

# Učinci biljnog pripravka *Ilex paraguriensis* u prevenciji eksperimentalnog dijabetesa tipa 1

---

**Buretić, Martina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:578003>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-17**

*Repository / Repozitorij:*



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
Biotehnologija u medicini

Martina Buretić

**Učinci biljnog pripravka *Ilex paraguriensis* u prevenciji  
eksperimentalnog dijabetesa tipa 1**

Diplomski rad

Rijeka, 2022. godine

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
Biotehnologija u medicini

Martina Buretić

**Učinci biljnog pripravka *Ilex paraguriensis* u prevenciji  
eksperimentalnog dijabetesa tipa 1**

Diplomski rad

Rijeka, 2022. godine

Mentor rada: dr.sc. Marina Četković-Cvrlje

UNIVERSITY OF RIJEKA  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY  
Graduate programme  
Biotechnology in medicine

Martina Buretić

**The effects of the herbal preparation *Ilex paraguriensis* in  
the prevention of experimental type 1 diabetes**

Master's Thesis

Rijeka, 2022.

Diplomski rad obranjen je dana:

Pred povjerenstvom:

1. dr.sc Željka Maglica

2. dr.sc Ivana Ratkaj

3. dr.sc. Marina Četković-Cvrlje

1.

## **SAŽETAK**

Dijabetes tipa 1 (T1D), autoimuna je bolest posredovana T stanicama koja napada beta stanice gušterače čija je uloga u proizvodnji inzulina. Trenutno na tržištu ne postoji učinkovita imunoterapija koja bi prevenirala njegovo napredovanje. Yerba mate (YM) (*Ilex paraguariensis*) prirodan je biljni preparat za koji se pokazalo da ima protuupalna i hipoglikemijska svojstva. Ova studija je imala cilj ispitati učinke YM u odgodi početka T1D u kontekstu djelovanja na T limfocite u višestrukim niskim dozama streptozotocina (VND-STZ)-induciranom eksperimentalnom C57BL/6 mišjem modelu. Korištene su koncentracije od 4% i 2% YM (w/v) *ad libitum* tijekom 6 tjedana. Administracija YM značajno je snizila incidenciju T1D i hiperglikemiju, uz povećanje tjelesne težine tretiranih miševa. Također, pokazan je trend smanjenja pojavnosti T1D i razine glukoze u krvi, ali uz pad tjelesne težine, primjenom 4% YM u pilot eksperimentu na modelu spontano razvijajućeg T1D u (*non-obese diabetic* (NOD)) miševa. Ex vivo analiza T-stanica slezene izoliranih iz VND-STZ-C57BL/6 miševa pokazala je da YM primijenjena u obje koncentracije nije kompromitirala vijabilnost stanica, uz značajno smanjenje proliferacije T-stanica, prolazne promjene u imunofenotipovima T-stanica (samo sa tretmanom 2% YM) i reduciranje proizvodnje proupalnih i protuupalnih citokina, osobito u tretmanu 4% YM. T-stanice izravno izložene YM *in vitro*, pokazale su smanjenju proliferaciju ovisno o dozi, te povećanu proizvodnju IL-2 uz smanjenje IFN- $\lambda$ . Dobiveni rezultati sugeriraju preventivni potencijal YM u eksperimentalnom T1D i u skladu su s drugim studijama, potvrđujući hipoglikemijsko i imunomodulativno djelovanje YM na T-stanice.

Dijabetes tipa 1, *Ilex paraguariensis*, C57BL/6 miš, T-stanice

## SUMMARY

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease mediated by T cells that attack the insulin-producing beta cells of the pancreas. Currently, there is no effective immunotherapy on the market that would reverse the progression of the disease. Yerba mate (YM) or *Ilex paraguariensis* is a natural herbal supplement that has been shown to have anti-inflammatory and hypoglycemic properties. This study aimed to examine the effects of YM in delaying the onset of T1D in the context of T lymphocytes in multiple low dose streptozotocin (MLD-STZ)-induced experimental C57BL/6 mouse model. Concentrations of 4% and 2% YM (w/v) were used ad libitum for 6 weeks. Administration of YM significantly reduced the incidence of T1D and hyperglycemia, while increasing the body weight of treated mice. Also, a trend of decreasing the incidence of T1D and decreasing the blood glucose level, but with a decrease in body weight, was demonstrated by the application of 4% YM in a pilot experiment on a model of spontaneously developing T1D non-obese diabetic NOD mice. Ex vivo analysis of splenic T-cells isolated from MLDSTZ-C57BL/6 mice showed that YM administered at both concentrations did not compromise cell viability, with a significant reduction in T-cell proliferation, transient changes in T-cell immunophenotypes (only with 2b% YM treatment) and reduction of the production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, especially in the 4% YM treatment. T-cells directly exposed to YM *in vitro* showed a dose-dependent decrease in proliferation, an increased production of IL-2 with a decrease of IFN- $\lambda$ . The obtained results suggest the preventative potential of YM in the experimental T1D and are consistent with other studies, confirming the hypoglycemic and immunomodulatory effects of YM on T-cells.

## KEY WORDS

Type 1 diabetes, *Ilex paraguariensis*, C57BL/6 mouse, T-cells

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1 Dijabetes .....	1
1.2 T-stanice .....	3
1.3 Genetski i okolišni čimbenici .....	4
1.3.1. Genetski čimbenici i sustav humanih leukocitnih antigena (HLA) ...	5
1.3.2 Virusni i okolišni čimbenici .....	6
1.4 Autoimuni proces u T1D .....	6
1.5 Faze razvoja T1D .....	8
1.6. Prevencija T1D .....	9
1.7 Mišji modeli T1D .....	10
1.8 Yerba Mate .....	11
2. Cilj rada .....	12
3. Materijali i metode .....	13
3.1 Miševi .....	13
3.1.1 VND-STZ-C57BL/6 eksperimentalni mišji model .....	14
3.1.2 NOD mišji model .....	14
3.2 YM priprema i tretman .....	14
3.3 Indukcija VND-STZ u C57BL/6 miševa .....	15
3.4 Glikemijska mjerenja .....	15
3.5 Priprema suspenzije stanica iz slezene .....	16
3.6 Proliferacijski eseji T-stanica .....	17
3.7 Karakterizacija populacija imunoloških stanica (imunofenotipizacija). ..	18
3.8 Analiza citokina .....	19
3.9 Procjena proliferacije T-stanica i razine citokina .....	19
3.10 Statistička analiza .....	20
4. Rezultati .....	20
4.1 Određivanje optimalne doze YM za oralnu <i>ad libitum</i> primjenu .....	20



4.2 In vivo i ex vivo djelovanje 4% YM u VND-STZ-C57BL/6 modelu T1D21	
4.2.1 Tjelesna težina, glikemija i incidencija dijabetesa u VND-STZ-C57BL/6 miševa tretiranih sa 4%YM kroz period od 6 tjedana .....	21
4.2.2 Ex vivo djelovanje 4% YM na imunološke parametre u VND-STZ-C57BL/6 miševa u krajnjoj točki eksperimenta .....	23
4.3 In vivo i ex vivo djelovanje 2% YM u VND-STZ-C57BL/6 modelu T1D26	
4.3.1 Tjelesna težina, glikemija i incidencija dijabetesa u VND-STZ-C57BL/6 miševa tretiranih sa 2% YM kroz period od 6 tjedana .....	26
4.3.2 Ex vivo djelovanje 2% YM na imunološke parametre u VND-STZ-C57BL/6 miševa u krajnjoj točki eksperimenta .....	27
4.4. In vivo pilot istraživanje djelovanja 4% YM u NOD modelu T1D.....	30
4.5 In vitro djelovanje YM na proliferaciju T-stanica i njihove citokine ....	31
5. Rasprava .....	33
6. Zaključak.....	39
7.Literatura .....	40
8. Životopis .....	43

# 1.UVOD

## 1.1 Dijabetes

Dijabetes je heterogena bolest koja je u prethodnih nekoliko desetljeća postala ogroman problem javnog zdravstva zbog sve veće incidencije i morbiditeta. U 2019. godini bolest je bila deveti vodeći uzrok smrti u svijetu s oko 1.5 milijuna smrtnih slučajeva (1). S obzirom na mehanizme koji uzrokuju povećanu razinu glukoze u krvi, bolesti se dijeli na dva oblika - dijabetes tipa 1 (T1D) i dijabetes tipa 2 (T2D). T1D autoimuna je bolest koja se javlja već u djetinjstvu, ali se može manifestirati i kasnije u razvoju. Karakterizira je selektivni gubitak beta stanica gušterače čija je glavna uloga u sekreciji hormona inzulina. Proizvode ga nakupine beta stanica gušterače u Langerhansovim otočićima. Inzulin je esencijalni anabolički hormon koji sudjeluje u metabolizmu glukoze, lipida, bjelančevina i minerala. Glavna uloga je da omogućuje ulazak glukoze u mišiće i masne stanice te potiče jetru na skladištenje glikogena. Smanjena razina inzulina u krvi rezultira nemogućnošću glukoze da ulazi u stanicu pri čemu dolazi do njene povećane razine u krvi, odnosno do hiperglikemije. Posljedično se javljaju po život opasne komplikacije živčanog, kardiovaskularnog i dr. sustava. Razlog uništenja beta stanica i nedostatka inzulina u T1D je tzv. tip IV imunološke preosjetljivosti, pri čemu vlastite T-stanice iniciraju napad na beta stanice i nakupljanje ostalih stanica imunološkog sustava. Oboljele osobe ovisne su o dnevnoj administraciji inzulina i praćenju razine glukoze u krvi. Najčešće se pojavljuje kod djece i mlađih osoba, no u posljednjih nekoliko godina u porastu je i broj oboljelih odraslih osoba. Globalno se povećava incidencija i prevalencija T1D s godišnjim porastom broja slučajeva od oko 2-3%, stoga je ovo istraživanje usmjereno upravno na ovaj tip dijabetesa. Rezultati

meta-analize pokazali su da je incidencija ovog oblika bolesti 15 na 100 000 ljudi u svijetu. S druge strane, T2D smatra se metaboličkom bolesti. Javlja se u 90% slučajeva dijabetesa gdje većina oboljelih proizvodi normalne količine inzulina, ali uslijed poremećaja signalne transdukcije inzulinskog receptora, u stanicama jetre i mišića dolazi do neadekvatnog odgovora na inzulinsku stimulaciju. Inzulin se veže za inzulinske stanične receptore ali glukoza ne može ući u stanicu te dolazi do stanja koje se zove inzulinska rezistencija (2). Dijabetes predstavlja ogroman problem javnog zdravstva te oko 5 milijuna ljudi godišnje u svijetu umire od komplikacija bolesti. Iako relativno uspješno kontrolirana, jednom dijagnosticirana bolest je još uvijek neizlječiva. Trenutačni ciljevi liječenja T1D su postići dobru kontrolu glikemije, spriječiti hiperglikemiju povezanu s dugotrajnim mikrovaskularnim i makrovaskularnim komplikacijama te izbjeći ponovljene epizode hipoglikemije koja može imati negativne učinke na kognitivnu funkciju organizma. Međutim, unatoč kontinuiranoj optimizaciji režima inzulinske terapije, stvarna hormonska nadomjesna primjena djeluje samo na liječenje simptoma bez učinka na patologiju bolesti i etiopatogenezu. Iako je konvencionalni imunoterapeutski pristup privlačan koncept u potencijalnoj prevenciji nastanka T1D (3), interesantan je i pokušaj identificiranja neinvazivnih, tradicionalnih biljnih preparata s protuupalnim svojstvima koji bi mogli ako ne suzbiti, barem odgoditi pojavu bolesti. Yerba mate (YM) *Ilex paraguariensis*, je biljka s visoko izraženim sadržajem polifenola i opisanim hipoglikemijskim i protuupalnim svojstvima. Dakle, YM bi mogao biti biljni kandidat sa svojstvima odgode početka ili u smanjenja ozbiljnosti simptoma T1D (4).

Rani simptomi bolesti uključuju polidipsiju (povećana žeđ), poliuriju (povećana potreba za mokrenjem), polifagiju (povećana glad) i glikozuriju (izlučivanje glukoze u mokraću), a posljedica su hiperglikemije koja može

uzrokovati i gubitak tjelesne težine, mučninu i povraćanje, zamućen vid te sklonost bakterijskim ili gljivičnim infekcijama. Iz tog razloga izuzetno je važna kontrola hiperglikemije što uključuje praćenje razine glukoze u krvi, prilagođenu prehranu i tjelovježbu. Oboljele osobe ovisne su o administraciji inzulina bez kojeg upadaju u stanje dijabetičke ketoacidoze (DKA). DKA nastaje kada tijelo umjesto glukoze razgrađuje trigliceride (lipoliza) i proteine u mišiću, čime se povećava razina triglicerola i slobodnih masnih kiselina u krvi koje se pretvaraju u ketone pri povećanim razinama glukagona koje prati manjak inzulina. Nastale ketokiseline acetocetena i  $\beta$ -hidroksimaslačna jake su organske kiseline koje uzrokuju metaboličku acidozu čime se povećava kiselost krvi.

## **1.2 T-stanice**

T-stanice glavne su efektorske stanice u staničnoj imunosti. Glavne uloge su aktivacija fagocita i obrana od infekcija, kao i međudjelovanje sa limfocitima B. Razlikujemo CD4+ pomagačke T-stanice čija je uloga u izlučivanju citokina i regrutaciji i aktivaciji drugih leukocita u borbi protiv stranih mikroorganizama. S druge strane, postoje i CD8+ citotoksični limfociti T koji ubijaju bilo koju stanicu koja sadrži proteine mikroorganizama u citosolu. Naivne T-stanice pomoću receptora T-stanica (TCR) prepoznaju peptidne antigene u sklopu MHC molekula na antigen prezentirajućim stanicama (APC). Samo prepoznavanje antigena nije dovoljno da se T-stanica aktivira, već je uključeno više receptora. Koreceptori CD4 i CD8 pomažu u provođenju signala koji dovodi do aktivacije. Kostimulatori su izraženi na APC nakon kontakta s antigenom te se vežu na kostimulacijske receptore na T-stanicama i potiču njihov odgovor. Najpoznatiji su B7-1 i B7-2 koje prepoznaje receptor CD28 na limfocitima T. T-stanice za to vrijeme luče razne citokine kao što je interleukin 2 (IL-2) čime se dodatno pojačava njihova aktivacija. Prepoznavanje antigena aktivira nekoliko biokemijskih

kaskada koje diktiraju diferencijaciju T-stanica i potiču odgovarajući odgovor T-stanica. Razlikujemo nekoliko podvrsta T limfocita od kojih su Th1, Th2 i Th17 vrste CD4+ stanica. Razlikuju se po svojoj funkciji i citokinima koje proizvode. Th1 stanice potiču aktivaciju fagocita na ubijanje stranih mikroorganizama pojačavajući njihov odgovor lučenjem interferona gama (IFN- $\gamma$ ) i djelujući preko CD40 liganda. Th2 stanice aktiviraju se kod zaraza parazitima (helmintima) lučenjem IL-4, IL-5, IL-13 aktivirajući odgovor eozinofila. Također, uključene su u alergijske reakcije na antigene iz okoline. Th17 stanice uključene su u odgovor na bakterijske i gljivične infekcije pri čemu izazivaju jake upalne reakcije i time mogu doprinijeti razvoju nekoliko vrsta bolesti. Potiču privlačenje neutrofilnih granulocita izlučivanjem IL-17 i IL-22. Jedna od najvažnijih podskupina T-stanica koja igra ulogu u inhibiciji staničnog odgovora su regulacijske T-stanice (Treg). Razvijaju se u timusu i perifernim tkivima nakon dodira sa vlastitim antigenima i suprimiraju aktivaciju limfocita na te iste antigene. Luče IL-10 i *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ) koji inhibiraju aktivaciju limfocita, dendritičkih stanica i makrofaga. U konačnici, imaju mogućnost izražavanja visokih razina receptora za IL-2 i tako onemogućiti njegovo cirkuliranje i dostupnost drugim stanicama (5). Treg stanice i citokini koje izlučuju od velikog su značaja u ovom istraživanju jer za razliku od ostalih tipova T-stanica, jedine imaju protektivnu ulogu u razvoju T1D.

### **1.3 Genetski i okolišni čimbenici**

Čimbenike koji utječu na sam razvoj T1D možemo podijeliti na 3 skupine: genetski čimbenici, virusne infekcije i okolišni čimbenici (6).

### **1.3.1. Genetski čimbenici i sustav humanih leukocitnih antigena (HLA)**

Do danas je prepoznato više od 60 gena asociranih sa razvojem T1D. Glavne skupine gena mogu se grupirati na gene koji kodiraju proteine sa imunološkim funkcijama, poput *major histocompatibility complex* (MHC) (kod ljudi nazvan HLA), CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), PTPN2 (*Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2*), IL-2 receptor gena te na proteine vezane uz funkciju beta stanica, poput inzulina (7) (8). Od svih detektiranih gena koji utječu na razvoj T1D najznačajniji su specifični HLA geni poput HLA II molekula (HLA-DQA1, HLA-DQB1 i HLA-DRB1), od kojih se HLA-DQ lokus pokazao kao najvažnijim utjecajem u razvoju bolesti. Ovi geni kodiraju proteine koji imaju ključnu ulogu u imunološkom sustavu. HLA čini grupu gena na šestom ljudskom kromosomu koji kodiraju za, membranske glikoproteine izuzetno važne za imunološki sustav u njegovu prepoznavanju stranih molekula i održavanju tolerancije na vlastite antigene u tijelu. Glavna uloga tih molekula je prezentacija antigena T-stanicama kako bi imunološki sustav razlikovao naše stanice i tkiva od stranog. Kod ljudi, lokus MHC sadrži dvije skupine polimfornih gena – MHC I i MHC II. Molekule MHC I nalaze se na svim stanicama s jezgrom, dok su molekule MHC II izražene na dendritičkim stanicama, makrofagima i limfocitima B. Antigeni prezentirani na MHC I molekula nastaju iz endogenih citosolnih proteina koji prolaze proces razgradnje u ubikvitin-proteasomalnom putu. S druge strane, antigeni prezentirani na MHC II molekulama unose se iz izvanstaničnog okoliša iz npr. bakterija (5). Genska regija inzulina na kromosomu 11 (lokus 11p15) drugi je najvažniji genetski faktor utvrđen za dijabetes tipa 1.

### **1.3.2 Virusni i okolišni čimbenici**

Postoje indikacije da se T1D može povezati sa enteroviralnim infekcijama kao što je Coxsackie virus B4 koji sadrži protein 2C (P2C) sličan enzimu dekarboksilazi glutaminske kiseline, koja je prisutna u beta stanicama. U normalnim uvjetima, T-limfociti prepoznaju P2C kao strani antigen te ga mogu uspješno ukloniti. Kod osoba oboljelih od T1D, dolazi do pojave molekularne mimikrije, odnosno, P2C se greškom uzima kao vlastiti antigen što rezultira time da ga T-stanice ne prepoznaju i ne uklanjaju. Enterovirusi mogu ciljati beta stanice putem površinskih molekula kao što su poliovirusni receptor i integrin  $\alpha\beta 3$  čime se promiče snažna upala unutar otočića i stvara početni korak u indukciji autoimunosti. Krajnji rezultat je destrukcija beta stanica gušterače.

Što se okolišnih čimbenika tiče, studije na ljudima istih etničkih skupina koje se nalaze na različitim geografskim područjima, pokazale su veoma različitu incidenciju T1D. Vjeruje se da određena prehrana može znatno utjecati na sam tijek razvoja bolesti (6)(9). Jedan primjer toga je bakterijska mikroflora u probavnom sustavu, za koju se smatra da ulazi u trakt gušterače i djeluje kao okidač za destrukciju beta stanica pomoću molekularne mimikrije. Oslobađaju se interleukin 6 (IL-6) i interleukin 8 (IL-8) te dolazi do infiltracije makrofaga (10). Suprotno tome, povećana konzumacija vitamina D u infantilnoj dobi povezana je sa smanjenim rizikom za dječji T1D (9).

### **1.4 Autoimuni proces u T1D**

Autoimunost je stanje u kojem imunološki sustav greškom uništava zdravo tkivo i stanice. Zdravi imunološki sustav u mogućnosti je prepoznati strane antigene i razlikovati ih od vlastitih te time omogućuje autotoleranciju. Ukoliko dođe do disrupcije mehanizama koji reguliraju reaktivnost T-limfocita i B-limfocita, dolazi do stvaranja autoantitijela i autoreaktivnih

stanica. Rezultat toga je oštećenje vlastitih tkiva te posljedično organa. Ostaje nepoznata činjenica u kojem se trenutku autoreaktivne T-stanice početno aktiviraju. Normalno, imunološki sustav osigurava nekoliko kontrolnih točaka na kojima autoreaktivne stanice smanjuju svoj odgovor. U slučaju T1D, dolazi do disrupcije u signalu pri čemu Th i Tc stanice reaktivne na autoantigenske komponente beta stanica pokreću reakciju preosjetljivosti odgođenog tipa. Komponente beta stanica, poput proinzulina, dekarboksilaze glutaminske kiseline, te transporter cinka 8, identificirani su kao neki od autoantigena u T1D (11). APC stanice u limfnom čvoru gušterače prezentiraju navedene autoantigene autoreaktivnim Th stanicama. Th stanice, koje diferenciraju primarno u Th1 stanice, migriraju u gušteraču i luče proupalne citokine (IFN- $\lambda$ , IL-17 i TNF- $\alpha$ ) koji induciraju uništavanje beta stanica regrutiranjem Tc. Nadalje, beta stanice dodatno se uništavaju djelovanjem makrofaga koji generiraju reaktivne kisikove vrste (ROS), TNF- $\alpha$  i IL-1 (12). Istodobno, Th stanice aktiviraju B-stanice koje proizvode autoantitijela na autoantigene, pojačavajući imunološki odgovor. Progresijom T1D nadjačava se supresivni odgovor Treg stanica te s vremenom dolazi do inicijacije inzulitisa (13). Inzulitis je stanje karakterizirano infiltracijom mononuklearnih stanica imunološkog sustava u otočiće pri čemu dolazi do stvaranja upalnih lezija. Smatra se glavnim histopatološkim znakom kronične upale u T1D. U lezijama su dominantno prisutne Tc stanice, iako prisutne mogu biti i B-stanice. Općenito, količina otočića zahvaćena inzulitisom kod ljudi s T1D vrlo je mala i predominantno zahvaća inzulin-pozitivne otočiće (14). Iako su Th1 stanice primarni medijatori T1D, Th17 stanice također sudjeluju u autoimunosti ili upali proizvodeći proupalni IL-17. Th2 s druge strane, mogu suzbiti upalu proizvodnjom IL-4, koji može inhibirati diferencijaciju naivnih T stanica u Th1 i inhibirati Th1 funkcije. Zajedno s Treg stanicama imaju protektivnu



ulogu u razvoju T1D (5). Opisana su 2 stanična mehanizma destrukcije beta stanica:

1. Citotoksične T-stanice (CD8+) prepoznaju vlastite antigene prezentirane na MHC molekulama na površini beta stanica. Postoji direktan kontakt T-stanice i beta stanica te prepoznavanje MHC I molekula od strane CD8+limfocita (*recognition-linked mechanism*) što dovodi do destrukcije beta stanica gušterače.
2. T-stanice (CD4+) prepoznaju antigene prezentirane na MHC II molekulama APC stanica. MHC II molekule nisu eksprimirane na beta stanicama *in vivo* (*activation-linked mechanism*). Dolazi do uništavanja beta stanica pomoću citokina i topljivih medijatora T-stanica i aktivacijom citocidnih funkcija makrofaga.

Pojava autoreaktivnih antitijela prvi je uočljivi dijagnostički relevantan znak autoimunosti u nastajanju. Postoji nekoliko vrste antitijela koja povezujemo s razvojem dijabetesa tipa 1 poput ICA (*islet cell antibodies*), IAA (*insulin autoantibodies*), te GADA (autoantitijela na izoformu dekarboksilaze glutaminske kiseline) (13). Da je destrukcija beta stanica gušterače posredovana staničnim imunološkim procesima, potvrđuje progresija bolesti koja je odgođena primjenom immunosupresivnih lijekova koji specifično ciljaju T-stanice te cirkulirajuće autoreaktivne T-stanice koje se mogu detektirati kod pacijenata s kliničkom reprezentacijom dijabetesa tipa 1. Sve većim razumijevanjem bolesti postaje jasno da T1D ne predstavlja samo autoimuno razaranje beta stanica od strane reaktivnih T-stanica, već dolazi do kompleksnih preklapanja između genetskih faktora, okolišnih čimbenika, mikrobioma i metabolizma koji variraju od pojedinca do pojedinca (2).

## **1.5 Faze razvoja T1D**

Klinički razlikujemo 4 faze T1D od kojih su 3 pre-simptomatske – predfaza 1, faza 1, faza 2, dok je faza 3 simptomatska. U predfazi 1 postoji genetska

podložnost bolesti, ali još ne postoje indikacije autoimunosti. Razvoj preventivne terapije u ovoj fazi bio bi ključan budući da se repertoar T-stanica nije proširio a stupanj rizika od dobivanja T1D još uvijek je vrlo nizak. Imunoterapija bi u ovoj fazi trebala biti izuzetno sigurna i učinkovita u odgađanju kliničke dijagnoze. U fazi 1, pacijenti zadržavaju normalne razine glukoze u krvi, ali počinju pokazivati znakove autoimunosti prisustvom antitijela u krvi. Rizik od nastanka bolesti već tada je 100% , a T-stanice već su uvelike aktivirane. Nadalje, u fazi 2 beta stanice već su velikim djelom uništene što se očituje u nespecifičnim razinama glukoze u krvi, odnosno disglukemijom. Kada pacijent postane simptomatičan dostigne se faza 3. Autoreaktivni repertoar T stanica je potpuno aktivan, a 90% funkcionalne stanične mase beta stanica je uništeno. Imunoterapije u ovoj fazi nisu dovoljne za ponovno uspostavljanje normoglikemije, te progresija bolesti ovisi isključivo o administraciji inzulina.

## **1.6. Prevencija T1D**

Trenutno ne postoji odgovarajući način kliničke prevencije T1D. Nastanak bolesti heterogen je i kompleksan te se ne može pripisati jednom faktoru. Postoji nekoliko ključnih meta u prevenciji T1D. Stavlja se važnost na prevenciju u ranoj fazi bolesti kako bi se minimaliziralo oštećenje stanica gušterače. Primarna prevencija bolesti očitovala bi se u manipulaciji okolišnih faktora koji djeluju kao okidači razvoju autoimunosti u osoba genetički predisponiranih za potencijalni razvoj bolesti. Jedan od poznatih faktora koji pozitivno utječe na prevenciju je vitamin D koji ima inhibitornu ulogu u proliferaciji T-stanica i funkciji dendritičkih stanica. Sekundarna prevencija bazirala bi se na regulaciji autoimune kaskade razaranja beta stanica kod već započetog kroničnog oblika bolesti. U prošlom desetljeću, razvili su se različiti imunoterapijski pristupi liječenju i prevenciji T1D. Imunoterapije uglavnom ciljaju autoreaktivne T-stanice i njihove imunološke

mehanizme blokiranjem kostimulacije, smanjenjem broja CD8+ reaktivnih T-stanica ili blokiranjem učinka proupalnih citokina kao što su TNF $\alpha$ , ili IL-1. Manji broj eksperimentalnih terapija fokusirao se na klonalnu ekspanziju Treg stanica. Monoklonalno antitijelo protiv CD20 proteina koje se koristi u liječenju nekoliko autoimunih bolesti i raka, također je pokazao utjecaj na smanjenu prezentaciju antigena i proizvodnju autoantitijela inducirajući smanjenje B limfocita ili djelovanjem na makrofage, dendritičke stanice i NK stanice. Ipak, do sada dovršene studije bile su neuspješne u značajnom očuvanju mase beta stanica (3).

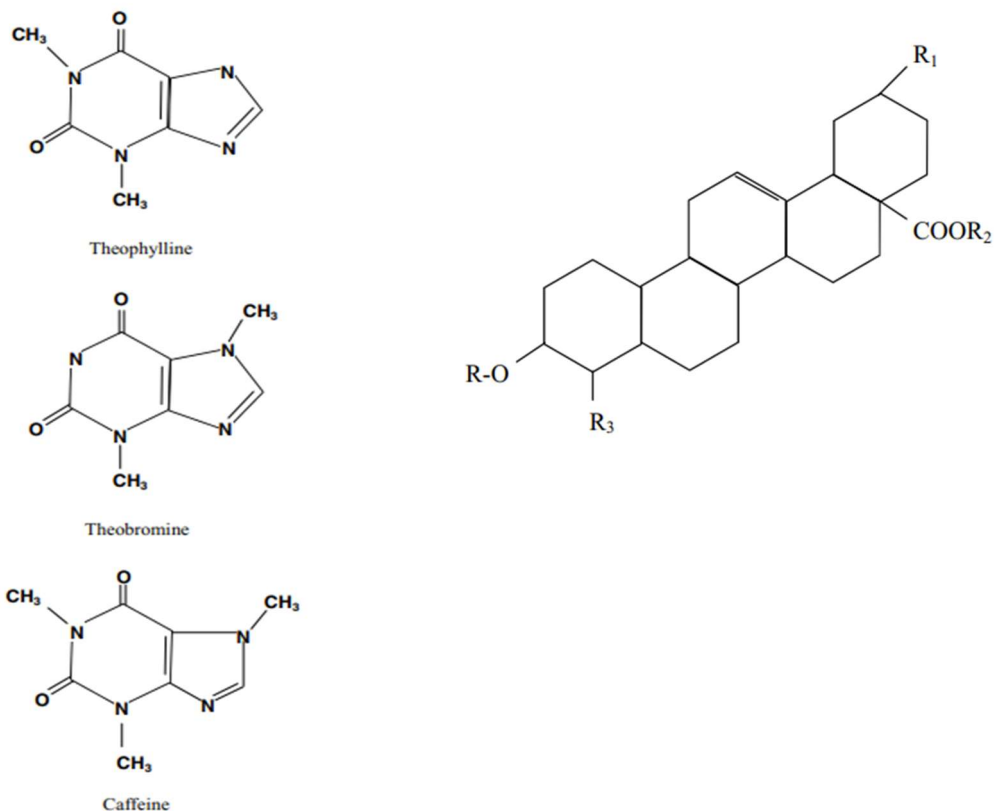
## **1.7 Mišji modeli T1D**

U istraživanju imunopatogeneze T1D koriste se životinjski modeli poput T1D induciranog višestrukim niskim dozama streptozotocina (VND-STZ) u C57BL/6 miševa i model spontano razvijajućeg T1D u (non-obese diabetic (NOD)) miševa. Streptozotocin (STZ) alkilirajući je neoplastični agens, ekstremno otrovan po beta stanice gušterače sisavaca. Kada se administrira u niskim dozama, STZ djeluje toksično na prijenosnik glukoze (GLUT)2 beta stanica te posljedično dolazi do infiltracije imunoloških stanica i lokalne upalne reakcije (15). Ukoliko se miševima da premala doza STZ, doći će do razvoja tranzijentne hiperglikemije od koje se životinje brzo oporave. U slučaju prevelike doze miševi ne razvijaju bolest postepeno već u istom danu, što je znak toksičnog ubijanja beta stanica, a ne željene inducirane autoimunosti. Uz VND-STZ model T1D koriste se i NOD ženke miševa kod kojih dolazi do spontanog razvoja bolesti, a sukladno ljudskom T1D, bolest je posredovana aktivacijom limfocita T te je karakterizirana neravnotežom citokina i inzulitisom, kao i cirkulirajućim protutijelima na vlastite antigene. Iz tih razloga ovaj je model najbliži ljudskom T1D.

Problem kod ovog modela je vrijeme od oko 6 mjeseci do godine dana koliko je potrebno da miševi postaju dijabetični (16).

## 1.8 Yerba Mate

Biljni pripravci već se odavno u svijetu koriste u tradicionalnoj medicini zbog svojih imunomodulativnih i imunosupresivnih svojstava. YM je južnoamerički napitak dobiven iz biljke *Ilex paraguariensis* sušenjem i mljevenjem listova za pripremu herbalnog pripravka. Ekstrakti biljke sadrže purinske alkaloidne (metilksantine) stimulanse centralnog živčanog sustava, vitamine A, B, C i E, saponine i polifenole. Saponini su iznimno važni zbog svojih protuupalnih svojstava, dok su polifenoli značajni antioksidativni agensi (17). U posljednjih 15 godina, uvelike su se istraživala svojstva ove biljke, a rezultati su pokazali učinke poput antioksidativnih i antiupalnih, hipoglikemijskih, vazodilatacije, smanjenja razine lipida, antimutagenoze, i učinka na smanjenje težine. Vezujući se na problem upale i hiperglikemije kod T1D, farmakološka svojstva ove biljke mogla bi pomoći u kontroli same bolesti (18). Naime, u studiji iz 2011. godine (19), pokazano je poboljšanje u bazalnim razinama glukoze u krvi i u odgovoru na primjenu inzulina u životinja tretiranih YM. Molekularna analiza inzulinske signalizacije otkrila je obnovu jetrenog i mišićnog inzulinskog supstratnog receptora (IRS)-1 te smanjenje ekspresije faktora nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ) i IL-6 gena na početnu vrijednost. Postoje i dodatna saznanja o tome da YM inhibira aktivaciju limfocita *in vitro*. Uočeno je da YM reducira aktivaciju T-stanica ovisno o dozi administriranog YM. Ovaj učinak također je primijećen u subpopulaciji T-stanica (20).



Slika 1. Metilksantini (a) i generička struktura saponina (b) u biljci *Ilex paraguariensis*. Preuzeto 06.07.2022. iz (21)

## 2. Cilj rada

Prekomjerna smrtnost povezana s komplikacijama T1D i sve veća učestalost dječjeg dijabetesa tipa 1 ističu važnost terapijskih strategija za prevenciju ovog kroničnog poremećaja. Istraživanja se najvećim djelom bave imunomodulacijom reaktivnih T limfocita u svrhu smanjenja autodestrukcije stanica gušterače. Tradicionalni biljni pripravci s protuupalnim svojstvima pokazali su potencijal u supresiji T-stanica. YM sadrži veliki broj antioksidansa te ima izražena protuupalna i hipoglikemijska svojstva zbog čega će se i ispitivati u ovom istraživanju. Glavni cilj istraživanja je odrediti učinak YM na razvoj T1D analizom incidencije na modelu C57BL-6 miševa tretiranih VND-STZ. S obzirom na prethodno opisana svojstva, očekuje se da

će YM smanjiti incidenciju, i simptome (hiperglikemiju) T1D kroz smanjenje potencijala za autoreaktivnost limfocita T.

### **3. Materijali i metode**

#### **3.1 Miševi**

C57BL/6J (C57BL/6) i NOD/LtJ (NOD) sojevi miševa kupljeni su od Jackson laboratorija (Bar Harbor, ME, SAD) te su uzgajani u vivarijumu St. Cloud State University (SCSU). Pilot studija za određivanje optimalne dnevne doze YM u miševa odobrena je od strane odbora Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) prije početka projekta (protokol "*Pilot Experiment for Determining Fluid Intake in Mice Orally Exposed to Yerba Mate*", broj 5-125). Ostale procedure na miševima odobrene su od strane SCSU IACUC (protokol "*Effects of Yerba Mate on the development and severity of Type 1 Diabetes in NOD and streptozotocin-induced mouse models*", broj 5-127). Korišteni su „BPA-free NexGen Lo-Profile“ kavezi bez bisfenola A (BPA), a miševima je dopušten slobodan pristup vodi i hrani bez fitoestrogena baziranog na kazeinu (AIN-93G *Rodent Diets, Research Diet, Inc., Harlan research laboratories*). Miševi su bili razdvojeni po kavezima ovisno o spolu, te su bili izloženi 12-satnom ciklusu svjetla i mraka. C57BL/6 miševi, mužjaci, te NOD ženke, su za istraživanje uzimani sa sedam do devet tjedana života. Tretman YM u NOD miševa započet je u dobi koja je komparativna vremenska točka pre-dijabetesa tipa 1, tj. kada su miševi još uvijek pre-dijabetični i normoglikemični (22). C57BL/6 miševi tretirani su YM tjedan prije STZ injekcija kako bi tretman započeo prije induciranja autoimunog procesa, odnosno u svrhu simulacije pre-dijabetes stanja. Miševe se pratilo kroz cijeli istraživački period u svrhu osiguranja odsustva zdravstvenih problema ili bolesti koji bi mogli utjecati na eksperiment. U vrijeme kada su dostignute

krajnje točke eksperimenta, i/ili nakon otkrivanja zdravstvenih problema, miševi su eutanazirani izlaganjem CO<sub>2</sub>.

### **3.1.1 VND-STZ-C57BL/6 eksperimentalni mišji model**

C57BL/6 miševi razdvojeni su u 3 skupine i tretirani su ili *ad libitum*<sup>1</sup> vodom, 2% YM w/v ili 4% YM w/v. Tretman YM započet je u osmom do devetom tjednu života 7 dana prije STZ injekcija u svrhu simulacije tretmana prije poticaja okolišnih čimbenika razvoja bolesti. Niske doze STZ administrirane su tijekom 5 dana (od nultog do četvrtog dana), a 7 dana nakon prve injekcije STZ počela se mjeriti dva puta tjedno tjelesna težina i glukoza u krvi sve do 35. dana nakon primitka prve injekcije STZ-a. Miševi su se eutanazirali 35-tog dana koji se uzima kao krajnja točka eksperimenta.

### **3.1.2 NOD mišji model**

Na ovom je modelu provedeno samo pilot istraživanje. NOD ženke miša razdvojene su u dvije skupine koje su tretirane ili vodom *ad libitum* ili 4% YM w/v. Grupe su praćene od 7-9 do 24. tjedna života (60-90% ženki NOD miševa u ovom razdoblju ispoljavaju hiperglikemiju) kako bi se istraživala incidencija i prevalencija T1D, razine glikemije i tjelesna težina.

## **3.2 YM priprema i tretman**

YM pripravak porijeklom iz Urugvaja kupljen je preko Amazon stranice (*Canarias Yerba Mate Sabor Tradicional*, Brazil). Infuzije YM od 2% i 4% w/v (4g YM na 100 mL autoklavirane DI vode) pripremane su dnevno i davane su tretiranim skupinama *ad libitum*. Pilot eksperiment (SCSU IACUC protokol broj 5-125) proveden je prema protokolima koje je postavilo Sveučilište u

---

<sup>1</sup> Slobodno, po želji

Bostonu kako bi se odredila optimalna koncentracija pri kojoj miševi ostaju zdravi i ne gube težinu (Sveučilište u Bostonu, 2018.). Podaci pilot eksperimenta pokazali su da je 4% YM w/v infuzija najviša koncentracija koja se može sigurno oralno primijeniti u miševa. Dok su neke studije primjenjivale YM putem sonde, YM je primjenjivan *ad libitum* oralno kako bi se smanjio stres kod životinja i simuliralo korištenje kao u ljudi. Dnevne infuzije pripremane su prema publiciranom protokolu (23). Ukratko, autoklavirana deionizirana (DI) voda zagrijana je na 80°C. Odgovarajuća količina YM je dodana i potpuno potopljena u DI kroz 15 minuta. Otopina je filtrirana sterilnim filterima za kavu, ohlađena na sobnu temperaturu i dana miševima u autoklavirane staklene boce bez BPA s gumenim cjevčicama za piće.

### **3.3 Indukcija VND-STZ u C57BL/6 miševa**

STZ je administriran intraperitonealno kroz 5 uzastopnih dana u niskoj dozi od 40 mg/kg u kontrolne i miševe tretirane YM. STZ je pripreman na dnevnoj bazi prije svake injekcije. Otapao se u 0,05M puferu natrijeva citrata (147,1 mg natrijeva citrata u 10mL hladne DI vode). pH pufera podešen je na 4,5 dodavanjem 1M HCl ili 1M NaOH i otopina je vorteksirana. Injektiran je volumen od 6,52  $\mu$ L/g tjelesne težine kako bi se dala adekvatna količina otopine u intraperitonealnu šupljinu miša (24). STZ je administriran u vremenu od 15 min nakon pripreme kako bi se izbjegla denaturacija pripravka.

### **3.4 Glikemijska mjerenja**

Početna glikemija i tjelesna težina C57BL/6 miševa mjerene su prije injekcija STZ te su ponavljana dvaput tjedno kroz 5 tjedana, do kraja istraživanja. Kod NOD miševa, mjerenja glukoze započeta su u 12 tjednu života što je



očekivana početna točka pojave disglukemije. Mjerenja su nastavljena do 24. tjedna života. Mjerenja glukoze određivana su Accu-Chek Aviva trakama i glukometrom (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, SAD). Miševi su držani u 50mL Falcon epruvetama s probušenim rupama na čepu i na stranama. Repovi miševa stavljeni su u toplu vodu radi induciranja vazodilatacije lateralne vene. Kap krvi iz repa, otprilike 0.6  $\mu$ L, stavljena je na traku glukometra. Miševi su smatrani dijabetičnima kada u dva uzastopna mjerenja imaju razinu glukoze u krvi od 250 mg/dL ili više. Prvo takvo mjerenje uzimalo se kao početak dijabetesa (25).

### **3.5 Priprema suspenzije stanica iz slezene**

Miševi su eutanazirani izlaganjem CO<sub>2</sub> u krajnjim točkama eksperimenta, a slezene su aseptično izolirane. Suspenzije stanica pripremljene su gnječenjem pojedinačnih slezena klipom iz štrcaljke od 10 mL i propuštanjem kroz najlonsko cjedilo od 70 mm (BD Falcon, SAD). Cjedilo je isprano s 5mL PBS-a. Suspenzije su centrifugirane na 1200 okretaja u minuti tijekom 5 minuta. Supernatant je dekantiran, a stanični talog resuspendiran u 750  $\mu$ L ACK pufera za lizu stanica (NH<sub>4</sub>Cl 8,29 g/L, KHCO<sub>3</sub> 1,0 g/L, EDTA Na<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O 0,0375 g/L; 18 Lonza Bio Whittaker, Walkersville, MD, SAD) kroz 1 minutu za potpunu hemolizu. Dodatnih 5 mL PBS-a je dodano da se zaustavi djelovanje pufera za lizu, a suspenzije su centrifugirane. Odrađena su tri dodatna ispiranja s 5 mL PBS-a i potom centrifugiranje, da se uklone ostaci stanica i ispere ACK pufer. Brojanje i vijabilnost stanica mjereni su metodom isključenja tripanskim plavilom (Lonza Bio Whittaker Walkersville, MD, SAD). Izolirani splenociti<sup>2</sup> pripremljeni su u razrijeđenju 1:20 s

---

<sup>2</sup> Stanice slezene

tripanskim plavilom i stavljeni su u hemocitometar; napunjeni hemocitometar stavljen je pod objektiv mikroskopa s povećanjem od 10x da se odrede žive i mrtve stanice brojanjem svih stanica u dva suprotna kvadranta. Mrtve stanice pod mikroskopom su plave a žive stanice žute.

### **3.6 Proliferacijski eseji T-stanica**

Proliferacijski eseji napravljeni su za ispitivanje *ex vivo* učinaka YM pripravka na funkciju T-stanica. Suspenzije stanica, dobivene iz slezene miševa nakon *in vivo* tretmana s YM ili vodom, razrijeđene su u mediju za uzgoj [RPMI-1640 s 1U penicilina/mL i 100 ug streptomocina/mL i 10% fetalnog goveđeg seruma (Sigma, St. Louis, MO, SAD)]. Splenociti su stavljeni na pločicu s 96 jažica u koncentraciji od  $4 \times 10^5$  u ukupnom volumenu od 100  $\mu$ L. U odabrane jažice dodan je mitogen T-stanica Concanavalin A [(Con A) Sigma, St. Louis, MO, SAD] u volumenu od 3  $\mu$ g/mL. U preostale, nestimulirane jažice dodan je medij za uzgoj. Pločice su inkubirane 72 sata na 37°C s 5% CO<sub>2</sub>. ConA posebno stimulira proliferaciju T-stanica. Na kraju kultivacijskog perioda, Alamar blue test je korišten za kvantificiranje proliferacije T-stanica (Invitrogen, Grand Island, NY, SAD). To je kolorimetrijski test kojim se detektiraju metabolički aktivne stanice. Aktivni sastojak, resazurin (7-hidroksi-10-oksidoftenoksazin-10-ium-3-on) reducira se u fluorescentni ružičasti resorufin u živim stanicama. U jažice je dodano 10  $\mu$ L Alamar blue boje. Ploča je inkubirana dodatnih 5-6 sati pod prethodno opisanim uvjetima te izmjerene optičke gustoće (OD) ELISA čitačem ploča (570 nm, GeneMate). Alamar blue mijenja boju medija koji okružuje T-stanice i omogućuje da se odrede promjene u razlikama OD bazirano na proliferativnom kapacitetu stanica.

### **3.7 Karakterizacija populacija imunoloških stanica (imunofenotipizacija)**

Metoda protočne citometrije korištena je kako bi se odredio sastav imunoloških stanica (T-stanice i odgovarajući podtipovi, B-stanice i makrofagi) nakon tretmana YM. Izolirani splenociti iz suspenzija stanica korišteni su u koncentraciji od  $1 \times 10^6$  i prebačeni su u epruvete za protočnu citometriju (BD Biosciences, USA) uz dodatak 1 mL FACS pufera (PBS, 1% FBS, 0,1%  $\text{NaN}_3$ ). Splenociti su centrifugirani 5 minuta na 1200 okretaja u minuti na  $4^\circ\text{C}$ , pri čemu je supernatant odbačen. Da bi se odredila populacija imunoloških stanica, splenociti su tretirani antitijelima konjugiranim s fluorokromom koja se vežu na specifične CD markere. Antitijela su pripremljena s FACS puferom u omjeru 1:100, a splenociti su inkubirani uz dodatak antitijela 30-45 minuta na  $4^\circ\text{C}$  zaštićeno od svjetlosti. CD markeri koji klasificiraju imunološke stanice su redom CD3 (sve T-stanice), CD4 (pomagačke T-stanice), CD8 (citotoksične T-stanice), CD4/CD25 (Treg), CD45R/B220 (B-stanice) i CD11b (makrofagi). Antitijela su konjugirana sa sljedećim fluorokromima: fluorescein izotiocijanat (FITC), fikoeritrin (PE), peridinin klorofil (PerCP) i alofikocijanin (APC). Za protočnu citometriju korištena su sljedeća antitijela konjugirana s fluorokromom: anti-CD4 PerCP (klon RM4-5), anti-CD8 FITC (klon 53-6.7), anti-CD25 APC (klon 3C7), anti-B220 APC (klon RA3 -6B2), anti-CD 11b PerCP (klon M1/70) i anti-CD3 PE (klon 145-2C11) (BD Biosciences). Nakon inkubacije, stanice su isprane tri puta s FACS puferom; dodatnih 300  $\mu\text{L}$  FACS pufera dodano je uzorcima prije prikupljanja stanica protočnim citometrom Accuri C6 Plus (BD Biosciences). Analiza je odrađena pomoću softvera Accuri C6 Plus (BD Biosciences).

### **3.8 Analiza citokina**

Izolirani splenociti uzgajani su na pločici s 24 jažice u koncentraciji od  $4 \times 10^6$ /ml. Odabrane jažice dobile su Con A te medij za uzgoj (opisan u poglavlju 3.6), za ukupni volumen od 1 mL. Pločice su inkubirane 48 sati pod prethodno opisanim uvjetima. Nakon što je period inkubacije završen, pločica je okretana u centrifugi 10 minuta pri 1200 okretaja u minuti na  $4^\circ\text{C}$ . Supernatant je sakupljen u alikvote od 250  $\mu\text{L}$  i pohranjen na  $-80^\circ\text{C}$ . Kvantifikacija citokina učinjena je pomoću CBA Mouse Th1/Th2/Th17 kita za citokine (BD Biosciences, SAD), slijedeći uputstva proizvođača. Citokini od interesa uključivali su IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN $\gamma$  i TNF $\alpha$ . Liofilizirani mišji standardi su rabljeni za određivanje „standard curve“ citokina; tretirani su s 2,0 mL otapala za esej, nakon čega je uslijedilo serijsko razrjeđivanje u omjeru od 1:2 do konačnog razrjeđenja od 1:256. Otopina za hvatanje zrnaca pripremljena je dodatkom 10  $\mu\text{L}$  svakog citokina. 50  $\mu\text{L}$  ove otopine dodano je u svaku epruvetu za razrjeđivanje, uz dodatak 50  $\mu\text{L}$  staničnog supernatanta. Na kraju je dodano 50  $\mu\text{L}$  fluorokroma, PE te su uzorci inkubirani 2 sata na sobnoj temperaturi, zaštićeni od svjetlosti. Prikupljanje rezultata je odrađeno protočnim citometrom Accuri C6 Plus (BD Biosciences), a uzorci su analizirani korištenjem FCAP *array* softvera (Softflow, New Brighton, MN, SAD).

### **3.9 Procjena proliferacije T-stanica i razine proizvedenih citokina *in vitro***

Jednostanične suspenzije napravljene su od slezena 8 tjedana starih C57BL/6 muških miševa kako bi se odredila izravna interakcija YM s limfocitima T. Stanice su zatim nasađene u koncentraciji  $4 \times 10^5$  u 100  $\mu\text{L}$  za proliferaciju T stanica u tri primjerka. Stanice stimulirane 0,3% ConA i one

nestimulirane tretirane su sa YM u koncentracijama od 0 do 1000 µg/mL. Dodatno, stanice su nasađene na isti prethodno napisani način,  $4 \times 10^6$  u 1000 µL dodatak ConA i istih koncentracije YM za određivanje citokina. Ploče su inkubirane te su analize proliferacije i citokina odrađene kako je prethodno opisano (poglavlje 3.7 i 3.8).

### **3.10 Statistička analiza**

Svi podaci izraženi su kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM. Rezultati *in vivo* analizirani su pomoću statističkog softvera Statistica (StatSoft Europe). Mjerenja glikemije i tjelesne težine analizirana su pomoću jednosmjerne ANOVA-e s ponovljenim mjerenjima, dok su rezultati učestalosti dijabetesa analizirani pomoću statističke metode preživljavanja. Broj stanica, vijabilnost stanica, imunofenotipovi, proliferacija T-stanica i kvantifikacija citokina analizirani su dvostranim, neuparenim student T-testom koristeći Microsoft Excela. Za sve testove korištena je p razina  $<0,05$  pri određivanju statistički značajnih razlika između skupina.

## **4. Rezultati**

### **4.1 Određivanje optimalne doze YM za oralnu *ad libitum* primjenu**

Pilot eksperiment odrađen je prema smjernicama za aditive u pitkoj vodi Sveučilišta u Bostonu kako bi se odredila najveća doza YM koju bi miševi mogli tolerirati-(Sveučilište u Bostonu, 2018.). Izvorno je odabrana koncentracija YM od 7% w/v jer je to bila najviša koncentracija opisana u literaturi za *in vivo* studije na glodavcima (26). Utvrđeno je da je oralna

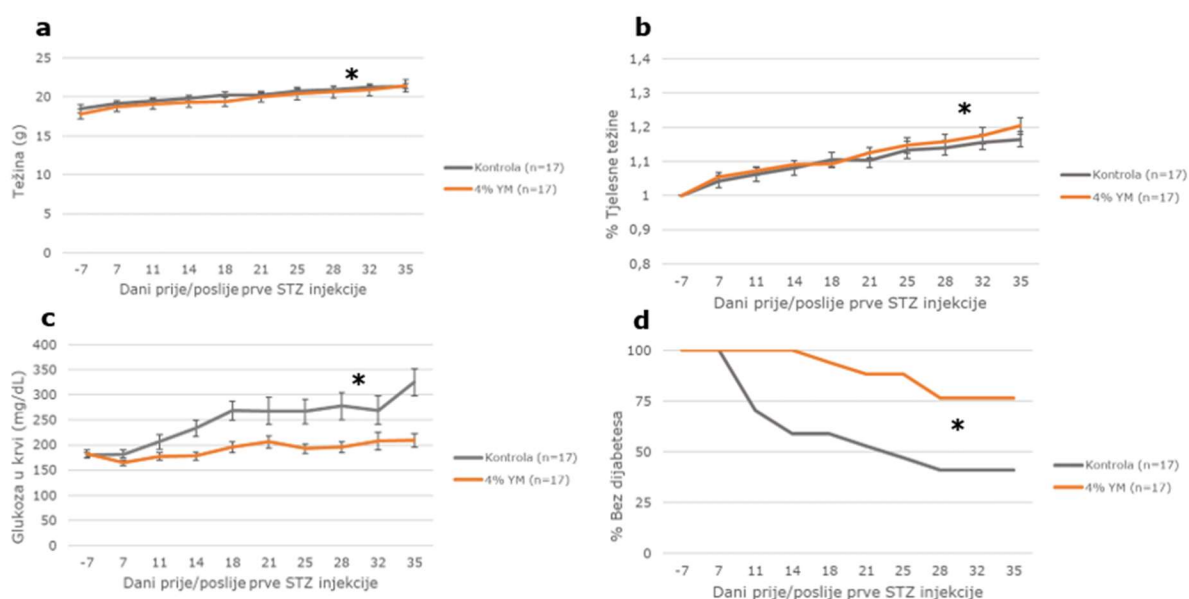
konzumacija 7% i 5% YM w/v smanjila tjelesnu težinu u VND-STZ-C57BL/6 i NOD miševa ispod odgovarajućeg praga od 90%. Međutim, s 4% YM w/v, unos tekućine oba soja je održan. Tjelesne težine neznatno su se smanjile, odnosno nisu pale ispod 10% početne težine (rezultati pilot pokusa nisu prikazani). Iz ovih podataka, 4% w/v YM je odabrana kao optimalna najveća doza pripravka za sve daljnje pokuse. Sva slijedeća spominjanja koncentracije YM kroz rad odnose se na težinu po volumenu, osim ako nije drukčije navedeno.

## **4.2 In vivo i ex vivo djelovanje 4% YM u VND-STZ-C57BL/6 modelu T1D**

### **4.2.1 Tjelesna težina, glikemija i incidencija dijabetesa u VND-STZ-C57BL/6 miševa tretiranih sa 4%YM kroz period od 6 tjedana**

Nakon što se utvrdila odgovarajuća doza YM, miševi su tretirani 4% YM kroz tjedan dana, prije primitka višestrukih niskih doza STZ kroz 5 dana (dan 0-4). Nadalje, tjelesne težine i glukoza u krvi mjerene su dvaput tjedno. Miševi tretirani 4% YM i kontrolni miševi postepeno su dobivali na težini (Slika 2.a). Prosječne mase miševa tretiranih s YM bile su inicijalno manje zbog nasumičnog grupiranja miševa niže tjelesne težine kontrolnoj grupi. Kod analize postotka promjene tjelesne težine, miševi tretirani YM statistički značajno su dobili na težini od kontrolnih skupina ( $p < 0,001$ ) (Slika 2.b). Nadalje, početna mjerenja glukoze na dan -7 pokazala su slične vrijednosti između dviju kontrolnih skupina -  $179 \pm 5,3$  mg/dl za kontrolu i  $183 \pm 7,7$  mg/dl (*srednja vrijednost  $\pm$  SEM*) za YM. Nakon injekcija STZ razine glukoze postaju značajno različite. Vrijednosti glukoze kontrolne skupine 18. su dan dostigle razine hiperglikemije ( $\geq 250$  mg/dl) te su nastavljale rasti sve do 35. dana (Slika 2.c). Kod skupine tretirane YM, glukoza u krvi rasla je do 21. dana gdje je prosječna vrijednost iznosila 206 mg/dl te se do kraja

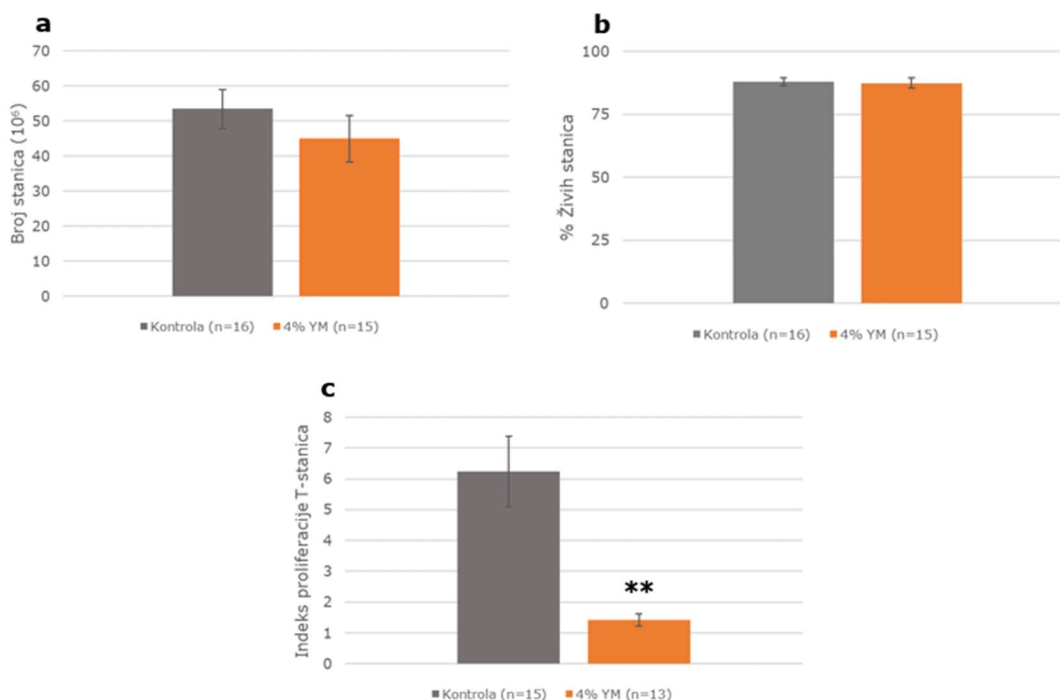
eksperimenta nije značajno promijenila. Miševi tretirani YM imali su značajno manju incidenciju T1D u usporedbi s kontrolnom grupom ( $p < 0,05$ ) (Slika 2.d). Kod kontrolne skupine, 50% miševa je postalo dijabetično 18.dan istraživanja. Skupina tretirana YM nije dostigla prag od 50% oboljelih tijekom trajanja istraživanja te je 76% miševa ostalo zdravo kroz cijeli period eksperimenta (4 od 17 miševa razvilo je bolest). Kod kontrolne skupine taj je broj iznosio 41% (10 od 17 miševa razvilo je bolest).



Slika 2. Tjelesna težina (a), % tjelesne težine (b), glukoza u krvi (c) i incidencija T1D (d) u VND-STZ-C57BL/6 miševa tretiranih s 4% YM kroz period od 6 tjedana. Miševi su tretirani s 4% YM od -7 dana do 35 dana nakon prve injekcije STZ-om. Početne tjelesne težine i glukoza u krvi mjerene su na dan -7 i dvaput tjedno počevši od dana 7 nakon prve injekcije STZ-om. Incidencija T1D prikazana je kao postotak miševa koji nisu razvili dijabetes. Početak bolesti definiran je dvama uzastopnim očitavanjima glukoze  $\geq 250$  mg/dl, od kojih se prvo mjerenje uzima kao početak bolesti. Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  u usporedbi s kontrolnom grupom (MANOVA: a-c, Metoda preživljavanja: d).

#### 4.2.2 Ex vivo djelovanje 4% YM na imunološke parametre u VND-STZ-C57BL/6 miševa u krajnjoj točki eksperimenta

Stanice dobivene iz suspenzije stanica slezene brojale su se 35 dana (Slika 3.a) nakon prve injekcije STZ-om, te je analizirana njihova vijabilnost (Slika 3.b). Kod oba parametra nije bilo statistički značajne razlike između kontrolne i tretirane skupine. Kod mjerenja indeksa proliferacije T-stanica, skupina tretirana YM pokazala je značajnu supresiju u usporedbi s kontrolom. Vrijednost indeksa proliferacije iznosila  $1,4 \pm 0,7$  (*srednja vrijednost*  $\pm$  *SD*). Kod kontrolne skupine indeks proliferacije je iznosio  $6,2 \pm 4,4$  ( $p < 0,001$  u usporedbi sa YM grupom) (Slika 3.c).

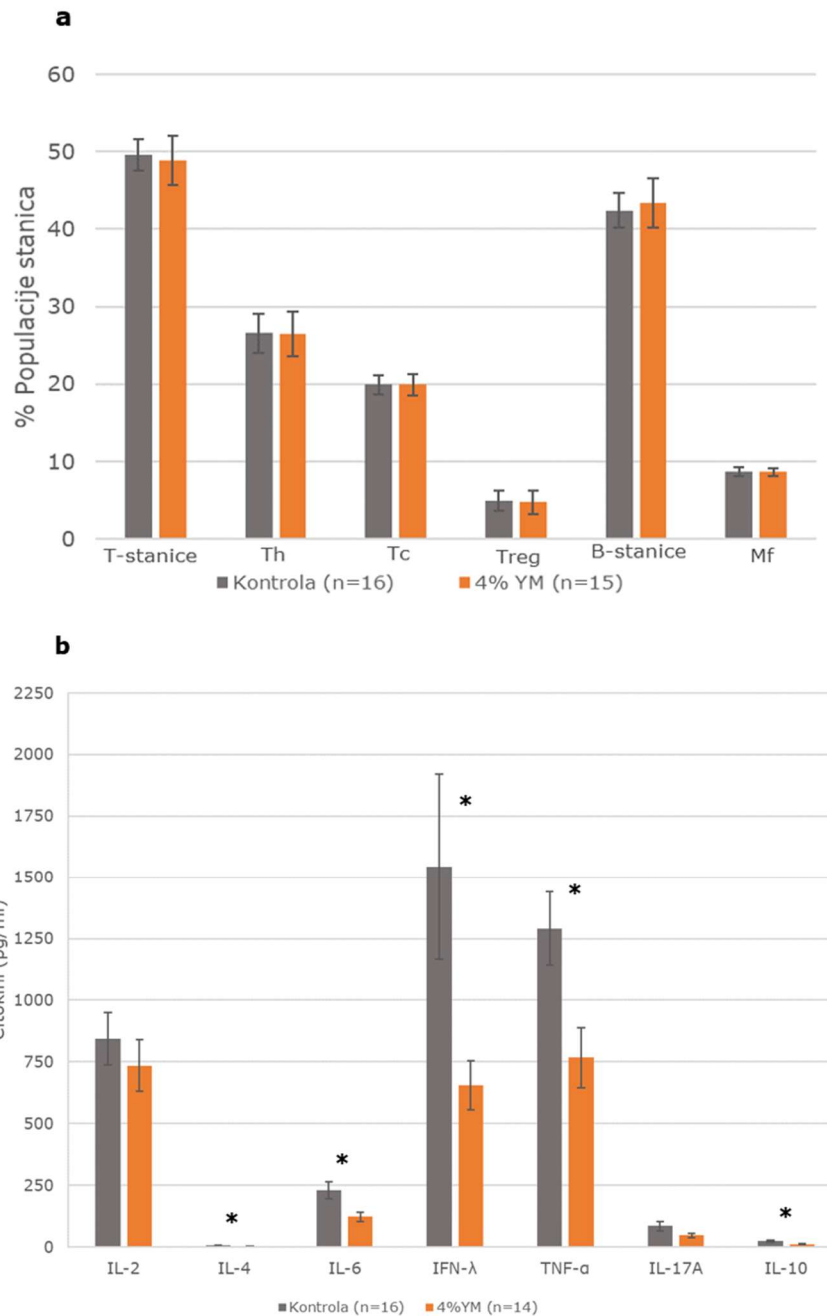


Slika 3. Broj stanica (a), vijabilnost stanica (b) i indeks proliferacije T-stanica (c) dobivenih iz slezene VND-STZ-C57BL/6 miševa tretiranih s 4% YM. Miševi su tretirani 4% YM od -7. do 35. dana nakon prve injekcije STZ-om. Uklonjene su im slezene i napravljene su suspenzije stanica slezene. Broj stanica slezene (a) i njihova vijabilnost (b) određeni su pomoću hemocitometra, testom isključenja tripanskim modrilom. Proliferacija T-stanica inducirana je dodatkom ConA kroz period inkubacije od 72h. Dodan je AlamarBlue reagens i određene su optičke gustoće. Indeks proliferacije dobiven je



dijeljenjem optičkih gustoća T-stanica stimuliranih ConA s optičkim gustoćama nestimuliranih T-stanica (d). Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti  $\pm$  SEM, \*\* $p < 0,001$  u usporedbi s kontrolama (student T-test).

Nadalje, imunofenotipovi stanica slezene između kontrolne i YM tretirane skupine nisu pokazali statistički značajnu razliku (Slika 4.a). S druge strane, svi citokini skupine tretirane YM bili su niži u usporedbi s kontrolnom. Rezultati su pokazali značajna smanjenja razine proupalnih [(IL-6 ( $p=0,014$ ), IFN- $\lambda$  ( $p=0,042$ ), TNF- $\alpha$  ( $p=0,012$ )] i protuupalnih [IL-4 ( $p=0,003$ ) i IL-10 ( $p=0,002$ )] citokina (Slika 4.b).

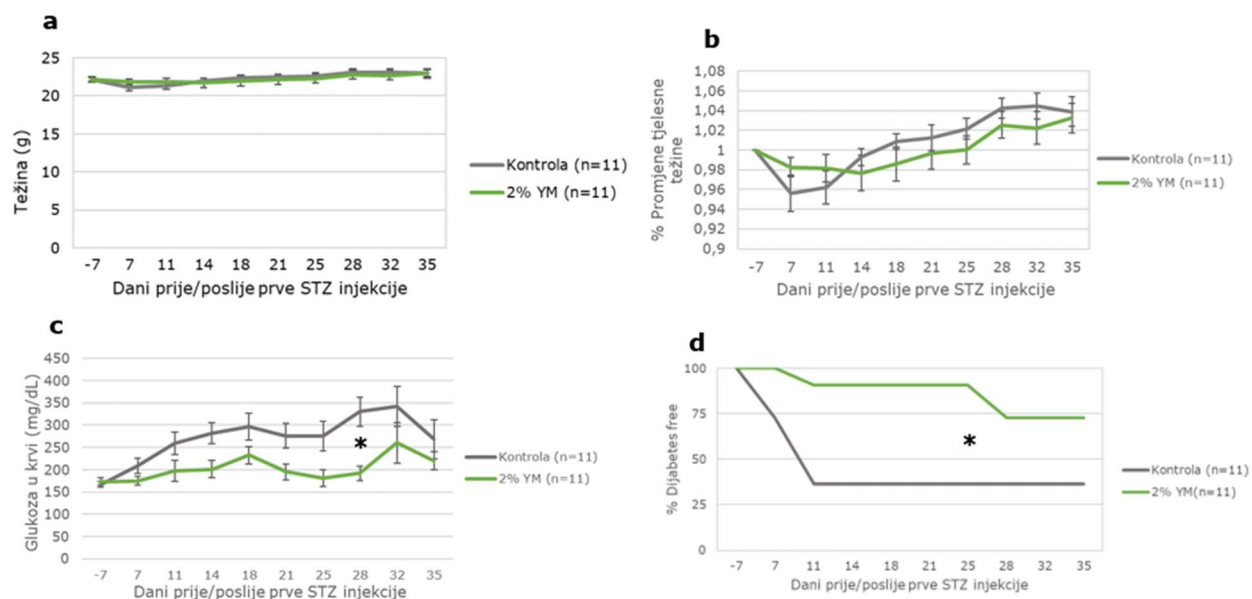


*Slika 4. Imunofenotipovi stanica (a) i koncentracije citokina (b) dobiveni iz slezene VND-STZ-C57BL/6 miševa tretiranih s 4% YM. Splenociti miševa tretirani su odgovarajućim monoklonalnim antitijelima konjugiranim fluorokromom te su analizirani protočnom citometrijom (a). CBA Mouse Th1/Th2/Th17 kit za citokine korišten je za određivanje koncentracije citokina protočnom citometrijom iz splenocita stimuliranih s ConA kroz period inkubacije od 48h. (b). Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti  $\pm$  SEM, \*  $p < 0.05$  u usporedbi s kontrolama (student T-test).*

### **4.3 *In vivo* i *ex vivo* djelovanje 2% YM u VND-STZ-C57BL/6 modelu T1D**

#### **4.3.1 Tjelesna težina, glikemija i incidencija dijabetesa u VND-STZ-C57BL/6 miševa tretiranih sa 2% YM kroz period od 6 tjedana**

STZ-C57BL/6 miševi tretirani su 2% YM te su isti parametri, koji su opisani ranije (tjelesna težina, glukoza i incidencija dijabetesa), praćeni do 35. dana nakon prve STZ injekcije. Tjelesna težina i postotak promjene tjelesne težine nisu se značajno razlikovali između skupine tretirane YM i kontrolne skupine (Slika 5.a i 5.b). Razine glukoze u krvi YM tretiranih miševa u krajnjoj točki eksperimenta bile su značajno niže ( $p=0,046$ ) te je prosječna razina glukoze iznosila  $219,9 \pm 49$  mg/dl (*srednja vrijednost  $\pm$  SD*). Kod kontrolne skupine prosječna vrijednost iznosila je  $268,5 \pm 145$  mg/dl (*srednja vrijednost  $\pm$  SD*) 35. dana (Slika 5.c). Što se incidencije T1D tiče, postoje značajne razlike između dviju skupina pri čemu dolazi do statistički značajnog smanjenja incidencije kod 2% YM tretiranih miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $p=0,046$ ) (Slika 5.d). U konačnici, 3 od 11 miševa (27%) skupine tretirane YM razvilo je dijabetes, dok je u kontrolnoj skupini 7 od ukupno 11 miševa razvilo bolest (64%), pri čemu je 64% kontrolnih miševa postalo dijabetično do 11. dana eksperimenta, za razliku od 9% 2% YM tretiranih miševa.

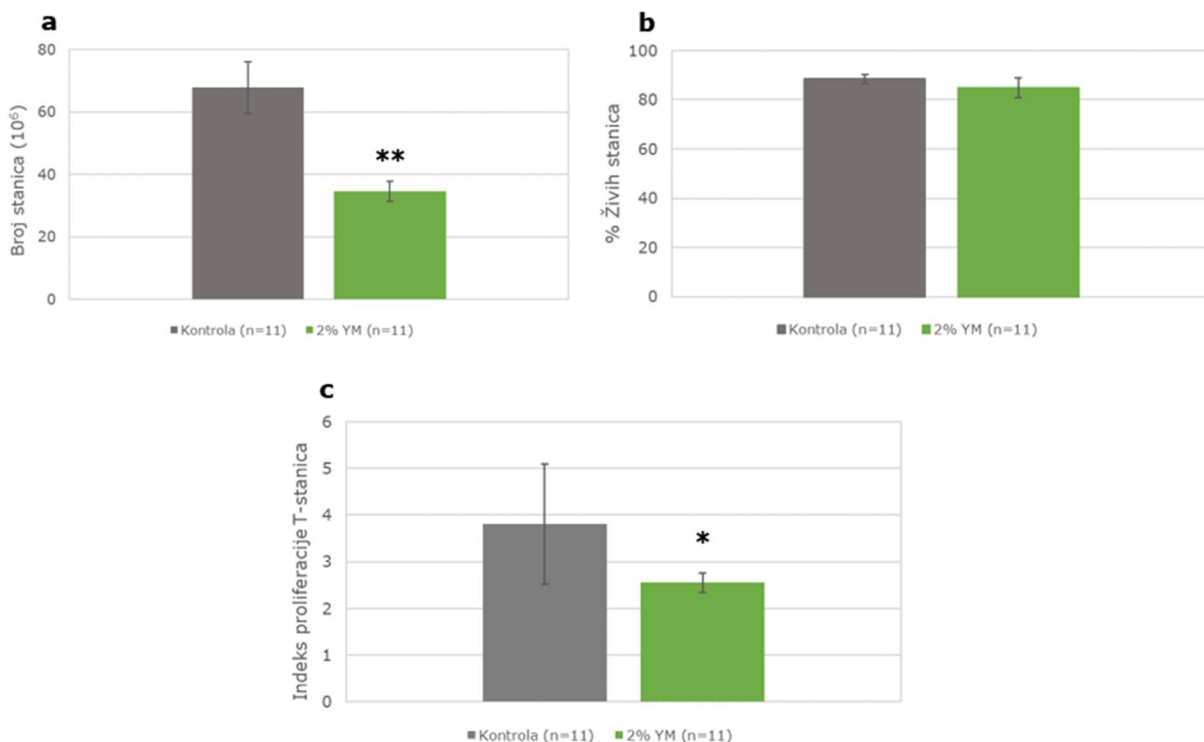


Slika 5. Tjelesna težina (a), % tjelesne težine (b), glukoza u krvi (c) i incidencija T1D (d) u VND-STZ-C57BL/6 miševa tretiranih s 2% YM kroz period od 6 tjedana. Miševi su tretirani s 2% YM od -7 dana do 35. dana nakon prve injekcije STZ-a. Početne tjelesne težine i glukoza u krvi mjerene su na dan -7 i dvaput tjedno počevši od dana 7 nakon prve injekcije STZ-a. Incidencija T1D prikazana je kao postotak miševa koji nisu razvili dijabetes. Početak bolesti definiran je dvama uzastopnim očitavanjima glukoze  $\geq 250$  mg/dl, od kojih se prvo mjerenje uzima kao početak bolesti. Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  u usporedbi s kontrolnom grupom (MANOVA: a-c, Metoda preživljavanja: d).

#### 4.3.2 Ex vivo djelovanje 2% YM na imunološke parametre u VND-STZ-C57BL/6 miševa u krajnjoj točki eksperimenta

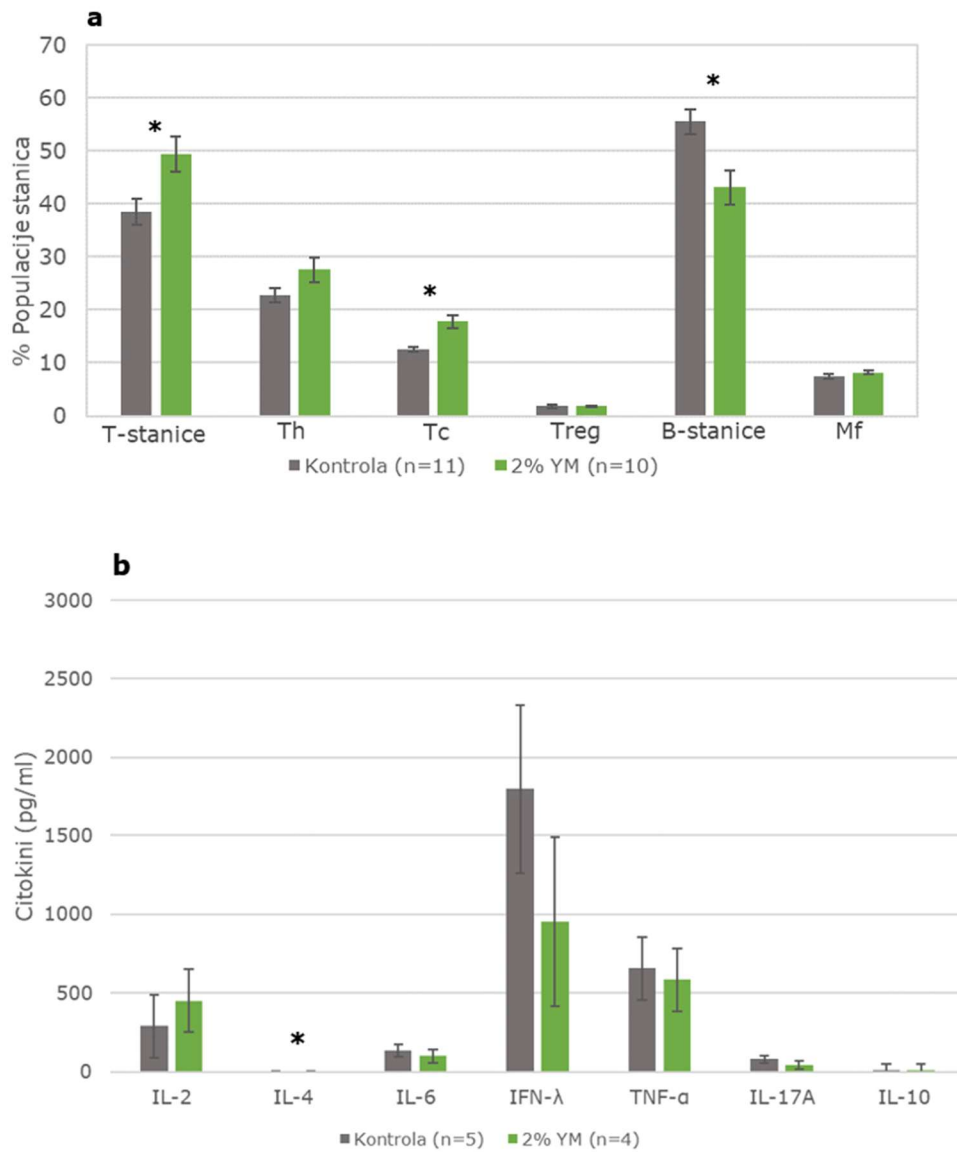
Podaci za *ex vivo rezultate* sakupljeni su u krajnjoj točki istraživanja, 35. dana nakon prve STZ injekcije. Broj stanica slezene dobiven iz YM tretiranih miševa bio je značajno niži u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $p=0,001$ ) (Slika 6.a). Ova razlika pripisuje se ljudskoj pogrešci u liziranju eritrocita ACK puferom za lizu dulje nego što je propisano u protokolu. Usprkos razlici u broju stanica slezene, vijabilnost između dviju skupina nije varirala (Slika

6.b). Što se tiče indeksa proliferacije T-stanica, rezultati su pokazali značajno manji indeks proliferacije T stanica u YM tretiranoj grupi u odnosu na kontrolu ( $p < 0,013$ ) (Slika 6.c).



Slika 6. Broj stanica (a), vijabilnost stanica (b) i indeks proliferacije T-stanica (c) dobivenih iz slezene VND-STZ-C57BL/6 miševa tretiranih s 2% YM. Miševi su tretirani 2% YM od -7. do 35. dana nakon prve injekcije STZ-a. Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$  u usporedbi s kontrolama (student T-test).

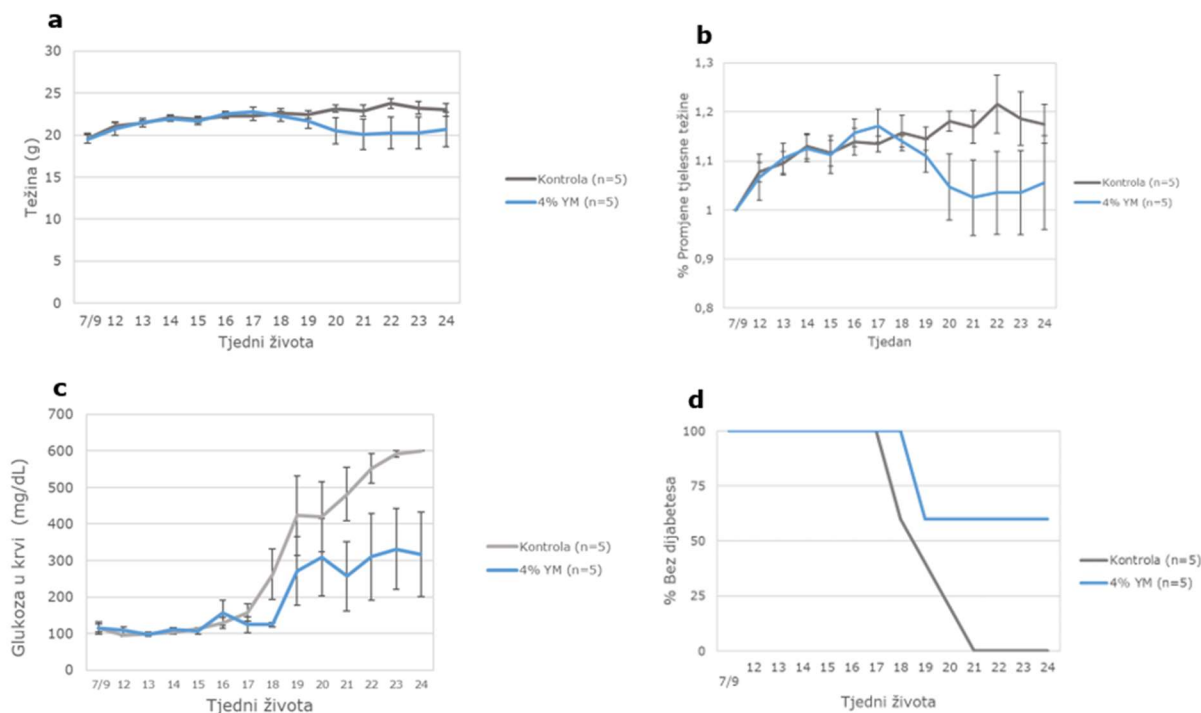
Kod skupine tretirane 2% YM uočena je značajno povišena razina T-stanica ( $p = 0,016$ ), Th stanica i Tc stanica ( $p < 0,001$ ) u usporedbi s kontrolnom skupinom. Nadalje, razina B-stanica također je bila značajno niža nego kod kontrolne skupine ( $p = 0,006$ ) (Slika 7.a). Za razliku od trenda porasta razine IL-2, opažen je trend smanjenih razina citokina poput IFN- $\lambda$ , TNF- $\alpha$  i IL-6 u skupini tretiranoj 2% YM (Slika 7.b), premda je samo razina IL-4 bila statistički značajno niža ( $p = 0,03$ ) od kontrole.



Slika 7. Imunofenotipovi stanica (a) i koncentracije citokina (b) dobivenih iz slezene VND-STZ-C57BL/6 miševa tretiranih s 2% YM. Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti  $\pm$  SEM, \*  $p < 0.05$  u usporedbi s kontrolama (student T-test).

#### **4.4. *In vivo* pilot istraživanje djelovanja 4% YM u NOD modelu T1D**

NOD pre-dijabetični miševi starosti 7-9 tjedana tretirani su 4% YM sve do 24. tjedna života. Oko 17. tjedna života, tjelesna težina i postotak promjene tjelesne težine, počele su opadati u miševa tretiranih 4% YM u usporedbi s kontrolom (Slika 8.a i 8.b), iako statistička značajnost pada težine nije dostignuta. Razine glukoze u krvi počele su rasti u 17. tjednu života u NOD kontrolnih miševa, te u 19. tjednu u 4% YM tretiranih miševa. Iako su 4% YM tretirani miševi pokazali trend smanjene razine hiperglikemije od 17. do 24. tjedna života u odnosu na kontrolu, statistička značajnost te razlike nije pokazana. U krajnjoj točki istraživanja prosječna vrijednost glukoze za 4% YM skupinu iznosila je  $317,2 \pm 115$  mg/dl (*srednja vrijednost  $\pm$  SD*), dok je za kontrolnu grupu bila  $600 \pm 0$  mg/dl (*srednja vrijednost  $\pm$  SD*) (Slika 8.c). 40% miševa je postalo prvotno dijabetično u 18. tjednu kod kontrolne skupine, zatim 40% kod 4% YM tretirane skupine u 19. tjednu istraživanja. Svi miševi kontrolne skupine (5 od 5) postali su dijabetični do 21. tjedna, dok je 60% miševa (3 od 5) tretiranih 4% YM ostalo zdravo do kraja eksperimenta (Slika 8.d).

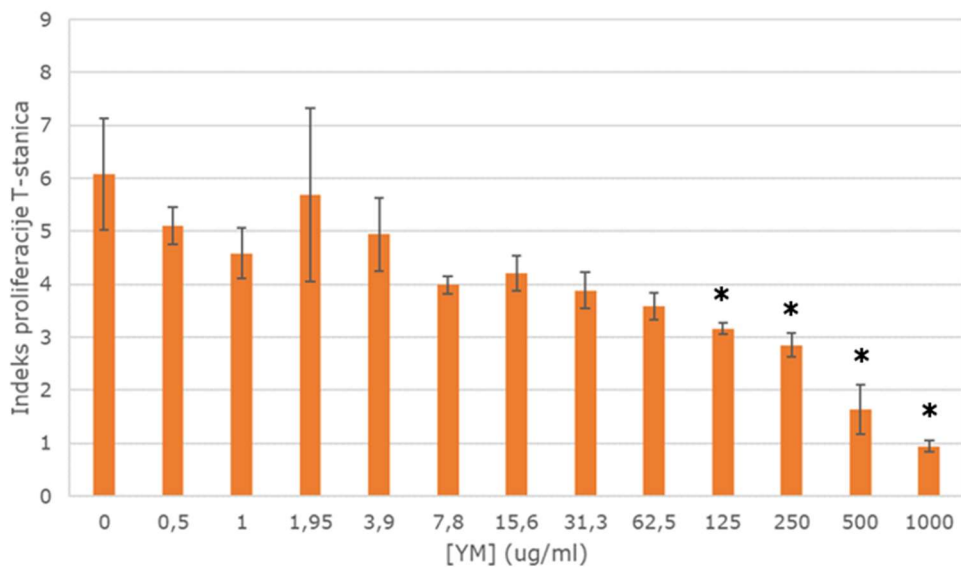


Slika 8. Tjelesna težina (a), % tjelesne težine (b), glukoza u krvi (c) i incidencija T1D (d) u NOD miševa tretiranih s 4% YM kroz period 7/9-24. tjedna života. Početne tjelesne težine i glukoza u krvi miševa mjereni su prvi dan tretmana 4% YM i praćene tjedno kroz period od 12.-24. tjedna života. Incidencija T1D prikazana je kao postotak miševa koji nisu razvili dijabetes. Početak bolesti definiran je dvama uzastopnim očitavanjima glukoze  $\geq 250$  mg/dl. Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti  $\pm$  SEM. Nije uočena statistički značajna razlika između tretirane i kontrolne grupe. (MANOVA: a-c, Metoda preživljavanja: d).

#### 4.5 *In vitro* djelovanje YM na proliferaciju T-stanica i njihove citokine

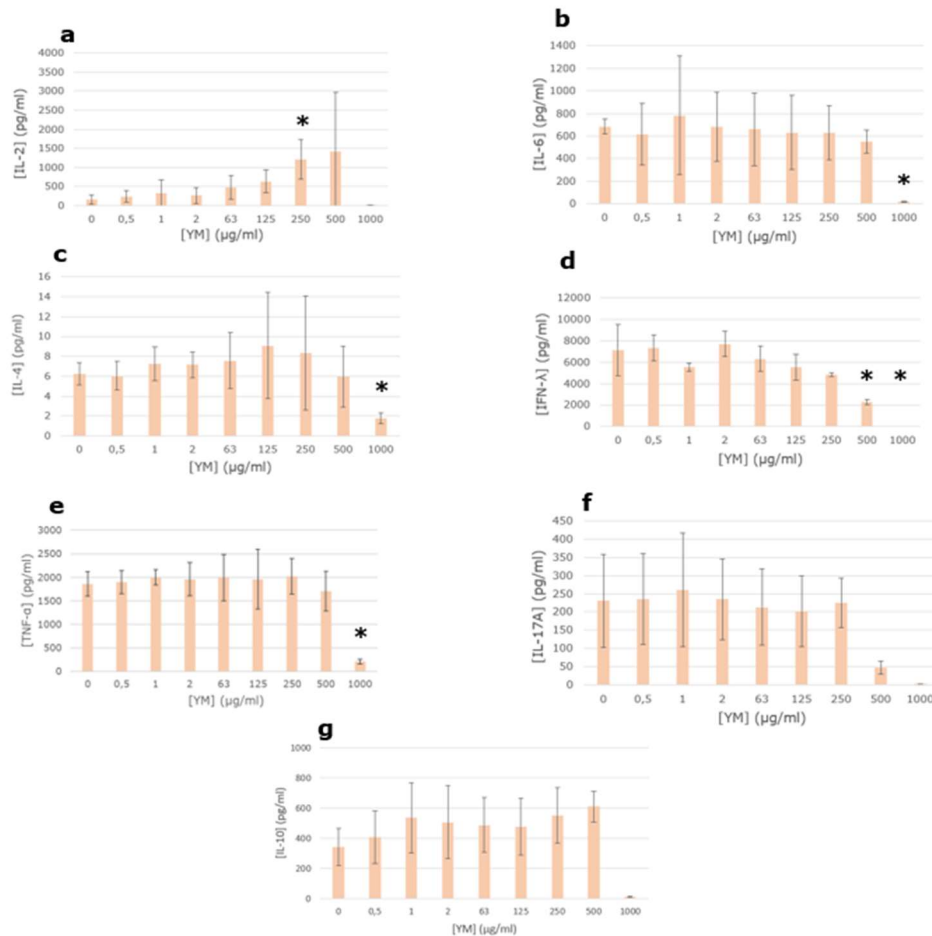
Pratio se i direktan utjecaj različitih koncentracija YM na T-stanice *in vitro*. Provedena su 3 testa proliferacije T-stanica tretiranjem izoliranih stanica slezene C57BL/6 miša različitim koncentracijama YM (0,5-1000  $\mu\text{g/ml}$ ) *in vitro*. Vidljiv je trend smanjene proliferacije T-stanica ovisno o dozi YM (Slika 9), sa statistički značajnom redukcijom indeksa proliferacije T-stanica pri koncentracijama od 125  $\mu\text{g/mL}$  ( $p=0,05$ ), 250  $\mu\text{g/mL}$  ( $p=0,04$ ), 500  $\mu\text{g/mL}$  ( $p=0,018$ ) i 1000  $\mu\text{g/mL}$  ( $p=0,008$ ).





Slika 9. Indeks proliferacije T-stanica in vitro stimuliranih ConA pri različitim koncentracijama YM. Proliferacija T-stanica inducirana je u stanicama slezene C57BL/6 miševa pomoću ConA s dodatkom s/bez dodatka različitih koncentracija YM (0-1000 µg/mL) kroz period inkubacije od 72h. Optičke gustoće određene su spektrofotometrijski dodatkom AlamarBlue boje, a indeks proliferacije izračunat je dijeljenjem optičke gustoće stanica stimuliranih ConA s optičkom gustoćom nestimuliranih za svaku od koncentracija YM. Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti ± SEM za tri individualna eksperimenta, \*  $p < 0.05$  u usporedbi s kontrolom (student T-test).

Koncentracije citokina mjerene su u supernatantima kultura splenocita C57BL/6 miševa stimuliranih s ConA. Splenociti su tretirani različitim koncentracijama YM (0,5-1000 µg/ml) te su provedena tri eksperimenta. U usporedbi s T-stanicama kontrole, izlaganje stanica koncentraciji YM od 1000 µg/dl značajno je snizilo produkciju citokina IL-4 ( $p=0,009$ ), IL-6 ( $p=0,014$ ), IFN- $\lambda$  ( $p=0,008$ ) i TNF- $\alpha$  ( $p < 0,001$ ). Nadalje, došlo je i do smanjenja produkcije IL-2, IL-17A i IL-10 (Slika 10). Kod koncentracije od 500 µg/mL, značajan utjecaj zabilježen je kod IFN- $\lambda$  ( $p=0,03$ ) koji je je smanjen u usporedbi s kontrolom. IFN- $\lambda$  jedini je citokin za koji je uočen trend supresije izlučivanja ovisno o dozi (Slika 10.d). Suprotno tome, razine IL-2 rasle su ovisno o dozi YM 0-500 µg/ml. Međutim, statistička značajnost nije potvrđena osim kod koncentracije od 250 µg/ml u usporedbi s kontrolom ( $p=0,036$ ) (Slika 10.a).



Slika 10. Koncentracije citokina u T-stanicama stimuliranim ConA i izloženim različitim koncentracijama YM *in vitro* (0,5-1000 μg/mL). Splenociti C57BL/6 miševa stimulirani su ConA sa i bez različitih koncentracija YM kroz period inkubacije od 48h. Supernatanti su analizirani CBA Mouse Th1/Th2/Th17 kitom za citokine protočnom citometrijom. Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti ± SEM za 3 eksperimenta. \*p<0.05 u usporedbi s kontrolama (student T-test).

## 5. Rasprava

Kod prevencije ili liječenja autoimunih bolesti, fokus se stavlja na supresiju odgovora stanica imunološkog sustava. U slučaju T1D, to su T-stanice koje dovode do autodestrukcije beta stanica gušterače. Prijašnja klinička istraživanja T1D bila su usredotočena isključivo na zaustavljanje progresije oštećenja beta stanica, što se nije pokazalo efikasnim jer je 80-90% stanica

već bilo uništeno prije pojave simptoma (9). Najidealniji pristup bolesti trebao bi biti usmjeren na prevenciju, ciljajući predfazu 1 u kojoj nisu sve T-stanice regrutirane u autoimunom napadu i kritična masa beta stanica je još uvijek prezervirana. Ciljana imunoterapija prije pojave same bolesti ključna je u prevenciji T1D jer sama predispozicija za razvoj dijabetesa u ranoj fazi ne znači i pojavu bolesti u budućnosti. Prevencija T1D može predstavljati održivu alternativu stvarnom izlječenju blokiranjem autoimunog odgovora dok je masa beta stanica još uvijek očuvana. Iz tog razloga, u posljednjih nekoliko desetljeća, preventivske studije počele su se fokusirati na pacijente s rizikom od razvoja bolesti, kod kojih je autoimuni proces u tijeku, ali beta stanice nisu uništene. Najčešće se primjenjuje antigen-specifična terapija, temeljena na davanju inzulina radi uspostavljanja tolerancije. U konačnici, imunosupresivne terapije se oslanjaju na depleciju efektorskih T-stanica s klonalnom ekspanzijom Treg stanica. Neki od primjera su Abatacept (CTLA-4 antitijelo), GAD-Alum (izoforma GAD proteina za koji je tolerancija imunoloških stanica veća) i Teplizumab (anti-CD3 antitijelo) koji je u kliničkim ispitivanjima pokazao iznimnu supresiju imunološkog sustava, omogućavajući beta stanicama proizvodnju inzulina kroz dulje vrijeme. Teplizumab je obećavajuća nova terapija te bi lijek mogao biti odobren već 2023. godine (3)(27). Iako su neki od opisanih tretmana pokazali određenu učinkovitost u kliničkim ispitivanjima, još uvijek postoji problem konzistentnosti i efikasnosti terapije kroz dulje vrijeme. K tome, javljaju se teške nuspojave kao što su nefrotoksičnost, trombocitopenija, prolazno otpuštanje citokina, itd. (28)(29). Nadalje, uzimajući u obzir da su imunoterapijski pristupi iznimno skupi i gotovo nedostupni u siromašnim zemljama svijeta gdje postoji najveća populacija djece sa potencijalnim razvojem T1D, naglašava potrebu za široko pristupačnim, sigurnim agensom s potencijalnim efektom usporavanja autoimunog procesa u T1D. Prethodno je već opisano protuupalno i hipoglikemijsko djelovanje YM koje se očituje u

visokom udjelu polifenola u biljci, čineći ga ozbiljnim kandidatom za odgodu progresije bolesti i/ili smanjenje ozbiljnosti samih simptoma. Usprkos ovim odličnim svojstvima, YM nije nikada ispitan u autoimunom T1D, stoga je ova studija jedinstvena s tog aspekta. Uzet je eksperimentalni model T1D induciran primjenom STZ na kojem se ispitaio učinak YM, uz pilot eksperiment na modelu spontanog razvitka T1D u NOD miševa.

Koncentracija od 4% YM određena je u našem pilot eksperimentu kao optimalna najveća doza koja se može sigurno oralno primijeniti u miševa da ostanu zdravi i ne gube na težini. U istraživanju učinka YM na redukciju akutne upale pluća C57BL/6 miševa, YM se davao oralno i intraperitonealno u koncentraciji od 150 mg/kg tjelesne težine (30). Na istom modelu miša, YM je primijenjen i intragastričnom gavažom u koncentracijama od 0,5, 1, ili 2 g/kg tjelesne težine (31). Što se drugih eksperimentalnih modela tiče, u istraživanju na hrčcima, 1%, 2% ili 4% YM w/v davao se oralno *ad libitum* (32), a koncentracija od 7% YM w/v štakorima oralno *ad libitum* (26). Oralni način administracije YM manje je invazivan od gavaže ili injekcija, a pokazao se jednako učinkovit u gore navedenim istraživanjima. Pošto je konačni cilj primjena u ljudima, izabrali smo oralnu administraciju YM pripravka kao sigurniju i primjenjivu za korištenje u ljudi.

*In vivo* učinkovitost 4% YM mjerila se u VND-STZ-C57BL/6 i NOD miševa. Pretpostavljalo se da će doći do odgode pojavnosti T1D i smanjenja ozbiljnosti simptoma. Kod STZ-C57BL/6 miševa tretiranih 4%YM došlo je do povećanja tjelesne težine, uz značajno smanjenje glukoze u krvi, u usporedbi s kontrolom. Sukladno tome, nakon 6 tjedana tretmana YM, 76% miševa tretiranih 4% YM nije razvilo dijabetes kroz cijelo trajanje istraživanja, dok je za kontrolnu skupinu taj broj iznosio 41%. Održanje normoglikemije u skladu je s već provedenim istraživanjima u kojima je

opisano hipoglikemijsko djelovanje YM na miševe kojima je administrirana hrana bogata mastima (31) i miševe tretirane visokom dozom STZ-a (26). U literaturi dosad nije zabilježeno povećanje tjelesne težine nakon tretmana YM.

Što se tiče *in vivo* učinka 2% YM u STZ-C57BL/6 miševa, rezultati su slični kao kod tretmana većom dozom, osim što nije došlo do povećanja tjelesne težine. Glukoza u krvi, kao i incidencija dijabetesa bile su značajno niže u usporedbi s kontrolnom grupom. Unutar skupine tretirane 2% YM 73% miševa nije razvilo dijabetes, dok u kontrolnoj skupini ta brojka iznosi 36%. Učinkovitost 2% YM, u odnosu na incidenciju T1D i smanjenje hiperglikemije, je komparabilna sa 4% YM.

Kod eksperimentalnog NOD modela, zabilježeno je opadanje tjelesne težine oko 17. tjedna života (nakon otprilike 10 tjedana YM tretmana) pri čemu je mogući uzrok to da je NOD miševima YM administriran kroz dulji period nego VND-STZ-C57BL/6 miševima (6 tjedana YM tretmana). Još jedan razlog smanjenja tjelesne težine opisali su Arçari i suradnici (19). Naime u njihovom istraživanju, koje je trajalo 16 tjedana, miševi su podvrgnuti ili dijeti bogatoj mastima ili standardnoj prehrani. Nakon 8 tjedana mjerila se razina pretilosti te im se počelo davati ili 1g YM/kg tjelesne težine ili voda. Zabilježena je niža razina kolesterola, triglicerida, LDL kolesterola i glukoze u serumu tretiranih miševa. Pretpostavljeno je da su te promjene nastale zbog sinergističkog djelovanja spojeva u YM. Naime, klorogenska kiselina modulira glukozu-6-fosfatazu i smanjuje oksidaciju LDL-a i kolesterola, a saponini ometaju metabolizam kolesterola. Trend smanjenja hiperglikemije i incidencije T1D, opažen u NOD modelu, sličan je kao i u VND-STZ-C57BL/6 modelu. Međutim, statistički značajni rezultati nisu dobiveni kod NOD miševa. Razliku u rezultatima između dvaju eksperimentalnih mišjih modela

moguće je pripisati i samoj razlici između dvaju modela. Kao što je već naglašeno, kod VND-STZ-C57BL/6 modela STZ djeluje kao okolišni čimbenik pomoću kojega se inducira autoimunost te su kod tog modela zabilježeni obećavajući rezultati. S druge strane, NOD miševi spontano razvijaju T1D te su sličniji ljudima u ekspresiji gena povezanih s osjetljivošću na bolest, razvoju autoantitijela i ispoljavanju inzulitisa. Uz to potrebno je naglasiti da je na NOD modelu napravljen je pilot pokus sa samo 5 miševa po skupini te je neophodno pokus ponoviti na većem uzorku kako bi se dobili vjerodostojni rezultati (16).

Iako 4% YM tretman nije utjecao na subpopulacije T-stanica, B-stanica i makrofaga u slezeni, smanjeni indeks proliferacije T-stanica, razine proupalnih citokina (IL-6, IFN- $\lambda$ , TNF- $\alpha$ ) kao i protuupalnih citokina (IL-4 i IL-10) ukazuju na imunomodulativna svojstva YM pri dozi od 4% (v/w). Dobiveni *ex vivo* rezultati mogu se usporediti s onima dobivenim u istraživanju iz 2011.godine (19) gdje su se razine ekspresije TNF- $\alpha$  i IL-6 gena vratile na početnu vrijednost putem signalne transdukcije NF- $\kappa$ B puta, nakon tretmana YM. Naime, TNF- $\alpha$  potiče translokaciju NF- $\kappa$ B u jezgru čime se potiče proizvodnja proupalnih citokina. Stoga, smanjenjem razine TNF- $\alpha$ , YM bi mogao utjecati na smanjenje upale. Slično je dobiveno i u ostalim studijama (33)(34). Zanimljiva je činjenica da su naši rezultati pokazali smanjenje i u protuupalnim citokinima. Müller i suradnici (34) pokazali su da je osjetljivost na razvoj dijabetesa bila više povezana sa smanjenjem razine citokina Th2 odgovora (IL-4 i IL-10) nego s indukcijom citokina Th1 tipa (IFN- $\lambda$  i TNF- $\alpha$ ).

Podaci dobiveni nakon *in vivo* tretmana 2% YM slični su rezultatima opaženim nakon tretmana 4%YM. Također, 2% YM tretman je smanjio indeks proliferacije T-stanica, kao i 4% YM administracija. Opažene su razlike u subpopulacijama stanica slezene u miševa tretiranih 2% YM, tj.

porast T-stanica, Th i Tc stanica, za razliku od nepromijenjenih populacija/subpopulacija T-stanica nakon tretmana 4% YM. Proupalni citokini (IL-6, IFN- $\lambda$ , TNF- $\alpha$ ) pokazali su trend smanjenja koncentracija u miševa tretiranih 2% YM, iako statistička značajnost nije pokazana za iste citokine kao u miševa tretiranih sa 4% YM. Interesantno, IL-4 je u miševa tretiranih 2% YM bio značajno niži, kao i u miševa tretiranih 4% YM.

Kako bi proširili razumijevanje direktnog djelovanja YM na T-stanice, primijenjen je *in vitro* pristup korištenjem mišjih splenocita. Pretpostavili smo da bi T-stanice podvrgnute izravnom utjecaju YM pokazale smanjenu proliferaciju i izlučivanje pro- i protuupalnih citokina. Indeks proliferacije T-stanica smanjivao se ovisno o dozi YM sa značajnom supresijom počevši od koncentracije YM od 125  $\mu\text{g/ml}$ . Najveća administrirana doza od 1000  $\mu\text{g/ml}$  smanjila je koncentracije svih testiranih citokina. Mogući uzrok tome je da je ta doza bila prevelika i da je YM u toj dozi inducirao staničnu smrt. Zanimljiv je podatak da je kod IL-2 zabilježen rast koncentracije ovisno o dozi, sve do doze od 1000  $\mu\text{g/ml}$  gdje je razina citokina naglo pala. Sumirajući analizu svih ispitivanih citokina *in vitro*, jedino statistički značajno smanjenje koncentracije (izuzimajući najveću koncentraciju od 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) zabilježeno je na IFN- $\lambda$  pri koncentracijama od 500  $\mu\text{g/ml}$ , što pokazuje razliku rezultata dobivenih u *in vitro* modelu i živom mišu, te kompleksnost interakcija T-stanica i ostalih imunih stanica u *in vivo* modelu.

Ukratko, rezultati su pokazali da je tretman YM značajno smanjio glukozu u krvi i incidenciju T1D pri upotrebi koncentracija od 4% i 2% u modelu VND-STZ-C57BL/6 miševa kroz 6 tjedana. Nadalje, 4%-tna koncentracija YM povećala je, a 2%-tna održala tjelesnu težinu tijekom cijelog eksperimentalnog razdoblja. Tretman NOD miševa sa YM u koncentraciji od 4% pokazao je trend smanjenja i razine glukoze i pojavnosti T1D, ali uz

induciranje gubitka tjelesne težine nakon 10 tjedana uzastopne administracije. Dobiveni *ex vivo* podaci pokazali su da je YM značajno smanjio proliferaciju T-stanica u VND-STZ-C57BL/6 miševa kojima su davane koncentracije YM od 2% i 4% tijekom 6 tjedana. Primjena 2% YM smanjila je populaciju B-stanica dok je povećala populaciju T stanica i subopopulaciju Th i Tc u istom modelu. Obje koncentracije YM suprimirale su razine citokina; T-stanice miševa tretiranih s 4% YM proizvele su snižene razine proupalnih (IL-6, IFN- $\lambda$ , TNF- $\alpha$ ) i protuupalnih (IL-4 i IL-10) citokina. S druge strane, T-stanice miševa tretiranih s 2% YM proizvele su značajno smanjenje protuupalnog IL-4 te je zabilježen trend smanjenja proupalnih citokina. *In vitro* podaci, dobiveni na T-stanicama slezene izravno izloženih koncentracijama 0-1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  YM, pokazali su značajno smanjenje proliferacije T-stanica ovisno o dozi počevši od koncentracije od 125  $\text{mg}/\text{mL}$  YM. Nije bilo značajnih trendova u proizvodnji testiranih citokina, osim u povećanju IL-2 i smanjenju IFN- $\lambda$ .

## 6. Zaključak

Zaključno, rezultati su po prvi puta pokazali da je oralna *ad libitum* administracija 4% i 2% YM inhibirala razvoj T1D u VND-STZ-C57BL/6 modelu miša i reducirala razinu glukoze u krvi, izuzev redukcije tjelesne težine. Nadalje, obje koncentracije YM inhibirale su proliferativni potencijal T-stanica, a tretman sa 4% YM je prominentno potisnuo proizvodnju kako proupalnih tako i protuupalnih citokina. Predstavljeni rezultati sugeriraju imunomodulatorni učinak YM, potkrijepljen aktualnom literaturom u *in vivo* i *in vitro* modelima, kao potencijalni mehanizam inhibicije T1D. Usporedno s rezultatima dobivenim kod VND-STZ-C57BL/6 miševa, opažen je trend smanjenja hiperglikemije i incidencije T1D u NOD miševa uz trend gubitka težine, iako rezultati nisu bili statistički značajni. Iako su u ovoj YM studiji u



VND-STZ mišjem modelu pokazani rezultati odgođenog početka T1D, smanjene hiperglikemije i imunomodulacije, studije učinka YM na razvoj T1D u drugim eksperimentalnim modelima, poput NOD miša, treba produbiti. Unatoč obećavajućim rezultatima ove studije, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdila sigurnost dugoročne konzumacije YM, osobito u kontekstu opaženog gubitka tjelesne težine u pilot NOD eksperimentu. Konačno, bolje razumijevanje interakcije spojeva pronađenih u YM pomoći će u rasvjetljavanju mehanizama promatranih ishoda.

## 7.Literatura

1. World Health Organization (WHO). 2021.
2. Gillespie KM. Type 1 diabetes: Pathogenesis and prevention. Vol. 175, CMAJ. 2006. p. 165–70.
3. Rapini N, Schiaffini R, Fierabracci A. Immunotherapy strategies for the prevention and treatment of distinct stages of type 1 diabetes: An overview. Vol. 21, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2020.
4. Gómez-Juaristi M, Martínez-López S, Sarria B, Bravo L, Mateos R. Absorption and metabolism of yerba mate phenolic compounds in humans. Food Chem. 2018 Feb 1;240:1028–38.
5. Abbas K. Abul LHAPS. Basic Immunology - Functions and Disorders of the Immune System. 5th ed. Elsevier Inc.; 2016.
6. Acharjee S, Ghosh B, Al-Dhubiab BE, Nair AB. Understanding type 1 diabetes: Etiology and models. Can J Diabetes. 2013;37(4):269–76.
7. Ram R, Mehta M, Nguyen QT, Larma I, Boehm BO, Pociot F, et al. Systematic Evaluation of Genes and Genetic Variants Associated with Type 1 Diabetes Susceptibility. The Journal of Immunology. 2016 Apr 1;196(7):3043–53.
8. Bakay M, Pandey R, Hakonarson H. Genes involved in type 1 diabetes: An update. Vol. 4, Genes. 2013. p. 499–521.

9. Maahs DM, West NA, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ. Epidemiology of type 1 diabetes. Vol. 39, *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2010. p. 481–97.
10. Korsgren S, Molin Y, Salmela K, Lundgren T, Melhus Å, Korsgren O. On the etiology of type 1 diabetes: A new animal model signifying a decisive role for bacteria eliciting an adverse innate immunity response. *American Journal of Pathology*. 2012 Nov;181(5):1735–48.
11. Aaron Wiles T, Powell R, Michel CR, Scott Beard K, Hohenstein A, Bradley B, et al. Identification of Hybrid Insulin Peptides (HIPs) in Mouse and Human Islets by Mass Spectrometry. *J Proteome Res*. 2019 Mar 1;18(3):814–25.
12. Burrack AL, Martinov T, Fife BT. T cell-mediated beta cell destruction: Autoimmunity and alloimmunity in the context of type 1 diabetes. Vol. 8, *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A.; 2017.
13. Knip M, Siljander H. Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. Vol. 7, *Autoimmunity Reviews*. 2008. p. 550–7.
14. Pugliese A. Insulinitis in the pathogenesis of type 1 diabetes. Vol. 17, *Pediatric Diabetes*. Blackwell Publishing Ltd; 2016. p. 31–6.
15. Müller A, Schott-Ohly P, Dohle C, Gleichmann H. Differential Regulation of Th1-Type and Th2-Type Cytokine Profiles in Pancreatic Islets of C57BL/6 and BALB/c Mice by Multiple Low Doses of Streptozotocin [Internet]. 2002. Available from: <http://www.urbanfischer.de/journals/immunobiol>
16. Aoki CA, Borchers AT, Ridgway WM, Keen CL, Ansari AA, Gershwin ME. NOD mice and autoimmunity. Vol. 4, *Autoimmunity Reviews*. 2005. p. 373–9.
17. Heck CI, de Mejia EG. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. Vol. 72, *Journal of Food Science*. 2007.
18. Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. Vol. 136, *Journal of Ethnopharmacology*. 2011. p. 378–84.
19. Arçari DP, Bartchewsky W, dos Santos TW, Oliveira KA, DeOliveira CC, Gotardo EM, et al. Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (*Ilex*

- paraguariensis) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 2011 Mar 30;335(2):110–5.
20. Muñoz-Culla M, Sáenz-Cuesta M, Guereca-Barandiaran MJ, Ribeiro ML, Otaegui D. Yerba mate (: *Ilex paraguariensis*) inhibits lymphocyte activation in vitro. *Food Funct*. 2016 Nov 1;7(11):4556–63.
  21. Heck CI, de Mejia EG. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. Vol. 72, *Journal of Food Science*. 2007.
  22. Coppieters K, von Herrath M. The development of immunotherapy strategies for the treatment of type 1 diabetes. Vol. 5, *Frontiers in Medicine*. Frontiers Media S.A.; 2018.
  23. Silva RDA, Bueno ALS, Gallon CW, Gomes LF, Kaiser S, Pavei C, et al. The effect of aqueous extract of gross and commercial yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on intra-abdominal and epididymal fat and glucose levels in male Wistar rats. *Fitoterapia*. 2011 Sep;82(6):818–26.
  24. ter Veld MGR, Zawadzka E, van den Berg JHJ, van der Saag PT, Rietjens IMCM, Murk AJ. Food-associated estrogenic compounds induce estrogen receptor-mediated luciferase gene expression in transgenic male mice. *Chem Biol Interact*. 2008 Jul 30;174(2):126–33.
  25. Cetkovic-Cvrlje M, Thinamany S, Bruner KA. Bisphenol A (BPA) aggravates multiple low-dose streptozotocin-induced type 1 diabetes in C57BL/6 mice. *J Immunotoxicol*. 2017 Jan 1;14(1):160–8.
  26. Rocha DS, Casagrande L, Model JFA, dos Santos JT, Hoefel AL, Kucharski LC. Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on the metabolism of diabetic rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2018 Sep 1;105:370–6.
  27. Herold KC, Bundy BN, Long SA, Bluestone JA, DiMeglio LA, Dufort MJ, et al. An Anti-CD3 Antibody, Teplizumab, in Relatives at Risk for Type 1 Diabetes. *New England Journal of Medicine*. 2019 Aug 15;381(7):603–13.
  28. Staeva TP, Chatenoud L, Insel R, Atkinson MA. Recent lessons learned from prevention and recent-onset type 1 diabetes immunotherapy trials. Vol. 62, *Diabetes*. 2013. p. 9–17.

29. Luo X, Herold KC, Miller SD. Immunotherapy of Type 1 Diabetes: Where Are We and Where Should We Be Going? Vol. 32, Immunity. 2010. p. 488–99.
30. Lanzetti M, Bezerra FS, Romana-Souza B, Brando-Lima AC, Koatz VLG, Porto LC, et al. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. Nutrition. 2008;24(4):375–81.
31. Kang YR, Lee HY, Kim JH, Moon DI, Seo MY, Park SH, et al. Anti-obesity and anti-diabetic effects of Yerba Mate ( *Ilex paraguariensis* ) in C57BL/6J mice fed a high-fat diet . Lab Anim Res. 2012;28(1):23.
32. Gao H, Long Y, Jiang X, Liu Z, Wang D, Zhao Y, et al. Beneficial effects of Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*) on hyperlipidemia in high-fat-fed hamsters. Exp Gerontol. 2013 Jun;48(6):572–8.
33. Panza VP, Brunetta HS, de Oliveira MV, Nunes EA, da Silva EL. Effect of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on the expression of the leukocyte NADPH oxidase subunit p47 phox and on circulating inflammatory cytokines in healthy men: a pilot study. Int J Food Sci Nutr. 2019 Feb 17;70(2):212–21.
34. Müller A, Schott-Ohly P, Dohle C, Gleichmann H. Differential Regulation of Th1-Type and Th2-Type Cytokine Profiles in Pancreatic Islets of C57BL/6 and BALB/c Mice by Multiple Low Doses of Streptozotocin [Internet]. 2002. Available from: <http://www.urbanfischer.de/journals/immunobiol>

## **8. Životopis**

### **Osobne informacije**

Martina Buretić

Adresa: Narodnog doma 2/a, 52000 Pazin (Hrvatska)

Datum rođenja: 09/04/1996

Spol: Žensko

Državljanstvo: hrvatsko

E-adresa: [martina.buretic@gmail.com](mailto:martina.buretic@gmail.com)

Broj telefona: +385989901199

## **OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE**

### **Sveučilišna prvostupnica (baccalaurea) biotehnologije i istraživanja lijekova**

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci [2015 – 2019]

Adresa: Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)

### **Učenica**

Gimnazija i strukovna škola Jurja Dobrile Pazin [2010 – 2014]

Adresa: Šetalište Pazinske Gimnazije 11, 52000 Pazin (Hrvatska)

[www.gssjd.hr](http://www.gssjd.hr)

## **RADNO ISKUSTVO**

### **Demonstrator na kolegiju „Imunologija“**

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci [10/2018]

Mjesto: Rijeka

Zemlja: Hrvatska

Voditelj: dr. sc. Ivana Munitić

Opis posla: pomoć studentima u izvođenju laboratorijskog djela kolegija – izolacija limfnih tkiva i organa iz miša, protočna citometrija.

### **Demonstrator na kolegiju „Imunologija“**

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci [10/2019]

Voditelj: dr. sc. Ivana Munitić

Opis posla: pomoć studentima u izvođenju laboratorijskog djela kolegija – izolacija limfnih tkiva i organa iz miša, protočna citometrija.

### **Studentska praksa**

Jadran galenski laboratorij (JGL) [05/2018– 06/2018]

Mjesto: Rijeka

Zemlja: Hrvatska

Voditelj: Vesna Saršon Beltrame

Opis posla: čitanje Standardnih operativnih procedura (SOP), mjerenje viskoznosti Dolokain gelova, simulacija transporta Dramina sirupa i evaluacija sposobnosti transportne jedinice, ispitivanje očuvanja graduacije žličica Dramina sirupa, rad na DSC (Differential Scanning Calorimetry) uređaju za kalorimetriju, ispitivanje adhezije aktivne supstance Dramina sirupa – evaluacija sorpcije i konzervansa tijekom skladištenja.

### **Analitičar u instrumentalnom laboratoriju Kontrole kvalitete (JGL)**

Jadran galenski laboratorij (JGL) [11/2021-danas]

Mjesto: Rijeka

Zemlja: Hrvatska

Opis posla: Rad na HPLC uređaju i analiza lijekova HPLC metodom, priprema mobilnih faza, administrativni poslovi.

Dodatno:

### **Iskustvo u radu na Odjelu za organsku kemiju u sklopu projekta u suradnju s Odjelom za fiziku Sveučilišta u Rijeci.**

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci [2018 - 2019]

Opis: sinteza i pročišćavanje spojeva

Voditelj: dr. sc. Karlo Wittine

### **Ljetna škola – Patofiziologija aktualnih javnozdravstvenih problema i bolesti**

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci [06/2019]

Mjesto: Rijeka

Voditelj: dr. sc. Marina Četković Cvrnje

U suradnji sa St. Cloud University, Minnesota, Sjedinjene Američke Države

**Položen online kolegij Introduction to Breast Cancer na Yale Sveučilištu (Medicinski studij)**

New Haven, Connecticut [16/4/2021]

Voditelj: Anees B. Chagpar, MD, MSc, MPH, MA, MBA, FRCS(C), FACS,  
Professor of Surgery

**Počasti i nagrade**

Stipendija grada Pazina [2018-2021]

**Jezične vještine**

Materinji jezik: hrvatski

Ostalo:

**Engleski jezik**

Slušanje: C1

Čitanje: C1

Pisanje: C1

Govorna produkcija: C1

Govorna interakcija: C1

Licenca i certifikat: TOEFL (IBT) [2014]

**Njemački jezik**

Slušanje: A2

Čitanje: A2

Pisanje: A2

Govorna produkcija: A2

Govorna interakcija: A2

## **DIGITALNE VJEŠTINE**

Internet / MS Office (Word, Excel, PowerPoint) / PyMOL, Chimera, Avogadro, Gamess, Marvin / Statistica, MedCalc, R studio, VMD

## **DODATNE INFORMACIJE**

### **Konferencije**

#### **Konferencija studenata Biotehnologije – aktivno sudjelovanje – prezentacija projekta**

Prehrambeno - Biotehnološki fakultet (PBF), Sveučilište u Zagrebu [2018]

Adresa: Pierottijeva ul. 6, 10000, Zagreb (Hrvatska)

<http://www.pbf.unizg.hr/>

#### **Konferencija Budućnost i perspektiva studija – pasivno sudjelovanje**

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci [2016 – 2019]

Adresa: Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)

### **Projekti**

#### **Voditelj projekta „Znanost iza objektivna“ – snimanje video materijala**

kemijskih pokusa u suradnji sa izdavačkom kućom Školska Knjiga

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci [2018-2019]



Adresa: Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)

**Voditelj projekta „Kuglice dobrih želja“** –humanitarna akcija pod pokroviteljstvom grada Rijeke

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci [10/2019 – 11/2019]

Adresa: Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)

### **Volonterstvo**

Aktivni član Udruge studenata biotehnologije Rijeka (USBRI):

### **Popularizacija znanosti**

**Volonter na projektu „Putujući znanstvenici“** – popularizacija znanosti među djecom vrtićke i školske dobi

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci [2017 – 2019]

Adresa: Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)

**Volonter na manifestaciji „Otvoreni dan“ Odjela za biotehnologiju** – aktivno sudjelovanje – izvođenje pokusa

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci [2017, 2018]

Adresa: Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)

**Volonter na manifestaciji „Europska noć znanstvenika“**

Mjesto: Rijeka [2018]

**Volonter na manifestaciji „Znanstveni piknik“**

aktivno sudjelovanje – izvođenje pokusa

Mjesto: Rijeka [2018]

### **Program kulturne razmjene**

Work and Travel USA [2019,2021]

Martha's Vineyard, MA, SAD

### **ORGANIZACIJSKE VJEŠTINE**

- Organiziranost
- Prilagodljivost
- Susretljivost
- Proaktivnost

### **KOMUNIKACIJSKE I MEĐULJUDSKE VJEŠTINE**

- Komunikativnost
- Srdačnost
- Timski rad
- Pristupačnost
- Rad s djecom

**DODATNO:** vozačka dozvola B kategorije