

# Utjecaj prehrane bogate mastima i šećerom na Izražaj antioksidativnih gena u mikrocirkulaciji Sprague Dawley štakora

---

Šušnjara, Petar

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:804962>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska  
dijagnostika**

**Petar Šušnjara**

**UTJECAJ PREHRANE BOGATE  
MASTIMA I ŠEĆERIMA NA IZRAŽAJ  
ANTIOKSIDATIVNIH GENA U  
MIKROCIRKULACIJI SPRAGUE-  
DAWELY ŠTAKORA**

**Završni rad**

**Osijek, 2017.**



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska  
dijagnostika**

**Petar Šušnjara**

**UTJECAJ PREHRANE BOGATE  
MASTIMA I ŠEĆERIMA NA IZRAŽAJ  
ANTIOKSIDATIVNIH GENA U  
MIKROCIRKULACIJI SPRAGUE-  
DAWELY ŠTAKORA**

**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 9 slika.

Ovaj završni rad ostvaren je na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek, u Laboratoriju za fiziologiju cirkulacije, u sklopu znanstvenoga projekta „Uloga oksidativnog stresa u razvoju poremećenog vaskularnog odgovora kod pretilih, preddijabetičnih štakora starije dobi tretiranih metforminom i liraglutidom“ dr.sc. Anite Ćosić, voditeljice projekta i starije istraživačice prof. dr. sc. Ines Drenjančević.

## ZAHVALA

*„Per aspera ad astra“*

*Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Ines Drenjančević koja mi je svojom potporom omogućila izradu ovog preddiplomskog rada te dr. sc. Aniti Ćosić koja mi je strpljivošću i savjetima uvelike olakšala pisanje rada. Također, želim zahvaliti svojim roditeljima, bratu i sestrama što su uvijek bili uz mene i bili mi bezuvjetna podrška.*

# KAZALO

1. UVOD .....	1
1.1. Pretilost i utjecaj na kardiovaskularni sustav .....	1
1.2. Moždana cirkulacija .....	2
1.3. Oksidacijski stres .....	2
1.4. Enzimi oksidacijskoga stresa .....	3
2. HIPOTEZA .....	5
3. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	6
4. MATERIJALI I METODE .....	7
4.1. Homogenizacija rtPCR .....	7
4.2. Statističke metode .....	9
5. REZULTATI 10	
5.1. Mjerenje razine glukoze u krvi na početku i na kraju protokol .....	10
5.2. Relativan izražaj antioksidacijskih enzima u žilama mozga štakorica .....	11
5.3. Relativan izražaj antioksidacijskih enzima žilama mozga štakora .....	14
6. RASPRAVA .....	17
7. ZAKLJUČAK .....	19
8. SAŽETAK .....	20
9. SUMMARY .....	21
10. LITERATURA .....	22
11. ŽIVOTOPIS .....	24



## 1. UVOD

### 1.1. Pretilost i utjecaj na kardiovaskularni sustav

Debljinu ili pretilost definira se kao stanje povećanoga nakupljanja masnoga tkiva u organizmu u količini koja može dovesti do negativnoga utjecaja na zdravlje. Najtočnije procjene količine masnoga tkiva ostvaruju se mjerenjima u laboratorijskim uvjetima pomoću podvodnoga vaganja (denzitometrije), multifrekventnom bioelektričnom impedancijom te magnetskom rezonancijom. Ipak, dijagnoza se temelji na indeksu tjelesne mase (BMI - izračunatom iz visine i težine) i opsegu struka (1-3). Gotovo svi slučajevi pretilosti nastaju zbog kroničnoga prejedanja uz nedovoljno kretanje i genetsku sklonost. Genetske, metaboličke i druge odrednice obično imaju sporedniju ulogu. Genetski čimbenici mogu utjecati na mnoge signalizacijske molekule i receptore koji služe dijelovima hipotalamusa i probavnoga sustava za upravljanje uzimanjem hrane. Rijetko pretilost nastaje uslijed patoloških razina peptida koji upravljaju uzimanjem hrane (npr. leptina) ili poremećajem njihovih receptora (npr. receptora za melanokortin-4) tkiva u tijelu. Masno tkivo koje se akumulira u tijelu može dovesti do različitih komplikacija koje rezultiraju pojavom različitih bolesti poput: šećerne bolesti tipa II, dislipidemije, hipertenzije i mnogih drugih kardiovaskularnih bolesti (1-3). Kardiovaskularne bolesti jesu bolesti srca i krvožilnoga sustava koje se klinički mogu podijeliti na one koje zahvaćaju srce i krvožilni sustav, koronarne (ishemične) bolesti, mozak i moždani krvožilni sustav, cerebrovaskularne bolesti, donje udove te okluzivne bolesti perifernih arterija. Predstavljaju vodeći uzrok obolijevanja u Hrvatskoj kao i u razvijenim zemljama. Rizičnoj skupini pripadaju ljudi s predispozicijama povišene masnoće u krvi, arterijskom hipertenzijom ili povišenim krvnim tlakom, pušači, dijabetičari, pretili osobe, osobe muškog spola, osobe smanjene fizičke aktivnosti, osobe izložene stresu te osobe visoke životne dobi. Kardiovaskularne bolesti mogu biti prirođene (transpozicija velikih krvnih žila, trikuspidna atrezija, opstrukcija anomalnoga utoka pulmonalnih vena, teška pulmonalna stenoza, pulmonalna atrezija, prirođena aortna stenoza, koarktacija aorte + VSD/Ductus Botalli itd.) i stečene (valvularne bolesti, bolesti miokarda, bolesti perikarda, tumori srca, shemijske bolesti srca, bolesti aorte). U podlozi tih stečenih bolesti najčešće je poremećaj strukture i funkcije krvnih žila arterija (1-3).

## 1.2. Moždana cirkulacija

Moždani krvni optok opskrbljuju četiri velike arterije, dvije karotidne i dvije vertebralne, koje se spajaju i oblikuju Willisov prsten na bazi mozga. Arterije koje polaze iz Willisova prstena granaju se u manje penetrirajuće arterije i ulaze u subarahnoidalni prostor te uranjaju u moždano tkivo, prelazeći u intracerebralne arteriole koje se konačno granaju u kapilare. Normalan protok krvi kroz mozak odrasle osobe u minuti prosječno iznosi 50 do 65 ml na 100 g moždane mase.

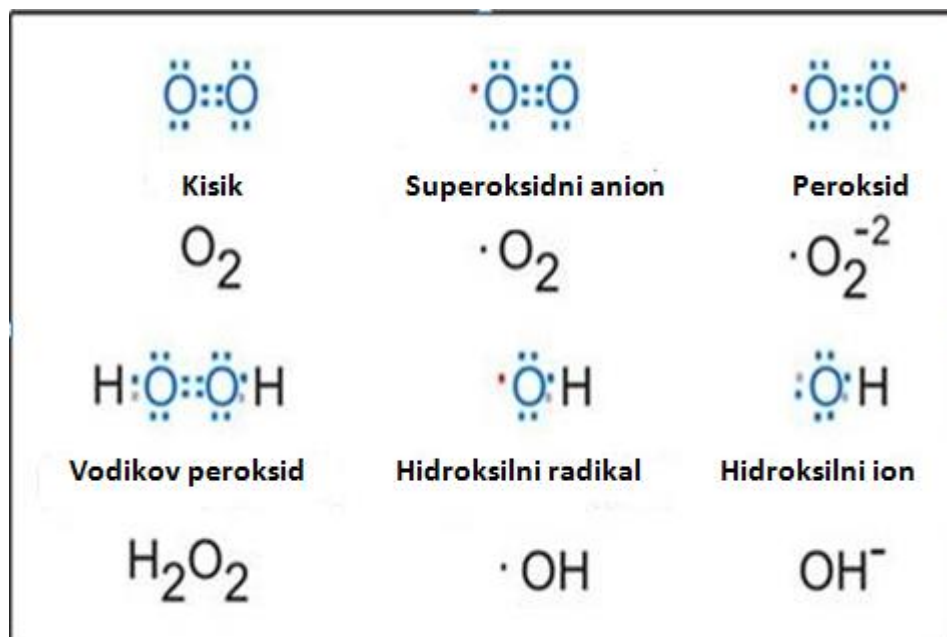
Kao i u većini drugih vaskularnih područja tijela, moždani protok krvi ovisi i o metabolizmu tkiva koji sudjeluje u nadzoru nad moždanim protokom krvi: koncentracija ugljikova dioksida, koncentracija vodikovih iona, kisika i tvari koji ispuštaju astrociti i specijalizirane neživčane stanice (4).

Najvažnija funkcija cirkulacijskoga sustava zbiva se u mikrocirkulaciji: riječ je o prijenosu hranjivih tvari i uklanjanju staničnih izlučevina. Male arteriole nadziru protjecanje krvi prema svakom tkivnom području, a lokalni uvjeti u tkivima povratno nadziru promjene u arteriolama. Tako svako tkivo uglavnom kontrolira vlastiti krvni protok u skladu sa svojim potrebama. Mikrocirkulacija svakog organa posebno je ustrojena te se sastoji od arteriola koje su vrlo mišićave, metaarteriola, završnih arteriola i venula koje su šire od arteriola i imaju mnogo slabiji mišićni omotač. Kapilarne su stijenke izvanredno tanke, građene od jednoga sloja endotelne stanice. Stoga se između tkiva i cirkulirajuće krvi mogu brzo i lako izmjenjivati hranjive tvari i voda (4).

## 1.3. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres u podlozi razvoja kardiovaskularnih bolesti (5). Oksidacijski stres definira kao pomak ravnoteže u smjeru oksidacije u oksidacijsko-redukcijskim reakcijama gdje dolazi do prekomjernoga stvaranja slobodnih radikala kisika, pri čemu dolazi do smanjene mogućnosti da ih neke stanice razgrade, a rezultira promjenama povezanim uz oštećenje stanica. Slobodan je radikal svaka kemijska vrsta koja u vanjskoj ljusci ima jednu ili više nesparenih elektrona. Sve slobodne radikale određuje visoka reaktivnost što je rezultat njihova nastojanja da popune valentnu orbitalu. Biokemijski su najznačajniji reaktivni oblici kisika kao i reaktivni neradikalni derivati kisika (vodikov peroksid, hipokloritna kiselina) te reaktivni oblici dušika. Proces stvaranja slobodnih radikala neprekidan proces koji je vezan uz normalne metaboličke reakcije kao što je respiracijski lanac u mitohondrijima. Gomilanje slobodnih radikala u organizmu kao posljedicu ima značajnu ulogu u etiopatogenezi

kardiovaskularnih bolesti, neurodegenerativnih bolesti, dijabetesa, karcinoma, procesima starenja te u mnogim drugim stanjima (6).



**Slika 1.** Različite vrste reaktivnih kisikovih vrsta (preuzeto i prilagođeno <http://www.biotek.com>)

#### 1.4. Enzimi antioksidacijskoga stresa

Organizam je pod stalnim „napadima“ oksidacijskoga stresa zbog nezdravoga načina života kao što su pušenje, nezdrava prehrana, prekomjerno konzumiranje alkohola te tjelesna neaktivnost, što vodi povećanju oksidacijskoga stresa u stanicama i većem riziku za nastajanje patoloških promjena. Međutim, ljudski se organizam pokušava obraniti od štetnoga utjecaja slobodnih radikala uz pomoć antioksidacijskih enzima koji s jedne strane povećavaju antioksidacijski kapacitet, a s druge strane uklanjaju slobodne radikale (7).

Kada je riječ o antioksidacijskim sredstvima kojima se uklanjaju slobodni radikali, može ih se podijeliti na enzimatske antioksidanse, kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaza te glutation peroksidaza, i na neenzimatske, poput vitamina C i E, NADPH, glutationa te nekih metala u tragovima (selen).

Postoje tri SOD izoforme: bakar-cink SOD (CuZn SOD ili SOD-1), mangan SOD (MnSOD ili SOD-2) - lokalizirani u mitohondrijima - i izvanstanični oblik EC-SOD ili SOD-3. Iako je subcelularni položaj svake izoforme SOD-a jedinstven, tek nedavno pojedina su se

istraživanja počela usmjeravati na funkcionalnu važnost pojedinih SOD izoformi unutar stijenki krvnih žila u normalnim uvjetima ili tijekom poremećaja krvožilja. Izražaj i aktivnost SOD-a vjerojatno imaju velik utjecaj na odgovor vaskularnih stanica na akutni i kronični oksidacijski stres. Smanjena razina CuZn SOD povećanim razinama vaskularnoga superoksida i peroksinitrita povećava miogeni ton, pojačava se vazokonstriksijski odgovor te smanjuje dilatacijaovisna o endotelu (NO posredovana) kod velikih arterija i u mikrocirkulaciji. Povećanja vaskularne propusnosti nakon ishemije uvelike su promijenjena kod CuZn SOD-deficitarnih miševa(8). Pod normalnim uvjetima mitohondrijski je lanac prijenosa elektrona glavni izvor superoksida, pretvarajući otprilike 5% molekularnoga O<sub>2</sub> u superoksid. Zbog svoje substancične lokalizacije, MnSOD smatra se prvom crtom obrane protiv oksidacijskoga stresa. Tu činjenicu potvrđuje i otkriće da miševi s potpunim deficitom MnSOD umiru u roku nekoliko tjedana nakon rođenja i pokazuju različite fenotipove (ovisno o genetskoj podlozi) uključujući degeneraciju živaca, srčane abnormalnosti i opsežna mitohondrijska oštećenja. EC-SOD jedina je SOD izoforma koja je izražena izvan stanice, vezana na tkivo putem svojih heparin-vezujućih domena koje imaju afinitet prema proteinu za heparan sulfat proteoglikan na površini stanice u bazalnim membranama i u izvanstaničnom matriksu. Lokaliziran je u stijenci krvne žile, posebice između endotela i vaskularnih mišića (8).

Glutation peroksidaza (GPx) skupina je osam (GPx1-8) enzima koji su važni za prevođenje i smanjenje razine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. GPx su selenocistein enzimi koji koriste glutation kao redukcijsko sredstvo. U mozgu se selenoproteini GPx-1-3, GPx1 i 4 nalaze u mitohondrijima, jezgri i citoplazmi. Glutation peroksidaza i katalaza smanjuju razinu vodikova peroksida samostalnim djelovanjem, ali učinkovitije smanjuju toksičnost egzogenog vodikova peroksida zajedničkim djelovanjem (8).

Katalaza (CAT, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – oksidoreduktazna) je prije svega unutarstanični enzim. Njegove najviše koncentracije u sisavaca mogu se naći u eritrocitima, jetri i povremeno u bubregu. Ima dominantnu ulogu u kontroli koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Osim katalaznog, enzim može imati i peroksidacijsko djelovanje koje prevladava pri fiziološkim koncentracijama vodikova peroksida. Niska aktivnost katalaze zabilježena je kod pacijenata sa shizofrenijom, aterosklerozom i dijabetesom (9).

## **2. HIPOTEZA**

Hrana obogaćena mastima i ugljikohidratima dovodi do poremećaja u genskom izražaju antioksidacijskih enzima u krvnim žilama mozga uz spolne razlike. Razina se antioksidacijskih enzima smanjuje što posljedično dovodi do povećanja oksidacijskoga stresa i narušavanja endotelne funkcije u mikrocirkulaciji.

Antidiabetička terapija ima pozitivan utjecaj i povećava izražajnost gena antioksidacijskih enzima u mikrocirkulaciji.

### **3. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj je provedenoga istraživanja:

- 1) ispitati utjecaj prehrane bogate mastima i šećerima na izražajnost antioksidacijskih gena u mikrocirkulaciji Sprague-Dawley (SD) štakora oba spola,
- 2) utvrditi utjecaj antidijabetičke terapije na izražajnost gena antioksidacijskih enzima u mikrocirkulaciji.

## 4. MATERIJALI I METODE

Zdravi Sprague-Dawley štakori, oba spola, starosti deset mjeseci uvedeni su u dijetni protokol u trajanju od četiri mjeseca. Životinje su podijeljene u četiri skupine:

- 1) Kontrolna skupina - životinje su tijekom svih 14 mjeseci konzumirale standardnu hranu za štakore (proizvođač Mucedola, Italija).
- 2) HSHFD skupina - životinje su od 10 do 14 mjeseci starosti konzumirale hranu koja sadrži 60% ugljikohidrata i 12 % krute masti u svojem sastavu (proizvođač Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG.).
- 3) HSHFD + metformin skupina - životinje su od 10 do 14 mjeseci starosti konzumirale hranu koja sadrži 60% ugljikohidrata i 12 % krute masti u svojem 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 svojem sastavu te su od 51. do 65. tjedna primale i terapiju antidijabetika liraglutida u dozama od 0.3 mg/ kg/ dan.

Životinjama je na početku i na kraju dijetnoga protokola izmjerena razina glukoze u krvi. Prije usmrćivanja životinje su bile uspavane izofluranom (Forane® isofluranum, Abbott Laboratories Ltd, Queenborough, UK). Od uzoraka prikupljale su se krvne žile mozga. Krvne su žile izolirane u što kraćem vremenu te su smrznute u tekućem dušiku i pohranjene u hladnjaku na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Svi su eksperimentalni postupci bili usklađeni s europskim smjernicama za skrb i primjenu laboratorijskih životinja (direktiva 86/ 609). Također, poduzete su sve mjere da bi se spriječila patnja životinja. Istraživanja je odobrilo Mađarsko etičko povjerenstvo za istraživanja na životinjama (IV/3796/2015). Uzorci su prikupljeni na Odjelu za farmakodinamiku i biofarmaciju Farmaceutškoga fakulteta u Szegedu, u Mađarskoj, u sklopu RECOOP projekta Opći mehanizam bolesti.

### 4.1 Homogenizacija i rtPCR

Tkiva se homogeniziraju tako da ih prvo usitnimo pomoću tekućeg dušika na što manje, „praškaste“ dijelove pomoću tarionika i tučka. Zatim otopinom gvanidij-tijocijanata i uzorka nastavimo s mehaničkim usitnjavanjem. Stanice odvojene centrifugiranjem liziraju se u 1 ml TRIZOL-reagensa. Homogenizirani uzorak (homogeniziran repipetiranjem) inkubira se pet

minuta na sobnoj temperaturi. Zatim se dodaje 0,2 ml kloroforma po ml TRIZOL-reagensa i pomiješa. Uzorak se inkubira na sobnoj temperaturi 2 - 3 minute te se centrifugira 15 minuta kod 12.000 x g pri 2 – 8 °C. Gornji se vodeni sloj prenese u čistu epruvetu bez RNaza. Na to se doda izopropanol, inkubira deset minuta na sobnoj temperaturi te centrifugira kod 12.000 x g pri 2 – 8 °C. Supernatant se odlije, a talog se ispiri 72 %-tnom otopinom etanola i ponovno centrifugira pet minuta kod 7.500 x g pri 2 – 8 °C. Na kraju se RNA osuši. Talog se otopi u vodi bez RNaza (10).

Klasična je metoda RT-PCR (reverse transcriptase PCR) semikvantitativna, stoga je potreba za preciznijom kvantifikacijom mRNA dovela do razvoja nove tehnike nazvanere *real time* PCR. *Real time* PCR pouzdana je i precizna metoda za kvantifikaciju specifičnih molekula DNA. Za reakciju potrebne su vrlo male količine mRNA što omogućava upotrebu te metode u slučajevima kada su na raspolaganju vrlo male količine tkiva. Produkti lančane reakcije polimeraze obilježeni fluorescencijskom bojom (PCR, *polymerase chain reaction*) neprekidno se analiziraju.

Fluorescencijska boja (najčešće se koristi SYBR Green I) vezana je uz prigušivač (Q- quencher), a emitira fluorescenciju tek nakon razdvajanja od njega, tj. vezanjem za dvolančanu (novonastalu) DNA. Dakle, mjerenjem fluorescencije mjerimo nastalu DNA jer količina fluorescencije razmjerna je količini PCR proizvoda.

Nakon završene reakcije PCR, aparat se može programirati tako da načini krivulju taljenja u kojoj se mjeri fluorescencija u odnosu na temperaturu. Tako *real time* PCR određuje i točku taljenja (*melting point*) novonastalog proizvoda, kada se dva lanca DNA odvoje i fluorescencija naglo prestaje. Tim provjeravamo specifičnost produkta jer svi produkti za specifičan par primera moraju imati istu krivulju taljenja (*melting curve*).

Danas se u praksi sve više koristi Taqman kemija u reakciji *real time* PCR-a. Metoda se zasniva na uporabi neobilježenih specifičnih početnih oligonukleotida te specifične obilježene probe (REF). Ta se metoda koristi i u analizi izražajnosti gena, ali i u SNP analizi u kojoj se koriste dvije specifične i različito obilježene probe. *Real time* PCR koristi se i za apsolutnu ili relativnu kvantifikaciju DNA/RNA. Apsolutnom kvantifikacijom može se precizno odrediti broj kopija RNA u nekom uzorku uspoređujući fluorescenciju sa standardnom krivuljom. Relativnom pak kvantifikacijom može se analizirati relativne promjene u količini transkripta. *Real time* PCR sve veću primjenu nalazi u SNP analizi (11,12).

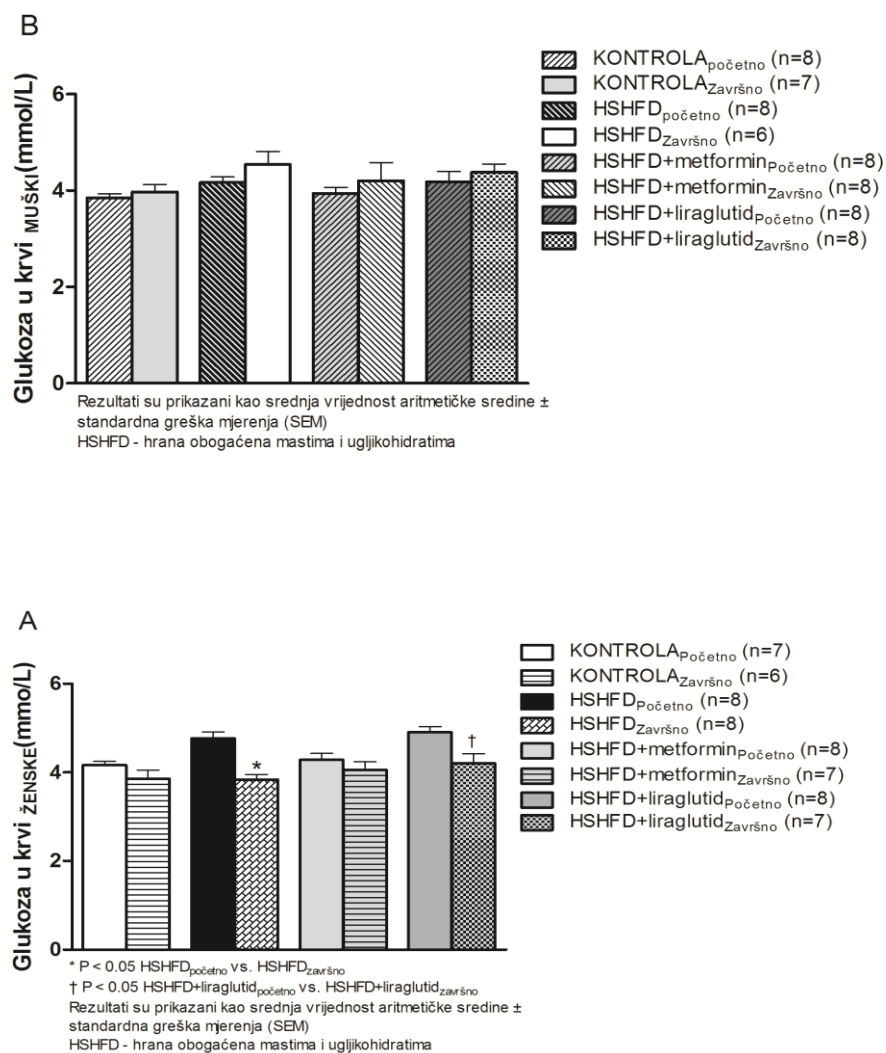


## 4.2. Statističke metode

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  SEM (SEM- standardna pogreška mjerenja). Normalnost raspodjele numeričkih varijabli ispitana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Za statističku analizu usporedbe skupina koristila se jednosmjerna analiza varijance - One-way ANOVA test, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Kruskal-Wallisov test. Razina statističke značajnosti iznosi  $p < 0,05$ . Koristio se statistički program SigmaPlot, inačica 11.2, Systat Software, Inc., Chicago, USA. Pomoću Sigma Plot v11.0 programa izračunata je veličina uzorka te ona za snagu testa od 0,8,  $p < 0,05$  i uz minimalnu očekivanu razliku od 0,25 što iznosi četiri uzorka (životinje) po skupini.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Mjerenje razine glukoze u krvi na početku i na kraju protokola



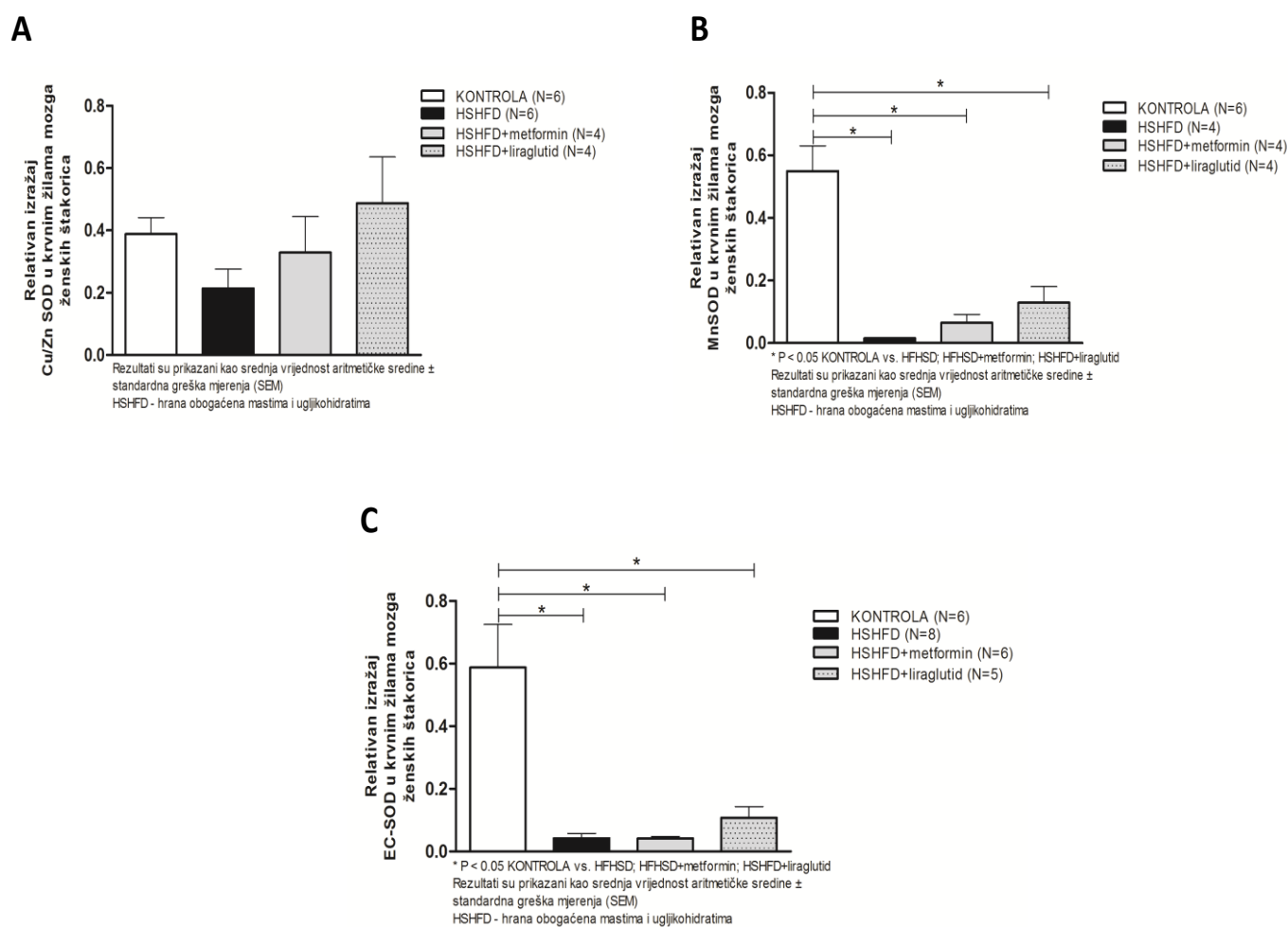
**Slika 2. Promjena vrijednosti glukoze u krvi (nmol/L) na početku i kraju protokola za sve ispitivane skupine ženskih (A) i muških (B) štakora**

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost aritmetičke sredine ± standardna pogreška mjerenja (SEM), p < 0,05 -razina statističke značajnosti.

U štakorica u HSHFD skupini ( $4.77 \pm 0.14$  u odnosu na  $3.83 \pm 0.11$  mmol / L, p < 0.05) i HSHFD + liraglutidna skupina ( $4.90 \pm 0,12$  prema  $4,20 \pm 0,21$  mmol / L, p < 0,05) koncentracija glukoze bila je značajno niža na kraju protokola (Slika 2 A).

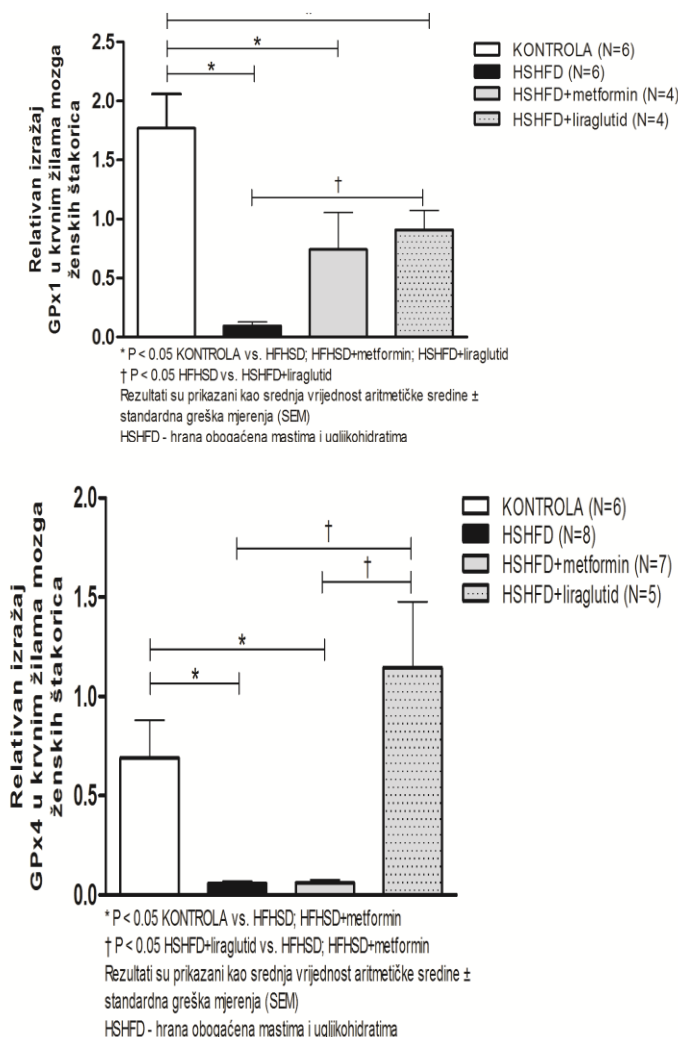
Promjena je koncentracije glukoze u krvi između skupina na početku i na kraju protokola kod muških štakora. Glukoza u krvi štakorica značajno je snižena nakon prehrane visoko masnom dijetom (Slika 2 B).

## 5.2. Relativan izražaj antioksidacijskih enzima u žilama mozga štakorica



Slika 3. Relativan izražaj Cu/Zn SOD (A), MnSOD (B) i EC-SOD antioksidacijskih enzima u krvnim žilama mozga štakorica

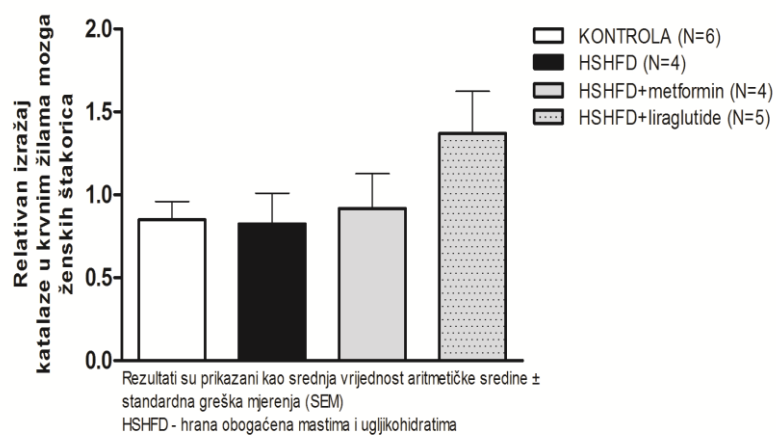
Krvnim žilama mozga štakorica izražaj gena MnSOD, EC-SOD i GPx1 u svim HSHFD skupinama (smetforminom i liraglutidom i bez njih) značajno je smanjen u usporedbi s kontrolnom ženskom skupinom (Slika 3 A, B, C).



**Slika 4. Relativan izražaj glutation peroksidaza (GPx 1 (A) i GPx4 (B)) u krvnim žilama mozga štakorica**

U ženskoj HSHFD + liraglutidnoj skupini GPx1 je izražaj povećan u odnosu na žensku HSHFD skupinu bez terapije(Slika 4 A).

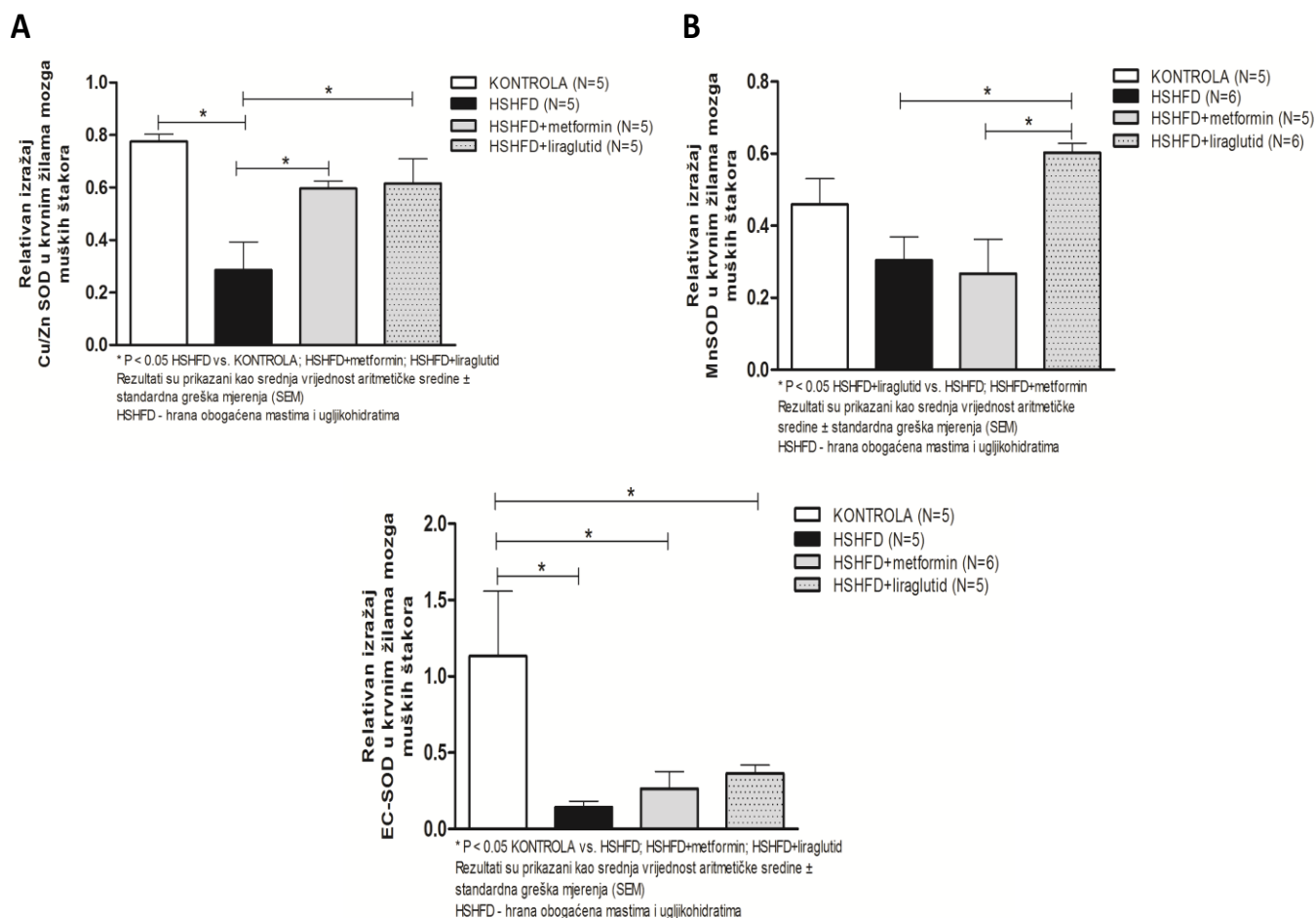
GPx4 izražaj u krvnim žilama mozga štakorica značajno je smanjen HSHFD i HSHFD + metformin u odnosu na kontrolnu i HSHFD + liraglutidnu skupinu (Slika 4 B).



**Slika 5. Relativan izražaj katalaze u krvnim žilama mozga štakorica**

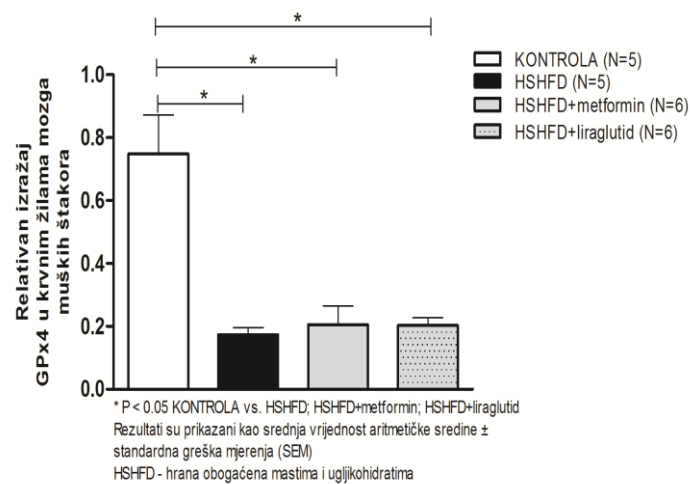
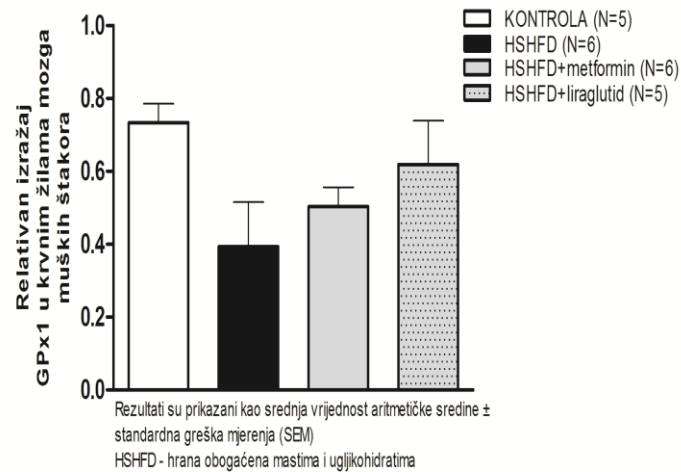
Relativan izražaj katalaze u krvnim žilama mozga štakorica pokazuje izražaj drugih antioksidacijskih enzima (Cu/Zn SOD i katalaza) kojini je značajno promijenjen između skupina (Slika 5 A).

### 5.3. Relativan izražaj antioksidacijskih enzima u žilama mozga štakora



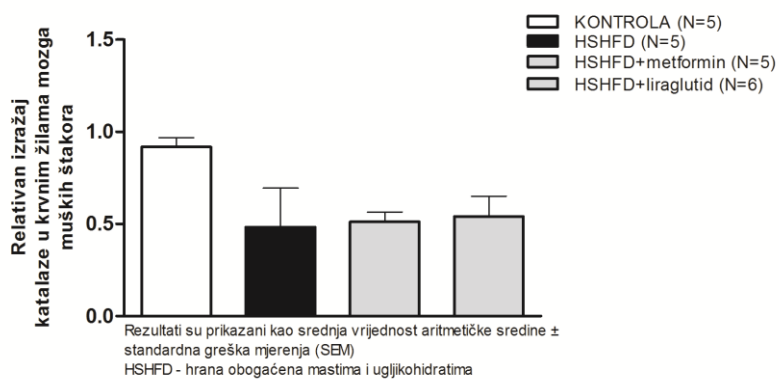
**Slika 6. Relativan izražaj Cu/Zn SOD (A), MnSOD (B) i EC-SOD antioksidacijskih enzima u krvnim žilama mozga štakora**

Izražaj Cu/Zn SOD kod HFHSD skupine u usporedbi s drugim skupinama prikazan je na slici 6 A. Liraglutidje povećao izražaj MnSOD do razine izmjerene u kontrolnoj skupini u usporedbi s HSHFD i HSHFD + metformin skupinama u krvnim žilama mozga štakora (Slika 6 B). Izražaj gena EC-SOD i GPx4 u krvnim žilama mozga štakora značajno je smanjen u svim HSHFD skupinama (s terapijom antidijabeticima i bez nje) u usporedbi s kontrolnom skupinom (Slika 6 C).



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

Izražaj GPx1 i katalaze nije se značajno promijenio između ispitivanih skupina (Slika 7), dok je izražaj gena EC-SOD i GPx4 u krvnim žilama mozga štakora značajno smanjen u svim HSHFD skupinama (sterapijom antidijabeticima i bez nje) u usporedbi s kontrolom (Slika 7 B).



**Slika 8. Relativan izražaj katalaze u krvnim žilama mozga štakora**

Izražaj GPx1 i katalaze nije se značajno promijenio između ispitivanih skupina (Slika 8A).



## 6. RASPRAVA

Nezdrava prehrana često dovodi do razvoja brojnih kroničnih kardiometaboličkih bolesti kao što su pretilost, dijabetes, kardiovaskularne bolesti i ateroskleroze (13,14). Njihov je zajednički nazivnik oksidacijski stres (15), stanje koje se javlja zbog neravnoteže između proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, superoksid, vodikov peroksid itd.) i smanjene razine antioksidacijskoga kapaciteta (16). Aktivnost antioksidacijskih enzima smanjena je u pretilih osoba što ima utjecaj na razvoj zdravstvenih problema vezanih uz pretilost (17). Uz dijabetes melitus tipa 2, pretilost je često popraćena povećanim rizikom od kardiovaskularnih bolesti, uključujući koronarnu arterijsku bolest, moždani udar i perifernu arterijsku bolest (18), a sve to posljedica je disfunkcije endotela što podrazumijeva smanjenje biorasploživosti dušikova oksida (NO), upalu, povećanje slobodnih radikala i proizvodnju citokina te oksidaciju lipoproteina niske gustoće (LDL-a) (19,20).

U ovom istraživanju nije utvrđena promjena koncentracije glukoze u krvi između skupina na početku i kraju protokola kod štakora (Slika 2B), dok je kod štakorica u HSHFD skupini ( $4,77 \pm 0,14$  u odnosu na  $3,83 \pm 0,11$  mmol / L,  $p < 0,05$ ) i HSHFD + liraglutidna skupina ( $4,90 \pm 0,12$  prema  $4,20 \pm 0,21$  mmol / L,  $p < 0,05$ ) koncentracija glukoze bila značajno niža na kraju protokola (Slika 2 A), međutim unutar fiziološkoga raspona. Prema Priručniku za veterinare (REF), normalna razina glukoze kod štakorau rasponu je od 2,77 do 7,49 mmol/L(21).

U krvnim žilama mozga štakorica izražaj gena MnSOD, EC-SOD i GPx1 u svim HSHFD skupinama (s ili bez metformina i liraglutida) značajno je smanjen u usporedbi s kontrolnom ženskom skupinom (Slika 3 B; C, Slika 4 A). U ženskoj HSHFD + liraglutidnoj skupini GPx1 izražaj povećan je u odnosu na žensku HSHFD skupinu bez terapije (Slika 4 A). GPx4 izražaj u krvnim žilama mozga štakorica značajno je smanjen u HSHFD i HSHFD + metformin skupini u odnosu na kontrolnu i HSHFD + liraglutidnu skupinu (Slika 4 B). Liraglutid je povećao izražaj GPx4 enzima na razinu izražaja istog enzima izmjenjenog u kontrolnoj skupini (Slika 4 B). Izražaj drugih antioksidacijskih enzima (Cu / Zn SOD i katalaza) nije značajno promijenjen između skupina (Slika 3 A, Slika 5).

Izražaj gena EC-SOD i GPx4 u muškim krvnim žilama mozga značajno je smanjen u svim HSHFD skupinama (s terapijom antidijabeticima i bez nje) u usporedbi s kontrolnom skupinom (Slika 6 C, Slika 7 B) te izražaj Cu / Zn SOD kod HFHSD skupine u usporedbi s drugim skupinama (Slika 6 A). Liraglutid je povećao izražaj MnSOD do razine izmjerene u kontrolnoj skupini u usporedbi s HSHFD i HSHFD + metformin skupinama u krvnim žilama

mozga štakora (Slika 6 B). Izražaj GPx1 i katalaze nije se značajno promijenio između ispitivanih skupina (Slika 7 A, Slika 8).

Liraglutid ima sposobnost prolaska kroz moždanu barijeru i ima zaštitni učinak na mozak (npr. u slučaju Alzheimerove bolesti) (21). No, također je utvrđeno da učinci te terapije nisu posredovani mikrovaskularnim odgovorima (22). To potvrđuje rezultate ovoga istraživanja koji su pokazali da se većina antioksidacijskih enzima nije značajno promijenila terapijom liraglutida u krvnim žilama mozga nakon dugotrajnog unosa masne hrane. Pretilost u bilo kojem obliku značajno smanjuje izražaj antioksidacijskih enzima u mikrocirkulaciji, bez obzira na liječenje. Stoga je pretpostavka da djelomice povećan izražaj antioksidacijskih enzima u mozgu nije izravan učinak liraglutida, nego se javlja uslijed poboljšanja ukupnoga stanja tijela nakon tretmana. Metformin također može proći moždanu barijeru (23), međutim ona nema nikakvoga značajnoga utjecaja na izražaj i promjenu razine mjerenih antioksidacijskih enzima. Dakle, pretpostavlja se da moždana mikrocirkulacija nije podvrgnuta promjenama oksidacijskoga statusa pod utjecajem metformina.

## 7. ZAKLJUČAK

- 1) Visok unos masne hrane kao i terapije antidijabeticima nisu doveli do promjene vrijednosti razine glukoze u krvi izvan fizioloških granica.
- 2) Izražaj većine antioksidacijskih enzima značajno je smanjen primjenom masne hrane s primjenom antidijabetika i bez nje u odnosu na kontrolnu skupinu.
- 3) Iako liraglutid i metformin mogu proći kroz moždanu barijeru, nisu imali značajan utjecaj na izražaj većine antioksidacijskih enzima u moždanoj mikrocirkulaciji.
- 4) Snižena razina antioksidacijskih enzima u mikrocirkulaciji primjenom hrane s visokim udjelom masti dokazuje povećanu razinu oksidacijskoga stresa u stanjima pretilosti.

## 8. SAŽETAK

**CILJ:** Cilj je istraživanja ispitati utjecaj prehrane bogate mastima i šećerima na izražajnost antioksidacijskih gena u mikrocirkulaciji Sprague Dawley (SD) štakora oba spola.

**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 krvnih žila mozga izmjeren je izražaj gena antioksidacijskih enzima (Cu/Zn SOD, MnSOD, EC-SOD, GPx1, 4 i katalaze) pcr metodom u stvarnom vremenu.

**REZULTATI:** Terapija liraglutidinom izazvala je nižu razinu glukoze u krvi kod štakorica dok kod muških štakora nije utvrđena promjena koncentracije glukoze u krvi. U krvnim žilama mozga štakorica izražaj gena MnSOD, EC-SOD i GPx1 u svim HSHFD skupinama, sa terapijom ili bez terapije, značajno je smanjen u usporedbi s kontrolnom ženskom skupinom. Također, izražaj GPx1 povećan je u odnosu na žensku HSHFD skupinu bez terapije. GPx4 izražaj u krvnim žilama mozga štakorica značajno je smanjen u skupini pod terapijom s metformin u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je liraglutid povećao izražaj GPx4 enzima izmjerenog u kontrolnoj skupini. EC-SOD i GPx4 u muškim krvnim žilama mozga značajno su smanjeni u svim skupinama u usporedbi s kontrolnom skupinom te izražaj Cu / Zn SOD kod HFHSD skupine u usporedbi s drugim skupinama ( $p < 0,05$ ). Liraglutid je povećao izražaj MnSOD u usporedbi sa skupinama na metforminu u krvnim žilama mozga štakora.

**ZAKLJUČAK:** Razina glukoze u krvi ostala je unutar fizioloških granica primjenom hrane obogaćene mastima i ugljikohidratima s primjenom antidijabetika ili bez primjene. Također, dijetni protokol dovodi do značajnog sniženja razine antioksidacijskih enzima. Primjena antidijabetika nije pokazala značajan utjecaj na izražaja većine antioksidacijskih enzima u moždanim žilama.

## 8. SUMMARY

The effect of diet rich in fats and carbohydrates on the antioxidative genes expression in microcirculation of Sprague-Dawley rats

**AIM:** The aim of the study was to examine the influence of fats and sugar rich diet on the expression of antioxidative genes in microcirculation of Sprague Dawley (SD) rats of both sexes.

**MATERIALS AND METHODS:** Healthy Sprague-Dawley rats of both sexes, aged 10 months were divided into four groups: control group, group HSHFD, HSHFD + Metformin + HSHFD group and liraglutide group and dietary protocols have been introduced in the period of 4 months. Out of blood vessels of the brain was measured gene expression of antioxidant enzymes (Cu / Zn SOD, MnSOD, EC-SOD, GPx1, catalase and 4) the method of PCR in real time.

**RESULTS:** The treatment caused liraglutidinom lower blood glucose levels in rats whereas in male rats was determined change in blood glucose concentrations. The blood vessels of the brain in rats the expression of genes of MnSOD, EC-SOD and GPx1 in all HSHFD groups, the treatment or no treatment, was significantly reduced as compared to the female control group. Also, expression GPx1 increased compared to female HSHFD group without treatment. GPx4 expression in blood vessels of the brain in rats decreased significantly in the group with metformin therapy compared to the control group, while increased expression liraglutide GPx4 enzyme measured in the control group. EC-SOD and GPx4 in male blood vessels of the brain were significantly reduced in all groups compared to the control group and the expression of the Cu / Zn SOD in HFHSD group compared to the other groups ( $p < 0.05$ ). Liraglutide increased expression of MnSOD in uspordbi groups with the metformin in the blood vessels of the rat brain.

**CONCLUSION:** The blood glucose level remained within the physiological range using feed enriched with fats and carbohydrates using antidiabetic agents and without administration. Also, diet protocol leads to significant decreases in levels of antioxidant enzima. Primjena antidiabetic agents did not show a significant effect on the expression of the majority of antioxidant enzymes in the brain vessels

## 10. LITERATURA

- 1) Božikov V, Aganović I. Pretilost i metabolički sindrom. U: Vrhovac B, ur. Interna medicina. Zagreb: Ljevak, 2008,126-775.
- 2) D.Medanić i J.Pucarín-Cvetković<sup>1,2</sup>;Pretilost – javnozdravstveni problem i izazov; Acta Med Croatica, 66 (2012) 347-355; Klinički bolnički centar Zagreb, 1 Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Škola narodnog zdravlja “Andrija Štampar” i 2 Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, Hrvatska
- 3) Arthur C.,GuytonJohn E.Hall;Protok krvi u mozgu,cerebrospinalna tekućina i moždani metabolizam,61.poglavlje:Medicinska fiziologija 12 izdanje; Medicinska naklada d.o.o 2012, Zagreb,742-750
- 4) Arthur C.,GuytonJohn E.Hall;Mikrocirkulacija i limfni sustav:izmjena kapilarne tekućine,međustanična tekućina i protok limfe,16 poglavlje:Medicinska fiziologija 11 poglavlje;Medicinska naklada d.o.o 2006,Zagreb,743-149
- 5) Drenjancevic-Peric I, Lombard JH . Reduced Angiotensin II and Oxidative Stress Contribute to Impaired Vasodilation in Dahl Salt-Sensitive Rats on Low-Salt Diet. Hypertension. 2005;45:687-691.
- 6) Z. Ďuračková. Some current insights into oxidative stress. Physiological Researchreferencu
- 7) Atalay, M., & Laaksonen, D.E. (2002). Diabetes, oxidative stress and physical exercise. Journal of Sports Science and Medicine, 1, 1–14.
- 8) Veerareddy S, Cooke CL, Baker PN, Davidge ST. Gender differences in myogenic tone in the superoxide dismutase knockout mouse: an animal model of oxidative stress. Am J Physiol. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004;287(1):H40-5.
- 9) Navest) Go´th L, Vitai M. Hypocatalasemia in hospital patients. Clin Chem. 1996; 42:341–342.
- 10) D.Čvorišćec i I.ČepelakMolekularna dijagnostika;Štrausova Medicinska biokemija.Medicinska naklada Zagreb,2009,629-636
- 11) <http://bib.irb.hr/prikazi-rad?rad=157979>
- 12) Lozano I, Van der Werf R, Bietiger W, Seyfritz E, Peronet C, Pinget M et al. 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
- 13) Crescenzo R, Bianco F, Mazzoli A, Giacco A, Cancelliere R, di Fabio G et al. Fat Quality Influences the Obesogenic Effect of High Fat Diets. Nutrients. 2015 Nov 16;7(11):9475-91. doi: 10.3390/nu7115480.
- 14) Esposito K, Ciotola M, Giugliano D. Oxidative stress in the Metabolic Syndrome. J. Endocrinol. Invest. 2006, 29, 791–795.

- 15) 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
- 16) Ozata M, Mergen M, Oktenli C, Aydin A, Sanisoglu SY, Bolu E et al. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. *Clin. Biochem.* 2002, 35, 627–631.
- 17) Coutinho T, Goel K, Corrêa de Sá D, Carter RE, Hodge D, Kragelund, C et al. 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.
- 18) Hadi H, Carr C, Suwaidi J. Endothelial dysfunction: Cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc. Health Risk Manage.* **2005**, 1, 183–198.
- 19) 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.
- 20) Johnson-Delaney C. *Exotic Animal Companion Medicine Handbook for Veterinarians*, 1996, Zoological Education Network
- 21) Hunter K, Hölscher C. Drugs developed to treat diabetes, liraglutide and lixisenatide, cross the blood brain barrier and enhance neurogenesis. *BMC Neurosci.* 2012 Mar 23;13:33. doi: 10.1186/1471-2202-13-33.
- 22) Smits MM, Tonneijck L, Muskiet MH, Hoekstra T, Kramer MH, Diamant M et al. GLP-1-Based Therapies Have No Microvascular Effects in Type 2 Diabetes Mellitus: An Acute and 12-Week Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *ArteriosclerThrombVasc Biol.* 2016 Oct;36(10):2125-32.
- 23) Yarchoan M, Arnold SE. Repurposing diabetes drugs for brain insulin resistance in Alzheimer disease. *Diabetes.* 2014 Jul;63(7):2253-61.

## 11. ŽIVOTOPIS

### **Petar Šušnjara**

Datum rođenja: 4. kolovoza 1994.

Adresa: Put Šušnjara 19, 21 240 Trilj, Republika Hrvatska

e-pošta: perosusy@gmail.com

### **Obrazovanje:**

- rujan 2010. – lipanj 2014.: Srednja škola "Braća Radić" Kaštel Štafilić
- rujan 2014. – : Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku