

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij

Molekularne bioznanosti

Marina Horvatiček

**Utjecaj suplementacije n-3 polinezasićenim
masnim kiselinama na koncentraciju C-peptida
kod trudnica koje boluju od dijabetesa tipa 1**

Doktorska disertacija



Osijek, 2017.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij

Molekularne bioznanosti

Marina Horvatiček

**Utjecaj suplementacije n-3 polinezasićenim
masnim kiselinama na koncentraciju C-peptida
kod trudnica koje boluju od dijabetesa tipa 1**

Doktorska disertacija

Osijek, 2017.

Disertacija je izrađena na Katedri za ginekologiju i opstetriciju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Klinika za ženske bolesti i porođaje Kliničkog bolničkog centra Zagreb, u sklopu projekta „*Dijabetes i metabolički sindrom nakon prethodnoga gestacijskog dijabetesa*“, Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske, vođenog pod brojem 108-10870401-0385.

Voditeljica disertacije je prof. dr. sc. Marina Ivanišević iz Klinike za ženske bolesti i porođaje KBC-a Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Disertacija je drugim dijelom pod stručnim nadzorom prof. dr. sc. Ivančice Delaš izrađena u Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković, Zagreb
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni
studij Molekularne bioznanosti

Doktorska disertacija

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti
Znanstvena polja: Biologija i Temeljne medicinske znanosti

Utjecaj suplementacije n-3 polinezasićenim masnim kiselinama na koncentraciju C-peptida kod trudnica koje boluju od dijabetesa tipa 1

Marina Horvatiček, prof. biol.

Disertacija je izrađena u: Katedri za ginekologiju i opstetriciju Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, Klinika za ženske bolesti i porođaje KBC-a Zagreb, Odjel za dijabetes u trudnoći i fetalni rast; i Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Mentor/i: prof. dr. sc. Marina Ivanišević

Kratki sažetak doktorske disertacije:

Dijabetes tipa 1 je autoimuna bolest u kojoj se postepeno gubi funkcija beta-stanica gušterače i izlučivanje inzulina. Tijekom trudnoće dolazi do djelomičnog smanjenja aktivnosti upalnog imunološkog sustava te dolazi do supresije autoimunih bolesti. Te se promjene kod dijabetičnih trudnoća odražavaju na povećanje rasta Langerhansovih otočića gušterače i na njihovu poboljšanu funkciju u usporedbi sa stanjem prije trudnoće. Najprikladnija mjera izlučivanja endogenog inzulina i funkcije beta-stanica je koncentracija C-peptida. Prehrana, osobito n-3 višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA) djeluju zaštitno i mogu utjecati na očuvanje beta-stanica. Cilj ovog istraživanja bio je pokazati povoljan utjecaj suplementacije n-3 PUFA na izlučivanje C-peptida kod trudnica koje boluju od dijabetesa tipa 1. Dobiveni rezultati pokazuju da je povećan unos n-3 PUFA povoljno utjecao na aktivnost beta-stanica te je došlo do značajnog porasta C-peptida kod trudnica u istraživanoj skupini. Masena koncentracija dokozahexaenske kiseline (DHA) značajno je povećana u istraživanoj skupini što se također odrazilo i na značajno smanjenje omjera AA/DHA te n-6/n-3 PUFA.

Broj stranica: 100

Broj slika: 12

Broj tablica: 42

Broj literaturnih navoda: 111

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: dijabetes tipa 1, C-peptid, n-3 PUFA, trudnoća

Datum obrane: 22. rujna 2017.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. **Prof. emeritus dr. sc. Josip Đelmiš**, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, predsjednik Povjerenstva
2. **Prof. dr. sc. Ivančica Delaš**, redovita profesorica Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, član
3. **Prof. dr. sc. Vera Cesar**, redovita profesorica Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, član
4. **dr. sc. Jasminka Štefulj**, viša znanstvena suradnica, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, zamjena

Disertacija je pohranjena u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute, Zagreb
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of Molecular
biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Interdisciplinary Area of Science

Scientific Fields: Biology and Basic Medical Sciences

The impact of supplementation n-3 unsaturated fatty acids on concentration of C-peptide in pregnant women with type 1 diabetes mellitus

Marina Horvatiček, mag. educ. biol.

Thesis performed at: University of Zagreb, School of Medicine, Department of Gynecology and Obstetrics and Department of Medical Chemistry and Biochemistry; Clinical Hospital Centre Zagreb, Department for Diabetes in pregnancy

Supervisor/s: Marina Ivanišević, Ph. D., Full Professor

Short abstract:

Type 1 diabetes mellitus (T1D) is an autoimmune disease in which the function of pancreatic beta-cells and secretion of insulin are gradually lost. During pregnancy there is a partial suppression of the inflammatory immune system and autoimmune diseases often go into remission. These changes in diabetic pregnancies are reflected as increase in the growth of islets of Langerhans and their improved function compared to the pre-pregnancy stage. The most appropriate measure of endogenous insulin secretion and consequently beta-cells' function is the concentration of C-peptide. Nutrition, particularly n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), has a protective effect on the preservation of beta-cells. The aim of the study was to demonstrate the beneficial effect of n-3 PUFAs on the C-peptide secretion in T1D pregnant women. The results show that increased n-3 PUFA intake has had a beneficial effect on beta-cells' function and that there has been a significant increase of C-peptide concentration in the study group. The mass concentration of docosahexaenoic acid (DHA) was significantly increased in the study group, which also resulted with a significant reduction in the ratio of AA/DHA and n-6/n-3 PUFA.

Number of pages: 100

Number of figures: 12

Number of tables: 42

Number of references: 111

Original in: croatian

Key words: diabetes type 1, C-peptid, n-3 PUFA, pregnancy

Date of the thesis defense: 22nd September 2017

Reviewers:

1. **Josip Đelmiš**, Ph. D., Professor emeritus, University of Zagreb, School of Medicine, commission president

2. **Ivančica Delaš**, Ph. D., Full Professor, University of Zagreb, School of Medicine, member

3. **Vera Cesar**, Ph. D., Full Professor, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, member

4. **Jasminka Štefulj**, Ph. D., Senior scientific associate, Rudjer Boskovic Institute, substitute

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Dragoj mentorici prof. dr. sc. Marini Ivanišević iskreno se zahvaljujem na brižnom mentorstvu, podršci, savjetima i velikoj pomoći oko provedbe istraživanja.

Posebno se zahvaljujem cijenjenom i dragom prof. dr. sc. Josipu Đelmišu na odabiru teme, podršci, nesebičnoj pomoći i stručnim savjetima prilikom izrade ove disertacije.

Svojim profesorima Marini Ivanišević i Josipu Đelmišu također se zahvaljujem na njihovom znanstvenom entuzijazmu iz kojih su proizašli mnogi znanstveni radovi i projekti koje smo uspješno napravili.

Neizmerno sam zahvalna osoblju, i sestrama i liječnicima, *Odjela za dijabetes i fetalni rast*, koji su mi nesebično pomagali prilikom dugotrajnog skupljanja uzoraka, kao i dragim prijateljima, kolegama i drugim djelatnicima Klinike za ženske bolesti i porođaje koji su mi bilo kako pomogli.

Zahvaljujem se svim djelatnicima Zavoda za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, posebno prof. dr. sc. Ivančici Delaš, za stručne savjete, poticaje, srdačnost te nesebičan trud i pomoć pri obradi uzoraka ukupnih lipida.

Tvrtka Kormedix d.o.o. osigurala je donaciju *Pregnazon Complete* kapsula za provedbu ovog istraživanja, te im se ovim putem ljubazno zahvaljujem.

Tvrtka za pružanje laboratorijskih usluga Sample Control d.o.o. osigurala je provedbu analize uzoraka plinskom kromatografijom, te im se ovim putem ljubazno zahvaljujem.

Zahvaljujem se i svom programeru na strpljenju i podršci, kao i na izradi programa za analizu ukupnih lipida, „*Chubby*“.

Neizmerno sam zahvalna svojim roditeljima čija me je bezuvjetna ljubav i podrška motivirala tijekom izrade ovog rada.

Rad posvećujem svojim roditeljima za strpljenje, poticaje i odricanja tijekom školovanja.

Marina Horvatiček

1. UVOD	1
1. 1. Autoimunost u dijabetesu tipa 1	1
1. 2. Imunoterapijski pristupi u liječenju dijabetesa	3
1. 3. Inzulin i C-peptid	4
1. 4. C-peptid kao pokazatelj funkcije beta-stanica	6
1. 5. Dijabetes tip 1 i trudnoća	9
1. 6. Supresija imunskog sustava u trudnica	10
1. 7. Aktivnost beta-stanica gušterače i trudnoća	12
1. 8. Utjecaj prehrane na bolesnike/ce s dijabetesom tipa 1	14
1. 9. Masne kiseline	16
1. 10. Metabolizam esencijalnih masnih kiselina	18
1. 11. Metabolizam eikozanoida	20
1. 12. Upalni procesi i n-3 višestruko nezasićene masne kiseline	22
1. 13. Višestruko nezasićene masne kiseline i trudnoća	23
1. 14. Prijenos masnih kiselina kroz posteljicu	25
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	27
2. 1. Hipoteza	27
2. 2. Ciljevi istraživanja	27
2. 3. Znanstveni doprinos	27
3. SUDIONICE I METODE ISTRAŽIVANJA	28
3. 1. Sudionice	28
3. 2. Kemikalije	29
3. 3. Metode	30
3. 3. 1. Uzorkovanje krvi	30
3. 3. 2. Određivanje koncentracije C-peptida	30
3. 3. 3. Određivanje koncentracije glukoze	31
3. 3. 4. Određivanje glikiranog hemoglobina	31
3. 3. 5. Ekstrakcija ukupnih lipida seruma	31
3. 3. 6. Priprema metilnih estera masnih kiselina	32
3. 3. 7. Plinska kromatografija (GC-FID)	33
3. 3. 8. Statistička analiza	34
4. REZULTATI	35
4. 1. Podaci o sudionicama	35
4. 2. Koncentracija glukoze u krvi (GUK) natašte	36
4. 3. Postotak glikiranog hemoglobina (HbA _{1c})	38

4. 4. Koncentracija C-peptida u krvi natašte	39
4. 5. Doze inzulina	42
4. 6. Koncentracija glukoze i C-peptida u krvi pupčane vene	43
4. 7. Sastav masnih kiselina ukupnih lipida seruma	44
4. 7. 1. Masena koncentracija pojedinih masnih kiselina u serumu trudnica	45
4. 7. 2. Masena koncentracija pojedinih masnih kiselina u serumu pupčane vene	56
4. 7. 3. Maseni udio pojedinih masnih kiselina u serumu sudionica	58
4. 7. 4. Maseni udio pojedinih masnih kiselina u serumu pupčane vene	64
5. RASPRAVA	65
6. ZAKLJUČCI	81
7. POPIS LITERATURE	82
8. SAŽETAK	92
9. SUMMARY	94
10. ŽIVOTOPIS	96

POPIS KRATICA

AA	arahidonska kiselina, C20:4n-6
ALA	α -linolenska kiselina, C18:3n-3
BB	soj laboratorijskih životinja, štakora, engl. <i>bio breeding</i>
BHT	2,6-di-tetra-butil-4-metilfenol (butil-hidroksi-toluen)
CD-36	klaster diferencijacije-36
CD4 ⁺	pomoćnički T-limfociti (T-stanice)
CD8 ⁺	citotoksični T-limfociti (T-stanice)
COX-2	ciklooksigenaza 2
DGLA	dihomo- γ -linolenska kiselina, C20:3n-6
DHA	dokozaheksaenska kiselina, C22:6n-3
DM-1	šećerna bolest tipa 1, <i>diabetes mellitus</i>
EFA	esencijalne masne kiseline, engl. <i>essential fatty acids</i>
EPA	eikozapentaenska kiselina, C20:5n-3
ER	endoplazmatski retikulum
ETA	eikozatetraenska kiselina, C20:4n-3
FA	masa kiselina, engl. <i>fatty acid</i>
FABP	citoplazmatski protein koji veže masne kiseline, engl. <i>fatty acid binding protein</i>
FABPpm	membranski protein koji veže masne kiseline, engl. <i>plasma membrane fatty acid binding protein</i>
FAME	metilni ester masnih kiselina, engl. <i>fatty acid methyl ester</i>
FAT	translokaza masnih kiselina, engl. <i>fatty acid translocase</i>
FATP	prijenosni protein masnih kiselina, engl. <i>fatty acid transporter protein</i>
FFA	slobodne masne kiseline, engl. <i>free fatty acid</i>
FID	plameno-ionizacijski detektor, engl. <i>flame ionisation detector</i>
GA	Golgijev aparat
GC	plinska kromatografija
GLA	γ -linolenska kiselina, C18:3n-6
GLUT	prijenosnik glukoze, engl. <i>glucose transporter</i>
GUK	glukoza u krvi
HbA _{1c}	glikirani hemoglobin A _{1c}
hCG	humani korionski gonadotropin
HLA	humani leukocitni antigeni
HLA-DR	humani leukocitni antigeni razreda II, engl. <i>human leukocyte antigen - antigen D related</i>
hPL	humani placentni laktogen
hPRL	humani prolaktin
IAA	autoprotutijela inzulina, engl. <i>insulin autoantibodies</i>
ICA	antitijela stanica otočića, engl. <i>islet cell antibodies</i>
IGF-I	inzulinu sličan čimbenik rasta, engl. <i>insulin-like growth factor I</i>
IL	interleukini
INF	interferon
ITM	indeks tjelesne mase
IUGR	zastoj u rastu fetusa, engl. <i>intrauterine growth restriction</i>

LA	linolna kiselina , C18:2n-6
LPL	lipoproteinska lipaza
LT	leukotrieni
LX	lipoksini
MHC	glavni kompleks tkivne podudarnosti, engl. <i>major histocompatibility complex</i>
MK	masne kiseline
MUFA	jednostruko nezasićene masne kiseline, engl. <i>monounsaturated fatty acids</i>
NEFA	neesterificirane masne kiseline, engl. <i>nonesterified fatty acids</i>
NK-stanice	prirodnoubilačke stanice, engl. <i>natural killer cells</i>
NOD	soj laboratorijskih životinja, miševa, engl. <i>non-obese diabetic</i>
OA	oleinska kiselina, C18:1n-9
PA	palmitinska kiselina, C16:0
PAF	čimbenik aktivacije trombocita, engl. <i>platelet-activating factor</i>
pFABPpm	izoforma membranskog proteina koji veže masne kiseline u posteljici, engl. <i>placental FABPpm</i>
PG	prostanglandini
PGI	prostacaklini
PUFA	višestruko nezasićene masne kiseline, engl. <i>polyunsaturated fatty acids</i>
SA	stearinska kiselina, C18:0
SFA	zasićene masne kiseline, engl. <i>saturated fatty acids</i>
TNF	čimbenik nekroze tumora, engl. <i>tumor necrosis factor</i>
TX	tromboksani
VUM	<i>vena umbilicalis</i> , pupčana vena

1. UVOD

1. UVOD

Dijabetes tipa 1 (*Diabetes mellitus*, DM-1) je autoimuna bolest posredovana T-stanicama, usmjerena protiv beta-stanica gušterače. Posljedica je gubitak funkcije beta-stanica i nemogućnost (nesposobnost) proizvodnje inzulina do razine koja je potrebna za održavanje normalne koncentracije glukoze u krvi (normoglikemije). Očuvanje funkcije beta-stanica rezultira boljom metaboličkom kontrolom i smanjenjem rizika dugoročnih dijabetičnih komplikacija, te štetnih posljedica intenzivne terapije (primarno hipoglikemije) (DCCT studija, 1998). Najpouzdaniji pokazatelj očuvanja funkcije beta-stanica je koncentracija C-peptida u krvi.

Od trenutka postavljanja kliničke dijagnoze DM-1, bolesnici obično zadržavaju ograničenu sposobnost proizvodnje endogenog inzulina još nekoliko mjeseci ili godina (Greenbaum, 2009). Izlučivanje se postupno gubi jer je funkcija beta-stanica selektivno uništena. Autoimuno uništenje beta-stanica izraženije/agresivnije je kod razvoja DM-1 u djetinjstvu, kod male djece, dok je taj proces dugotrajniji i nepotpuniji kod bolesnika koji obole od DM-1 kasnije tijekom života (Poudel i sur., 2015, Virtanen i Knip, 2003).

Trudnoća je jedinstveni događaj u kojem genetski i imunološki strani fetus preživi do punog termina bez odbacivanja od strane imunološkog sustava majke (Poole i Claman, 2004). Povezana je s djelomičnom supresijom imunološkog upalnog sustava zbog čega autoimune bolesti poput dijabetesa često idu u remisiju tijekom trudnoće (Wilder, 1998).

1. 1. Autoimunost u dijabetesu tipa 1

Pojava autoprotutijela dijabetesa prvi je mjerljiv znak nadolazeće autoimunosti beta-stanica gušterače. Postoje četiri vrste autoprotutijela koja predviđaju očit tip DM-1 (Knip, 2002). To uključuje: protutijela

stanica otočića (engl. *islet cell antibodies*, ICA), autoprotutijela inzulina (engl. *insulin autoantibodies*, IAA), autoprotutijela 65-kD izoforme dekarboksilaze glutaminske kiseline (engl. *glutamic acid decarboxylase*, GAD) i IA-2A povezane molekule (IA-2A).

U razumijevanju imunopatologije dijabetesa najveći su doprinos dali radovi na laboratorijskim modelima životinja (NOD, „*non-obese diabetic*“ miševi i BB, „*bio breeding*“ štakori) koje su sklone spontanom razvoju dijabetesa vrlo sličnih obilježja onome koji se sreće u ljudi. Tako prikupljene činjenice o nastanku bolesti nedvosmisleno potvrđuju središnju ulogu imunoloških mehanizama, osobito stanične imunosti, te pružaju drukčiji pristup liječenju i prevenciji od dosadašnjeg (Bach, 1994; Epestein, 1994).

Prema suvremenom shvaćanju, DM-1 je autoimuna bolest genetski podložnih osoba, koja vodi selektivnom uništenju beta-stanica Langerhansovih otočića gušterače i apsolutnom nedostatku inzulina. Gepts je 1965. godine prvi objavio zapažanje kako otočići gušterače umrlih bolesnika s juvenilnim dijabetesom pokazuju znakove „inzulitisa“, karakterističnu histopatološku sliku peri- i intrainzularnog mononuklearnog staničnog infiltrata, za koji je pretpostavio da bi na neki način mogao biti odgovoran za nastanak bolesti (Gepts, 1965). Kasnije, Bottazzo i suradnici dokazuju da stanice koje infiltriraju otočiće pretežno pripadaju citotoksičnim T-limfocitima fenotipa CD8⁺, ali su također izolirali i limfocite CD4⁺ (pomagački T-limfociti) te NK-stanice (prirodnoubilačke stanice, engl. *natural killer cells*) (Bottazzo i sur., 1984). Na većini stanica infiltrata mogli su se dokazati i produkti HLA-DR gena te receptor za interleukin-2 (IL-2), što je tipičan dokaz aktiviranoga stanja imunoloških stanica. Vrlo važna odlika procesa koji dovodi do DM-1 jest specifičnost razaranja beta-stanica Langerhansovih otočića, dok stanice koje stvaraju glukagon, somatostatin i pankreasni polipeptid ostaju neoštećene i zadržavaju normalnu funkciju. Nije jasno zbog čega beta-stanice specifično stradavaju tijekom inzulitisa. Činjenica da samo one na svojoj

površini mogu iskazati HLA-DR antigene mogla bi biti najvažniji uzrok selektivnog oštećenja, slično onome koje se viđa primjerice, u Gravesovoj bolesti štitnjače (Radončić, 2009). Iako individualno genetsko nasljeđe predstavlja važnu determinantu podložnosti dijabetesu tipa 1, okolišni čimbenici su najvjerojatniji modulatori koji konačno determiniraju početak bolesti. Podršku ovakvom gledištu pružaju istraživanja monozigotnih blizanaca i bliskih srodnika s rizičnim DR antigenima u kojih koincidencija bolesti unutar obitelji ne premašuje 50%.

Stoga se mora pretpostaviti postojanje specifičnih čimbenika sredine čiji se dijabetogeni potencijal izražava ili pojačava posredstvom autoimunih mehanizama. U prvom redu to se odnosi na virusne infekcije za koje je poznato da mogu značajno doprinijeti početku velikog broja autoimunih bolesti. Eksperimentalna infekcija laboratorijskih životinja reovirusima izaziva poliendokrinu bolest s autoprotutijelima protiv gušterače, adenohipofize, timusa i želučane sluznice. Ovakvo stanje možda predstavlja scenarij povezanosti između virusne infekcije i autoimunog fenomena koji se viđa u nastanku DM-1 (Miller i sur., 1987).

1. 2. Imunoterapijski pristupi u liječenju dijabetesa

Suvremeno liječenje dijabetesa tipa 1 temelji se na nadomjesnoj terapiji egzogenim inzulinom. Njegova je primjena posljednjeg desetljeća uznapredovala do te mjere da su dugoročne komplikacije osnovne bolesti znatno smanjene, iako još u potpunosti nisu i otklonjene. U tom kontekstu imunoterapijski pristup mogao bi biti najzadovoljavajući oblik liječenja i prevencije pojave bolesti. Imunoterapija dijabetesa uključuje sve intervencije kojima se nastoji manipulirati imunološkim sustavom, a u užem smislu uključuje imunosupresivne i imunomodulacijske postupke.

Imunosupresivni lijekovi su po svojoj definiciji citotoksični, dok imunomodulacijske tvari primarno djeluju u smislu pojačanja ili smanjenja imunološkog odgovora, uključujući i prekidanje odnosno moduliranje

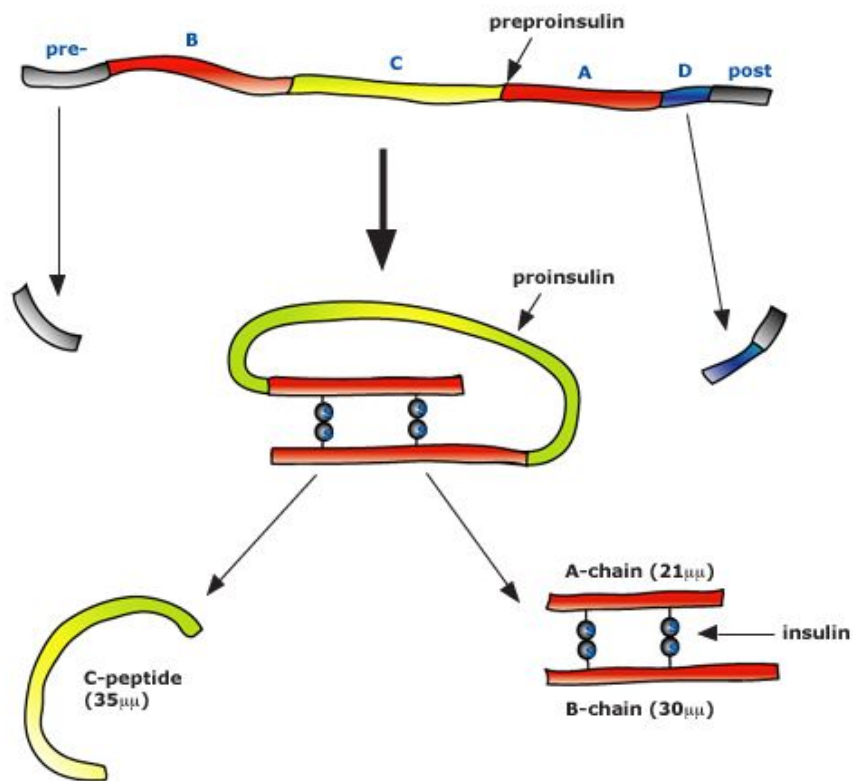
puteva destrukcije beta-stanica. Klasični lijekovi koji se koriste u svrhu imunoterapije u biti su supstancije male molekulske mase (kortikosteroidi, azatioprin, metotreksat, ciklofosamid, ciklosporin), koje nespecifično djeluju na sve leukocite i time stvaraju neželjenu sistemsku imunosupresiju. Najveći nedostatak tih lijekova je neučinkovitost nakon duge primjene i ponovna uspostava imunološke reakcije prema beta-stanicama ubrzo nakon prestanka terapije. To zahtjeva dugotrajnu primjenu koja nosi opasnost intoksikacije i učestalih infekcija tijekom primjene, što je za razliku od bolesnika s transplantiranim organom, neprihvatljiva nuspojava u dijabetesu (Radončić, 2009).

1. 3. Inzulin i C-peptid

Inzulin je protein male molekulske mase (5808 daltona) koji se izlučuje kao primarni odgovor na povišenu koncentraciju glukoze u krvi. Inzulin je glavni hormon koji kontrolira metabolizam glukoze i olakšava ulazak glukoze u stanice. No neki živčani podražaji i povišene koncentracije drugih izvora energije (poput aminokiselina i masnih kiselina) također potiču izlučivanje inzulina. Glavna je uloga inzulina kontrola ulaska glukoze iz krvi u stanice i njenog iskorištavanja u perifernim tkivima. Sudjeluje u smanjenju koncentracije glukoze u krvi na način da potiče glikolizu, a inhibira glukoneogenezu i glikogenolizu u jetri. Djelovanje inzulina je kontraregulirano hormonima koji potiču porast koncentracije glukoze kao što su glukagon, adrenalin, hormon rasta i kortizol. Beta-stanice zdrave gušterače proizvode i izlučuju onoliko inzulina koliko je potrebno za kontrolu homeostaze glukoze.

Inzulin se sintetizira iz molekule preteče pre-proinzulin (slika 1). C-peptid je peptid kojeg čini 31 aminokiselina koji u molekuli proinzulina povezuje amino-kraj alfa-lanca i karboksilni kraj beta-lanca zrelog inzulina, pa odatle i naziv: povezujući peptid (engl. *connecting peptide*, *C-peptide*). Neophodan je za ispravno savijanje (smatanje) proinzulina

stvarajući dvije disulfidne veze između cisteinskih ostataka alfa i beta-lanca, i jednu vezu unutar alfa-lanca inzulina.



Slika 1. Sinteza inzulina i C-peptida iz molekule preteče, pre-proinzulina, u beta-stanicama Langerhansovih otočića. Preuzeto s *Up To Date*, 20. srpnja 2015.

Pre-proinzulin, transkripcijski produkt inzulinskog gena, stvara se u endoplazmatskom retikulumu (ER) beta-stanica gušterače. Mikrosomalni enzimi cijepaju pre-proinzulin na proinzulin koji se sastoji od dva inzulinska lanca (alfa i beta) povezana C-peptidom. Proinzulin se prenosi u Golgijev aparat (GA) gdje se pakira u vezikule obložene klatrinom (engl. *clathrin-coated granules*). Nakon sazrijevanja, vezikule otpuštaju klatrinski ovoj te se proinzulin podvrgava proteolitičkom cijepanju na tri peptidna lanca: alfa i beta lanac inzulina te C-peptid. Kada su beta-stanice stimulirane, inzulin se izlučuje iz stanice egzocitozom i difundira u kapilarnu krv otočića. Nakon što se odvoji od C-peptida, jedan kraj beta lanca inzulina može se vezati na inzulinske receptore.

Inzulin i C-peptid zajedno se izlučuju u ekvimolarnoj količini u portalnu cirkulaciju. Oko 50% inzulina se metabolizira (apsorbira) u jetrima prilikom prvog prolaska, tzv. „*the first-pass effect*“. Preostali inzulin ima važnu regulacijsku ulogu u perifernim tkivima. Za razliku od inzulina, C-peptid se ne apsorbira u jetrima i ima duže vrijeme poluživota (oko 30 min) od inzulina (oko 4 min), te je pogodan za mjerenje koncentracije endogenog inzulina u perifernoj cirkulaciji (Nussey i Whitehead, 2001; Faber i sur., 1978).

C-peptid se izlučuje bubrezima, u proksimalnim kanalićima. Vrijednosti C-peptida u urinu koreliraju s vrijednostima C-peptida u plazmi, no kod osoba oboljelih od DM-1 bubrežna ekstrakcija znatno varira tijekom 24h (Meistas i sur., 1982), tj. hiperglikemija povećava stopu glomerularne filtracije te povećava klirens C-peptida u urinu kod dijabetičara (Wasada i sur., 1995; Hsieh i sur., 1988). Stoga je urinarni C-peptid prilično nepouzdana mjera funkcije beta-stanica.

Iako se prije smatralo da C-peptid nema biološku aktivnost, kasnije je dokazana njegova funkcija: poboljšava kapilarni protok krvi u koži i skeletnim mišićima, smanjuje izlučivanje albumina mokraćom te poboljšava živčanu funkciju kod osoba oboljelih od DM-1. Pretpostavlja se da bi mogao imati potencijalni terapijski potencijal sprječavajući neke kasnije komplikacije DM-1 (Nussey i Whitehead, 2001).

1. 4. C-peptid kao pokazatelj funkcije beta-stanica

Praćenje funkcije beta-stanica kod novo-dijagnosticiranih pacijenata s DM-1 je mjerljiv ishod koji predviđa dugoročni klinički status te je odgovarajuća mjera određivanja funkcije beta-stanica neophodna. Zašto je C-peptid najprikladnija mjera prikazano je u nastavku.

Glikirani hemoglobin (HbA_{1c}) je standardna mjera ishoda kontrole glikemije, koji odražava prosječnu koncentraciju glukoze u krvi tijekom

prethodna tri do četiri mjeseca, budući je životni vijek eritrocita 120 dana. Nastaje nespecifičnim vezanjem šećera za molekulu adultnog hemoglobina (HbA) te konverzijom labilnog u stabilni oblik HbA_{1c}, čija se količina povećava s porastom prosječne koncentracije glukoze u krvi. Uz mjerenje profila glukoze, koji ne mora uvijek biti odraz prosječne razine glukoze, HbA_{1c} je korisniji parametar praćenja metaboličke regulacije (Nielsen i sur., 2004), ali je nedovoljno osjetljiv u procjeni funkcije beta-stanica (Palmer i sur., 2004). Ovaj biomarker glikemijske kontrole ključan je u nadzoru pacijenata s DM-1 jer korelira s mikrovaskularnim i makrovaskularnim komplikacijama (Diabetes, 2010).

Prisutnost protutijela stanica otočića (ICA) i drugih mjera autoimunosti beta-stanica, poput autoprotutijela (imunoglobulini, dominantan IgG1), korisni su u identificiranju autoimune bolesti ili u predviđanju kliničkog tijeka. Međutim, koncentracije autoprotutijela otočića nisu se mijenjale s primjenom terapija koje su pokazivale kliničku učinkovitost u smanjivanju progresivnog gubitka funkcije beta-stanica kod bolesnika s DM-1. Nakon početka bolesti, titar i frekvencija različitih autoprotutijela smanjivali su se s vremenom (Jaeger i sur., 1997; Yokota i sur., 1998). Stoga autoprotutijela imaju prognostičku vrijednost i od najveće su koristi u dijagnozi, u usporedbi s koncentracijom C-peptida koji daje mjeru trenutnog stanja pacijenta (Winter i Schatz, 2011).

Primjena terapije koja poboljšava očuvanje funkcije beta-stanica mogu rezultirati proporcionalnim smanjenjem dnevnih doza inzulina potrebnih za postizanje normoglikemije. Međutim, na dnevne doze inzulina mogu utjecati brojni čimbenici poput razlike u osjetljivosti na inzulin, vrijeme i učestalost davanja inzulina, tip inzulina, prehrana i vježbanje, intra-individualna farmakokinetika i farmakodinamika inzulina, te druge varijable. Stoga doza inzulina nije izravan odraz funkcije beta-stanice i nije primjeren za procjenu funkcije beta-stanica (Palmer i sur., 2004).

Najizravnija mjera funkcije beta-stanica je izlučivanje endogenog

inzulina. Točno određivanje količine izlučenog inzulina u perifernoj krvi je ograničeno, jer se nakon izlučivanja u portalnu venu inzulin značajno metabolizira u jetri (40-60%). Oboje, i metaboliziranje inzulina u jetri i periferni klirens inzulina varijabilne su vrijednosti, stoga periferna razina inzulina ne odražava precizno količinu izlučenog inzulina (Brundin, 1999; Field, 1973).

Mnogi testovi za određivanje koncentracije inzulina ne mogu razlikovati inzulin od proinzulina i drugih međuprodukata proinzulina, endogeni od egzogenog inzulina, te nisu precizni pri malim koncentracijama koje se tipično nalaze kod pacijenata s DM-1. Stoga mjerenje C-peptida osigurava validiran način kvantificiranja izlučenog endogenog inzulina. C-peptid i inzulin se izlučuju u portalnu cirkulaciju u ekvimolarnim količinama. Iako jetra metabolizira značajnu količinu inzulina, C-peptid se ne resorbira u jetri (Nussey i Whitehead, 2001) i ima konstantan periferni klirens pri različitim fiziološkim okolnostima i promjenama koncentracije glukoze u plazmi (Licinio-Paixao i sur., 1986).

Također, C-peptid je koristan za praćenje funkcije gušterače kod transplantacije ili uklanjanja organa. Koristi se za dijagnosticiranje i razlikovanje DM-1 od adultnog dijabetesa u mladima (MODY dijabetes, engl. *maturity onset diabetes of the young*) ili dijabetesa tipa 2 (DM-2), za praćenje funkcije beta-stanica kod pacijenata s rano otkrivenim DM-1 i koji primaju imunomodulatornu terapiju za usporavanje progresije bolesti.

Testovi za određivanje koncentracije C-peptida danas su dostupniji, relativno niske varijabilnosti i visoke reproducibilnosti. Koncentracije C-peptida su općenito značajno veće od koncentracije proinzulina u perifernoj cirkulaciji, i dok god je stupanj križne reaktivnosti (engl. *cross-reactivity*) proinzulina u testovima za C-peptid manji od 10%, proinzulin neće doprinosti imunoreaktivnosti C-peptida u fiziološkim okolnostima. Uska povezanost C-peptida u sistemske cirkulaciji i endogenog inzulina u portalnom sustavu dobro je utvrđena (Palmer i sur., 2004).

C-peptid je mali linearni peptid koji je podložan cijepanju proteolitičkim enzimima zbog čega je potrebno osigurati da se plazma ili serum za mjerenje C-peptida odvoji od uzorka krvi u što kraćem periodu i da se test provede unutar mjesec dana. Imunoreaktivnost C-peptida također opada dugotrajnim pohranjivanjem. Budući hipoglikemija inhibira odgovor beta-stanica, preporučuje se da se test funkcije beta-stanica provede u odsutnosti hipo- ili hiperglikemije (Greenbaum i Harrison, 2003).

Na temelju navedenog, zaključeno je da je koncentracija C-peptida u standardiziranim uvjetima u perifernoj cirkulaciji najprikladnija mjera izlučivanja endogenog inzulina i funkcije beta-stanica (Palmer i sur., 2004).

1. 5. Dijabetes tip 1 i trudnoća

Trudnoća je povezana s velikim brojem fizioloških promjena i kompleksnih metaboličkih procesa koji se odvijaju kod majke.

Šećerna bolest jedan je od najčešćih metaboličkih poremećaja koji se odražava na cijelu trudnoću. Svojim djelovanjem počinje već u vrijeme fertilizacije i implantacije blastociste, a nastavlja se tijekom cijele trudnoće, nakon čega ponekad mogu ostati trajne promjene koje se prenose na dijete. Šećerna bolest tipa 1 u trudnoći uzrokuje brojne komplikacije za majku i dijete. Stoga je kontrola glikemije neophodna za smanjenje maternalnog i fetalnog morbiditeta i mortaliteta u trudnoća kompliciranih dijabetesom (Nielsen i sur., 2004). Trudnica oboljela od dijabetesa treba imati redoviti klinički nadzor s primjerenom regulacijom glikemije, kako bi se prevenirale komplikacije. Najučestalije komplikacije DM-1 u trudnoći su spontani pobačaji te poremećaji embrionalnog i fetalnog razvoja.

Trudnoću karakterizira stanje povećane razine inzulina u serumu, nešto manja koncentracija glukoze i periferna inzulinska rezistencija

(Sorenson i Brelje, 1997). Kod dijabetičnih trudnica zbog postupnog razvoja inzulinske rezistencije mora se postupno povećavati doza inzulina, te na taj način zadovoljiti povećane potrebe za inzulinom. Međutim, trudnice koje boluju od DM-1 i kod kojih je tijekom trudnoće očuvana endogena sinteza inzulina trebaju znatno manje egzogenog inzulina, nemaju hipoglikemije i ishodi trudnoće su uspješni. Povišene koncentracije C-peptida povezane su s boljom glikemijskom kontrolom (nižim vrijednostima HbA_{1c}), te značajnim smanjenjem hipoglikemija i mikrovaskularnih komplikacija kod oboljelih od DM-1 (Sjöberg i sur., 1987; Steffes, 2002; Panero i sur., 2009).

Unatoč stalnom, uravnoteženom i redovitom unosu raznih hranjivih tvari, tijekom trudnoće dolazi do značajnih promjena u metabolizmu ugljikohidrata, proteina i lipida. Dok su specifične prilagodbe ugljikohidrata i proteina kod dijabetičnih trudnica prilično dobro proučene, još uvijek je mnoštvo značajnih fizioloških odstupanja i nedovoljno razjašnjenih mehanizama u metabolizmu lipida. Također, nisu u potpunosti razjašnjeni svi fiziološki procesi u funkcioniranju stanica otočića tijekom dijabetične trudnoće i popratno izlučivanje C-peptida.

1. 6. Supresija imunosnog sustava u trudnica

Trudnoća je jedinstveni događaj u kojem genetski i imunološki strani fetus preživi do punog termina bez odbacivanja od imunološkog sustava majke. Složeni i jedinstveni imunološki mehanizmi omogućuju fetusu da raste i opstane u većini slučajeva (Poole i Claman, 2004). Tijekom trudnoće dolazi do djelomične supresije majčinog imunološkog sustava kako bi se prihvatio alogeni fetus. To zahtijeva značajne promjene u majčinom imunološkom sustavu tijekom programiranog razdoblja (Wilder, 1998). Tolerancija majčinog imunološkog sustava na očinske antigene povezana je s razvojem nekoliko specifičnih mehanizama koji štite fetus od majčinog citotoksičnog napada. Jedan od mehanizama je sinteza

neklasičnih HLA-G molekula koje proizvode stanice sinciciotrofoblasta, komplementarnih regulatornih proteina, te smanjena sinteza klasičnih HLA molekula klase I (Deniz i sur., 1994; Vince i Johnson, 1995).

Jedinstvene imunološke promjene koje se javljaju tijekom trudnoće obično se javljaju lokalno, jer nema čvrstih dokaza da je majčin imunološki sustav ugrožen tijekom trudnoće (Wilder, 1998).

Tijekom trudnoće suprimirana je stanična imunološka funkcija i proizvodnja Th1 citokina (npr. IL-2, TNF- α , INF- γ), dok je humoralna imunost i proizvodnja Th2 citokina (npr. IL-4, IL-10) pojačana. Takav obrazac imunološke funkcije obrnut je u postpartalnom razdoblju (Wilder, 1998).

Trudnoća je združena s djelomičnim smanjenjem upalnog imunološkog sustava pa zbog toga dolazi do supresije autoimunih bolesti tijekom trudnoće (Wilder, 1998). Te se promjene kod dijabetičnih trudnoća odražavaju na povećanje rasta Langerhansovih otočića gušterače i na njihovu poboljšanu funkciju u usporedbi sa stanjem prije trudnoće. Uz pojačano lučenje hormona prolaktina tijekom trudnoće dolazi do povećavanja rasta Langerhansovih otočića. Postoje klinički podaci koji potvrđuju da trudnice koje boluju od DM-1 stvaraju i svoj vlastiti inzulin (Madsbad 1983; Hedman i sur., 2004; Nielsen i sur. 2004; Karnik i sur., 2007; Ringholm i sur., 2008; Nielsen i sur., 2009).

Smanjenje uništenja beta-stanica zbog supresije imunskog sustava vidi se povećanjem koncentracije C-peptida. Hipoteza da su hormoni trudnoće dio liječenja DM-1 potvrđena je na životinjskim modelima, NOD miševima (engl. „*non-obese diabetic*“). Predijabetični NOD miševi koji su primali hormone trudnoće nisu razvili dijabetes. Hormoni trudnoće smanjuju limfocitnu infiltraciju Langerhansovih otočića. Karnik i suradnici u svom su istraživanju uočili pad koncentracije C-peptida nakon okota (Karnik i sur., 2007). U prilog ovoj hipotezi ide nalaz da proliferacija beta-stanica stimulirana trudnoćom kod životinjskih modela (miša), nestaje

četiri dana nakon okota. Nielsen i suradnici također su u svom istraživanju opazili da se koncentracija C-peptida brzo smanjila nakon porođaja. Moguće je da na povećanje koncentracije C-peptida tijekom trudnoće utječu promotori rasta iz placente ili hormonski čimbenici koji više ne djeluju nakon trudnoće (Nielsen i sur., 2009).

1. 7. Aktivnost beta-stanica gušterače i trudnoća

Zbog povećane potrebe za inzulinom tijekom dužeg perioda, kao što je trudnoća, otočići moraju proći strukturne i funkcionalne promjene. Ishod dugoročne regulacije otočića mora biti poboljšanje proizvodnje inzulina pri normalnoj koncentraciji glukoze. Najvažnija promjena koju otočići prolaze tijekom trudnoće je poboljšanje izlučivanja inzulina, smanjenje praga izlučivanja inzulina stimuliranog glukozom i poboljšana proliferacija beta stanica (Sorenson i Brelje, 1997).

Lučenje humanog prolaktina (hPRL) i humanog placentnog laktogena (hPL) pojačava se tijekom trudnoće (Kletzky i sur., 1985). Aktivnost laktogena važna je za mogućnost beta-stanica da poboljšaju proliferaciju i funkciju kao odgovor na trudnoću (Parsons i sur., 1992). PRL i PL direktno utječu na regulaciju proliferacije beta-stanica: prekomjeren izražaj PL uzrokuje značajno povećanje proliferacije i mase beta-stanica čak i kod hipoglikemije.

Tijekom trudnoće, placentni hormon rasta (GH) postepeno zamjenjuje proizvodnju hipofiznog GH. Posljedično se i razina IGF-I (inzulinu sličan čimbenik rasta, engl. *insulin-like growth factor I*) povećava tijekom trudnoće (Ringholm i sur. 2008; Chellakooty i sur., 2004; Fuglsang i sur., 2003; Lonberg i sur., 2003). Kod žena s DM-1 tijekom trudnoće razina IGF-I je niža, a razina placentnog GH veća (Chellakooty i sur., 2004). Nielsen i suradnici su pokazali da pojačano lučenje placentnog GH i IGF-I nisu povezani s povećanjem koncentracije C-peptida (Nielsen i sur., 2009).

Ravnoteža između rasta i gubitka beta-stanica dobro je regulirana, a funkcionalna masa beta-stanica normalno kompenzira povećane zahtjeve za inzulinom, na primjer tijekom trudnoće (Rieck i Kaestner, 2010). Trenutni dokazi upućuju da je disregulacija tih mehanizama bitna značajka u patogenezi šećerne bolesti, sve češćeg metaboličkog poremećaja.

Istraživanja na životinjskim modelima (glodavcima) pokazala su da beta-stanice tijekom trudnoće povećaju svoju masu 3-4 puta. Osim značajne hipertrofije majčinih beta-stanica (Sorenson i Brelje, 1997; Rieck i sur., 2009), dramatično se pojačava i proliferacija beta-stanica tijekom trudnoće (Parsons i sur. 1992; Rieck i sur. 2009). Zanimljivo je da se unutar 10 dana nakon porođaja masa beta-stanica vraća na normalnu razinu povećanom apoptozom beta-stanica, smanjenom proliferacijom i smanjenom veličinom beta-stanice (Scaglia, 1995). Iako temeljni mehanizmi navedenih procesa još nisu poznati, trudnoća je jedinstveni primjer brzog i reverzibilnog širenja beta-stanica, s izrazitim nastupom i proliferacije i apoptoze beta-stanice koje se javljaju u fiziološkom okruženju. U istraživanju Nielsena i suradnika koncentracije C-peptida brzo su se smanjile nakon porođaja. To upućuje da na povećanje koncentracije C-peptida tijekom trudnoće mogu utjecati čimbenici rasta iz placente ili hormonski čimbenici koji više ne djeluju nakon trudnoće (Nielsen i sur., 2009).

Tijekom trudnoće povećan je izražaj čimbenika rasta, a gušterača reagira na dodatnu potražnju za inzulinom povećanjem postojećih Langerhansovih otočića i hiperplazijom beta-stanica koje proizvode inzulin (Sorenson i Brelje 1997; Van Assche i sur., 1978). Također reagira povećanom regulacijom sinteze i izlučivanja inzulina, te povećanom osjetljivosti beta-stanica na stimulaciju glukozom (Sorenson i Brelje, 1997). Povećana mitotička aktivnost je vidljiva i *in vivo* i *in vitro* u otočićima izloženima hormonu rasta. Tijekom trudnoće povećava se izražaj receptora hormona rasta u stanicama otočića (Nielsen i sur., 1999).

Kod trudnica s dugogodišnjim DM-1 koje nisu imale mjerljivu koncentraciju C-peptida, uočena je proizvodnja endogenog inzulina (Ilic i sur., 2005; Novak i sur., 2005; Pirttiaho i sur., 1987). Ova pojava može biti posljedica obnavljanja funkcije beta-stanica zbog čimbenika rasta potaknutih trudnoćom i supresije imunološkog sustava (Ilic i sur., 2005), ali poboljšana metabolička kontrola također može imati ulogu u povećanju koncentracije C-peptida kod trudnica koje boluju od DM-1 tek nekoliko godina (Shah i sur., 1989) kao i kod DM-1 nakon početne faze remisije (Novak i sur., 2005; Madsbad i sur., 1981). Nielsen i suradnici prikazali su da koncentracija C-peptida postepeno raste tijekom trudnoće, i uočili su značajan porast C-peptida na kraju trudnoće i u skupini trudnica koja nije imala mjerljiv C-peptid na početku trudnoće (Nielsen i sur., 2009). C-peptid ne prolazi kroz posteljicu stoga izmjerena koncentracija C-peptida potječe od majke, a ne od fetusa.

Još uvijek postoje dvojbe rezultira li poboljšanja metabolička kontrola povećanom proizvodnjom C-peptida ili obrnuto, povećana proizvodnja C-peptida rezultira boljom metaboličkom kontrolom. Međutim, u prospektivnom istraživanju Madsbada i suradnika utvrđeno je da poboljšana glikemijska kontrola tijekom trudnoće vodi do povećane koncentracije C-peptida kod trudnica koje boluju od DM-1 tek nekoliko godina (Madsbad i sur., 1981). Također, Nielsen i suradnici zaključuju da poboljšana glikemijska kontrola olakšava proizvodnju C-peptida jer nisu utvrdili povezanost smanjenih doza inzulina pred kraj trudnoće i povećane koncentracije C-peptida (Nielsen i sur., 2009).

1. 8. Utjecaj prehrane na bolesnike/ce s dijabetesom tipa 1

Dijabetes je multifaktorijalna bolest, ali još nije poznato što točno potiče autoimuni proces i koji čimbenici potiču razvoj bolesti do kliničke dijagnoze. Poznato je da važnu ulogu u patogenezi imaju genetički čimbenici u HLA kompleksu, zajedno s okolišnim čimbenicima, poput

prehrane ili virusne infekcije (Stene i sur., 2000). Postoji nekoliko dokaza koji podržavaju ključnu ulogu okolišnih čimbenika u patogenezi DM-1. Diljem svijeta uočena je velika razlika u stopi incidencije (Karvonen i sur., 2000), i ta se razlika teško može objasniti genetičkim čimbenicima. Stoga nagli porast incidencije ne može biti posljedica pojačane genetičke podložnosti u populaciji, već je uglavnom odraz promjena u životnom stilu i okolišu (Virtanen i Knip, 2003). Tako je u ranijim istraživanjima pokazana važnost prehrane u sprječavanju pogoršanja bolesti. Primjerice, vitamini D i E, nikotinamid i n-3 višestruko nezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) mogu imati zaštitni utjecaj kod djece i odraslih oboljelih od DM-1 (Mayer-Davis i sur., 2013, Stene i sur., 2000).

Retrospektivna istraživanja koja su pratila uzimanje dodatka prehrani obogaćenog vitaminom D tijekom trudnoće ili tijekom prve godine života pokazala su nižu stopu incidencije nastanka DM-1 (Stene i sur., 2000; Eurodiab Substudy, 1999). Vitamin E, osim što ima oksidativna svojstva, čuva i beta-stanice od utjecaja medijatora upale (interleukina-1 (IL-1), čimbenika nekroze tumora (TNF) i γ -interferona). Nikotinamid ordiniran u vrijeme dijagnoze DM-1 ima dobar utjecaj na remisiju bolesti, poboljšava metaboličku kontrolu i povećava funkciju beta-stanica. Pozzilli i suradnici pokazali su da je izlučivanje C-peptida očuvano i do dvije godine nakon dijagnoze DM-1, ako se uz inzulinsku terapiju dodatno uzima sam nikotinamid ili nikotinamid u kombinaciji s vitaminom E (Pozzilli i sur., 1995). Pored navedenih vitamina, na smanjenje rizika razvoja DM-1 kod mladih osoba s genetskom sklonošću, utječe uzimanje povećane količine n-3 PUFA (Norris i sur., 2005). Ranija istraživanja pokazala su da n-3 PUFA mogu imati povoljan utjecaj na očuvanje funkcije beta-stanica (Mayer-Davis i sur., 2013) i na smanjenje upalnih procesa (Simopoulos, 2002).

1. 9. Masne kiseline

Masne kiseline (MK) nalaze se u sastavu većine lipida te imaju više fiziološki značajnih uloga u tkivima sisavaca: strukturna uloga, skladištenje i proizvodnja energije, te kao preteče biološki aktivnih tvari. Masne kiseline sastavne su jedinice fosfolipida i glikolipida i, prema tome, osnovna su komponenta staničnih membrana koje daju stanici njen strukturalni integritet i omeđuju organele. U organizmu se rijetko nalaze u slobodnom obliku zbog svojih detergentskih i citotoksičnih učinaka, već su općenito esterificirane u veće molekule kao što su fosfolipidi (PL) i triacilgliceroli (TAG).

Dijele se na temelju stupnja zasićenosti na: 1) zasićene (engl. *saturated fatty acids*, SFA) koje ne sadrže dvostruke (nezasićene) veze; 2) jednostruko nezasićene ili mononezasićene (engl. *monounsaturated fatty acids*, MUFA) kod kojih postoji jedna dvostruka veza između atoma ugljika, te 3) višestruko nezasićene ili polinezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) kod kojih je prisutno više dvostrukih veza.

Na početku lanca masne kiseline nalazi se karboksilna skupina (-COOH) čiji se ugljikov atom broji kao prvi u nomenklaturi masnih kiselina. Na kraju lanca nalazi se metilna skupina (-CH₃) čiji se C-atom označava kao ω ili n. Klasifikacija nezasićenih MK temelji se na duljini ugljikovog lanca, broju dvostrukih veza te položaju dvostrukih veza. Nomenklatura koja se temelji na udaljenosti prve dvostruke veze od zadnjeg C-atoma označava masne kiseline kao: n-3, n-6, n-7 ili n-9 nezasićene MK. Položaj dvostruke veze kod nezasićenih MK bitan je za njihova svojstva.

Dvostruke veze u strukturi nezasićenih MK ne dopuštaju rotaciju skupina koje povezuje, no moguća su dva fiksna prostorna rasporeda skupina oko osi dvostruke veze: *cis* ili *trans* konfiguracija. *Cis*-konfiguracija znači da se susjedni atomi vodika nalaze na istoj strani

dvostruke veze, dok su u *trans*-konfiguraciji na suprotnim stranama. U *cis*-formi izomera krutost dvostruke veze uzrokuje da se alifatski lanac presavija i zadržava svoje oblikovanje, što ograničava oblikovnu slobodu masnih kiselina. Veći broj dvostrukih veza u *cis*-obliku povećava zakrivljenost lanca i time ograničava sposobnost masnih kiselina da se zbiju u manjem prostoru, što utječe na točku taljenja membrane ili masnoće. Naime, udaljenije intermolekularne veze su slabije i potrebno je manje energije za prijelaz iz krutog u tekuće stanje. Stoga je točka taljenja nezasićenih MK niža od one zasićenih MK, čija linearna struktura dopušta zgusnuto pakiranje i kristalično stanje.

Prisutnošću *trans*-izomera masnih kiselina narušavaju se prostorni odnosi u samoj strukturi membranskih lipida, a time i membrana. U prirodi se gotovo sve nezasićene MK pojavljuju u *cis*-formi, dok *trans*-oblik uglavnom nastaje utjecajem čovjeka i njegove namjere da prerađuje masnoće, tj. nusprodukt je hidrogeniranja prirodnih ulja. Ipak je važno napomenuti da neke namirnice prirodno sadrže nezasićene MK u *trans*-konfiguraciji, primjerice mlijeko i mliječni proizvodi, kamo dospijevaju kao rezultat metabolizma mikrobnog flore u buragu preživača.

Kao i sve biološke membrane, stanična (plazmatska) membrana sadrži fosfolipide, sfingolipide, kolesterol, te proteine, i organizirana je u dva sloja. Fosfolipidne molekule orijentiraju se tako da su hidrofobni „repovi“ masnih kiselina okrenuti prema unutrašnjosti dvosloja, a hidrofilne „glave“ vezanog alkohola ili šećera nalaze s vanjske strane membrane, prema vodenom mediju unutar i izvan stanice. Rezultirajući lipidni dvosloj osnovna je strukturalna jedinica svih membrana i služi kao selektivno propusna barijera za većinu u vodi topljivih supstancija. Lanci masnih kiselina lipidnog dvosloja u stalnom su pokretu, a stupanj molekularnog gibanja unutar membrane, tj. „pokretljivost“ membrane, određena je prirodom masnih kiselina (zasićene, nezasićene, *cis* ili *trans* konfiguracija), ugrađenim proteinima, sadržajem kolesterola, itd. Unutar fosfolipidnog dvosloja acilni lanci susjednih fosfolipida su u međusobnoj interakciji, tako

da stupanj interakcija između spomenutih lanaca određuje fizikalno-kemijska svojstva membrane: fluidnost, propusnost, enzimatska aktivnost, međustanične interakcije, vezanje signalnih molekula i receptora te prijenos nutrijenata. Aktivnost mnogih membranskih proteina regulirana je upravo njihovim interakcijama s lipidima unutar dvosloja. Nezasićene MK u fosfolipidima vezane su pretežno na *sn-2* položaju. Duljina acilnog lanca i stupanj (ne)zasićenosti masnih kiselina važne su determinante mnogih membranskih karakteristika koje određuju funkcionalnu učinkovitost membrane.

Za pravilno djelovanje staničnih membrana potreban je relativno visok udio nezasićenih MK, posebno PUFA, u samoj strukturi. U nedostatku PUFA, u membrane se više ugrađuju zasićene MK, čime se smanjuje fluidnost membrana jer je molekularno gibanje svedeno na minimum, tj. stvaraju gotovo kristalnu strukturu. Posljedično dolazi do promjena u funkciji staničnih membrana koje se očituju kao promjene u propusnosti vode, niskomolekulskih nutrijenata i elektrolita, promjenama provodljivosti električnih impulsa, gubitku sposobnosti komunikacije s drugim stanicama, slabljenju odgovora na podražaj hormona itd. (Vance, 1985; Wan i sur., 1988).

S obzirom da su PUFA najzastupljenije u staničnim membranama mijelina (72%), eritrocita (43%), stanicama jetre (52%), te u unutrašnjoj membrani mitohondrija (24%), ova tkiva su i najizložena promjenama uzrokovanim njihovim nedostatkom (Cristie, 1992).

1. 10. Metabolizam esencijalnih masnih kiselina

Ljudski organizam može jednostavno proizvesti zasićene masne kiseline ili jednostruko nezasićene masne kiseline s dvostrukom vezom na devetom atomu ugljika brojeći od kraja lanca (n-9 nezasićene masne kiseline). Međutim zbog nepostojanja enzima Δ -12 i Δ -15 desaturaze nije u mogućnosti *de novo* sintetizirati n-6 i n-3 obitelji masnih kiselina.

Linolna kiselina (LA, C18:2n-6) od koje se u organizmu dalje sintetizira n-6 serija nezasićenih masnih kiselina, i α -linolenska kiselina (ALA, C18:3n-3) od koje se sintetizira n-3 serija nezasićenih masnih kiselina, moraju se stoga unijeti u organizam putem hrane te ih nazivamo esencijalnim masnim kiselinama (engl. *essential fatty acids*, EFA).

Biosinteza dugolančanih višestruko nezasićenih masnih kiselina (LC-PUFA) iz preteča uključuje niz naizmjeničnih aktivnosti enzima elongaza i desaturaza, pri čemu između n-6 i n-3 kiselina postoji konkurencija za desaturacijskim enzimima (Simopoulos, 1991). Ljudski organizam je u mogućnosti konvertirati ili retrokonvertirati pojedinačne masne kiseline u druge masne kiseline iste serije, no ne i konvertirati masne kiseline iz n-3 serije u n-6 seriju, ili obrnuto. Afinitet masnih kiselina za desaturacijske enzime je sljedeći: ALA > LA > oleinska kiselina (Kassem i sur., 2012).

Djelovanjem enzima LA se prevodi u dugolančane n-6 PUFA kao što su dihomogama-linolenska kiselina (DGLA, C20:3n-6) i arahidonska kiselina (AA, C20:4n-6), dok se ALA može prevesti u dugolančane n-3 PUFA od kojih su prevladavajuće eikozapentaenska kiselina (EPA, C20:5n-3) i dokozaheksaenska kiselina (DHA, C20:6n-3). Međutim učinkovitost endogene pretvorbe ALA iz hrane u EPA i DHA u organizmu odraslog čovjeka nije velika (Burdge i sur., 2003; Holud 2006; Hanebutt i sur., 2008). Te se dugolančane n-3 PUFA danas također smatraju esencijalnim i preporuča se njihov pojačani unos hranom.

Dugolančane PUFA poput AA, EPA i DHA u organizmu mogu potjecati izravno iz konzumirane hrane ili se sintetiziraju endogeno iz svojih preteča unesenih hranom. Glavni predstavnik n-3 PUFA je ALA, a nalazimo je u zelenom lišću povrća, kao i u nekim sjemenkama, orašastim plodovima i mahunarkama (leguminoze). Ona se može u ograničenom kapacitetu metabolizirati u EPA i DHA, dvije n-3 PUFA čiji su primarni izvor ribe i plodovi mora (Norris i sur., 2007). Najzastupljenija n-6 PUFA u prehrani je LA i primarno je nađena u orašastim plodovima, sjemenkama i biljnim

uljima. Preteča je za sintezu AA. Obzirom da se ALA i LA natječu za ključne enzime uključene u metabolizam masnih kiselina i pretvorbu u proupalne ili protuupalne eikozanoide, važno je istražiti učinak zajedničkog unosa n-3 i n-6 PUFA (Norris i sur., 2007).

U zapadnim zemljama gdje je prehrana bogata mastima, masne kiseline unesene hranom skladište se u organizmu u adipocitima, dok iz hrane bogate ugljikohidratima adipociti sami sintetiziraju masne kiseline (uglavnom palmitinsku (PA, C16:0), stearinsku (SA, C18:0) i oleinsku (OA, C18:1n-9)). Samo u mliječnim žlijezdama mogu se sintetizirati kratkolančane i srednjelančane masne kiseline, dok sva ostala tkiva sintetiziraju masne kiseline duljih lanaca (Vance, 1985).

1. 11. Metabolizam eikozanoida

Eikozanoidi su skupina fiziološki i farmakološki aktivnih spojeva koji djeluju kao lokalni hormoni putem receptora vezanih za G-protein ili kao drugi glasnici. Eikozanoidi nastaju iz eikozapolienskih masnih kiselina, dakle masnih kiselina s 20 C-atoma i većim brojem dvostrukih veza. Do danas je poznato oko 30 različitih vrsta podijeljenih u tri serije, ovisno o masnoj kiselini iz koje su nastali. Neposredne preteče eikozanoida su: DGLA za seriju 1, AA za seriju 2 i EPA za seriju 3 prostanglandina. Ove masne kiseline obično nisu prisutne u slobodnom obliku već su esterificirane u sastavu fosfolipida stanične membrane, neutralnih lipida i kolesteril-estera (Sardesai, 1992).

Prostanoidi su eikozanoidi koji nastaju ciklooksigenaznim putem, a obuhvaćaju prostanglandine (PG), prostacikline (PGI) i tromboksane (TX). Leukotrieni (LT) i lipoksini (LX) su eikozanoidi koji nastaju lipoksigenaznim putem.

Preteče, osobito AA i EPA, mogu potjecati neposredno iz hrane ili nastaju metabolički iz LA i ALA. Masne kiseline za sintezu eikozanoida

uobičajeno se oslobađaju sa *sn-2* položaja fosfolipida iz stanične membrane (mjesto na kojem su PUFA najčešće esterificirane) djelovanjem enzima fosfolipaze A₂ (PLA₂, engl. *phospholipase A₂*). Aktivnost PLA₂ je prema tome ograničavajući čimbenik u brzini stvaranja eikozanoida iz AA i EPA, a s obzirom da PLA₂ ima jednaki afinitet za AA i EPA, o masno-kiselinskom sastavu fosfolipida ovisi omjer oslobođenih n-3 i n-6 PUFA koje se koriste kao ishodni spojevi za sintezu eikozanoida (Calder, 1996).

Zapadnjačkim stilom prehrane u organizam se unose značajne količine AA, koja je posljedično najzastupljenija PUFA u fosfolipidima membrane, stoga su u ljudskom organizmu najčešći oblici PG serije 2 (Sardesai, 1992).

Eikozanoidi sintetizirani iz masnih kiselina n-6 (AA) i n-3 (EPA i DHA) reda međusobno djeluju antagonistički. Metabolizmom AA nastaju proupalni eikozanoidi, prostanglandini i tromboksani serije 2 (PG₂ i TX₂), te leukotrieni serije 4 (LT₄). Nasuprot tomu, metabolizmom EPA i DHA nastaju protuupalni eikozanoidi, prostanglandini i tromboksani serije 3 (PG₃ i TX₃), te leukotrieni serije 5 (LT₅) (Parker i sur., 2006; De Caterina i sur. 2004). Stoga povišeni omjer AA/EPA ili AA/DHA u organizmu može ukazivati na upalne procese.

Eikozanoidi se smatraju poveznicom između n-3 PUFA, upale i imuniteta (Simopoulos, 2002). Osim protuupalnih učinaka suzbijanjem sinteze LT₄, n-3 PUFA suzbijaju pretjeranu sposobnost monocita da sintetiziraju interleukin-1 (IL-1) i čimbenik nekroze tumora (TNF, engl. *tumor necrosis factor*) (Weber i Leaf, 1991). Dok TX₂ podupire sintezu citokina u ljudskim monocitima, ima proupalni učinak (Simopoulos, 2002).

Protuupalna svojstva n-3 PUFA, posebno EPA i DHA, rezultat su natjecanja s AA kao supstrata za ciklooksigenaze (COX) i 5-lipoksigenaze. Tako EPA i DHA povećavaju sintezu LT₅ (koji imaju slabije upalno djelovanje u odnosu na LT₄) i smanjuju sintezu LT₄ izvedenih iz AA (Simopoulos, 2002; De Caterina, 2004). PG₃ je snažan inhibitor

agregacije trombocita kao i PG2, ali je TX3 znatno slabiji agregator trombocita od TX2, i ima minimalni vazokonstriksijski učinak.

Rezultati ovih promjena u produkciji PG, TX i LT mijenjaju ravnotežu njihovih aktivnosti, kao što su vazodilatacija i inhibicija agregacije trombocita što rezultira smanjenjem upalne aktivnosti.

Nekoliko studija do sada pokazalo je da promjena količine i vrste masnih kiselina u prehrani može utjecati na stvaranje različitih eikozanoida. Tako zamjena ulja u kojima prevladavaju n-6 masne kiseline, s hranom i uljima u kojima prevladavaju n-3 masne kiseline, dovodi do povećane sinteze njima pripadajućih eikozanoida, čije je djelovanje manje snažno od onih koji nastaju od AA.

1. 12. Upalni procesi i n-3 višestruko nezasićene masne kiseline

Interakcije između imunih i upalnih stanica posredovane su velikim dijelom proteinima, nazvanima interleukini (IL), koji mogu poticati stanični rast, diferencijaciju i funkcionalnu aktivaciju. TNF- α , IL-1 i IL-6 najvažniji su citokini koje proizvode monociti i makrofazi. Proizvodnja odgovarajućih količina TNF- α , IL-1 i IL-6 korisna je u odgovoru na infekciju, ali neprimjerene količine ili prekomjerna proizvodnja mogu biti opasne jer su ti citokini, posebice TNF, uključeni u neke patološke procese koji se javljaju kao odgovor u upalnim uvjetima (Simopoulos, 2002).

Djelovanjem n-3 PUFA ublažava se stanicom posredovani imunološki odgovor, dijelom inhibirajući funkciju antigen-prezentirajuće stanice, dijelom povećanjem fluidnosti membrana, te mijenjanjem izražaja gena za IL-6 i IL-1- β (Akerlele i Cheema, 2016). Osim što smanjuju izražaj mRNA za IL-6 i IL-1- β , suprimiraju i čimbenik aktivacije trombocita (PAF, engl. *platelet-activating factor*), snažan agregator trombocita i aktivator leukocita. Čimbenik aktivacije trombocita snažno potiče metabolizam arahidonske kiseline. Studije su pokazale da dodatak n-3 PUFA u majčinu

prehranu, rezultira značajnom redukcijom proizvodnje medijatora upale, IL-1, IL-6 i TNF- α (Trebbles i sur., 2003). Dokozaheksaenska kiselina (DHA) pokazala se učinkovitijom nego eikozapentaenska kiselina (EPA) u smanjenju koncentracije TNF- α u plazmi, DHA smanjuje za 35% dok EPA smanjuje za 20% (Mori i sur., 2003).

Prilikom aktivacije monociti i makrofazi izražavaju ciklooksigenazu-2 (COX-2) i značajno povećavaju pro-upalne prostanglandine izvedene iz AA (Norris i sur., 2007). Dokozaheksaenska kiselina (i n-3 PUFA općenito) smanjuje izražaj COX-2 koji je induciran djelovanjem IL-1 β .

U uvjetima relativnog obilja n-6 PUFA u membrani, proizvodnja proupalnih prostanglandina posredovanih COX-2 može prevagnuti i pridonijeti etiologiji DM-1, dok povećana razina n-3 PUFA može ograničiti proizvodnju proupalnih prostanglandina i poticati stvaranje protuupalnih eikozanoida (Norris i sur., 2007).

1. 13. Višestruko nezasićene masne kiseline i trudnoća

Esencijalne masne kiseline imaju važnu ulogu tijekom fetalnog razvoja i rasta (Coletta i sur., 2010; Abedi i Sahari, 2014). n-3 PUFA i metaboliti (poput eikozanoida) poboljšavaju majčine i neonatalne zdravstvene ishode, te su mnogi rezultati istraživanja pokazali da suplementacija s n-3 PUFA tijekom trudnoće smanjuje rizik od prijevremenog porođaja, posebice kod visokorizičnih trudnoća (Olsen i Secher, 2002; Makrides i sur., 2006; Horvath, Koletzko i Szajewska, 2007; De Giuseppe, Roggi i Cena, 2014).

Dokozaheksaenska kiselina (DHA) je posebno važna za ukupan fetalni rast kao i za razvoj vitalnih organa poput mozga i očiju (retine) pa je tako nedostatan unos DHA tijekom trudnoće povezan s oslabljenim kognitivnim funkcijama i oštrinom vida kod novorođenčadi (Uauy i sur., 1992; Green i Yavin, 1998; Carlson, 2001; Singh, 2005).

Mozak sadrži najveću količinu lipida (60% suhe mase) u usporedbi s drugim organima u tijelu (Burdge i Calger, 2005), od kojih pak gotovo 50% čine PUFA: AA i DHA. Iako različite vrste moždanih stanica, kao što su glijalne stanice, astrociti i cerebralni endotel mogu iz EFA djelovanjem elongaza i desaturaza sintetizirati njihove više homologe, majka je glavni izvor AA i DHA koje se akumuliraju u mozgu tijekom fetalnog razvoja.

Rast mozga ubrzan je u drugom tromjesečju, što je vjerojatno ključni period za DHA suplementaciju. Međutim dokazano je da je nakupljanje DHA u mozgu najbrže tijekom trećeg tromjesečja trudnoće i tijekom prve godine života (Clandinin i sur., 1980; Martínez i Mougán, 1998) te je majčin status DHA u tom periodu značajan za fetalno zdravlje kako bi se podržao normalan rast, neurološki razvoj i kognitivna funkcija rastućeg fetusa (Al i sur., 1995). No, studije su pokazale da je majčina razina DHA uglavnom niska tijekom zadnjeg tromjesečja, što se objašnjava visokom stopom prijenosa DHA prema fetusu (Montgomery i sur., 2003). Istovremeno, niska razina majčine n-3 PUFA u zadnjem tromjesečju može biti urođeni regulatorni mehanizam za povećanje sinteze proupalnih molekula potrebnih za početak porođaja. Međutim, ukoliko nisu adekvatno opskrbljeni s n-3 PUFA, fetus tijekom trećeg tromjesečja i novorođenče podložni su razvojnim deficitima.

Tako važna uloga DHA zasniva se na njezinom sudjelovanju u održavanju fluidnosti membrane, prijenosu impulsa, sinaptičkom prijenosu i njezinoj ulozi kao citosolnog signala koji prenosi čimbenike za izražaj različitih gena tijekom kritičnog razdoblja razvoja (Innis, 1991).

Tijekom rane trudnoće masti iz prehrane i majčinog metabolizma pohranjuju se u majčino masno tkivo, što osigurava akumulaciju važnih zaliha PUFA (Duttaroy, 2009). Lipolitička aktivnost u masnom tkivu značajno se povećava tijekom trećeg tromjesečja kao posljedica inzulinske rezistencije (Elliott, 1975). Oslobođene masne kiseline, kao i masne kiseline iz prehrambenih lipida, odgovorne su za povećanu količinu TAG u

cirkulirajućim lipoproteinima majke. Iako majčini lipoproteini ne prolaze direktno kroz placentarnu barijeru, hipertriacilglicerolemija u trudnoći ima važnu ulogu u dostupnosti masnih kiselina za fetus (Elliott, 1975; Duttaroy, 2009).

Ako je unos hrane nedostatan, mogu se mobilizirati zalihe majčinog tijela. Zahtjevi za AA vjerojatno će biti ispunjeni jer postoji obilje LA (preteča AA) u masnom tkivu. Međutim, ALA je prisutna u manjoj količini i posljedično je smanjena sinteza DHA i EPA. PUFA status djeteta vrlo je koreliran s majčinim (Smita i sur., 2000). Pokazalo se da tijekom trudnoće koncentracija EFA u krvi majke pada za otprilike 40%, uz istodobno povećanje koncentracije neesencijalnih masnih kiselina, budući da se zalihe tijela mobiliziraju i iscrpljuju (Al i sur., 1995).

1. 14. Prijenos masnih kiselina kroz posteljicu

Prijenos esencijalnih masnih kiselina kroz posteljicu odvija se pasivnom difuzijom ili kroz membranu posredovanjem plazmatskih proteina (Duttaroy, 2009). Fiziološki proteinom posredovan prijenos masnih kiselina pokazao se kvantitativno važniji nego pasivna difuzija (Duttaroy, 2009). Ti se proteini nalaze u nekoliko humanih tkiva, uključujući i posteljicu.

U staničnim membranama nalaze se: membranski protein koji veže masne kiseline (FABPpm, engl. *plasma membrane fatty acid binding protein*); translokaza masnih kiselina (FAT, engl. *fatty acid translocase*) poznat i pod nazivom klaster diferencijacije-36 (CD-36); prijenosni protein masnih kiselina s aktivnošću acil-CoA-sintetaze (FATP, engl. *fatty acid transporter protein*), dok se citoplazmatski protein koji veže masne kiseline, (FABP, engl. *fatty acid binding protein*), nalazi u citoplazmi (Coleman, 1986), kao i citoplazmatski proteinski prijenosnik masnih kiselina (Duttaroy, 2009).

Trudnice s DM-1 imaju znakovito povećanu aktivnost lipoproteinske lipaze (LPL) u odnosu na zdrave trudnice. Primjeren prijenos masnih kiselina kroz posteljicu u smjeru fetusa ima značajnu ulogu za uredan fetalni razvoj i osigurava važan izvor energije, te preteča staničnih signalizirajućih molekula.

Lipolitička aktivnost značajno se povećava tijekom trećeg tromjesečja (Elliott, 1975) i to je vjerojatno važno za poticanje zdravog fetalnog rasta kroz odgovarajuću dostavu esencijalnih PUFA preko posteljice. Manjak opskrbe esencijalnim PUFA zbog disfunkcije posteljice i nedostatne perinatalne konzumacije pripisan je specifičnim štetnim ishodima trudnoće (Morgan, 2014).

Trudnoće komplicirane s DM-1 obično imaju povišen materno-fetalni koncentracijski gradijent, posebno za slobodne masne kiseline (FFA, engl. *free fatty acid*) i triacilglicerole (TAG) (Hollingsworth i Grundy, 1982; Montelongo i sur., 1992). Time se objašnjava činjenica da trudnice s DM-1 češće rađaju djecu s povećanom tjelesnom masom (Osmond i sur., 2000). Zbog pojačanog unosa, te hidrolitičke i reesterifikacijske aktivnosti posteljice u trudnica dijabetičarki dolazi do akumulacije TAG i fosfolipida u posteljici (Diamant i sur., 1982). U takvim slučajevima uslijed fiziološke aktivnosti, te povećanog prijenosa slobodnih masnih kiselina i TAG u smjeru fetusa, dolazi do nakupljanja lipida u posteljičnom tkivu (Knopp i sur., 1985; Desoye i Shafrir, 1994).

Aktivnost placentne LPL smanjena je 47% i u IUGR (zastoj u rastu fetusa, engl. *intrauterine growth restriction*) dok je u DM-1 trudnoćama aktivnost povećana 39% u usporedbi s kontrolama (Magnusson i sur., 2004), te je povezana s prekomjernim fetalnim rastom kod trudnica s DM-1 (Lindegaard i sur., 2006). Ovi podaci su u skladu s hipotezom da promjene u aktivnosti placentne LPL pridonose promjeni prijenosa FFA fetusu i posljedično fetalnom rastu (Magnusson i sur., 2004).

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2. 1. Hipoteza

Prehrana bogata n-3 višestruko nezasićenim masnim kiselinama djeluje zaštitno i može utjecati na stvaranje endogenog inzulina i očuvanje beta-stanica kod trudnica s dijabetesom tipa 1. Od istraživanja se očekuje da će trudnice koje uzimaju hranu bogatu n-3 višestruko nezasićenim masnim kiselinama imati više vrijednosti C-peptida natašte od onih koje ne uzimaju.

2. 2. Ciljevi istraživanja

1. Istražiti utjecaj n-3 višestruko nezasićenih masnih kiselina na izlučivanje C-peptida kod trudnica koje boluju od dijabetesa tipa 1.

2. Istražiti razlike u koncentraciji pojedinih n-3 višestruko nezasićenih masnih kiselina između istraživanih skupina, u krvi majke i krvi pupčane vene.

2. 3. Znanstveni doprinos

Očekuje se utjecaj n-3 višestruko nezasićenih masnih kiselina na povećanje koncentracije C-peptida kod trudnica oboljelih od dijabetesa tipa 1. Povećana koncentracija C-peptida kod trudnica oboljelih od dijabetesa tipa 1 rezultirat će smanjenjem doze inzulina, boljom metaboličkom kontrolom, smanjenjem učestalosti hipoglikemija, nižim vrijednostima HbA_{1c} i rađanjem eutrofične novorođenčadi.

3. SUDIONICE I METODE ISTRAŽIVANJA

3. SUDIONICE I METODE ISTRAŽIVANJA

3. 1. Sudionice

U Klinici za ženske bolesti i porođaje KBC-a Zagreb, na Odjelu za dijabetes i fetalni rast, djeluje Referentni centar Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi za dijabetes u trudnoći, gdje se uspješno nadziru i liječe trudnice s dijabetesom. Tijekom jednogodišnjeg razdoblja u Referentnom centru liječi se i porađa 60-ak trudnica sa šećernom bolešću tipa 1 (DM-1). U razdoblju od kraja 2013. godine pa do početka 2017. u istraživanje je uključeno 100 trudnica koje boluju od DM-1.

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Etičkog povjerenstva Klinike za ženske bolesti i porođaje te Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra u Zagrebu. Sve su sudionice bile informirane o istraživanju („*Obavijest za ispitanika*“) te su potpisale „*Suglasnost za sudjelovanje odraslog ispitanika u istraživanju*“.

Sudionice su uključene u istraživanje prilikom prvog pregleda na Odjelu za dijabetes i fetalni rast u Klinici za ženske bolesti i porođaje u Zagrebu i podijeljene u dvije skupine. Kontrolna je skupina (n=50) bila samo na uobičajenoj dijabetičkoj prehrani, dok je istraživana skupina (n=50) pored uobičajene dijabetičke dijeta od 12. tjedna trudnoće do porođaja uzimala dodatak prehrani obogaćen n-3 višestruko nezasićenim masnim kiselinama (PUFA).

Dodatak prehrani obogaćen n-3 nezasićenim masnim kiselinama osiguran je donacijom kapsula *Pregnazon Complete* (HealthAid LTD), ljubaznošću tvrtke Kormedix d.o.o, Zagreb, Hrvatska. Kapsule osim ostalih optimalnih/potrebni vitamina i mineralnih tvari za trudnice sadrže i 195 mg n-3 PUFA, od toga 30 mg eikozapentaenske kiseline (EPA, C20:5n-3) i 154 mg dokozaheksaenske kiseline (DHA, C22:6n-3).

Trudnice u ispitivanoj skupini uzimale su *Pregnazon Complete* kapsulu dva puta dnevno uz obrok.

U studiju su uključene dijabetične trudnice koje nisu imale komplikacija dijabetesa, a tijek trudnoće je protekao uredno i rodile su zdravu novorođenčad. U slučaju prijevremenog porođaja, višepodne trudnoće, trudnoće s nekom drugom izraženom patologijom, kao i trudnoće s kromosomskim anomalijama ili malformacijama ploda, sudionice su bile isključene iz istraživanja.

Gestacijska dob određivana je prema datumu prvog dana zadnje menstruacije i potvrđena ultrazvučnim pregledom u ranoj trudnoći (6 do 10 tjedana).

Trudnice su bile na intenziviranoj inzulinskoj terapiji (kombinacija kratkodjelujućeg i dugodjelujućeg inzulina ili inzulinske pumpe) i imale su dobro kontroliranu glikemiju. Doza inzulina izražena je kao internacionalna jedinica po kilogramu tjelesne mase [IU/kg]. Izračuna se tako da se zbroje sve dnevne doze kratkodjelujućeg (ili dugodjelujućeg) inzulina koje trudnice primaju te podijeli s kilogramima tjelesne mase.

Trudnoće su dovršene uglavnom carskim rezom (94%) između 37. i 40. tjedna trudnoće.

3. 2. Kemikalije

Standardi za plinsku kromatografiju (Supelco FAME MIX 37, PUFA No.1, PUFA No.3) proizvod su tvornice Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA. Organska otapala korištena za ekstrakciju ukupnih lipida kupljena su od tvrtke Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka, kao i interni standard heptadekaenske kiseline, bezvodni natrijev sulfat, 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (BHT) i koncentrirana kloridna kiselina.

3. 3. Metode

3. 3. 1. Uzorkovanje krvi

Uzorci krvi uzeti su ujutro natašte, iz lijeve kubitalne vene, u epruvete s gelom za razdvajanje seruma (Vacuette® tube 5 mL Z Serum Separator Clot Activator). Svi uzorci su unutar sat vremena od uzorkovanja centrifugirani na $1400\times g$ (3000 o/min) 10 minuta, nakon čega je serum odvojen, rastučen u dvije epruvete (Cryo tube) i pohranjen u zamrzivač na $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ do daljnje analize.

Uzorci krvi uzimani su prilikom prvog dolaska u Kliniku (1. tromjesečje, do 14. tjedna trudnoće), zatim u 2. tromjesečju (19. - 24. tjedan) i u 3. tromjesečju (30. - 33. tjedan). Na dan porođaja uzorak krvi je uzet natašte, prije porođaja. Uzorak krvi iz pupčane vene uzet je neposredno nakon porođaja.

Koncentracija glukoze u krvi i C-peptida, te postotak glikiranog hemoglobina (HbA_{1c}) u krvi majke i u pupčanoj venskoj krvi određene su na dan vađenja uzoraka, dok je analiza ukupnih lipida provedena naknadno.

3. 3. 2. Određivanje koncentracije C-peptida

Određivanje koncentracije C-peptida (nmol/L) provedeno je u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb elektrokemi-luminiscentnom metodom „ECLIA“ na autoanalizatoru Roche-Elecsys (Roche Diagnostics, Švicarska), reagensom istog proizvođača.

Upotreba vrlo različitih mjernih jedinica za izražavanje vrijednosti C-peptida u kliničkoj praksi može dovesti do zabuna. Stoga se C-peptid uobičajeno izražava u nmol/L, pmol/L ili ng/L. U ovom istraživanju koncentracija C-peptida izražena je u nmol/L, a referentni raspon je 0,37 – 1,47 nmol/L. Analitička osjetljivost 0,01 nmol/L.

3. 3. 3. Određivanje koncentracije glukoze

Koncentracija glukoze (mmol/L) određena je enzimskim UV testom (referentna metoda s heksokinazom) na Roche Cobas C301 analizatoru korištenjem reagensa istog proizvođača (Roche Diagnostics, Švicarska), u Klinici za ženske bolesti i porođaje. Analitička osjetljivost 0,056 mmol/L.

3. 3. 4. Određivanje glikiranog hemoglobina

Određivanje vrijednosti HbA_{1c} (%) turbidimetrijskom inhibicijskom imunoanalizom na analizatoru Roche Cobas C501, reagensom istog proizvođača (Roche Diagnostics, Švicarska), izvršeno je u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb.

3. 3. 5. Ekstrakcija ukupnih lipida seruma

Ekstrakcija ukupnih lipida i prevođenje masnih kiselina u metilne estere provedena je na Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ukupni lipidi su iz uzoraka seruma izdvojeni modificiranom metodom po Folchu, ekstrakcijom organskim otapalima (Folch i sur. 1957).

Ekstrakcija je provedena smjesom otapala kloroforma i metanola uz dodatak antioksidansa BHT. Odleđenom uzorku seruma (2 mL) dodano je 8 mL smjese otapala CHCl₃:MeOH = 2:1 (v : v) te je uzorak postavljen na tresilicu tijekom 10 minuta, nakon čega je uzorak centrifugiran pri 2000 o/min kroz 5 minuta. Pasteurovom pipetom odvoji se donji (organski) sloj uzorka u novu staklenu epruvetu. Postupak je ponovljen dodatkom još 1 mL smjese otapala. Izdvojenoj organskoj fazi dodan je bezvodni natrijev sulfat (Na₂SO₄) kako bi vezao ostatke vode iz otapala. Uzorak se profiltrira u prethodno vagnute epruvete i upari do suha u vakuum uparivaču (UNIVAPO 100H) opremljenom jedinicom za hlađenje (UNICRYO MC2L -80°C, UniEquip Martinsried, Njemačka). Ekstrahirani lipidi koriste se za daljnje određivanje sastava masnih kiselina.

3. 3. 6. Priprema metilnih estera masnih kiselina

Prevođenje masnih kiselina u hlapljive derivate provedeno je postupkom transesterifikacije uz metanolnu HCl, pri čemu nastaju metilni esteri masnih kiselina (engl. *Fatty Acid Methyl Ester*, FAME), internacionalni standardni postupak ISO 5509 (ISO, 2000).

Na upareni ekstrakt ukupnih lipida doda se 2 mL metanolne HCl (1 M HCl u metanolu), te se epruvete dobro zatvore i stave u termostat na 100°C kroz 45 min. Nakon hlađenja epruveta, provodi se ekstrakcija FAME u organsko otapalo. Ekstrakcija se provodi dodatkom 5 mL petroletera, smjesa se dobro promiješa, centrifugira i gornji (organski) sloj odvoji se u novu staklenu epruvetu. Postupak se ponavlja četiri puta kako bi se što uspješnije izdvojili metilni esteri. Potom se organska faza ispiri sa po 5 mL destilirane vode do neutralnog pH. Nakon ekstrakcije donji (vodeni) sloj se baca, a prikupljenoj organskoj fazi dodaje se bezvodni Na₂SO₄ preko noći, kako bi se uklonila zaostala voda. Sulfat se ukloni filtracijom, a otapalo upari do suha. Epruvete se propušu čistim dušikom, zatvore i čuvaju na -65 °C do analize na plinskom kromatografu.

3. 3. 7. Plinska kromatografija (GC-FID)

Analiza sastava metilnih estera masnih kiselina provedena je plinskom kromatografijom je na kromatografu Agilent 7890B (Agilent Technologies, CA, SAD), opremljenom plameno-ionizacijskim detektorom (FID). Analiza je omogućena ljubaznošću tvrtke Sample Control d.o.o. Za razdvajanje metilnih estera korištena je kapilarna kolona HP-88, duljine 100 m, unutarnjeg promjera 0,25 mm te debljine aktivnog sloja 0,20 μm (Agilent J&W, SAD). Instrument je opremljen uređajem za automatsko injektiranje uzorka („*autosampler*“) istog proizvođača uz mogućnost aplikacije smanjenog volumena uzorka („*split/splitless*“ sustav). Temperatura injektora iznosila je 200 °C, a temperatura detektora 250 °C.

Početna temperatura kolone iznosila je 140 °C prvih 5 minuta, a potom slijedi porast od 4 °C/min do 240 °C, koja se zadržava 15 minuta. Uzorak (0,5 μL) je injektiran u split modu omjera 1:100. Kao plin nosač korišten je helij čistoće 6.0, uz protok od 0,8 mL/min.

Identifikacija pojedinih masnih kiselina provedena je na temelju vremena retencije usporedbom s vremenom retencije poznatih standarda (PUFA No. 1, PUFA No.3, C8-C20, Supelco 37 Component FAME mix, sve Supelco, SAD).

Sadržaj masnih kiselina izražen je kao relativni maseni udio (%) i masena koncentracija (mg/L). Kvantitativno određivanje pojedinih masnih kiselina provedeno je usporedbom površine vrška internog standarda (heptadekanska kiselina, C 17:0, Sigma Aldrich, Njemačka), s površinom vrška pojedine masne kiseline. Obrada kromatograma provedena je integriranim računalnim programom Agilent 7890B GC (Agilent Technologies, CA, SAD).

3. 3. 8. Statistička analiza

Kategorijalne varijable predstavljene su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Kvantitativne varijable opisane su srednjom vrijednosti (aritmetičkom sredinom) i standardnom devijacijom u slučaju varijabli koje slijede normalnu raspodjelu, a u ostalim slučajevima središnjom vrijednosti (medijanom) i granicama interkvartilnog raspona.

Normalnost raspodjele kvantitativnih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Postojane statistički značajne razlike između dviju nezavisnih skupina kod normalno distribuiranih kvantitativnih varijabli testirane su Studentovim t testom, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyevim U testom. Razlike kategorijskih varijabli testirane su χ^2 testom, a po potrebi Fisherovim egzaktnim testom. Povezanost normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli ocijenjena je Pearsonovim koeficijentom korelacije r , a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Spearmanovim koeficijentom korelacije ρ . Postojanje statističkih promjena unutar ispitanika kroz vrijeme u pojedinim varijablama (mjerenjima) testiranje Friedmanovim testom uz dodatnu *post hoc* usporedbu uz korištenje Wilcoxonovog testa (uz Bonferronijevu korekciju).

Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na $\alpha=0,05$. Podaci su analizirani statističkim postupcima pomoću programa MedCalc Statistical Software version 13.1.2 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgija; <http://www.medcalc.org>; 2014).

4. REZULTATI

4. REZULTATI

4. 1. Podaci o sudionicama

Istraživanjem je obuhvaćeno 100 sudionica, od kojih je 50 bilo na uobičajenoj dijabetičkoj dijeti (kontrolna skupina), dok ih je 50 uz uobičajenu dijabetičku dijetu uzimalo i dodatak prehrani obogaćen n-3 višestruko nezasićenim masnim kiselinama (istraživana skupina). Između opisanih dviju skupina nije bilo razlike u dobi ni trajanju dijabetesa, kako je prikazano u tablici 1.

Tablica 1. Dob sudionica i trajanje dijabetesa u skupinama sudionica

Ispitivana varijabla	Istraživana		Kontrolna		Z	P
	N	C (raspon)	N	C (raspon)		
Dob trudnice [godine]	50	30 (20-46)	50	31 (20-41)	0,382	-0,874
Trajanje dijabetesa [godine]	50	11 (1-28)	50	12 (1-30)	0,209	-1,258

Napomena:

N - broj sudionica; C - medijan; Z – vrijednost Mann Whitneyjevog testa; P – statistička vjerojatnost

Također, nije pokazana značajna razlika u indeksu tjelesne mase sudionica u ispitivanoj u odnosu na kontrolnu skupinu, kao i porastu tjelesne mase trudnica tijekom trudnoće (tablica 2).

Tablica 2. Indeks tjelesne mase i porast tjelesne mase tijekom trudnoće u skupinama sudionica

Ispitivana varijabla	Istraživana			Kontrolna			t	P
	N	\bar{X}	SD	N	\bar{X}	SD		
Indeks tjelesne mase prije trudnoće [kg/m ²]	50	22,7	3,1	50	22,9	3,3	-0,269	0,789
Porast tjelesne mase tijekom trudnoće [kg]	50	13,6	4,9	50	12,5	4,3	1,157	0,250

Napomena:

N - broj sudionica; \bar{X} - srednja vrijednost; SD - standardna devijacija; t – vrijednost Studentovog t-testa; P – statistička vjerojatnost

Nije pokazana statistički značajna razlika u tjednu dovršenja trudnoće, kao ni načinu dovršenja trudnoće. U kontrolnoj skupini 98% trudnoća

dovršeno je carskim rezom, a u istraživanoj skupini 90% ($\chi^2 = 2,837$; $P = 0,092$). Novorođenčad se po skupinama nije razlikovala s obzirom na porođajnu masu i duljinu, Ponderalni indeks, pH pupčane arterije kao ni ocjenama po Apgarovoj u 1. i 5. minuti (Apgar 1. minuta $t = -0,854$, $P = 0,097$; Apgar 5. minuta $t = -0,791$, $P = 0,111$) (tablica 3).

Tablica 3. Podaci o novorođenčadi kontrolne i istraživane skupine

Ispitivana varijabla	Istraživana			Kontrolna			t	P
	N	\bar{X}	SD	N	\bar{X}	SD		
Tjedan dovršenja trudnoće	50	38,5	0,8	50	38,2	1,0	1,331	0,674
Tjelesna masa novorođenčeta [g]	50	3464	510	50	3457	487	0,070	0,944
Tjelesna duljina novorođenčeta [cm]	50	49	2	50	49	2	-0,205	0,838
Ponderalni indeks [kg/cm^3]	50	2,90	0,30	50	2,88	0,26	0,430	0,668
pH pupčane arterije	50	7,24	0,07	50	7,24	0,08	-0,182	0,856

Napomena:

N - broj sudionica; \bar{X} - srednja vrijednost, SD - standardna devijacija; t – vrijednost Studentovog t-testa; P – statistička vjerojatnost

4. 2. Koncentracija glukoze u krvi (GUK) natašte

Koncentracija glukoze u krvi (GUK) natašte u drugom tromjesečju trudnoće bila je statistički značajno niža u istraživanoj nego u kontrolnoj skupini, dok u prvom i trećem tromjesečju, te na dan porođaja, nije bilo statistički značajne razlike između skupina u koncentraciji GUK natašte (tablica 4).

Tablica 4. Koncentracija glukoze u krvi (GUK) natašte u sudionica istraživane i kontrolne skupine po tromjesečjima i na dan porođaja

GUK [mmol/L]	Istraživana			Kontrolna			t	P
	N	\bar{X}	SD	N	\bar{X}	SD		
1. tromjesečje	49	5,1	1,9	49	4,9	2,0	0,579	0,564
2. tromjesečje	50	4,2	1,4	50	4,9	2,0	-2,198	0,031
3. tromjesečje	50	4,9	1,9	50	4,6	1,2	1,065	0,290
porođaj	48	5,4	1,7	50	5,4	1,9	0,084	0,933

Napomena:

N - broj sudionica; \bar{X} - srednja vrijednost, SD - standardna devijacija; t – vrijednost Studentovog t-testa; P – statistička vjerojatnost

U istraživanoj skupini pokazana je statistički značajna razlika u koncentraciji GUK natašte između prvog i drugog tromjesečja, drugoga i trećeg tromjesečja te drugoga tromjesečja i na dan porođaja. Slično vrijednostima HbA_{1c}, vrijednosti su bile najmanje u drugome tromjesečju, a najveće na dan porođaja. U kontrolnoj skupini sudionica statistički značajna razlika bila je jedino u trećem tromjesečju u odnosu na dan porođaja (veća je bila vrijednost na dan porođaja), kako je prikazano u tablici 5.

Tablica 5. Razlike u koncentraciji glukoze u krvi (GUK) natašte u krvi sudionica istraživane i kontrolne skupine po tromjesečjima i na dan porođaja

Tromjesečja	Istraživana		Kontrolna	
	t	P	t	P
1. tromj. - 2. tromj.	2,842	0,007	-0,304	0,763
1. tromj. - 3. tromj.	0,958	0,343	0,938	0,353
1. tromj. - porođaj	-0,640	0,525	-1,431	0,159
2. tromj. - 3. tromj.	-2,629	0,011	1,089	0,282
2. tromj. - porođaj	-4,848	<0,001	-1,136	0,262
3. tromj. - porođaj	-1,304	0,199	-3,030	0,004

Napomena:

t – vrijednost t-testa vezanih uzoraka; P – statistička vjerojatnost

4. 3. Postotak glikiranog hemoglobina (HbA_{1c})

Nije pokazana statistički značajna razlika u postotku HbA_{1c} u krvi po tromjesečjima između sudionica kontrolne i istraživane skupine (tablica 6).

Tablica 6. Postotak glikiranog hemoglobina (HbA_{1c}) u krvi sudionica istraživane i kontrolne skupine po tromjesečjima

HbA _{1c} [%]	Istraživana			Kontrolna			t	P
	N	\bar{X}	SD	N	\bar{X}	SD		
1. tromjesečje	49	6,9	1,2	49	6,6	1,2	1,001	0,319
2. tromjesečje	50	5,7	0,6	50	5,5	0,6	1,363	0,176
3. tromjesečje	48	5,9	0,8	48	5,8	0,8	0,984	0,327

Napomena:

N - broj sudionica; \bar{X} - srednja vrijednost, SD - standardna devijacija; t – vrijednost Studentovog t-testa; P – statistička vjerojatnost

U svakoj skupini zasebno, tj. istraživanoj kao i u kontrolnoj, utvrđena je statistički značajna razlika u postotku HbA_{1c} između prvog i drugog, prvog i trećeg te drugog i trećeg tromjesečja (tablica 5). U obje skupine vrijednost postotka HbA_{1c} bila je najmanja u drugome tromjesečju, a najveća u prvome tromjesečju (tablica 7).

Tablica 7. Razlike postotka glikiranog hemoglobina (HbA_{1c}) u krvi sudionica istraživane i kontrolne skupine po tromjesečjima

Tromjesečja	Istraživana		Kontrolna	
	t	P	t	P
1. tromj. - 2. tromj.	8,526	<0,001	8,811	<0,001
1. tromj. - 3. tromj.	6,548	<0,001	5,730	<0,001
2. tromj. - 3. tromj.	-3,828	0,001	-3,598	0,001

Napomena:

t – vrijednost t-testa za vezane uzorke; P – statistička vjerojatnost

4. 4. Koncentracija C-peptida u krvi natašte

Koncentracija C-peptida u krvi u trećem tromjesečju trudnoće bila je statistički značajno veća u istraživanoj nego u kontrolnoj skupini sudionica, dok u prvom i drugom tromjesečju nije bilo statistički značajne razlike između skupina sudionica (tablica 8). Najveća vrijednost koncentracije C-peptida u krvi izmjerena je u istraživanoj skupini sudionica u trećem tromjesečju (tablica 8).

Tablica 8. Koncentracija C-peptida natašte u krvi sudionica istraživane i kontrolne skupine po tromjesečjima

C-peptid [nmol/L]	Istraživana				Kontrolna				Z	P
	N	C	P.25	P.75	N	C	P.25	P.75		
1. tromjesečje	49	0,01	0,01	0,05	48	0,01	0,01	0,03	-0,194	0,846
2. tromjesečje	50	0,01	0,01	0,08	49	0,01	0,01	0,02	-1,335	0,182
3. tromjesečje	50	0,02	0,01	0,09	50	0,01	0,01	0,03	-2,085	0,037

Napomena:

N - broj sudionica; C - medijan; P.25. – 25. percentil, P.75. – 75. percentil;

Z – vrijednost Mann Whitneyjevog testa; P – statistička vjerojatnost

U istraživanoj skupini pokazana je statistički značajna razlika u koncentraciji C-peptida u krvi između prvog i trećeg tromjesečja te drugoga i trećeg tromjesečja (tablica 9).

Tablica 9. Razlike u koncentraciji C-peptida natašte u krvi sudionica istraživane i kontrolne skupine po tromjesečjima

Tromjesečja	Istraživana		Kontrolna	
	Z	P	Z	P
1. tromj. - 2. tromj.	-0,888	0,374	-0,741	0,459
1. tromj. - 3. tromj.	-3,661	<0,001	-0,172	0,864
2. tromj. - 3. tromj.	-3,051	0,002	-1,284	0,199

Napomena:

Z – vrijednost Wilcoxonovog testa ekvivalentnih parova; P – statistička vjerojatnost (uz Bonferonijevu korekciju za ponavljana mjerenja, $P < 0,017$)

Razlika C-peptida (Δ C-peptid) između trećega i prvog tromjesečja bila je značajno veća u istraživanoj skupini sudionica u odnosu na kontrolnu skupinu (tablica 10).

Tablica 10. Razlika vrijednosti koncentracije C-peptida (Δ C-peptid) između 3. i 1. tromjesečja u krvi sudionica istraživane i kontrolne skupine

(Δ C-peptid)	N	C	P.25	P.75	Z	P
Istraživana	49	0,00	0,00	0,03	-3,377	0,001
Kontrolna	48	0,00	0,00	0,00		

Napomena:

C - medijan; P.25. – 25. percentil, P.75. – 75. percentil; Z – vrijednost Mann Whitneyjevog testa; P – statistička vjerojatnost

Ukoliko se u analizu uključe samo podaci za sudionice koje su imale mjerljive vrijednosti C-peptida u prvom tromjesečju trudnoće, koncentracije C-peptida u trećem tromjesečju su se statistički značajno razlikovale između kontrolne i istraživane skupine sudionica, dok u prvom i drugom tromjesečju nije bilo statistički značajnih razlika u koncentraciji C-peptida između kontrolne i istraživane skupine sudionica (tablica 11). Najveća vrijednost C-peptida u krvi izmjerena je u istraživanoj skupini sudionica u trećem tromjesečju (tablica 11).

Tablica 11. Koncentracija C-peptida u krvi kod sudionica koje su imale mjerljivu koncentraciju C-peptida u 1. tromjesečju

C-peptid [nmol/L]	Istraživana				Kontrolna				Z	P
	N	C	P.25	P.75	N	C	P.25	P.75		
1. tromjesečje	16	0,13	0,06	0,21	16	0,04	0,03	0,23	-1,155	0,248
2. tromjesečje	16	0,13	0,07	0,26	15	0,08	0,02	0,23	-1,544	0,123
3. tromjesečje	16	0,22	0,08	0,37	16	0,07	0,04	0,22	-2,152	0,031

Napomena:

N - broj sudionica; C - medijan; P.25. – 25. percentil, P.75. – 75. percentil; Z – vrijednost Mann Whitneyjevog testa; P – statistička vjerojatnost

Kod sudionica koje su imale mjerljivu koncentraciju C-peptida u prvom tromjesečju trudnoće, razlika u koncentraciji C-peptida između trećega i prvog tromjesečja bila je značajno veća u istraživanoj skupini sudionica nego u kontrolnoj skupini (tablica 12).

Tablica 12. Razlika vrijednosti koncentracije C-peptida (Δ C-peptid) između 3. i 1. tromjesečja u krvi sudionica koje su imale mjerljivu koncentraciju C-peptida u 1. tromjesečju

(Δ C-peptid)	N	C	P.25	P.75	Z	P
Istraživana	16	0,05	0,01	0,18	-2,587	0,008
Kontrolna	16	0,00	-0,02	0,03		

Napomena:

N - broj sudionica; C - medijan; P.25. – 25. percentil, P.75. – 75. percentil;
Z – vrijednost Mann Whitneyjevog testa; P – statistička vjerojatnost

Ukoliko se u analizu uključe samo podaci za sudionice koje nisu imale mjerljive vrijednosti C-peptida u prvom tromjesečju trudnoće, koncentracije C-peptida u trećem tromjesečju su se statistički značajno razlikovale između kontrolne i istraživane skupine sudionica dok u prvom i drugom tromjesečju nije bilo statistički značajnih razlika u koncentraciji C-peptida između kontrolne i istraživane skupine sudionica (tablica 13).

Tablica 13. Koncentracija C-peptida u krvi kod sudionica koje nisu imale mjerljivu koncentraciju C-peptida u 1. tromjesečju

C-peptid [nmol/L]	Istraživana				Kontrolna				Z	P
	N	C	P.25	P.75	N	C	P.25	P.75		
1. tromjesečje	32	0,01	0,01	0,01	32	0,01	0,01	0,01	0,000	1,000
2. tromjesečje	32	0,01	0,01	0,01	34	0,01	0,01	0,01	-0,658	0,511
3. tromjesečje	32	0,01	0,01	0,02	34	0,01	0,01	0,01	-3,073	0,002

Napomena:

N - broj sudionica; C - medijan; P.25. – 25. percentil, P.75. – 75. percentil;
Z – vrijednost Mann Whitneyjevog testa; P – statistička vjerojatnost

Kod sudionica koje nisu imale mjerljivu koncentraciju C-peptida u 1. tromjesečju trudnoće, razlika u koncentraciji C-peptida između trećega i prvog tromjesečja značajno veća u istraživanoj skupini sudionica za razliku od kontrolne skupine u kojoj nije bilo promjena (tablica 14).

Tablica 14. Razlika vrijednosti koncentracije C-peptida (Δ C-peptid) između 3. i 1. tromjesečja u krvi sudionica koje nisu imale mjerljivu koncentraciju C-peptida u 1. tromjesečju

(Δ C-peptid)	N	C	P.25	P.75	Z	P
Istraživana	32	0,00	0,00	0,01	-2,971	0,003
Kontrolna	32	0,00	0,00	0,00		

Napomena:

N - broj sudionica; C - medijan; P.25. – 25. percentil, P.75. – 75. percentil; Z – vrijednost Mann Whitneyjevog testa; P – statistička vjerojatnost

4. 5. Doze inzulina

Nije pokazana statistički značajna razlika u dozama kratkodjelujućeg inzulina po tromjesečjima između sudionica u istraživanoj i kontrolnoj skupini (tablica 15).

Tablica 15. Doze kratkodjelujućeg inzulina po tromjesečjima (uključene jedinice inzulina primijenjene uz pomoć inzulinske pumpe)

Doza kratkodjelujućeg inzulina [IU/kg]	Istraživana			Kontrolna			t	P
	N	\bar{X}	SD	N	\bar{X}	SD		
1. tromjesečje	50	0,42	0,15	50	0,37	0,15	1,598	0,113
2. tromjesečje	50	0,42	0,16	50	0,37	0,13	1,625	0,108
3. tromjesečje	50	0,45	0,16	50	0,43	0,16	0,698	0,487

Napomena:

N - broj sudionica; \bar{X} - srednja vrijednost, SD - standardna devijacija; t – vrijednost Studentovog t-testa; P – statistička vjerojatnost

Nije pokazana statistički značajna razlika u dozama dugodjelujućeg inzulina po tromjesečjima između sudionica u kontrolnoj i istraživanoj skupini (tablica 16).

Tablica 16. Doze dugodjelujućeg inzulina po tromjesečjima (uključene jedinice inzulina primijenjene uz pomoć inzulinske pumpe)

Doza dugodjelujućeg inzulina [IU/kg]	Istraživana			Kontrolna			t	P
	N	\bar{X}	SD	N	\bar{X}	SD		
1. tromjesečje	47	0,32	0,14	47	0,35	0,12	-1,056	0,294
2. tromjesečje	47	0,31	0,10	49	0,32	0,11	-0,539	0,591
3. tromjesečje	47	0,32	0,13	49	0,34	0,11	-0,732	0,466

Napomena:

N - broj sudionica; \bar{X} - srednja vrijednost, SD - standardna devijacija; t – vrijednost Studentovog t-testa; P – statistička vjerojatnost

4. 6. Koncentracija glukoze i C-peptida u krvi pupčane vene

Nije pokazana statistički značajna razlika u koncentraciji glukoze i C-peptida u krvi pupčane vene između sudionica u istraživanoj i kontrolnoj skupini (tablica 17).

Tablica 17. Koncentracija glukoze i C-peptida u krvi pupčane vene sudionica istraživane i kontrolne skupine

Ispitivana varijabla	Istraživana			Kontrolna			t	P
	N	\bar{X}	SD	N	\bar{X}	SD		
glukoza [mmol/L]	47	4,5	1,5	48	4,9	1,5	-1,258	0,211
C-peptid [nmol/L]	46	0,86	0,52	47	0,94	0,64	-0,626	0,533

Napomena:

N - broj sudionica; \bar{X} - srednja vrijednost, SD - standardna devijacija; t – vrijednost Studentovog t-testa; P – statistička vjerojatnost

4. 7. Sastav masnih kiselina ukupnih lipida seruma

Prilikom analize masnokiselinskog sastava ukupnih lipida seruma identificirane su 23 različite masne kiseline. Prikaz rezultata sažet je na ciljane masne kiseline koje pokazuju povezanost s koncentracijom C-peptida. Konkretno, prikazani su rezultati za eikozapentaensku (EPA, C20:5n-3) i dokozaheksaensku (DHA, C22:6n-3) kiselinu kao predstavnike n-3 skupine višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA), te arahidonsku kiselinu (AA, C20:4n-6) kao predstavnika n-6 skupine PUFA.

Od karakterističnih omjera masnih kiselina prikazani su omjeri suma n-6 i n-3 PUFA (n-6/n-3) te arahidonske i dokozaheksaenske kiseline (AA/DHA).

Sastav masnih kiselina ukupnih lipida u serumu sudionica prikazan je masenom koncentracijom (mg/L) i masenim udjelom (%), te izražen medijanom i interkvartilnim rasponom (25. i 75. percentila) uz razinu statističke značajnosti (P) ili vjerojatnost pogreške tipa I (α). Statistički značajne razlike između kontrolne i istraživane skupine, te promjene po tromjesečjima i dan porođaja iskazane su sa **P < 0,05**.

4. 7. 1. Masena koncentracija pojedinih masnih kiselina u serumu trudnica

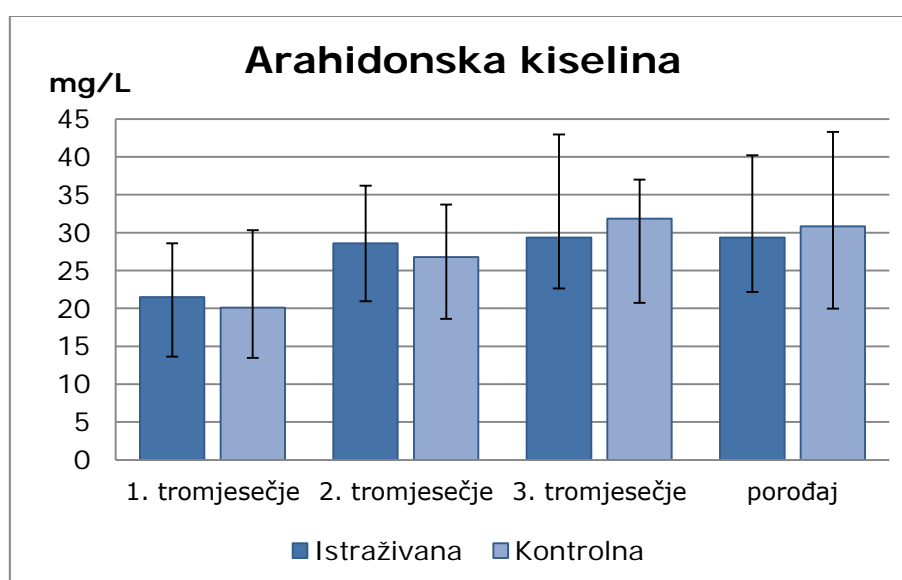
U masenoj koncentraciji AA nije bilo statistički značajne razlike između skupina sudionica po tromjesečjima te na dan porođaja. U obje skupine masena koncentracija AA bila je najmanja u prvom tromjesečju, dok je u istraživanoj skupini bila najveća na dan porođaja, a u kontrolnoj skupini u trećem tromjesečju (tablica 18, slika 2).

Tablica 18. Masena koncentracija (mg/L) arahidonske kiseline (AA) u serumu sudionica istraživane i kontrolne skupine po tromjesečjima i na dan porođaja

AA [mg/L]	Istraživana		Kontrolna		Z	P
	N	^C (25. P – 75. P)	N	^C (25. P – 75. P)		
1. tromjesečje	41	21,50 (13,64 - 28,58)	42	20,09 (13,47 - 30,32)	-0,287	0,774
2. tromjesečje	42	28,59 (20,92 - 36,20)	41	26,78 (18,62 - 33,72)	-0,246	0,806
3. tromjesečje	41	29,34 (22,63 - 42,96)	41	31,84 (20,71 - 36,98)	-0,413	0,680
porođaj	42	29,36 (22,16 - 40,19)	42	30,81 (19,95 - 43,31)	-0,107	0,915

Napomena:

N - broj sudionica; C - medijan; P.25. – 25. percentil, P.75. – 75. percentil;
Z – vrijednost Mann Whitneyjevog testa; P – statistička vjerojatnost



Slika 2. Masena koncentracija (mg/mL) arahidonske kiseline u serumu sudionica istraživane i kontrolne skupine kroz trudnoću

U masenoj koncentraciji EPA nije bilo statistički značajne razlike između skupina sudionica po tromjesečjima te na dan porođaja. U obje skupine masena koncentracija EPA bila je najmanja u prvom tromjesečju, dok je u istraživanoj skupini bila najveća u trećem tromjesečju, a u kontrolnoj skupini u drugom tromjesečju (tablica 19, slika 3).

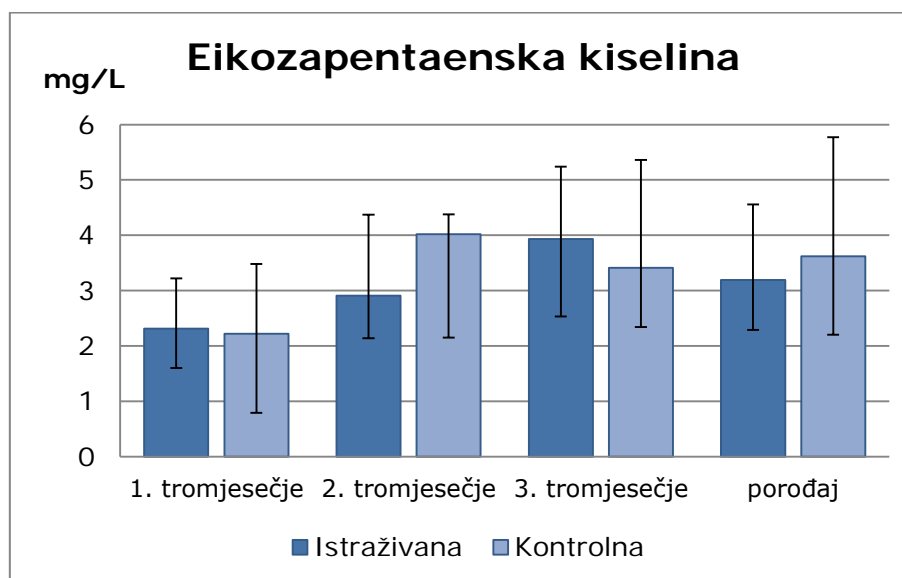
Tablica 19. Masena koncentracija (mg/L) eikozapentaenske kiseline (EPA) u serumu sudionica istraživane i kontrolne skupine po tromjesečjima i na dan porođaja

EPA [mg/L]	Istraživana		Kontrolna		Z	P
	N	^C (25. P – 75. P)	N	^C (25. P – 75. P)		
1. tromjesečje	41	2,31 (1,60 - 3,22)	42	2,22 (0,79 - 3,48)	-0,493	0,622
2. tromjesečje	42	2,91 (2,14 - 4,37)	41	4,02 (2,15 - 4,38)	-0,774	0,439
3. tromjesečje	41	3,93 (2,53 - 5,24)	41	3,41 (2,34 - 5,36)	-0,635	0,525
porođaj	42	3,19 (2,29 - 4,56)	42	3,62 (2,20 - 5,77)	-0,604	0,546

Napomena:

N - broj sudionica; C - medijan; P.25. – 25. percentil, P.75. – 75. percentil;

Z – vrijednost Mann Whitneyjevog testa; P – statistička vjerojatnost



Slika 3. Masena koncentracija (mg/mL) eikozapentaenske kiseline u serumu sudionica istraživane i kontrolne skupine kroz trudnoću

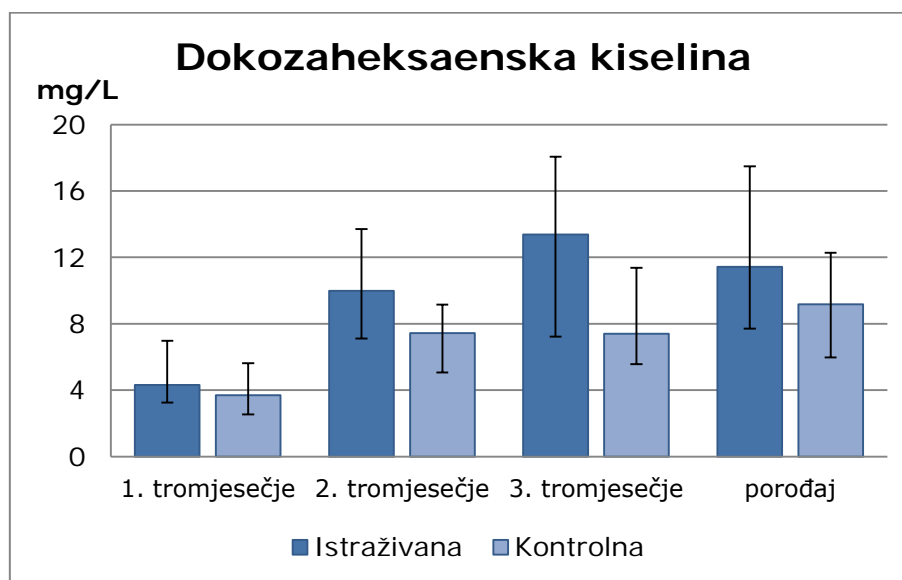
U masenoj koncentraciji DHA bilo je statistički značajne razlike u drugom i trećem tromjesečju te na dan porođaja između sudionica u kontrolnoj i istraživanoj skupini (tablica 20). U obje skupine masena koncentracija DHA bila je najmanja u prvom tromjesečju, a najveća na dan porođaja (tablica 20, slika 4).

Tablica 20. Masena koncentracija (mg/L) dokozaheksaenske kiseline u serumu sudionica po tromjesečjima i na dan porođaja

DHA [mg/L]	Istraživana		Kontrolna		Z	P
	N	C (25. P – 75. P)	N	C (25. P – 75. P)		
1. tromjesečje	41	4,32 (3,25 - 6,97)	42	3,70 (2,54 - 5,63)	-1,416	0,157
2. tromjesečje	42	9,98 (7,11 - 13,70)	41	7,44 (5,07 - 9,15)	-2,910	0,004
3. tromjesečje	41	13,37 (7,23 - 18,06)	41	7,4 (5,57 - 11,38)	-3,380	0,001
porođaj	42	11,43 (7,70 - 17,48)	42	9,17 (5,97 - 12,27)	-2,165	0,030

Napomena:

N - broj sudionica; C - medijan; P.25. – 25. percentil, P.75. – 75. percentil;
Z – vrijednost Mann Whitneyjevog testa; P – statistička vjerojatnost



Slika 4. Masena koncentracija (mg/mL) dokozaheksaenske kiseline u serumu sudionica istraživane i kontrolne skupine kroz trudnoću

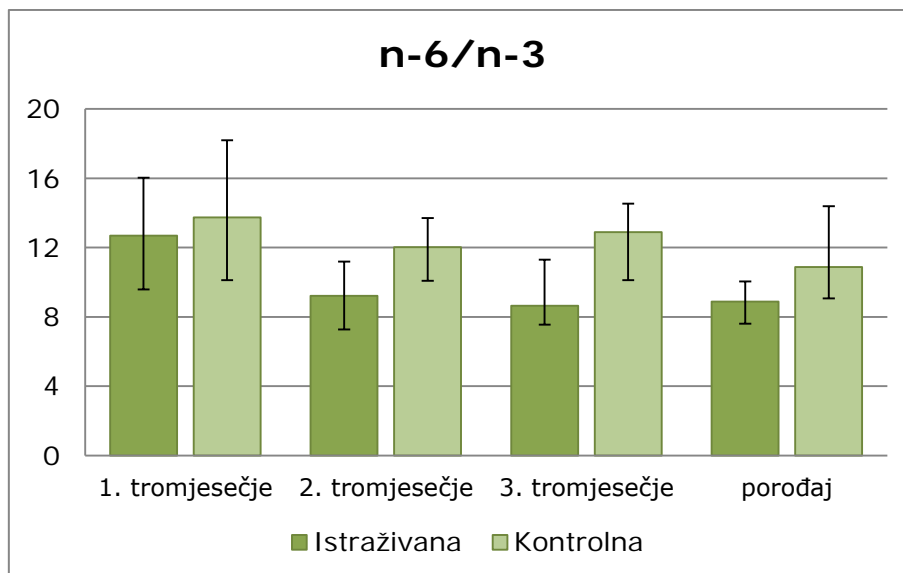
Pokazana je statistički značajna razlika u omjeru suma n-6 i n-3 PUFA (n-6/n-3) u drugom i trećem tromjesečju, te na dan porođaja, između sudionica u kontrolnoj i istraživanoj skupini. U obje skupine omjer n-6/n-3 PUFA bio je najveći u prvom tromjesečju i smanjivao se kroz trudnoću. U istraživanoj skupini bio najmanji u trećem tromjesečju, dok je u kontrolnoj skupini bio je najmanji na dan porođaja (tablica 21, slika 5).

Tablica 21. Omjeri suma n-6 i n-3 višestruko nezasićenih masnih kiselina (n-6/n-3 PUFA) u serumu sudionica istraživane i kontrolne skupine po tromjesečjima i na dan porođaja

n-6/n-3 PUFA	Istraživana		Kontrolna		Z	P
	N	C (25. P – 75. P)	N	C (25. P – 75. P)		
1. tromjesečje	41	12,69 (9,58 - 16,04)	42	13,75 (10,13 - 18,19)	-1,139	0,255
2. tromjesečje	42	9,22 (7,27 - 11,20)	41	12,03 (10,08 - 13,71)	-4,031	<0,001
3. tromjesečje	41	8,64 (7,55 - 11,30)	41	12,90 (10,12 - 14,54)	-4,568	<0,001
porođaj	42	8,89 (7,61 - 10,04)	42	10,88 (9,07 - 14,38)	-3,400	0,001

Napomena:

N - broj sudionica; C - medijan; P.25. – 25. percentil, P.75. – 75. percentil;
Z – vrijednost Mann Whitneyjevog testa; P – statistička vjerojatnost



Slika 5. Omjer sume n-6 i n-3 višestruko nezasićenih kiselina (n-6/n-3 PUFA) u serumu sudionica istraživane i kontrolne skupine kroz trudnoću

Pokazana je statistički značajna razlika u omjeru AA i DHA kiseline (AA/DHA) u drugom i trećem tromjesečju te na dan porođaja između sudionica u kontrolnoj i istraživanoj skupini. U obje skupine omjer AA/DHA bio je najveći u prvom tromjesečju, dok je u istraživanoj skupini bio najmanji u trećem tromjesečju, u kontrolnoj skupini bio je najmanji na dan porođaja (tablica 22, slika 6).

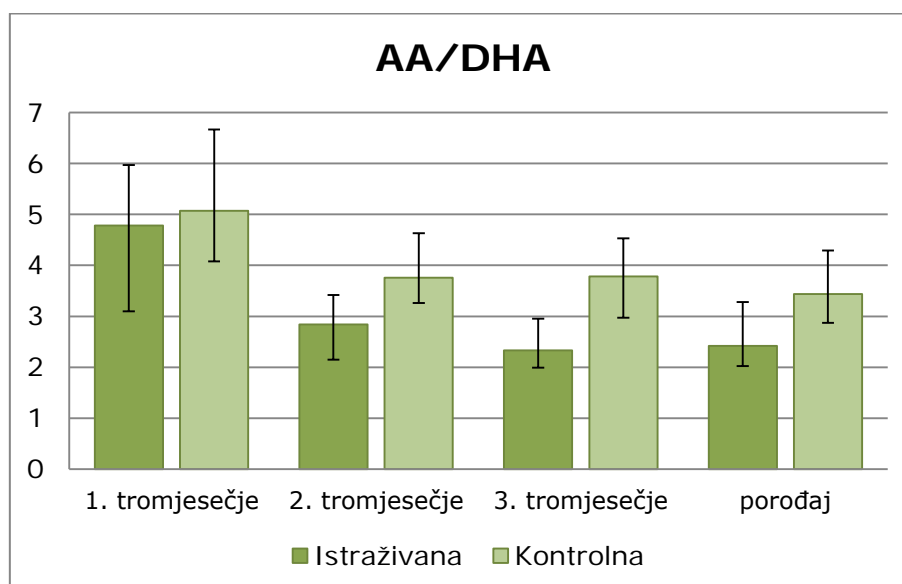
Tablica 22. Omjer arahidonske i dokozaheksaenske kiseline (AA/DHA) u serumu sudionica istraživane i kontrolne skupine po tromjesečjima i na dan porođaja

AA/DHA	Istraživana		Kontrolna		Z	P
	N	^C (25. P – 75. P)	N	^C (25. P – 75. P)		
1. tromjesečje	41	4,78 (3,10 - 5,97)	42	5,07 (4,08 - 6,67)	-1,394	0,163
2. tromjesečje	42	2,84 (2,15 - 3,42)	41	3,76 (3,26 - 4,63)	-3,994	<0,001
3. tromjesečje	41	2,33 (1,99 - 2,95)	41	3,78 (2,97 - 4,53)	-5,013	<0,001
porođaj	42	2,42 (2,02 - 3,28)	42	3,44 (2,87 - 4,29)	-3,288	0,001

Napomena:

N - broj sudionica; C - medijan; P.25. – 25. percentil, P.75. – 75. percentil;

Z – vrijednost Mann Whitneyjevog testa; P – statistička vjerojatnost



Slika 6. Omjer arahidonske i dokozaheksaenske kiseline (AA/DHA) u serumu sudionica istraživane i kontrolne skupine kroz trudnoću

Pokazan je statistički značajan porast masenih koncentracija AA, EPA i DHA po tromjesečjima i na dan porođaja u serumu sudionica istraživane skupine (tablica 23).

Tablica 23. Razlika masenih koncentracija arahidonske (AA), eikoza-pentaenske (EPA) i dokozaheksaenske kiseline (DHA) u serumu sudionica istraživane skupine po tromjesečjima i na dan porođaja

Masna kiselina [mg/L]	Istraživana skupina					χ^2	P
	1. trom.	2. trom.	3. trom.	Porođaj			
	C (25. P – 75. P)	C (25. P – 75. P)	C (25. P – 75. P)	C (25. P – 75. P)			
AA	21,50 (13,64 - 28,58)	28,59 (20,92 - 36,20)	29,34 (22,63 - 42,96)	29,36 (22,16 - 40,19)	26,760	<0,001	
EPA	2,31 (1,60 - 3,22)	2,91 (2,14 - 4,37)	3,93 (2,53 - 5,24)	3,19 (2,29 - 4,56)	29,810	<0,001	
DHA	4,32 (3,25 - 6,97)	9,98 (7,11 - 13,70)	13,37 (7,23 - 18,06)	11,43 (7,70 - 17,48)	65,130	<0,001	

Napomena:

C - medijan; P.25. – 25. percentil, P.75. – 75. percentil; χ^2 – vrijednost Friedmanovog testa; P – statistička vjerojatnost

Pokazan je statistički značajan porast masenih koncentracija AA, EPA i DHA po tromjesečjima i na dan porođaja u serumu sudionica kontrolne skupine (tablica 24).

Tablica 24. Razlika masenih koncentracija arahidonske (AA), eikoza-pentaenske (EPA) i dokozaheksaenske kiseline (DHA) u serumu sudionica kontrolne skupine po tromjesečjima i na dan porođaja

Masna kiselina [mg/L]	Kontrolna skupina					χ^2	P
	1. tromj.	2. trom.	3. trom.	Porođaj			
	C (25. P – 75. P)	C (25. P – 75. P)	C (25. P – 75. P)	C (25. P – 75. P)			
AA	20,09 (13,47 - 30,32)	26,78 (18,62 - 33,72)	31,84 (20,71 - 36,98)	30,81 (19,95 - 43,31)	25,176	<0,001	
EPA	2,22 (0,79 - 3,48)	4,02 (2,15 - 4,38)	3,41 (2,34 - 5,36)	3,62 (2,20 - 5,77)	22,527	<0,001	
DHA	3,70 (2,54 - 5,63)	7,44 (5,07 - 9,15)	7,40 (5,57 - 11,38)	9,17 (5,97 - 12,27)	48,930	<0,001	

Napomena:

C - medijan; P.25. – 25. percentil, P.75. – 75. percentil; χ^2 – vrijednost Friedmanovog testa; P – statistička vjerojatnost

U svakoj zasebno tj. istraživanoj kao i u kontrolnoj skupini sudionica postojala je statistički značajna razlika u masenoj koncentraciji AA između prvog i drugog, prvog i trećeg, drugog i trećeg te između prvog tromjesečja i porođaja (tablica 25).

U obje skupine vrijednost masene koncentracije AA bila je najmanja u prvom tromjesečju u odnosu na drugo i treće tromjesečje, a najveća na dan porođaja (tablica 18).

Tablica 25. Razlike masenoj koncentraciji (mg/L) arahidonske kiseline (AA) u serumu sudionica istraživane i kontrolne skupine po tromjesečjima i na dan porođaja

Tromjesečja	Istraživana		Kontrolna	
	Z	P	Z	P
1. tromj. - 2. tromj.	-3,129	0,002	-3,492	<0,001
1. tromj. - 3. tromj.	-4,100	<0,001	-4,438	<0,001
1. tromj. - porođaj	-4,024	<0,001	-3,245	0,001
2. tromj. - 3. tromj.	-2,650	0,008	-2,016	0,044
2. tromj. - porođaj	-0,938	0,348	-1,912	0,056
3. tromj. - porođaj	-0,836	0,403	-0,162	0,871

Napomena:

Z – vrijednost Wilcoxonovog testa ekvivalentnih parova; P – statistička vjerojatnost (uz Bonferonijevu korekciju za ponavljana mjerenja, $P < 0,008$)

U svakoj zasebno, tj. istraživanoj kao i u kontrolnoj skupini sudionica postojala je statistički značajna razlika u masenoj koncentraciji EPA između prvog i drugog, prvog i trećeg te prvog tromjesečja i porođaja. U istraživanoj skupini pokazana je i razlika između drugog i trećeg tromjesečja (tablica 26).

U obje skupine vrijednosti masene koncentracije EPA bile su najmanje u prvom tromjesečju u odnosu na drugo i treće tromjesečje. U kontrolnoj skupini vrijednost masene koncentracije EPA bila je najveća u drugom, a u istraživanoj skupini u trećem tromjesečju (tablica 19).

Tablica 26. Razlike masene koncentracije (mg/L) eikozapentaenske kiseline (EPA) u serumu sudionica istraživane i kontrolne skupine po tromjesečjima i na dan porođaja

Tromjesečja	Istraživana		Kontrolna	
	Z	P	Z	P
1. tromj. - 2. tromj.	-3,300	0,001	-4,207	<0,001
1. tromj. - 3. tromj.	-4,647	<0,001	-4,248	<0,001
1. tromj. - porođaj	-4,335	<0,001	-3,752	<0,001
2. tromj. - 3. tromj.	-3,065	0,002	-1,298	0,194
2. tromj. - porođaj	-0,725	0,468	-1,521	0,128
3. tromj. - porođaj	-1,555	0,120	-0,497	0,619

Napomena:

Z – vrijednost Wilcoxonovog testa ekvivalentnih parova; P – statistička vjerojatnost (uz Bonferonijevu korekciju za ponavljana mjerenja)

U svakoj zasebno, tj. istraživanoj kao i u kontrolnoj skupini sudionica postojala je statistički značajna razlika u masenoj koncentraciji DHA između prvog i drugog, prvog i trećeg te prvog tromjesečja i porođaja. U istraživanoj skupini pokazana je i razlika između drugog i trećeg tromjesečja (tablica 27).

U obje skupine vrijednosti masene koncentracije DHA bile su najmanje u prvom tromjesečju u odnosu na drugo i treće tromjesečje. U kontrolnoj skupini vrijednost masene koncentracije DHA bila je najveća na porođaju, a u istraživanoj skupini u trećem tromjesečju (tablica 20).

Tablica 27. Razlike u masenoj koncentraciji (mg/L) dokozaheksaenske kiseline (DHA) u serumu sudionica istraživane i kontrolne skupine po tromjesečjima i na dan porođaja

Tromjesečja	Istraživana		Kontrolna	
	Z	P	Z	P
1. tromj. - 2. tromj.	-5,099	<0,001	-4,853	<0,001
1. tromj. - 3. tromj.	-5,471	<0,001	-5,410	<0,001
1. tromj. - porođaj	-5,488	<0,001	-4,820	<0,001
2. tromj. - 3. tromj.	-3,427	0,001	-1,579	0,114
2. tromj. - porođaj	-1,851	0,064	-1,147	0,251
3. tromj. - porođaj	-0,706	0,480	-0,136	0,892

Napomena:

Z – vrijednost Wilcoxonovog testa ekvivalentnih parova; P – statistička vjerojatnost (uz Bonferonijevu korekciju za ponavljana mjerenja)

Pokazano je statistički značajno smanjenje omjera suma n-6 i n-3 PUFA (n-6/n-3) te AA i DHA (AA/DHA) po tromjesečjima i na dan porođaja u serumu sudionica istraživane skupine. Najveći omjeri izmjereni su u prvom, a najmanji u trećem tromjesečju (tablica 28).

Tablica 28. Razlika omjera n-6/n-3 PUFA i omjera AA/DHA masnih kiselina u serumu sudionica istraživane skupine po tromjesečjima i na dan porođaja

Omjer	Istraživana skupina					χ^2	P
	1. tromj.	2. tromj.	3. tromj.	Porođaj			
	C (25. P – 75. P)	C (25. P – 75. P)	C (25. P – 75. P)	C (25. P – 75. P)			
n-6/n-3	12,69 (9,58 - 16,04)	9,22 (7,27 - 11,20)	8,64 (7,55 - 11,30)	8,89 (7,61 - 10,04)	29,215	<0,001	
AA/DHA	4,78 (3,10 - 5,97)	2,84 (2,15 - 3,42)	2,33 (1,99 - 2,95)	2,42 (2,02 - 3,28)	59,173	<0,001	

Napomena:

C - medijan; P.25. – 25. percentil, P.75. – 75. percentil; χ^2 – vrijednost Friedmanovog testa; P – statistička vjerojatnost;

Pokazano je statistički značajno smanjenje omjera suma n-6 i n-3 PUFA (n-6/n-3) te AA i DHA (AA/DHA) po tromjesečjima i na dan porođaja u serumu sudionica kontrolne skupine. Najveći omjeri izmjereni su u prvom, a najmanji u trećem tromjesečju (tablica 29).

Tablica 29. Razlika omjera n-6/n-3 PUFA i omjera AA/DHA masnih kiselina u serumu sudionica kontrolne skupine po tromjesečjima i na dan porođaja

Omjer	Kontrolna skupina					χ^2	P
	1. tromj.	2. tromj.	3. tromj.	Porođaj			
	$\begin{matrix} C \\ (25. P - 75. P) \end{matrix}$	$\begin{matrix} C \\ (25. P - 75. P) \end{matrix}$	$\begin{matrix} C \\ (25. P - 75. P) \end{matrix}$	$\begin{matrix} C \\ (25. P - 75. P) \end{matrix}$			
n-6/n-3	$\begin{matrix} 13,75 \\ (10,13 - 18,19) \end{matrix}$	$\begin{matrix} 12,03 \\ (10,08 - 13,71) \end{matrix}$	$\begin{matrix} 12,90 \\ (10,12 - 14,54) \end{matrix}$	$\begin{matrix} 10,88 \\ (9,07 - 14,38) \end{matrix}$	11,752	0,008	
AA/DHA	$\begin{matrix} 5,07 \\ (4,08 - 6,67) \end{matrix}$	$\begin{matrix} 3,76 \\ (3,26 - 4,63) \end{matrix}$	$\begin{matrix} 3,78 \\ (2,97 - 4,53) \end{matrix}$	$\begin{matrix} 3,44 \\ (2,87 - 4,29) \end{matrix}$	60,867	<0,001	

Napomena:

C - medijan; P.25. – 25. percentil, P.75. – 75. percentil; χ^2 – vrijednost Friedmanovog testa; P – statistička vjerojatnost

U svakoj zasebno, tj. u istraživanoj kao i u kontrolnoj skupini sudionica, postojala je statistički značajna razlika u omjeru suma n-6 i sume n-3 PUFA (n-6/n-3) između prvog i drugog te prvog tromjesečja i porođaja. U istraživanoj skupini pokazana je i razlika između prvog i trećeg tromjesečja (tablica 30).

Tablica 30. Razlike u omjeru n-6/n-3 PUFA u serumu sudionica istraživane i kontrolne skupine po tromjesečjima i na dan porođaja

Tromjesečja	Istraživana		Kontrolna	
	Z	P	Z	P
1. tromj. - 2. tromj.	-4,113	<0,001	-2,741	0,006
1. tromj. - 3. tromj.	-4,312	<0,001	-2,592	0,010
1. tromj. - porođaj	-4,409	<0,001	-3,063	0,002
2. tromj. - 3. tromj.	-0,635	0,525	-0,837	0,402
2. tromj. - porođaj	-0,269	0,788	-1,004	0,315
3. tromj. - porođaj	-0,266	0,791	-1,860	0,063

Napomena:

Z – vrijednost Wilcoxonovog testa ekvivalentnih parova; P – statistička vjerojatnost (uz Bonferonijevu korekciju za ponavljana mjerenja, $P < 0,008$)

U svakoj zasebno, tj. u istraživanoj kao i u kontrolnoj skupini sudionica postojala je statistički značajna razlika u omjeru AA i DHA kiseline (AA/DHA) između prvog i drugog, prvog i trećeg te prvog tromjesečja i porođaja. U istraživanoj skupini pokazana je i razlika između drugog i trećeg tromjesečja (tablica 31).

Tablica 31. Razlike u omjeru AA/DHA u serumu sudionica istraživane i kontrolne skupine po tromjesečjima i na dan porođaja

Tromjesečja	Istraživana		Kontrolna	
	Z	P	Z	P
1. tromj. - 2. tromj.	-4,624	<0,001	-5,164	<0,001
1. tromj. - 3. tromj.	-5,247	<0,001	-5,242	<0,001
1. tromj. - porođaj	-4,678	<0,001	-5,521	<0,001
2. tromj. - 3. tromj.	-2,655	0,008	-1,193	0,233
2. tromj. - porođaj	-1,157	0,247	-2,278	0,023
3. tromj. - porođaj	-0,128	0,898	-1,251	0,211

Napomena:

Z – vrijednost Wilcoxonovog testa ekvivalentnih parova; P – statistička vjerojatnost (uz Bonferonijevu korekciju za ponavljana mjerenja, $P < 0,008$)

4. 7. 2. Masena koncentracija pojedinih masnih kiselina u serumu pupčane vene

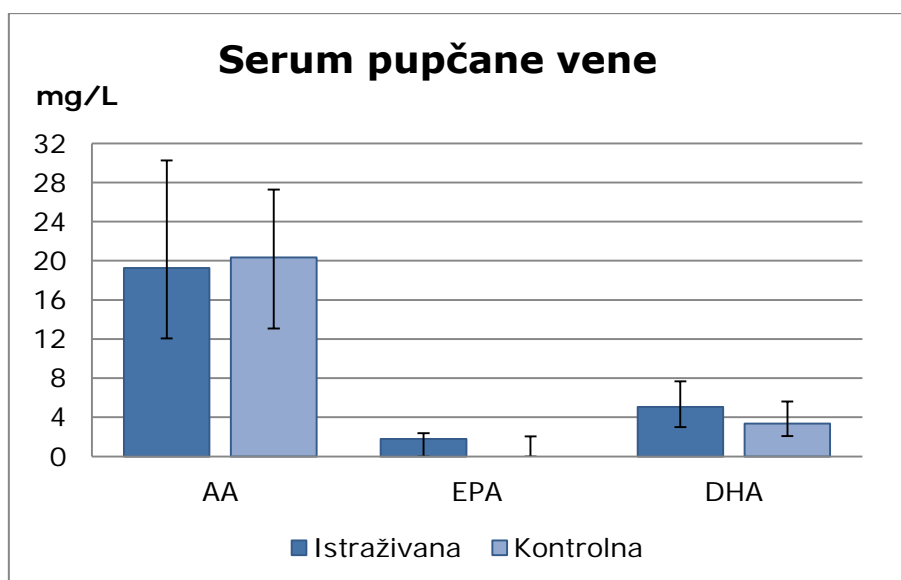
Pokazana je statistički značajna razlika u masenoj koncentraciji DHA u serumu pupčane vene između sudionica u istraživanoj i kontrolnoj skupini. Vrijednost masene koncentracije AA bila je veća u kontrolnoj skupini, dok su vrijednosti masene koncentracije za EPA i DHA bile veće u istraživanoj skupini (tablica 32, slika 7).

Tablica 32. Masena koncentracija arahidonske (AA), eikozapentaenske (EPA) i dokozaheksaenske kiseline (DHA) u serumu pupčane vene sudionica istraživane i kontrolne skupine

Masna kiselina [mg/L]	Istraživana		Kontrolna		Z	P
	N	C (25. P – 75. P)	N	C (25. P – 75. P)		
AA	38	19,25 (12,05 - 30,25)	40	20,35 (13,08 - 27,28)	-0,140	0,889
EPA	38	1,80 (0,00 - 2,38)	40	0,00 (0,00 - 2,05)	-1,835	0,066
DHA	38	5,05 (3,01 - 7,68)	40	3,36 (2,07 - 5,63)	-2,624	0,009

Napomena:

N - broj sudionica; C - medijan; P.25. – 25. percentil, P.75. – 75. percentil;
Z – vrijednost Mann Whitneyjevog testa; P – statistička vjerojatnost



Slika 7. Masene koncentracije (mg/L) arahidonske (AA), eikozapentaenske (EPA) i dokozaheksaenske (DHA) kiseline u serumu pupčane vene sudionica istraživane i kontrolne skupine

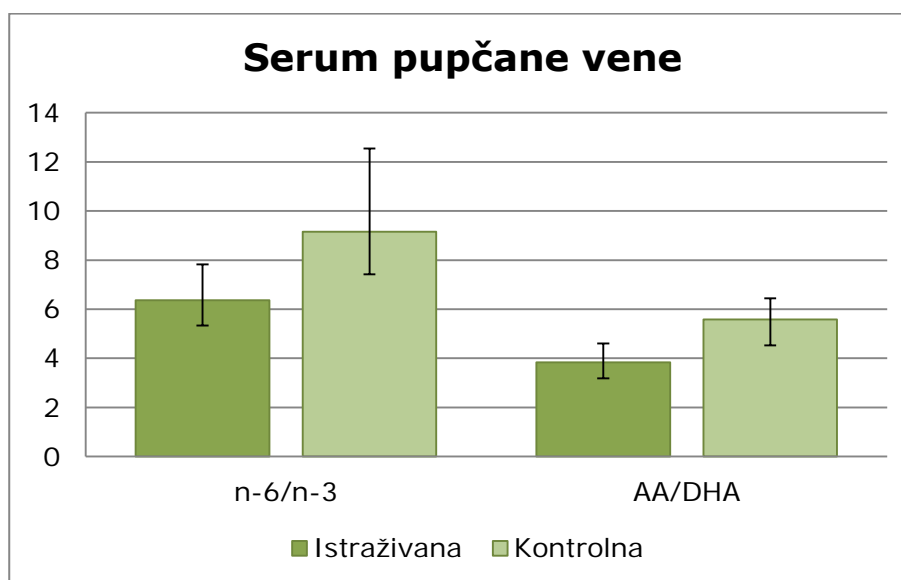
Pokazana je statistički značajna razlika u omjeru suma n-6 i n-3 PUFA (n-6/n-3), te omjeru AA i DHA (AA/DHA) u serumu pupčane vene između sudionica u istraživanj i kontrolnoj skupini. Omjeri n-6/n-3 PUFA i AA/DHA bili su manji u istraživanj skupini (tablica 33, slika 8).

Tablica 33. Omjeri masnih kiselina u serumu pupčane vene sudionica istraživane i kontrolne skupine

Omjeri	Istraživana		Kontrolna		Z	P
	N	C (25. P – 75. P)	N	C (25. P – 75. P)		
n-6/n-3	38	6,37 (5,33 - 7,83)	40	9,16 (7,42 - 12,54)	-4,228	<0,001
AA/DHA	38	3,84 (3,19 - 4,61)	40	5,58 (4,53 - 6,44)	-4,126	<0,001

Napomena:

N - broj sudionica; C - medijan; P.25. – 25. percentil, P.75. – 75. percentil;
Z – vrijednost Mann Whitneyjevog testa; P – statistička vjerojatnost



Slika 8. Omjeri n-6/n-3 PUFA i AA/DHA u serumu pupčane vene sudionica istraživane i kontrolne skupine

4. 7. 3. Maseni udio pojedinih masnih kiselina u serumu sudionica

U masenom udjelu AA između skupina sudionica po tromjesečjima te na dan porođaja nije bilo statistički značajne razlike. U obje skupine vrijednost masenog udjela AA bila je najveća u prvom tromjesečju, a najmanja na dan porođaja (tablica 34, slika 9).

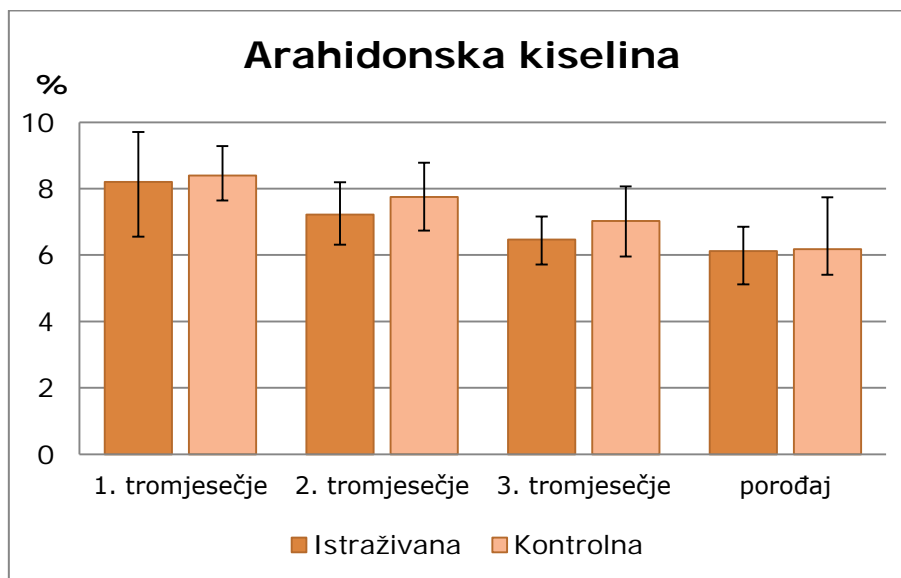
Tablica 34. Maseni udio (%) arahidonske kiseline (AA) u serumu sudionica istraživane i kontrolne skupine po tromjesečjima i na dan porođaja

AA [%]	Istraživana		Kontrolna		Z	P
	N	^C (25. P – 75. P)	N	^C (25. P – 75. P)		
1. tromjesečje	41	8,20 (6,55 - 9,71)	42	8,40 (7,64 - 9,28)	-0,287	0,774
2. tromjesečje	42	7,22 (6,31 - 8,19)	41	7,75 (6,74 - 8,78)	-0,246	0,806
3. tromjesečje	41	6,47 (5,72 - 7,16)	41	7,03 (5,96 - 8,07)	-0,413	0,680
porođaj	42	6,12 (5,12 - 6,85)	42	6,18 (5,41 - 7,74)	-0,107	0,915

Napomena:

N - broj sudionica; C - medijan; P.25. – 25. percentil, P.75. – 75. percentil;

Z – vrijednost Mann Whitneyjevog testa; P – statistička vjerojatnost



Slika 9. Maseni udio (%) arahidonske kiseline (AA) u serumu sudionica istraživane i kontrolne skupine kroz trudnoću

U masenom udjelu EPA između skupina sudionica po tromjesečjima te na dan porođaja pokazana je statistički značajna razlika u drugom tromjesečju. U istraživanoj skupini vrijednost masenog udjela EPA bila je najveća u prvom tromjesečju, a najmanja na dan porođaja. U kontrolnoj skupini vrijednost masenog udjela EPA bila je najveća u drugom tromjesečju, a najmanja na dan porođaja (tablica 35, slika 10).

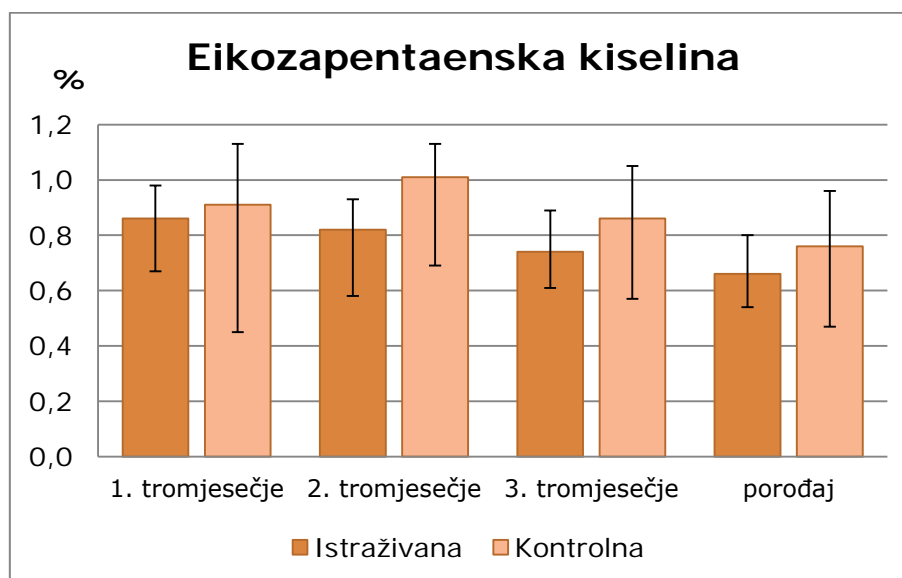
Tablica 35. Maseni udio (%) eikozapentaenske kiseline (EPA) u serumu sudionica istraživane i kontrolne skupine po tromjesečjima i na dan porođaja

EPA [%]	Istraživana		Kontrolna		Z	P
	N	^C (25. P – 75. P)	N	^C (25. P – 75. P)		
1. tromjesečje	41	0,86 (0,67 - 0,98)	42	0,91 (0,45 - 1,13)	-0,306	0,760
2. tromjesečje	42	0,82 (0,58 - 0,93)	41	1,01 (0,69 - 1,13)	-2,396	0,017
3. tromjesečje	41	0,74 (0,61 - 0,89)	41	0,86 (0,57 - 1,05)	-1,058	0,290
porođaj	42	0,66 (0,54 - 0,80)	42	0,76 (0,47 - 0,96)	-1,078	0,281

Napomena:

N - broj sudionica; C - medijan; P.25. – 25. percentil, P.75. – 75. percentil;

Z – vrijednost Mann Whitneyjevog testa; P – statistička vjerojatnost



Slika 10. Maseni udio (%) eikozapentaenske kiseline (EPA) u serumu sudionica istraživane i kontrolne skupine kroz trudnoću

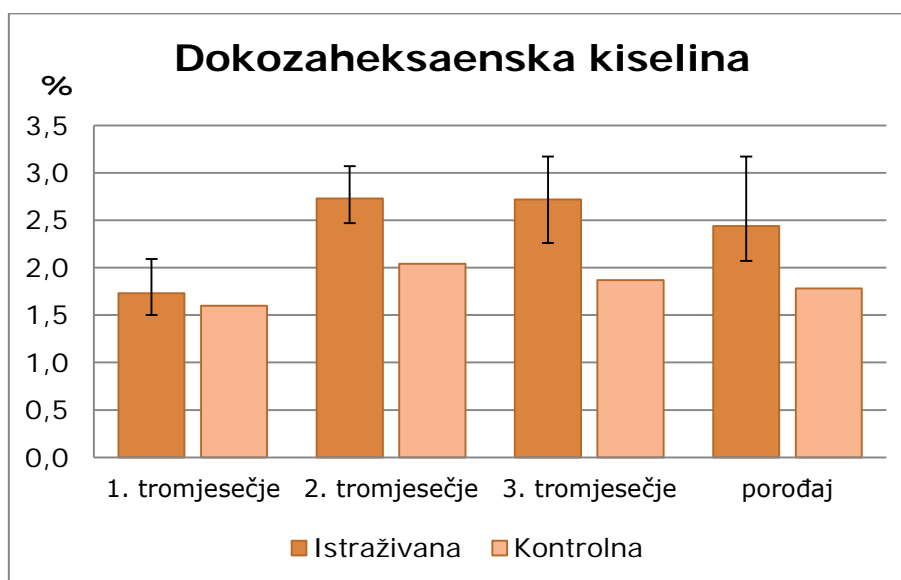
U masenom udjelu DHA između skupina sudionica po tromjesečjima te na dan porođaja pokazana je statistički značajna razlika u drugom i trećem tromjesečju te na dan porođaja. U obje skupine vrijednost masenog udjela DHA bila je najmanja u prvom tromjesečju. U istraživanoj skupini vrijednost masenog udjela DHA bila je najveća na dan porođaja, dok je u kontrolnoj skupini najveća vrijednost izmjerena u drugom tromjesečju (tablica 36, slika 11).

Tablica 36. Maseni udio (%) dokozaheksaenske (DHA) u serumu sudionica istraživane i kontrolne skupine po tromjesečjima i na dan porođaja

DHA [%]	Istraživana		Kontrolna		Z	P
	N	C (25. P – 75. P)	N	C (25. P – 75. P)		
1. tromjesečje	41	1,73 (1,33 - 2,08)	42	1,60 (1,37 - 1,96)	-0,424	0,672
2. tromjesečje	42	2,73 (2,16 - 3,36)	41	2,04 (1,78 - 2,38)	-2,915	0,004
3. tromjesečje	41	2,72 (2,19 - 3,27)	41	1,87 (1,41 - 2,32)	-4,007	<0,001
porođaj	42	2,44 (2,00 - 2,99)	42	1,78 (1,41 - 2,51)	-3,118	0,002

Napomena:

N - broj sudionica; C - medijan; P.25. – 25. percentil, P.75. – 75. percentil;
Z – vrijednost Mann Whitneyjevog testa; P – statistička vjerojatnost



Slika 11. Maseni udio (%) dokozaheksaenske kiseline (DHA) u serumu sudionica istraživane i kontrolne skupine kroz trudnoću

Pokazana je statistički značajna razlika u masenom udjelu AA, EPA i DHA po tromjesečjima i na dan porođaja u serumu sudionica istraživane skupine (tablica 37).

Tablica 37. Razlika masenih udjela arahidonske (AA), eikozapentaenske (EPA) i dokozaheksaenske kiseline (DHA) u serumu sudionica istraživane skupine po tromjesečjima i na dan porođaja

Masna kiselina [%]	Istraživana skupina					
	1. tromj.	2. tromj.	3. tromj.	Porođaj	χ^2	P
	C (25. P – 75. P)	C (25. P – 75. P)	C (25. P – 75. P)	C (25. P – 75. P)		
AA	8,20 (6,55 - 9,71)	7,22 (6,31 - 8,19)	6,47 (5,72 - 7,16)	6,12 (5,12 - 6,85)	72,270	<0,001
EPA	0,86 (0,67 - 0,98)	0,82 (0,58 - 0,93)	0,74 (0,61 - 0,89)	0,66 (0,54 - 0,80)	21,997	<0,001
DHA	1,73 (1,33 - 2,08)	2,73 (2,16 - 3,36)	2,72 (2,19 - 3,27)	2,44 (2,00 - 2,99)	34,534	<0,001

Napomena:

C - medijan; P.25. – 25. percentil, P.75. – 75. percentil; χ^2 – vrijednost Friedmanovog testa; P – statistička vjerojatnost

Pokazana je statistički značajna razlika u masenom udjelu AA, EPA i DHA po tromjesečjima i na dan porođaja u serumu sudionica kontrolne skupine (tablica 38).

Tablica 38. Razlika masenih udjela arahidonske (AA), eikozapentaenske (EPA) i dokozaheksaenske kiseline (DHA) u serumu sudionica kontrolne skupine po tromjesečjima i na dan porođaja

Masna kiselina [%]	Kontrolna skupina					
	1. trom.	2. trom.	3. trom.	Porođaj	χ^2	P
	C (25. P – 75. P)	C (25. P – 75. P)	C (25. P – 75. P)	C (25. P – 75. P)		
AA	8,40 (7,64 - 9,28)	7,75 (6,74 - 8,78)	7,03 (5,96 - 8,07)	6,18 (5,41 - 7,74)	59,150	<0,001
EPA	0,91 (0,45 - 1,13)	1,01 (0,69 - 1,13)	0,86 (0,57 - 1,05)	0,76 (0,47 - 0,96)	17,648	0,001
DHA	1,60 (1,37 - 1,96)	2,04 (1,78 - 2,38)	1,87 (1,41 - 2,32)	1,78 (1,41 - 2,51)	17,346	0,001

Napomena:

C - medijan; P.25. – 25. percentil, P.75. – 75. percentil; χ^2 – vrijednost Friedmanovog testa; P – statistička vjerojatnost

U svakoj zasebno, tj. istraživanoj kao i u kontrolnoj skupini sudionica, postojala je statistički značajna razlika u masenom udjelu AA između prvog i drugog, prvog i trećeg, drugog i trećeg te između prvog tromjesečja i porođaja te drugog tromjesečja i porođaja (tablica 39).

U obje skupine vrijednost masenog udjela AA bila je najveća u prvom tromjesečju u odnosu na drugo i treće, a najmanja na dan porođaja (tablica 34).

Tablica 39. Razlike u masenom udjelu (%) arahidonske kiseline (AA) u serumu sudionica istraživane i kontrolne skupine po tromjesečjima i na dan porođaja

Tromjesečja	Istraživana		Kontrolna	
	Z	P	Z	P
1. tromj. - 2. tromj.	-3,421	0,001	-2,903	0,004
1. tromj. - 3. tromj.	-5,377	<0,001	-4,749	<0,001
1. tromj. - porođaj	-4,866	<0,001	-5,320	<0,001
2. tromj. - 3. tromj.	-4,581	<0,001	-4,073	<0,001
2. tromj. - porođaj	-4,395	<0,001	-4,389	<0,001
3. tromj. - porođaj	-2,365	0,018	-2,138	0,033

Napomena:

Z – vrijednost Wilcoxonovog testa ekvivalentnih parova; P – statistička vjerojatnost (uz Bonferonijevu korekciju za ponavljana mjerenja $P < 0,008$)

U istraživanoj skupini sudionica postojala je statistički značajna razlika u masenom udjelu EPA između porođaja i trudnoće kroz sva tri tromjesečja. U kontrolnoj skupini sudionica postojala je statistički značajna razlika u masenom udjelu EPA između drugog i trećeg tromjesečja te trećeg tromjesečja i porođaja (tablica 40).

U obje skupine vrijednost masenog udjela EPA bila je najveća u prvom tromjesečju u odnosu na drugo i treće, a najmanja na dan porođaja (tablica 35).

Tablica 40. Razlike u masenom udjelu (%) eikozapentaenske kiseline (EPA) u serumu sudionica istraživane i kontrolne skupine po tromjesečjima i na dan porođaja

Tromjesečja	Istraživana		Kontrolna	
	Z	P	Z	P
1. tromj. - 2. tromj.	-1,029	0,304	-1,459	0,145
1. tromj. - 3. tromj.	-1,424	0,155	-0,242	0,809
1. tromj. - porođaj	-2,830	0,005	-1,150	0,250
2. tromj. - 3. tromj.	-1,647	0,100	-3,748	<0,001
2. tromj. - porođaj	-2,845	0,004	-3,674	<0,001
3. tromj. - porođaj	-2,931	0,003	-1,612	0,107

Napomena:

Z – vrijednost Wilcoxonovog testa ekvivalentnih parova; P – statistička vjerojatnost (uz Bonferonijevu korekciju za ponavljana mjerenja $P < 0,008$)

U istraživanoj skupini sudionica postojala je statistički značajna razlika u masenom udjelu DHA između prvog i drugog, drugog i trećeg tromjesečja, prvog tromjesečja i porođaja te drugog tromjesečja i porođaja. U kontrolnoj skupini sudionica postojala je statistički značajna razlika u masenom udjelu DHA između prvog i drugog te drugog i trećeg tromjesečja (tablica 41).

U obje skupine vrijednost masenog udjela DHA bila je najmanja u prvom tromjesečju, a najveća u drugom tromjesečju (tablica 36).

Tablica 41. Razlike u masenom udjelu (%) dokozaheksaenske kiseline (DHA) u serumu sudionica istraživane i kontrolne skupine po tromjesečjima i na dan porođaja

Tromjesečja	Istraživana		Kontrolna	
	Z	P	Z	P
1. tromj. - 2. tromj.	-4,309	<0,001	-3,881	<0,001
1. tromj. - 3. tromj.	-4,342	<0,001	-0,780	0,436
1. tromj. - porođaj	-3,486	<0,001	-0,769	0,442
2. tromj. - 3. tromj.	-1,225	0,221	-2,843	0,004
2. tromj. - porođaj	-2,793	0,005	-2,605	0,009
3. tromj. - porođaj	-2,352	0,019	-0,855	0,392

Napomena:

Z – vrijednost Wilcoxonovog testa ekvivalentnih parova; P – statistička vjerojatnost (uz Bonferonijevu korekciju za ponavljana mjerenja $P < 0,008$)

4. 7. 4. Maseni udio pojedinih masnih kiselina u serumu pupčane vene

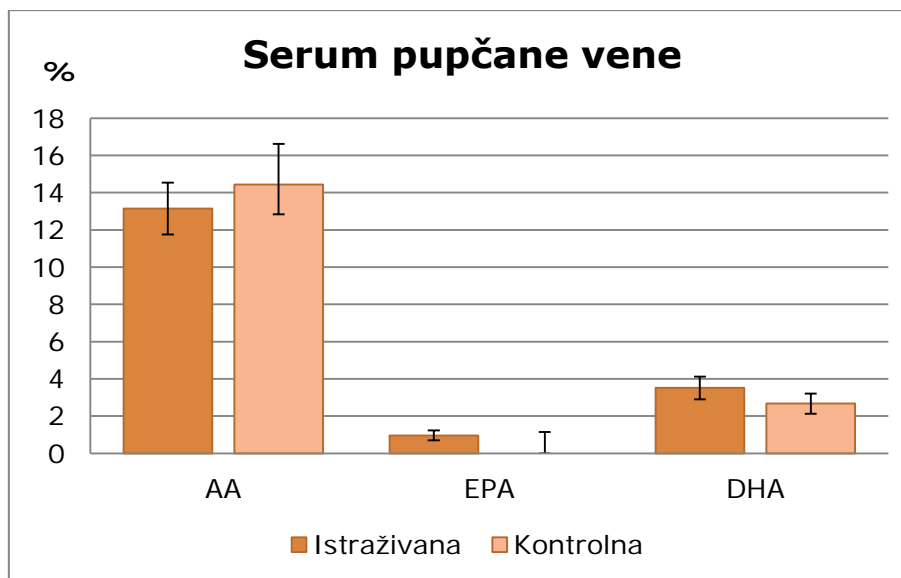
Pokazana je statistički značajna razlika u masenom udjelu AA i DHA u serumu pupčane vene sudionica istraživane i kontrolne skupine. Vrijednost masenog udjela AA bila je veća u kontrolnoj skupini, dok su vrijednosti masenog udjela EPA i DHA veće u istraživanoj skupini (tablica 42).

Tablica 42. Udio pojedinih masnih kiselina u serumu pupčane vene ispitanica istraživane i kontrolne skupine

Masna kiselina [%]	Istraživana		Kontrolna		Z	P
	N	^C (25. P – 75. P)	N	^C (25. P – 75. P)		
AA	38	13,15 (12,30 - 14,55)	40	14,43 (12,84 - 16,62)	-2,319	0,020
EPA	38	0,96 (0,00 - 1,23)	40	0,00 (0,00 - 1,14)	-1,425	0,154
DHA	38	3,51 (2,53 - 4,12)	40	2,67 (2,13 - 3,21)	-2,664	0,008

Napomena:

N - broj sudionica; C - medijan; P.25. – 25. percentil, P.75. – 75. percentil;
Z – vrijednost Mann Whitneyjevog testa; P – statistička vjerojatnost



Slika 12. Maseni udio (%) arahidonske (AA), eikozapentaenske (EPA) i dokozahexaenske (DHA) kiseline u serumu pupčane vene sudionica istraživane i kontrolne skupine

5. RASPRAVA

5. RASPRAVA

Dijabetes tipa 1 (DM-1) jedan je od najčešćih metaboličkih poremećaja koji se odražava na cijelu trudnoću koja je sama po sebi jedinstveni događaj povezan s velikim brojem fizioloških promjena i kompleksnih metaboličkih procesa koji se odvijaju kod majke. Djelovanje DM-1 počinje već u vrijeme oplodnje i nastavlja se kroz cijeli period trudnoće. Stoga je praćenje promjena kroz cijeli period trudnoće od iznimne važnosti za njihovo razumijevanje.

Cilj doktorske disertacije bio je istražiti utjecaj dodatka prehrani obogaćenog n-3 višestruko nezasićenim masnim kiselinama (PUFA) na koncentraciju C-peptida kod trudnica koje boluju od DM-1. Najveći broj sličnih istraživanja temeljio se na praćenju utjecaja različitih prehranbenih čimbenika kod bolesnika s nedavno dijagnosticiranim DM-1 (Virtanen i Knip, 2003), posebice kod djece (Mayer-Davis i sur., 2013). Potom je proučavan utjecaj majčine prehrane na rizik pojave DM-1 kod novorođenčadi gdje su pokazali da konzumiranje ulja od jetara bakalara (bogato n-3 PUFA i vitaminom D) tijekom trudnoće povoljno utječe na smanjenje rizika pojave DM-1 (Stene i sur., 2000). Nielsen i suradnici su pratili utjecaj trudnoće na koncentraciju C-peptida te pokazali da sama trudnoća djeluje povoljno na povećanje koncentracije C-peptida i kod zdravih i kod dijabetičnih trudnica (Nielsen i sur., 2009). Dok je Simopoulos u svom istraživanju pokazao povoljan utjecaj n-3 PUFA na smanjenje upalnih procesa (Simopoulos, 2002). Međutim, dosadašnja istraživanja nisu obuhvatila sustavno praćenje utjecaja suplementacije n-3 PUFA na koncentraciju C-peptida tijekom cijele trudnoće kod dijabetičnih trudnica. U prilog cjelovitosti našeg istraživanja ide činjenica da su uključene trudnice s kompletnim setom uzoraka prikupljenih kroz trudnoću u 4 vremenske točke.

Unatoč tome što se u Referentnom centru liječi i porađa do 60-tak trudnica s DM-1 godišnje, skupljanje reprezentativnih i kompletnih

uzoraka bilo je izazovno, što zbog samog trajanja trudnoće, što zbog povremeno neplaniranih porođaja prije termina ili porođaja u drugim bolnicama, kao i (ne)spremnosti trudnica da sudjeluju u istraživanju.

1. Usporedbom demografskih podataka, nije bilo statistički značajne razlike u dobi trudnica i trajanju osnovne bolesti (tablica 1). U obje skupine bio je podjednak broj trudnica koje boluju od DM-1 duže od 10 godina, kao i podjednak broj trudnica kod kojih je DM-1 dijagnosticiran unazad nekoliko godina. Nekoliko istraživanja (Greenbaum 2009; Poudel i sur., 2015; Virtanen i Knip, 2003) potvrdila su ograničenu aktivnost beta-stanica kod bolesnika koji obole od DM-1 kasnije tijekom života, jer je autoimuno uništenje beta-stanice manje izraženo nego li kod DM-1 dijagnosticiranog u djetinjstvu. Ograničena sposobnost proizvodnje endogenog inzulina prisutna je još nekoliko mjeseci ili godina, što se može pratiti mjerljivim koncentracijama C-peptida. Stoga je važno da su istraživana i kontrolna skupina bile homogene, kako bi se isključio utjecaj trajanja DM-1, a time i mjerljivost C-peptida, na rezultat.

2. Usporedba indeksa tjelesne mase prije trudnoće (ITM, kg/m^2) pokazala je da je prosječna vrijednost obje skupine bila podjednaka te da nije bilo statistički značajne razlike između istraživane i kontrolne skupine ($P=0,789$, tablica 2). Prosječni porast tjelesne mase tijekom trudnoće bio je nešto veći u istraživanoj skupini, no razlika nije bila značajna što ukazuje na stabilan metabolizam ugljikohidrata, lipida i proteina kod trudnica u obje skupine, zbog dobre regulacije glikemije. Navedeni rezultati odgovarali su kriterijima izbora za što manjom razlikom u dobi, tjelesnoj masi te trajanju dijabetesa kod trudnica, te prikupljeni uzorci predstavljaju homogenu skupinu uzoraka.

3. Novorođenčad trudnica u istraživanoj i kontrolnoj skupini nisu se statistički značajno razlikovala u tjelesnoj masi i dužni kao ni po ponderalnom indeksu (tablica 3). Apgar indeks u 1. i 5. minuti je pokazao da su trudnice u obje skupine rodile djecu dobre vitalnosti i bez

zdravstvenih komplikacija, bez statistički značajnih razlika u ishodu trudnoća. U Klinici za ženske bolesti i porođaje KBC-a Zagreb, klinička je praksa porađanja trudnica koje boluju od DM-1 carskim rezom temeljena na dugogodišnjem iskustvu i dobrim ishodima dijabetesom kompliciranih trudnoća. U istraživanje su uključene trudnice porođene u terminu (37-40 tjedan gestacije), te nije bilo značajne razlike u tjednu porođaja između skupina (tablica 3).

4. Koncentracija glukoze u krvi (GUK) natašte između skupina po tromjesečjima i na dan porođaja nisu se značajno razlikovale (tablica 4). Takvi podaci su u skladu s urednim vrijednostima HbA_{1c} , a odražavaju dobro reguliranu glikemiju. Iznimno je prosječna vrijednost GUK u istraživanoj skupini u drugom tromjesečju značajno niža od kontrolne skupine. Vrijednosti GUK natašte na dan porođaja povišene su u obje skupine u odnosu na vrijednosti tijekom trudnoće što se može povezati s uzbuđenjem/stresom kod trudnica zbog samog porođaja.

5. Postotak glikiranog hemoglobina HbA_{1c} , kao standardnog pokazatelja ishoda kontrole glikemije, koji odražava prosječnu razinu glukoze u krvi tijekom prethodna dva do tri mjeseca, nije se statistički značajno razlikovao po tromjesečjima između skupina (tablica 6). Taj podatak govori da se radi o trudnicama s urednom i kontroliranom glikemijom u obje skupine, te da nema razlika u prosječnoj glikemiji koja bi mogla utjecala na vrijednosti koncentracije C-peptida.

Postotak HbA_{1c} u krvi sudionica obje skupine pokazuje tendenciju pada kroz trudnoću, s malim povećanjem vrijednosti u 3. tromjesečju. No vrijednosti HbA_{1c} u 3. tromjesečju značajno su niže od vrijednosti s početka trudnoće (tablica 7) što je u skladu s drugim istraživanjima (Nielsen i sur., 2004, 2009). U suprotnom, veće vrijednosti u 3. tromjesečju povezane su s povećanim rizikom preeklampsije, makrosomije novorođenčadi i mrtvorodenih (Nielsen i sur., 2004). To

upućuje da bi vrijednosti HbA_{1c} u trudnoći trebale biti niže od vrijednosti izvan trudnoće kako bi se spriječili nepovoljni ishodi (Nielsen i sur., 2004).

6. Koncentracija C-peptida natašte izražena je medijanom i interkvartilnim rasponom s obzirom da je s povećanjem broja uzoraka raspodjela pokazala veću asimetriju.

C-peptid i inzulin nastaju iz zajedničke molekule preteče, preproinzulina koji se prvo cijepa proteolitičkim enzimom na proinzulin. Daljnjim cijepanjem proinzulina u beta-stanicama gušterače nastaju C-peptid i inzulin koji se izlučuju u ekvimolarnim koncentracijama u portalnu cirkulaciju. S obzirom da se C-peptid ne apsorbira u jetrima poput inzulina, te ima dulje vrijeme poluživota, u mnogim istraživanjima zaključeno je da koncentracija C-peptida u perifernoj cirkulaciji na najbolji način odražava izlučivanje endogenog inzulina i pokazatelj je funkcije beta-stanica (Palmer i sur. 2004; Nussey i Whitehead, 2001; Faber i sur., 1978). C-peptid daje preciznije mjeru trenutnog stanja pacijenta, odnosno koliko se endogenog inzulina proizvodi trenutno, dok auto-protutijela imaju prognostičku vrijednost i od najveće su koristi u dijagnozi jer ukazuju hoće li se nastaviti proizvoditi endogeni inzulin i ubuduće (Winter i Schatz, 2011). U ovom istraživanju je praćena koncentracija C-peptida (izražena u jedinici nmol/L) natašte u serumima trudnica koje boluju od DM-1, longitudinalno kroz cijelu trudnoću, od prvog dolaska u kliniku, kroz drugo i treće tromjesečje do porođaja.

Nielsen i suradnici pokazali su da koncentracija C-peptida postepeno raste tijekom trudnoće, neovisno o koncentraciji glukoze u krvi, kod trudnica koje boluju od DM-1 (Nielsen i sur., 2009). Ako se usporede vrijednosti koncentracija C-peptida kroz sva tri tromjesečja (tablica 9), u istraživanoj skupini postoji značajni porast od prvog do trećeg ($P < 0,001$), te od drugog do trećeg tromjesečja ($P = 0,002$). Koncentracija C-peptida u kontrolnoj skupini također pokazuje tendenciju porasta, iako taj porast nije bio statistički značajan. Dobiveni rezultat u skladu je s našim

prethodnim istraživanjima koji pokazuju da u trudnoći dolazi do povećanja C-peptida kod zdravih trudnica, kao i kod trudnica s DM-1 (Horvatiček i sur., 2017; Berberović i sur., 2014), a sukladan je i s navedenim porastom C-peptida kroz trudnoću u istraživanju Nielsena i suradnika. S obzirom da C-peptid ne prolazi kroz posteljicu niti u jednom smjeru, detektirane više vrijednosti C-peptida tijekom trudnoće potječu od majčinih beta-stanica, a ne od fetusa u razvoju.

Smatra se da je povećanje koncentracije C-peptida u obje skupine trudnica odraz supresije upalnog imunološkog sustava tijekom trudnoće, kako bi majčin organizam prihvatio genetski imunološki strani fetus (Wilder, 1998; Poole i Claman, 2004). Pri tome majčin imunološki sustav prolazi značajne promjene, koje uključuju razvoj nekoliko specifičnih mehanizama koji štite fetus od majčinog citotoksičnog napada. Jedan od mehanizama je smanjen izražaj klasičnih HLA molekula klase I, dok su drugi mehanizmi povezani s promijenjenim izlučivanjem citokina Th1 i Th2 skupine (Wilder, 1998). Tijekom trudnoće suprimirana je stanična imunološka funkcija i proizvodnja pro-upalnih Th1 citokina (npr. IL-2, TNF- α , INF- γ), dok je humoralna imunost i proizvodnja protu-upalnih Th2 citokina (npr. IL-4, IL-10) pojačana. Takav obrazac imunološke funkcije obrnut je u postpartalnom razdoblju (Wilder, 1998).

Djelomično smanjenje aktivnosti upalnog imunološkog sustava dovodi do supresije mnogih autoimunih bolesti tijekom trudnoće (Wilder, 1998), pa tako i dijabetesa. Kod DM-1 te su promjene izražene rastom i djelovanjem Langerhanseovih otočića gušterače. Najvažnija promjena koju otočići prolaze tijekom trudnoće je poboljšanje izlučivanja inzulina, smanjenje praga izlučivanja inzulina stimuliranog glukozom i poboljšana proliferacija beta stanica (Sorenson i Brelje, 1997).

Zahvaljujući mnogobrojnim istraživanjima na životinjskim modelima, danas je poznato da beta-stanice tijekom trudnoće povećaju svoju masu 3-4 puta, te se pokazalo da osim značajne hipertrofije majčinih beta-

stanica, dramatično raste i proliferacija beta-stanica tijekom trudnoće (Parsons i sur. 1992; Rieck i sur. 2009; Sorenson i Brelje, 1997). U kratkom periodu nakon porođaja masa beta-stanica vraća se na normalnu razinu povećanom apoptozom, smanjenom proliferacijom i smanjivanjem veličinom beta-stanica (Scaglia, 1995). Također, Nielsen i suradnici su primijetili da se koncentracija C-peptida brzo smanjuje nakon porođaja (Nielsen i sur., 2009). To ukazuje i na ulogu posteljice na povećanje koncentracije C-peptida tijekom trudnoće. Placentni čimbenici rasta i hormoni koji utječu na smanjenje majčinog limfocitnog odgovora fetoplacentne jedinice (Wilder, 1998; Poole i Claman, 2004), ali i na hiperplaziju beta-stanica, nakon trudnoće više se ne izlučuju.

Postoji nekoliko dokaza koji podržavaju ključnu ulogu okolišnih čimbenika u patogenezi DM-1. Diljem svijeta uočena je velika razlika u stopi incidencije (Karvonen i sur., 2000), i ta se razlika teško može objasniti genetičkim čimbenicima. Nagli porast incidencije ne može biti uzrokovan pojačanom genetičkom podložnosti populacije, već je uglavnom odraz promjena u životnom stilu i okolišu. Primjerice, gotovo 20% finske populacije ima povećanu genetičku predispoziciju (HLA podložni) za DM-1, a manje od 1% razvije dijabetes do 20 godine života (Ilonen i sur., 1996). Prema tome, samo 1 od 20 pacijenata s povećanom genskom podložnošću razvije klinički DM-1, što potvrđuje snažan utjecaj okoliša na rizik razvoja bolesti. Dodatno, osim uloge okidača, okolišni čimbenici mogu imati učinak poticanja ili zaštite u ishodu i učestalosti preddijabetičkog procesa (Virtanen i Knip, 2003). Stene i suradnici uočili su da je značajno niža incidencija DM-1 kod stanovnika koji se bave ribolovom nego u ostatku Norveške populacije kompatibilna s povećanim konzumiranjem ribe i u njima sadržanih PUFA (Stene i sur., 2000). Mayer-Davis i suradnici promatrali su kako kod mladih ljudi s nedavno dijagnosticiranim DM-1 izlaganje raznim prehranbenim tvarima (n-3 PUFA, vitamini D i E) utječe na koncentraciju C-peptida natašte (Mayer-Davis i sur., 2013). Dokazali

su da su više koncentracije DHA te zbroj EPA i DHA, značajno povezani s većom koncentracijom C-peptida.

Osim ranije spomenutog povoljnog utjecaja same trudnoće na aktivnost beta-stanica, navedena, ali i mnoga druga istraživanja pokazala su važnost prehrane u sprječavanju pogoršanja DM-1, osobito vitamina D i E, nikotinamida i n-3 PUFA. Uzimanje dodatka prehrani obogaćenog vitaminom D tijekom trudnoće ili tijekom prve godine života smanjuje stopu incidencije nastanka DM-1 (Stene i sur., 2000; Eurodiab Substudy, 1999). Vitamin E zajedno s nikotinamidom utječe na očuvanje izlučivanja C-peptida i do dvije godine nakon dijagnoze DM-1 (Pozzilli i sur., 1995). Dok uzimanje povećane količine n-3 PUFA utječe na smanjenje rizika razvoja DM-1 kod mladih osoba s genetskom sklonošću, (Norris i sur., 2005).

Podaci dobiveni u ovom istraživanju u skladu su s ranije navedenim istraživanjima, jer je koncentracija C-peptida u istraživanoj skupini značajno veća krajem trudnoće, u trećem tromjesečju ($P=0,037$), u usporedbi s kontrolnom skupinom (tablica 8). Dobiveni rezultat od iznimne je važnosti jer se nadovezuje na naše prethodno istraživanje (Horvatiček i sur. 2017), te nadopunjuje druga svjetska istraživanja (Nielsen i sur., 2009; Mayer-Davis i sur., 2013) u razjašnjavanju fizioloških mehanizama poboljšanja funkcije beta-stanica kod trudnica koje boluju od DM-1.

7. Razlika u vrijednosti koncentracije C-peptida (Δ C-peptid) između 3. i 1. tromjesečja (tablica 10) značajno je veća u istraživanoj skupini u usporedbi s kontrolnom što je i očekivano s obzirom na značajnu razliku C-peptida između skupina u zadnjem tromjesečju.

Značajan porast kroz trudnoću, kao i značajna razlika C-peptida na kraju trudnoće u istraživanoj skupini, dobiven je i ukoliko se trudnice podijele na temelju mjerljive vrijednosti koncentracije C-peptida ($>0,01$ nmol/L, granica analitičke osjetljivosti) na početku trudnoće.

Ako se u analizu uključe samo one trudnice koje su ušle u trudnoću s mjerljivim vrijednostima C-peptida (to su uglavnom trudnice kod kojih je DM-1 dijagnosticiran unazad nekoliko godina), u istraživanoj skupini značajno je veća koncentracija u trećem tromjesečju nego u kontrolnoj skupini (tablica 11). Ista je značajnost dobivena i u skupini trudnica koje se ušle u trudnoću s nemjerljivim vrijednostima C-peptida ($<0,01$ nmol/L, to su uglavnom trudnice kod kojih je DM-1 dijagnosticiran prije više od 10 godina) (tablica 13). Rezultati su u skladu s istraživanjem Nielsena i suradnika koji su također dobili značajan porast koncentracije C-peptida kod trudnica s nemjerljivim vrijednostima na početku trudnoće (Nielsen i sur., 2009).

Trudnoća u kombinaciji s povećanim unosom n-3 PUFA potiče povećanje koncentracije C-peptida u žena s dugotrajnim DM-1 čak i u žena u kojih se nije mogla dokazati koncentracija C-peptida na početku trudnoće.

8. C-peptid, doze inzulina i kontrola glikemije. Ranija istraživanja pokazala su da poboljšana kontrola glikemije tijekom trudnoće vodi do povećane koncentracije C-peptida kod trudnica koje boluju od DM-1 tek nekoliko godina (Madsbad i sur., 1981; Novak i sur., 2005). Iako nisu utvrdili povezanost smanjenih doza inzulina pred kraj trudnoće i povećane koncentracije C-peptida, Nielsen i suradnici zaključuju da poboljšana kontrola glikemije olakšava proizvodnju C-peptida (Nielsen i sur., 2009). Postizanje i održavanje dobre metaboličke kontrole u trudnoći ima ulogu u regeneraciji beta-stanica.

Rezultati ovog istraživanja nisu pokazali statistički značajnu povezanost postotka HbA_{1c} i glukoze natašte s koncentracijama C-peptida u serumu ispitanica. Iako na prvi pogled djeluje neočekivano, razlog tome možda je upravo u činjenici da su trudnice u obje skupine bile s urednom i kontroliranom glikemijom.

Prosječne doze kratkodjelujućeg inzulina bile su nešto veće u istraživanoj skupini, no bez statistički značajne razlike (tablica 15). Povećanje doze kratkodjelujućeg inzulina kroz trudnoću u obje skupine značajan je za 3. tromjesečje, što je u skladu s porastom potrebe za većim dozama inzulina zbog postupnog razvoja inzulinske rezistencije u trudnoći, što je u skladu s istraživanjem danskih autora koji su pokazali da doze inzulina imaju tendenciju rasta kroz trudnoću (Nielsen i sur., 2009).

Prosječne doze dugodjelujućeg inzulina bile su manje u istraživanoj skupini, no nije utvrđena statistički značajna razlika (tablica 16). Iako dobiveni rezultat nije dosegao razinu značajnosti, u skladu je s činjenicom da trudnice koje imaju očuvaniju funkciju beta-stanica, a time i povećanu sintezu endogenog inzulina, imaju smanjenu potrebu za egzogenim inzulinom.

9. Koncentracije glukoze i C-peptida u krvi pupčane vene prosječno su manje u istraživanoj skupini u usporedbi s kontrolom, no nije dokazana statistička značajnost (tablica 17). U prijašnjem istraživanju, Đelmiš i suradnici pokazali su značajnu pozitivnu povezanost između koncentracije glukoze i inzulina u krvi pupčane vene (Đelmiš i sur., 1992) tj. povećana koncentracija glukoze povećava sintezu i otpuštanje inzulina fetusa i obrnuto. Stoga manja koncentracija C-peptida u krvi pupčane vene može rezultirati manjom koncentracijom glukoze u krvi pupčane vene.

Manje vrijednosti C-peptida također mogu biti posljedica smanjenja inzulinske rezistencije kao reakcije na protuupalno djelovanje n-3 PUFA. Visok udio n-3 PUFA u lipidima staničnih membrana odgovoran je za normalnu funkciju plazmatske membrane, pri čemu nezasićene MK povećavaju fluidnost membrane. Ukoliko se namirnice u kojima dominiraju n-6 PUFA zamijene namirnicama koje sadržavaju više n-3 PUFA, povećava se udio n-3 PUFA u sastavu lipida membrane. Na taj način osigurana je veća količina supstrata za enzime koji sudjeluju u sintezi eikozanoida i

potaknuta sinteza protuupalnih eikozanoida na račun n-3 PUFA. Te promjene u omjeru sinteze protuupalnih i proupalnih eikozanoida smanjuju upalni odgovor, što posljedično smanjuje sintezu inzulina i inzulinsku rezistenciju, kao i koncentraciju C-peptida u krvi pupčane vene.

10. Protuupalna svojstva višestruko nezasićenih masnih kiselina. Poveznica između upalnog i imunološkog sustava je sinteza eikozanoida koji nastaju pregradnjom iz masnih kiselina s 20 C-atoma, prvenstveno iz AA i EPA. Eikozanoidi čine skupinu fiziološki aktivnih spojeva koji djeluju kao lokalni hormoni. Masne kiseline za sintezu eikozanoida mogu potjecati iz hrane (preko LA i ALA), no uobičajeno se masne kiseline oslobađaju iz fosfolipida stanične membrane djelovanjem enzima fosfolipaze A2.

Eikozanoidi sintetizirani iz skupine n-6 i n-3 PUFA međusobno djeluju antagonistički. To znači da će se iz AA koja je n-6 reda sintetizirati proupalni eikozanoidi, prostanglandini i tromboksani serije 2 (TX₂), te leukotrieni serije 4 (LT₄), dok je EPA iz n-3 serije preteča protuupalnih eikozanoida, prostanglandina i tromboksana serije 3 (TX₃), te leukotriena serije 5 (LT₅) (Parker i sur., 2006; De Caterina i sur. 2004).

Protuupalna svojstva n-3 PUFA proizlaze iz natjecanja AA i DHA za iste enzime u metabolizmu eikozanoida. Na stvaranje i aktivnost eikozanoida može se utjecati mijenjajući količinu i vrstu MK u prehrani. Tako će, primjerice, zamjena ulja u kojima prevladavaju n-6 PUFA hranom i uljima u kojima prevladavaju n-3 PUFA, smanjiti proizvodnju pro-upalnih eikozanoida i omogućiti prednost proizvodnji protuupalnih eikozanoida. Calder je pokazao da povećan unos n-3 PUFA u obliku ribljeg ulja rezultira smanjenjem razine AA u membrani i posljedično smanjenjem sinteze proupalnih prostaglandina (Calder, 1998).

Stoga se omjer AA/DHA koristi kao pokazatelj upalnog stanja u organizmu.

Prema rezultatima dobivenim u ovom radu, napredovanjem trudnoće **omjer AA/DHA** u serumu postepeno se smanjuje u obje skupine ispitanica (tablice 22, 28 i 29, slika 6). U prvom tromjesečju omjer AA/DHA ne razlikuje se značajno između skupina, kao ni masena koncentracije DHA, što je očekivano s obzirom da prvo tromjesečje predstavlja stanje prije uvođenja suplementacije. Značajnija razlika se opaža od drugog tromjesečja sve do porođaja. Omjer AA/DHA značajno je manji u istraživanoj skupini kao posljedica utjecaja suplementacije i pokazatelj je smanjenog upalnog stanja nego u kontrolnoj skupini.

Omjer sume n-6 i sume n-3 PUFA (n-6/n-3) također se koristi u procjeni upalnog stanja u organizmu. Iako nisu prikazani svi rezultati, u omjer je uključen zbroj svih n-3 PUFA (C18:3n-3, C20:3n-3, C20:4n-3, C20:5n-3, C22:5n-3, C22:6n-3) i zbroj svih n-6 PUFA (C18:2n-6, C18:3n-6, C20:3n-6, C20:4n-6, C22:2n-6, C22:4n-6). Omjer n-6/n-3 očekivano je značajno manji u istraživanoj skupini, od drugog tromjesečja do kraja trudnoće (tablica 21, 28 i 29, slika 5). Nije utvrđena razlika u omjeru n-6/n-3 PUFA između trudnica istraživane i kontrolne skupine u 1. tromjesečju, što pokazuje da su u trudnoću ušle s jednakim omjerom n-6/n-3, te da je kontinuirani unos suplementacije n-3 PUFA bio učinkovit i povećanjem udjela n-3 PUFA u sastavu lipida doprinio smanjenju omjera n-6/n-3.

Protuupalni učinak n-3 PUFA, osim kroz modificiranje metabolizma eikozanoida, ispoljava se i kroz smanjenje proizvodnje medijatora upale, citokine. Osobito potiskuju izražaj mRNA za interleukine IL-1 β , IL-6 i TNF- α . Simopoulos je pokazao da smanjena produkcija citokina IL-1 i TNF- α pridonosi ublažavanju upalnih simptoma kod bolesnika koji uzimaju n-3 PUFA dodatak prehrani (Simopoulos, 2002). Druga istraživanja su pokazala da suplementacija s n-3 PUFA u majčinoj prehrani rezultira značajnim smanjenjem proizvodnje medijatora upale, IL-1, IL-6 i TNF- α (Trebble i sur., 2003). U istraživanjima Khalfouna i suradnika, kao i Morija i suradnika, DHA se pokazala učinkovitijom od EPA u smanjenju

koncentracije TNF- α u plazmi DHA uzrokuje smanjuje od 35%, dok EPA smanjuje za 20% (Khalfoun i sur., 1997; Mori i sur., 2003).

11. Sadržaj masnih kiselina. Tijekom trudnoće prehrambene potrebe majke povećane su zbog potreba rastućeg fetusa i placente. Uravnotežena i raznolika prehrana osigurava potrebne prehrambene tvari. Današnjim stilom prehrane to nije jednostavno izvedivo, te se često preporučuje trudnicama uzimanje dodatka prehrani koji sadrže optimalan sastav vitamina i mineralnih tvari potreban za razvoj fetusa. U sklopu ovog istraživanja trudnice su koristile dodatak prehrani koji pored vitamina i mineralnih tvari sadrži n-3 PUFA (EPA i DHA). Takva suplementacija može osigurati dodatne zalihe n-3 PUFA potrebnih za normalan rast i razvoj djeteta, kao i metabolizam majke.

Višestruko nezasićene masne kiseline, linolna kiselina (LA, C18:2n-6) i α -linolenska kiselina (ALA, C18:3n-3), ne mogu se „de novo“ sintetizirati u ljudskom organizmu zbog nepostojanja odgovarajućih enzima te se moraju unijeti u organizam putem prehrane. Zovemo ih esencijalnim masnim kiselinama i preteče su u sintezi drugih višestruko nezasićenih masnih kiselina u tijelu. Iz LA i ALA naizmjeničnim nizom djelovanja enzima elongaza i desaturaza izvode se druge masne kiseline. LA je preteča n-6 skupine masnih kiselina: dihomo- γ -linolenske (DGLA, C20:3n-6) i arahidonske kiseline (AA, 20:4n-6). Kao preteča n-3 skupine masnih kiselina služi ALA od koje kreće sinteza eikozapentaenske (EPA, C20:5n-3) i dokozaheksaenske kiseline (DHA, C20:6n-3). S obzirom da učinkovitost endogene pretvorbe ALA iz hrane u EPA i DHA u organizmu odraslog čovjeka nije velika, EPA i DHA danas se također smatraju esencijalnim MK.

Budući se ALA i LA natječu za iste ključne enzime uključene u sintezu viših homologa i pretvorbu u proupalne ili protuupalne eikozanoide, važno je istražiti učinak zajedničkog unosa n-3 i n-6 PUFA.

Iako su u uzorcima identificirane 23 različite masne kiseline, zbog primarnog cilja istraživanja o utjecaju dodatka prehrani obogaćenog n-3 višestruko nezasićenim masnim kiselinama (PUFA) na koncentraciju C-peptida i poboljšanje funkcije beta-stanica, rezultati su sažeti na odabrane masne kiseline za koje se smatra da su povezane s koncentracijom C-peptida. Analiza rezultata provedena je za EPA i DHA koje pripadaju n-3 redu, te AA, koja je n-6 reda. Od karakterističnih omjera masnih kiselina izdvojeni su omjer AA/DHA i omjer n-6/n-3 PUFA zbog njihove uloge pokazatelja upalnog stanja u organizmu.

Budući je masena koncentracija (mg/L) ovih masnih kiselina, posebice n-3 reda, u serumu mala, promjene su teško uočljive. Zbog toga se boljim pokazateljem smatraju promjene u njihovim međusobnim odnosima zbog čega su rezultati prikazani i masenim udjelima (%).

Sadržaj dugolančanih n-3 PUFA u sastavu lipida seruma s napredovanjem trudnoće raste. Takve promjene se direktno odražavaju na transplacentarni prijenos masnih kiselina u posteljicu (Berghaus i sur., 2000; Koletzko, 1997).

Masena koncentracija **arahidonske kiseline (AA)** postepeno i značajno raste u obje skupine sudionica (tablica 18, slika 2). Masena koncentracija nešto je veća u istraživanoj skupini u prvom i drugom tromjesečju, dok je u trećem tromjesečju i na dan porođaja masena koncentracija AA veća u kontrolnoj skupini, ali razlika nije statistički značajna. Pojačani unos n-3 PUFA u istraživanoj skupini omogućio je veću dostupnost ovih kiselina i njihovu pojačanu ugradnju, uz istovremeno smanjenu resorpciju i/ili ugradnju AA.

Iako masena koncentracija AA raste kroz trudnoću, važno je uočiti da se njezin udio značajno smanjuje kroz trudnoću, kako u istraživanoj, tako i u kontrolnoj skupini ispitanica (tablica 34).

Masena koncentracija **eikozapentaenske kiseline (EPA)** kontinuirano raste kroz trudnoću istraživane i kontrolne skupine. Iako je u

kontrolnoj skupini opaženo naglo povećanje EPA u drugom tromjesečju, nije bilo statistički značajne razlike po tromjesečjima između istraživane i kontrolne skupine (tablice 19 i 24, slika 3). U usporedbi s masenom koncentracijom DHA, manje promjene koncentracije EPA su očekivane, jer je u suplementaciji EPA znatno manje zastupljena.

Masena koncentracija **dokozaheksaenske kiseline (DHA)** u serumu sudionica ne razlikuje se značajno između skupina u prvom tromjesečju (tablica 20, slika 4). Uzorak iz prvog tromjesečja uzet je kod prvog dolaska trudnice u Kliniku, kada su i uključene u istraživanje. Rezultat iz prvog tromjesečja odražava stanje statusa n-3 PUFA kod trudnica prije početka suplementacije, stoga je očekivano da između istraživane i kontrolne skupine nije bilo statistički značajne razlike. Značajna razlika opaža se već u drugom tromjesečju i nastavlja se do kraja trudnoće. U istraživanoj skupini značajno je veća masena koncentracija DHA što je rezultat utjecaja kontinuirane suplementacije tijekom trudnoće. Isti rezultat se odražava i u masenom udjelu DHA (tablica 36, slika 11).

Iako je porast koncentracije EPA i DHA do trećeg tromjesečja uočen u obje skupine, u istraživanoj skupini porast je značajno veći. što ukazuje na dosljednost trudnica u uzimanju suplementacije i otvara mogućnost da se utječe na poboljšanje statusa majke i djeteta (tablice 26 i 27).

12. Sadržaj masnih kiselina u serumu pupčane vene. Esencijalne masne kiseline imaju važnu ulogu tijekom fetalnog razvoja i rasta, a za zdrav razvoj mozga i očiju (retine) od posebne je važnosti DHA (Uauy i sur., 1992; Green i Yavin, 1998; Carlson, 2001; Singh, 2005). Nedostatan unos DHA tijekom trudnoće povezuje se s oslabljenim kognitivnim funkcijama i smanjenom oštrinom vida kod novorođenčadi (Uauy i sur., 1992). Nakupljanje DHA u mozgu najbrže je tijekom trećeg tromjesečja trudnoće i tijekom prve godine života (Clandinin i sur., 1980; Martínez i Mougan, 1998), te je majčin status DHA u tom periodu značajan za fetalno zdravlje. No, studije su pokazale da je razina DHA u krvi majke

uglavnom niska tijekom zadnjeg tromjesečja, što se objašnjava visokom stopom prijenosa DHA prema fetusu (Montgomery i sur., 2003). Istovremeno, niska razina n-3 PUFA u krvi majke tijekom zadnjeg tromjesečja može biti urođeni regulatorni mehanizam koji omogućuje povećanje sinteze proupalnih molekula potrebnih za početak porođaja.

Budući da posteljica nema aktivnost desaturaza, a aktivnost fetalnih enzima *in utero* je vrlo ograničena, fetus ovisi o placentalnom prijenosu esencijalnih masnih kiselina i metabolita PUFA iz majčine cirkulacije (Sprecher, 1981). Stoga unos DHA kod žena prije i tijekom trudnoće ima velik utjecaj na količinu DHA koja je na raspolaganju fetusu. Nakupljanje n-3 PUFA u fetusu regulirano je majčinim statusom n-3 PUFA i funkcijom posteljice (Duttaroy, 2009).

Istraživanja na eksperimentalnim životinjskim modelima ukazuju da je prijenos esencijalnih masnih kiselina uvijek dvostruko veći od prijenosa neesencijalnih masnih kiselina u ukupnom prijenosu lipida u smjeru fetusa. Takva zapažanja pokazuju i potvrđuju da je prijenos masnih kiselina selektivan proces, kojim se omogućuje veća zastupljenost i koncentriranje masnih kiselina koje su neophodne za fetalni rast i razvoj (Honda i sur., 1990). DHA i AA iz majčine cirkulacije selektivno i preferencijalno prenose se kroz posteljicu prema fetusu tijekom trudnoće (Montgomery i sur., 2003; Duttaroy, 2009).

Status esencijalnih masnih kiselina fetusa ovisi o statusu masnih kiselina majke, tako da niže koncentracije AA i DHA u trudnica s DM-1 uvjetuju manju koncentraciju ovih masnih kiselina i u fetusu u usporedbi sa zdravim trudnicama. Masena koncentracija DHA u krvi pupčane vene značajno je veća u istraživanoj skupini, što je rezultat poboljšanog majčinog statusa DHA uslijed suplementacije (tablica 32, slika 7). Maseni udio DHA također je značajno veći u istraživanoj skupini (tablica 42).

Masena koncentracija EPA u krvi pupčane vene viša je u istraživanoj skupini nego u kontrolnoj, iako razlika nije statistički značajna. Taj

rezultat u skladu je s promjenama koncentracije EPA u krvi majke, gdje veće koncentracije u istraživanoj skupini nisu značajno veće u usporedbi s kontrolnom skupinom. Porast masene koncentracije EPA vjerojatno nije dosegao statističku značajnost jer je udio EPA u suplementaciji znatno manji od udjela DHA. Maseni udio EPA također nije značajno veći u istraživanoj skupini (tablica 42).

Masena koncentracija AA u krvi pupčane vene manja je u istraživanoj skupini nego u kontrolnoj, ali razlika nije statistički značajna (tablica 32). Međutim, analizom promjene masenog udjela AA pokazalo se da je on značajno niži u istraživanoj skupini (tablica 42).

Utjecaj suplementacije na smanjenje omjera AA/DHA i n-6/n-3 PUFA kod majke, dokazan je i u omjerima AA/DHA i n-6/n-3 PUFA u krvi pupčane vene. Oba omjera značajno su manja u istraživanoj skupini, čime pridonose smanjenju upalnog stanja (tablica 33, slika 8).

Prikazani rezultati i novije spoznaje o utjecaju povećane koncentracije n-3 PUFA na poboljšanje funkcije beta-stanica gušterače daju dobar temelj za nastavak istraživanja i smjernice u proučavanju još uvijek nedovoljno istraženog područja.

6. ZAKLJUČCI

6. ZAKLJUČCI

1. U krvi trudnica istraživane i kontrolne skupine nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji glukoze i postotku glikiranog hemoglobina, što upućuje da se radi o dijabetičnim trudnicama s dobro reguliranom glikemijom.

2. Sudionice koje su uzimale dodatak prehrani obogaćen n-3 višestruko nezasićenim masnim kiselinama (PUFA) imale su značajno veću koncentraciju C-peptida u trećem, u odnosu na prvo i drugo tromjesečje trudnoće, i značajno veću koncentraciju C-peptida u trećem tromjesečju trudnoće u usporedbi s trudnicama kontrolne skupine. Porast koncentracije C-peptida nađen je i kod sudionica kod kojih koncentracija C-peptida u prvom tromjesečju trudnoće nije bila mjerljiva. **Rezultati potvrđuju da dodatak n-3 višestruko nezasićenih masnih kiselina u prehranu povoljno utječe na poboljšanje funkcije beta-stanica kod trudnica koje boluju od dijabetesa tipa 1.**

3. Sudionice koje su dodatno uzimale n-3 višestruko nezasićene masne kiseline imale su veće masene koncentracije dokozaheksaenske kiseline (DHA) u krvi, te posljedično manje omjere n-6/n-3 PUFA i AA/DHA u drugom i trećem tromjesečju trudnoće u usporedbi sa sudionicama kontrolne skupine. Ovaj rezultat ukazuje da bi **povećani unos n-3 višestruko nezasićenih masnih kiselina mogao povoljno utjecati na smanjenje upalnog stanja kod trudnica s dijabetesom tipa 1.**

4. Povećani unos n-3 višestruko nezasićenih masnih kiselina rezultirao je povećanom masenom koncentracijom dokozaheksaenske kiseline (DHA) u serumu pupčane vene. Ovaj rezultat ukazuje da **povećani unos n-3 višestruko nezasićenih masnih kiselina kod dijabetičnih trudnoća pospješuje prijenos dokozaheksaenske kiseline u fetalni krvotok te bi mogao povoljno utjecati na neurološki razvoj fetusa.**

7. POPIS LITERATURE

7. POPIS LITERATURE

- Abedi, E.; Sahari, M. A. (2014) Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties, *Food Science & Nutrition*, **2**(5): 443–463.
- Akerele, O. A.; Cheema, S. K. (2016) A balance of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids is important in pregnancy, *Journal of Nutrition and Intermediary Metabolism*. **5**:23–33.
- Al, M. D. M.; van Houwelingene, A. C.; Hornstra, G. (1995) Long chain polyunsaturated fatty acids, pregnancy and pregnancy outcome. *American Journal of Clinical Nutrition*, **71**:S285–S291.
- Atkinson, M.A.; Maclaren, N.K. (1994) The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. U: Epstein, F.H. (ur.): Mechanisms of disease, *N. Engl. J. Med* **331**:1428-36.
- Bach, J. F. (1994) Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease., *Endocrine reviews*, **15**(4), pp. 516–542.
- Berberović, E.; Ivanišević, M.; Juras, J.; Horvatiček, M.; Delaš, I.; Djelmiš, J. (2013) Arachidonic acid docosahexaenoic acid in the blood of a mother and umbilical vein in diabetic pregnant women. *J Matern Fetal Neonatal Med.*; **26**:1287-91.
- Berberović, E.; Ivanišević, M.; Horvatiček, M.; Kralik-Oguić, S.; Đelmiš, J. (2014) Utjecaj glukoze i adipokina na porođajnu težinu kod trudnica sa šećernom bolesti tipa 1. *Gynaecologia et perinatologia: journal for gynaecology, perinatology, reproductive medicine and ultrasonic diagnostics*. **23**;116-120.
- Berghaus, T. M.; Demmelmair, H.; Koletzko, B. (2000) Essential fatty acids and their long-chain polyunsaturated metabolites in maternal and cord plasma triglycerides during late gestation., *Biology of the neonate*, **77**(2): 96–100.
- Bottazzo, G. F. (1984) Beta-Cell damage in diabetic insulinitis: are we approaching a solution?, *Diabetologia*, **26**(4): 241–249.
- Brundin T. (1999) Splanchnic and extrasplanchnic extraction of insulin following oral and intravenous glucose loads. *Clin Sci (Lond)*, **97**(4):429-36.
- Burdge, G. C.; Finnegan, Y. E.; Minihane, A. M.; Williams, C. M.; Wooton, S. A. (2003) Effect of altered dietary n-3 fatty acid intake upon plasma lipid fatty acid composition, conversion of [¹³C] α-linolenic acid to longer-chain fatty acids and partitioning towards β-oxidation in older man. *British Journal of Nutrition*, **90**: 311-321

- Burdge, G. C.; Calder, P. C. (2005) Conversion of α -linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults, *Reprod. Nutr. Dev.*, **45**:581–597.
- Calder, P. C. (1998) Dietary fatty acids and the immune system, *Nutrition reviews*, **56**(1):S70–S83.
- Carlson, S. E. (2001) Docosahexaenoic acid and arachidonic acid in infant development, *Seminars in Neonatology*, **6**(5):437–449.
- Chellakooty, M.; Vangsgaard, K.; Larsen, T.; Scheike, T.; Falck-Larsen, J.; Legarth, J.; Andersson, AM.; Main, K.M.; Skakkebaek, N.E.; Juul, A. (2004) A longitudinal study of intrauterine growth and the placental growth hormone (GH)-insulin-like growth factor I axis in maternal circulation: association between placental GH and fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab.*, **89**(1):384-91.
- Cristie WW. (1982) Lipid analysis.
- Clandinin, M. T.; Chappell, J. E.; Leong, S.; Heim, T.; Swyer, P. R.; Chance, G. W. (1980) Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: implications for fatty acid requirements, *Early Human Development*, **4**(2):121–129.
- Coleman, R.A. (1986) Placental metabolism and transport of lipid *Federation Proceedings*, **45**(10):2519-2523.
- Coletta, J. M.; Bell, S. J.; Roman, A. S. (2010) Omega-3 Fatty acids and pregnancy., *Reviews in obstetrics & gynecology*, **3**(4):163–71.
- DCCT study. (1998) Effect of intensive therapy on residual beta-cell function in patients with type 1 diabetes in the diabetes control and complications trial. A randomized, controlled trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *Ann Intern Med.* **128**(7):517-23.
- Delmis, J.; Drazancic, A.; Ivanisevic, M.; Suchanek, E. (1993) Glucose, insulin, HGH and IGF-I levels in maternal serum, amniotic fluid and umbilical venous serum: A comparison between late normal pregnancy and pregnancies complicated by diabetes and fetal growth retardation, *Journal of Perinatal Medicine*, **20**(1):47–56.
- Deniz, G.; Christmas, S. E.; Brew, R.; Johnson, P. M. (1994) Phenotypic and functional cellular differences between human CD3- decidual and peripheral blood leukocytes., *The Journal of Immunology*, **152**(9):4255-4261.
- Desoye, G.; Shafrir, E. (1994) Placental metabolism and its regulation in health and diabetes, *Molecular Aspects of Medicine*, **15**(6):505–682.
- Diabetes, D. O. F. (2010) 'Diagnosis and classification of diabetes

- mellitus', *Diabetes Care*, **33**(Suppl. 1):S62-S69.
- Diamant, Y. Z.; Metzger, B. E.; Freinkel, N.; Shafrir, E. (1982) Placental lipid and glycogen content in human and experimental diabetes mellitus., *American journal of obstetrics and gynecology*, **144**(1):5–11.
- Duttaroy, A. K. (2009) Transport of fatty acids across the human placenta: A review, *Progress in Lipid Research*, **48**(1):52–61.
- Elliott, J. A. (1975) The Effect of Pregnancy on the Control of Lipolysis in Fat Cells Isolated from Human Adipose Tissue, *European Journal of Clinical Investigation*, **5**(1):159–163.
- EURODIAB Substudy 2 Study Group (1999) Vitamin D supplement in early childhood and risk for Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, **42**:51-54.
- Faber, O. K.; Hagen, C.; Binder, C.; Markussen, J.; Naithani, V. K.; Blix, P. M.; Kuzuya, H.; Horwitz, D. L.; Rubenstein, A. H.; Rossing, N. (1978) Kinetics of human connecting peptide in normal and diabetic subjects, *Journal of Clinical Investigation*, **62**(1):197–203.
- Field, J. B. (1973) Extraction of insulin by liver, *Annual review of medicine*, **24**(1):309–314.
- Folch, J.; Lees, M.; Sloane–Stanley, G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.*, **226**:497-509.
- Fuglsang, A.T.; Borch, J.; Bych, K.; Jahn, T.P.; Roepstorff, P.; Palmgren, M. G. (2003). The binding site for regulatory 14-3-3 protein in plant plasma membrane H⁺-ATPase: Involvement of a region promoting phosphorylation-independent interaction in addition to the phosphorylation-dependent C-terminal end. *J. Biol. Chem.* **278**:42266–72.
- Gepts, W. (1965) Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus, *Diabetes*, **14**(10):619–633.
- De Giuseppe, R.; Roggi, C.; Cena, H. (2014) n-3 LC-PUFA supplementation: Effects on infant and maternal outcomes, *European Journal of Nutrition*, **53**(5):1147–1154.
- Green, P.; Yavin, E. (1998) Mechanisms of Docosahexaenoic acid accretion in the fetal brain, *Journal of Neuroscience Research*, **52**(2):129–136.
- Greenbaum, C. J.; Harrison, L. C. (2003) Guidelines for Intervention Trials in Subjects With Newly Diagnosed Type 1 Diabetes, *Diabetes*, **52**(5):1059 -1065.

- Greenbaum, C. J.; Anderson, A.M.; Dolan, L. M.; Mayer-Davis, E. J.; Dabelea, D.; Imperatore, G.; Marcovina, S.; Pihoker, C. (2009) Preservation of β -Cell Function in Autoantibody-Positive Youth With Diabetes, *Diabetes Care*, **32**:1839–1844.
- Hanebutt, F. L.; Demmelmair, H.; Schiessl, B.; Larqué, E.; Koletzko, B. (2008) Long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) transfer across the placenta, *Clinical Nutrition*, **27**(5):685–693.
- Hedman, C. A.; Frystyk, J.; Lindstrom, T.; Chen, J. W.; Flyvbjerg, A.; Orskov, H.; Arnqvist, H. J. (2004) Residual-cell function more than glycemic control determines abnormalities of the insulin-like growth factor system in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, **89**:6305–6309.
- Hollingsworth, D. R.; Grundy, S. M. (1982) Dorothy r. hollingsworth and scott m. grundy', **31**:1092–1097.
- Holub, B. J. (2006) Conversion efficiency of ALA to DHA in humans. DHA-EPA Omega-3 Institute.
- Honda, M.; Lowy, C.; Thomas, C. R. (1990) The effects of maternal diabetes on placental transfer of essential and non-essential fatty acids in the rat. *Diabetes Res*; **15**(1):47-51.
- Horvath, A.; Koletzko, B.; Szajewska, H. (2007) Effect of supplementation of women in high-risk pregnancies with long-chain polyunsaturated fatty acids on pregnancy outcomes and growth measures at birth: a meta-analysis of randomized controlled trials, *British Journal of Nutrition*, **98**(2):253-259.
- Horvaticek, M.; Djelmis, J.; Ivanisevic, M.; Oreskovic, S.; Herman, M. (2017) Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid supplementation on C-peptide preservation in pregnant women with type-1 diabetes: randomized placebo controlled clinical trial. *European journal of clinical nutrition*, **71**:968-972.
- Hsieh, S. D.; Iwamoto, Y.; Matsuda, A.; Kuzuya, T. (1988) Reduction in urine C-peptide clearance rate after metabolic control in NIDDM patients. *Endocrinol Jpn*; **35**:601–606.
- Ilonen, J.; Reijonen, H.; Herva, E.; Sjöröos, M.; Iitiä, A.; Lövgren, T.; Veijola, R.; Knip, M.; Åkerblom, H. K. (1996) Rapid HLA-DQB1 genotyping for four alleles in the assessment of risk for IDDM in the Finnish population, *Diabetes Care*, **19**(8):795–800.
- Ilic, S.; Jovanovic, L.; Wollitzer, A. O. (2005) Is the paradoxical first trimester drop in insulin requirement due to an increase in C-peptide concentration in pregnant type Idiabetic women? *Diabetologia*, **43**:1329-1330.

- Innis, S. M. (1991) Essential Fatty Acids in Growth and Development, *Prog Lip Res.*, **30**(1):39–103.
- Jaeger, C.; Allendorfer, J.; Hatziagelaki, E.; Dyrberg, T.; Bergis, K. H.; Federlin, K.; Bretzel, R. G. (1997) Persistent GAD 65 antibodies in longstanding IDDM are not associated with residual beta-cell function, neuropathy or HLA-DR status', *Horm Metab Res*, **29**(10):510–515.
- Karnik, S. K.; Chen, H.; McLean, G. W.; Heit, J. J.; Gu, X.; Zhang, A. Y.; Fontaine, M.; Yen, M. H.; Kim, S. K. (2007) Menin controls growth of pancreatic-cells in pregnant mice and promotes gestational diabetes mellitus. *Science*, **318**:806–809.
- Karvonen, M.; Viik-Kajander, M.; Moltchanova, E.; Libman, I.; LaPorte, R.; Tuomilehto, J. (2000) Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group., *Diabetes care*, **23**(10):1516–1526.
- Kassem, A. A.; Abu Bakar, M. Z.; Yong Meng, G.; Mustapha, N. M. (2012) Dietary (n-6:n-3) fatty acids alter plasma and tissue fatty acid composition in pregnant Sprague Dawley rats., *The Scientific World Journal*, **2012**,ID:851437.
- Khalfoun, B.; Thibault, F.; Watier, H.; Bardos, P.; Lebranchu, Y. (1997) Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human endothelial cell production of interleukin-6. *Adv Exp Med Biol.*, **400B**:589-97.
- Knip M. (2002) Can we predict type 1 diabetes in the general population? *Diabetes Care*, **25**:623–625.
- Knopp, R. H.; Bergelin, R. O.; Wahl, P. W.; Walden, C. E. (1985) Relationships of infant birth size to maternal lipoproteins, apoproteins, fuels, hormones, clinical chemistries, and body weight at 36 weeks gestation, *Diabetes*, **34**(Suppl. 2):71–77.
- Koletzko, B.(1997) Importance of dietary lipids. U: Tsang, R.; Zlotkin, S.; Nichols, B.; Hansen, J. (ur.): Nutrition During Infancy: Birth to 2 Years. Principles and practice, 123–53.
- Leonard, A. E.; Pereira, S. L.; Sprecher, H.; Huang, Y. S. (2004) Elongation of long-chain fatty acids, *Progress in Lipid Research*, **43**(1): 36–54.
- Licinio-Paixao, J.; Polonsky, K. S.; Given, B. D.; Pugh, W.; Ostrega, D.; Frank, B. F.; Rubenstein, A. H. (1986) Ingestion of a mixed meal does not affect the metabolic clearance rate of biosynthetic human C-peptide, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **63**(2):401–403.
- Lindegaard, M. L. S.; Damm, P.; Mathiesen, E. R.;Nielsen, L. B. (2006)

- Placental triglyceride accumulation in maternal type 1 diabetes is associated with increased lipase gene expression, *Journal of lipid research*, **47**(11):2581–2588.
- Lonberg, U.; Damm, P.; Andersson, A. M.; Main, K. M.; Chellakooty, M.; Lauenborg, J. et al. (2003) Increase in maternal placental growth hormone during pregnancy and disappearance during parturition in normal and growth hormone-deficient pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*, **188**:247–251.
- Madsbad, S.; Krarup, T.; Reguer, L.; Faber, O. K.; Binder, C. (1981) Effect of strict blood glucose control on residual B-cell function in insulin-dependent diabetics. *Diabetologia*, **20**:530–534.
- Madsbad S. (1983) Prevalence of residual B cell function and its metabolic consequences in type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*, **24**:141–147.
- Magnusson, A. L.; Waterman, I. J.; Wennergren, M.; Jansson, T.; Powell, T. L. (2004) Triglyceride hydrolase activities and expression of fatty acid binding proteins in the human placenta in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction and diabetes, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **89**(9):4607–4614.
- Makrides, M.; Duley, L.; Olsen, S. F. (2006) Marine oil, and other prostaglandin precursor, supplementation for pregnancy uncomplicated by pre-eclampsia or intrauterine growth restriction, *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Martínez, M.; Mougán, I. (1998) Fatty acid composition of human brain phospholipids during normal development.', *Journal of neurochemistry*, **71**(6):2528–2533.
- Mayer-Davis, E. J.; Dabelea, D.; Crandell, J. L., Crume, T., D'Agostino, R. B., Dolan, L., King, I. B., Lawrence, J. M.; Norris, J. M.; Pihoker, C. and The, N. (2013) 'Nutritional factors and preservation of C-peptide in youth with recently diagnosed type 1 diabetes: SEARCH Nutrition Ancillary Study.', *Diabetes care*, **36**(7):1842–50.
- Meistas, M. T.; Rendell, M.; Margolis, S.; Kowarski, A. A. (1982) Estimation of the secretion rate of insulin from the urinary excretion rate of C-peptide: study in obese and diabetic subjects, *Diabetes*, **31**:449-53.
- Miller, G. G.; Pollack, M. S.; Nell, L. J.; Thomas, J. W. (1987) Insulin-specific human T cells. Epitope specificity, major histocompatibility complex restriction, and alloreactivity to a diabetes-associated haplotype, *Journal of immunology*, **139**(11):3622–3629.
- Montelongo, A.; Lasuncion, M. A.; Pallardo, L. F.; Herrera, E. (1992) Longitudinal-Study of Plasma-Lipoproteins and Hormones During

- Pregnancy in Normal and Diabetic Women, *Diabetes*, **41**(12),1651–1659.
- Montgomery, C.; Speake, B. K.; Cameron, A.; Sattar, N.; Weaver, L. T. (2003) Maternal docosahexaenoic acid supplementation and fetal accretion. *The British journal of nutrition*, **90**(1):135–45.
- Morgan, T. (2014) Placental insufficiency is a leading cause of preterm labor, *NeoReviews*, **15**(12):518–525.
- Mori, T. A.; Woodman, R. J.; Burke, V.; Puddey, I. B.; Croft, K. D.; Beilin, L. J. (2003) Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on oxidative stress and inflammatory markers in treated-hypertensive type 2 diabetic subjects', *Free Radical Biology and Medicine*, **35**(7):772–781.
- Nielsen, J. H.; Svensson, C.; Galsgaard, E. D.; Moldrup, A.; Billestrup N.(1999) β Cell proliferation and growth factors. *J Mol Med*; **77**:62– 66.
- Nielsen, L. R.; Ekbom, P.; Damm, P.; Glümer, C.; Frandsen, M. M.; Jensen, D. M.; Mathiesen, E. R. (2004) HbA1c Levels are Significantly Lower in Early and Late Pregnancy', *Diabetes Care*, **27**(5):1200–1201.
- Nielsen, L. R.; Rehfeld, J. F.; Pedersen-Bjergaard, U.; Damm, P.; Mathiesen, E. R. (2009) Pregnancy-induced rise in serum C-peptide concentrations in women with type 1 diabetes, *Diabetes Care*, **32**(6): 1052–1057.
- Nielsen, L. R.; Damm, P.; Mathiesen, E. R. (2009) Improved pregnancy outcome in type 1 diabetic women with microalbuminuria or diabetic nephropathy: effect of intensified antihypertensive therapy? *Diabetes Care*, **32**:38–44.
- Norris, J. M.; Yin, X.; Lamb, M. M.; Barriga, K.; Seifert, J.; Hoffman, M.; Orton, H. D.; Barón, A. E.; Clare-Salzler, M.; Chase, H. P.; Szabo, N. J.; Erlich, H.; Eisenbarth, G. S. ; Rewers, M. (2007) Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Intake and Islet Autoimmunity in Children at Increased Risk for Type 1 Diabetes, *Jama*, **298**(12):1420.
- Novak, E. J.; Ortqvist, E.; Nord, E.; Edwall, L.; Hampe, C. S.; Bekris, L.; Persson, B. E.; Lernmark, A.(2005) Stability of disease-associated antibody titers in pregnant women with type 1 diabetes with or without residual β -cell function. *Diabetes Care*, **23**:1019– 1021.
- Nussey, S., Whitehead, S. (2001) *Endocrinology: An Integrated Approach*.
- Olsen, S.; Secher, N. (2002) Low consumption of seafood in early pregnancy as a risk factor for preterm delivery: prospective cohort study, *British Medical Journal*, **324**:1–5.
- Osmond, D. T. D.; Nolan, C. J.; King, R. G.; Brennecke, S. P.; Gude, N. M.

- (2000) Effects of gestational diabetes on human placental glucose uptake, transfer, and utilisation', *Diabetologia*, **43**(5):576–582.
- Palmer, J. P.; Fleming, G. A.; Greenbaum, C. J.; Herold, K. C.; Jansa, L. D.; Kolb, H.; Lachin, J. M.; Polonsky, K. S.; Pozzilli, P.; Skyler, J. S. (2004) ADA Workshop Report: C-Peptide Is the Appropriate Outcome Measure for Type 1 Diabetes Clinical Trials to Preserve β -Cell Function, *Diabetes*, **53**:250–264.
- Panero, F.; Novelli, G.; Zucco, C.; Fornengo, P.; Perot, M. (2009) Fasting Plasma C-Peptide and Micro- and Macrovascular Complications in a Large Clinic-Based Cohort of Type 1 Diabetic Patients, *Diabetes Care*, **35**:301-305.
- Parsons, J. A.; Brelje, T. C.; Sorenson, R. I. (1992) Adaptation of Islets of Langerhans to Pregnancy: Increased Islet Cell Proliferation and Insulin Secretion Correlates with the Onset of Placental Lactogen Secretion. *Endocrinology*, **130**:1459-1466.
- Pirttiaho, H. I.; Hartikainen-Sorri, A. L.; Kääpä, P.; Kaila, J. M.; Puukka, R. (1987) Maternal residual beta-cell function and the outcome of diabetic pregnancy', *Journal of Perinatal Medicine*, **15**(1):83–89.
- Poole, J. A.; Claman, H. N. (2004) Immunology of Pregnancy: Implications for the Mother, *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, **26**:161–170.
- Poudel, A.; Savari, O.; Striegel, D. A.; Periwal, V.; Taxy, J.; Millis, J. M.; Witkowski, P.; Atkinson, M. A.; Hara, M. (2015) Beta-cell destruction and preservation in childhood and adult onset type 1 diabetes, *Endocrine*, **49**(3):693–702.
- Pozzilli, P.; Visalli, N.; Signore, A.; Baroni, M. G.; Buzzetti, R.; Cavallo, M. G. et al. (1995) (IMDIAB V) Double blind trial of nicotinamide in recent onset insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetologia*, **38**:848–852.
- Radončić E. (2009) Imunologija i imunoterapija šećerne bolesti. U: Dijabetes u žena, (ur. Đelmiš, J.; Ivanišević, M.; Metelko, Ž.)
- Rieck, S.; Kaestner, K. H. (2013) Expansion of b-cell mass in response to pregnancy, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **21**(3):151–158.
- Ringholm, N. L.; Juul, A.; Pedersen-Bjergaard, U.; Thorsteinsson, B.; Damm, P.; Mathiesen, E. R. (2008) Lower levels of circulating IGF-I in type 1 diabetic women with frequent severe hypoglycaemia during pregnancy. *Diabet Med*, **25**:826 – 833.
- Sardesai, V. M. (1992) Biochemical and nutritional aspects of eicosanoids. *J. Nutr. Biochem.*, **3**:562-579.
- Shah, S. C.; Malone, J. I.; Simpson, N. E. (1989) A randomized trial of

- intensive insulin therapy in newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*; **320**:550– 554.
- Simopoulos, A. P. (1991) Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr*, **54**:438-63.
- Simopoulos, A. P. (2002) Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases, *Journal of the American College of Nutrition*, **21**(6):495–505.
- Singh, M. (2005) Essential fatty acids, DHA and human brain, *The Indian Journal of Pediatrics*, **72**(3):239–242.
- Sjöberg, S.; Gunnarsson, R.; Gjötterberg, M.; Lefvert, A. K.; Persson, A.; Ostman, J. (1987) Residual insulin production, glycaemic control and prevalence of microvascular lesions and polyneuropathy in long-term type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, **30**(4):208-13.
- Smita, E. N.; Oelena, E. A.; Seeratc, E. et al. (2000) Breast milk docosahexaenoic acid (DHA) correlates with DHA status of malnourished infants. *Archives of Disease in Childhood*, **82**:493–4.
- Sprecher H. (1981) Biochemistry of essential fatty acids. *Prog Lipid Res*, **20**:13e22.
- Sorenson, R.; Brelje, T. (1997) Adaptation of Islets of Langerhans to Pregnancy: β -Cell Growth, Enhanced Insulin Secretion and the Role of Lactogenic Hormones, *Hormone and Metabolic Research*, **29**(6):301–307.
- Steffes, M. W.; Sibley, S.; Jackson, M.; Thomas, W. (2003) Beta-Cell Function and the Development of Diabetes-Related Complications in the Diabetes Control and Complications Trial, *Diabetes Care*, **26**:832–836.
- Stene, L. C.; Ulriksen, J.; Magnus, P.; Joner, G. (2000) Use of cod liver oil during pregnancy associated with lower risk of Type I diabetes in the offspring, *Diabetologia*, **43**:1093–1098.
- Trebble, T.; Arden, N. K.; Stroud, M. A.; Wootton, S. A.; Burdge, G. C.; Miles, E. A.; Ballinger, A. B.; Thompson, R. L.; Calder, P. C. (2003) Inhibition of tumour necrosis factor- α and interleukin 6 production by mononuclear cells following dietary fish-oil supplementation in healthy men and response to antioxidant co-supplementation', *British Journal of Nutrition*, **90**(2):405.
- Uauy, R.; Birch, E.; Birch, D.; Peirano, P.; (1992) 'Visual and brain function measurements in studies of n-3 fatty acid requirements of infants', *The Journal of pediatrics*, **120**(4):S168–S180.

- Van Assche, F. A.; Aerts, L.; de Prins, F. (1978) A morphological study of the endocrine pancreas in human pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*, **85**: 818– 820.
- Vance, D. E.; Vance, J. E. (1985) Biochemistry of lipids and membranes.
- Vince, G. S.; Johnson, P. M. (1995) Materno-fetal immunobiology in normal pregnancy and its possible failure in recurrent spontaneous abortion?, *Human reproduction*, **10**(Suppl 2):107–13.
- Virtanen, S.; Knip, M. (2003) Nutritional risk predictors of β cell autoimmunity and type 1 diabetes at a young age, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **78**: 1053–1067.
- Wasada, T.; Kuroki, H.; Aarii, H.; Maruyama, A.; Katsumori, K.; Aoki, K. et al. (1995) Hyperglycemia facilitates urinary excretion of C-peptide by increasing glomerular filtration rate in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, **44**:1194–1198.
- Weber, P. C.; Leaf, A. (1991) Cardiovascular effects of omega 3 fatty acids. Atherosclerosis risk factor modification by omega 3 fatty acids. U: Simopoulos, A. P.; Kifer, R. R.; Martin, R. E.; Barlow, S. M. (ur.): Health Effects of w3 Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods, *World Rev Nutr Diet.*, **66**:218–232.
- Wilder, R. L. (1998) Hormones, pregnancy, and autoimmune diseases, *Annals of the New York Academy of Sciences*, **840**:45–50.
- Winter, W. E.; Schatz, D. A. (2011) Autoimmune markers in diabetes, *Clinical Chemistry*, **57**(2):168–175.
- Yokota, I.; Matsuda, J.; Naito, E.; Ito, M.; Shima, K.; Kuroda, Y. (1998) Comparison of GAD and ICA512/IA-2 Antibodies at and After the Onset of IDDM', *Diabetes Care*, **21**(1):49 LP-52.

8. SAŽETAK

8. SAŽETAK

Dijabetes tipa 1 (DM-1) autoimuna je bolest usmjerena protiv beta-stanica gušterače. Posljedica je postepeni gubitak funkcije beta-stanica i nemogućnost proizvodnje inzulina do razine koja je potrebna za održavanje normalne razine koncentracije glukoze u krvi. Tijekom trudnoće dolazi do djelomične supresije imunološkog upalnog sustava zbog čega autoimune bolesti često idu u remisiju tijekom trudnoće. Te se promjene imunološkog sustava kod dijabetičnih trudnoća odražavaju na povećanje rasta Langerhansovih otočića gušterače i na njihovu poboljšanu funkciju u usporedbi sa stanjem prije trudnoće. Najpouzdaniji pokazatelj očuvanja funkcije beta-stanica je koncentracija C-peptida. Sintetizira se u beta-stanicama Langerhansovih otočića u obliku molekule preteče proinzulina od kojeg proteolitičkim cijepanjem u ekvimolarnim količinama nastaju C-peptid i inzulin koji se izlučuju u portalnu cirkulaciju. Za razliku od inzulina, C-peptid se minimalno metabolizira u jetri, stoga periferna koncentracija C-peptida točnije odražava funkciju beta-stanica. Dokazana je važnost prehrane u sprječavanju pogoršanja bolesti, i mnoga su istraživanja pokazala da vitamini D i E, kao i n-3 višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA) mogu imati zaštitni utjecaj na očuvanje funkcije beta-stanica.

Cilj ovog istraživanja je bio pokazati utjecaj n-3 PUFA na izlučivanje C-peptida kod trudnica koje boluju od dijabetesa tipa 1.

Istraživanje je provedeno u razdoblju od kraja 2013. godine pa do početka 2017. Uključeno 100 trudnica koje boluju od DM-1 koje su podijeljene u dvije skupine. Kontrolna je skupina bila samo na uobičajenoj dijabetičkoj prehrani, dok je ispitivana skupina pored uobičajene dijabetičke dijeta od 12. tjedna trudnoće do porođaja uzimala dodatak prehrani obogaćen n-3 PUFA. Dodatak prehrani osiguran je donacijom kapsula *Pregnazon Complete* (HealthAid LTD), ljubaznošću tvrtke Kormedix d.o.o. Kapsule osim ostalih optimalnih/potrebnih vitamina i

mineralnih tvari za trudnice sadrže i 195 mg n-3 PUFA, od toga 30 mg eikozapentaenske kiseline (EPA, C20:5n-3) i 154 mg dokozaheksaenske kiseline (DHA, C22:6n-3). Trudnice u istraživanoj skupini uzimale su *Pregnazon Complete* kapsulu dva puta dnevno uz obrok.

Uzorci krvi uzimani su prilikom prvog dolaska u Kliniku (1. tromjesečje) zatim u 2. tromjesečju i 3. tromjesečju te na dan porođaja. Svi su uzorci krvi uzeti natašte. Uzorak krvi iz pupčane vene uzet je neposredno nakon porođaja. U uzorcima su se istog dana odredile koncentracija glukoze u krvi i C-peptida, te postotak glikiranog hemoglobina (HbA_{1c}), dok je analiza ukupnih lipida provedena naknadno. Ukupni lipidi su iz uzoraka seruma izdvojeni modificiranom metodom ekstrakcije organskim otapalima po Folchu, a analiza sastava metilnih estera masnih kiselina provedena je na vezanom sustavu GC/FID, ljubaznošću tvrtke Sample Control d.o.o.

Analizom rezultata utvrđeno je da nakon povećanog unosa n-3 PUFA dolazi do značajnog porasta koncentracije C-peptida u trećem tromjesečju u istraživanoj skupini. Porast koncentracije C-peptida tijekom trudnoće opažen je i kod trudnica istraživane skupine kod kojih se nije mogla dokazati koncentracija C-peptida prije trudnoće. Povećani unos n-3 PUFA značajno je povećao masenu koncentraciju DHA te značajno smanjio omjere AA/DHA i n-6/n-3 PUFA u istraživanoj skupini.

Rezultati istraživanja ukazuju da trudnoća u kombinaciji s povećanim unosom n-3 PUFA povoljno utječe na poboljšanje funkcije beta-stanica, i posljedičnog značajnog povećanja koncentracije C-peptida.

9. SUMMARY

9. SUMMARY

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease directed against the pancreatic beta-cells. Its consequence is the gradual loss of beta-cells' function and the inability to produce insulin to the level required to maintain normal blood glucose levels. During pregnancy there is a partial suppression of the immune inflammatory system due to which autoimmune diseases often go into remission during pregnancy. These changes in the immune system in diabetic pregnancies are reflected as an increase in the growth of islets of Langerhans and their improved function compared to the pre-pregnancy stage. The most reliable marker of the preservation of beta-cells' function is the C-peptide concentration in blood. It is synthesized in the beta-cells of islets of Langerhans in the form of molecule proinsulin from which proteolytic cleavage in equimolar amounts results in the secretion of C-peptide and insulin into portal circulation. Unlike insulin, the C-peptide is metabolized in the liver minimally; hence the peripheral C-peptide concentration reflects the beta-cells' function more accurately. The importance of nutrition in preventing deterioration caused by a disease has been demonstrated, and many studies have shown that vitamins D and E, as well as n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) can have a protective effect on the conservation of beta-cell function.

The aim of this study was to define the influence of n-3 PUFAs on C-peptide secretion in T1D pregnant women.

The study was carried out in the period from end of 2013 until the beginning of 2017. Study included 100 pregnant women with T1D, divided into two groups. The control group was only on the standard diabetic diet, while the study group included pregnant women on standard diabetic diet enriched with n-3 PUFAs from the 12th week of pregnancy until delivery. The nutritional supplementation has been provided by the donation of capsules Pregnazon Complete (HealthAid LTD), courtesy of Kormedix

d.o.o. Supplement, besides other necessary vitamins and minerals for pregnant women, also contains 390 mg of n-3 PUFAs, of which 60 mg eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5n-3) and 308 mg docosahexanic acid (DHA, C22:6n-3).

Blood samples were taken in all three trimesters, at the day of delivery and after the delivery from umbilical vein/cord. The samples were analyzed for levels of: fasting plasma glucose, fasting C-peptide and glycated hemoglobin within the same day. Extraction of total lipids was performed according to the modified Folch method and the fatty acid composition analysed by gas chromatography.

The data analysis revealed that after the increased intake of n-3 PUFA there was a significant increase in C-peptide concentration in the third trimester of the study group. The increase in C-peptide concentration during pregnancy was also observed in pregnant women who had the undetectable C-peptide concentration before pregnancy. Increased intake of n-3 PUFA significantly increased the concentration of DHA and significantly reduced AA/DHA and n-6/n-3 PUFA ratios in the study group.

The study results indicate that pregnancy and increased intake of n-3 PUFA have a beneficial effect on preservation of beta-cells' function and consequent significant increase in C-peptide concentration.

10. ŽIVOTOPIS I POPIS PUBLIKACIJA

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1982. godine u Zagrebu gdje je sam pohađala osnovnu školu i opću gimnaziju. Akademske godine 2000./2001. upisala sam Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Biološki odsjek, na kojem 2007. godine stječem titulu profesora biologije. Diplomski rad pod naslovom „Biokemijski pokazatelji stresa u vrsti *Posidonia oceanica* (L.) *Delile*“ izradila sam na Zavodu za fiziologiju bilja pod mentorstvom prof. dr. sc. Željke Vidaković-Cifrek. Interdisciplinarni poslijediplomski doktorski studij Molekularne bioznanosti, smjer Biologija, pri Sveučilištu u Osijeku upisala sam u akademskoj godini 2011./2012., te pod vodstvom prof. dr. sc. Marine Ivanišević izrađujem ovu doktorsku disertaciju.

U razdoblju od prosinca 2009. do srpnja 2016. zaposlena sam (s prekidom od 7 mjeseci) kao znanstveni novak na projektu Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta RH „*Dijabetes i metabolički sindrom nakon prethodnog gestacijskog dijabetesa*“ (108-1080401-0385) na Katedri za ginekologiju i opstetriciju Medicinskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od akademske godine 2015./2016. sudjelujem kao vanjski suradnik u održavanju seminara na kolegijima „*Fiziologija i biokemija uterusa u trudnoći i porodu*“, „*Dijabetes i trudnoća*“ i „*Nutritivna i respiracijska funkcija posteljice, rast fetusa, i fetalna endokrinologija*“ u sklopu poslijediplomskog studija Biomedicina i zdravstvo, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Od akademske godine 2016./2017. sudjelujem kao vanjski suradnik u održavanju vježbi na kolegiju „*Medicinska kemija i biokemija*“ u sklopu Integriranog preddiplomskog i diplomskog studija medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Pored navedenog projekta surađivala sam od 2014. do 2016. godine u istraživanju Instituta Ruđer Bošković naziva „*Regulacija gena serotoninskog sustava u humanoj posteljici*“ pod vodstvom doc. dr. sc. Jasminke Štefulj, v. zn. sur. Sudjelovala sam na nekoliko radionica i stručnih seminara: „*The GC and the SPE seminar by Dr. J. Baute, Phenomenex*“, „*Prilog spoznajama o značenju prehrane u prevenciji i liječenju bolesti*“, „*7th Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine Summer School*“, „*How to build biobank - learning by doing*“.

POPIS PUBLIKACIJA

ZNANSTVENI RADOVI U BAZI CC

1. Blažević, Sofia Ana; **Horvatiček, Marina**; Kesić, Maja; Zill, Peter; Hranilović, Dubravka; Ivanišević, Marina; Desoye, Gernot; Štefulj, Jasminka. (2017) Epigenetic adaptation of the placental serotonin transporter gene (SLC6A4) to gestational diabetes mellitus. *PLoS One*, **12**(6):e0179934

2. **Horvatiček, Marina**; Đelmiš, Josip; Ivanišević, Marina; Orešković, Slavko; Herman, Mislav. (2017) Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid supplementation on C-peptide preservation in pregnant women with type-1 diabetes: randomized placebo controlled clinical trial. *European journal of clinical nutrition*, **71**:968-972

3. Berberović, Edina; Ivanišević, Marina; Juras, Josip; **Horvatiček, Marina**; Delaš, Ivančica; Đelmiš, Josip. (2013) Arachidonic and docosahexaenoic acid in the blood of a mother and umbilical vein in diabetic pregnant women. *Journal of maternal-fetal & neonatal medicine*, **26**(13):1287-1291.

ZNANSTVENI RADOVI U DRUGIM BAZAMA

1. Đelmiš, Josip; Radončić, Erden; **Horvatiček, Marina**; Ivanišević, Marina. (2015) Dietary effect on c-peptide preservation in type 1 diabetic pregnant women. *Gynaecologia et perinatologia*. **24**(1):31-36.

2. Berberović, Edina; Ivanišević, Marina; **Horvatiček, Marina**; Kralik-Oguić, Saša; Đelmiš, Josip. (2014) Utjecaj glukoze i adipokina na porođajnu težinu kod trudnica sa šećernom bolesti tipa 1. *Gynaecologia et perinatologia*. **23**(4):116-120.

3. Berberović, Edina; Ivanišević, Marina; Juras, Josip; **Horvatiček, Marina**; Kralik-Oguić, Saša; Berberović, Behija; Đelmiš, Josip. (2013) Leptin, adiponektin, inzulin i glukoza u trudnica sa šećernom bolesti tipa 1. *Gynaecologia et perinatologia*. **22**(2):93-97.

USMENA PRIOPĆENJA

1. **Horvatiček, Marina**; Đelmiš, Josip; Ivanišević, Marina; Tuškan, Ksenija. (2017) C-peptide in type 1 diabetic pregnant patients. *9th*

International DIP Symposium on Diabetes, Hypertension, Metabolic Syndrome & Pregnancy. Barcelona, Španjolska.

2. **Horvatiček, Marina**; Ivanišević, Marina; Đelmiš, Josip. (2015) C-peptide preservation in type 1 diabetic pregnant women. *XXXVII Alpe Adria Meeting of Perinatal Medicine, Program and Book of abstracts*. Meir, Y. J.; Perin, D.; Mangano, M. C. (ur.). Bassano del Grappa, Italy; str. 54.

3. **Horvatiček, Marina**; Berberović, Edina; Ivanišević, Marina; Đelmiš, Josip. (2011) Arahidonic and docosahexaenoic acid in maternal venous blood/ plasma, umbilical veins and arteries in healthy and diabetic women. *XVII Lipid Meeting Leipzig, Abstract book*. Thiery, J.; Teupser, D. (ur.). Leipzig : Universität Leipzig; str. 43-44.

KONGRESNA PRIOPĆENJA (SAŽECI)

1. Ivanišević, Marina; **Horvatiček, Marina**; Đelmiš, Josip; Herman, Mislav; Starčević, Vito. (2017) State referral centre for diabetes in pregnancy biobank. *9th International DIP Symposium on Diabetes, Hypertension, Metabolic Syndrome & Pregnancy*. Barcelona, Španjolska.

2. Herman, Mislav; Đelmiš, Josip; Berberović, Edina; **Horvatiček, Marina**; Ivanišević, Marina. (2017) Fatty acid profile in maternal and fetal blood of pregnant women with type 1 diabetes mellitus. *9th International DIP Symposium on Diabetes, Hypertension, Metabolic Syndrome & Pregnancy*. Barcelona, Španjolska.

3. Gluščić, Valentina; **Horvatiček, Marina**; Jelinčić Vučković, Kristina; Delaš, Ivančica. (2017) Total lipid extraction from archaeological samples from Ancient sites on the island of Brač. *Methodology&Archaeometry, 04th scientific conference*. Miloglav, I. (ur.). Zagreb; str. 36.

4. Kosi, Nina; **Horvatiček, Marina**; Ivanišević, Marina; Đelmiš, Josip; Alić, Ivan. (2016) Utjecaj povećanog unosa n-3 nezasićenih masnih kiselina na izražaj placentalne lipoproteinske lipaze kod trudnica koje boluju od dijabetesa tipa 1. *XXX. Perinatalni dani "Ante Dražančić"*. *Gynaecologia et Perinatologia, Zbornik radova*. Đelmiš, J. (ur.). Zagreb: HLZ, Hrvatsko društvo za perinatalnu medicinu, str. 158.

5. Štefulj, Jasminka; Blazević, Sofia Ana; **Horvatiček, Marina**; Kesić, Maja; Ivanišević, Marina; Hranilović, Dubravka; Zill, Peter. (2016) Placental DNA methylation of the serotonin transporter gene is associated with maternal gestational diabetes. *Game of Epigenomics conference*. Vugrek, O.; Jerić, I.; Ambriović Ristov, A.; Vidoš, A. (ur.). Zagreb: Institut Ruđer Bošković, str. 55-56.

6. Kosi, Nina; **Horvatiček, Marina**; Alić, Ivan; Mitrečić, Dinko; Đelmiš, Josip; Ivanišević, Marina. (2015) Prijenos lipida kroz posteljicu - analiza

izražaja lipoproteinske lipaze u posteljici zdravih trudnica te trudnice s nasljednom hipertrigliceridemijom. *XXIX. Perinatalni dani „Ante Dražančić“*, zbornik, *Gynaecologia et perinatologia*. Đelmiš, J. (ur.). Zagreb: HLZ, Hrvatsko društvo za perinatalnu medicinu. Zagreb, str. 85.

7. **Horvatiček, Marina**; Ivanišević, Marina; Đelmiš, Josip. (2015) C-peptide preservation in Type 1 diabetic pregnant women. *47th Annual Meeting of Diabetic Pregnancy study Group of EASD*, Programme and Proceedings book. Str. 57.

8. Berberović, Edina; Ivanišević, Marina; **Horvatiček, Marina**; Delaš, Ivančica; Juras, Josip; Đelmiš, Josip. (2014) Masne kiseline u trudnica sa šećernom bolesti tipa 1. *Gynaecologia et perinatologia*. Đelmiš, J. (ur.). Zagreb, str. 110-111.

9. Starčević, Vito; Đelmiš, Josip; Herman, Mislav; Juras, Josip; Blajić, Jozo; Krivačić, Tea; Tuškan, Ksenija; Berberović, Edina; **Horvatiček, Marina**. (2014) Prijevremeni porođaj u stavu zatkom. *Gynaecologia et perinatologia*. Đelmiš, J.; Juras, J.; Berberović, E. (ur.). Zagreb, str. 143.

10. Berberović, Edina; Ivanišević, Marina; **Horvatiček, Marina**; Delaš, Ivančica; Đelmiš, Josip. (2013) Omega-3 fatty acids and neuroprotection in pregnancy. *XXXV. Alpe Adria Meeting of Perinatal Medicine XXVII Alpe Adria Perinatal Congress*. Kornhauser Cerar, Lj.; Lučovnik, M. (ur.). Bled, Slovenia, str. 49-50.

11. Berberović, Edina; Ivanišević, Marina; **Horvatiček, Marina**, Delaš, Ivančica; Đelmiš, Josip. (2013) Omega-3 masne kiseline u trudnica sa šećernom bolesti tipa 1. *XXVII. Perinatalni dani „Ante Dražančić“*, zbornik, *Gynaecologia et perinatologia*. Đelmiš, J.; Juras, J. (ur.). Zagreb, str. 108.

12. Juras, Josip; Ivanišević, Marina; **Horvatiček, Marina**; Župić, Tomislav; Đelmiš, Josip. (2013) Metaboličke posljedice gestacijskog dijabetesa. *XXVII. Perinatalni dani „Ante Dražančić“*, zbornik, *Gynaecologia et perinatologia*. Đelmiš, J.; Juras, J. (ur.). Zagreb: HLZ, Hrvatsko društvo za perinatalnu medicinu, str. 99-100.

13. Starčević, Vito; Đelmiš, Josip; Ivanišević, Marina; Herman, Mislav; Juras, Josip; Blajić, Jozo; **Horvatiček, Marina**. (2013) Utjecaj glikemije na rani embrionalni razvoj u trudnica dijabetičarki. *XXVII. Perinatalni dani „Ante Dražančić“*, zbornik, *Gynaecologia et perinatologia*. Đelmiš, J.; Juras, J. (ur.). Zagreb: HLZ, Hrvatsko društvo za perinat. med., str. 93.

14. Blajić, Jozo; Juras, Josip; **Horvatiček, Marina**; Ivanišević, Marina; Starčević, Vito; Đelmiš, Josip. (2012) Dovođenje trudnoća u trudnica s gestacijskim dijabetesom. *XXVI. Perinatalni dani „Ante Dražančić“*, *XX. Savjetovanje o perinatalnom mortalitetu RH*, zbornik radova,

Gynaecologia et perinatologia. Đelmiš, J. (ur.). Zagreb: HLZ, Hrvatsko društvo za perinatalnu medicinu, str. 93.

POSTERI (SAŽECI) U ZBORNICIMA SKUPOVA

1. Berberović, Edina; Ivanišević, Marina; **Horvatiček, Marina**; Delaš, Ivančica; Djelmiš, Josip. (2015) Fatty acids in type 1 diabetes pregnancy. *The 8th International DIP symposium on diabetes, hypertension, metabolic syndrome and pregnancy*. Hod, M.; Di Renzo, G. C.; Henrich, W. (ur.). Berlin, str. 50.
2. Berberović, Edina; Ivanišević, Marina; **Horvatiček, Marina**; Delaš, Ivančica; Djelmiš, Josip. (2014) Arachidonic and docosahexaenoic acid in the blood of a mother and umbilical vein in diabetic pregnant women. *XXIV European Congress of Perinatal Medicine*, str. 93.
3. Ivanisević, Marina; Berberović, Edina; **Horvatiček, Marina**; Kralik-Oguić, Saša; Djelmiš, Josip. (2014) The relation of glucose and adipokines to birth weight in type 1 diabetic pregnancy. *XXIV European Congress of Perinatal Medicine*, str. 94.
4. Borovac Štefanović, Leda; **Horvatiček, Marina**; Delaš, Margareta; Kalinić, Dubravka; Mandelsamen Perica, Marina; Ćurić, Maja; Delaš, Ivančica. (2012) Fatty acid composition in blood serum of patients with post-traumatic stress disorder . *Fourth European Workshop on Lipid Mediators, Book of Abstracts*. Balsinde, J. et al. (ur.). Paris: GREMI, str.76.
5. Delaš, Ivančica; Mandelsamen Perica, Marina; Borovac Štefanović, Leda; Kalinić, Dubravka; **Horvatiček, Marina**; Ćurić, Maja. (2011) Fatty acid composition and total cholesterol content of erythrocyte membranes in war veterans with post-traumatic stress disorder. *XVII Lipid Meeting Leipzig, Abstract book*. Thiery, J.; Teupser, D. (ur.). Leipzig, str. 87-88.
6. Mandelsamen Perica, Marina; Delaš, Ivančica; Borovac štefanović, Leda; Kalinić, Dubravka; **Horvatiček, Marina**; Ćurić, Maja. (2011) Promjene u sastavu masnih kiselina membrana eritrocita u osoba oboljelih od PTSP-a. *Prehrana i klinička dijetoterapija, zbornik sažetaka*. Ivandić, E.; Polić, Lj.(ur.). Rijeka: Med. fakultet Sveučilišta u Rijeci, str. 38-39.
7. Tkalec, Mirta; Vidaković-Cifrek, Željka; Berković, Buga; **Horvatiček, Marina**; Pevalek- Kozlina, Branka; Bakran-Petricioli, Tatjana. (2007) Preliminarna istraživanja biokemijskih pokazatelja stresa u listovima morske cvjetnice *Posidonia oceanica*. *2. hrvatski botanički kongres 2007. - knjiga sažetaka*, Britvec, M ; Škvorc, Ž. (ur.). Zagreb, str. 122-123.