Učinci hrane bogate ugljikohidratima i mastima te primjene antidijabetičkog tretmana na vazorelaksaciju u aortama kod pretilih i predijabetičkih odraslih štakora oba spola

Horvat, Helena

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:591880

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINE

Helena Horvat

UČINCI HRANE BOGATE UGLJIKOHIDRATIMA I MASTIMA TE PRIMJENE ANTIDIJABETIČKOG TRETMANA NA VAZORELAKSACIJU U AORTAMA KOD PRETILIH I PREDIJABETIČKIH ODRASLIH ŠTAKORA OBA SPOLA

Diplomski rad

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINE

Helena Horvat

UČINCI HRANE BOGATE UGLJIKOHIDRATIMA I MASTIMA TE PRIMJENE ANTIDIJABETIČKOG TRETMANA NA VAZORELAKSACIJU U AORTAMA KOD PRETILIH I PREDIJABETIČKIH ODRASLIH ŠTAKORA OBA SPOLA

Diplomski rad

Osijek, 2021.

Rad je ostvaren na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentorica rada: doc. dr. sc. Anita Matić

Rad ima 35 listova, 5 slika i 1 tablicu.

Predgovor radu

Neizmjerno zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Aniti Matić na pristupačnosti, nesebičnoj i velikoj pomoći te uloženom vremenu prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvalu upućujem i ekipi s baleta, pogotovo Tessi i Firili što su uvijek bile uho bez dna za frustracije i poteškoće vezane za fakultet, ali i život! Hvala vam svima što ste tako dobri i zabavni ljudi i što ste mi večeri učinili najopuštenijim dijelom dana.

Hvala i mojim Shady djevojkama što ste uvijek imale ohrabrujuće riječi i što jedne drugima nismo dale da posustanemo. Hvala vam na najboljim kavama, izlascima, druženjima i putovanjima tijekom ovih 6 godina.

Hvala i Luciji što si propatila skoro svaki ispit zajedno samnom i što si uvijek bila uporna toliko da i mene poguraš, bilo na baletu ili na faksu.

Jedno posebno hvala mom Joletu što si uvijek unosio vedrinu i ljubav u moje dane. Hvala ti što si uvijek bio spreman na šalu i veselje.

Za kraj, najveće i vječno hvala mojoj majci, ocu i ostaloj obitelji na poticanju radnih navika još od djetinjstva te na usađivanju ljubavi prema prirodnim znanostima. Hvala i na velikoj podršci te olakšavanju svih dijelova života koje ste mogli olakšati. Bez vas bi ovo bila nemoguća misija.

Sadržaj

POPIS KRATICA II
1. UVOD 1
1.1 Građa krvnih žila 1
1.2 Uloga i sinteza NO u endotelu krvnih žila 2
1.3 Oksidativni stres 3
1.4 Uloga pretilosti na krvne žile 4
1.5 Djelovanje antidijabetičkog tretmana (liraglutid i metformin) na krvne žile 6
2. HIPOTEZA 7
3. CILJEVI 8
4. MATERIJALI I METODE 9
4.1 Ustroj studije 9
4.2 Materijali 9
4.3 Metode 10
4.3.1 Anestezija životinja 10
4.3.2 Metoda izoliranih aortalnih prstenova („ringovi”) 10
4.4 Statističke metode 11
5. REZULTATI 12
5.1 Tjelesna masa 12
5.2 ACh-om potaknuta relaksacija aortalnih prstenova 13
5.3 Spolne razlike u razini ACh-om potaknute relaksacije aortalnih prstenova 16
5.4 Utvrđivanje mehanizama relaksacije 18
6. RASPRAVA 24
7. ZAKLJUČAK 27
8. SAŽETAK 28
9. SUMMARY 29
10. LITERATURA 30
11. ŽIVOTOPIS 35

POPIS KRATICA

ACh – acetilkolin

ATP – adenozin trifosfat

BH_4 – tetrahidrobiopterin

BMI – indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)

cGMP – ciklički gvanozin monofosfat

EDHF – endotelni hiperpolarizirajući faktor (engl. *endothelium-derived hyperpolarizing factor*)

eNOS – endotelna dušikov (II)-oksid sintetaza

ET-1 – endotelin-1

FAD – flavin adenin dinukleotid

FMN – flavin mononukleotid

GLP-1 – glukagonu sličan peptid-1 (engl. *glucagon-like peptide-1*)

GMS – glatke mišićne stanice

HClO – hiperklorična kiselina

$HO^{\cdot}$ – hidroksilni radikal

HSHFD – prehrana s visokim udjelom šećera i masti (engl. *high-sugar and high-fat diet*)

IL-17 – interleukin-17

IL-6 – interleukin-6

L-NAME – Nω-nitro-L arginin-metil ester

MCP-1 – monocitni kemotaktički protein-1 (engl. *monocyte chemoattractant protein-1*)

NADPH – reducirani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NO – dušikov (II)-oksid

NOS – dušikov (II)-oksid sintaza

O_2^- – superoksidni anion

$ONOO^-$ – preoksinitrit

PAF – čimbenik aktivacije trombocita (engl. *platelet-activating factor*)

PGI2 – prostaciklin (engl. *prostaglandin I2*)

PI3K/Akt – fosfatidilinozitol 3-kinaza / protein kinaza B

PVAT – perivaskularno masno tkivo (engl. *perivascular adipose tissue*)

RAS/MAPK – engl. *rat sarcoma / mitogen-activated protein kinase*

ROS – slobodni kisikovi radikali (engl. *reactive oxygen species)*

SFA – zasićene masne kiselina

TNF-α – čimbenik nekroze tumora α (engl. *tumor necrosis factor α*)

1. UVOD

1.1 Građa krvnih žila

S obzirom na promjer krvnih žila, žilni sustav se može podijeliti na makrocirkulaciju i mikrocirkulaciju. Mikrocirkulaciju čine arteriole, kapilare i venule. Glavna važnost mikrocirkulacije je u izmjeni tvari između krvi i tkiva. Krvne žile većeg promjera dijelimo na mišićne arterije srednjeg promjera i velike elastične arterije.

Sve krvne žile imaju sličnu opću građu. Građene su od tri sloja ili tunika: tunika intima, tunika medija i tunika adventicija. Unutarnji sloj, endotel građen je od jednog sloja endotelnih stanica poredanih na bazalnu membranu koju oblaže subendotelni sloj rahlog veziva (1). Uloge endotela su mnogobrojne. On ne djeluje samo kao pasivna barijera između krvi i tkiva nego sudjeluje i u aktivnom transportu hranjivih tvari, plinova, hormona i drugih makromolekula. Endotel također sintetizira brojne tvari putem kojih sudjeluje u hemostazi, permeabilnosti krvnih žila, vaskularnoj reaktivnosti, upalnom odgovoru te angiogenezi (2). Najvažnije vazodilatirajuće tvari koje luči endotel su: dušikov (II)-oksid (NO), prostaciklin (PGI2), endotelni hiperpolarizirajući faktor (EDHF), bradikinin, histamin, serotonin i tvar P. Najvažnije vazokonstriktivne tvari koje luči endotel su: endotelin-1 (ET-1), angiotenzin II, tromboksan A2 i slobodni kisikovi radikali (ROS, engl. *reactive oxygen species*). Održavanje fiziološke ravnoteže između ovih faktora ključno je za pravilno funkcioniranje endotela (3). Subendotelno vezivo obloženo je unutarnjom elastičnom membranom koja odvaja endotel od tunike medije te endotelu pruža stabilnost i elastičnost. Unutarnja elastična membrana građena je od elastina te ima otvore koji dopuštaju prolazak tvari iz krvi u dublje slojeve stijenke krvne žile.

Tunika medija građena je od koncentričnih slojeva glatkih mišićnih stanica i elastinskih vlakana. Oblaže ju vanjska elastična membrana kojom je tunika medija odvojena od adventicije. Adventicija je građena od kolagena tipa 1 i elastičnih vlakana te pruža mehaničku potporu krvnim žilama. Postepeno prelazi u okolno vezivno tkivo (1). U adventiciji većih krvnih žila nalazi se i *vasa vasorum*, splet malih krvnih žila koje opskrbljuju dublje slojeve stijenke kisikom i hranjivim tvarima, te perivaskularni živčani spletovi (2). U adventiciji se nalazi i perivaskularno masno tkivo (PVAT, engl. *perivascular adipose tissue*) koje ne samo da podupire krvne žile, nego ima i dvojaku ulogu u modulaciji vaskularne reaktivnosti (vazokonstrikcija i vazorelaksacija). Prvo, umanjuje vazokonstrikciju posredovanu fenilefrinom, serotoninom i

angiotenzinom II lučenjem vazorelaksirajućih čimbenika. Drugo, potiče vazokonstrikciju lučenjem vazokonstrikcijskih čimbenika koji djeluju preko perivaskularnih živaca (4).

Za razliku od arterija, vene imaju tanji mišićni sloj i deblju adventiciju. Vene također sadrže zaliske, polumjesečaste nabore tunike intime koji strše u lumen vena (1).

1.2 Uloga i sinteza NO u endotelu krvnih žila

NO je plin koji ima snažna vazodilatacijska, protuupalna i antioksidativna svojstva. U endotelu se NO sintetizira pomoću endotelne NO-sintetaze (eNOS). Ovaj enzim katalizira pretvorbu L-arginina i O_2 u L-citrulin i NO (5). Aktivacija eNOS je ovisna o kalmodulinu koji je prethodno aktiviran kalcijem. Kao kofatkori u reakciji potrebni su O_2, reducirani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH), tetrahidrobiopterin (BH_4) i flavinski nukleotidi (FAD i FMN). Za pravilno funkcioniranje eNOS potrebna je njegova dimerizacija u prisustvu hema i BH_4. Tvari koje djeluju kao agonisti eNOS (bradikinin, histamin ADP, acetilkolin (ACh), serotonin itd.) mogu povećati sintezu NO i dovesti do vazodilatacije, no najveći je fiziološki poticaj za stvaranje NO mehanički podražaj krvi koja dodiruje endotel.

NO uzrokuje vazodilataciju stimulirajući enzim gvanilat-ciklazu na proizvodnju cikličkog gvanozin monofosfata (cGMP). Stvoreni cGMP difundira u glatke mišićne stanice (GMS) tunike medije gdje uzrokuje smanjenje unutarstanične koncentracije kalcija. Smanjenje unutarstanične koncentracije kalcija rezultira opuštanjem GMS, a time i vazodilatacijom. Protuupalni učinak NO očituje se u smanjivanju lučenja proupalnih citokina i smanjenoj ekspresiji adhezijskih molekula na endotelnim stanicama. Antioksidativna svojstva ostvaruje kao čistač slobodnih kisikovih radikala. NO također pokazuje i antiagregacijska svojstva. Sve ove uloge NO ključne su u održavanju vaskularne homeostaze (6).

Smanjena bioraspoloživost NO u krvnim žilama definira se kao endotelna disfunkcija. Endotelnu disfunkciju karakteriziraju pojačana vazokonstrikcija, protrombotsko stanje, povećana proliferacija GMS i upala krvnih žila. Do smanjenja bioraspoloživosti NO može doći na dva načina: 1. pojačanim trošenjem bioraspoloživog NO u kemijskim reakcijama s ROS i 2. smanjenim stvaranjem NO. Niz akutnih i kroničnih patoloških stanja može uzrokovati pojačano stvaranje ROS-a, posebice superoksida, koji reagira s NO stvorenim u endotelu te time smanjuje njegovu bioraspoloživost i dovodi do stvaranja peroksinitrita ($ONOO^-$). Peroksinitrit, kao i superoksid, pripada skupini ROS. Zbog toga, njegovim pojačanim stvaranjem dolazi do

oksidativnog stresa i oštećenja okolnih tkiva. Drugi mehanizam smanjenja bioraspoloživosti NO je modifikacija eNOS. U stanjima oksidativnog stresa, ROS oksidiraju BH_4 u BH_2 i time onemogućuju dimerizaciju eNOS te mijenjaju svrhu tog enzima. Umjesto proizvodnje NO, takva eNOS proizvodi superoksidni radikal. ROS djeluju i na receptor za NO – gvanilat ciklazu. Uzrokuju oksidaciju hema i tako smanjuju raleaksirajuće djelovanje koje NO ima na glatke mišićne stanice (5, 7).

1.3 Oksidativni stres

Oksidativni stres je stanje u kojem postoji neravnoteža između stvaranja slobodnih kisikovih radikala te njihova uklanjanja iz organizma putem antioksidansa i enzima. ROS su molekule koje su vrlo reaktivne zbog nesparenog elektrona u vanjskoj ljusci. U ROS ubrajamo: superoksidni anion (O_2^-), hidrogen peroksid (H_2O_2), hiperklorična kiselina (HClO), hidroksilni radikal (HO^-), i peroksinitrit ($ONOO^-$). ROS se mogu stvarati tijekom endogenih i egzogenih procesa u enzimatskim i neenzimatskim reakcijama. Za endogenu proizvodnju ROS-a odgovorni su procesi kao što su aktivacija imunoloških stanica, upala, starenje, pretjerana tjelovježba, ishemija, itd. (8). Najveći endogeni izvor ROS-a je aerobni metabolizam, odnosno mitohondriji u kojima ROS nastaju kao nusproizvod respiracijskog lanca. Ostale reakcije koje mogu stvarati ROS su one uključene u sintezu prostaglandina, fagocitozu i sustav citokroma P450. Razni okolišni čimbenici koji djeluju kao egzogeni izvori ROS-a mogu biti teški metali, lijekovi, ionizirajuće zračenje, te pržena, masna i dimljena hrana. Stanice našeg organizma posjeduju obrambene mehanizme za uklanjanje viška ROS-a. Ti se mehanizmi uglavnom baziraju na enzimima kao što su katalaza, superoksid dismutaza i glutation peroksidaza. Kada ti mehanizmi zakažu i stvaranje ROS-a se poveća, povećava se njihovo štetno djelovanje na stanične strukture, što dovodi do stanične ozljede i smrti. To uzrokuje poremećaje brojnih fizioloških funkcija zbog čega se oksidativni stres nalazi u podlozi brojnih bolesti. Stvaranje malih količina ROS-a dio je normalne fiziologije. Oni u organizmu imaju mnoge uloge: regulacijsku, obrambenu ulogu, sudjeluju u unutarstaničnoj signalizaciji te proliferaciji. Vrlo važnu ulogu imaju i u imunološkom odgovoru, gdje djeluju kao medijatori upale i signalne molekule (9).

Oksidativni stres ima važne učinke i na endotel. Smanjuje bioraspoloživost NO, povećava količinu trombocitnog aktivirajućeg faktora (PAF, engl. *platelet-activating factor*), povećava izražavanje adhezijskih molekula, te povećava količinu leukotriena B4 i citokina. Povećanjem

razine oksidativnog stresa dolazi do prekomjernog stvaranja proupalnih citokina, što uzrokuje prekomjerno pobuđivanje imunološkog sustava i upalu. Sve to dovodi do endotelne disfunkcije (9).

Poticaj za stvaranje ROS može biti i višak nutrijenata ako ne postoji potražnja za njima. Pretilost, kao posljedica dugotrajnog suviška nutrijenata povezana je s poremećajima metabolizma ugljikohidrata i masti te sistemskom upalom niskog stupnja. Pokazalo se da konzumiranje dijete bogate ugljikohidratima i mastima (HSHFD, engl. *high-sugar and high-fat diet*) predstavlja veliki rizični čimbenik za razvoj metaboličkog sindroma i dijabetesa tipa 2 koji u svojoj podlozi imaju povećane razine oksidativnog stresa. U stanjima hiperglikemije i hiperlipidemije postoji suvišak nutrijenata s posljedičnim povećanjem protoka elektrona kroz respiracijski lanac. Zbog toga dolazi do ″curenja elektrona″ kroz kopmlekse I i III respiracijskog lanca. Time se povećava stvaranje superoksidnog aniona i vodikovog peroksida u mitohondrijima, a što nadalje povećava razinu oksidativnog stresa u stanicama. Također se pokazalo kako su u pretilih miševa razine antioksidativnih enzima (katalaze, superoksid dismutaze i glutation peroksidaze) snižene u odnosu na miševe normalne tjelesne mase. Pretpostavlja se da povećano stvaranje ROS u mitohondrijima uzrokovano suviškom nutrijenata inducira i inzulinsku rezistenciju. Povećana razina oksidativnog stresa koja nastaje u ovim stanjima povezuje se i s upalom. Slobodni radikali, kao jedni od ključnih signalnih molekula u upalnom odgovoru, povećavaju lučenje proupalnih citokina te tako doprinose sistemskoj upali niskog stupnja koja je povezana s pretilosti i inzulinskom rezistencijom (7, 10, 11).

1.4 Uloga pretilosti na krvne žile

Pretilost se definira kao pretjerano nakupljanje tjelesne masti s indeksom tjelesne mase (BMI, engl. *body mass index*) iznad 30 kg/m^2. Pretilost nije samo zasebna bolest nego i rizični čimbenik za razvoj drugih metaboličkih i kardiovaskularnih bolesti kao što su dijabetes tip 2, hipertenzija, nealkoholna bolest jetre i moždani udar. Ovu metaboličku bolest obilježava kronična upala niskog stupnja s povišenim razinama upalnih biljega (9). Važan uzročnik upale u sklopu pretilosti je hipoksija masnog tkiva koja nastaje zbog prekomjernog povećanja mase adipocita i posljedičnog nedovoljnog dotoka krvi u masno tkivo. Hipoksija dovodi do nekroze masnog tkiva i njegove infiltracije makrofazima. To za posljedicu ima povećano otpuštanje proupalnih citokina, od kojih su najvažniji IL-6, TNF-α, leptin i monocitni kemotaktički protein-1 (MCP-1)

(12). Drugi uzročnik upale u sklopu pretilosti je oksidativni stres koji nastaje kao posljedica viška nutrijenata i posljedične hiperprodukcije ROS u mitohondrijima (7).

Poznato je da u stanjima metaboličkih abnormalnosti koje prate pretilost, kao što su hiperglikemija, hiperlipidemija i inzulinska rezistencija dolazi do endotelne disfunkcije. Endotelna disfunkcija u pretilosti je multifaktorijalno stanje koje je karakterizirano smanjenom bioraspoloživošću NO. To događa kao posljedica: 1.) pojačane razgradnje NO uslijed povećanog stvaranja ROS-a i 2.) smanjenog stvaranja NO putem eNOS (13). Pretilost nadalje igra veliku ulogu u nastanku endotelne disfunkcije uzrokujući i kroničnu upalu niskog stupnja u organizmu. Veliku ulogu imaju i stanja povezana s pretilosti kao što je inzulinska rezistencija, a važna je i uloga perivaskularnog masnog tkiva.

U fiziološkim uvjetima PVAT potiče vazodilataciju lučenjem tvari koje povećavaju bioraspoloživost NO. Najvažnija od tih tvari je adiponektin (14). Adiponektin je protuupalna tvar koja umanjuje upalnu reakciju endotela inhibirajući aktivaciju makrofaga. U fiziološkim uvjetima adiponektin djeluje na endotel tako da stimulira sintezu NO aktiviranjem eNOS (15). U pretilih osoba dolazi do povećanja mase adipocita u PVAT-u proporcionalno povećanju mase visceralnog masnog tkiva (16). Takvo, hipertrofično, perivaskularno masno tkivo poprima upalni fenotip. Pojačava se lučenje proupalnih adipocitokina kao što su leptin, rezistin, IL-6, TNF-α i IL-17. Također se povećava i lučenje MCP-1 što uzrokuje infiltraciju masnog tkiva aktiviranim makrofazima, a zbog čega se susljedno povećava lučenje leptina i smanjuje lučenje adiponektina (17). Zbog smanjenog lučena adiponektina iz PVAT-a u pretilih je osoba umanjen fiziološki, vazorelaksirajući učinak perivaskularnog masnog tkiva posredovan adiponektinom što doprinosi razvoju endotelne disfunkcije (17, 18).

Inzulinska rezistencija je prisutna u pretilosti. Ne zna se točan mehanizam nastanka inzulinske rezistencije u pretilih osoba, ali se smatra da veliku ulogu imaju oksidativni stres, upala te mitohondrijska disfunkcija (19). Upala perivaskularnog masnog tkiva, kao i manjak adiponektina, promoviraju inzulinsku rezistenciju u krvnim žilama (20, 21). Do endotelne disfunkcije zbog inzulinske rezistencije i prateće hiperinzulinemije dolazi zbog neuravnoteženosti između vazodilatacijskog učinka puta NO i vazokonstrikcijskog učinka sustava endotelina-1 (ET-1). U fiziološkim uvjetima inzulin, vezanjem za svoje receptore na endotelnim stanicama, uzrokuje istovremenu aktivaciju 2 puta unutarstanične signalizacije: PI3K/Akt puta što vodi u sintezu NO putem eNOS i RAS/MAPK kaskade što vodi u sintezu

ET-1. U fiziološkim uvjetima prevladaju učinci sinteze NO, što uzrokuje neto vazodilataciju (22). Suprotno tome, u stanjima povezanim s endotelnom disfunkcijom, kao što je pretilost, PI3K/Akt put biva oštećen, dok RAS/MAPK put ostaje pošteđen. Dolazi do prevage sinteze ET-1 i vazokonstrikcije čime se dodatno pogoršava inzulinska rezistencija kao posljedica smanjenog protoka krvi kroz tkiva (23).

1.5 Djelovanje antidijabetičkog tretmana (liraglutid i metformin) na krvne žile

Metformin je antidijabetik koji spada u skupinu bigvanida. Smatra se prvom linijom liječenja dijabetesa tipa 2. Svoje farmakološko djelovanje ostvaruje putem 3 glavna mehanizma: 1) inhibira glukoneogenezu i glikogenolizu u jetri čime smanjuje proizvodnju glukoze u jetri, 2) povećava osjetljivost na inzulin tako što poboljšava periferni unos glukoze i iskorištavanje glukoze u mišićima, 3) odgađa apsorpciju glukoze iz tankog crijeva. Metformin ne potiče sekreciju inzulina zbog čega ne izaziva hipoglikemiju. Pokazalo se da terapija metforminom u osoba koje boluju od dijabetesa tipa 2 umanjuje inzulinsku rezistenciju i poboljšava o endotelu ovisnu vazodilataciju. Također se pokazalo da dugotrajna terapija metforminom snižava razine nekih upalnih parametara. Najvažniji mehanizmi putem kojih metformin poboljšava endotelnu funkciju su smanjenje adhezije leukocita smanjenjem ekspresije adhezijskih molekula na površini endotelnih stanica, povećanje bioraspoloživosti NO smanjenjem oksidativnog stresa i poboljšanjem funkcije eNOS, inhibiranje vaskularnog starenja potaknutog hiperglikemijom te preveniranjem ozljede i smrti endotelnih stanica poboljšanjem vaskularnog integriteta (3).

Liraglutid je antidijabetik koji pripada skupini analoga glukagonu sličnog peptida-1 (GLP-1). Djeluje tako što se veže na GLP-1 receptor te ga aktivira. Točan mehanizam djelovanja nije još u potpunosti jasan. Neka ispitivanja su prikazala unos lijeka u neke dijelove mozga pri čemu je liraglutid vezanjem ta GLP-1 receptore pojačao signalizaciju sitosti i smanjio signalizaciju gladi. GLP-1 receptori mogu se još naći u srcu, krvnim žilama, imunološkom sustavu i bubrezima. Liraglutid snižava tjelesnu masu smanjenjem količine masnog tkiva i to pretežito visceralnog masnog tkiva, regulira apetit pojačanjem osjećaja sitosti i smanjenjem osjećaja gladi, stimulira lučenje inzulina i smanjuje lučenje glukagona potaknuto glukozom. Pokazalo se također da liraglutid poboljšava funkciju ß-stanica gušterače. Učinci GLP-1 analoga na krvne žile uključuju smanjenje proliferacije vaskularnih GMS-a, smanjenje oksidativnog stresa i povećanje bioraspoloživosti NO (24).

2. HIPOTEZA

Prehrana s visokim udjelom masti i ugljikohidrata uzrokuje narušavanje razine vazorelaksacije u aortama kod pretilih i predijabetičkih štakora te različiti vaskularni odgovor ovisno o spolu. Antidijabetička terapija ima pozitivan utjecaj te poboljšava vaskularni odgovor krvnih žila.

3. CILJEVI

Ciljevi istraživanja su:

1) Procijeniti krvožilnu funkciju i relaksaciju induciranu acetilkolinom (Ach) kod Sprague-Dawley štakora oba spola hranjenih hranom bogatom mastima i ugljikohidratima

2) Ispitati ulogu antidijabetičkih lijekova (metformin i liraglutid) u navedenim procesima

4. MATERIJALI I METODE

4.1 Ustroj studije

Provedeno istraživanje je eksperimentalna studija na pokusnim laboratorijskim životinjama (Sprague-Dawley štakorima). Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva za istraživanja Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, Medicinskog fakulteta Osijek (KLASA: 602-04/21-08/07, URBROJ: 2158-61-07-21-106).

4.2 Materijali

Uzgoj i dijetni protokol na životinjama provodili su se u Vivariju Medicinskog fakulteta Osijek. U istraživanju su korišteni Sprague-Dawley štakori oba spola u starosti od 10 mjeseci. U toj dobi životinje su bile podijeljene u 4 skupine te su im uvedeni dijetni protokoli u trajanju od 4 mjeseca:

1) Kontrolna skupina: životinje su tijekom svih 14 mjeseci konzumirale standardnu hranu za štakore
2) HSHFD skupina: životinje koje su od 10. do 14. mjeseca starosti konzumirale hranu koja sadrži 56 % ugljikohidrata i 12 % krute masti u svom sastavu
3) HSHFD + METFORMIN skupina: životinje koje su od 10. do 14. mjeseca starosti konzumirale hranu koja sadrži 56 % ugljikohidrata i 12 % krute masti u svom sastavu. Od 51. do 65. tjedna životinje su primale terapiju antidijabetikom metforminom u dozi od 50 mg/kg/dan
4) HSHFD + LIRAGLUTID skupina: životinje koje su od 10. do 14. mjeseca starosti konzumirale hranu koja sadrži 56 % ugljikohidrata i 12 % krute masti u svom sastavu. Od 51. do 65. tjedna životinje su primale terapiju antidijabetikom liraglutidom u dozi od 0,3 mg/kg/dan

4.3 Metode

Nakon završenog dijetnog protokola životinje su uključene u protokol fiziološkog pokusa određivanja vaskularne reaktivnosti u Laboratoriju za mikrocirkulaciju pri Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku. Svim životinjama je izmjerena tjelesna masa i izmjerena razina glukoze u krvi na početku i kraju dijetnog protokola.

4.3.1 Anestezija životinja

Prije početka fizioloških protokola sve životinje su anestezirane kombinacijom ketanesta S 75 mg/kg (Ketanest S 25 mg/ml, ampule 2 ml, Pfizer) i midazolama 0,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/ml, 3 ml, Torrex Chiesi Pharma) i potom dekapitirane.

4.3.2 Metoda izoliranih aortalnih prstenova („ringovi")

Nakon otvaranja prsnog koša, torakalni dio aorte se pažljivo izvadi iz životinje i položi u Krebs-Henseleit otopinu temperature 4 °C, pH 7,4. Aorta se preparira i očisti od okolnog vezivnog i masnog tkiva te izreže u 4 prstena širine 4 mm. Prsteni su potom stavljeni u organske bazenčiće (10 ml zapremine) s Krebs-Henseleitovom otopinom temperature 37 °C, a koja je prožimana 95 %-tnim O_2 i 5 %-tnim CO_2 pomoću dvije paralelne čelične žice provučene kroz lumen prstena. Potom je jedna žica učvršćena na dno držača koji se uranja u bazenčić s kupelji, a druga je povezana na pretvarač vlačne sile preko kojeg je mjeren tonus žilnog prstena. Pretvarač sile je spojen na pojačalo i na analogno-digitalni pretvarač gdje se prati grafički prikaz tijeka pokusa na ekranu računala. Protokol se sastoji od nekoliko dijelova:

1. Stabilizacija krvne žile (ekvilibracija bez djelovanja sile kroz 30 minuta, potom ekvilibracija pod silom od 2 g kroz 60 min)

2. Inicijalni prekontrakcijski test (jednom dozom noradrenalina 10^{-7} M)

3. Testiranje intaktnosti i funkcije endotela (za procjenu endotel-ovisne vazodilatacije koristio se ACh 10^{-9} do 10^{-5} M)

4. Specifični testovi (protokom-posredovana vazorelaksacija krvnih žila mjerila se u odsutnosti i prisutnosti inhibitora dušik-oksid sintaze (NOS; 10^{-6} M) i TEMPOL-a ("hvatača slobodnih radikala"; 10^{-5} M)).



Slika 1. Sustav za izolirane organe
(slika preuzeta s dozvolom iz doktorske disertacije doc. dr. sc. Zrinke Mihaljević)

4.4 Statističke metode

Veličina uzorka određena je pomoću SigmaPlot v11.2 (Systant Software, Inc.) statističkog programa. Uz alfa = 0,05 te snagu testa od 0,80 te predviđenu najmanju mjerljivu razliku u prosječnim vrijednostima od 0,25, potrebno je minimalno 4 pokusne životinje po skupini. Podaci su dobiveni softverom koji je osigurao proizvođač uređaja (Experimetria Ltd, Budimpešta, Mađarska), a zatim prebačeni u proračunsku tablicu za statističke analize pomoću SigmaPlot v11.2 (Systat Software, Chicago, USA). U svrhu analize razlika u vazorelaksaciji aortalnih prstenova među skupinama izazvanih ACh-om koristila se dvosmjerna ANOVA (Two-way ANOVA) i Bonferroni post hoc test. Numerički podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom. Statistička značajnost postavljena je na $p < 0,05$. Za grafički prikaz dobivenih rezultata korišten je GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

5. REZULTATI

5.1 Tjelesna masa

Tjelesna masa svih životinja mjerena je na početku dijetnog protokola i prije samog žrtvovanja životinje.

Tablica 1. Vrijednosti tjelesne mase (g) Sprague-Dawley štakora oba spola na početku i kraju protokola

	Aritmetička sredina (standardna devijacija)							
	Tjelesna masa (g)							
	Ženski Sprague-Dawley štakori				**Muški Sprague-Dawley štakori**			
Pokusne skupine	**Kontrola (N = 7)**	**HSHFD (N = 6)**	**HSHFD + LIRAGLUTID (N = 4)**	**HSHFD + METFORMIN (N = 8)**	**Kontrola (N = 7)**	**HSHFD (N = 7)**	**HSHFD + LIRAGLUTID (N = 8)**	**HSHFD + METFORMIN (N = 8)**
Početno vaganje	316 (11)	309 (12)	307 (7)	305 (15)	593 (56)	595 (99)	647 (51)	648 (44)
Završno vaganje	348 (22)*†	346 (28)*†	224 (15)	391 (32)*	626 (53)	748 (147)‡	569 (62)	733 (74)‡

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija

*HSHFD + LIRAGLUTID vs. Kontrola ($p < 0,001$), HSHFD ($p < 0,001$), HSHFD + METFORMIN ($p < 0,001$)

†HSHFD + METFORMIN vs. Kontrola ($p = 0,01$), HSHFD ($p = 0,01$)

‡HSHFD + LIRAGLUTID vs. HSHFD + METFORMIN ($p = 0,02$), HSHFD ($p = 0,02$)

HSHFD - HSHFD (engl. *high sugar high fat diet*) - grupa izložena konzumaciji hrane s visokim udjelom ugljikohidrata i masti

U mjerenje razlika tjelesne mase uključene su samo životinje koje su imale oba mjerenja (početno i završno vaganje).

Na početku protokola nije utvrđena razlika u tjelesnoj masi štakora unutar ispitivanih skupina istog spola (između ženskih skupina $p = 0,76$; između muških skupina $p = 0,51$), što je bilo i za očekivati jer su sve životinje jednake dobi.

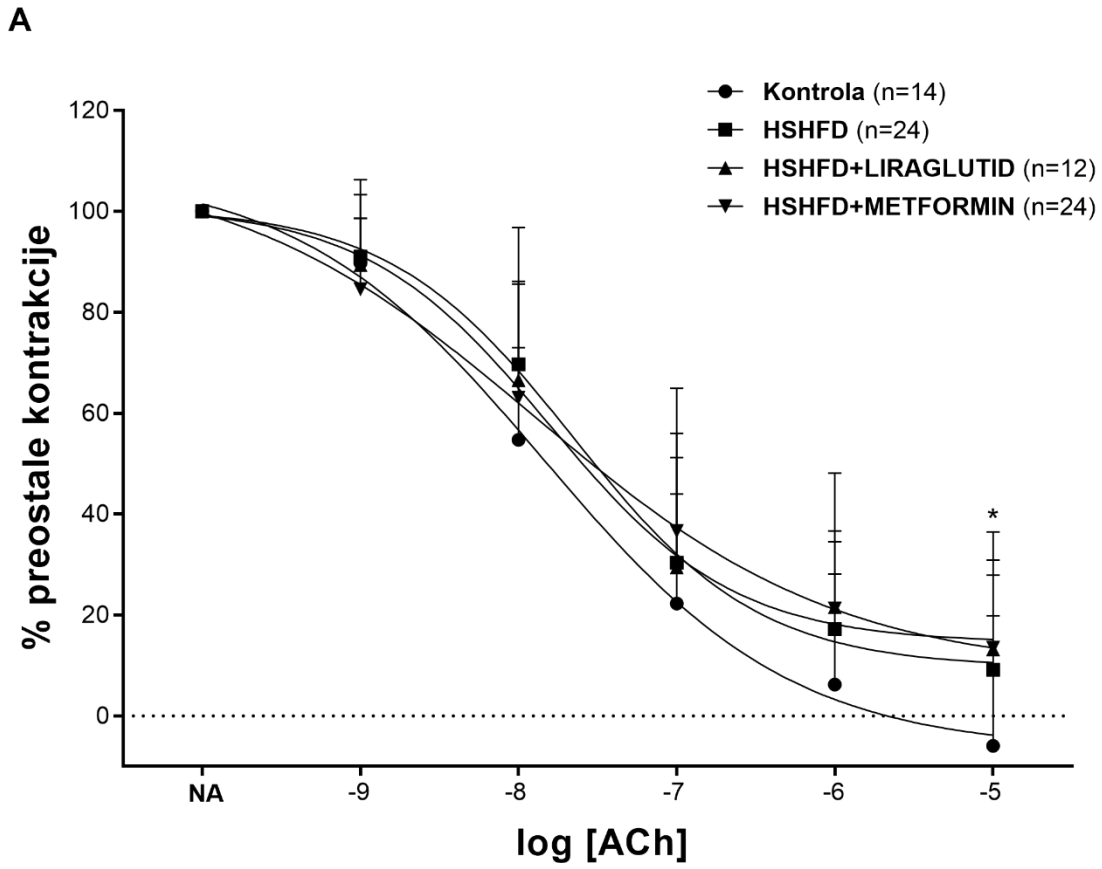
Nakon završetka dijetnog protokola u ženskoj skupini štakora je utvrđeno kako ženke koje su pripadale HSHFD + LIRAGLUTID skupini imaju statistički manju tjelesnu masu od kontrolnih ($p < 0,001$), HSHFD ($p < 0,001$) i HSHFD + METFORMIN ($p < 0,001$) štakorica. Također, pokazalo se kako je terapija metforminom uzrokovala značajan porast tjelesne mase u skupini HSHFD + METFORMIN u odnosu na kontrole ($p = 0,01$) i HSHFD ($p = 0,01$).

Kod muških štakora, utvrđeno je kako HSHFD + LIRAGLUTID skupina ima statistički manju tjelesnu masu u odnosu na skupine HSHFD ($p = 0,02$) i HSHFD + METFORMIN ($p = 0,02$).

5.2 ACh-om potaknuta relaksacija aortalnih prstenova

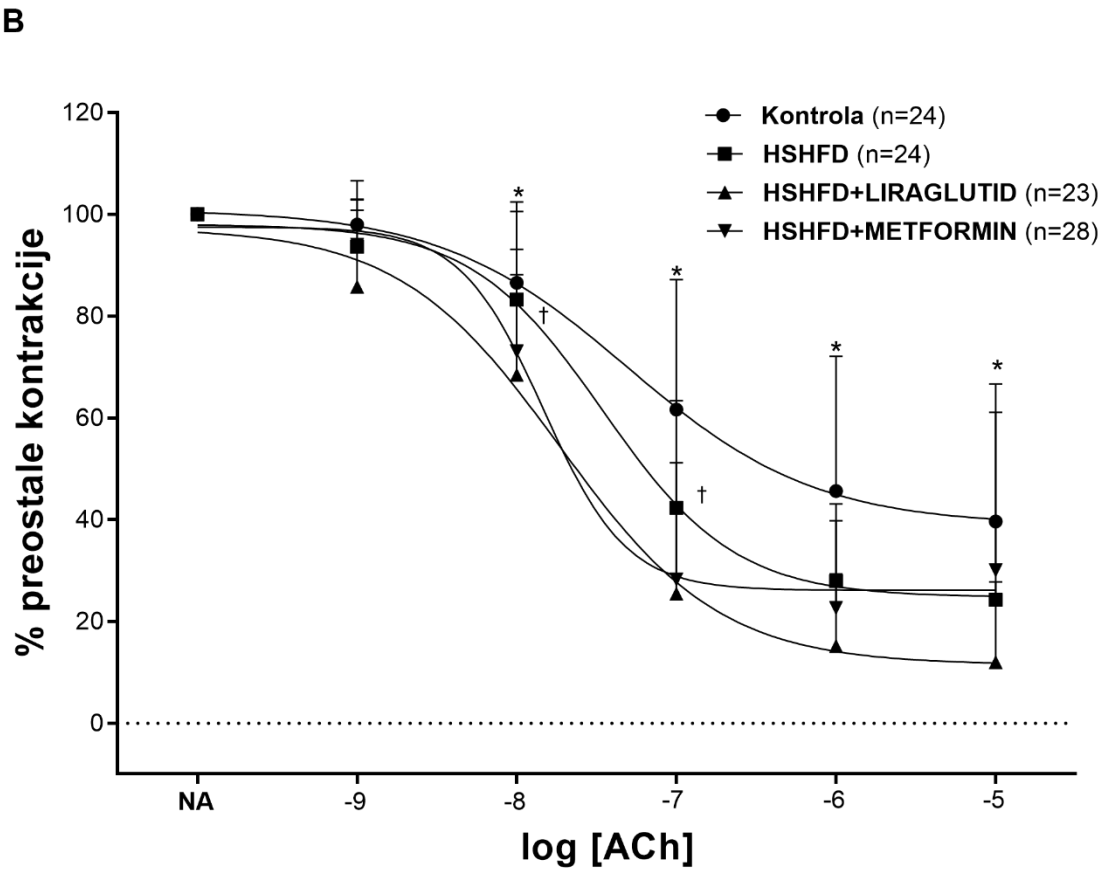
ACh-om uzrokovana relaksacija izoliranih aortalnih prstenova muških i ženskih Sprague-Dawley štakora kontrolne, HSHFD, HSHFD + LIRAGLUTID i HSHFD + METFORMIN skupine prikazani su na **Slikama 2A i 2B.**

Bazična ACh-om uzrokovana relaksacija značajno je smanjena u HSHFD + METFORMIN skupini u odnosu na kontrolnu skupinu kod štakorica (pri ACh 10^{-5} M) (**Slika 2A**). Kontrolna skupina muških štakora pokazala je značajno smanjenu bazalnu vrijednost ACh-om uzrokovane relaksacije u usporedbi sa svim ostalim skupinama muških štakora (u koncentracijama ACh 10^{-8} do 10^{-5} M) (**Slika 2B**). Nadalje, tretirani muški štakori HSHFD (metformin ili liraglutid) pokazali su značajno bolji odgovor na ACh-om izazvanu relaksaciju u usporedbi sa skupinom muških štakora HSHFD bez terapije (u koncentracijama ACh 10^{-8} i 10^{-7} M) (**Slika 2B**).



Rezultati su opisani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (Two-way ANOVA)
* Kontrola vs. HSHFD+METFORMIN (p=0,01 pri ACh 10^{-5} M)
log [ACh] - negativan logaritam ispitivanih koncentracija acetilkolina (ACh)
ACh- acetilkolin, NA- noradrenalin, n- broj aortalnih prstenova
Okomite crte s graničnikom predstavljaju standardnu devijaciju

Slika 2A. ACh-om potaknuta relaksacija aortalnih prstenova u kontrolnoj, HSHFD, HSHFD + LIRAGLUTID i HSHFD + METFORMIN skupini ženskih Sprague-Dawley štakora.

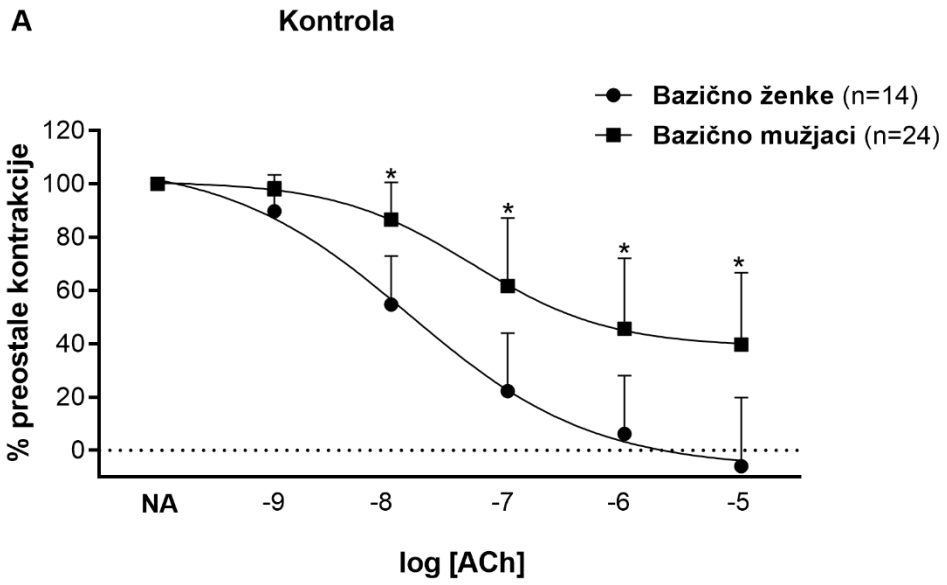


Rezultati su opisani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (Two-way ANOVA)
* Kontrola vs. HSHFD, HSHFD+LIRAGLUTID, HSHFD+METFORMIN ($p<0,001$ pri ACh 10^{-8} do 10^{-5} M)
† HSHFD vs. HSHFD+LIRAGLUTID, HSHFD+METFORMIN ($p=0,01$ pri ACh 10^{-8} do 10^{-7} M)
log [ACh] - negativan logaritam ispitivanih koncentracija acetilkolina (ACh)
ACh- acetilkolin, NA- noradrenalin, n- broj aortalnih prstenova
Okomite crte s graničnikom predstavljaju standardnu devijaciju

Slika 2B. ACh-om potaknuta relaksacija aortalnih prstenova u kontrolnoj, HSHFD, HSHFD + LIRAGLUTID i HSHFD + METFORMIN skupini muških Sprague-Dawley štakora .

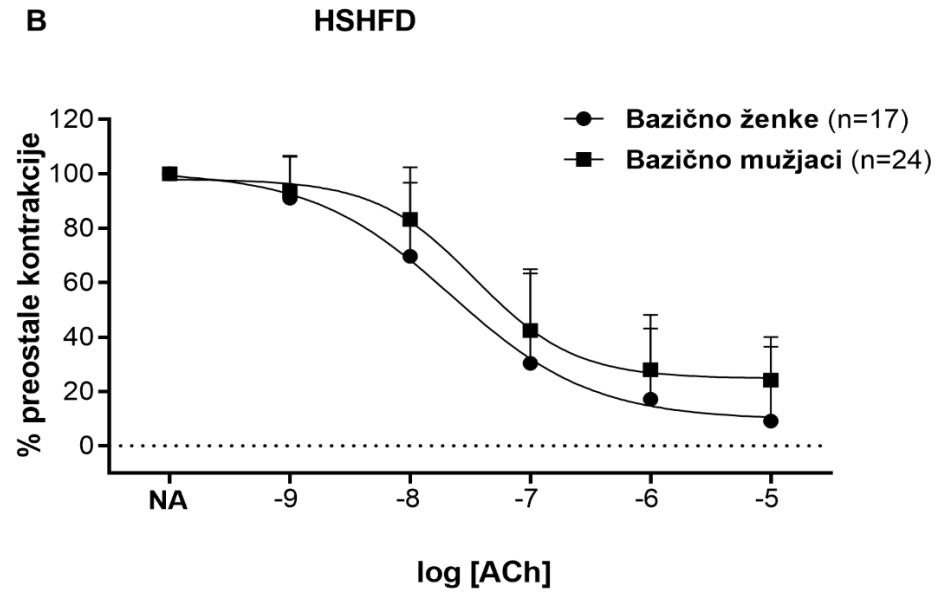
5.3 Spolne razlike u razini ACh-om potaknute relaksacije aortalnih prstenova

Značajne spolne razlike u razini ACh-om potaknute relaksacije uočene su u kontrolnoj skupini gdje je vidljivo kako muški štakori imaju značajno manju razinu ACh-om potaknute relaksacije u odnosu na ženke (u koncentracijama ACh 10^{-8} do 10^{-5} M) (**Slika 3A**). Također, muški štakori iz HSHFD + METFORMIN skupine imali su značajno smanjenu razinu ACh-om potaknute relaksacije u usporedbi sa štakoricama HSHFD + METFORMIN skupine (na ACh 10^{-5} M) (**Slika 3D**). Razlike u razini ACh-om potaknute relaksacije povezane sa spolom nisu primijećene u skupinama štakora HSHFD (**Slika 3B**) i HSHFD + LIRAGLUTID (**Slika 3C**).

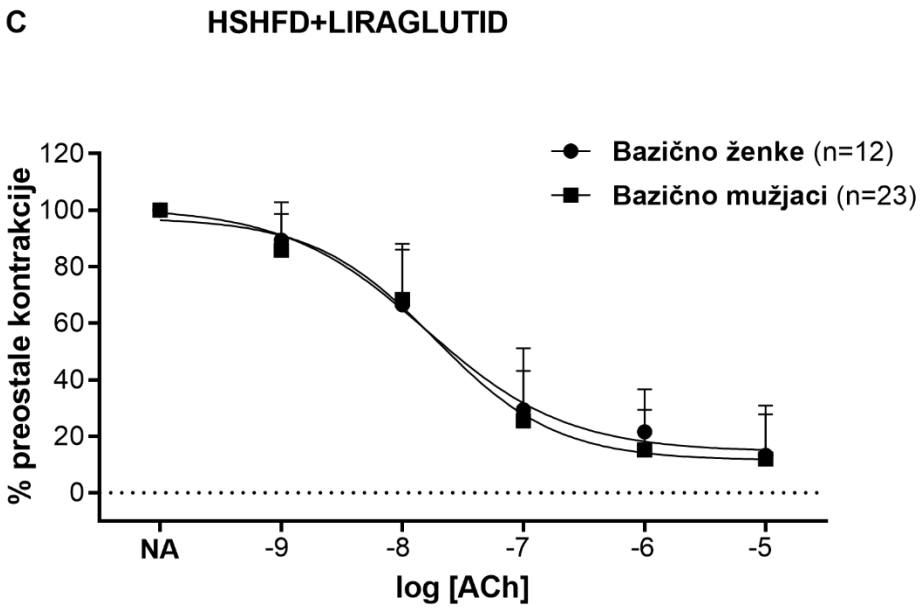


Rezultati su opisani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (Two-way ANOVA)
* bazično ACh ženke vs. mužjaci (p=0,01 pri ACh 10^{-8} do 10^{-5} M)
log [ACh] - negativan logaritam ispitivanih koncentracija acetilkolina (ACh)
ACh- acetilkolin, NA- noradrenalin, n- broj aortalnih prstenova
Okomite crte s graničnikom predstavljaju standardnu devijaciju

Slika 3A. Usporedba bazičnog odgovora ACh-om potaknute relaksacije aortalnih prstenova između spolova u kontrolnoj skupini.

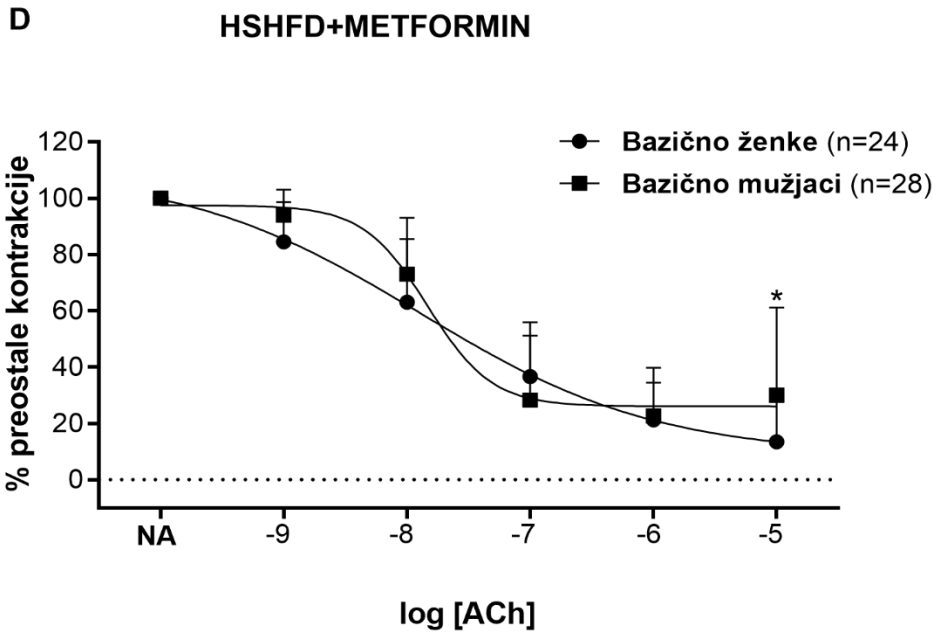


Rezultati su opisani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (Two-way ANOVA)
log [ACh] - negativan logaritam ispitivanih koncentracija acetilkolina (ACh)
ACh- acetilkolin, NA- noradrenalin, n- broj aortalnih prstenova
Okomite crte s graničnikom predstavljaju standardnu devijaciju



Rezultati su opisani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (Two-way ANOVA)
log [ACh] - negativan logaritam ispitivanih koncentracija acetilkolina (ACh)
ACh- acetilkolin, NA- noradrenalin, n- broj aortalnih prstenova
Okomite crte s graničnikom predstavljaju standardnu devijaciju

Slika 3B i C. Usporedba bazičnog odgovora ACh-om potaknute relaksacije aortalnih prstenova između spolova u HSHFD skupini (**B**) i HSHFD + LIRAGLUTID skupini (**C**).



Rezultati su opisani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (Two-way ANOVA)
* bazično ACh ženke vs. mužjaci (p=0,02 pri ACh 10^{-7} M)
log [ACh] - negativan logaritam ispitivanih koncentracija acetilkolina (ACh)
ACh- acetilkolin, NA- noradrenalin, n- broj aortalnih prstenova
Okomite crte s graničnikom predstavljaju standardnu devijaciju

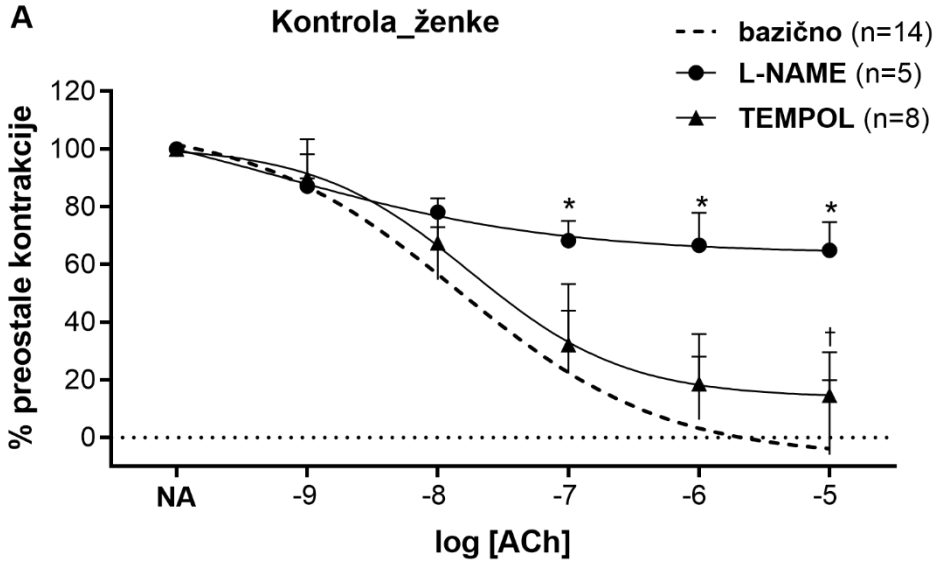
Slika 3D. Usporedba bazičnog odgovora ACh-om potaknute relaksacije aortalnih prstenova između spolova u HSHFD + METFORMIN skupini.

5.4 Utvrđivanje mehanizama relaksacije

Mehanizmi koji posreduju ACh-om potaknutu relaksaciju prikazani su na **Slici 4** i **Slici 5**. Vazorelaksacija aortalnih prstenova posredovana NO-om ispitana je dodatkom eNOS inhibitora L-NAME te je prisutnost visoke razine oksidativnog stresa funkcionalno procijenjena dodavanjem TEMPOL-a, koji se smatra multifunkcionalnim antioksidansom, a ne samo čistačem superoksida.

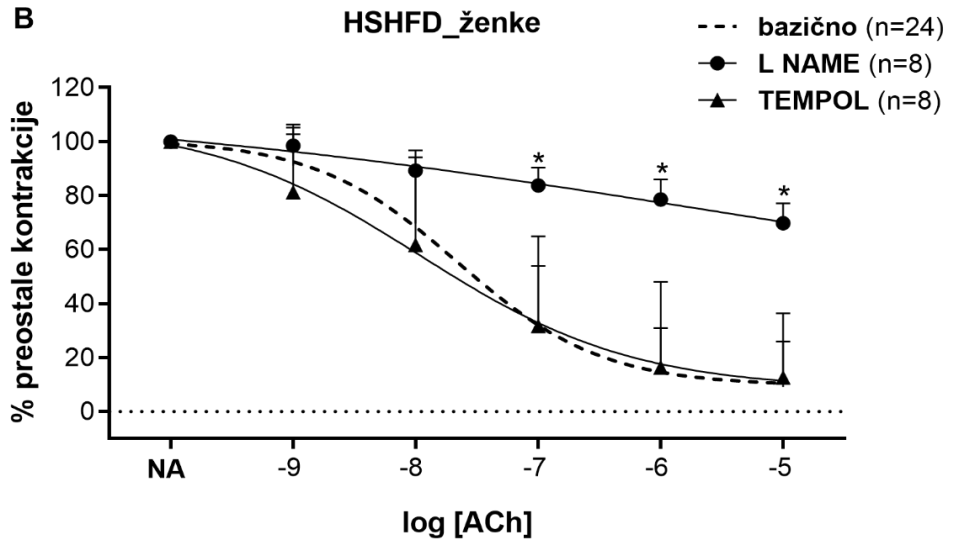
U svim ženskim skupinama štakora prisutnost L-NAME značajno je smanjila odgovor vazorelaksacije na ACh izoliranih aortnih prstenova štakora, što znači da je u ACh-om potaknutoj relaksaciji u svim ženskim skupinama štakora posredovao uglavnom NO (**Slika 4**).

In vitro primjena TEMPOL-a inducirala je oporavak vazorelaksacije kao odgovor na ACh (na ACh 10^{-5} M) u kontrolnoj skupini (**Slika 4A**), ali ne i na drugim eksperimentalnim skupinama ženkih štakora (**Slika 4B-D**). Ovi podaci sugeriraju da je kontrolna skupina imala najvišu razinu oksidativnog stresa od svih ženskih skupina štakora.

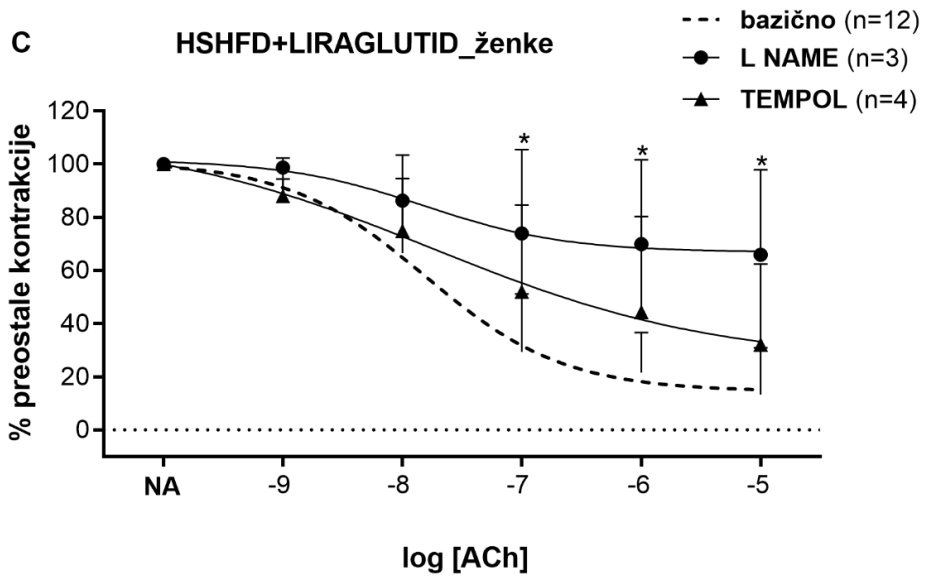


Rezultati su opisani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (Two-way ANOVA)
* bazično vs. L-NAME ($p<0,001$ pri ACh 10^{-7} do 10^{-5} M)
† bazično vs. TEMPOL ($p=0,01$ pri ACh 10^{-5} M)
log [ACh] - negativan logaritam ispitivanih koncentracija acetilkolina (ACh)
ACh- acetilkolin, NA- noradrenalin, n- broj aortalnih prstenova
Okomite crte s graničnikom predstavljaju standardnu devijaciju

Slika 4A. Mehanizmi ACh-om potaknute relaksacije aortalnih prstenova u kontrolnoj skupini ženskih štakora.

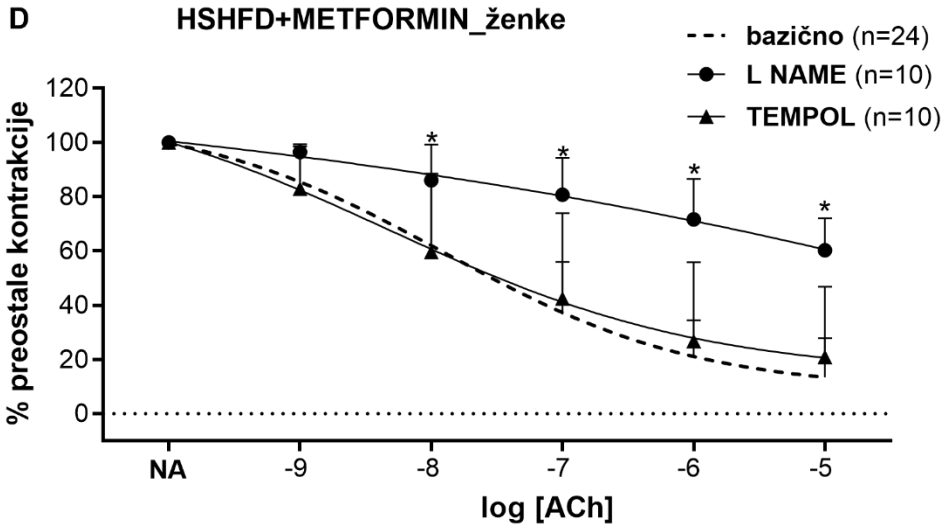


Rezultati su opisani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (Two-way ANOVA)
* bazično vs. L-NAME ($p<0,001$ pri ACh 10^{-7} do 10^{-5} M)
log [ACh] - negativan logaritam ispitivanih koncentracija acetilkolina (ACh)
ACh- acetilkolin, NA- noradrenalin, n- broj aortalnih prstenova
Okomite crte s graničnikom predstavljaju standardnu devijaciju



Rezultati su opisani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (Two-way ANOVA)
* bazično vs. L-NAME ($p=0,02$ pri ACh 10^{-7} M; $p=0,01$ pri ACh 10^{-6} do 10^{-5} M)
log [ACh] - negativan logaritam ispitivanih koncentracija acetilkolina (ACh)
ACh- acetilkolin, NA- noradrenalin, n- broj aortalnih prstenova
Okomite crte s graničnikom predstavljaju standardnu devijaciju

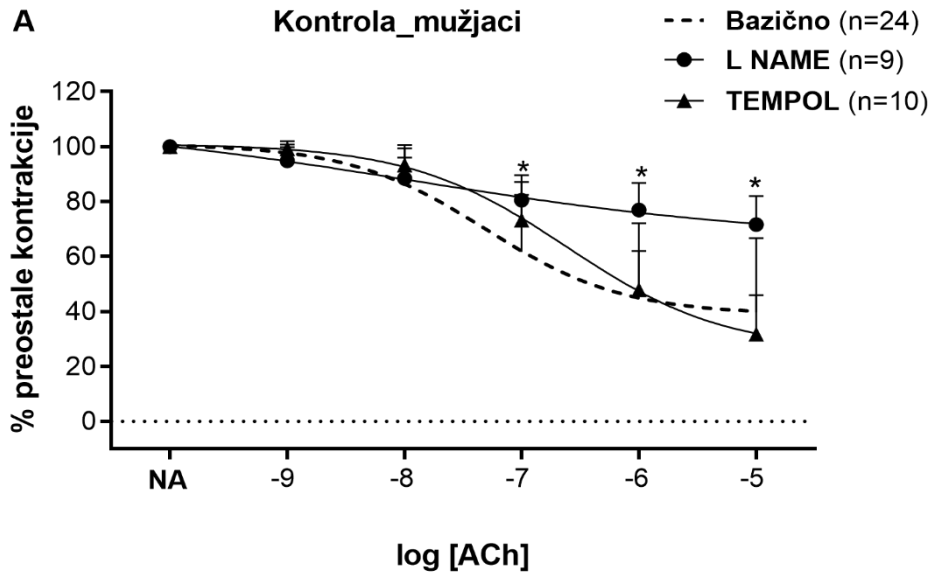
Slika 4 B i C. Mehanizmi ACh-om potaknute relaksacije aortalnih prstenova u HSHFD skupini (**B**) i HSHFD + LIRAGLUTID skupini (**C**) ženskih štakora



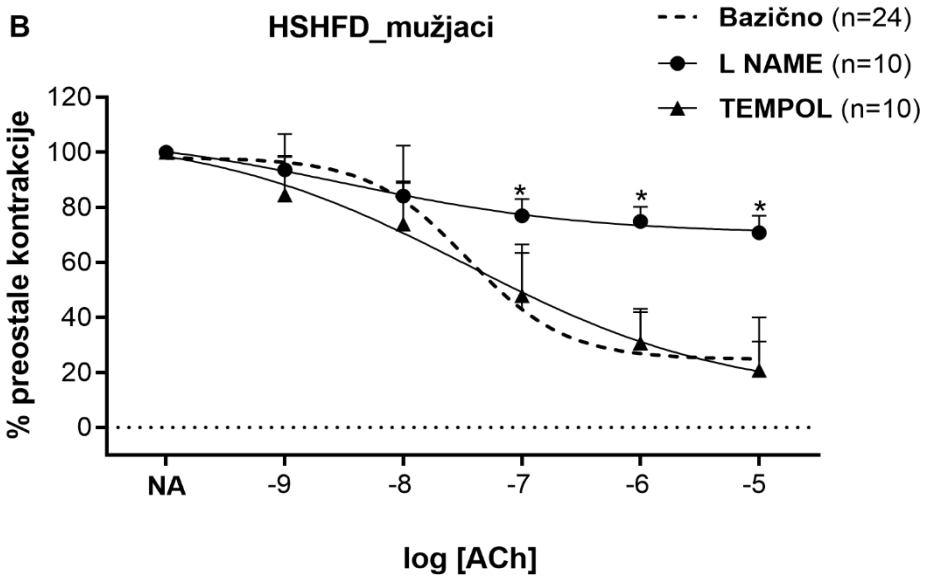
Rezultati su opisani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (Two-way ANOVA)
* bazično vs. L-NAME ($p<0,001$ pri ACh 10^{-8} do 10^{-5} M)
log [ACh] - negativan logaritam ispitivanih koncentracija acetilkolina (ACh)
ACh- acetilkolin, NA- noradrenalin, n- broj aortalnih prstenova
Okomite crte s graničnikom predstavljaju standardnu devijaciju

Slika 4D. Mehanizmi ACh-om potaknute relaksacije aortalnih prstenova u HSHFD + METFORMIN skupini ženskih štakora .

Kod svih ispitanih skupina muških štakora prisutnost L-NAME-a značajno je smanjila odgovor na ACh u izoliranih aortnih prstenova, što znači da je ACh-om potaknutu relaksaciju u svim muškim skupinama štakora posredovao uglavnom NO (**Slika 5**), baš kao i u ženki. *In vitro* primjena TEMPOL-a nije imala značajan učinak na vazorelaksaciju kao odgovor na ACh ni u jednoj skupini muških štakora (**Slika 5**).

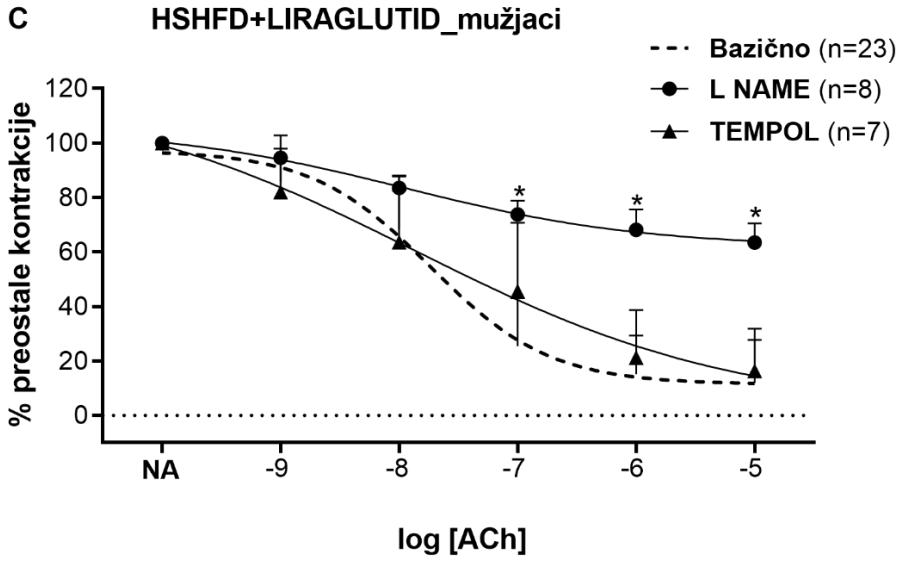


Rezultati su opisani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (Two-way ANOVA)
* bazično vs. L-NAME (p=0,01 pri ACh 10^{-7} M; p<0,001 pri ACh 10^{-6} do 10^{-5} M)
log [ACh] - negativan logaritam ispitivanih koncentracija acetilkolina (ACh)
ACh- acetilkolin, NA- noradrenalin, n- broj aortalnih prstenova
Okomite crte s graničnikom predstavljaju standardnu devijaciju

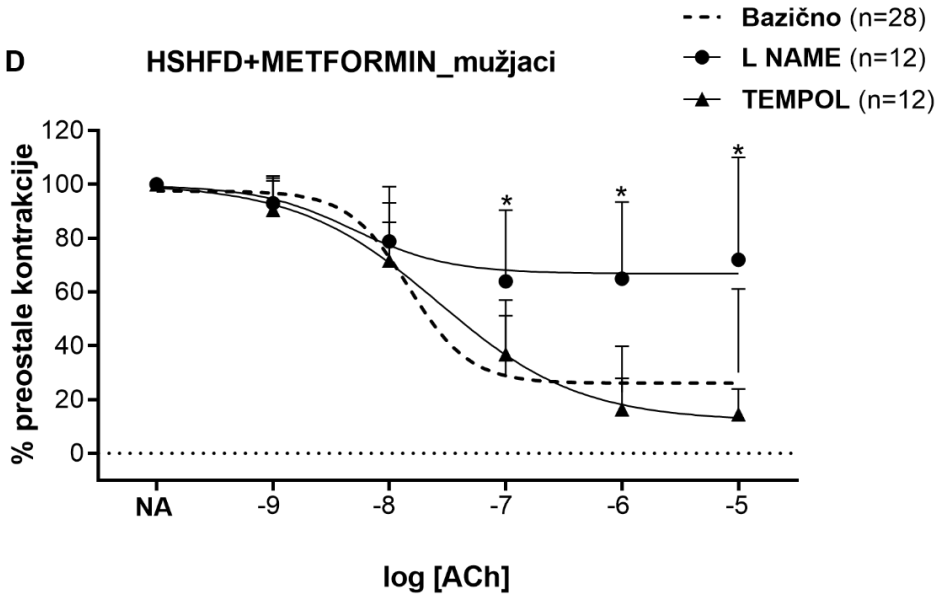


Rezultati su opisani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (Two-way ANOVA)
* bazično vs. L-NAME (p<0,001 pri ACh 10^{-7} do 10^{-5} M)
log [ACh] - negativan logaritam ispitivanih koncentracija acetilkolina (ACh)
ACh- acetilkolin, NA- noradrenalin, n- broj aortalnih prstenova
Okomite crte s graničnikom predstavljaju standardnu devijaciju

Slika 5 A i B. Mehanizmi ACh-om potaknute relaksacije aortalnih prstenova u kontrolnoj (**A**) i HSHFD (**B**) skupini muških štakora.



Rezultati su opisani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (Two-way ANOVA)
* bazično vs. L-NAME ($p<0,001$ pri ACh 10^{-7} do 10^{-5} M)
log [ACh] - negativan logaritam ispitivanih koncentracija acetilkolina (ACh)
ACh- acetilkolin, NA- noradrenalin, n- broj aortalnih prstenova
Okomite crte s graničnikom predstavljaju standardnu devijaciju



Rezultati su opisani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (Two-way ANOVA)
* bazično vs. L-NAME ($p=0,01$ pri ACh 10^{-7} do 10^{-5} M)
log [ACh] - negativan logaritam ispitivanih koncentracija acetilkolina (ACh)
ACh- acetilkolin, NA- noradrenalin, n- broj aortalnih prstenova
Okomite crte s graničnikom predstavljaju standardnu devijaciju

Slika 5C i D. Mehanizmi ACh-om potaknute relaksacije aortalnih prstenova u HSHFD + LIRAGLUTID (**C**) i HSHFD + METFORMIN (**D**) skupini kod muških štakora .

6. RASPRAVA

Promjene u načinu života i prehrani rezultirale su povećanjem broja pretilih ljudi (25). Različite vrste prehrambenih protokola, kronične ili akutne, poput prehrane s visokim udjelom masti i ugljikohidrata (HSHFD), prehrane s visokim udjelom zasićenih masnih kiselina (SFA) i unosa transmasnih kiselina, dovode do oksidativnog stresa kroz više biokemijskih mehanizama (26, 27, 28). Nezdrava prehrana nalazi se u podlozi mnogih kroničnih kardiometaboličkih bolesti, kao što su pretilost, dijabetes, kardiovaskularne bolesti i ateroskleroza (29, 30). Zajednički nazivnik ovih bolesti je oksidativni stres, stanje koje se javlja kada postoji neravnoteža između stvaranja ROS-a i smanjene razine antioksidativnog kapaciteta (31, 32). Aktivnost antioksidativnih enzima smanjena je kod pretilih osoba usporedbi s ljudima koji nisu pretili, što ima implikacije na razvoj zdravstvenih problema povezanih s pretilošću (33). U osoba koje su pretile i boluju od dijabetesa neki oralni antidijabetički lijekovi mogu dovesti do povećanja tjelesne mase. Neki od tih lijekova su derivati sulfonilureje, meglitinidi, tiazolidindioni i sam inzulin. Za razliku od njih, novorazvijeni lijekovi koji djeluju putem inkretinskih hormona potiču gubitak kilograma. Liraglutid, agonist GLP-1 receptora, smanjuje unos hrane, potiče mršavljenje i poboljšava indekse metaboličke funkcije (34). Naši rezultati su u skladu s tim činjenicama. Pokazuju smanjenje tjelesne mase pretilih štakora koji su primili terapiju liraglutidom u usporedbi s drugim skupinama pretilih štakora, posebno u usporedbi sa ženkama štakora. Terapija liraglutidom pokazala se učinkovitijom u usporedbi s terapijom metforminom, budući da metformin nije značajno smanjio tjelesnu masu u usporedbi sa skupinom pretilih životinja oba spola. Učinci metformina na tjelesnu masu donekle su kontroverzni. Dok su neka istraživanja pokazala da metformin značajno smanjuje tjelesnu masu, neka druga istraživanja su čak pokazala da dovodi do povećanja tjelesne mase, a što su naši rezultati u ženskoj skupini i pokazali (35, 36). Uz dijabetes melitus tipa 2, pretilost je često popraćena povećanim rizikom od kardiovaskularnih bolesti, uključujući bolest koronarnih arterija i moždani udar. Sve to nastaje kao posljedica endotelne disfunkcije, kronične upale niskog stupnja, povećane proizvodnje ROS-a i citokina te oksidacije lipoproteina male gustoće (LDL) koji nastaju uslijed pretilosti (37). Primjerice, kod pretilosti postoji povećana razina superoksidnog radikala i nitrotirozina u koronarnom endotelu. Rana gojaznost dovodi do povećanog oksidacijskog stresa i disfunkcije endotela povezane s povećanom razinom leptina (38). Također, pretilost i dijabetes melitus tipa 2, kao rezultat hiperinzulinemije, karakterizira poremećaj transporta glukoze, disfunkcija β-stanica gušterače, kao i povećana razina

oksidativnog stresa i upale (39). β-stanice gušterače imaju relativno niski izražaj brojnih antioksidativnih enzima i kada su izložene hiperglikemiji mogu proizvesti ROS koji potiskuje izlučivanje inzulina izazvano glukozom (40).

Liraglutid, analog GLP-1, smanjuje glukozu u krvi pojačavajući o glukozi ovisnu sekreciju inzulina, pojačavajući rast β-stanica, smanjujući unos hrane i tjelesnu masu (41). U ljudskim endotelnim stanicama liraglutid smanjuje razinu TNF-α, oksidativni stres izazvan visokom razinom glukoze te upalni odgovor (42). Također, liraglutid smanjuje razinu ROS-a u plazmi u bolesnika s dijabetesom tipa 2 (43). Studije na životinjama na jetri i masnom tkivu dijabetičkih miševa pokazale su da GLP-1 poboljšava rezistenciju na inzulin (44). U srcu miševa s dijabetesom i mozgu miševa s Alzheimerovom bolešću liraglutid je pokazao protuupalni učinak (45).

Slično liraglutidu, metformin ima antioksidativna i protuupalna svojstva. U liječenju dijabetesa metformin je postao lijek izbora zbog svoje sposobnosti da poboljša osjetljivost na inzulin i učinkovito smanji glikemiju bez značajnog povećanja stope hipoglikemije (46). Neke su studije pokazale da metformin smanjuje endogene razine ROS-a koje proizvode mitohondriji, a primarno to ostvaruje inhibicijom mitohondrijskog kompleksa I (NADH: ubikinon oksidoreduktaza) (47). Metformin štiti primarne hepatocite štakora, endotelne stanice i neuronske stanice od apoptoze izazvane oksidativnim stresom (48, 49, 50).

U fiziološkim uvjetima mitohondriji su glavno mjesto unutarstanične proizvodnje ROS-a, ali postoje i druga mjesta na kojima se ROS može proizvesti, kao što su sustavi plazmatske membrane, endoplazmatski retikulum, lizosomi, peroksisomi i putem citoplazmatskih enzima (51). Kako bi se razina ROS-a održala na minimumu, tkiva posjeduju antioksidativne enzime (superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, katalaza, glutation S-transferaza, tioredoksin reduktaza itd.) koju djeluju sinergistički na smanjenje razine slobodnih radikala (52). Pojedinačna ispitivanja o odnosu spolne razlike i promjene aktivnosti antioksidativnih enzima utvrdila su da u starijih muških miševa veza između tri antioksidativna enzima (superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, katalaza) postaje slabija, bez obzira na koncentraciju peroksidacije lipida. Suradnja između antioksidativnih enzima postaje skladnija s povećanom koncentracijom peroksidacije lipida u jetri i mozgu starijih ženskih miševa, što bi moglo objasniti zašto su stare ženke bolje zaštićene od oksidacijskog stresa od muškaraca (53). Ova istraživanja podupiru i naše rezultate vaskularne relaksacije aortalnih prstenova. Uočili smo kako je ACh-om potaknuta relaksacija u svim skupinama štakora oba spola posredovana uglavnom sa NO. Ali također smo uočili da je TEMPOL u kontrolnoj skupini vratio ACh-om posredovanu dilataciju na početne (bazalne) vrijednosti, za razliku od kontrolne muške

skupine gdje je TEMPOL samo djelomično vratio ACh-om posredovanu dilataciju u usporedbi s drugim skupinama.

7. ZAKLJUČAK

Glavni zaključci ove studije su:

1) Liraglutid ima značajan utjecaj na smanjenje tjelesne mase kod oba spola.

2) ACh-om potaknuta relaksacija u svim skupinama štakora oba spola posredovana je uglavnom s NO-om.

3) Bolji oksidacijski status u ženskoj skupini dovodi do manjih promjena u vazorelaksaciji posredovanoj ACh-om.

4) Stariji muški štakori imaju izraženije oštećenje krvožilnog opuštanja od starijih ženskih štakora.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Odrediti razlike u razini relaksacije inducirane ACh-om te ispitati ulogu antidijabetičkih lijekova kod Sprague-Dawley štakora oba spola hranjenih hranom bogatom mastima i ugljikohidratima.

Nacrt studije: Eksperimentalna studija

Ispitanici i metode: U istraživanju su korišteni Sprague-Dawley štakori oba spola u starosti od 10 mjeseci podijeljeni u 4 skupine: 1.) Kontrolna skupina hranjena standardnom prehranom, 2.) HSHFD skupina hranjena prehranom bogatom ugljikohidratima i mastima te 3.) i 4.) HSHFD + liraglutid/metformin skupine koje su primale antidijabetički tretman. Nakon završenog dijetnog protokola životinje su izvagane, anestezirane, dekapitirane te im je izolirana torakalna aorta za ispitivanje razine ACh-om potaknute vazorelaksacije u odsutnosti i prisutnosti i L-NAME-a ili se utvrđivala mjera nastalog oksidativnog stresa pomoću TEMPOL-a.

Rezultati: Liraglutid dovodi do značajnog snižavanja tjelesne mase kod oba spola. ACh-om posredovana vazorelaksacija je smanjena kod ženki u HSHFD + METFORMIN skupini u usporedbi s kontrolom. Kontrolna skupina muških štakora pokazala je značajno smanjenu bazalnu vrijednost ACh-om uzrokovane relaksacije u usporedbi sa svim ostalim skupinama muških štakora, dok su skupine s antidijabetikom imale bolji odgovor u odnosu na skupinu HSHFD. Usporedbom između spolova pokazalo se kako muški kontrolni štakori imaju smanjenu vazorelaksaciju u odnosu na kontrolnu žensku skupinu. Kod svih ispitanih skupina prisutnost L-NAME-a značajno je smanjila odgovor na ACh, dok TEMPOL ima značajan utjecaj jedino na žensku kontrolnu skupinu.

Zaključak: Rezultati sugeriraju da bolji oksidacijski status ženske skupini dovodi do manjih promjena u vazorelaksaciji. Stariji muški štakori imaju izraženije oštećenje vazorelaksacije od starijih ženskih štakora.

Ključne riječi: L-NAME, oksidativni stres, pretilost, TEMPOL, vazorelaksacija

9. SUMMARY

The effects of carbohydrate and fat-rich food and use of antidiabetic treatment on aortic vasorelaxation in obese pre-diabetic adult rats of both sexes

Objectives: To evaluate the level of relaxation induced by acetylcholine and to examine the role of antidiabetic drugs in Sprague-Dawley rats of both sexes fed food rich with fats and carbohydrates.

Study design: Experimental research.

Material and Methods: In the study, Sprague-Dawley rats of both sexes were divided into 4 groups at 10 months of age: Control group which was fed a standard diet, HSHFD group which was fed a diet rich in carbohydrates and fats, and HSHFD + metformin and HSHFD + liraglutide groups which, after 4 months of HSHFD diet, received antidiabetic treatment for 14 weeks. After completion of the dietary protocol, the animals were weighed, anesthetized, decapitated, and their thoracic aorta was isolated, which was used to examine the level of acetylcholine-induced vasorelaxation in the absence and presence of NO synthase inhibitor (L-NAME) or to measure the level of oxidative stress with TEMPOL.

Results: Liraglutide leads to a significant reduction in body weight in both sexes. Acetylcholine-mediated vasorelaxation was reduced in the female HSHFD + METFORMIN group compared to the control. Also, the male control group showed a reduction in baseline acetylcholine-mediated vasorelaxation compared to all other male groups, while the groups with antidiabetic treatment had a better response compared to the HSHFD group. Comparison between the sexes showed that male control rats had reduced vasorelaxation compared to the female control group. In all examined groups of both sexes, the presence of L-NAME significantly reduced the response to acetylcholine, while TEMPOL had a significant effect only on the female control group.

Conclusion: Present results suggest that minor changes in vasorelaxation are in the female group becouse of better oxidative status, and also that aged male rats have more prominent vascular relaxation impairment than female.

Keywords: antidiabetic, nitric oxide, oxidative stress, obesity, vasorelaxation

10. LITERATURA

1. Junqueira LC, Carneiro J. Osnove histologije. Udžbenik i atlas. Prema desetom američkom izdanju. 11.poglavlje Žilni sustav. ŠK, Zagreb, 2005.
2. Pugsley MK, Tabrizchi R. The vascular system. An overview of structure and function. J Pharmacol Toxicol Methods. 2000;44(2):333–40.
3. Nafisa A, Gray SG, Cao Y, Wang T, Xu S, Wattoo FH, i sur. Endothelial function and dysfunction: Impact of metformin. Pharmacol Ther. 2018;192:150–62.
4. Nosalski R, Guzik TJ. Perivascular adipose tissue inflammation in vascular disease: PVAT inflammation in vascular disease. Br J Pharmacol. 2017;174(20):3496–513.
5. Cyr AR, Huckaby LV, Shiva SS, Zuckerbraun BS. Nitric oxide and endothelial dysfunction. Crit Care Clin. 2020;36(2):307–21.
6. Tousoulis D, Kampoli A-M, Tentolouris C, Papageorgiou N, Stefanadis C. The role of nitric oxide on endothelial function. Curr Vasc Pharmacol. 2012;10(1):4–18.
7. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. Vascul Pharmacol. 2018;100:1–19.
8. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, i sur. Oxidative stress: Harms and benefits for human health. Oxid Med Cell Longev. 2017;2017:1–13.
9. Rodríguez-Hernández H, Simental-Mendía LE, Rodríguez-Ramírez G, Reyes-Romero MA. Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation. Int J Endocrinol. 2013;2013:678159.
10. Yaribeygi H, Farrokhi FR, Butler AE, Sahebkar A. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms: YARIBEYGI i sur. J Cell Physiol. 2019;234(6):8152–61.
11. Matulewicz N, Karczewska-Kupczewska M. Insulin resistance and chronic inflammation. Postepy Hig Med Dosw. 2016;70(0):1245–58.
12. Ellulu MS, Patimah I, Khaza'ai H, Rahmat A, Abed Y. Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. Arch Med Sci. 2017;13(4):851–63.
13. Virdis A, Masi S, Colucci R, Chiriacò M, Uliana M, Puxeddu I, i sur. Microvascular endothelial dysfunction in patients with obesity. Curr Hypertens Rep. 2019;21(4):32.
14. Atawia RT, Bunch KL, Toque HA, Caldwell RB, Caldwell RW. Mechanisms of obesity-induced metabolic and vascular dysfunctions. Front Biosci (Landmark Ed). 2019;24:890–934.

15. Fang H, Judd RL. Adiponectin regulation and function. Compr Physiol. 2018;8(3):1031–63.
16. Fitzgibbons TP, Czech MP. Epicardial and perivascular adipose tissues and their influence on cardiovascular disease: basic mechanisms and clinical associations. J Am Heart Assoc. 2014;3(2):e000582.
17. Segovia SA, Vickers MH, Reynolds CM. The impact of maternal obesity on inflammatory processes and consequences for later offspring health outcomes. J Dev Orig Health Dis. 2017;8(5):529–40.
18. Guzik TJ, Marvar PJ, Czesnikiewicz-Guzik M, Korbut R. Perivascular adipose tissue as a messenger of the brain-vessel axis: role in vascular inflammation and dysfunction. J Physiol Pharmacol. 2007;58(4):591–610.
19. Barazzoni R, Gortan Cappellari G, Ragni M, Nisoli E. Insulin resistance in obesity: an overview of fundamental alterations. Eat Weight Disord. 2018;23(2):149–57.
20. Lastra G, Manrique C. Perivascular adipose tissue, inflammation and insulin resistance: link to vascular dysfunction and cardiovascular disease. Horm Mol Biol Clin Investig [Internet]. 2015;22(1). Available from: http://dx.doi.org/10.1515/hmbci-2015-0010.
21. Achari A, Jain S. Adiponectin, a therapeutic target for obesity, diabetes, and endothelial dysfunction. Int J Mol Sci. 2017;18(6):1321.
22. Muniyappa R, Iantorno M, Quon MJ. An integrated view of insulin resistance and endothelial dysfunction. Endocrinol Metab Clin North Am. 2008;37(3):685–711.
23. Engin A. Endothelial dysfunction in obesity. Adv Exp Med Biol. 2017;960:345–79.
24. Almutairi M, Al Batran R, Ussher JR. Glucagon-like peptide-1 receptor action in the vasculature. Peptides. 2019;111:26–32.
25. Lastra G, Manrique CM, Hayden MR. The role of beta-cell dysfunction in the cardiometabolic syndrome. J. Cardiometab. Syndr. 2006, 1, 41–46.
26. Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. J. Nutr. 2005, 135, 969–972.
31. Dandona P, Ghanim, H, Chaudhur A, Dhindsa S, Kim SS. Macronutrient intake induces oxidative and inflammatory stress: Potential relevance to atherosclerosis and insulin resistance. Exp. Mol. Med. 2010, 42, 245–253.
32. Serra D, Mera P, Malandrino MI, Mir JF, Herrero L. Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. Antioxid. Redox Signal. 2012, doi:10.1089/ars.2012.4875.

33. Lozano I, Van der Werf R, Bietiger W, Seyfritz E, Peronet C, Pinget M i sur. High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. Nutr Metab (Lond). 2016 Feb 25;13:15. doi: 10.1186/s12986-016-0074-1
34. Crescenzo R, Bianco F, Mazzoli A, Giacco A, Cancelliere R, di Fabio G i sur. Fat Quality Influences the Obesogenic Effect of High Fat Diets. Nutrients. 2015 Nov 16;7(11):9475-91. doi: 10.3390/nu7115480.
35. Esposito K, Ciotola M, Giugliano D. Oxidative stress in the Metabolic Syndrome. J. Endocrinol. Invest. 2006, 29, 791–795.
36. Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. Life Sci. 2009 May 22;84(21-22):705-12. doi: 10.1016/j.lfs.2009.02.026.
37. Ozata M, Mergen M, Oktenli C, Aydin A, Sanisoglu SY, Bolu E i sur. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. Clin. Biochem. 2002, 35, 627–631.
38. Shiraki A, Oyama J, Komoda H, Asaka M, Komatsu A, Sakuma M i sur. The glucagon-like peptide 1 analog liraglutide reduces TNF-α-induced oxidative stress and inflammation in endothelial cells. Atherosclerosis. 2012; 221(2):375-82. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.12.039.
39. Douek IF, Allen SE, Ewings P, Gale EA, Bingley PJ. Continuing metformin when starting insulin in patients with type 2 diabetes: a double-blind randomized placebo-controlled trial. Diabet Med 2005; 22: 634–640
40. Kvapil M, Swatko A, Hilberg C, Shestakova M. Biphasic insulin aspart 30 plus metformin: an effective combination in type 2 diabetes. Diabetes Obes Metab 2006; 8: 39–48.
41. Coutinho T, Goel K, Corrêa de Sá D, Carter RE, Hodge D, Kragelund, C i sur. Combining body mass index with measures of central obesity in the assessment of mortality in subjects with coronary disease: Role of “normal weight central obesity”. J. Am. Coll. Cardiol. 2013, 61, 553–560.
42. Galili O, Versari D, Sattler KJ, Olson ML, Mannheim D, McConnell JP i sur. Early experimental obesity is associated with endothelial dysfunction and oxidative stress. Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2007, 292, H904–H911.
43. Paneni F, Costantino S, Cosentino F. Insulin resistance, diabetes, and cardiovascular risk. Curr. Atheroscler. Rep. 2014, 16, 419.
44. Pi J, Bai Y, Zhang Q, Wong V, Floering LM, Daniel K i sur. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. Diabetes 2007, 56, 1783–1791.

45. Wook K, Egan MJ. The Role of Incretins in Glucose Homeostasis and Diabetes Treatment. Pharmacological Reviews December 2008, 60 (4) 470-512; DOI: http://dx.doi.org/10.1124/pr.108.000604
46. Shiraki A, Oyama J, Komoda H, Asaka M, Komatsu A, Sakuma M i sur. The glucagon-like peptide 1 analog liraglutide reduces TNF-α-induced oxidative stress and inflammation in endothelial cells. Atherosclerosis. 2012; 221(2):375-82. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.12.039.
47. Okada K, Kotani K, Yagyu H, Ando A, Osuga J, Ishibashi S.Effects of treatment with liraglutide on oxidative stress and cardiac natriuretic peptide levels in patients with type 2 diabetes mellitus. Endocrine. 2014, Volume 47, Issue 3, pp 962–964.
48. Yong OK, Detlef S. When GLP-1 hits the liver: a novel approach for insulin resistance and NASH. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology. 2012 Vol. 302 no. 8, G759-G761 DOI: 10.1152/ajpgi.00078.2012.
49. Noyan-Ashraf MH, Shikatani EA, Schuiki I, Mukovozov I, Wu J, Li RK i sur. A Glucagon-Like Peptide-1 Analog Reverses the Molecular Pathology and Cardiac Dysfunction of a Mouse Model of Obesity. Circulation. 2013;127:74-85, 2013.
50. Markowicz-Piasecka M, Huttunen KM, Mateusiak L, Mikiciuk-Olasik E, Sikora J. Is metformin a perfect drug? Updates in pharmacokinetics and pharmacodynamics. Curr Pharm Des. 2017;23(17):2532–50.
51. Kelly B, Tannahill GM, Murphy MP, O'Neill LA.Metformin inhibits the production of reactive oxygen species from NADH:ubiquinone oxidoreductase to limit induction of interleukin-1β (IL-1β) and boosts interleukin-10 (IL-10) in lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(33):20348–20359. doi: 10.1074/jbc.m115.662114.
52. El-Mir MY, Detaille D, R-Villanueva G, Delgado-Esteban M, Guigas B, Attia S, Fontaine E, Almeida A, Leverve X. Neuroprotective role of antidiabetic drug metformin against apoptotic cell death in primary cortical neurons. J Mol Neurosci. 2008; 34(1):77-87.
53. Eriksson L, Erdogdu O, Nyström T, Zhang Q, Sjöholm Å. Effects of some anti-diabetic and cardioprotective agents on proliferation and apoptosis of human coronary artery endothelial cells. Cardiovasc Diabetol. 2012 Mar 21; 11():27.

54. Bhatt MP, Lim YC, Kim YM, Ha KS. C-peptide activates AMPKα and prevents ROS-mediated mitochondrial fission and endothelial apoptosis in diabetes. Diabetes. 2013 Nov; 62(11):3851-62.
55. Alkadi H. A review on free radicals and antioxidants. Infect Disord Drug Targets. 2020;20(1):16–26.
56. Savini I, Catani MV, Evangelista D, Gasperi V, Avigliano L. Obesity-Associated Oxidative Stress: Strategies Finalized to Improve Redox State Int. J. Mol. Sci. 2013, 14, 10497-10538; doi:10.3390/ijms140510497.
57. Sobocanec S, Balog T, Kusić B, Sverko V, Sarić A, Marotti T. Differential response to lipid peroxidation in male and female mice with age: correlation of antioxidant enzymes matters. Biogerontology. 2008 Oct;9(5):335-43. doi: 10.1007/s10522-008-9145-7.

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Helena Horvat

Adresa: Koranska 38, 31 000 Osijek

e – mail: helenahorvat96@gmail.com

Datum i mjesto rođenja: 20. prosinca 1996., Osijek

OBRAZOVANJE

2015. – 2021. Sveučilišni integrirani preddiplomski i diplomski studij medicine,

Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku

2011. – 2015. II. gimnazija Osijek

2003. – 2011. Osnovna škola "Dobriša Cesarić" u Osijeku