

# Spolno uvjetovane razlike u izražaju antioksidativnih gena u aorti Sprague-Dawley štakora hranjenih visoko-masnom- visoko-slatkom hranom

---

Tomac, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:732908>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska  
dijagnostika**

**Petra Tomac**

**SPOLNO - UVJETOVANE RAZLIKE U  
IZRAŽAJU ANTIOKSIDACIJSKIH  
GENA U AORTI ŠTAKORA HRANJENIH  
VISOKO – MASNOM – VISOKO –  
SLATKOM HRANOM**

**Završni rad**

**Osijek, 2017.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska  
dijagnostika**

**Petra Tomac**

**SPOLNO - UVJETOVANE RAZLIKE U  
IZRAŽAJU ANTIOKSIDACIJSKIH  
GENA U AORTI ŠTAKORA HRANJENIH  
VISOKO – MASNOM – VISOKO –  
SLATKOM HRANOM**

**Završni rad**

**Osijek, 2017.**

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek, Odsjek za fiziologiju i imunologiju

Mentorica rada: prof.dr.sc. Ines Drenjančević, dr.med., predsjednica Katedre za fiziologiju i imunologiju

Neposredna voditeljica: dr. sc. Anita Ćosić, dipl. ing.

Rad ima 32 lista, 0 tablica i 8 slika.

## ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr. med. na vođenju, pomoći i savjetima tijekom pisanja ovoga rada.

Također, zahvaljujem dr. sc. Aniti Ćosić, dipl. ing. na pomoći oko provođenja eksperimenta, brojnim savjetima, strpljenju i izdvojenom vremenu za moje brojne upite.

Zahvaljujem se svim svojim prijateljima koji su bili uz sve moje uspone i padove tijekom studiranja. Posebnu zahvalnost upućujem svojoj obitelji i roditeljima koji su mi omogućili ovo trogodišnje studiranje. Hvala im na povjerenju koje su mi ukazali tijekom studiranja.

## SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
	1.1.Prehrana bogata mastima i šećerima te kardiovaskularne bolesti kao glavna posljedica prekomjernog unosa takve prehrane.....	1
	1.2.Pretilost i kardiovaskularni rizik.....	2
	1.3. Oksidacijski stres i slobodni kisikovi spojevi.....	2
	1.4. Antioksidacijski mehanizmi.....	3
	1.4.1. Enzimski antioksidansi.....	3
	1.4.2. Neenzimski antioksidansi.....	4
	1.5.Antidijabetički lijekovi - metformin i liraglutid.....	4
2.	HIPOTEZA.....	6
3.	CILJ.....	7
4.	MATERIJALI I METODE.....	8
	4.1. Materijali.....	8
	4.2. Metode.....	9
	4.2.1. Način hranjenja eksperimentalnih životinja i izolacija uzoraka.....	9
	4.2.2. PCR u realnom vremenu (eng. <i>Real - Time Polymerase Chain Reaction</i> )....	9
	4.2.3. Statistička analiza.....	11
5.	REZULTATI.....	12
	5.1. Tjelesna masa životinja.....	12
	5.2.Relativan izražaj antioksidacijskih enzima u aortama štakorica.....	13
	5.3.Relativan izražaj antioksidacijskih enzima u aortama štakora.....	16
6.	RASPRAVA.....	18
7.	ZAKLJUČCI.....	20
8.	SAŽETAK.....	21

9. SUMMARY.....	22
10. LITERATURA.....	23
11. ŽIVOTOPIS.....	26

## 1. UVOD

### 1.1. Prehrana bogata mastima i šećerima te kardiovaskularne bolesti kao glavna posljedica prekomjernog unosa takve prehrane

Danas je uvriježeno mišljenje da su masti izrazito loše za čovjeka, zbog čega mnogi odlaze na dijetu, i da se njihov unos treba minimalizirati ili čak izbjegavati. Naravno da takva jednostrana procjena nije dobra jer masti imaju loše, ali i dobre strane. Masti su dio mnogih namirnica i osim što poboljšavaju okus hrane, sprječavaju brzu probavu hrane te tako osiguravaju dulji osjećaj sitosti. Osim toga, uz proteine i ugljikohidrate i masti čine glavni sastojak hrane, a energetska je vrijednost 9 kcal po gramu masti. Po svojem sastavu masti su esteri masnih kiselina i alkohola glicerola, a može ih se podijeliti u zasićene i transmasne kiseline ili u mono- i polinezasićene masne kiseline. Ukupan dnevni unos masti ne bi smio prijeći 70 g, a unos zasićenih masnih kiselina trebalo bi se ograničiti na maksimalno 20 grama dnevno. Zato pozornost treba obratiti na unos zasićenih i transmasnih kiselina, jer one povećavaju rizik oboljenja od kardiovaskularnih bolesti, najčešće ateroskleroze, a onda i diabetesa mellitusa, nekih oblika raka, upalnih bolesti ili pretilosti koja danas u svijetu, pa i u Hrvatskoj, predstavlja velik javnozdravstveni problem (1). Uz glavni čimbenik rizika, povišen krvni tlak ili hipertenziju, pretilost također pridonosi boljemu i bržemu razvoju već spomenutih kardiovaskularnih bolesti (1). Prema podacima europske statistike, kardiovaskularne su bolesti vodeći uzrok smrti i odgovorne su za 4,3 milijuna smrti godišnje što čini 42% smrti u zemljama Europske unije (1). Tu je činjenicu potvrdilo i Hrvatsko kardiološko društvo koje je objavilo da je ta vrsta bolesti bila uzrok smrti u 47% umrlih u Hrvatskoj 2014. godine (2). Za razliku od zasićenih i transmasnih kiselina, mono- i polinezasićene masne kiseline (kojima su maslinovo ulje i riba glavni izvor) podižu razinu tzv. „dobrog“ kolesterola, a istovremeno smanjuju razinu tzv. „lošeg kolesterola“. Molekula HDL (*High-density lipoproteins*) smatra se dobrim kolesterolom jer skuplja višak LDL (*Low-density lipoproteins*) kolesterola i nosi ga u jetru gdje se razgrađuje. Nasuprot tomu, molekula LDL predstavlja loš kolesterol, bez obzira na to što nosi kolesterol u tkiva i organe, jer stvaranje naslaga (plakova) te molekule uzrokuje različite bolesti kardiovaskularnog sustava. Kao dodatan rizik za kardiovaskularna oboljenja navodi se i prekomjeran unos šećera. Dnevna razina šećera koja bi se smjela unijeti u organizam iznosi 90 grama, a ako se vrijednosti popnu iznad navedene, mogu uzrokovati povećanje triglicerida u krvi i smanjiti razinu tzv. „dobrog“



kolesterola (3). Tako se organizam ponovo dovodi u rizičnu situaciju oboljenja od kardiovaskularnih bolesti.

### **1.2. Pretilost i kardiovaskularni rizik**

Prehrana različito utječe na razvoj i napredovanje kardiovaskularnih bolesti, od nepravilnog odabira hrane do prekomjernog unosa šećera i masti. Pretjeran dnevni unos kalorija, a uz njega i nedovoljna tjelesna aktivnost, pogoduju nastanku pretjerane uhranjenosti. Zato je pretilost sve češće udružena s čimbenicima kao što su arterijska hipertenzija i inzulinska rezistencija. U Hrvatskoj je, nažalost, incidencija pretilosti u porastu i svaki je peti stanovnik pretio. Tako je Hrvatska u nedavno objavljenoj opservacijskoj studiji Europskog kardiološkog društva *Europaspire IV* zauzela 6. mjesto u Europi s prevalencijom pretilosti. Prekomjeran unos hrane bogate mastima i šećerima može dovesti do povećanja oksidacijskoga stresa zbog snižene aktivnosti antioksidacijskih enzima. Tako povećan oksidacijski stres u stijenci krvnih žila dovodi do aktivacije endotela i do razvoja upale te se gubi ravnoteža između slobodnih kisikovih spojeva i antioksidacijskog obrambenog mehanizma (4).

### **1.3. Oksidacijski stres i slobodni kisikovi spojevi**

Oksidacijski se stres može definirati kao poremećaj u ravnoteži između slobodnih kisikovih spojeva i antioksidacijske obrane. Slobodne kisikove spojeve (ROS) stvaraju živi organizmi kao rezultat normalnog staničnog metabolizma i okolišnih čimbenika. Fiziološki ROS u niskim je koncentracijama važan za rast stanica, njihovu diferencijaciju, starenje i apoptozu. ROS se ubrajaju u visoko reaktivne molekule zbog nesparenog elektrona, odnosno slobodne valencije, pa u visokim koncentracijama mogu dovesti do oštećenja staničnih struktura kao što su ugljikohidrati, nukleinske kiseline, proteini, lipidi, ali i mijenjati njihove funkcije. Pomak u ravnoteži između oksidansa i antioksidansa u korist oksidansa upravo je oksidacijski stres, a štetnost mu se očituje na vaskularnom endotelu čija je poremećena funkcija podloga kardiovaskularnih bolesti. Smanjena regulacija oksidacijskog stresa i oksidirajuće stanje izuzetno su kritični za vijabilnost stanica, njihovu aktivaciju, proliferaciju i funkciju organa (5). Kako bi se spriječili svi štetni učinci ROS-a, organizam aktivira antioksidacijske sustave, bili oni enzimski ili neenzimski. Međutim, u patološkim stanjima, uključujući oštećenje miokarda tijekom ishemije, akutni infarkt zbog opstrukcije koronarnih arterija, ateroskleroze, dijabetes, hipertenziju, upalu, neurološke poremećaje ili rak, funkcija antioksidacijskih

sustava može biti narušena (5). U ROS ubrajaju se superoksid, vodikov peroksid, singlet kisik, ozon i organski peroksidi, a u patofiziološkim stanjima postoje mnogi izvori ROS-a. Glavni endogeni izvori ROS-a predstavljaju sedam izoformi NADPH oksidaza, mitohondrijski respiratorni transportni lanac, ksantin oksidaza, citokrom P450 i metabolizam arahidonske kiseline, a egzogeni su primjerice dim cigareta, različite vrste zračenja, lijekovi i sl. (6).

#### **1.4. Antioksidacijski mehanizmi**

Svaki živi organizam posjeduje antioksidacijski obrambeni mehanizam koji služi za suprotstavljanje štetnog učinka ROS-a. Dijeli se na enzimski i neenzimski mehanizam. Općenito, antioksidansi predstavljaju male molekule koje mogu izbaciti slobodne radikale tako da prihvate ili daju elektron kako bi spriječili ili ublažili pojedina štetna stanja uzrokovana ROS-om. Enzimskoj antioksidacijskoj obrani pripadaju superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza i katalaza koji kataliziraju mnoge reakcije pretvorbe ROS-a u stabilnije molekule, primjerice vodu i kisik. U neenzimsku obranu ubrajaju se  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E), askorbinska kiselina (vitamin C), glutation (GSH), nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH), tioredoksin, metali u tragovima kao što je selen i brojni drugi.

##### 1.4.1. Enzimski antioksidansi

Superoksid dismutaza pripada prvoj crti obrane, a javlja se u trima oblicima: bakar-cink SOD (CuZnSOD ili SOD-1), mangan SOD (MnSOD ili SOD-2) koji su smješteni u matriksu mitohondrija i izvanstanični oblik EC-SOD ili SOD-3. Povećana aktivnost bilo koje izoforme SOD-a može se shvatiti kao odgovor vaskularnog endotela i stanica na oksidacijski stres. U normalnim uvjetima mitohondrijski lanac prijenosa elektrona predstavlja najvažniji izvor superoksida, a pretvara oko 5% molekularnog kisika u superokside. Primjerice, u normalnoj aorti miša pokazalo se da CuZnSOD čini 50 do 80% ukupne SOD aktivnosti, MnSOD predstavlja oko 2 do 12% ukupnog vaskularnog SOD-a, a EC-SOD ostatak. Osim toga, studije na MnSOD heterozigotnim deficijentnim miševima pokazale su da MnSOD štiti od oštećenja vaskularnog mitohondrija i razvoja ateroskleroze (5). Jedina izoforma SOD-a koja je izražena izvan stanice jest EC-SOD, a za tkivo je vezana uz pomoć svojih heparin-vezujućih domena. EC-SOD smješten je u stijenci krvne žile, pogotovo između endotela i vaskularnih mišića. Također, i njegova se aktivnost može mijenjati kao odgovor na različite podražaje kao što su hipertenzija, ateroskleroza i dijabetes (5). Osim superoksid dismutaze,

važnu ulogu antioksidacijske obrane ima i glutation peroksidaza (5, 7). Nalazi se u citosolu stanica, ali i u mitohondrijima. Glutation peroksidaze (GPx) čini osam (GPx1-8) enzima koji su važni za smanjenje razine vodikova peroksida, tj. za njegovu detoksifikaciju. Pripadaju selenocistein enzimima koji koriste glutation kao redukcijско sredstvo, odnosno supstrat. Glutation ima sposobnost vraćanja važnih vitamina, vitamina C i E, u njihov aktivni oblik, a smatra se i glavnim izvorom zaštite od blagog oksidacijskog stresa u odnosu na katalazu koja je sve važnija u zaštiti od teškog oksidacijskog stresa (7). U odsutnosti selena koji je dio aktivnog mjesta GPx, GPx gubi svoje antioksidacijsko djelovanje. Poznato je da se GPx natječe s katalazom za  $H_2O_2$  kao supstrat, ali i da je vodeći antioksidacijski enzim, jer ima veći afinitet od katalaze prema  $H_2O_2$  pa ga bolje detoksificira (7).

Katalaza (CAT,  $H_2O_2$ :  $H_2O_2$ - oksidoreduktaza) je enzim koji karakterizira brza redukcija  $H_2O_2$  do molekularnog kisika i vode, a njegova je aktivnost izražena u eritrocitima, hepatocitima i ponekad u bubregu. Unutarstanični je enzim te se nalazi u citosolu stanice, točnije peroksisomima. Građen je od četiri podjedinice i svaka od njih sadržava hem skupinu u aktivnom centru. Kao i glutation peroksidaza, značajna je u uklanjanju  $H_2O_2$  (7).

#### 1.4.2. Neenzimski antioksidansi

Uz primarne enzimatske antioksidanse, velik učinak u suzbijanju oksidacijskog stresa imaju i neenzimski antioksidansi.

Glutation (GSH) je tripeptid koji je sučimbenik glutacione peroksidaze. Već je spomenuto da ima važnu ulogu u uklanjanju  $H_2O_2$ , ali i kloriranih oksidansa i hidroksil radikala. Osim toga, važan je u regulaciji proliferacije limfocita, sintezi imunoglobulina i citokina (5).

Vitamin E važan je za zaštitu struktura staničnih membrana, jer sprječava lipidnu peroksidaciju, a vitamin C za uklanjanje superoksidnog i hidroksilnog radikala (8).

### 1.5. Antidijabetički lijekovi-metformin i liraglutid

Dijabetes tipa 2 metabolički je poremećaj za koji je karakteristična kronična hiperglikemija zbog poremećene sekrecije inzulina zbog čega je poremećeno iskorištavanje ugljikohidrata iz hrane. Hiperglikemija je stanje povišene glukoze iznad 8 mmol/L, a može dovesti do razvoja oksidacijskog stresa tako da povećava aktivnost mitohondrija, odnosno dovodi do nakupljanja slobodnih kisikovih spojeva (9).

Metformin i liraglutid antidijabetici su koji služe za poboljšanje kontrole razine šećera kod osoba s dijabetesom tipa 2 (9).

Metformin je lijek koji pripada grupi bigvanida kojima je glavna zadaća stvarati smanjenu količinu glukoze u jetrima aktivacijom enzima protein-kinaze koju aktivira AMP (adenozin monofosfat). Osim toga, smanjuju glukoneogenezu u bubrezima, usporavaju apsorpciju glukoze u probavnom traktu, povećavaju odstranjivanje glukoze iz krvi, te smanjuju razinu glukagona u plazmi. Metformin se preporučuje kao lijek izbora za dijabetes tipa 2. Štedi inzulin, ne povećava tjelesnu težinu i ne dovodi do nastanka hipoglikemije. Također je dokazano da smanjuje rizik od makrovaskularnih i mikrovaskularnih bolesti. Poluvijek mu je eliminacije 1,5-3 sata, te se ne može metabolizirati ni vezati za proteine u plazmi pa se iz organizma uklanja samo putem bubrega u aktivnom obliku. Njegov štetan učinak odražava se na probavni sustav uzrokujući anoreksiju, mučninu, proljev, bol u trbuhu i sl. (9).

Osim metformina, kao antidijabetik dijabetesa tipa 2 koristi se i liraglutid. Liraglutid je analog humanoga GLP-1 (glukagon like peptid-1) s 97% homologije. Zbog spore apsorpcije i eliminacije jedna dnevna doza dovoljna je za postizanje učinka tijekom 24 sata. Liječenje liraglutidom počinje se dozom od 0,6 mg koju nakon tjedan dana treba povisiti na 1,2 mg (10). Potrebno je započeti liječenje nižom dozom zbog mogućih gastrointestinalnih nuspojava (10). Osim u liječenju dijabetesa tipa 2, ispitivana je učinkovitost liraglutida i u liječenju pretilosti te je dokazano da pridonosi gubitku težine (10). Najčešća je nuspojava koju je izazivao taj lijek bila mučnina. Osnovne mjere liječenja (redukcija tjelesne težine i primjerena prehrana te pojačana tjelesna aktivnost) vrlo su uspješne u postizanju bolje inzulinske osjetljivosti, odnosno u smanjenju inzulinske rezistencije (10).

## **2. HIPOTEZA**

Unos hrane bogate mastima i ugljikohidratima dovest će do sniženog izražaja gena antioksidacijskih enzima, posebice kada je riječ o ženskom spolu. Također, primjena antidijabetičke terapije uzrokovat će normalizaciju izražaja gena antioksidacijskih enzima.

### **3. CILJ ISTRAŽIVANJA**

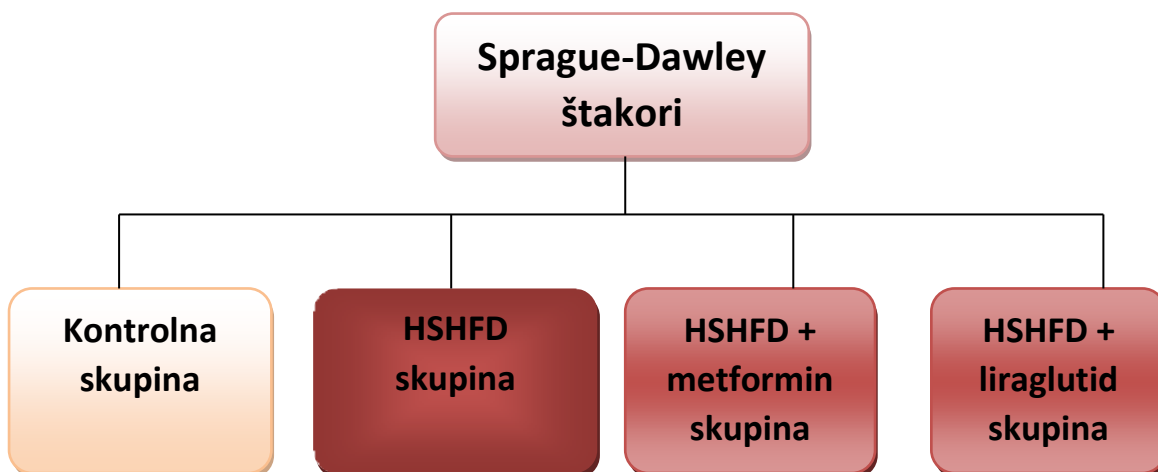
Cilj je ovoga istraživanja utvrditi spolno uvjetovane razlike u izražaju gena antioksidacijskih enzima kod Sprague-Dawley štakora koji su hranjeni hranom bogatom mastima i šećerima (preddijabetičkim štakorima). Također je cilj utvrditi i utjecaj antidijabetičke terapije na izražaj gena antioksidativnih enzima kod štakora oba spola.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. MATERIJALI

Istraživanje se provodilo na zdravim Sprague-Dawley štakorima obaju spolova u starosti od 10 mjeseci. U toj dobi životinje su podijeljene u četiri skupine i uvedeni su dijetni protokoli u trajanju od četiri mjeseca:

- 1) kontrolna skupina- životinje su tijekom svih 14 mjeseci konzumirale standardnu hranu za štakore;
- 2) HSHFD skupina- životinje su od 10 do 14 mjeseci starosti konzumirale hranu koja sadrži 60% ugljikohidrata i 12% krute masti u sastavu;
- 3) HSHFD + metformin skupina - životinje su od 10 do 14 mjeseci starosti konzumirale hranu koja sadrži 60% ugljikohidrata i 12% krute masti u sastavu te su od 51. do 65. tjedna primale i terapiju antidijabetika metformina u dozama od 50 mg/kg/dan;
- 4) HSHFD +liraglutid skupina - životinje su od 10 do 14 mjeseci starosti konzumirale hranu koja sadrži 60% ugljikohidrata i 12% krute masti u sastavu te su od 51. do 65. tjedna primale i terapiju antidijabetika liraglutida u dozama od 0.3 mg/kg/dan.



Slika 1. Prikaz eksperimentalnih životinja

## 4.2. METODE

### 4.2.1. Način hranjenja eksperimentalnih životinja i izolacija uzoraka

U istraživanju se koristilo Sprague-Dawley štakore oba spola. Kontrolna je skupina konzumirala standardnu hranu za štakore (proizvođač Mucedola, Italija), dok su ostale skupine konzumirale HSHFD hranu (60% ugljikohidrata i 12% krute masti) proizvođača Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG. Životinje su tijekom cijelog istraživanja imale slobodan pristup tekućoj vodi. U dobi od 10 mjeseci životinje su bile uključene u dijetni protokol u trajanju četiri mjeseca. Dvije skupine koje su konzumirale HSHFD prehranu od 51. do 65. tjedna primale su terapiju antidijabeticima metforminom i liraglutidom. Od uzoraka uzimala se aorta za određivanje genskog izražaja antioksidacijskih enzima metodom PCR-a u realnom vremenu. Uzorci su nakon izolacije bili smrznuti u tekućem dušiku i pohranjeni na -80°C do izvođenja molekularnih pokusa. Prije usmrćivanja, životinje su bile uspavane izofluranom (Forane® isofluranum, Abbott Laboratories Ltd, Queenborough, UK). Svi eksperimentalni postupci su bili usklađeni s europskim smjericama za skrb i primjenu laboratorijskih životinja (direktiva 86/609). Također su poduzete sve mjere da bi se spriječila patnja životinja. Istraživanja je odobrilo Mađarsko etičko povjerenstvo za istraživanja na životinjama (IV/3796/2015) te od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek (Klasa:602-04/16-08/15, Broj: 2158-61-07-16-143). Uzorci su prikupljeni na Odjelu za farmakodinamiku i biofarmaciju Farmaceutskog fakulteta u Segedu u Mađarskoj, u okviru projekta Opći mehanizam bolesti (RECOOP). Pokusi genskog izražaja antioksidativnih enzima odrađeni su u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju u sklopu Medicinskog fakulteta Osijek.

### 4.2.2. PCR u realnom vremenu (eng. *Real-Time Polymerase Chain Reaction*)

#### Izolacija RNA

Homogenizacija se uzoraka provela prema protokolu koji je preuzet iz znanstvenog rada *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction* (11). Izolacija uzoraka (aorta) provedena je pomoću tekućeg dušika u tarioniku te je uzorak usitnjen pomoću tučka što je više moguće. Nakon toga, uzorku je dodan 1 ml trizola, toksične tvari tekućeg stanja za odjeljivanje tkiva od RNA i DNA kako bi se dobio



supernatant. Zatim je dodano 100  $\mu$ l 1-brom-3-klor-propana da se svi slojevi odvoje te su uzorci naglim pokretima promućkani 15 sekunda i na sobnoj temperaturi inkubirani osam minuta. Uzorci su potom centrifugirani na 12 000 okretaja 15 minuta. Po završetku, supernatant je odvojen u nove, sterilne *Eppendorf* tubice. U svaku *Eppendorf* tubicu dodano je 500  $\mu$ l izopropanola kako bi se RNA odvojila od staničnog sadržaja (DNA, proteini, lipidi...), nakon čega su uzorci lagano promućkani 15 do 20 sekunda i ponovo inkubirani na sobnoj temperaturi osam minuta. Uzorci su potom centrifugirani na 12 000 okretaja osam minuta. Nakon drugog centrifugiranja, slijedilo je ispiranje 1 ml 75%-tnim etanolom bez mućkanja uzoraka i centrifugiranje pri 7 500 okretaja pet minuta, a postupak s etanolom ponavljao se dva puta. Nakon čišćenja etanolom i sušenja uzoraka, dodano je 30  $\mu$ l čiste vode (NFW, Nuclease-Free Water) te je uslijedilo mjerenje koncentracije RNA i njezine čistoće.

### PCR u realnom vremenu

U ovom se istraživanju određivao izražaj antioksidacijskih gena PCR-om u realnom vremenu pomoću uređaja Bio Rad CFX96 iz uzoraka štakorskih aorti. To su bile izoforme superoksid dismutaze (Cu/Zn SOD, Mn SOD, EC SOD), katalaza te glutation peroksidaze 1 i 4 (GPx1 i GPx4). Pročišćavanje uzoraka i dobivanje cDNA provodilo se prema uputama proizvođača *Sigma-Aldrich* i *Applied Biosystems*. PCR, razvijen sredinom 1990-ih, metoda je umnožavanja relativno kratkih (100-5000 parova baza) odsječaka DNA u velik broj kopija. Predstavlja kombinaciju standardnog PCR-a i fluorescencije. Svaka PCR reakcijska smjesa sadrži kalup (DNA, cDNA, RNA), oligonukleotidne početnice, sva četiri deoksiribonukleotida (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), Taq DNA polimerazu, ione  $Mg^{2+}$ , PCR puffer i fluorescentnu boju ili fluorescentno obilježene oligonukleotidne probe. Ciljna se nukleinska kiselina eksponencijalno umnožava ciklusima koji se ponavljaju, a za sve je zaslužno enzimsko kopiranje. U svakom ciklusu prvo slijedi razdvajanje roditeljske DNA, odnosno denaturacija (pri 95 °C, 15 s), hlađenje na 55 do 60 °C koje omogućuje hibridizaciju, tj. sljepljivanje početnica (određenog slijeda nukleotida) s komplementarnim sljedovima, a na kraju elongacija, sinteza novonastale DNA. Optimalna temperatura Taq DNA polimeraze pri kojoj se odvija elongacija iznosi 72 °C. Broj DNA molekula u svakom se ciklusu udvostručio i novi lanci DNA u svakom sljedećem ciklusu predstavljaju kalup za vezanje početnica i sintezu nove DNA. Ono što PCR u realnom vremenu čini metodu izbora za umnažanje velikog broja kopija nukleotida jest brzina (PCR amplifikacija i dobivanje rezultata u samo 30-ak minuta) i precizna kvantifikacija nastalih PCR produkata za vrijeme umnažanja. Zato je

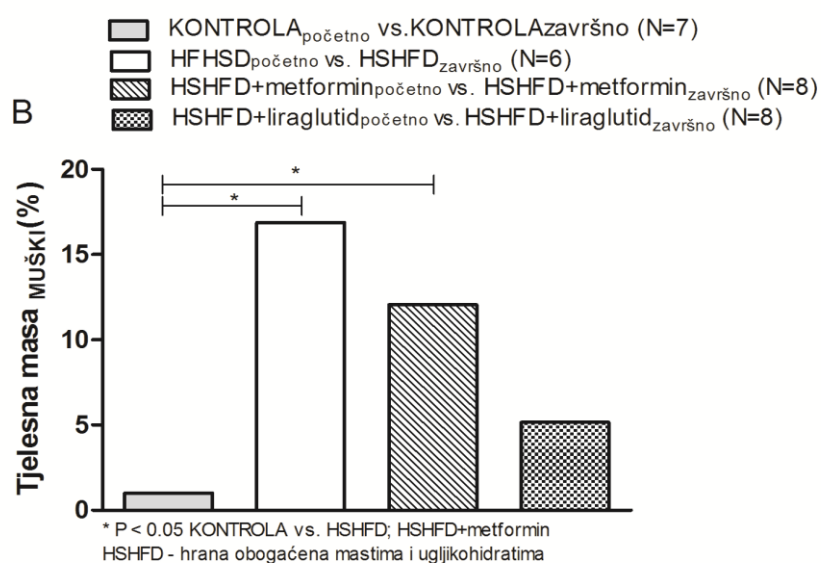
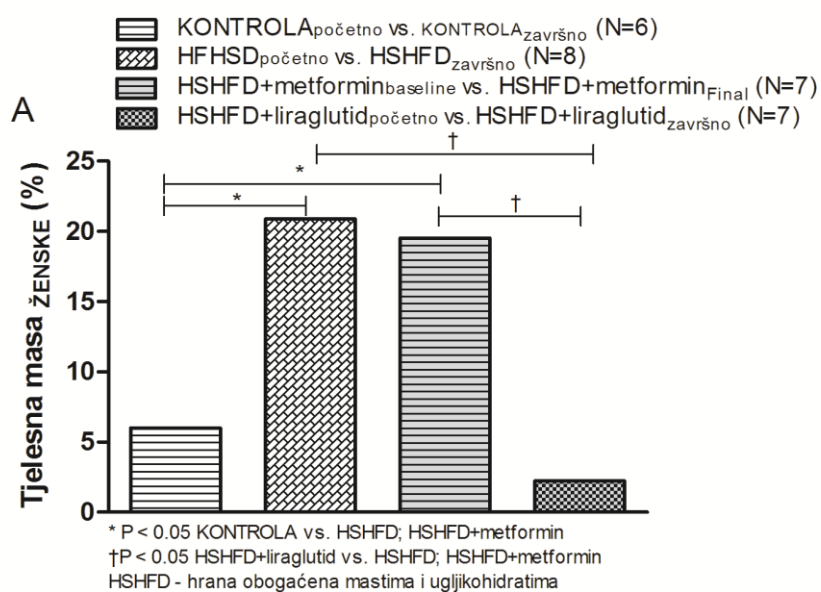
njegova primjena široka i rabi se primjerice za kvantifikaciju ekspresije gena, otkrivanje patogena i viralnu kvantifikaciju.

#### **4.2.3. Statistička analiza**

Veličina uzorka određena je pomoću Sigma Plot v11.0 programa. Za snagu testa od 0,8, p vrijednost manju od 0,05 i uz minimalnu očekivanu razliku od 0,25 iznosi 4 uzorka (životinja) po grupi. Svi su rezultati prikazani kao srednja vrijednost aritmetičke sredine  $\pm$  standardna greška mjerenja (SEM). Za utvrđivanje međusobne razlike u tjelesnoj masi životinja na početku i kraju pokusa kod normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina koristio se Studentov t test, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyjev U test. Za usporedbu rezultata genskog izražaja upotrijebljen je test za jednosmjernu analizu varijanci za nezavisne uzorke One-Way ANOVA ili u slučaju neravnomjerne distribucije dobivenih podataka Holm-Sidak ili Kruskal-Wallisov test. Za statističku je analizu upotrijebljen Sigma Plot v.12 (Systat Software, Inc, Chicago,USA). Statistička je značajnost određena na  $p < 0,05$ .

## 5. REZULTATI

### 5. 1. Tjelesna masa životinja



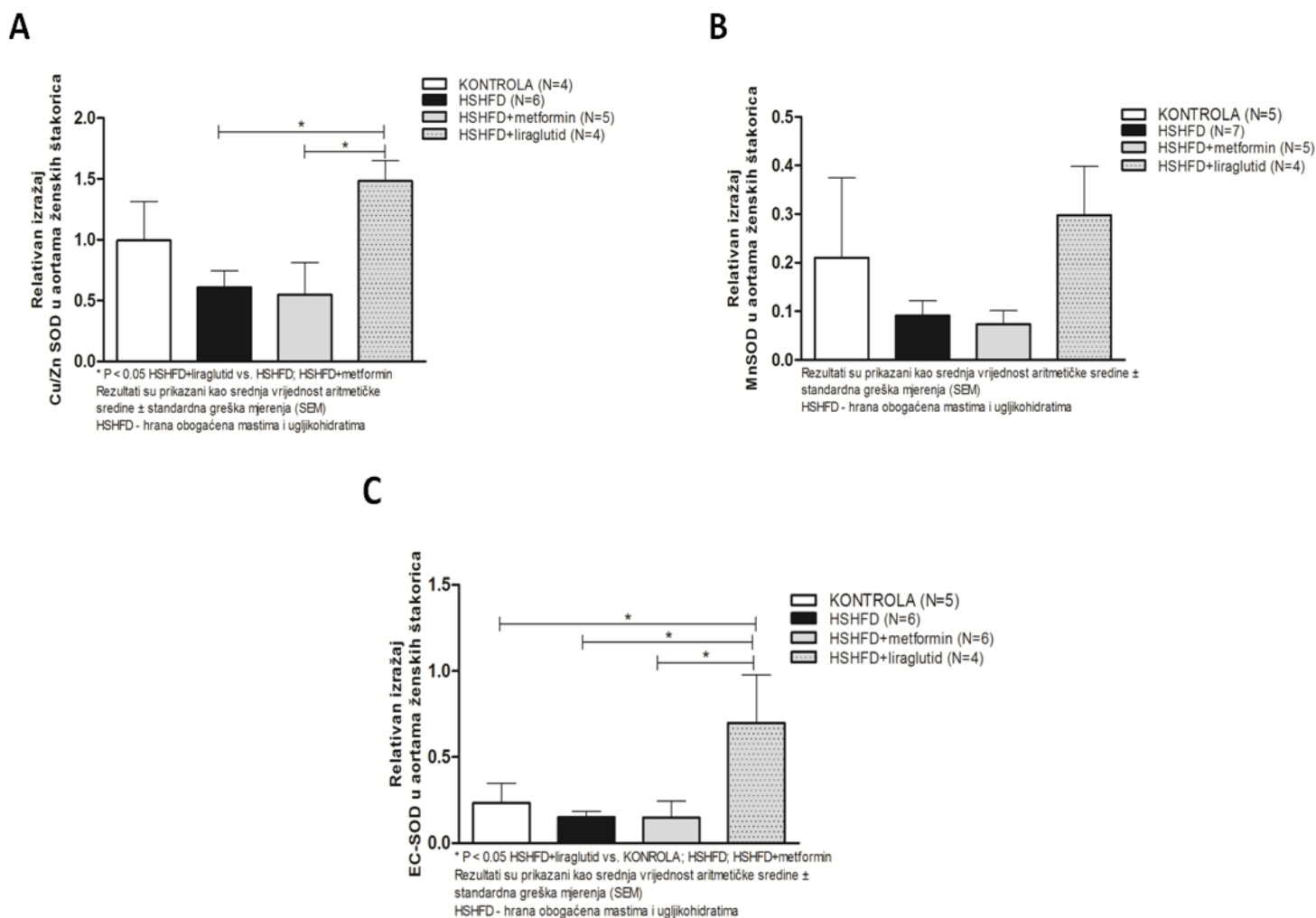
**Slika 2. Promjena tjelesne mase ženskih (A) i muških (B) štakora na početku i kraju protokola**

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost aritmetičke sredine  $\pm$  standardna greška mjerenja (SEM) , p<0,05 je razina statističke značajnosti.

Hrana s visokim udjelom masti i ugljikohidrata dovela je do značajnog povećanja tjelesne mase u oba spola (Slika 2A, 2B).

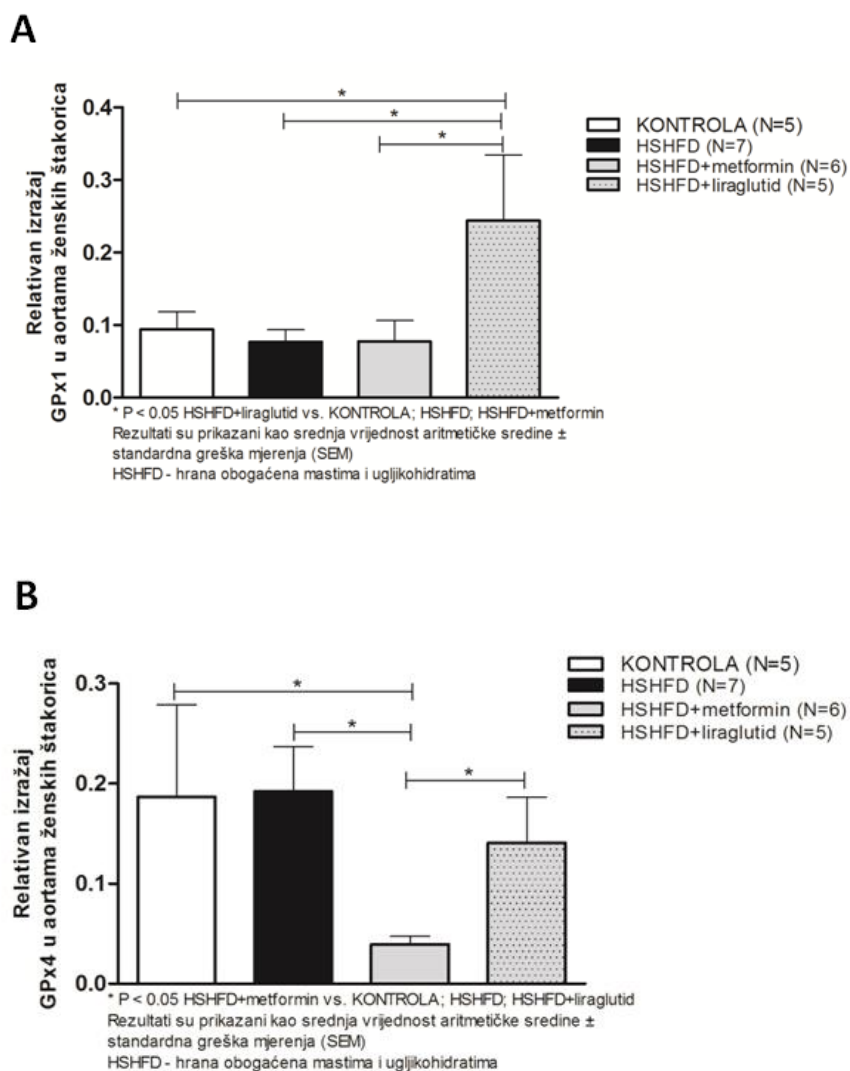
Liraglutid značajno smanjuje tjelesnu masu kod štakorica (Slika 2A), dok metformin ne dovodi do promjena tjelesne mase ni u štakora ni u štakorica (Slika 2A, 2B).

## 5.2. Relativan izražaj antioksidacijskih enzima u aortama štakorica



**Slika 3. Relativan izražaj Cu/Zn SOD (A), MnSOD (B) i EC-SOD (C) antioksidacijskih enzima u aortama štakorica**

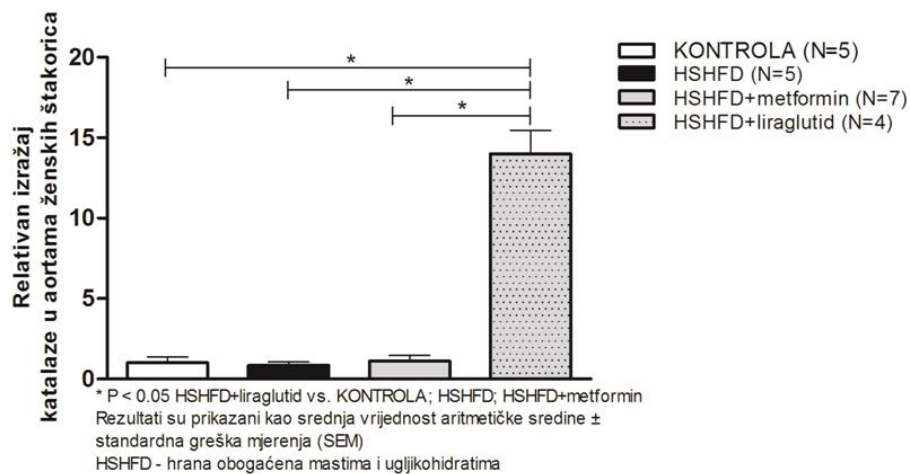
Liraglutid povećava izražaj gena svih izoformi antioksidacijskog enzima superoksid dismutaze (Slika 3A, 3B, 3C) u odnosu na kontrolnu skupinu, skupinu koja je hranjena hranom s povećanim udjelom ugljikohidrata i masti i u odnosu na skupinu s primjenjenom terapijom metformina, te liraglutid pokazuje veliko antioksidacijsko djelovanje.



**Slika 4. Relativan izražaj glutacion peroksidaze (GPx 1 (A) i GPx4 (B)) u aortama štakorica**

Hrana sa visokim udjelom ugljikohidrata i masti ne utječe na izražaj gena glutacion peroksidaze (GPx1), ali primjena terapije liraglutidom značajno povećava izražaj gena glutacion peroksidaze (GPx1) u odnosu na HSHFD skupinu kod štakorica (Slika 4B).

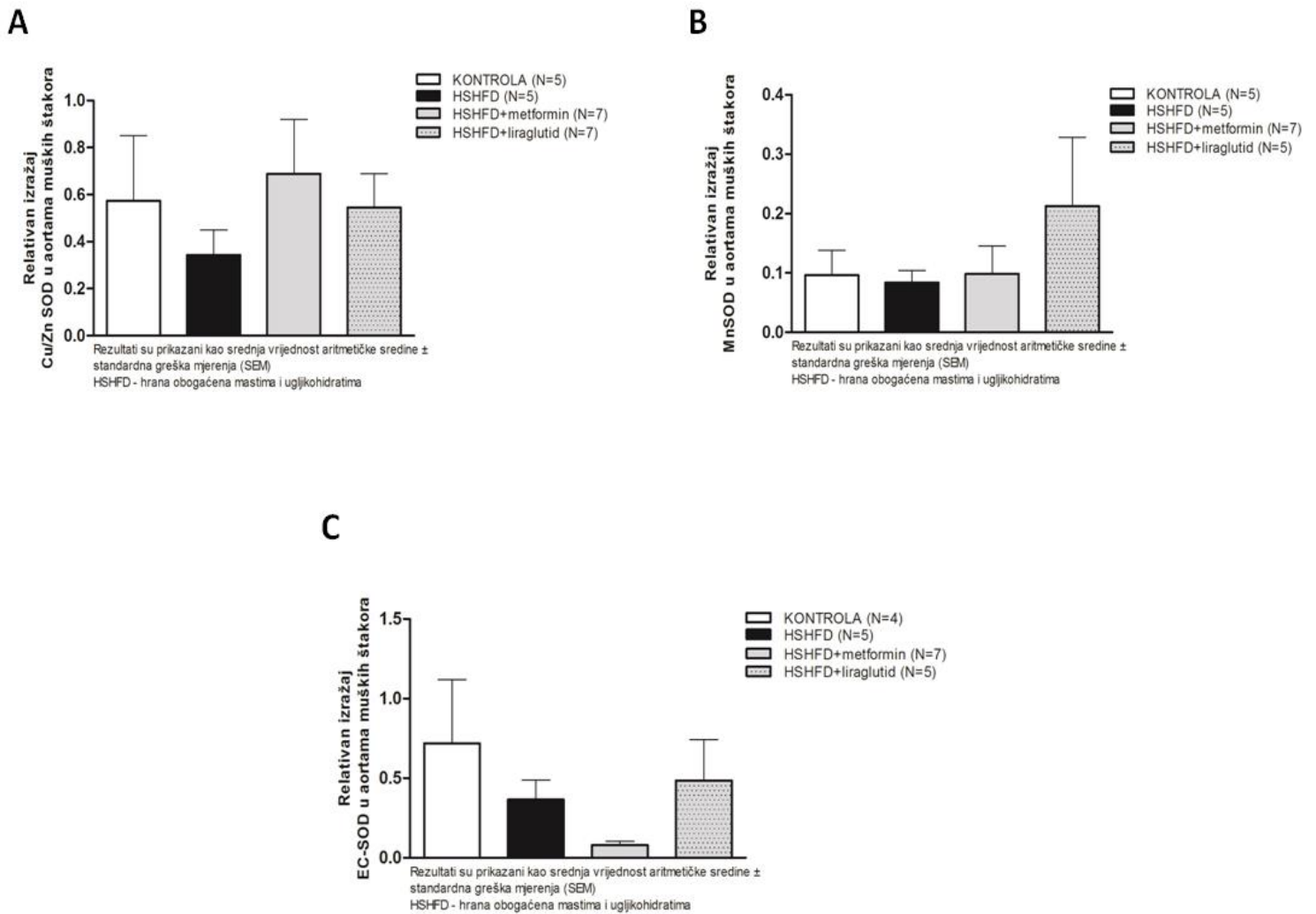
Hrana sa visokim udjelom ugljikohidrata i masti ne utječe na izražaj gena glutacion peroksidaze (GPx4), ali metformin značajno smanjuje izražaj gena glutacion peroksidaze (GPx4) u odnosu na HSHFD skupinu kod štakorica (Slika 4B).



**Slika 5. Relativan izražaj katalaze u aortama štakorica**

Primjena terapije liraglutidom značajno povećava izražaj gena katalaze u odnosu na kontrolnu skupinu, skupinu koja je hranjena hranom s povećanim udjelom ugljikohidrata i masti i skupinom s primjenjenom terapijom metformina (Slika 5).

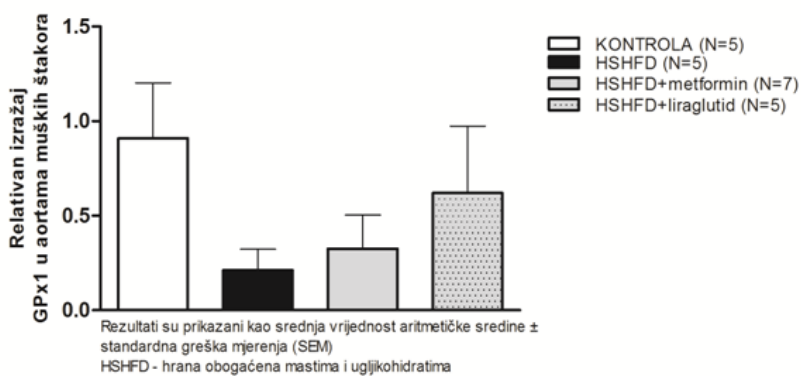
### 5.3. Relativan izražaj antioksidacijskih enzima u aortama štakora



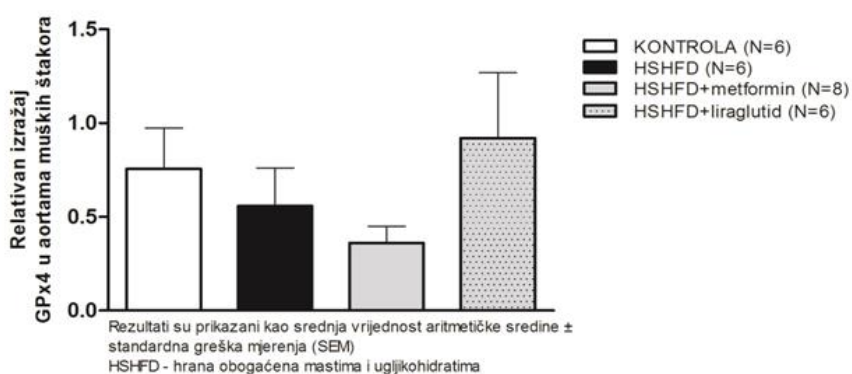
**Slika 6. Relativan izražaj Cu/Zn SOD (A), MnSOD (B) i EC-SOD antioksidacijskih enzima u aortama štakora**

Kod štakora nije utvrđena značajna razlika u izražaju gena antioksidacijskih enzima kao kod štakorica, te terapija metforminom i liraglutidom ne dovodi do značajne promjene antioksidacijskog statusa (Slika 6.-8.).

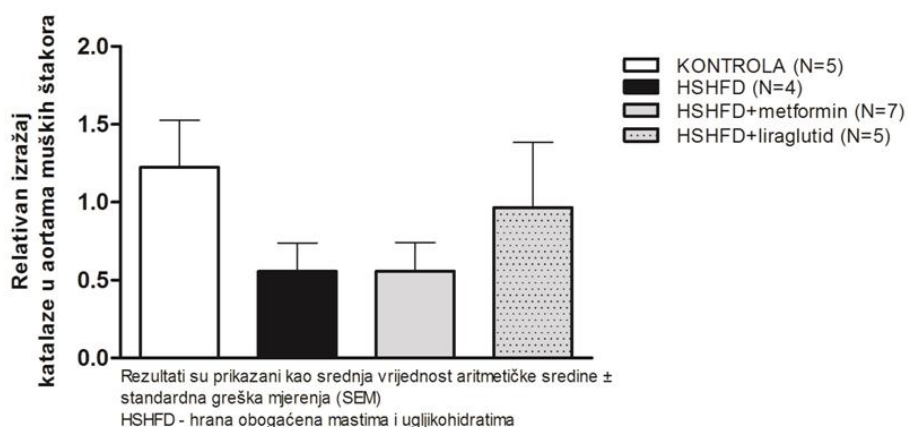
A



B



**Slika 7. Relativan izražaj glutation peroksidaza (GPx 1 (A) i GPx4 (B)) u aortama štakora**



**Slika 8. Relativan izražaj katalaze u aortama štakora**



## 6. RASPRAVA

Hrana s visokim udjelom masti dovodi do prekomjernog povećanja mase i pojave pretilosti u oba spola u ovom istraživanju (Slika 3A; B (12)). Pretili su životinje povećale naslage bijelih masti zbog hiperplazije i hipertrofije njihovih adipocita što uzrokuje manju gustoću receptora inzulina (13). Smanjena osjetljivost na inzulin glavna je značajka pretilosti i dijabetesa tipa 2 (14).

Za razliku od nekih oralnih antidijabetičkih sredstava koji dovode do povećanja tjelesne težine, kao što su inzulinski sekretagozi (sulfoniluree i meglitinidi), tiazolidindioni i sam inzulin (15, 16), novo razvijena sredstva potiču gubitak težine. Liraglutid, agonist GLP-1 receptora, smanjuje unos hrane, potiče gubitak težine i poboljšava indekse metaboličke funkcije (17). Rezultati dobiveni u ovom istraživanju su u skladu s tim činjenicama i pokazuju smanjenje tjelesne težine pretilih životinja koje primaju liraglutidnu terapiju u usporedbi s ostalim skupinama pretilosti, posebno kod ženskih štakorica (Slika 3A). Liraglutidna se terapija pokazala učinkovitijom u usporedbi s terapijom metforminom na tjelesnu težinu jer metformin nije značajno smanjio tjelesnu težinu u odnosu na skupinu pretilih životinja u obaju spolova (Slika 3A; B). Metforminski učinci na tjelesnu težinu nešto su kontroverzni: dok neke druge studije pokazuju da metformin značajno smanjuje tjelesnu masu (18) ili čak dovodi do povećanja tjelesne mase (19), rezultati ovoga istraživanja pokazali su da metformin ne dovodi do promjena tjelesne mase (20, 21). Metforminski učinci na tjelesnu masu također ovise o trajanju terapije (20, 21). Uz diabetes mellitus tip 2, pretilost je često popraćena povećanim rizikom od kardiovaskularnih bolesti, uključujući koronarnu arterijsku bolest, moždani udar i perifernu arterijsku bolest (22), a sve to povezano je s nastankom endotelne disfunkcije koja podrazumijeva smanjenje biorasploživosti vazodilacijskog dušikova oksida (NO), upala te povećanje slobodnih radikala (23, 24). Na primjer, u pretilosti povećani su superoksidni radikali i razine nitrotirozina u koronarnom endotelu. Pretilost dovodi do povećanog oksidacijskog stresa i poremećaja endotela povezanih s povećanim razinama leptina (25). Promjene izražaja antioksidacijskih enzima u aortama pokazale su se veće i značajnije u aortama štakorica. Unos masne hrane pokazao je sniženje izražaja antioksidacijskih enzima kod obaju spolova, no nije dobivena statistički značajna razlika kao kod primjene antidijabetika. Liraglutid je značajno povećao razinu gotovo svih ispitivanih antioksidacijskih enzima u ženskim aortama, čak i u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 4.-6.). Za razliku od GPx1, čiji je izražaj značajno povećan nakon tretmana liraglutidom, izražaj

GPx4 nije se značajno promijenio u usporedbi s HSHFD skupinom. U ovoj studiji izražaj katalaze bio je značajno viši u skupini s liraglutidom u usporedbi s ostalim skupinama, uključujući i kontrolnu skupinu (Slika 6). Budući da katalaza dovodi do raspada  $H_2O_2$  i time uklanja reaktivne kisikove spojeve, može upućivati u prilog većem antioksidacijskom kapacitetu ženske skupine. Za razliku od ženske skupine štakora, kod muških životinja nije utvrđena značajna razlika u izražaju antioksidacijskih enzima (slike 7.-9.) što govori u prilog da terapija metforminom i liraglutidom ne dovodi do značajne promjene u antioksidacijskom statusu i da je potrebno dulje vrijeme terapije kako bi se utvrdila značajna promjena genskog izražaja.

## 7. ZAKLJUČCI

- 1) Prehrana s visokim udjelom masnih tvari i ugljikohidrata znatno je povećala tjelesnu masu štakorica i štakora.
- 2) Primijenjena terapija liraglutidom značajno smanjuje tjelesnu masu i povećava izražaj gena antioksidacijskih enzima, posebice u štakorica.
- 3) Hrana s visokim udjelom masti smanjila je izražaj gena antioksidacijskih enzima kod štakorica, dok statistički značajne promjene u izražaju gena antioksidacijskih enzima kod štakora nema.
- 4) Liraglutid modificira antioksidacijski kapacitet i izražaj antioksidacijskih gena više u ženki nego u mužjaka, te se pokazao učinkovitiji u smanjenju razine oksidacijskog stresa od metformina.

## 8. SAŽETAK

**CILJ:** Cilj istraživanja bio je utvrditi spolno uvjetovane razlike u izražaju gena antioksidacijskih enzima u tkivu aorti preddijabetičkih Sprague-Dawley štakora koji su konzumirali hranu bogatu mastima i šećerima.

**MATERIJALI I METODE:** Zdravi Sprague-Dawley štakori, oba spola, starosti 10 mjeseci podijeljeni su u četiri skupine: kontrolna skupina, HSHFD skupina, HSHFD + metformin skupina i HSHFD + liraglutid skupina te su uvedeni dijetni protokoli u trajanju od 4 mjeseca. Iz tkiva aorte izmjeren je izražaj gena antioksidacijskih enzima (Cu/Zn SOD, MnSOD, EC-SOD, GPx1, 4 i katalaze) pcr metodom u stvarnom vremenu.

**REZULTATI:** Terapija liraglutidom izazvala je gubitak tjelesne mase kod obaju spolova, ali značajno kod ženskih štakorica. Izražaj EC-SOD, GPx1 i katalaze povećan je u aortama štakorica skupine HSHFD + liraglutid u usporedbi s ostalim ispitivanim skupinama. U HSHFD + liraglutid skupini štakorica izražaj gena CuZnSOD značajno je povećan u usporedbi s HSHFD i HSHFD + metformin skupinom. Izražaj GPx4 smanjen je u skupini HSHFD + metformina u usporedbi s ostalim skupinama ženskih aorti. Izražaj MnSOD-a nije se značajno promijenio među skupinama ženskog spola.

U muškoj skupini štakora izražaj se antioksidacijskih enzima nakon HSHFD prehrane nije značajno promijenio.

**ZAKLJUČAK:** Hrana s visokim udjelom masnoće dovodi do pojave pretilosti kod obaju spolova. Promjene antioksidacijskih enzima značajnije su kod ženskog spola. Terapija je liraglutidom značajno povećala antioksidacijski status kod ženskog spola. Također, metformin nije značajno utjecao na promjene antioksidacijskogs statusa u ispitivanim skupinama.

## 9. SUMMARY

Sex - dependant differences in antioxidative genes expression in aorta of Sprague - Dawley rats fed with high - fat - high - sugar diet

**AIM:** The aim of the study was to determine the sex differences in the expression of antioxidative enzymes in aortas of prediabetic Sprague-Dawley rats which consumed fat and sugar rich food.

**MATERIALS AND METHODS:** Healthy Sprague-Dawley rats, both sexes, aged 10 months were divided into four groups: control group, HSHFD group, HSHFD + metformin group and HSHFD + liraglutide group. They were included in 4 month diet protocols. From aortic tissue was measured gene expression of antioxidative enzymes (Cu/Zn SOD, MnSOD, EC-SOD, GPx1, 4 and catalase) by PCR in real time.

**RESULTS:** Liraglutide therapy caused loss of body weight in both sexes, but significant in female rats. The expression of EC-SOD, GPx1 and catalase was increased in aorta of HSHFD + liraglutide rats compared to other investigated groups. In the HSHFD + liraglutide group, Cu/ZnSOD was significantly increased compared to HSHFD and HSHFD + metformin groups. Expression of GPx4 was decreased in the HSHFD + metformin group compared to other female groups. Expression of MnSOD did not change significantly between groups.

In male group of rats expression of antioxidative enzymes after HSHFD diet was decreases, and was not affected by antidiabetic treatment.

**CONCLUSION:** Foods with high fat content leads to obesity in both sexes and increased oxidative stress. Expression of antioxidative enzymes are more significant in female experimental group. Liraglutide therapy has significantly increased antioxidative status in femals. Also, metformin did not significantly affect on the reduction of antioxidative stress caused by obesity.

## 10. LITERATURA

- 1) Kralj V, Sekulić K, Šekerija M, Kardiovaskularne bolesti u Hrvatskoj, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Ministarstvo zdravlja Republike Hrvatske, Zagreb 2013.
- 2) Doc. dr. sc. Knežević A, Hrvatsko kardiološko društvo, stručni članak: Prevencija kardiovaskularnih bolesti u 2015. godini, *Cardiol Croat.* 2016;11(7):218-233.
- 3) American Heart Association. Cardiovascular Disease & Diabetes. Dostupno na adresi: <http://www.heart.org>. Datum pristupa: 3.3.2017.
- 4) Higdon JV, Frei B, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003, Obesity and oxidative stress: a direct link to CVD?, 2003 Mar 1;23(3):365-7.
- 5) Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O, Oxidative Stress and Antioxidant Defense, *World Allergy Organ J.* 2012 Jan; 5(1): 9-19.
- 6) Rahal R, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K, Oxidative Stress, Prooxidants and Antioxidants: *BioMed Research International* Volume 2014 (2014), Article ID 761264, 19 pages
- 7) Jurkovič S, Osredkar J, Marc J, Molekularni utjecaj glutation-peroksidaza u antioksidacijskim procesima, *Biochemia Medica* 2008;18(2):162-74.
- 8) Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M, Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions, *Journal of Botany* Volume 2012 (2012), Article ID 217037, 26 pages
- 9) Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK, *Farmakologija*, 5. izdanje, Zagreb, Golden marketing-Tehnička knjiga, 2006.
- 10) Novak B, Metelko Ž, Liraglutid u liječenju šećerne bolesti tipa 2, *LiječVjesn* 2011;133:269-276
- 11) Chomczynski P, Sacchi N, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9.
- 12) Sikaris K, The clinical biochemistry of obesity. *Clin. Biochem. Rev.* 2004, 25, 165-181
- 13) Dulloo AG, Jacquet J, Solinas G, Montani JP, Schutz Y. Body composition phenotypes in pathways to obesity and the metabolic syndrome. *Int. J. Obes.* 2010, 34 (Suppl. 2), S4-S17

- 14) Rother KI, Diabetes treatment-Bridging the divide. *N. Engl. J. Med.* 2007, 356, 1499-1501
- 15) Scheen AJ, Current management strategies for coexisting diabetes mellitus and obesity. *Drugs* 2003; 63: 1165–1184. Todd JF, Bloom SR. Incretins and other peptides in the treatment of diabetes. *Diabet Med* 2007; 24: 223-232.
- 16) Todd JF, Bloom SR, Incretins and other peptides in the treatment of diabetes. *Diabet Med* 2007; 24: 223-232.
- 17) Shiraki A, Oyama J, Komoda H, Asaka M, Komatsu A, Sakuma M, The glucagon-like peptide 1 analog liraglutide reduces TNF- $\alpha$ -induced oxidative stress and inflammation in endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2012; 221(2):375-82. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.12.039. 15
- 18) 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 16
- 19) Makimattila S, Nikkila K, Yki-Jarvinen H, Causes of weight gain during insulin therapy with and without metformin in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 1999; 42: 406–412. 18
- 20) Hermann LS, Kalen J, Katzman P, Lager I, Nilsson A, Norrhamn O, Long-term glycaemic improvement after addition of metformin to insulin in insulin-treated obese type 2 diabetes patients. *Diabetes Obes Metab* 2001; 3: 428-434
- 21) 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,
- 22) Coutinho T, Goel K, Corrêa de Sá D, Carter RE, Hodge D, Kragelund C, 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.
- 23) Hadi H, Carr C, Suwaidi J. Endothelial dysfunction: Cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc. Health Risk Manage.* 2005, 1, 183-198.
- 24) Couillard C, Ruel G, Archer WR, Pomerleau S, Bergeron J, Couture P et al. Circulating levels of oxidative stress markers and endothelial adhesion molecules in men with abdominal obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005, 90, 6454-6459.

- 25) Galili O, Versari D, Sattler KJ, Olson ML, Mannheim D, McConnell JP. Early experimental obesity is associated with endothelial dysfunction and oxidative stress. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2007, 292, H904-H911



## 11. ŽIVOTOPIS

### **Petra Tomac**

Datum rođenja: 18. studenog 1994.

Adresa: J. J. Strossmayera 38, 31500 Našice, Hrvatska

Email adresa: petratomac6@gmail.com

JMBAG: 0062069602

### **Obrazovanje:**

- rujan 2009. – lipanj 2013.: Isusovačka klasična gimnazija s pravom javnosti u Osijeku
- rujan 2009. – lipanj 2013.: Glazbena škola Franje Kuhača Osijek
- rujan 2014. – do danas: Preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku