minuta na 95°C te ohlađeni na sobnu temperaturu. Nakon ispiranja, rezovi tkiva su inkubirani preko noći sa primarnim protutijelima (Tablica 1). Za dvostruka imunofluorescencijska bojanja koristili smo kombinacije dvaju primarnih i sekundarnih protutijela. Poslije višestrukog ispiranja u PBS-u, rezovi su inkubirani 1,5 h sa sekundarnim protutijelima. Potom su s PBS-om isprana sekundarna protutijela te su rezovi inkubirani s DAPI indikatorom (engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*), koji se veže na DNA i boji jezgre. Nakon završnog ispiranja sa PBS-om, svi rezovi bojani imunofluorescencijom uklopljeni su u medij (Immuno-Mount, Shandon, Pittsburgh, PA, SAD), prekriveni pokrovnim stakalcem i osušeni na zraku. Imunofluorescencija je pregledana i fotografirana Olympus BX51 mikroskopom (Olympus, Japan) opremljenim Olympus DP71 kamerom (Olympus, Japan). Za dvostruka bojanja rađene su odvojene fotografije, ovisno o tipu filtera, a kolokalizacije uporabom računalnog programa Adobe Photoshop 7.0.

#### 4.2.2 Bojanje s diaminobenzidinom (DAB-om)

Rezovi tkiva namjenjeni za imunohistokemijsko bojanje inkubirani su u trajanju od 10 minuta u 1% vodikovom peroksidu, prije stavljanja primarnog protutijela. Taj korak bio je nužan da bi se neutralizirala endogena peroksidazna aktivnost unutar tkiva. Vodikov peroksid ispiran je u fosfatnom puferu. Svi rezovi kuhani su u mikrovalnoj pećnici kroz 12 minuta na temperaturi od 95°C u puferu natrijevog citrata (pH=6,0). Primarna protutijela bila su inkubirana na rezovima tkiva tijekom noći. Rabilo se poliklonsko kunićje anti VDR protutijelo (1:300, ab305, Abcam plc. 330 Cambridge, CB4OFL, UK) i poliklonsko kozje anti CYP24 protutijelo (1:100, sc-32165, Santa Cruz, CA, SAD). Primarna protutijela višestruko su ispirana u PBS-u, potom je uslijedila inkubacija sa streptavidin-biotin-peroksidaznim sistemom (K0690, Dakocytomation, Carpinteria, Calif., SAD) i na kraju detekcija s diaminobenzidinom (DAB-om). Slijedilo je ispiranje u destiliranoj vodi, bojenje sa hematoksilinom i dehidriranje u etanolu i ksilolu. Stanice koje su smatrane pozitivnima imale su smeđe obojenje u citoplazmi i/ili jezgri.

#### 4.2.3 TUNEL

Za određivanje DNA fragmentacije, rezovi jetrenog tkiva obojani su TUNEL metodom (QIA39, kit za određivanje stanične smrti, Calbiochem, Novagen, Merck, Njemačka), koja se koristi za detekciju apoptoze, temeljeno na označavanju slobodnih 3'OH-krajeva ulomaka DNA s pomoću modificiranih nukleotida. Reakcija je katalizirana egzogenim enzimima, i to terminalnom deoksinukleotidil transferazom (TdT). TUNEL podrazumijeva obilježavanje 3'OH-krajeva pomoću nukleotida označenog fluorescein izotiocijanatom (fluorescein dUTP). Parafinski rezovi jetre su nakon deparafinizacije rehidrirani u nizu vodenih otopina etanola padajućih koncentracija te se pristupilo TUNEL bojanju. Svi rezovi su kuhani u mikrovalnoj pećnici kroz 12 minuta na temperaturi od 95°C u puferu natrijevog citrata (pH=6,0). Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi i ispiranja u fosfatnom puferu (PBS - pH 7, 4) 3x10 min, rezovi su prekriveni s 50 ml reakcijske smjese koja sadrži terminalnu TUNEL deoksinukleotidil transferazu i fluorescein dUTP (2'-deoksiuridin-5'-trifosfat). Za dvostruka bojanja svaki rez je inkubiran istodobno s primarnim protutijelom: monoklonsko kunićje anti VDR protutijelo i poliklonsko ovčje anti 1 $\alpha$ -OH protutijelo. Prema određenom protokolu, korištena su odgovarajuća sekundarna protutijela. Svi rezovi obojani TUNEL metodom uklopljeni su u medij (Immuno-Mount, Shandon, Pittsburgh, PA, SAD), prekriveni pokrovnim stakalcem i osušeni na zraku.



#### **4.2.4 Standardna histološka bojanja**

##### *Trikromno bojenje po Mallory-ju*

Uzorci su bili inkubirani s hematoksilinom kroz 5 minuta, potom isprani u vodi iz slavine, zatim je slijedila jedna minuta inkubacije u kiselom fuksinu. Kiseli fuksin bio je ispiran nekoliko puta u destiliranoj vodi, a potom su rezovi tkiva bili diferencirani u 1% fosfomolibdenskoj kiselini kroz jednu minutu. Slijedilo je ispiranje u destiliranoj vodi i inkubacija kroz 15 minuta u anilinskom modrilu, ponovo ispiranje u destiliranoj vodi potom diferencijacija tkiva u octenoj kiselini između 1-5 minuta. Posljednji korak bila je dehidracija tkiva u etanolu i ksilolu.

##### *Hamalaun i eozin bojanje (H&E)*

Nakon deparafiniranja, rezovi su bojani u hemalaunu u trajanju 3-5 minuta, ispirani jednu minutu u destiliranoj, potom 5-10 minuta u vodovodnoj vodi, slijedilo je bojanje eozinom 3-5 minuta i ponovno dehidriranje (provođenje rezova kroz alkohole rastućih koncentracija, od 70 %-tnog do 100%-og alkohola). Kako bi se rezovi učinili prozirnim uronili su se u ksilol, a potom su uklopljeni u kanadski balzam i prekriveni pokrovnim stakalcem.

##### Kontrole

Pozitivna kontrola na istraživanim rezovima bilo je smeđe obojenje (bojanje s DAB indikatorom) odnosno fluorescentni signal (bojanje fluorescentnim sekundarnim protutijelima) pojedinih citoplazmi ili jezgara stanica u okolnim strukturama za koje se iz literature zna da reagiraju s primarnim protutijelima. Dodatno se raspored i razlika pozitivnih od negativnih stanica u strukturama rezova provjerio u literaturi i to za svaki traženi čimbenik.

Negativne kontrole napravljene su tako da se proveo cijeli protokol bojanja, ali bez inkubacije primarnim protutijelom. Rezovi su za to vrijeme bili u PBS-u. Negativne kontrole imale su samo hemalaunom odnosno DAPI-jem plavo obojane jezgre, bez smeđe boje odnosno bez fluorescentnog signala citoplazmi ili jezgara stanica.

#### **4.3 Analiza slika i kvantifikacija**

Rezovi jetre pregledani su i fotografirani pomoću mikroskopa (BX51, Olympus, Tokyo, Japan) i fotografirani uz pomoć hladene digitalne kamere (DP71, Olympus, Tokyo, Japan) pri povećanju

×40 i ×100 pri istoj vremenskoj ekspoziciji. Fotografije su analizirane pomoću programa Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD). Svaka fotografirana zona mikrofotografije podijeljena je u kvadrate od 100×100µm pri ×40 povećanju. Brojeno je minimalno 25 kvadrata po rezu. Pet nasumično odabranih polja analizirano je na svakoj od pet mikrofotografija. Stanice koje su bile izrazito pozitivne na VDR označili smo kao jako pozitivne (u slučaju kada je više od 1/2 citoplazme pokazivalo intenzivnu imunoreaktivnost). Postotak jako pozitivnih stanica izražen je kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Broj VDR-imunoreaktivnih jezgara računao se na tri slike uzete pri povećanjem od ×40. Broj VDR-imunoreaktivnih jezgara hepatocita izražen je po mm<sup>2</sup>.

Broj imunoreaktivnih 1α-OHaza stanica izražen je kao broj stanica po površini 1 mm<sup>2</sup>. Svaki dio jetre fotografiran je na površini cijelog reza na uvećanju objektiva od ×10.

Broj imunoreaktivnih 24-OHaza stanica izražen je kao broj stanica po površini 1 mm<sup>2</sup>. Svaka mikrofotografija jetre podijeljena je na kvadrate 100×100 µm pri povećanju od ×40. Za analizu korišten je Image J program. Šest slučajno odabranih polja analizirano je na svakoj od šest analiziranih mikrofotografija. Hepatociti s imunoreaktivnim jezgrama smatrani su kao "24-OHaza pozitivne jezgre", a hepatociti s imunoreaktivnim citoplazmama kao "24-OHaza pozitivne citoplazme".

Za određivanje staničnih populacija koje pokazuju izražaj 1α-OHazu koristili smo dvostruka imunofluorescencijska bojenja. Imunoreaktivne 1α-OHaza stanice kolokalizirane su sa sljedećim biljezima: glijalni fibrilarni kiseli protein (GFAP), ionizirana kalcijum-vezujuća adapterska molekula 1 (Iba1), vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF) i mijeloperoksidaza (MPO) (Tablica 1.).

Za kvantifikaciju izražaja transformirajućeg čimbenika rasta β1 (TGF-β1), analizirana su 4 polja, na povećanju od ×40. Područje praga reaktivnosti u postotcima od ukupne površine izračunato je kao područje praga reaktivnosti u odnosu na ukupnu površinu reza.

**Tablica 1. Popis korištenih primarnih i sekundarnih protutijela.**

	Protutijelo	Tvornički naziv	Kataloški broj	Domaćin	Razrjeđenje	Proizvođač
Primarna protutijela	Kuniće protutijelo za vitamin D receptor	Anti-Vitamin D receptor	ab3508	kunić	1:300	Abcam, Cambridge, UK
	Kuniće protutijelo za glijalni fibrilarni kiseli protein	Anti- GFAP-antibody	ab7260		1:50	
	Kuniće protutijelo za čimbenik rasta koji potiče stvaranje novih krvnih žila	Anti -VEGF antibody	ab46154		1:200	
	Kuniće protutijelo za ljudsku mijeloperoksidazu	Anti-Human Myeloperoksidase	A 0398		1:300	DakoCytomation,DK-26000 Glostrup, Danska
	Mišje protutijelo za alfa glatki aktin	Alpha Smooth Actin	M0851	miš	1:300	
	Kozje protutijelo za vitamin D-24 - hidroksilazu	Anti-CYP 24	sc-32165	koza	1:100	Santa Cruz, CA, SAD
	Ovčje protutijelo za mišji 25-hidroksivitamin D3-1 $\alpha$ hidroksilazu	Anti-Murine 25-Hydroxyvitamin D3-1 $\alpha$ Hydroxylase	PC 290	ovca	1:100	The Binding Site Group Ltd, Birmingham, UK
	Magareće protutijelo za transformirajući čimbenik rasta $\beta$ 1	Anti-TGF- $\beta$ 1	ab92486	magarac	1:10	Abcam, Cambridge, UK
Kuniće protutijelo za ioniziranu kalcij-vezujuća adaptersku molekulu 1	Anti Iba1	019-19741	kunić	1:2000	Wako Pure Chemical Industries, Osaka 540-8605, Japan	
Sekundarna protutijela i njihovi fluorokromi	Magareće protutijelo za kuniće IgG konjugirano s rodaminom	Anti- Rabbit IgG-Rhodamine	711-295-152	magarac	1:300	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Baltimore, PA, SAD
	Magareće protutijelo za mišje IgG konjugirano s rodaminom	Anti- Mouse IgG-Rhodamine	715-295-151		1:300	
	Magareće protutijelo za kozje IgG konjugirano s rodaminom	Anti-Goat IgG-Rhodamine	705-295-003		1:300	
	Magareće protutijelo za kuniće IgG konjugirano s fluorescein izotiocijanatom (FITC)	Anti-Rabbit IgG-FITC	711-095-152		1:200	
	Magareće protutijelo za mišje IgG konjugirano s FITC	Anti-Mouse IgG-FITC	715-095-150		1:200	
	Magareće protutijelo za ovčje IgG konjugirano s FITC	Anti-Sheep IgG-FITC	713-095-147		1:200	

#### 4. 4. Statistička analiza

##### a) Statistički postupci

Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina i standardna devijacija ( $AS \pm SD$ ). Normalnost raspodjele podataka procijenili smo Kolmogorov-Smirnovljenim testom. Vrijednosti kategorijskih varijabli između skupina uspoređivali smo  $\chi^2$ -testom. Za statističku analizu usporedbe izražaja imunoflorescencije u jetrenim stanicama između kontrolnih i dijabetičnih skupina u odnosu na dob koristili smo jednosmjernu analizu varijance (engl. *one-way analysis of variance*, ANOVA), te Tukey-ev post hoc test. Sva obrada izvršila se uz pomoć računalnog programa Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK, SAD). Rezultati su interpretirani na razini značajnosti  $p < 0.05$ .

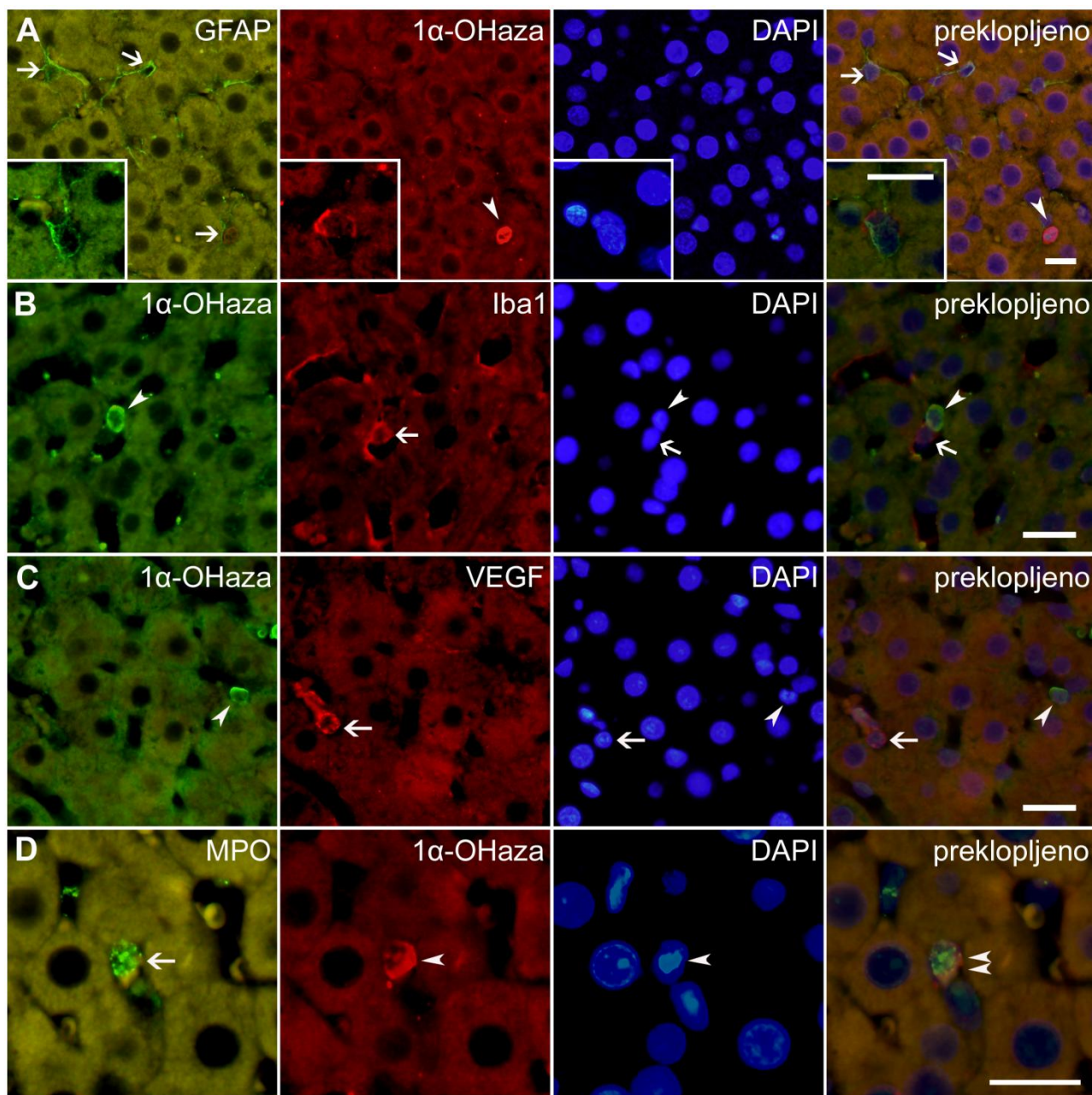
##### b) Izračun veličine uzorka

Procjena veličine uzorka izračunata je pomoću kalkulatora za izračun veličine uzorka dostupnom na <http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2.html>. Za istraživanje su uzete životinje koje su zadovoljile kriterije uključenja u određenom razdoblju. Za određivanje veličine potrebnog uzorka, ulazni parametri određeni su za varijantu izražaja receptora za vitamin D i za varijantu imunoreaktivnosti  $1\alpha$ -hidroksilaze uzimajući u obzir podatke dobivene pilotnom studijom: srednje vrijednosti (za VDR  $\mu_1 = 4.65$ ,  $\mu_2 = 14.32$ , te za  $1\alpha$ -OH  $\mu_1 = 0.63$ ,  $\mu_2 = 1.39$ ) i standardne devijacije (za VDR sigma ( $\sigma$ ) = 4.60, za  $1\alpha$ -OH ( $\sigma$ ) = 0.30); alfa (razinu značajnosti hipoteze) od 0.05 ( $\alpha = 0.05$ ) i snagu testa od 0.80 ( $1 - \beta = 0.80$ ). Uz navedene parametre, bila je potrebna veličina uzorka od najmanje 4 životinje u svakoj od skupina.

## 5. REZULTATI

### 5.1 Izražaj $1\alpha$ -hidroksilaze (CYP27B1) u jetri štakora

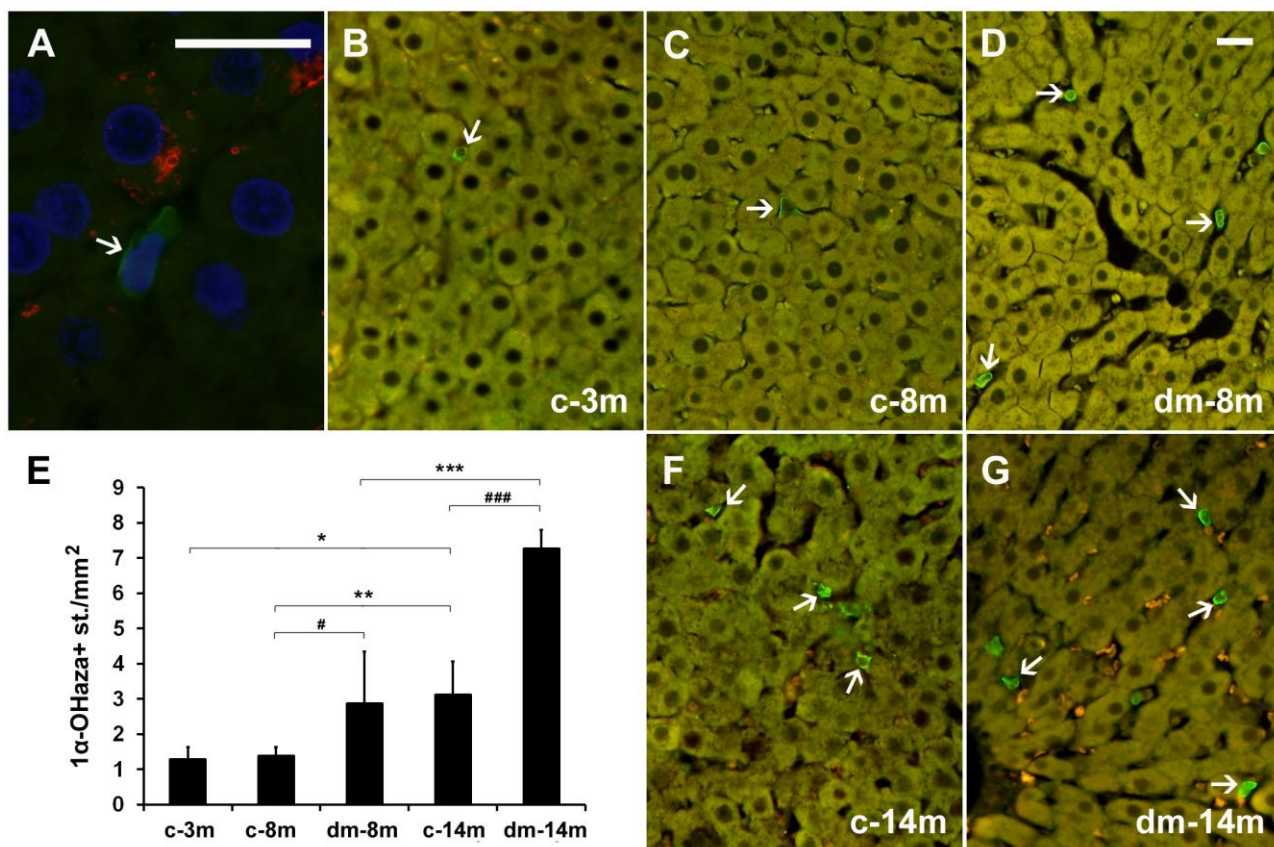
Za određivanje sub-populacije stanica koje su pokazale izražaj  $1\alpha$ -OHaze ( $1\alpha$ -hidroksilaze) koristili smo dvostruko imunofluorescencijsko bojanje. Izražaj  $1\alpha$ -OHaze u jetri štakora uočili smo u populaciji malih ovalnih stanica, lokaliziranih u sinusoidama. Kao biljeg jetrenih stelatnih stanica koristili smo GFAP (Sl. 4A). Iako nismo utvrdili kolokalizaciju GFAP-a i  $1\alpha$ -OHaze, ipak na mnogim mjestima  $1\alpha$ -OHaza imunoreaktivne stanice i GFAP-pozitivne stelatne stanice nalazile su bliskom kontaktu jedna pored druge (Sl. 4A, inserti). Kao biljeg jetrenih makrofaga (Kupfferovih stanica) koristili smo biljeg Iba1. Ko-lokalizacija  $1\alpha$ -OHaze i Iba1 u tkivu jetre također nije pronađena (Sl. 4B). Također, nismo uočili ni ko-lokalizaciju  $1\alpha$ -OHaze sa VEGF-om, biljekom aktivne angiogeneze, vaskulogeneze i endotelnih stanica (Sl. 4C). Međutim, gotovo potpunu kolokalizaciju  $1\alpha$ -OHaze pokazao je enzim mijeloperoksidaza (MPO) koji se koristi kao biljeg stanica mijeloidne loze (Sl. 4D). S druge strane sve mijeloperoksidaza-imunoreaktivne stanice nisu bile  $1\alpha$ -OHaza pozitivne. Kolokalizacija između  $1\alpha$ -OHaza i VDR nije pronađena (Sl.4).



**Slika 4. Izražaj 1 $\alpha$ -hidroksilaze u jetri štakora.** Imunofluorescencijsko bojanje na 1 $\alpha$ -hidroksilazu, GFAP, Iba1, VEGF, MPO i DAPI. Reprezentativni prikaz presjeka jetre štakora skupine DM 8 mjeseci: GFAP (zeleno, strelice), 1 $\alpha$ -OHaza (crveno, vrh strelice). Umetci pokazuju 1 $\alpha$ -OHaza imunoreaktivne stanice u neposrednoj blizini GFAP pozitivnih stelatnih stanica. Kolokalizacija nije uočena (A). Kolokalizacija 1 $\alpha$ -OHaze (zeleno, vrh strelice), i Iba1 (crveno, strelica), u tkivu jetre također nije uočena (B). Isto tako kolokalizacija 1 $\alpha$ -OHaze (zeleno, vrh strelice) i VEGF (crveno, strelica) nije potvrđena (C). Konačno, ko-lokalizacija MPO (zeleno, strelica) i 1 $\alpha$ -OHaze (crveno, vrh strelice) je uočena u svim 1 $\alpha$ -OHaza imunoreaktivnim stanicama (dvostruki vrh strelica) (D). Mjerna ljestvica = 20 $\mu$ m.

### 5.1.1 Izražaj $1\alpha$ -hidroksilaze tijekom starenja i dugoročnog DM1

Broj  $1\alpha$ -OHaza imunoreaktivnih stanica po  $\text{mm}^2$  površine bio je značajno veći u c-14m skupini, u odnosu na c-3m i c-8m skupinu ( $p < 0,05$  i  $p < 0,01$ ; Sl. 5). Dugotrajni DM1 značajno je utjecao na povećan izražaj  $1\alpha$ -OHaze u jetri. Broj  $1\alpha$ -OHaza-imunoreaktivnih stanica bilo je značajno veći u dijabetičnim, u usporedbi s kontrolnim skupinama, posebice 6 i 12 mjeseci nakon indukcije DM1 ( $p < 0,05$  i  $p < 0,001$ ; Sl. 5).



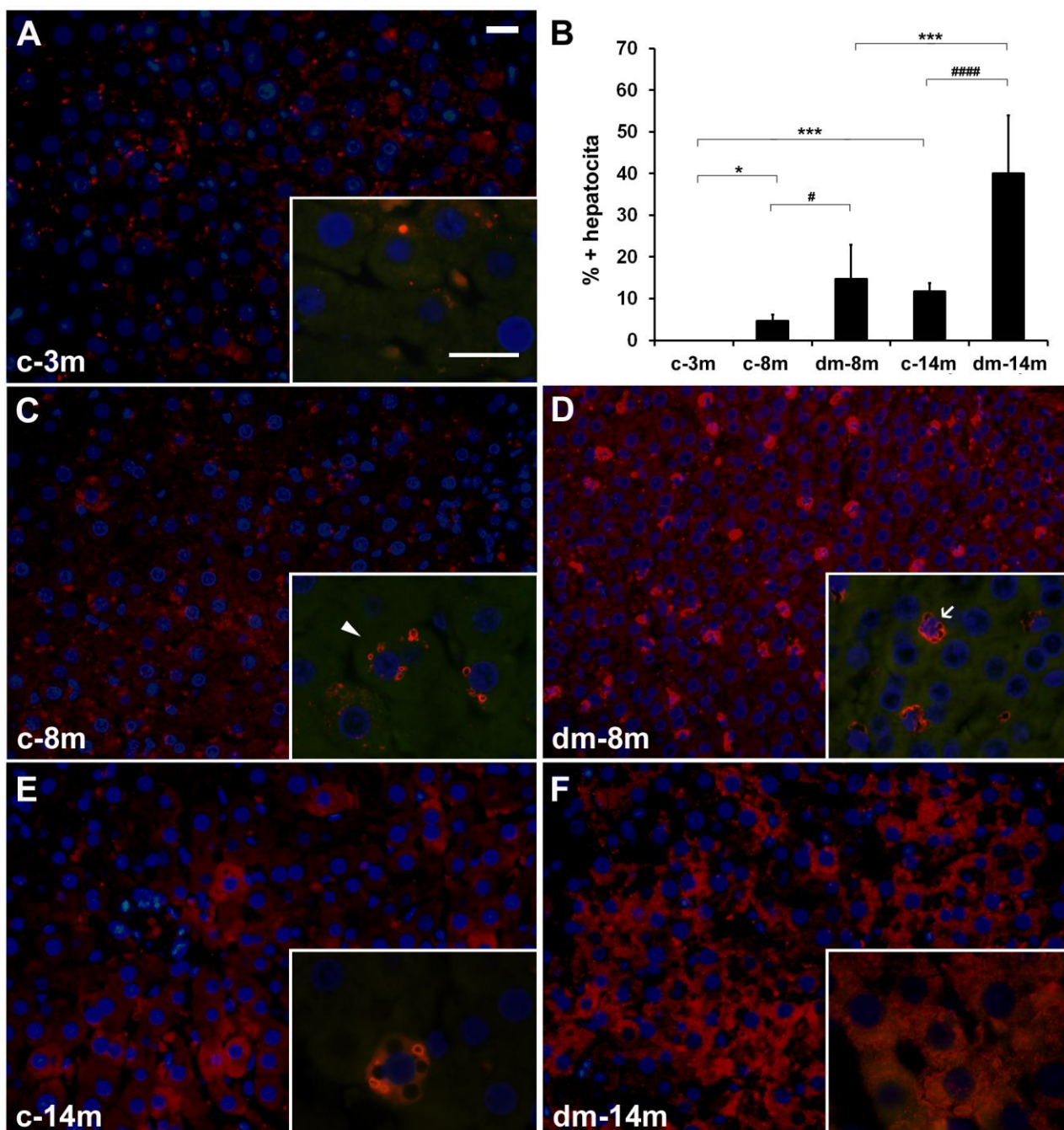
**Slika 5. Reprezentativni prikaz promjena izražaja  $1\alpha$ -OHaze tijekom starenja i dugoročne šećerne bolesti.** Izražaj  $1\alpha$ -OHaze (zeleno, strelice) u citoplazmi malih ovoidnih stanica u sinusoidima jetre (c-8m). Izražaj VDR (crveno) u membrani lipidnih kapljica unutar hepatocita. Kolokalizacija između  $1\alpha$ -OHaze i VDR-a nije pronađena (A). Prikaz histoloških rezova jetre kontrolnih štakora u dobi od 3 mjeseca (c-3m) (B), u dobi od 8 mjeseci (c-8m) (C), u dobi od 14 mjeseci (c-14m) (F). Broj  $1\alpha$ -OHaza imunoreaktivnih stanica po  $\text{mm}^2$  površine bio je značajno veći u dijabetičnoj (E), u usporedbi s kontrolnom grupom, 6 mjeseci (F) i 12 mjeseci poslije indukcije DM1 (G). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  značajne razlike s obzirom na dob, #  $p < 0,05$ ; ###  $p < 0,001$  značajna razlika između dijabetične i odgovarajuće kontrolne skupine (B). Mjerna ljestvica =  $20\mu\text{m}$ .

## 5.2 Izražaj receptora za vitamin D (VDR) u jetri štakora

### 5.2.1 Izražaj VDR-a u citoplazmi hepatocita tijekom starenja i dugoročnog DM1

Imunoreaktivnost VDR-a opažena je kao intenzivno crveno bojanje u citoplazmi hepatocita posebice u membranama vezikula, najvjerojatnije lipidnih kapljica (engl. *lipid droplets*, LDs, Sl. 6). Skupina c-8m i dm-8m pokazale su VDR-imunoreaktivnost masnih kapljica koje su bile grupirane oko jezgre hepatocita (Sl. 6) Također, imunoreaktivnost VDR-a opažena je i u jezgrama hepatocita, ali vrlo blago, osim u dm-14m skupini, gdje je izražaj bio vrlo jak (Sl. 6). Izražaj VDR-a uočen je i u citoplazmi stelatnih, Kupfferovih i endotelnih stanica jetre (Sl. 6). Značajan porast postotka VDR pozitivnih stanica (citoplazma) uočen je u 8-mjesečnim (c-8 m), kao i u 14-mjesečnim štakorima (c-14m) u odnosu na 3 mjeseca stare štakore (c-3m) ( $p < 0,05$  i  $p < 0,001$ ) (Sl. 6). Dugoročni DM1 rezultirao je značajno većim postotkom jako pozitivnih stanica 6 mjeseci ( $p < 0,05$ ) i 12 mjeseci nakon indukcije dijabetesa ( $p < 0,0001$ , Sl. 6). Postotak jako pozitivnih stanica značajno se povećao u dm-14m skupini, u odnosu na dm-8m skupinu ( $p < 0,001$ ).



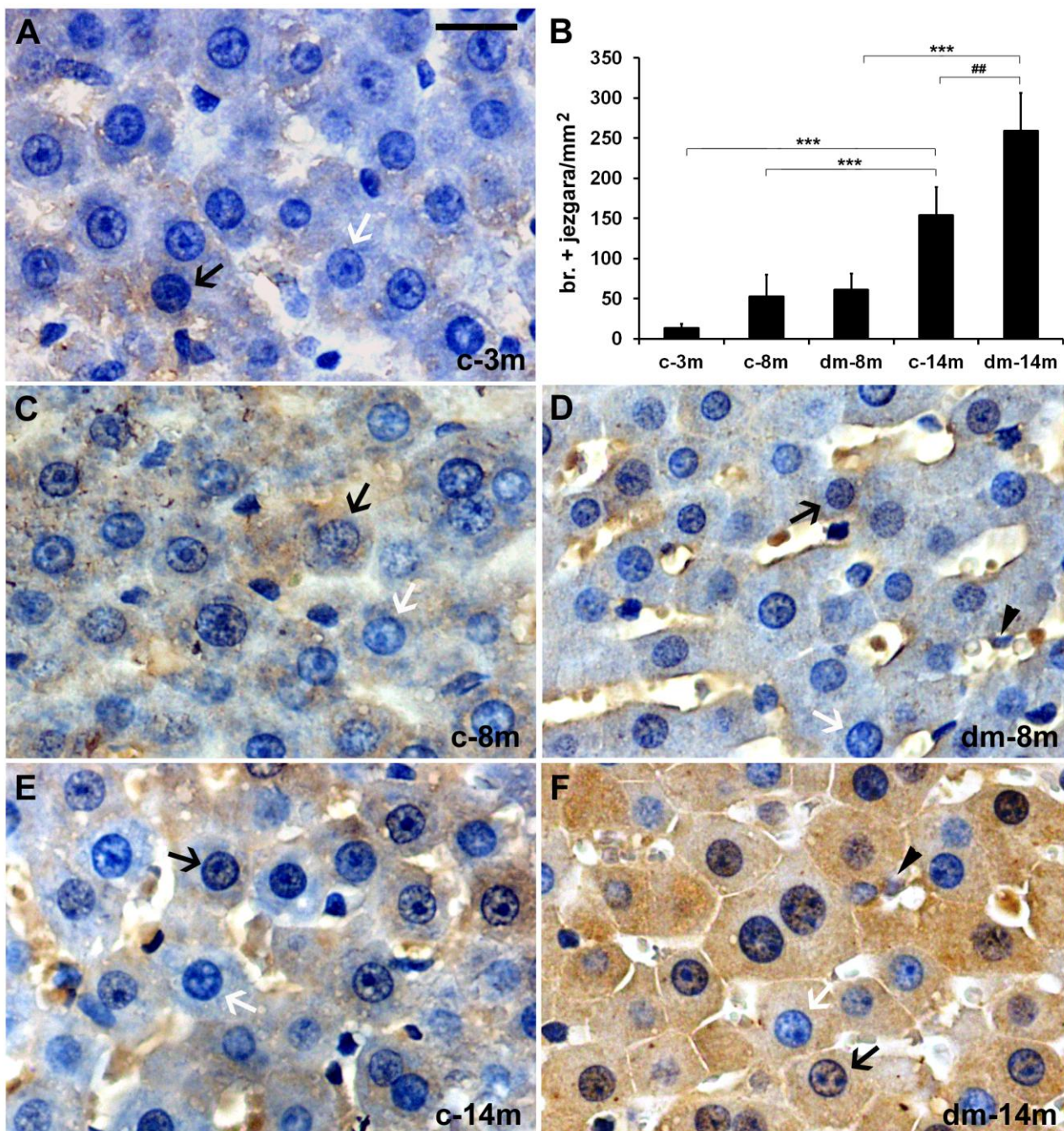


**Slika 6. Reprezentativni prikaz promjene u izražaju VDR-a u citoplazmi hepatocita tijekom starenja i dugoročne šećerne bolesti.** Histološke rezovi jetre kontrolnih životinja u dobi od 3 mjeseca, c-3m (A); 8 mjeseci starim štakorima, c-8m (C); dijabetične životinje u dobi od 8 mjeseci (6 mjeseci nakon indukcije dijabetesa), dm-8m (D); kontrolne životinje u dobi od 14 mjeseci, c-14m (E) i dijabetične životinje u dobi od 14 mjeseci (12 mjeseci nakon indukcije DM1), dm-14m (F). Postotak VDR pozitivnih stanica u različitim eksperimentalnim skupinama (B). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija. \*  $p < 0,05$  i \*\*\*  $p < 0,001$  značajne razlike s obzirom na dob; #  $p < 0,05$  i #####  $p < 0,0001$  značajna razlika između dijabetične i odgovarajuće kontrolne

skupine. Vrh strelice pokazuje početak formiranja staničnih vezikula-lipidnih kapljica (umetak u C). Strelica pokazuje VDR imunoreaktivnost u naprednom formiranju lipidnih organela koje su nalaze u nakupinama oko jezgre hepatocita (umetak u D). Mjerna ljestvica: 20 =  $\mu\text{m}$ .

### **5.2.2 Izražaj VDR-a u jezgri hepatocita tijekom starenja i dugoročnog DM1**

Blagi izražaj VDR-a bio je prisutan u jezgrama hepatocita mladih štakora (Sl. 7). Broj VDR pozitivnih jezgri po  $\text{mm}^2$  površine bio je značajno veći u 14 mjeseci starim štakorima (c-14m skupina), u odnosu na 3 mjeseca stare štakore (c-3m skupina), kao i u odnosu na 8 mjeseci stare štakore (c-8m skupina) ( $p < 0,001$ ). Značajno povećanje broja VDR-a u jezgrama uočeno je 12 mjeseci nakon indukcije DM, u usporedbi s kontrolnom skupinom jednako starih životinja ( $p < 0,001$ ). Nadalje, intenzitet VDR-a bio je vrlo jak u jezgri hepatocita u dm-14m skupini, za razliku od drugih skupina, gdje je intenzitet bojenja bio slabije izražen (Sl. 7).

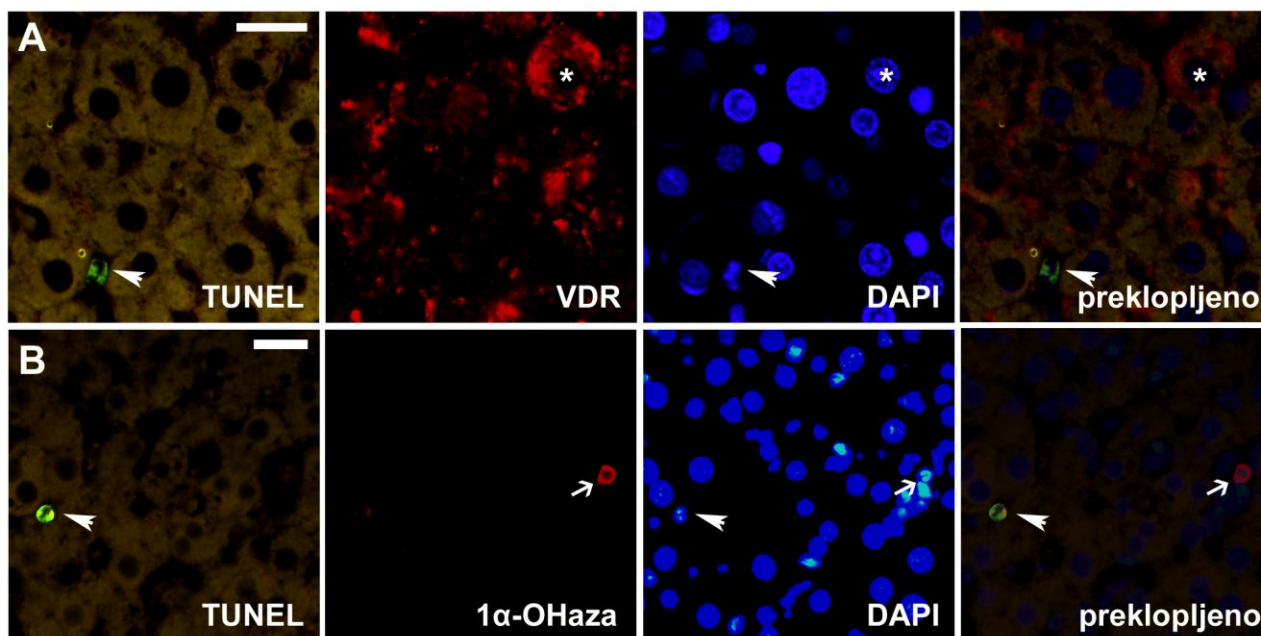


**Slika 7. Reprezentativni prikaz promjena u izražaju VDR-a u jezgrama hepatocita tijekom starenja i dugoročne šećerne bolesti.** Histološki presjek jetre kontrolnih životinja u dobi od 3 mjeseca (c-3m) (A). Imunohistokemijsko bojanje DAB-om pokazalo je vrlo slabo bojanje VDR u citoplazmi, kao i u jezgrama hepatocitima u jetri kontrolnih (c-8m) (C) i dijabetičnih životinja u dobi od 8 mjeseci (dm-8m) (D). U tkivu kontrolnih životinja u dobi od 14 mjeseci (c-14m) (E) i dijabetičnih iste dobi (dm-14m) (F) uočen je veći broj i intenzitet VDR pozitivnih jezgri i citoplazmi hepatocita. Crne strelice - VDR pozitivne jezgre; bijele strelice - VDR negativne jezgre. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija. Mjerna ljestvica: 20 =  $\mu\text{m}$ . \*\*\*

p<0,001 - značajna razlika s obzirom na dob; ### p<0,001 značajna razlika između dijabetične i kontrolne skupine (B).

### 5.2.3. Kolokalizacija TUNEL/VDR i TUNEL/1 $\alpha$ -OHaza

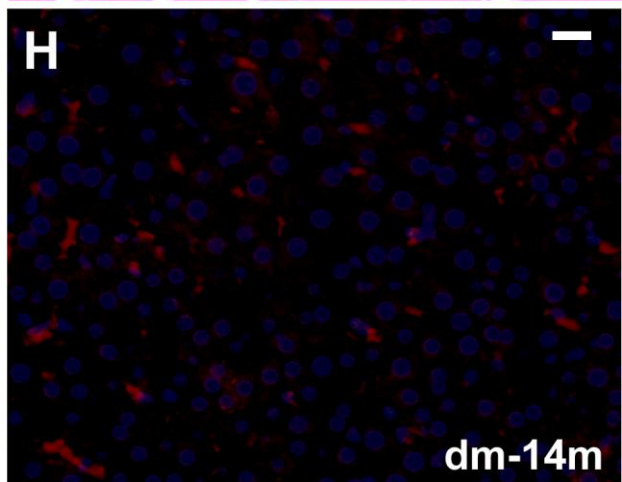
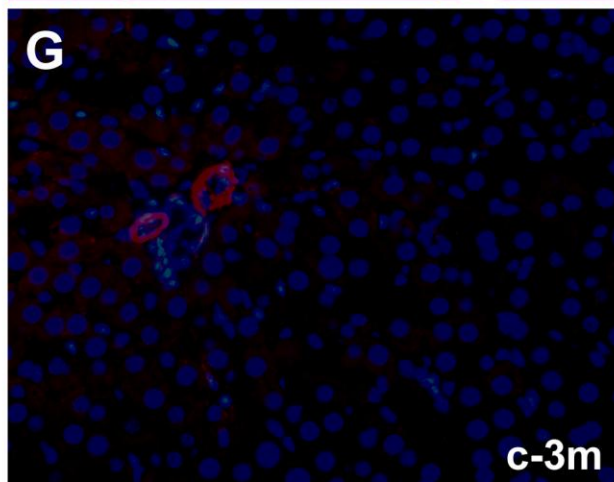
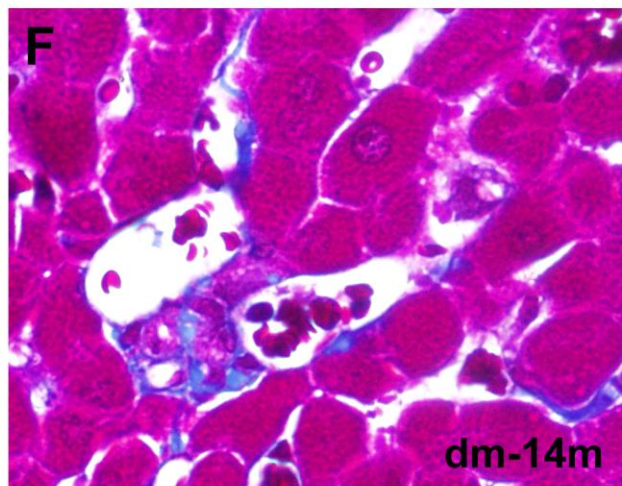
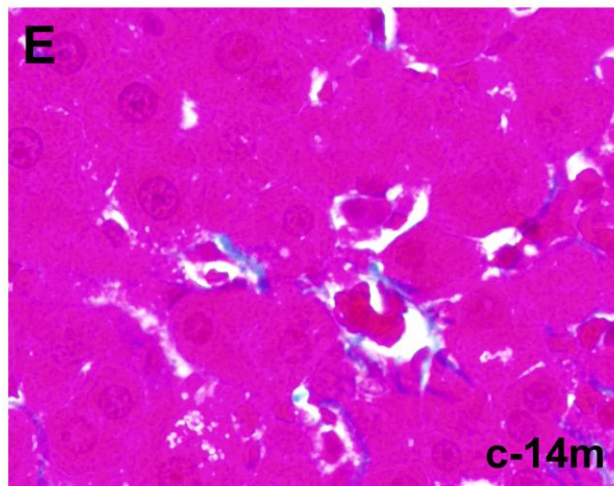
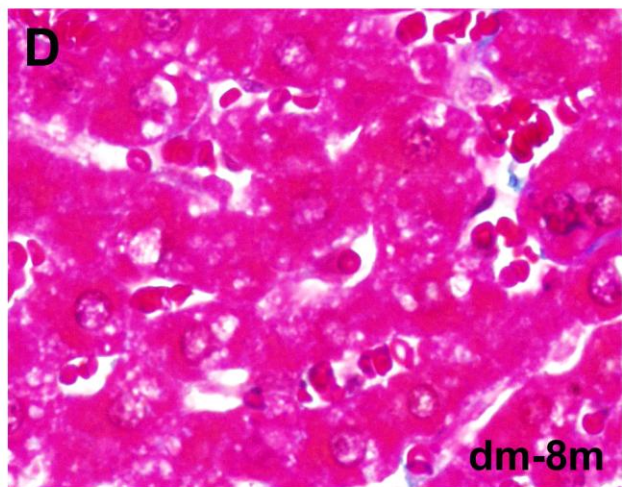
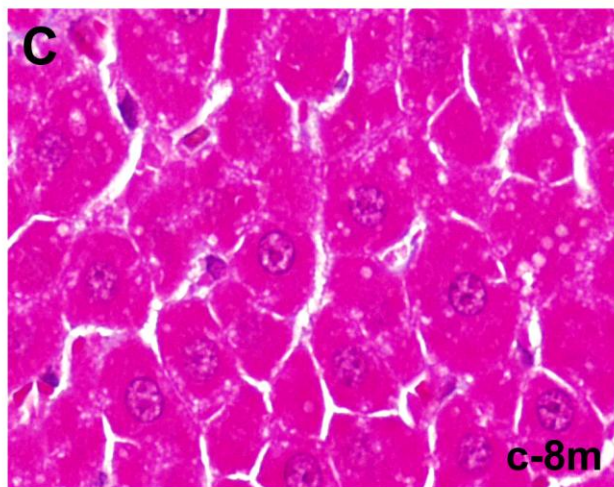
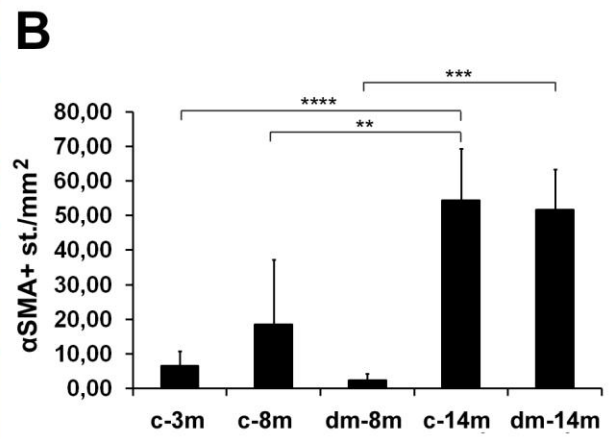
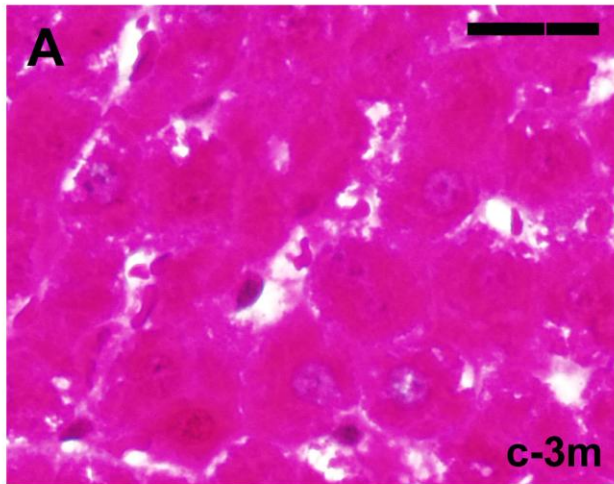
TUNEL metodom nađena je sporadična reaktivnost u hepatocitima i malim stanicama koje su se nalazile u sinusoidama i krvnim žilama (Sl. 8). Također nije uočena kolokalizacija TUNEL-a s VDR-om i 1 $\alpha$ -OHazom.



**Slika 8. Prikaz kolokalizacije TUNEL-a s VDR-om i 1 $\alpha$ -hidroksilazom.** Reaktivnost uočena TUNEL metodom se sporadično može vidjeti u hepatocitima, ali uočena je i u malim stanicama u sinusoidama jetre i krvnim žilama. TUNEL (zeleno, vrh strelice), VDR (crveno, zvjezdica), DAPI (plava). Preklapanje slika TUNEL, VDR, DAPI. Nije primijećena ko-lokalizacija TUNEL-a i VDR-a (A). TUNEL-pozitivna stanica (zeleno, vrh strelice), 1 $\alpha$ -OHaza pozitivna stanica (crveno, strelica), DAPI - jezgre (plavo). Preklapanje slika TUNEL, 1 $\alpha$ -OHaza, DAPI nije pokazalo ko-lokalizaciju TUNEL-a i 1 $\alpha$ -OHaze (B). Mjerna ljestvica = 20  $\mu$ m.

### 5.3 Trikromno bojanje po Mallory-u

Trikromno bojanje po Mallory pokazao je prisutnost jetrene fibroze u 14 mjesečnim životinjama. Znakovi jetrene fibroze bili su prisutni u obje skupine, kontrolnoj i dijabetičnoj, ali znatno više izraženi u jetri dijabetičnih životinja (Sl. 9). Značajan porast broja  $\alpha$ -SMA imunoreaktivnih stanica uočen je tijekom starenja. Broj  $\alpha$ -SMA imunoreaktivnih stanica bilo je najveći u c-14m, kao i u dm-14m skupini (Sl. 9). Značajne razlike između kontrolne i dm skupine nisu bile uočene 6 i 12 mjeseci nakon indukcije dijabetesa (dm-8m, dm-14m). S druge strane, značajan porast broja  $\alpha$ -SMA imunoreaktivnih stanica opažen je u 14 mjeseci starih dijabetičnih životinja (c-14m, dm-14m) (Sl. 9B).

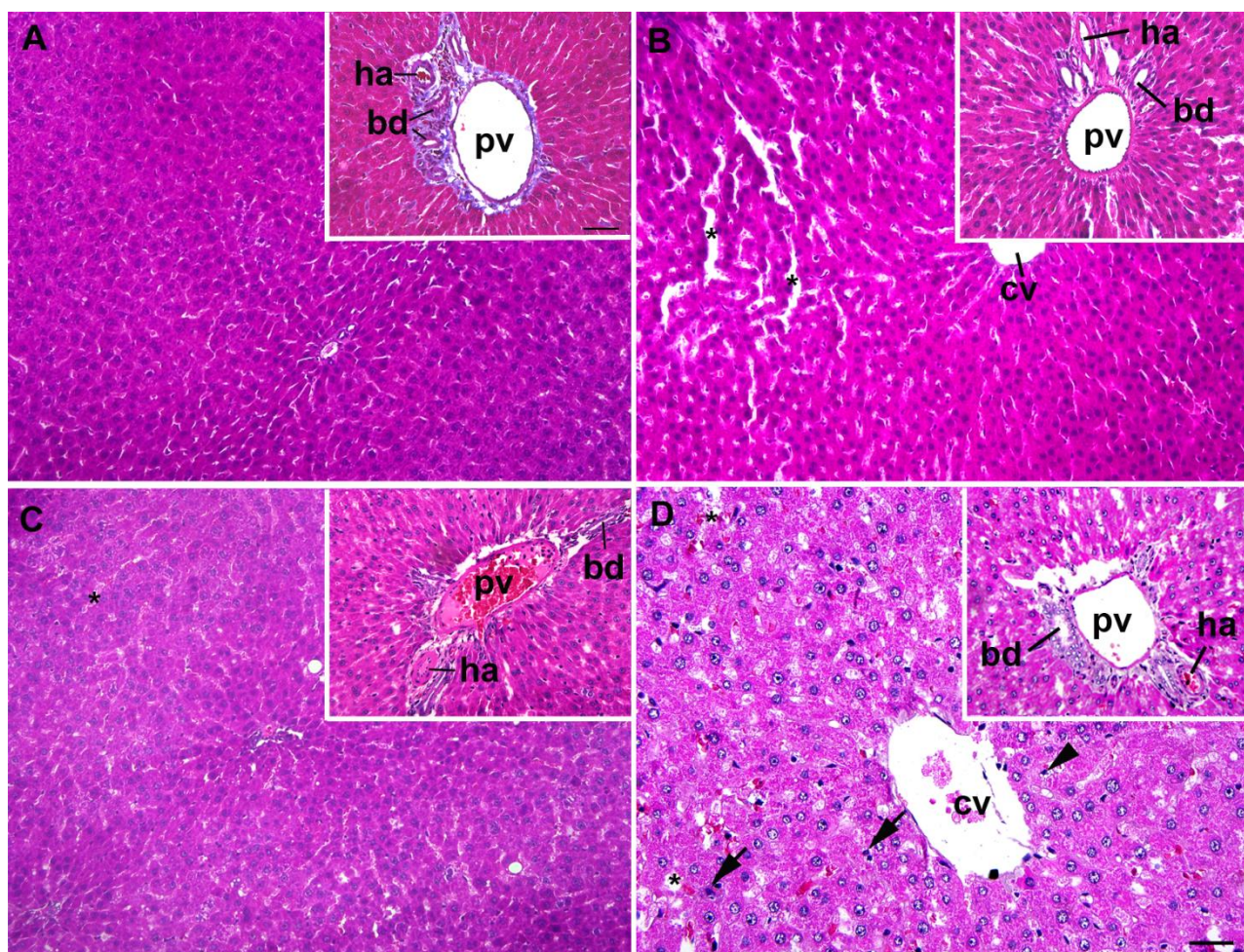


**Slika 9. Trikromno bojenje po Mallory-u i izražaj  $\alpha$ -SMA tijekom starenja i dugoročnog dijabetesa.** Trikromno bojanje po Malloryu pokazalo je znakove jetrene fibroze u 14-mjesečnoj kontroli (E) i dijabetičnim životinjama iste dobi (F). U kontroli dobi 3 (c-3m) (A) i 8 mjeseci (c-8m) (C) prisutnost jetrene fibroze nije uočena, dok se kod 8-mjesečne dm skupine (dm-8m) mogu vidjeti tek početni znaci fibrotičkog procesa (D). Broj ( $\alpha$ -SMA) imunoreaktivnih stanica po mm<sup>2</sup> površine. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija. \*\* p<0.01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001 bio je značajano različit s obzirom na dob (B). Reprezentativni primjeri izražaja  $\alpha$ -SMA u stanicama 3-mjesečne (c-3m) (G) i 14 mjesečne dm skupine (dm-14m) (H). Mjerna ljestvica=20  $\mu$ m.



## 5.4 Hemalaun i eozin bojenje

Na histološkom prikazu jetra kontrolne skupine (c-8m) ima normalni izgled jetre i jetrenog parenhima (Sl. 10). Blage morfološke promjene uočene su u kontrolnoj skupini (c-14m) (Sl. 10 C). Degeneracija i masna infiltracija hepatocita prikazane su u c-14m kao i u dijabetičnoj skupini (dm-8 m i dm-14m). Osim toga, u skupina s dijabetesom u dobi od 8 i 14 mjeseci prikazana je dilatacija središnjih vena, ogranaka portalne vene i žučnih vodova u području portalne trijade (Sl. 10 B i D). Mononuklearne stanice poput leukocita, kao i Kupfferove stanice (KCs) uočene su u jetrenom parenhimu između degeneriranih i masno promijenjenih hepatocita (Sl. 10 D).



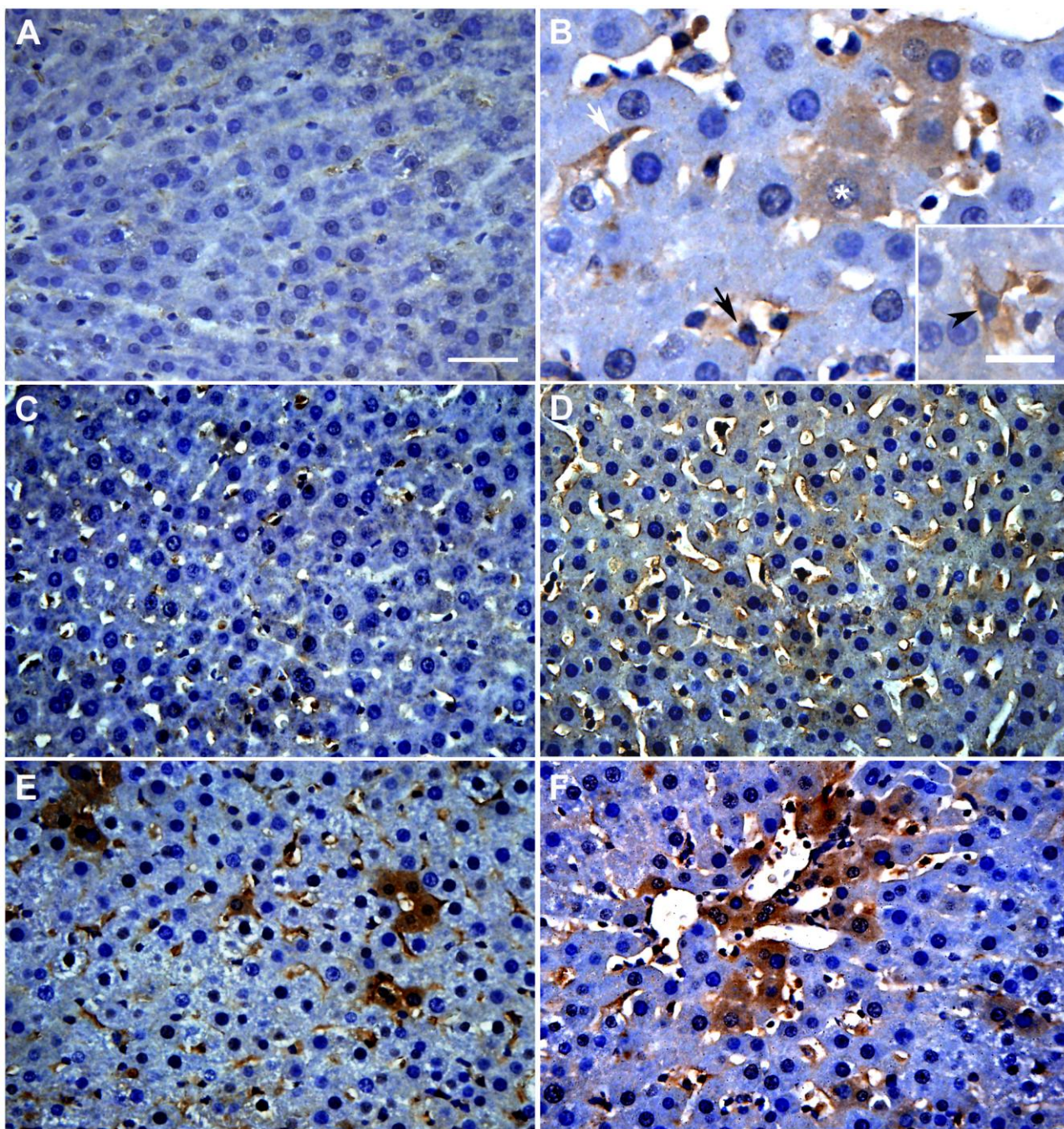
**Slika 10. Reprezentativni prikaz hemalaun-eozinom obojanih rezova jetre.** Histološki presjek jetre u c-8m (A), dm-8m (B), c-14m (C), i dm-14m (D). Kontrola (c-8m) prikazuje normalnu histološku strukturu centralnih vena (cv) i okolnih hepatocita u jetrenom parenhimu (A). Dijabetične skupine u dobi od 8 do 14 mjeseci pokazuju blagu kongestiju jetre, dilataciju središnjih vena i sinusoidalnih prostora (\*), ogranaka portalne vene (pv) i žučne vodove (bd) u portalnoj trijadi (umetci), te ogranaci jetrene arterije (ha), Kupfferove stanice (strelice), stelatne stanice jetre (vrh

strelice). Blaga degeneracija i masne promjene hepatocita mogu se uočiti i u skupinama c-14m, dm-8 i dm-14 (B, C, D). Mjerna ljestvica za A-D = 20  $\mu$ m, a za umetke = 40  $\mu$ m.

## **5.5. Izražaj 24-hidroksilaze (CYP 24A1) u jetri štakora**

### **5.5.1 Izražaj 24-hidroksilaze u jetri tijekom starenja i dugoročnog DM1**

Imunohistokemijsko bojanje na 24-OHazu pokazalo je imunoreaktivnost u jezgri i citoplazmi hepatocita, endotelnim stanicama u sinusoidama (LSECs), te u određenoj populaciji malih zvjezdastih stanica lokaliziranih u Disseovom prostoru tzv. stelatnim stanicama (HSCs) u kontrolnoj i dijabetičnoj skupini životinja tijekom starenja. Izražaj 24-OHaze u kontrolnim skupinama (c-3m; c-8m) bio je vrlo blag u citoplazmi i u jezgri hepatocita i ne-parenhimskih stanica (LSECs, HSCs i KCs), dok je dijabetična skupina (dm-8m) pokazala umjereni do jaki izražaj 24-OHaze opažen u citoplazmi hepatocita, LSECs, HSCs i KCs (Sl. 11A, C i D). Dijabetične životinje u dobi od 14 mjeseci pokazale su jači izražaj 24-OHaze u citoplazmi i jezgrama jetrenih stanica u usporedbi s kontrolnom skupinom (Sl. 11B, E i F).



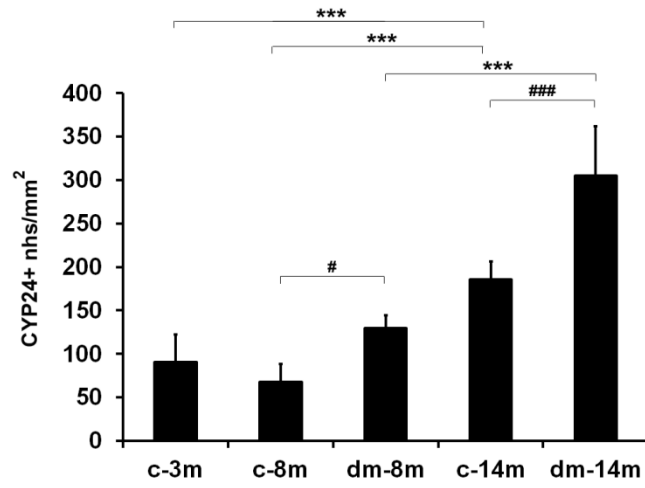
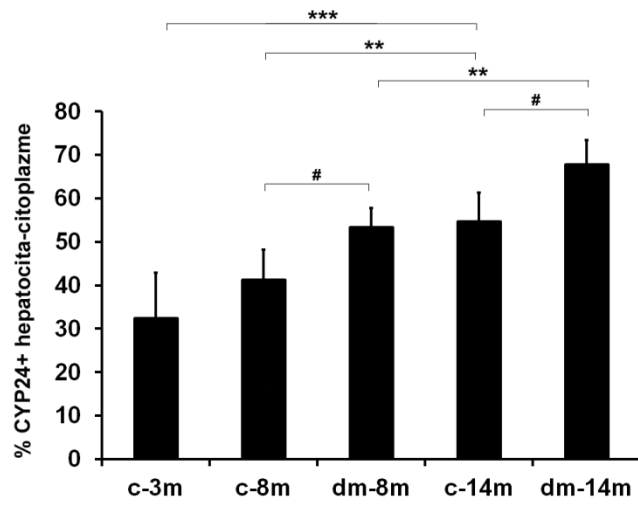
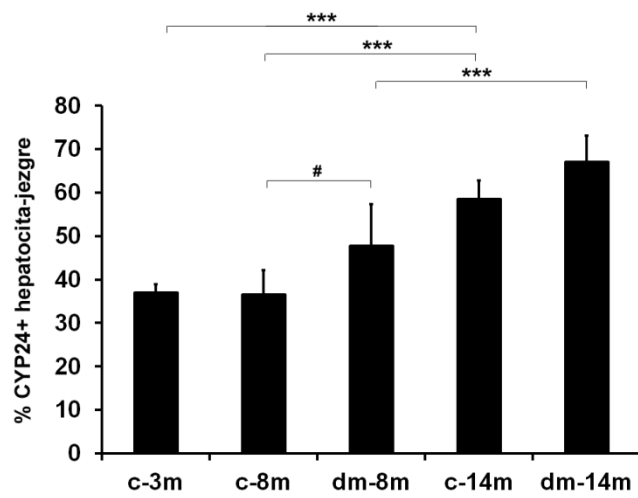
**Slika 11. Reprezentativni prikaz promjene u izražaju 24-OHaze u jetri tijekom starenja i dugotrajne šećerne bolesti.** Histološki presjek jetre kontrolnih životinja u dobi od 3 mjeseca. Imunohistokemija sa DAB-om pokazala je vrlo slabi izražaj 24-OHaze u citoplazmi, te u jezgri hepatocita i u stanicama sinusoida (A). Histološki presjek kroz jetru kontrolnih životinja u dobi od 8 mjeseci. Imunohistokemijsko bojanje na DAB pokazalo je vrlo slabi izražaj 24-OHaze u citoplazmi i jezgri hepatocita i stanica sinusoida (C), a histološkim presjekom kroz jetru dijabetičke skupine (dm-8m) uočen je umjereni do jaki izražaj 24-OHaze u citoplazmama i jezgrama istih stanica (D). Kontrolne (E) i dijabetične jetre u dobi od 14 mjeseci (F) pokazuju vrlo jak izražaj 24-OHaze u citoplazmama i jezgrama stanica u odnosu na kontrolnu skupinu. Povećanje

slike (umetci) iz dm-14m skupine prikazani su u gornjem desnom kutu (B). Na histološkom presjeku kroz jetru dijabetične skupine (dm-14m) uočen je snažan izražaj 24-OHaze u citoplazmi endotelnih stanica jetre (bijela strelica), stelatnih (crna strelica) i Kupfferovih stanica (vrh strelice u umetku), također jak izražaj 24-OHaze se može vidjeti i u citoplazmi i jezgri hepatocita (zvjezdica). Mjerna ljestvica A, C-F = 40 $\mu$ m; B = 20 $\mu$ m.

#### **5.5.1.1 Izražaj 24-OHaze u ne-parenhimskim stanicama jetre**

Broj 24-OHaza-pozitivnih ne-parenhimskih stanica (HSCs, LESC, KCs) bio je značajno veći u obje dijabetične skupine (dm-8m i dm-14m), u usporedbi s kontrolnim grupama (c-8 m i c-14m) ( $p < 0,05$  i  $p < 0,001$ ). Osim toga, u skupini dijabetičnih životinja tijekom starenja, broj 24-OHaza pozitivnih ne-parenhimskih stanica bio je značajno veći u dm-14m u odnosu na dm-8m ( $p < 0,001$ ) (Sl. 12A). Postotak 24-OHaza pozitivnih hepatocita u citoplazmi bio je značajno veći u obje skupine životinja sa šećernom bolešću (dm-8m i dm-14m), u odnosu na kontrolne skupine (c-8m i c-14m) ( $p < 0,05$ ). Tijekom starenja, broj 24-OHaza pozitivnih citoplazmi hepatocita bio je značajno veći u c-14m skupine u odnosu na mlađe kontrolne skupine životinja (c-3m, c-8m) ( $p < 0,01$  i  $p < 0,001$ ). U dijabetičnim skupinama životinja broj 24-OHaza pozitivnih hepatocita u citoplazmi bio je značajno veći u dm-14m u odnosu na dm-8m ( $p < 0,01$ ) (Sl. 12B).

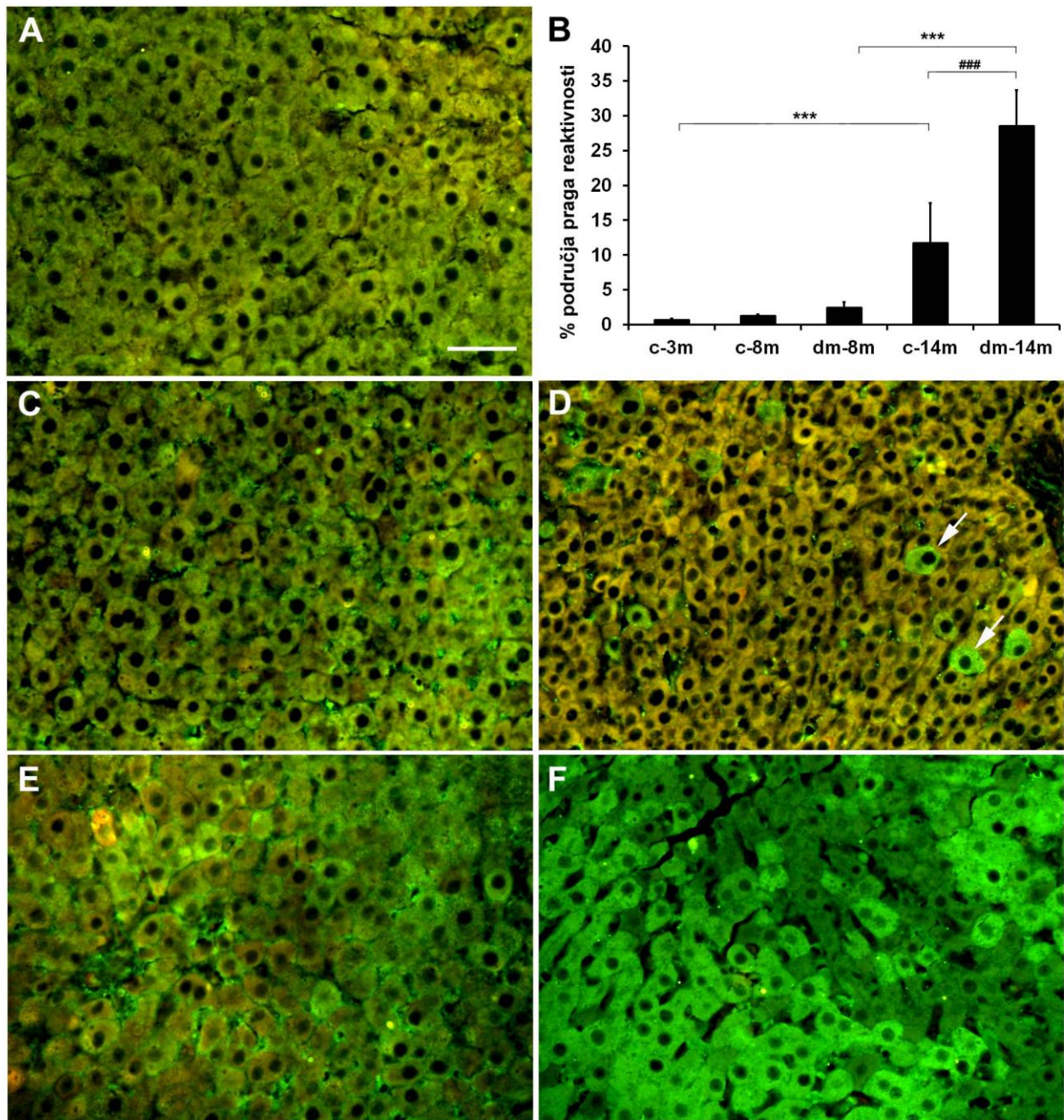
Omjer CYP24-pozitivnih jezgara hepatocita bio je značajno veći u dm-8m u usporedbi s c-8m skupinom ( $p < 0,05$ ). Broj 24-OHaza pozitivnih jezgara hepatocita bio je značajno veći u c-14m skupini u odnosu na ostale kontrolne skupine životinja (c-3m, c-8m) ( $p < 0,001$ ). U dm-8m, broj 24-OHaza pozitivnih jezgara hepatocita bio je znatno veći nego u c-8m ( $p < 0,05$ ) (Sl. 12C).

**A****B****C**

**Slika 12. Prikaz rezultata izražaja 24-OHaze u stanicama jetre.** Postotak imunoreaktivnih 24-OHaza ne-parenhimskih/hepatocitnih stanica (nps ili nhs) po kvadratnom milimetru (A), postotak 24-OHaza pozitivnih hepatocita citoplazme (B) i postotak pozitivnih 24-OHaza jezgara hepatocita (C) u različitim eksperimentalnim skupinama. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija, prikazane su značajne razlike s obzirom na dob, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , te značajna razlika između dijabetičkih i kontrolnih skupina #  $p < 0,05$  i ###  $p < 0,001$ .

### 5.6 Izražaj TGF- $\beta$ 1 u jetri štakora tijekom starenja i dugoročnog DM1

U kontrolnim skupinama (c-3m), uočen je vrlo blagi izražaj TGF- $\beta$ 1, dok je u c-8m uočen umjereni izražaj (Sl. 13A i C). Postotak TGF- $\beta$ 1 u različitim eksperimentalnim skupinama prikazan je na slici 13B. Jetra skupine životinja s šećernom bolešću starosti 8 mjeseci (dm-8m) sporadično je pokazala snažan izražaj TGF- $\beta$ 1 u hepatocitima i ne-parenhimskim stanicama jetre (Sl. 13D). Izražaj TGF- $\beta$ 1 bio je značajno veći u jetri 14-mjesečnih životinja, u odnosu na 3-mjeseca stare štakore ( $p < 0,001$ ; Sl. 13B). skupine životinja s šećernom bolešću, u dobi od 14 mjeseci, pokazale su jači izražaj TGF- $\beta$ 1 u citoplazmi i jezgrama stanica u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $p < 0,001$ ; Sl. 13B, E i F). Osim toga, značajno povećanje izražaja TGF- $\beta$ 1 nađeno je u jetri životinja sa šećernom bolešću i to u 14 mjesecih životinja (dm-14m) u usporedbi sa 8-mjesečnom skupinom (dm-8m) ( $p < 0,001$ , Sl. 13B, E i F).



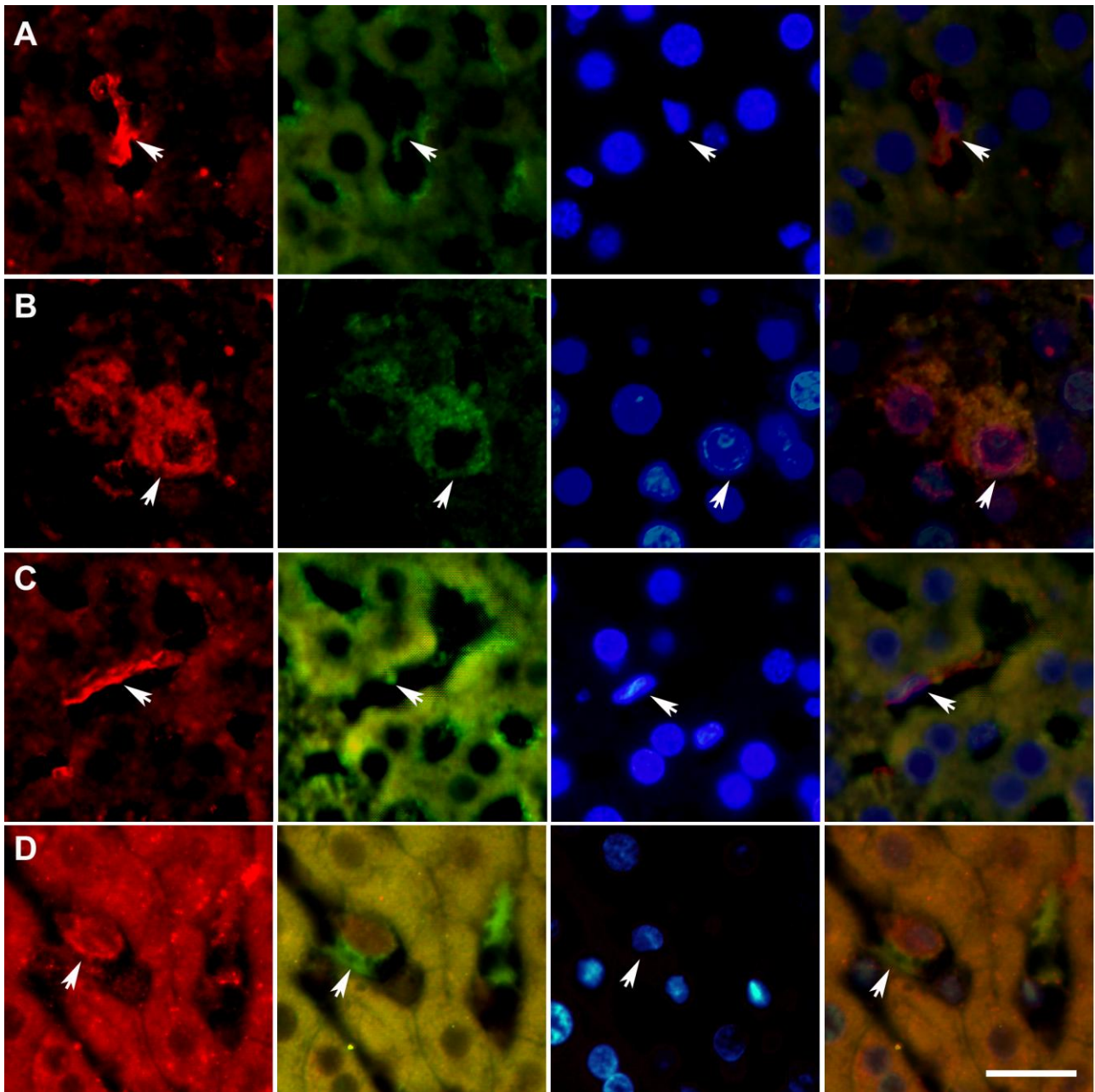
**Sl. 13. Promjene u izražaju TGF-β1 u jetri tijekom starenja i dugoročne šećerne bolesti.** Histološki presjek kroz jetru kontrolnih životinja u dobi od 3 mjeseca. Imunofluorescencijskim bojanjem uočen je vrlo slabi izražaj TGF-β1 u hepatocitima i sinusoidnim stanicama (A). Područje praga reaktivnosti (%) TGF-β1 u različitim eksperimentalnim grupama. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SD, značajna razlika s obzirom na dob \*\*\*  $p < 0,001$ , značajna razlika između dijabetične i kontrolne skupine ####  $p < 0,001$  (B). Histološki presjek kroz jetru kontrolnih životinja u dobi od 8 mjeseci. Imunofluorescencija je pokazala umjereni izražaj TGF-β1 u stanicama jetre (C), a u histološkom presjeku kroz jetru dijabetične skupine (dm-8m) uočen je jaki izražaj TGF-β1 u hepatocitima i sinusoidnim stanicama, posebno u određenim hepatocitima (strelice) (D). U jetri

kontrolnih životinja u dobi od 14 mjeseci (E) uočen je jak izražaj TGF- $\beta$ 1 u jetrenim stanicama, dok je kod dijabetične skupine životinja (dm-14m; F) uočen vrlo jaki izražaj TGF- $\beta$ 1 u hepatocitima i stanicama sinusoida u odnosu na kontrolu. Mjerna ljestvica A, C-F = 40 $\mu$ m.

### **5.7 Kolokalizacija 24-OHaze s TGF $\beta$ 1 i 24-OHaze s GFAP u tkivu jetre**

Dvostruko imunofluorescencijsko bojanje na 24-OHazu i TGF- $\beta$ 1 pokazalo je kolokalizaciju dvaju navedenih biljega u Kupfferovim stanicama, hepatocitima i jetrenim endotelnim stanicama u svim eksperimentalnim grupama. Reprezentativni primjeri su prikazani na slici (Sl.14 A-C). Stelatne stanice imaju vitalnu ulogu u reguliranju diferencijacije i proliferacije drugih tipova stanica u jetrenom tkivu. Stoga smo htjeli utvrditi moguću kolokalizaciju 24-OHaze i GFAP-a (biljeg stelatnih stanica) kako bi odredili prisutnost navedenog enzima i u stelatnim stanicama (Sl. 14D).





**Slika 14. Histološki presjek kroz jetru dijabetične skupine (dm-14m).** Cijelo područje jetrenog tkiva pregledano je da bi utvrdili kolokalizaciju u određenim populacijama stanica. Prikazani su reprezentativni primjeri kolokalizacije (strelice) 24-OHaze (crveno) i TGF- $\beta$ 1 (zeleno) u Kupfferovoj stanici (A), hepatocitu (B) i endotelnoj stanici (C). Kolokalizacija (strelica) 24-OHaze (crveno) i GFAP-a (zeleno) u stelatnim stanicama (D). DAPI (plavo obojenje jezgara). Mjerna ljestvica = 20  $\mu$ m.

## 6. RASPRAVA

### 6.1. Izražaj $1\alpha$ -OHaze i VDR-a u jetri dijabetičnih štakora tijekom starenja i dugoročnog DM1

U radu smo istraživali utjecaj starenja i dugoročnog oblika šećeren bolesti tipa 1 na izražaj VDR,  $1\alpha$ -OHaze i  $24$ -OHaze u jetri štakora. Imunohistokemijska analiza pokazala je prisutnost  $1\alpha$ -OHaze u populaciji stanica koje pripadaju monocitno-makrofagnom sustavu jetre. Za određivanje subpopulacije  $1\alpha$ -OHaza pozitivnih stanica koristili smo dvostruku imunofluorescenciju i kolokalizaciju s različitim biljezima. GFAP je dokazani biljeg stelatnih stanice jetre (HSCs) tzv. Itovih stanica (137). Stelatne stanice imaju važnu ulogu u patofiziologiji jetrene fibroze i stvaranju ožiljkastog tkiva kao odgovor na oštećenje jetre. Smještene u Disseovom prostoru, održavaju bliske interakcije s endotelnim sinusoidanim stanicama (LSECs) te imaju utjecaj na diferencijaciju i proliferaciju drugih sub-populacija stanica jetre tijekom razvoja i regeneracije (31, 138). Kolokalizaciju GFAP-a s  $1\alpha$ -OHazom nismo utvrdili u tkivu jetre, iz čega proizlazi da stelatne stanice ne izražavaju  $1\alpha$ -OHazu. Ipak, primijetili smo da su  $1\alpha$ -OHaza pozitivne stanice bile bliskom kontaktu, jedna pored druge s GFAP - pozitivnim (stelatnim) stanicama (Sl. 4), što upućuje na moguće funkcionalne interakcije između stelatnih i  $1\alpha$ -OHaza-imunoreaktivnih stanica, koje imaju mogućnost proizvodnje kalcitriola u jetrenom tkivu.

Također, kao biljeg angiogeneze, aktivne vaskulogeneze i endotelnih stanica koristili smo vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF) (139). Nismo našli kolokalizaciju VEGF-a i  $1\alpha$ -OHaze u tkivu jetre tijekom našeg istraživanja, što bi moglo upućivati da  $1,25(\text{OH})_2\text{VDR}$  sustav vjerojatno nije aktivno uključen u procese angiogeneze i vaskulogeneze u tkivu jetre.

Za procjenu u kojoj mjeri jetreni makrofazi izražavaju  $1\alpha$ -OHazu, istraživali smo potencijalnu kolokalizaciju između  $1\alpha$ -OHaze i ionizirane kalcij-vezujuće adaptivne molekule 1 (Iba1). Iba1, je biljeg povezan s membranskim nabiranjem i pokretljivošću stanica te se koristi kao biljeg jetrenih makrofaga tzv. Kupfferovih stanica (KCs) (29), raspoređenih uz stijenke jetrenih sinusoida, koje pripadaju retikuloendotelnom sustavu. Jetreni makrofazi proizvode upalne citokine koji aktiviraju miofibroblaste na proizvodnju kolagena tipa I, a koji nisu prisutni u zdravom jetrenom tkivu. Izlučivanje citokina i aktivacija miofibroblasta ima ključnu ulogu u patogenezi jetrene fibroze različitih etiologija (47). Nismo pronašli kolokalizaciju  $1\alpha$ -OHaze i Iba1 u tkivu jetre u istraživanih životinja (Sl. 4B), što upućuje da diferencirani makrofazi u jetri ne proizvode kalcitrol. Nasuprot tome, kolokalizacija mijeloperoksidaze (MPO), biljega mijeloidnih stanica, od promijelocitnog stadija do zrelih oblika (140) i  $1\alpha$ -OHaze bila je sveprisutna u stanicama jetrenog tkiva. Sve  $1\alpha$ -

OHaza imunoreaktivne stanice bile su ujedno i MPO pozitivne i pokazale su potpunu kolokalizaciju s MPO biljgom. Mijeloperoksidaza je lizosomalni leukocitni enzim, koji katalizira stvaranje reaktivnih kisikovih radikala, važan za mehanizam ubijanja bakterija u fagocitnim leukocitima, u ovisnosti o kisiku. Kao biljeg indeksa oksidacijskog stresa posrednik je u lokalnim oštećenjama tkiva kod mnogih kroničnih upalnih bolesti (141, 142). Prema lokalizaciji u jetrenim sinusoidama i kolokalizaciji s MPO-om, uz izostanak kolokalizacije s Iba1, biljgom zrelih makrofaga, zaključili smo da je  $1\alpha$ -OHaza snažno izražena u monocitima koji su predodređeni da se razviju u zrele jetrene makrofage tj. Kupfferove stanice. Prisutnost  $1\alpha$ -OHaze u tim stanicama pokazuje da jetra ima kapacitet za sintezu bioaktivnih metabolita vitamina D neovisno od proizvodnje istih u bubregu. Naime, u ovom istraživanju kvantificiran je broj  $1\alpha$ -OHaza pozitivnih stanica, dok enzimsku aktivnost  $1\alpha$ -OHaze nismo mjerili. Ovo se može smatrati kao nedostatak istraživanja, budući da je zapaženo dramatično povećanje broja stanica koje izražavaju  $1\alpha$ -OHazu. Završni korak u sintezi aktivnog kalcitriola je hidroksilacija na položaju 1, koju provodi enzim  $1\alpha$ -OHaza (13, 14). Primarno mjesto djelovanja enzima je u proksimalnim tubulima bubrega (97). Nedavne studije pokazale su imunoreaktivnost  $1\alpha$ -OHaze u brojnim tkivima, uključujući kožu (143), dojku (144), prostatu (145), stanice raka debelog crijeva (99) i stanice imunskog sustava (146). Međutim, prema dostupnim saznanjima, izražaj  $1\alpha$ -OHaze do sada nije istraživan u jetri te ovo je prvo izvješće o njenom izražaju u monocito-makrofagnom sustavu jetre. Osim toga, uočili smo značajan porast broja imunoreaktivnih  $1\alpha$ -OHaza stanica u različitim starosnim skupinama promatranih štakora (Sl. 5). Dodatni dokazi u literaturi upućuju na to da je starenje rezultat akumulacije tkivnih oštećenja koje posljedično inducira signale za infiltraciju makrofaga (147, 148). Osim toga, dugotrajna šećerna bolest rezultirala je umnožavanjem tih procesa, kao što se može vidjeti iz višestrukog povećanja broja  $1\alpha$ -OHaza pozitivnih monocita. Značajno povećanje broja  $1\alpha$ -OHaza imunoreaktivnih stanica u tkivu jetre zabilježeno je u dijabetičnih životinja. Ovaj trend uočen je 6, kao i 12 mjeseci nakon indukcije šećerne bolesti. Ipak, broj  $1\alpha$ -OHaza pozitivnih stanica bio je dvostruko veći u 12 mjeseci u usporedbi sa 6 mjeseci starim dijabetičnim životinjama (Sl. 5). Rezultati se mogu objasniti poznatim mehanizmom aktivacije izvanbubrežne  $1\alpha$ -OHaze putem posrednika upale, osobito interferona  $\gamma$  (14, 149). Prema dostupnim saznanjima, ovo je prva studija s ciljem kvantificiranja distribucije  $1\alpha$ -OHaza-imunoreaktivnih stanica u dijabetičnoj jetri tijekom starenja. Naši rezultati u suglasju su sa studijama koje pokazuju da su aktivnost  $1\alpha$ -OHaze i izražaj VDR uključeni u diferencijaciju monocita u zrele makrofage (150-152). Za aktivni oblik vitamina D-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> pokazano je da inducira diferencijaciju iz monocita u makrofage, što sugerira na autoregulacijski mehanizam monocitno-makrofagne proizvodnje i održavanje razine kalcitriola (150). Izražaj  $1\alpha$ -OHaze u imununosnim stanicama nije pod regulacijom kalcitriola, za razliku od

bubrega, gdje je prisutna temeljna auto-regulacija proizvodnje kalcitriola. Dakle, ove stanice mogu biti neograničen izvor vitamina D za autokrine/parakrine aktivnosti u stanicama jetre (14). Naši rezultati pokazuju značajno povećanje broja  $1\alpha$ -OHaza imunoreaktivnih stanica u procesu starenja i dugoročnom DM1, te možemo zaključiti da  $1\alpha$ -OHaza predstavlja potencijalni terapijski model u liječenju upalnih poremećaja uzrokovanih šećernom bolesti.

Uočeni bliski kontakt  $1\alpha$ -OHaza imunoreaktivnih stanica, koje proizvode kalcitriol s GFAP-pozitivnim stelatnim stanicama jetre (Sl. 4), čija aktivacija sudjeluje u patogenezi fibroze jetre (138), može biti od velike važnosti, posebice u patološkim procesima tijekom starenja i dugotrajne šećerne bolesti. Stelatne stanice jetre jako izražavaju VDR (16), koji je također potvrđen u našem istraživanju (Sl. 6). Nedavno su Ding i sur. (75) istražili signalni put sustava vitamina D/VDR kao potencijalnog terapijskog modela za prevenciju jetrene fibroze. Otkrili su da VDR ligandi inhibiraju aktiviranje stelatnih stanica i sprečavaju fibrozu jetre. Štoviše, našli su spontani razvoj jetrene fibroze u VDR *knockout* miševa. Kao potencijalno neograničeni izvor kalcitriola za okolne stanice,  $1\alpha$ -OHaza imunoreaktivni monociti/makrofazi mogu spriječiti i ograničiti aktivaciju stelatnih stanica (i drugih prekursora miofibroblasta), koji bi inače doveli do masivne fibroze. To pokazuje i naše istraživanje, tijekom kojeg smo pronašli histološke znakove fibroze 12 mjeseci nakon indukcije šećerne bolesti. Znakovi fibroze bili su vidljivi i u kontrolnih starijih štakora a posebice u onih kojima je bila inducirana šećerna bolest (Sl. 9). U skladu s prethodno spomenutim, broj  $\alpha$ -SMA-imunoreaktivnih stanica nije bio značajno veći u dijabetičnih, u usporedbi s kontrolnim životinjama (Sl. 6), što ukazuje na perzistentno ograničenje u aktivaciji stelatnih stanica te se može pripisati zaštitnoj ulozi kalcitriola proizvedenog od okolnih monocita. Također, fibrozi obično prethodi kronična upala (153). Nadalje, potrebno je istražiti može li kalcitriol sa svojim receptorom djelovati protuupalno, te spriječiti kroničnu upalu uzrokovanu oštećenjem jetre šest mjeseci nakon indukcije DM1. Ipak, u ovom istraživanju, starenje je samo po sebi rezultiralo znatno većim brojem aktiviranih miofibroblasta, što ukazuje da se akumulacija patoloških promjena ne može izbjeći tijekom starenja i dugotrajne šećerne bolesti (10, 154).

Aktivni vitamin D pokazuje svoje učinke, uglavnom preko svojih receptora, VDR-a (9, 91). Kalcitriol, može lako proći kroz biološke membrane i vezati se visokim afinitetom za nuklearni receptor VDR, koji djeluje kao nuklearni čimbenik transkripcije (85). Do sada je izražaj VDR-a opisan u brojnim tkivima ljudskog organizma, ali i u hepatocitima pokusnih životinja, primjerice miša i štakora (16, 155).

U ovom istraživanju, imunoreaktivnost VDR-a bila je blaga u hepatocitima mladih, zdravih štakora. Nasuprot tome, intenzivna imunoreaktivnost VDR-a zabilježena je u citoplazmi i jezgri hepatocita

starijih i dijabetičnih štakora (Sl. 7). Stoga naše istraživanje pokazuje da starenje i DM1 imaju utjecaj na povećani izražaj VDR-a u citoplazmi i jezgri hepatocita (Sl. 6). Snažna citoplazmatska imunoreaktivnost je vjerojatno uzrokovana povećanim izražajem VDR-a. Nevezani VDR obično je prisutan u citoplazmi, a nakon vezanja sa specifičnim ligandom, premješta se u jezgru, gdje pokazuje svoje učinke na prepisivanje gena (9, 13, 156). Među ostalim učincima, vezanje kalcitriola za VDR rezultira povećanim izražajem istog receptora (157, 158). Iz toga proizlazi mogući citoplazmatski i nuklearni porast izražaja VDR-a koje smo uočili u hepatocitima štakora tijekom starenja i dugoročnog DM1. Naime, povećan broj  $1\alpha$ -OHaza pozitivnih monocita može dovesti do dramatičnog povećanja proizvodnje kalcitriola koji nije potisnut povratnom spregom paratireoidnog hormona (PTH). Vezivanje kalcitriola na VDR aktivira nuklearnu translokaciju i porast izražaja VDR-a, koji bi mogao dovesti do produženja  $1,25D/VDR$  signala.

Starenje i dugoročna šećerna bolest može rezultirati značajnim promjenama u metabolizmu lipida u jetri (159). U istraživanju smo uočili i izražaj VDR-a u membranama masnih kapljica (engl. *lipid droplets*, LDs). Masne kapljice su unutarstanične organele čija membrana sadrži različite proteine, a imaju značajnu funkciju u skladištenju i metabolizmu masti (160). U 8 mjeseci starih štakora (c-8m; dm-8m), imunofluorescentni izražaj VDR bio je ograničen upravo na membrane lipidnih kapljica. Naime, u jetrama dijabetičnih i kontrolnih štakora našli smo VDR-imunoreaktivne lipidne organele lokalizirane u nakupinama oko jezgri hepatocita (Sl. 6). Također, VDR-imunoreaktivnost uočili smo i u citoplazmi hepatocita mladih životinja, ali samo sporadično. Nasuprot tome, intenzivna citoplazmatska VDR imunoreaktivnost u dobi od 14 mjeseci starih štakora bila je ravnomjerno raspoređena kroz cijelu citoplazmu. Naši rezultati pokazuju da starenje i šećerna bolest značajno povećavaju izražaj VDR-a u hepatocitima. Pojava VDR-a u membrani masnih kapljica objašnjava njihovu moguću ulogu u metabolizmu lipida u masnim kapljicama. Jedna od mogućih uloga je i internalizacija vitamina D i njegova pohrana, budući da su ranije studije izvijestile da cirkulirajući vitamin D može biti pohranjen u masnom tkivu i da je povezan s pretilošću i pohranom masti (161, 162). Osim toga, prethodnim istraživanjima utvrđeno je da funkcionalni odnos između VDR-a i receptora za aktivaciju proliferacije peroksisoma peroksidaza proliferajućih-aktiviranih receptora  $\alpha$  i  $\gamma$  (engl. *peroxisome proliferators activated receptor*, PPAR- $\alpha$  i PPAR- $\gamma$ ), potiče stvaranje masnih kapljica, što je jako važno u metabolizmu lipida (163, 164). Nadalje, poznato je da VDR regulacijom izražaja kolesterol  $7\alpha$ -hidroksilaze (engl. *cholesterol 7 alpha-hydroxylase*, CYP7A1) snažno pojačava metaboličku transformaciju kolesterola u žučne kiseline (165).

Akumulacija masnih kapljica u hepatocitima kod šećerne bolesti posljedica je opsežne lipolize u masnom tkivu koja rezultira značajnom raspoloživošću neesterificiranih masnih kiselina (engl. *non-*

*esterified fatty acid*, NEFA) (166). Uloga kalcitriola važna je u supresiji jetrene lipogeneze i upale, što se pokazalo važnim u prevenciji ne-alkoholnog steatohepatitisa (NASH-a) (167). Koliko je prisutnost VDR-a u membranama masnih kapljica u vezi s potonjim ulogama, ostaje da se dodatno istraži. Osim svoje klasične lokalizacije u citoplazmi i jezgrama, VDR-i su nedavno pronađeni i u kaveolama staničnih membrana, gdje posreduju u brzim ne-genomičkim učincima 1,25D/VDR (91). Komponenta kaveola, kaveolin-1, dio je proteosoma masnih kapljica, što je ključno u njihovom formiranju. Citoplazmatski izražaj VDR-a porastao je više od tri puta u dugotrajnoj šećernoj bolesti. Razlog za to bi mogao biti kompenzacijski mehanizam u kojem jetra nastoji povećanjem izražaja VDR-a tijekom starenja i dijabetesa vratiti homeostazu sustava vitamin D/VDR, potrebnu za normalno funkcioniranje jetre.

Skupine životinja u dm-8m i dm-14m pokazale su početne morfološke znakove propadanja jetre, uslijed starenja i dugotrajnog dijabetesa. S obzirom na tu činjenicu koristili smo dvostuku imunofluorescenciju s TUNEL označavanjem, kako bismo utvrdili da li su jako pozitivne VDR-a stanice ujedno i apoptotične. Naime, nedavna istraživanja pokazala su da kalcitriol aktivira unutarnji put apoptoze u nekim specifičnim tumorskim staničnim linijama (168, 169). Međutim, kolokalizacija TUNEL/VDR nije uočena u jetri štakora tijekom ovog istraživanja, sugerirajući da morfološko propadanje hepatocita nije uzrokovano apoptozom. Pretpostavljamo da su stanice s jakim citoplazmatskim izražajem VDR-a ušle u nekrotični put odumiranja. Ipak, u ovom istraživanju pokazana je vrlo rijetka pojava apoptoze u hepatocitima, čak i u vrlo starih i dijabetičnih štakora. Pomoću TUNEL-a, jedne od najpouzdanijih metoda za otkrivanje i kvantificiranje programirane stanične smrti, apoptoza je uočena u rezidentnim stanicama jetre (makrofagi, Itove stanice) te u sinusoidama. Također, nismo uočili prisustvo apoptoze u  $1\alpha$ -OHaza imunoreaktivnim stanicama (Sl. 8).

Osim u citoplazmi, VDR je prisutan i u jezgri, jer nakon vezanja specifičnog liganda odlazi u jezgru i regulira transkripciju odgovarajućih gena (9, 156). Imunoreaktivnost VDR-a uočena je i u jezgrama hepatocita, međutim taj izražaj bio je vrlo blag zbog zamaskiranosti jezgara jakim intenzitetom VDR imunofluorescencije u citoplazmi (Sl. 6). Stoga smo imunohistokemijskim bojanjem rezova na diaminobenzidin i kontrastiranjem jezgara hemalaunom mogli lakše uočiti imunoreaktivnost VDR-a i u jezgrama. Intenzitet nuklearnog izražaja VDR-a, zajedno s brojem stanica s VDR-imunoreaktivnim jezgrama dramatično se povećao sa starenjem životinja i dugoročnim dijabetesom (Sl. 7). Razlog za to leži u činjenici da je jak intenzitet vjerojatno posljedica povećanog izražaja VDR-a u citoplazmi uslijed navedenih procesa, ali također i zbog

povećanog vezivanja kalcitriola na VDR-a (157). Sličan nalaz potvrdila je i studija Alkharfy i sur. (158) koji su uočili su kako terapija vitaminom D inducira VDR ekspresiju u jetri miševa.

Osim bubrežne produkcije kalcitriola postoji i njegova autonomna van-bubrežna produkcija u brojnim tkivima i stanicama. Međutim, pored endogene količine kalcitriola proizvedene u bubrezima, u našem radu smo po prvi put pokazali da u oštećenju jetre šećernom bolešću i starenjem, monociti koji izražavaju  $1\alpha$ -OHaze mogu dovesti do dramatičnog povećanja proizvodnje kalcitriola koji nije pod utjecajem negativne vlastite povratne sprege (170). Naime, poznato je da izražaj  $1\alpha$ -OHaze u stanicama imunološkog sustava nije pod utjecajem negativne povratne sprege kalcitriolom, za razliku od bubrega, gdje taj mehanizam čini osnovu autoregulacije proizvodnje kalcitriola (14). Prema našim rezultatima, povećani kalcitriol u jetri produkt je autonomne proizvodnje u monocitima, što vjerojatno ima i dodatnu ulogu u očuvanju jetrene funkcije. Do sada su opisani brojni pozitivni učinci kalcitriola. Dokazano je da kalcitriol ima zaštitni učinak kod oštećenja jetre u eksperimentalnim modelima dijabetesa na štakorima (2, 3). Ovi učinci posredovani su povećanom razinom antioksidacijskih enzima (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza, glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze) u tkivu jetre (171, 172). Osim toga, kalcitriol svojim učincima modulira odgovor na oštećenja DNK i olakšava popravak DNA koji bi moglo pridonijeti borbi protiv starenja (172).

## **6.2. Izražaj 24-OHaze i TGF- $\beta$ 1 u jetri dijetetičnih štakora tijekom starenja i dugoročnog DM1**

Utjecaj starenja i DM1 na katabolizam vitamina D u jetri nije do sada proučavan. Nedavne studije povezuju katabolizam kalcitriola u jetri sa osteomalacijom uzrokovanom dugotrajnom uporabom određenih lijekova (173, 174) te se postavlja pitanje može li slična interakcija biti dio patofizioloških mehanizama u razvoju staračkog poremećaja mineralizacije kostiju i u kroničnim bolestima kao što je dijabetes.

Stoga smo proučavali i dinamiku izražaja 24-OHaze (CYP24), glavnog enzima u katabolizmu vitamina D, u jetri štakora tijekom starenja i eksperimentalnog DM1. Koristeći imunohistokemijske metode, pronašli smo povećan izražaj 24-OHaze u različitim vrstama jetrenih stanica uključujući hepatocyte, endotelne sinusoidne stanice jetre (LSECs), Kupfferove stanice (KCs) i stelatne stanice (HSCs). U hepatocitima, smo uočili izražaj 24-OHaze u citoplazmi, kao i u jezgri. Slično našim rezultatima, izražaj tog enzima uočen je i u neuronima spinalnog ganglija (175).

Prisutnost 24-OHaze u različitim stanicama jetre ukazuje na to da te stanice mogu imati izražaj enzima za razgradnju kalcitriola u svrhu vlastitih potreba. To bi moglo objasniti lokalizaciju enzima u jezgri. Naime, uočeno je da su pojedine populacije jetrenih stanica mjesta parakrinog/autokrinog djelovanja vitamina D (16). Nakon vezanja za VDR u citoplazmi, kalcitriol se premještena u jezgru, kako bi regulirao ekspresiju ciljnih gena (85, 91). Moguće je da 24-OHaza koja se nalazi u jezgri potiče proces razgradnje kalcitriola kako bi dovela do homeosteze u njegovom djelovanju.

Uloga kalcitriola opisana je u poboljšanju jetrene funkcije uslijed kroničnih jetrenih degenerativnih bolesti kao što je dijabetes (10, 176). Povećani izražaj 24-OHaze, koju smo promatrali tijekom starenja i DM1, mogao bi utjecati na autonomni metabolizam kalcitriola u jetri. S druge strane, opsežni katabolizam kalcitriola u jetrenim stanicama, osobito u hepatocitima i endotelnim sinusoidnim stanicama mogao bi znatno utjecati na opću koncentraciju kalcitriola, koja se odražava na izlučivanje minerala bubrezima, apsorpciju kalcija u crijevima i koštanu pregradnju (9, 13).

Endotelne sinusoidne stanice su vrsta stanica u tkivu jetre uglavnom odgovorne za čišćenje koloida i otpadnih makromolekula iz optjecaja (26). Kawai i sur. pokazali su kako su upravo endotelne stanice najučinkovitije u akumuliranju vitalnih molekula u jetri (177). U kombinaciji sa Kupfferovim stanicama, sinusoidne endotelne stanice predstavljaju najmoćniji "sustav čistača" u tijelu (26). Međutim, osim ove općepoznate uloge „čistača“ u tijelu, endotelne sinusoidne stanice, stelatne i Kupfferove stanice pokazale su opsežni izražaj 24-OHaze što je značajno s obzirom na ulogu u metabolizmu kalcitriola.

Iako je uočen povećani izražaj 24-OHaze u jetri tijekom starenja i DM1, mogući pozadinski mehanizam djelovanja do sada nije poznat. Dinamička ravnoteža bioaktivnog vitamina D u formi kalcitriola ovisi o njegovoj sintezi kataliziranoj putem  $1\alpha$ -OHaze, ali također ovisi i o stupnju njegove razgradnje. Povećan izražaj 24-OHaze u jetri koji smo utvrdili tijekom ovog istraživanja moguće je uzrokovan povećanom proizvodnjom kalcitriola i izražajem VDR-a, budući da je poznato da izražaj 24-OHaze izravno pozitivno reguliran količinom bioaktivnog vitamina D (106, 178). U skladu s tim, nedavna istraživanja također su pokazala da Kupfferove, stelatne i endotelne stanice odgovaraju na kalcitriol značajnim povećanjem 24-OHaze, što ukazuje da je VDR funkcionalan i u tim stanicama (16).

Da bi istražili patološke promjene tijekom starenja i dugotrajnog DM1 istražili smo također izražaj TGF- $\beta$ 1, kao ključnog posrednika u fibrogenim procesima u jetri (179, 180). Poznato je da TGF- $\beta$ 1 posreduje aktiviranje stelatnih stanica te inducira izražaj drugih posrednika u procesu fibroze (181).



Uočili smo znatan porast izražaja TGF- $\beta$ 1 tijekom starenja i dugoročnog DM1, potvrđujući progresiju kroničnog upalnog procesa. TGF- $\beta$ 1 je izražen u svim stanicama jetre, a njegov izražaj u citoplazmi hepatocita povećao se sa starenjem i progresijom DM1. Izražaj TGF- $\beta$  u hepatocitima sam po sebi je predmet rasprave (182). Dakle, moguće je da hepatociti tijekom starenja i DM1 počnu intenzivno izražavati TGF- $\beta$ 1, što može biti posljedica povećanog nakupljanja TGF- $\beta$ 1 u citoplazmi hepatocita, kojeg proizvede drugi tipovi stanica prisutni u jetrenom tkivu. S obzirom da TGF- $\beta$ 1 nije specifični biljeg stelatnih stanica, nego ga izražavaju i Kupfferove stanice, endotelne sinusoidalne stanice i sami hepatociti, za specifični biljeg stelatnih stanica koristili smo GFAP, koji se ne izražava u Kupfferovim stanicama i endotelnim sinusoidalnim stanicama. Stoga smo GFAP koristili kao biljeg stelatnih stanica kako bi utvrdili njegovu ko-ekspresiju sa 24-OHazeom i time dokazali ovaj enzim u stelatnim stanicama.

Također, uočena je koekspresija TGF- $\beta$ 1 i 24-OHaze u različitim populacijama jetrenih stanica. Jak citoplazmatski i jezgreni izražaj TGF- $\beta$ 1 i upalne promjene u stanicama mogu dovesti isto tako do povećanog izražaja 24-OHaze. Povećan izražaj 24-OHaze prethodno je povezan s drugim upalnim bolestima. Naime, izražaj 24-OHaze pokazao se povećanim u tkivu bubrega pacijenata s dijabetičnom nefropatijom (183) i kroničnim bubrežnim bolestima (184).

Zaključno, predstavljeni rezultati ukazuju da jetra ima sposobnost proizvodnje aktivnog vitamina D (kalcitriola) sintezom u monocitno/makrofagnom sustavu. Taj kapacitet znatno je povećan oštećenjem i upalom u različitim (pato)fiziološkim uvjetima, kao što su starenje i dugoročna šećerna bolest. Pojačan izražaj receptora za vitamina D u hepatocitima praćen je značajnim porastom kapaciteta za sintezu vitamina D. Ove promjene mogu imati hepatoprotektivne, antifibrotičke učinke, koji su naglašeni u slučajevima kroničnog perzistentog oštećenja jetre. Također, rezultati ovog istraživanja pružaju dokaz da jetra ima sposobnost aktivnog anabolizma i katabolizma vitamina D u različitim populacijama stanica, posebice u sinusoidama, kroz izražaj  $1\alpha$ -OHaze i 24-OHaze. Utvrdili smo da se ovaj kapacitet znatno povećavao tijekom starenja i dugotrajnog DM1. Navedena stanja karakterizira značajan porast izražaja 24-OHaze u hepatocitima, stelatnim, Kupfferovim i endotelnim stanicama, te izražaj  $1\alpha$ -OHaze, prvi put opisane u monocitno-makrofagnom sustavu jetre. Osim toga, opisali smo i prisutnost VDR-a u membranama masnih kapljica, koji ukazuje na potencijalni kompenzacijski mehanizam u kojem jetra nastoji povećanjem izražaja VDR-a tijekom starenja i dijabetesa vratiti homeostazu sustava vitamin D/VDR, potrebnu za normalno funkcioniranje jetre. Stoga su ključne komponente vitamin D-ovisnog signalnog sustava potencijalni terapijski model za liječenje dijabetesom oštećene jetre.

## 7. ZAKLJUČCI

- $1\alpha$ -hidroksilaza izražena je u tkivu jetre u stanicama monocitno-makrofagnog sustava.
- Receptori za vitamin D izraženi su u jezgrama i citoplazmi hepatocita, posebice u masnim kapljicama unutar citoplazme.
- 24-hidroksilaza prisutna je u većini jetrenih stanica uključujući hepatocite, endotelne sinusoidne, Kupfferove i stelatne stanice.
- Starenje rezultira porastom izražaja receptora za vitamin D i enzima koji sudjeluju u metabolizmu vitamina D ( $1\alpha$ -OHaze i 24-OHaze) u jetrenom tkivu.
- Dugoročni oblik šećerne bolesti tipa 1 izaziva porast izražaja receptora za vitamin D i enzima koji sudjeluju u metabolizmu vitamina D ( $1\alpha$ -OHaze i 24-OHaze) u jetrenom tkivu.

## 8. SAŽETAK

Šećerna bolest (*diabetes mellitus*, DM) je poremećaj metabolizma povezan s ozbiljnim komplikacijama jetre. Kao metabolička kronična bolest, DM je vrlo čest u starijih osoba. Nedavne studije ukazuju na mnoge blagotvorne učinke vitamina D na metabolički i oksidacijski stres u tkivu jetre u eksperimentalnim modelima dijabetesa. Cilj ovog istraživanja bio je istražiti izražaj vitamina D receptora (VDR-a), 1  $\alpha$ -hidroksilaze (1 $\alpha$ -OHaze) i 24-hidroksilaze (CYP24), ključnih enzima u proizvodnji i razgradnji aktivne forme vitamina D (kalcitriola) u jetri tijekom dugoročnog dijabetesa tip 1 (DM1) i starenja. Izvršene su imunohistokemijske analize izražaja VDR-a, 1 $\alpha$ -hidroksilaze, 24-hidroksilaze tijekom starenja u modelu DM1 izazvanom streptozotocinom. Izražaj enzima 1 $\alpha$ -OHaze utvrđen je u monocitno/makrofagom sustavu jetrenog tkiva. Osim nuklearnog izražaja u hepatocitima, također smo uočili izražaj VDR-a u membranama lipidnih kapljica unutar hepatocita. Starenje i dugoročni DM1 rezultirao je značajnim povećanjem broja 1 $\alpha$ -OHaza imunoreaktivnih stanica, kao i postotka jako pozitivnih VDR hepatocita. Također smo ustanovili da su starenje i dugoročni DM1 značajno povećali i izražaj CYP24 u hepatocitima, kao i u ne-parenhimskim stanicama jetre uključujući stelatne, Kupfferove i endotelne stanice. Iz svega navedenog proizlazi da jetra ima sposobnost sinteze aktivnog vitamina D u vlastitom monocitno/makrofagnom sustavu, kao i razgradnje u svim stanicama jetrenog tkiva koja je znatno povećana tijekom starenja i dugoročne šećerne bolesti. Ovaj nalaz prati i značajno povećanje izražaja receptora za vitamina D u hepatocitima i ostalim stanicama jetrenog tkiva. Navedeno istraživanje upućuje na zaključak da bi sustav vitamin D3/VDR mogao biti potencijalna terapijska meta u prevenciji komplikacija jetre uzrokovanih dijabetesom i starenjem.

## 9. SUMMARY

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder associated with serious liver complications. As a metabolic chronic disease, DM is very common in the elderly. Recent studies suggest ameliorating effects of vitamin D on metabolic and oxidative stress in the liver tissue in an experimental model of DM. The aim of this study was to investigate the expression of vitamin D receptors (VDRs), 1 $\alpha$ -hydroxylase(1 $\alpha$ -OHase) and 24-hydroxylase (CYP24), the key enzymes for the production and degradation of active vitamin D form (calcitriol) in the liver during long-term diabetes mellitus type 1 (DM1) in aging rats. We performed immunohistochemical analyses of liver expression of 1 $\alpha$ -OHase, CYP24 and VDRs during aging in long-term streptozotocin-induced DM1. Enzyme 1 $\alpha$ -hydroxylase was identified in the monocyte/macrophage system of the liver. In addition to the nuclear expression, we also observed the expression of VDR in membranes of lipid droplets within hepatocytes. Aging and long-term DM1 resulted in significant increase in the number of 1 $\alpha$ -OHase immunoreactive cells, as well as the percentage of strongly positive VDR hepatocytes. We also found that ageing and long-term DM1 resulted in a significant increases expression of CYP24 in hepatocytes, as well as in non-hepatocyte liver cells (Kupffer cells, hepatic stellate cells and sinusoidal endothelial cells). In conclusion, the liver has the capacity for active vitamin D synthesis in its monocyte/macrophage system and its degradation in all hepatic cell types that are substantially increased in aging and long-term diabetes mellitus. These conditions are also characterized by significant increases in vitamin D receptor expression in hepatocytes. The present study suggests that VDR signaling system could be a potential target in prevention of liver complications caused by diabetes and aging.

## 10. LITERATURA

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004;27(5):1047-53. Epub 2004/04/28.
2. Hamden K, Carreau S, Jamoussi K, Miladi S, Lajmi S, Aloulou D, et al. 1 $\alpha$ ,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: therapeutic and preventive effects against oxidative stress, hepatic, pancreatic and renal injury in alloxan-induced diabetes in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2009;55(3):215-22. Epub 2009/07/16.
3. George N, Kumar TP, Antony S, Jayanarayanan S, Paulose CS. Effect of vitamin D<sub>3</sub> in reducing metabolic and oxidative stress in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Nutr*. 108(8):1410-8. Epub 2012/01/10.
4. Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA, et al. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell*. 2000;6(1):87-97. Epub 2000/08/19.
5. Tappy L, Minehira K. New data and new concepts on the role of the liver in glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2001;4(4):273-7. Epub 2001/07/18.
6. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev*. 2008;29(6):726-76. Epub 2008/08/13.
7. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev*. 2005;26(5):662-87. Epub 2005/03/31.
8. Chakhtoura M, Azar ST. The role of vitamin d deficiency in the incidence, progression, and complications of type 1 diabetes mellitus. *Int J Endocrinol*. 2013:148673. Epub 2013/04/11.
9. Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>vitamin D<sub>3</sub>: genomic and non-genomic mechanisms. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 25(4):543-59. Epub 2011/08/30.
10. Hayes DP. Vitamin D and ageing. *Biogerontology*. 11(1):1-16. Epub 2009/10/22.
11. Najmi Varzaneh F, Sharifi F, Hossein-Nezhad A, Mirarefin M, Maghbooli Z, Ghaderpanahi M, et al. Association of vitamin D receptor with longevity and healthy aging. *Acta Med Iran*. 51(4):236-41. Epub 2013/05/22.
12. Hayes CE, Cantorna MT, DeLuca HF. Vitamin D and multiple sclerosis. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1997;216(1):21-7. Epub 1997/10/08.

13. Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, Haussler CA, Hsieh D, Hsieh JC, et al. Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcified tissue international*. 2013;92(2):77-98. Epub 2012/07/12.
14. Hewison M, Zehnder D, Bland R, Stewart PM. 1 $\alpha$ -Hydroxylase and the action of vitamin D. *J Mol Endocrinol*. 2000;25(2):141-8. Epub 2000/10/03.
15. Ding N, Yu RT, Subramaniam N, Sherman MH, Wilson C, Rao R, et al. A vitamin D receptor/SMAD genomic circuit gates hepatic fibrotic response. *Cell*.153(3):601-13. Epub 2013/04/30.
16. Gascon-Barre M, Demers C, Mirshahi A, Neron S, Zalzal S, Nanci A. The normal liver harbors the vitamin D nuclear receptor in nonparenchymal and biliary epithelial cells. *Hepatology*. 2003;37(5):1034-42. Epub 2003/04/30.
17. Segura C, Alonso M, Fraga C, Garcia-Caballero T, Dieguez C, Perez-Fernandez R. Vitamin D receptor ontogenesis in rat liver. *Histochem Cell Biol*. 1999;112(2):163-7. Epub 1999/08/25.
18. Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol*. 1999;277(2 Pt 2):F157-75. Epub 1999/08/13.
19. Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, Haussler CA, Hsieh D, Hsieh JC, et al. Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcified tissue international*.92(2):77-98. Epub 2012/07/12.
20. Tortora GJ, Grabowski SR. Introduction to the human body : the essentials of anatomy and physiology. 6th ed. ed. New York ; Chichester: Wiley; 2003.
21. Abdel-Misih SR, Bloomston M. Liver anatomy. *Surg Clin North Am*.90(4):643-53. Epub 2010/07/20.
22. Drake RL, Drake RLGsa, Gray HGsa. Gray's atlas of anatomy. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2008.
23. Junqueira LCUa, Carneiro J. Basic histology : text & atlas. 11th ed. / Luiz Carlos Junqueira, José Carneiro. ed. New York ; London: McGraw-Hill; 2005.
24. Moore KL, Agur AMR, Dalley AF, II. Essential clinical anatomy. 4th ed. ed. Philadelphia, Pa. ; London: Lippincott Williams & Wilkins.
25. Dunn JC, Yarmush ML, Koebe HG, Tompkins RG. Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration. *FASEB J*. 1989;3(2):174-7. Epub 1989/02/01.
26. Elvevold KH, Nedredal GI, Revhaug A, Smedsrod B. Scavenger properties of cultivated pig liver endothelial cells. *Comp Hepatol*. 2004;3(1):4. Epub 2004/08/13.
27. Naito M, Hasegawa G, Takahashi K. Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. *Microsc Res Tech*. 1997;39(4):350-64. Epub 1998/01/04.

28. Haubrich WS. Kupffer of Kupffer cells. *Gastroenterology*. 2004;127(1):16. Epub 2004/07/06.
29. Wijesundera KK, Juniantito V, Golbar HM, Fujisawa K, Tanaka M, Ichikawa C, et al. Expressions of Iba1 and galectin-3 (Gal-3) in thioacetamide (TAA)-induced acute rat liver lesions. *Exp Toxicol Pathol*.65(6):799-808. Epub 2012/12/26.
30. Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis*. 2001;21(3):311-35. Epub 2001/10/05.
31. Yin C, Evason KJ, Asahina K, Stainier DY. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *J Clin Invest*.123(5):1902-10. Epub 2013/05/03.
32. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005;115(2):209-18. Epub 2005/02/04.
33. International review of cytology. Supplement: New York ; London : Academic Press.
34. Zhou Y, Xu J, Liu Y, Li J, Chang C, Xu C. Rat hepatocytes weighted gene co-expression network analysis identifies specific modules and hub genes related to liver regeneration after partial hepatectomy. *PLoS One*.9(4):e94868. Epub 2014/04/20.
35. Nagasue N, Yukaya H, Ogawa Y, Kohno H, Nakamura T. Human liver regeneration after major hepatic resection. A study of normal liver and livers with chronic hepatitis and cirrhosis. *Ann Surg*. 1987;206(1):30-9. Epub 1987/07/01.
36. Arias IM, Doyle D, Schimke RT. Studies on the synthesis and degradation of proteins of the endoplasmic reticulum of rat liver. *J Biol Chem*. 1969;244(12):3303-15. Epub 1969/06/25.
37. Mosbach EH. Hepatic synthesis of bile acids. Biochemical steps and mechanisms of rate control. *Arch Intern Med*. 1972;130(4):478-87. Epub 1972/10/01.
38. Postic C, Dentin R, Girard J. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab*. 2004;30(5):398-408. Epub 2005/01/27.
39. Fujiki Y, Fowler S, Shio H, Hubbard AL, Lazarow PB. Polypeptide and phospholipid composition of the membrane of rat liver peroxisomes: comparison with endoplasmic reticulum and mitochondrial membranes. *J Cell Biol*. 1982;93(1):103-10. Epub 1982/04/01.
40. Raiha NC, Suihkonen J. Development of urea-synthesizing enzymes in human liver. *Acta Paediatr Scand*. 1968;57(2):121-4. Epub 1968/03/01.
41. Lathe GH, Walker M. The synthesis of bilirubin glucuronide in animal and human liver. *Biochem J*. 1958;70(4):705-12. Epub 1958/12/01.
42. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology*. 2004;40(1):185-94. Epub 2004/07/09.

43. Beers MH, Porter RS, Jones TV, Kaplan JL, Berkwits M. The Merck manual of diagnosis and therapy. 18th ed. / Mark H. Beers, editor-in-chief /Robert S. Porter, editor /Thomas V. Jones, associate editor /Justin L. Kaplan, senior assistant editor /Michael Berkwits, assistant editor. ed. Whitehouse Station, N.J.: Merck ; London : Elsevier Health Sciences [distributor]; 2006.
44. Ishak KG, Zimmerman HJ, Ray MB. Alcoholic liver disease: pathologic, pathogenetic and clinical aspects. *Alcohol Clin Exp Res.* 1991;15(1):45-66. Epub 1991/02/01.
45. Cave M, Deaciuc I, Mendez C, Song Z, Joshi-Barve S, Barve S, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *J Nutr Biochem.* 2007;18(3):184-95. Epub 2007/02/14.
46. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes.* 2001;50(8):1844-50. Epub 2001/07/27.
47. Xu J, Liu X, Koyama Y, Wang P, Lan T, Kim IG, et al. The types of hepatic myofibroblasts contributing to liver fibrosis of different etiologies. *Front Pharmacol.* 2014;5:167. Epub 2014/08/08.
48. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev.* 2008;88(1):125-72. Epub 2008/01/16.
49. Bissell DM, Wang SS, Jarnagin WR, Roll FJ. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest.* 1995;96(1):447-55. Epub 1995/07/01.
50. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell.* 2001;12(9):2730-41. Epub 2001/09/13.
51. Rockey DC. Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Semin Liver Dis.* 2001;21(3):337-49. Epub 2001/10/05.
52. MacSween RNM. Pathology of the liver. 4th ed. / edited by R.N.M. MacSween ... [et al.] ed. London: Churchill Livingstone; 2002.
53. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology.* 2004;127(5 Suppl 1):S35-50. Epub 2004/10/28.
54. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2014;37 Suppl 1:S81-90. Epub 2013/12/21.
55. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications : report of a WHO consultation. Part 1, Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva: World Health Organization, Department of Noncommunicable Disease Surveillance; 1999.



56. Standards of medical care in diabetes--2009. *Diabetes Care*. 2009;32 Suppl 1:S13-61. Epub 2009/01/06.
57. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas update poster teB, Belgium: International Diabetes Federation, 2014.
58. Tattersall R. Maturity-onset diabetes of the young: a clinical history. *Diabet Med*. 1998;15(1):11-4. Epub 1998/02/24.
59. Gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2004;27 Suppl 1:S88-90. Epub 2003/12/25.
60. Imagawa A, Hanafusa T, Uchigata Y, Kanatsuka A, Kawasaki E, Kobayashi T, et al. Different contribution of class II HLA in fulminant and typical autoimmune type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2005;48(2):294-300. Epub 2005/02/03.
61. Taplin CE, Barker JM. Autoantibodies in type 1 diabetes. *Autoimmunity*. 2008;41(1):11-8. Epub 2008/01/08.
62. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2005;28 Suppl 1:S37-42. Epub 2004/12/25.
63. Type 2 diabetes in children and adolescents. American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2000;23(3):381-9. Epub 2000/06/27.
64. Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes Care*. 2013;37 Suppl 1:S14-80. Epub 2013/12/21.
65. Dubner R, Kenshalo DR, Jr., Maixner W, Bushnell MC, Oliveras JL. The correlation of monkey medullary dorsal horn neuronal activity and the perceived intensity of noxious heat stimuli. *J Neurophysiol*. 1989;62(2):450-7. Epub 1989/08/01.
66. Kitabchi AE, Umpierrez GE, Murphy MB, Kreisberg RA. Hyperglycemic crises in adult patients with diabetes: a consensus statement from the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2006;29(12):2739-48. Epub 2006/11/30.
67. Cryer PE, Davis SN, Shamon H. Hypoglycemia in diabetes. *Diabetes Care*. 2003;26(6):1902-12. Epub 2003/05/27.
68. Wachtel TJ, Tetu-Mouradjian LM, Goldman DL, Ellis SE, O'Sullivan PS. Hyperosmolarity and acidosis in diabetes mellitus: a three-year experience in Rhode Island. *J Gen Intern Med*. 1991;6(6):495-502. Epub 1991/11/01.
69. Roglic G, Unwin N. Mortality attributable to diabetes: estimates for the year 2010. *Diabetes Res Clin Pract*. 2009;87(1):15-9. Epub 2009/11/17.
70. Brownlee M. Hyperglycemia-stimulated myelopoiesis causes impaired regression of atherosclerosis in type 1 diabetes. *Cell Metab*. 2013;17(5):631-3. Epub 2013/05/15.

71. Amarapurka DN, Amarapurkar AD, Patel ND, Agal S, Baigal R, Gupte P, et al. Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) with diabetes: predictors of liver fibrosis. *Ann Hepatol.* 2006;5(1):30-3. Epub 2006/03/15.
72. Chiang DJ, Pritchard MT, Nagy LE. Obesity, diabetes mellitus, and liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*300(5):G697-702. Epub 2011/02/26.
73. Berkow R. *The Merck manual of medical information. Home ed. ed.* New York ; London: Pocket Books; 2000.
74. Stone BG, Van Thiel DH. Diabetes mellitus and the liver. *Semin Liver Dis.* 1985;5(1):8-28. Epub 1985/02/01.
75. Ding N, Yu RT, Subramaniam N, Sherman MH, Wilson C, Rao R, et al. A vitamin D receptor/SMAD genomic circuit gates hepatic fibrotic response. *Cell.* 2013;153(3):601-13. Epub 2013/04/30.
76. Barchetta I, Carotti S, Labbadia G, Gentilucci UV, Muda AO, Angelico F, et al. Liver vitamin D receptor, CYP2R1, and CYP27A1 expression: relationship with liver histology and vitamin D3 levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis or hepatitis C virus. *Hepatology.*56(6):2180-7. Epub 2012/07/04.
77. Lin R, White JH. The pleiotropic actions of vitamin D. *Bioessays.* 2004;26(1):21-8. Epub 2003/12/30.
78. Stocklin E, Eggersdorfer M. Vitamin D, an essential nutrient with versatile functions in nearly all organs. *Int J Vitam Nutr Res.*83(2):92-100. Epub 2014/02/05.
79. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007;357(3):266-81. Epub 2007/07/20.
80. Cranney A, Horsley T, O'Donnell S, Weiler H, Puil L, Ooi D, et al. Effectiveness and safety of vitamin D in relation to bone health. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep).* 2007(158):1-235. Epub 2007/12/20.
81. Holick MF, Frommer JE, McNeill SC, Richtand NM, Henley JW, Potts JT, Jr. Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to previtamin D3 in skin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1977;76(1):107-14. Epub 1977/05/09.
82. Cooke NE, Haddad JG. Vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Endocr Rev.* 1989;10(3):294-307. Epub 1989/08/01.
83. Zittermann A. Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? *Br J Nutr.* 2003;89(5):552-72. Epub 2003/05/02.
84. Welsh J, Wietzke JA, Zinser GM, Byrne B, Smith K, Narvaez CJ. Vitamin D-3 receptor as a target for breast cancer prevention. *J Nutr.* 2003;133(7 Suppl):2425S-33S. Epub 2003/07/04.

85. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, et al. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res.* 1998;13(3):325-49. Epub 1998/04/03.
86. Dusso AS, Brown AJ. Mechanism of vitamin D action and its regulation. *Am J Kidney Dis.* 1998;32(2 Suppl 2):S13-24. Epub 1998/11/10.
87. Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *The American journal of clinical nutrition.* 2004;79(3):362-71. Epub 2004/02/27.
88. Edfeldt K, Liu PT, Chun R, Fabri M, Schenk M, Wheelwright M, et al. T-cell cytokines differentially control human monocyte antimicrobial responses by regulating vitamin D metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(52):22593-8. Epub 2010/12/15.
89. Clemens TL, Garrett KP, Zhou XY, Pike JW, Haussler MR, Dempster DW. Immunocytochemical localization of the 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor in target cells. *Endocrinology.* 1988;122(4):1224-30. Epub 1988/04/01.
90. Marshall TG. Vitamin D discovery outpaces FDA decision making. *Bioessays.* 2008;30(2):173-82. Epub 2008/01/18.
91. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289(1):F8-28. Epub 2005/06/14.
92. Grober U, Spitz J, Reichrath J, Kisters K, Holick MF. Vitamin D: Update 2013: From rickets prophylaxis to general preventive healthcare. *Dermato-endocrinology.* 2013;5(3):331-47. Epub 2014/02/12.
93. Ramagopalan SV, Heger A, Berlanga AJ, Maugeri NJ, Lincoln MR, Burrell A, et al. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution. *Genome Res.* 20(10):1352-60. Epub 2010/08/26.
94. Tuohimaa P. Vitamin D and aging. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009;114(1-2):78-84. Epub 2009/05/16.
95. Holick MF. The cutaneous photosynthesis of previtamin D<sub>3</sub>: a unique photoendocrine system. *J Invest Dermatol.* 1981;77(1):51-8. Epub 1981/07/01.
96. Bikle DD. Vitamin D insufficiency/deficiency in gastrointestinal disorders. *J Bone Miner Res.* 2007;22 Suppl 2:V50-4. Epub 2008/03/20.
97. Townsend K, Evans KN, Campbell MJ, Colston KW, Adams JS, Hewison M. Biological actions of extra-renal 25-hydroxyvitamin D-1 $\alpha$ -hydroxylase and implications for chemoprevention and treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005;97(1-2):103-9. Epub 2005/08/06.

98. Zehnder D, Bland R, Williams MC, McNinch RW, Howie AJ, Stewart PM, et al. Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 alpha-hydroxylase. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86(2):888-94. Epub 2001/02/07.
99. Cross HS, Bareis P, Hofer H, Bischof MG, Bajna E, Kriwanek S, et al. 25-Hydroxyvitamin D(3)-1alpha-hydroxylase and vitamin D receptor gene expression in human colonic mucosa is elevated during early cancerogenesis. *Steroids*. 2001;66(3-5):287-92. Epub 2001/02/17.
100. Portale AA, Miller WL. Human 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase: cloning, mutations, and gene expression. *Pediatr Nephrol*. 2000;14(7):620-5. Epub 2000/07/27.
101. Shinki T, Shimada H, Wakino S, Anazawa H, Hayashi M, Saruta T, et al. Cloning and expression of rat 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(24):12920-5. Epub 1997/12/16.
102. Takeyama K, Kitanaka S, Sato T, Kobori M, Yanagisawa J, Kato S. 25-Hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase and vitamin D synthesis. *Science*. 1997;277(5333):1827-30. Epub 1997/09/20.
103. Dardenne O, Prud'homme J, Arabian A, Glorieux FH, St-Arnaud R. Targeted inactivation of the 25-hydroxyvitamin D(3)-1(alpha)-hydroxylase gene (CYP27B1) creates an animal model of pseudovitamin D-deficiency rickets. *Endocrinology*. 2001;142(7):3135-41. Epub 2001/06/21.
104. Rowling MJ, Gliniak C, Welsh J, Fleet JC. High dietary vitamin D prevents hypocalcemia and osteomalacia in CYP27B1 knockout mice. *J Nutr*. 2007;137(12):2608-15. Epub 2007/11/22.
105. Knutson JC, DeLuca HF. 25-Hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase. Subcellular location and properties. *Biochemistry*. 1974;13(7):1543-8. Epub 1974/03/26.
106. Armbrrecht HJ, Hodam TL, Boltz MA. Hormonal regulation of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase and 24-hydroxylase gene transcription in opossum kidney cells. *Arch Biochem Biophys*. 2003;409(2):298-304. Epub 2002/12/31.
107. Jones G, Prosser DE, Kaufmann M. 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): its important role in the degradation of vitamin D. *Arch Biochem Biophys*. 523(1):9-18. Epub 2011/11/22.
108. Deluca HF, Cantorna MT. Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J*. 2001;15(14):2579-85. Epub 2001/12/01.
109. Agmon-Levin N, Mosca M, Petri M, Shoenfeld Y. Systemic lupus erythematosus one disease or many? *Autoimmun Rev*. 11(8):593-5. Epub 2011/11/02.
110. Lee S, Clark SA, Gill RK, Christakos S. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and pancreatic beta-cell function: vitamin D receptors, gene expression, and insulin secretion. *Endocrinology*. 1994;134(4):1602-10. Epub 1994/04/01.

111. Driver JP, Foreman O, Mathieu C, van Etten E, Serreze DV. Comparative therapeutic effects of orally administered 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and 1alpha-hydroxyvitamin D(3) on type-1 diabetes in non-obese diabetic mice fed a normal-calcaemic diet. *Clin Exp Immunol.* 2008;151(1):76-85. Epub 2007/11/07.
112. Takiishi T, Gysemans C, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.*39(2):419-46, table of contents. Epub 2010/06/01.
113. Hypponen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet.* 2001;358(9292):1500-3. Epub 2001/11/14.
114. Chiu KC, Chu A, Go VL, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *The American journal of clinical nutrition.* 2004;79(5):820-5. Epub 2004/04/29.
115. Talaei A, Mohamadi M, Adgi Z. The effect of vitamin D on insulin resistance in patients with type 2 diabetes. *Diabetol Metab Syndr.*5(1):8. Epub 2013/02/28.
116. Potter JJ, Liu X, Koteish A, Mezey E. 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its nuclear receptor repress human alpha1 (I) collagen expression and type I collagen formation. *Liver Int.*33(5):677-86. Epub 2013/02/19.
117. Beilfuss A, Sowa JP, Sydor S, Beste M, Bechmann LP, Schlattjan M, et al. Vitamin D counteracts fibrogenic TGF-beta signalling in human hepatic stellate cells both receptor-dependently and independently. *Gut.* 2015;64(5):791-9. Epub 2014/08/20.
118. Kwok RM, Torres DM, Harrison SA. Vitamin D and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): is it more than just an association? *Hepatology.*58(3):1166-74. Epub 2013/03/19.
119. Zhang A, Wang Y, Xie H, Zheng S. Calcitriol inhibits hepatocyte apoptosis in rat allograft by regulating apoptosis-associated genes. *Int Immunopharmacol.* 2007;7(8):1122-8. Epub 2007/06/16.
120. Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *The American journal of clinical nutrition.* 2008;88(2):491S-9S. Epub 2008/08/12.
121. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.*96(7):1911-30. Epub 2011/06/08.
122. Harris SS, Soteriades E, Coolidge JA, Mudgal S, Dawson-Hughes B. Vitamin D insufficiency and hyperparathyroidism in a low income, multiracial, elderly population. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2000;85(11):4125-30. Epub 2000/11/30.

123. Allain TJ, Dhesi J. Hypovitaminosis D in older adults. *Gerontology*. 2003;49(5):273-8. Epub 2003/08/16.
124. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001;50(6):537-46. Epub 2002/02/07.
125. Hayashi K, Kojima R, Ito M. Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice. *Biol Pharm Bull*. 2006;29(6):1110-9. Epub 2006/06/07.
126. Brosky G, Logothetopoulos J. Streptozotocin diabetes in the mouse and guinea pig. *Diabetes*. 1969;18(9):606-11. Epub 1969/09/01.
127. Higdon HL, 3rd, Parnell PG, Hill JE, Spitzer JC. Streptozocin-induced pancreatic islet destruction in beef cows. *Vet Pathol*. 2001;38(6):715-20. Epub 2001/12/06.
128. Wong FS. How does B-cell tolerance contribute to the protective effects of diabetes following induced mixed chimerism in autoimmune diabetes? *Diabetes*. 63(6):1855-7. Epub 2014/05/24.
129. Federiuk IF, Casey HM, Quinn MJ, Wood MD, Ward WK. Induction of type-1 diabetes mellitus in laboratory rats by use of alloxan: route of administration, pitfalls, and insulin treatment. *Comp Med*. 2004;54(3):252-7. Epub 2004/07/16.
130. Akbarzadeh A, Norouzian D, Mehrabi MR, Jamshidi S, Farhangi A, Verdi AA, et al. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. *Indian J Clin Biochem*. 2007;22(2):60-4. Epub 2007/09/01.
131. Masiello P. Animal models of type 2 diabetes with reduced pancreatic beta-cell mass. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(5-6):873-93. Epub 2005/10/29.
132. Oldstone MB, Nerenberg M, Southern P, Price J, Lewicki H. Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response. *Cell*. 1991;65(2):319-31. Epub 1991/04/19.
133. Ferhatovic L, Jelicic Kadic A, Boric M, Puljak L. Changes of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II expression in dorsal root ganglia during maturation in long-term diabetes. *Histol Histopathol*. 29(5):649-58. Epub 2013/11/23.
134. Ferhatovic L, Banozic A, Kostic S, Kurir TT, Novak A, Vrdoljak L, et al. Expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and pain-related behavior in rat models of type 1 and type 2 diabetes. *Anesth Analg*. 116(3):712-21. Epub 2013/02/13.
135. Novak A. "Izražaj gangliozida GM3 i njegovih sfingolipidnih preteča u mišiću i bubregu na štakorskim modelina šećerne bolesti tip 1 i 2" 2013.
136. Borić M. "Izražaj kalcij<sup>2+</sup>/kalmodulin-ovisne protein kinaze II (CaMKII) u putu prijenosa boli od periferije do središnjeg živčanog sustava u modelu šećerne bolesti". . 2015.

137. Buniatian G, Hamprecht B, Gebhardt R. Glial fibrillary acidic protein as a marker of perisinusoidal stellate cells that can distinguish between the normal and myofibroblast-like phenotypes. *Biol Cell*. 1996;87(1-2):65-73. Epub 1996/01/01.
138. Tennakoon AH, Izawa T, Wijesundera KK, Golbar HM, Tanaka M, Ichikawa C, et al. Characterization of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-expressing hepatic stellate cells and myofibroblasts in thioacetamide (TAA)-induced rat liver injury. *Exp Toxicol Pathol*.65(7-8):1159-71. Epub 2013/06/29.
139. Taniguchi E, Sakisaka S, Matsuo K, Tanikawa K, Sata M. Expression and role of vascular endothelial growth factor in liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Histochem Cytochem*. 2001;49(1):121-30. Epub 2000/12/19.
140. Pinkus GS, Pinkus JL. Myeloperoxidase: a specific marker for myeloid cells in paraffin sections. *Mod Pathol*. 1991;4(6):733-41. Epub 1991/11/01.
141. Odobasic D, Kitching AR, Semple TJ, Holdsworth SR. Endogenous myeloperoxidase promotes neutrophil-mediated renal injury, but attenuates T cell immunity inducing crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(3):760-70. Epub 2007/02/03.
142. Odobasic D, Yang Y, Muljadi RC, O'Sullivan KM, Kao W, Smith M, et al. Endogenous myeloperoxidase is a mediator of joint inflammation and damage in experimental arthritis. *Arthritis Rheumatol*.66(4):907-17. Epub 2014/04/24.
143. Dowd DR, MacDonald PN. The 1,25-dihydroxyvitamin D3-independent actions of the vitamin D receptor in skin. *J Steroid Biochem Mol Biol*.121(1-2):317-21. Epub 2010/04/07.
144. Friedrich M, Rafi L, Mitschele T, Tilgen W, Schmidt W, Reichrath J. Analysis of the vitamin D system in cervical carcinomas, breast cancer and ovarian cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2003;164:239-46. Epub 2003/08/06.
145. Chen TC, Wang L, Whitlatch LW, Flanagan JN, Holick MF. Prostatic 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase and its implication in prostate cancer. *Journal of cellular biochemistry*. 2003;88(2):315-22. Epub 2003/01/10.
146. Fritsche J, Mondal K, Ehrnsperger A, Andreesen R, Kreutz M. Regulation of 25-hydroxyvitamin D3-1 alpha-hydroxylase and production of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 by human dendritic cells. *Blood*. 2003;102(9):3314-6. Epub 2003/07/12.
147. Liu HH, Li JJ. Aging and dyslipidemia: a review of potential mechanisms. *Ageing Res Rev*.19:43-52. Epub 2014/12/17.
148. Poulouse N, Raju R. Aging and injury: alterations in cellular energetics and organ function. *Ageing Dis*.5(2):101-8. Epub 2014/04/15.

149. van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005;97(1-2):93-101. Epub 2005/07/28.
150. Kreutz M, Andreesen R, Krause SW, Szabo A, Ritz E, Reichel H. 1,25-dihydroxyvitamin D3 production and vitamin D3 receptor expression are developmentally regulated during differentiation of human monocytes into macrophages. *Blood.* 1993;82(4):1300-7. Epub 1993/08/15.
151. Kreutz M, Andreesen R. Induction of human monocyte to macrophage maturation in vitro by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Blood.* 1990;76(12):2457-61. Epub 1990/12/15.
152. Choudhuri U, Adams JA, Byrom N, McCarthy DM, Barrett J. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces normal mononuclear blood cells to differentiate in the direction of monocyte-macrophages. *Haematologia (Budap).* 1990;23(1):9-19. Epub 1990/01/01.
153. Hernandez-Gea V, Ghiassi-Nejad Z, Rozenfeld R, Gordon R, Fiel MI, Yue Z, et al. Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. *Gastroenterology.* 142(4):938-46. Epub 2012/01/14.
154. Zoppini G, Fedeli U, Gennaro N, Saugo M, Targher G, Bonora E. Mortality from chronic liver diseases in diabetes. *Am J Gastroenterol.* 109(7):1020-5. Epub 2014/06/04.
155. Han S, Chiang JY. Mechanism of vitamin D receptor inhibition of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene transcription in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(3):469-78. Epub 2008/12/25.
156. Michigami T, Suga A, Yamazaki M, Shimizu C, Cai G, Okada S, et al. Identification of amino acid sequence in the hinge region of human vitamin D receptor that transfers a cytosolic protein to the nucleus. *J Biol Chem.* 1999;274(47):33531-8. Epub 1999/11/24.
157. Gocek E, Kielbinski M, Marcinkowska E. Activation of intracellular signaling pathways is necessary for an increase in VDR expression and its nuclear translocation. *FEBS Lett.* 2007;581(9):1751-7. Epub 2007/04/10.
158. Alkharfy KM, Al-Daghri NM, Yakout SM, Hussain T, Mohammed AK, Krishnaswamy S. Influence of vitamin D treatment on transcriptional regulation of insulin-sensitive genes. *Metab Syndr Relat Disord.* 11(4):283-8. Epub 2013/04/30.
159. Masek T, Filipovic N, Hamzic LF, Puljak L, Starcevic K. Long-term streptozotocin diabetes impairs arachidonic and docosahexaenoic acid metabolism and 5 desaturation indices in aged rats. *Exp Gerontol.* 60:140-6. Epub 2014/12/03.
160. Greenberg AS, Coleman RA, Kraemer FB, McManaman JL, Obin MS, Puri V, et al. The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. *J Clin Invest.* 121(6):2102-10. Epub 2011/06/03.



161. Davis CD. Vitamin D and cancer: current dilemmas and future research needs. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;88(2):565S-9S. Epub 2008/08/12.
162. Ding C, Gao D, Wilding J, Trayhurn P, Bing C. Vitamin D signalling in adipose tissue. *Br J Nutr*.108(11):1915-23. Epub 2012/10/11.
163. Wood RJ. Vitamin D and adipogenesis: new molecular insights. *Nutr Rev*. 2008;66(1):40-6. Epub 2008/02/08.
164. Sakuma T, Miyamoto T, Jiang W, Kakizawa T, Nishio SI, Suzuki S, et al. Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling by vitamin D receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;312(2):513-9. Epub 2003/11/26.
165. Chow EC, Magomedova L, Quach HP, Patel R, Durk MR, Fan J, et al. Vitamin D receptor activation down-regulates the small heterodimer partner and increases CYP7A1 to lower cholesterol. *Gastroenterology*.146(4):1048-59. Epub 2013/12/25.
166. Berlanga A, Guiu-Jurado E, Porras JA, Auguet T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol*.7:221-39. Epub 2014/07/22.
167. Kong M, Zhu L, Bai L, Zhang X, Chen Y, Liu S, et al. Vitamin D deficiency promotes nonalcoholic steatohepatitis through impaired enterohepatic circulation in animal model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.307(9):G883-93. Epub 2014/09/13.
168. Blutt SE, Weigel NL. Vitamin D and prostate cancer. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999;221(2):89-98. Epub 1999/06/03.
169. Guzey M, Kitada S, Reed JC. Apoptosis induction by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in prostate cancer. *Mol Cancer Ther*. 2002;1(9):667-77. Epub 2002/12/14.
170. Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol*. 2006;92(1):4-8. Epub 2006/03/28.
171. Bao BY, Ting HJ, Hsu JW, Lee YF. Protective role of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 against oxidative stress in nonmalignant human prostate epithelial cells. *Int J Cancer*. 2008;122(12):2699-706. Epub 2008/03/19.
172. Halicka HD, Zhao H, Li J, Traganos F, Studzinski GP, Darzynkiewicz Z. Attenuation of constitutive DNA damage signaling by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Aging (Albany NY)*.4(4):270-8. Epub 2012/04/14.
173. Pascussi JM, Robert A, Nguyen M, Walrant-Debray O, Garabedian M, Martin P, et al. Possible involvement of pregnane X receptor-enhanced CYP24 expression in drug-induced osteomalacia. *J Clin Invest*. 2005;115(1):177-86. Epub 2005/01/05.
174. Zhou C, Assem M, Tay JC, Watkins PB, Blumberg B, Schuetz EG, et al. Steroid and xenobiotic receptor and vitamin D receptor crosstalk mediates CYP24 expression and drug-induced osteomalacia. *J Clin Invest*. 2006;116(6):1703-12. Epub 2006/05/13.

175. Tague SE, Smith PG. Vitamin D receptor and enzyme expression in dorsal root ganglia of adult female rats: modulation by ovarian hormones. *J Chem Neuroanat.*41(1):1-12. Epub 2010/10/26.
176. Danescu LG, Levy S, Levy J. Vitamin D and diabetes mellitus. *Endocrine.* 2009;35(1):11-7. Epub 2008/11/04.
177. Kawai Y, Smedsrod B, Elvevold K, Wake K. Uptake of lithium carmine by sinusoidal endothelial and Kupffer cells of the rat liver: new insights into the classical vital staining and the reticulo-endothelial system. *Cell Tissue Res.* 1998;292(2):395-410. Epub 1998/06/02.
178. Sutton AL, MacDonald PN. Vitamin D: more than a "bone-a-fide" hormone. *Mol Endocrinol.* 2003;17(5):777-91. Epub 2003/03/15.
179. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci.* 2002;7:d793-807. Epub 2002/03/19.
180. Weng HL, Ciucan L, Liu Y, Hamzavi J, Godoy P, Gaitantzi H, et al. Profibrogenic transforming growth factor-beta/activin receptor-like kinase 5 signaling via connective tissue growth factor expression in hepatocytes. *Hepatology.* 2007;46(4):1257-70. Epub 2007/07/28.
181. Weng HL, Liu Y, Chen JL, Huang T, Xu LJ, Godoy P, et al. The etiology of liver damage imparts cytokines transforming growth factor beta1 or interleukin-13 as driving forces in fibrogenesis. *Hepatology.* 2009;50(1):230-43. Epub 2009/05/15.
182. Schon HT, Weiskirchen R. Immunomodulatory effects of transforming growth factor-beta in the liver. *Hepatobiliary Surg Nutr.*3(6):386-406. Epub 2015/01/09.
183. Helvig CF, Cuerrier D, Hosfield CM, Ireland B, Kharebov AZ, Kim JW, et al. Dysregulation of renal vitamin D metabolism in the uremic rat. *Kidney Int.*78(5):463-72. Epub 2010/06/10.
184. Zehnder D, Quinkler M, Eardley KS, Bland R, Lепенies J, Hughes SV, et al. Reduction of the vitamin D hormonal system in kidney disease is associated with increased renal inflammation. *Kidney Int.* 2008;74(10):1343-53. Epub 2008/09/12.

## 11. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODATCI

**Ime i prezime:** Ana Vuica  
**Adresa:** Ruđera Boškovića 6, Split  
**Mjesto rođenja:** Split, Hrvatska  
**Datum rođenja:** 12. lipnja 1984.  
**Državljanstvo:** hrvatsko  
**Narodnost:** Hrvatica  
**Mobitel/Telefon:** 091 54 53 126; 021 31 22 60  
**Elektronička pošta:** ana.vuica@mefst.hr;  
ana.vuica@gmail.com

### OBRAZOVANJE:

1991. - 1999. Osnovna škola: " Split 3 " u Splitu  
1999. - 2003. IV. gimnazija: " Marko Marulić " u Splitu  
2003. - 2009. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu  
2013. - 2016. Poslijediplomski studij: " Translacijska istraživanja u biomedicini (TRIBE) ",  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

### RADNO ISKUSTVO:

2010. - 2011. - pripravnički staž u Kliničkom bolničkom centru Split  
2011. - 2013. - rad u primarnoj zdravstvenoj zaštiti (ordinacije obiteljske medicine)  
2013. - 2015. - asistentica na Katedri za anatomiju Medicinskog fakulteta u Splitu  
2015. - - specijalizantica nuklearne medicine u Kliničkom bolničkom centru Split

**JEZICI:**

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

**ZNANSTVENI INTERESI:**

- izražaj receptora za vitamina D i ključnih enzima u metabolizmu vitamina D u tkivu jetre
- vitamin D ovisni signalni put
- izražaj receptora za vitamin D u različitim tkivima
- povezanost između izražaja receptora za vitamin D sa starenjem i dijabetesom

**TEHNIČKE VJEŠTINE:**

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

**POZNAVANJE RAČUNALNIH PROGRAMA:**

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

**ČLANSTVO U PROFESIONALNIM ORGANIZACIJAMA:**

2011. - Hrvatska liječnička komora

2015. - Hrvatski liječnički zbor

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

1. **Vuica A**, Vukojević K, Ferhatović Hamzić L, Jerić M, Puljak L, Grković I, Filipović N. Expression pattern of CYP24 in liver during ageing in long-term diabetes. *Acta Histochem.* 2016 May 9. pii: S0065-1281(16)30069-1. doi: 10.1016/j.acthis.2016.05.001.
2. **Vuica A**, Ferhatović Hamzić L, Vukojević K, Jerić M, Puljak L, Grković I, Filipović N. Ageing and a long-term diabetes mellitus increase expression of 1  $\alpha$ -hydroxylase and vitamin D receptors in the rat liver. *Exp Gerontol.* 2015; Dec;72:167-76.
3. Jerić M, **Vuica A**, Borić M, Puljak L, Jeličić Kadić A, Grković I, Filipović N. Diabetes mellitus affects activity of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha in rat trigeminal ganglia. *J Chem Neuroanat.* 2015; 17;64-65C:12-19.
4. Filipović N, Vrdoljak M, **Vuica A**, Jerić M, Jeličić Kadić A, Utrobičić T, Mašek T, Grković I. Expression of PTHrP and PTH/PTHrP receptor 1 in the superior cervical ganglia of rats. *Neuropeptides.* 2014;48(6):353-9.
5. Đevenica D, Čikeš Čulić V, **Vuica A**, Markotić A. Biochemical, pathological and oncological relevance of Gb3Cer receptor. *Med Oncol.* 2011;28:S675-84.

### **Sažetci i prezentacije na znanstvenim skupovima:**

1. **Vuica A**, Ferhatović Hamzić L, Vukojević K, Jerić M, Puljak L, Grković I, Filipović N. Expression of 1  $\alpha$ -hydroxylase and vitamin D receptors in the rat liver during ageing and long-term diabetes mellitus. Poster presentation. Book of Abstracts, MCM 2015, Eger, Hungary. Eger, 2015. 375-376.
2. Jerić M, **Vuica A**, Borić M, Puljak L, Jeličić Kadić A, Grković I, Filipović N. Changes of VEGF and NPY expression in rat trigeminal ganglion induced by diabetes. Oral presentation. Bridges in Life Sciences 10<sup>th</sup> Annual Scientific Conference, abstract book / Vari, Sandor G. (ur.). Wrocław : Recoop HST Association, 2015. 42-42.

3. Filipović N, Vrdoljak M, **Vuica A**, Jerić M, Jeličić Kadić A, Utrobičić T, Mašek T, Grković I. Expression of pthrp and PTHR/pthrp receptor 1 in the superior cervical ganglia of rats. Poster presentation. The 6<sup>th</sup> international symposium of clinical and applied anatomy, June 26.-29. 2014, Malinska, Krk island, Rijeka, Croatia
4. Grković I, Jeličić Kadić A, Jerić M, **Vuica A**, Filipović N. Different components of the final grade in anatomy: how do they compare with subjective pre-exam evaluation of student performance. Oral presentation. The 6<sup>th</sup> international symposium of clinical and applied anatomy, June 26.-29. 2014, Malinska, Krk island, Rijeka, Croatia

#### **Sudjelovanje na kongresima i simpozijima:**

1. The 2<sup>nd</sup> European Allergology and Respiratory Obstructive Lung Diseases Conference on Clinical Practices, June 1-3, 2012., Dubrovnik, Croatia
2. Poslijediplomski tečaj TMI I. kategorije "Dijabetes, poremećaji metabolizma i metabolički učinci vina". 11.-12. travnja, 2014., Medicinski fakultet u Splitu, Split, Hrvatska
3. RECOOP " Protect and Publish " Workshop, May 28-29, 2014., Split, Croatia
4. Bridges in Life Science 9<sup>th</sup> Annual Scientific Conference, May 29 - June 1, 2014., Split, Croatia
5. The 6<sup>th</sup> Croatian Cochrane symposium, University of Split, School of Medicine, June 6, 2014., Split, Croatia
6. The 6<sup>th</sup> International symposium of clinical and applied anatomy, June 26-29, 2014., Malinska, Krk island, Rijeka, Croatia
7. Poslijediplomski tečaj TMI II. kategorije "Nove spoznaje o dijabetesu", 20. ožujka 2015., Medicinsku fakultet u Splitu, Split, Hrvatska
8. Poslijediplomski tečaj TMI I. kategorije "Odabrana poglavlja iz Kliničke farmakologije", 24.- 25. travnja 2015., Medicinski fakultet u Splitu, Split, Hrvatska
9. The 7<sup>th</sup> Croatian Cochrane symposium, University of Split, School of Medicine, May 11, 2015., Split, Croatia

10. Summer School of Scientific Communication: Publishing Research for Multidisciplinary Audiences, University of Split, School of Medicine, June 30 - July 3 2015., Split, Croatia

11. The 3<sup>rd</sup> Croatian Sleep Symposium. Satellite symposium. University of Split, School of Medicine, September 17, 2015., Split, Croatia

**OSTALE AKTIVNOSTI:**

1. Sudjelovanje u manifestaciji „Europska noć istraživača“, 27. rujna 2013.

2. Sudjelovanje u manifestaciji „Europska noć istraživača“, 26. rujna 2014.

3. Sudjelovanje u manifestaciji „Festival znanosti“, 20. - 25. travnja 2015.