

Ekstrakt lišća masline utječe na oksidacijski stres u mozgu dijabetičkih štakora

Zoraja, Rujana

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:510305>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-18**

Repository / Repozitorij:



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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Preddiplomski sveučilišni studij
"Biotehnologija i istraživanje lijekova"

Rujana Zoraja

Ekstrakt lišća masline utječe na oksidacijski stres u mozgu dijabetičkih
štakora izazvanog streptozotocinom

Završni rad

Rijeka, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Preddiplomski sveučilišni studij
"Biotehnologija i istraživanje lijekova"

Rujana Zoraja

Ekstrakt lišća masline utječe na oksidacijski stres u mozgu dijabetičkih
štakora izazvanog streptozotocinom

Završni rad

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
Undergraduate university study
"Biotechnology and drug research"

Rujana Zoraja

Olive leaf extract affects oxidative stress in the brain of diabetic rats induced
by streptozotocin

Final work

Rijeka, 2023.

Mentor of the final work: prof. dr. sc. Jasminka Giacometti

Završni rad obranjen je dana _____

pred povjerenstvom:

1. prof. dr. sc. Anđelka Radojčić Badovinac, predsjednica povjerenstva
2. prof. dr. sc. Dean Marković, član
3. prof. dr. sc. Jasminka Giacometti, mentor
4. doc. dr. sc. Toni Todorovski, zamjenski član

Rad ima 49 stranica, 19 slika, 4 tablice i 61 literaturni navod.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Jasminki Giacometti na pomoći, strpljenju te uloženom vremenu tijekom izrade ovog završnog rada.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Marini Nikolić, izv. prof. dr. sc. Tamari Šoić-Vranić i prof.dr.sc. Snježani Bajek sa Zavoda za anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci na ustupanju uzoraka eksperimentalnog modela dijabetesa.

Posebnu zahvalu upućujem tvrtkama *Kobis, d.o.o., Zagreb* za ustupanje na korištenje demo uređaja NanoDrop One spektrofotometar i *Kemolab, d.o.o., Zagreb* za ustupanje korištenja demo Bead Ruptor 12 homogenizatora.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Dijabetes, tipovi dijabetesa, liječenje dijabetesa.....	1
1.1.1. Dijagnostika i liječenje dijabetesa	5
1.1.2. Komplikacije šećerne bolesti	9
1.2. Uloga oksidacijskog stresa u šećernoj bolesti	10
1.2.1 Oksidacijski stres u dijabetesu i njegove posljedice	10
1.2.2. Učinak oksidacijskog stresa na središnji živčani sustav (SŽS)	14
1.3. Uloga fitoterapije u prevenciji oksidacijskog stresa i kontroli glikemije	16
2. CILJ RADA	20
3. EKSPERIMENTALNI DIO	21
3.1. Materijali i metode.....	21
3.1.1. Kemikalije	21
3.1.2. Protutijela, gelovi i membrane	22
3.2. Eksperimentalni model šećerne bolesti	23
3.3. Metode.....	24
3.3.1. Priprema homogenata mozga	24
3.3.2. Određivanje proteina	24
3.3.3. SDS-PAGE i Western blot analiza.....	25
3.3.4. TBARS	26
3.4. Statistička obrada podataka	27
4. REZULTATI	28
4.1. TBARS	28
4.2. SDS-PAGE	29
4.3. Western blot (WB) analiza	30
4.3.1. WB analiza superoksid dismutaze 1 (SOD1).....	30
4.3.2. WB analiza superoksid dismutaze 2 (SOD2).....	31
4.3.3. WB analiza glutation peroksidaze 1 (GPX1)	33
4.3.4. WB analiza B-aktina (β -Akt)	34

5. DISKUSIJA.....	36
6. ZAKLJUČCI	40
7. LITERATURA.....	41
Životopis	46
Prilog	49

SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Istražiti promjene u ekspresiji antioksidacijskih enzima SOD1, SOD2 i GPX1 u mozgu zdravih, dijabetičkih i dijabetičkih štakora tretiranih polifenolima lišća masline.

Materijal i metode: U eksperimentalnom modelu SZT izazvanog dijabetesa (dijabetes mellitus tip 1, DMT1) i HFD-izazvanog dijabetesa (dijabetes mellitus tip 2, DMT2) korišten je veliki mozak mužjaka Wistar štakora podijeljenih u 4 skupine: C (Kontrola) - kontrolna skupina bez tretmana; DMT1-skupina s razvijenim dijabetesom nakon 8 dana od jednokratnog iniciranja streptozotocina (*i.p.*, 60 mg/kg); DMT1+OLE- skupina s razvijenim dijabetesom i posttretirana *i.p.* iniciranjem ekstrakta polifenola lišća masline (OLE); DMT2-skupina je hranjena visoko-masnom hranom tijekom 30 dana (standardna laboratorijska hrana je obogaćena 50% s palminim uljem). Skupine su sadržavale 3-5 životinja, starosti 2-3 mjeseca. Za procjenu podataka korišten je program Statistica (softverski sustav za analizu podataka), verzija 14 (TIBCO Software Inc., 2020., Palo Alto, CA, SAD). Razlike između skupina procijenjene su jednosmjernom analizom varijance (ANOVA One-way) praćenom *post hoc* Scheffé-ovim testom i Kruskal-Wallis test (višestruka usporedba *p* vrijednosti). Linearna regresijska analiza korištena je za usporedbu međusobne ovisnosti varijabli u skupinama. Statistička značajnost je određena sa *p* vrijednosti manjom od 0,05 ($p < 0.05$) za faktor korelacije R.

Rezultati: U provedenim eksperimentalnim uvjetima, Kruskal-Wallis test pokazao je statistički značajnu razliku vrijednosti MDA između skupina DMT1 i DMT2 ($p=0,0140$).

Statistički značajna razlika ekspresije SOD2 pronađena je između skupina DMT1 i DMT1+PF ($p=0,011$), što znači da terapija ima učinak na ekspresiju mitohondrijskog SOD2. Analizom varijance pronađena je statistička

značajnost promjene ekspresije SOD2 svih ispitivanih skupina ($p=0,009$). SOD2 je pokazao statistički značajnu pozitivnu korelaciju sa SOD1 ($r=0,67$) i negativnu sa GPX1 ($r=-0,74$).

Zaključci: Istraživanjem ekspresije antioksidacijskih enzima SOD1, SOD2 i GPX i razine MDA u mozgu dijabetičnih štakora nakon SZT izazvanog dijabetesa (DMT1) i tretmana ekstraktom polifenola lišća masline utvrdili smo razlike između ispitanih skupina. SOD2 je bio značajno eksprimiran u skupini životinja liječenih ekstraktom polifenola lišća masline.

U skupini hranjenoj visoko-masnom hranom (DMT2) nismo pronašli značajne razlike u odnosu na Kontrolu te razlike DMT1 i DMT2 u mozgu štakora.

Na uravnoteženje antioksidacijskog statusa mozga dijabetičnih životinja vjerojatno ima utjecaj prisutni neenzimski antioksidansi topljivi u lipidima.

Ključne riječi: mozak; dijabetes mellitus; antioksidansi; polifenoli lišća masline; TBARS; SOD1; SOD2; GPX1.

SUMMARY

Research objectives: To study the changes in the expression of antioxidant enzymes SOD1, SOD2 and GPX1 in the brain of healthy, diabetic and diabetic rats treated with olive leaf polyphenols.

Material and methods: In the experimental model of SZT-induced diabetes (diabetes mellitus type 1, DMT1) and HFD-induced diabetes (diabetes mellitus type 2, DMT2), the cerebrum of male Wistar rats was used, which were divided into 4 groups: C (control) - control group without treatment; DMT1 group with developed diabetes after 8 days of single administration of streptozotocin (*i.p.*, 60 mg/kg); DMT1+ OLE - group with developed diabetes and post-treatment *i.p.* by administration of olive leaf polyphenol extract (OLE); DMT2 group was fed a high fat diet (standard laboratory diet enriched with 50% palm oil) for 30 days. The groups consisted of 3-5 animals aged 2-3 months. Statistica (data analysis software), version 14 (TIBCO Software Inc., 2020, Palo Alto, CA, USA) was used for data analysis. Differences between groups were assessed using one-way analysis of variance (ANOVA one-way) followed by post-hoc Scheffé test and Kruskal-Wallis test (multiple comparison of *p*-values). Linear regression analysis was used to compare the interdependence of variables in the groups. Statistical significance is determined with a *p*-value of less than 0.05 ($p < 0.05$) for the correlation factor R.

Results: Under the experimental conditions conducted, the Kruskal-Wallis test showed a statistically significant difference in MDA values between groups DMT1 and DMT2 ($p=0.0140$).

A statistically significant difference in SOD2 expression was found between the DMT1 and DMT1+ PF groups ($p=0.011$), indicating that the therapy has an effect on mitochondrial SOD2 expression. Statistical significance of the change in SOD2 expression in all groups studied was determined by analysis of variance ($p=0.009$). SOD2 showed a statistically significant positive

correlation with SOD1 ($r=0.67$) and a negative correlation with GPX1 ($r=-0.74$).

Conclusions: When the expression of the antioxidant enzymes SOD1, SOD2 and GPX and the MDA level in the brain of diabetic rats after SZT-induced diabetes (DMT1) and treatment with olive leaf polyphenol extract were examined, differences were found between the tested groups. SOD2 was significantly expressed in the olive leaf polyphenol extract treated group.

In the group fed a high-fat diet (DMT2), we found no significant differences compared to the control group and no differences between DMT1 and DMT2 in rat brain.

The balance of the antioxidant status of the brain of diabetic animals is probably influenced by the presence of fat-soluble non-enzymatic antioxidants.

Keywords: brain; diabetes mellitus; antioksidants; olive leaf polifenols; TBARS; SOD1; SOD2; GPX1.

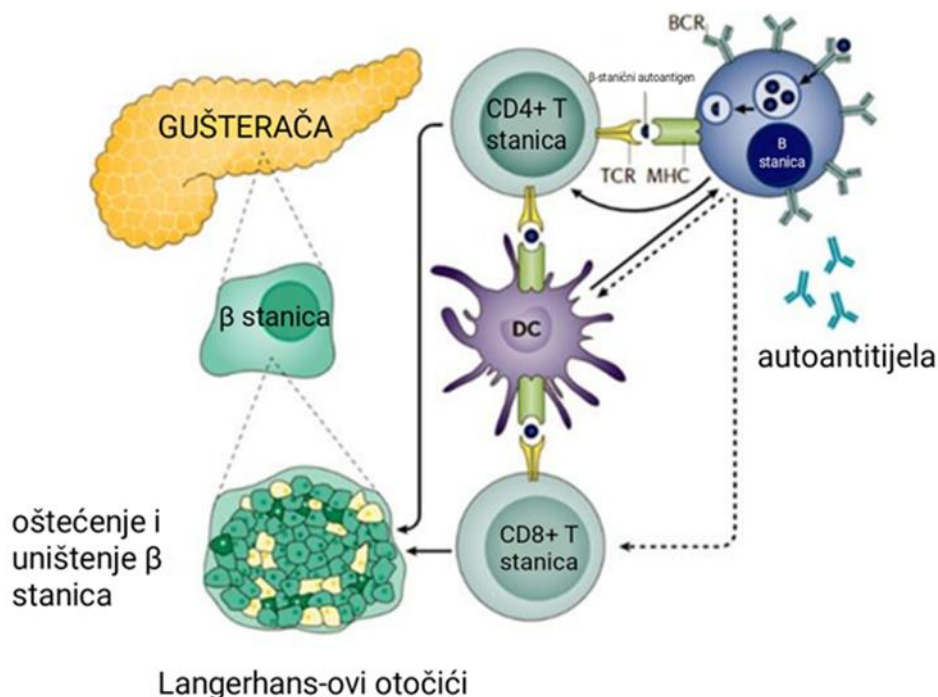
1. UVOD

1.1. Dijabetes, tipovi dijabetesa, liječenje dijabetesa

Ispravna definicija i patofiziologija dijabetesa (*dijabetes mellitus* ili šećerna bolest) je složena, no općenito obuhvaća složene metaboličke poremećaje kojima je zajednička hiperglikemija, odnosno povišena razina glukoze u krvi. Dijabetes se može podijeliti u dijabetes tip 1 (DMT1), dijabetes tip 2 (DMT2), gestacijski dijabetes (GDM), monogeniski dijabetes te sekundarni dijabetes.(1)

Dijabetes mellitus tipa 1 (DMT1) je endokrina i metabolička bolest karakterizirana uništenjem β stanica Langerhansovih otočića gušterače što posljedično uzrokuje inzulinsku deficijenciju i hiperglikemiju.(2)

DMT1 posljedica je okolišnih čimbenika, genetske predispozicije, proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) te neispravnog imunosnog odgovora na prisutnost antigena domaćina koji pokreću autoimuni napad na β stanice gušterače. DMT1 se opisuje kao kronična autoimuna bolest jer dolazi do formiranja autoantitijela koja su biomarkeri razvoja autoimunosti. Stanice imunosnog sustava imaju letalne mehanizme pomoću kojih se bore protiv patogena. U DMT1, stanice imunosnog sustava (limfociti, makrofagi i neutrofili), greškom napadaju β stanice gušterače što uzrokuje njihovo uništenje.(3)

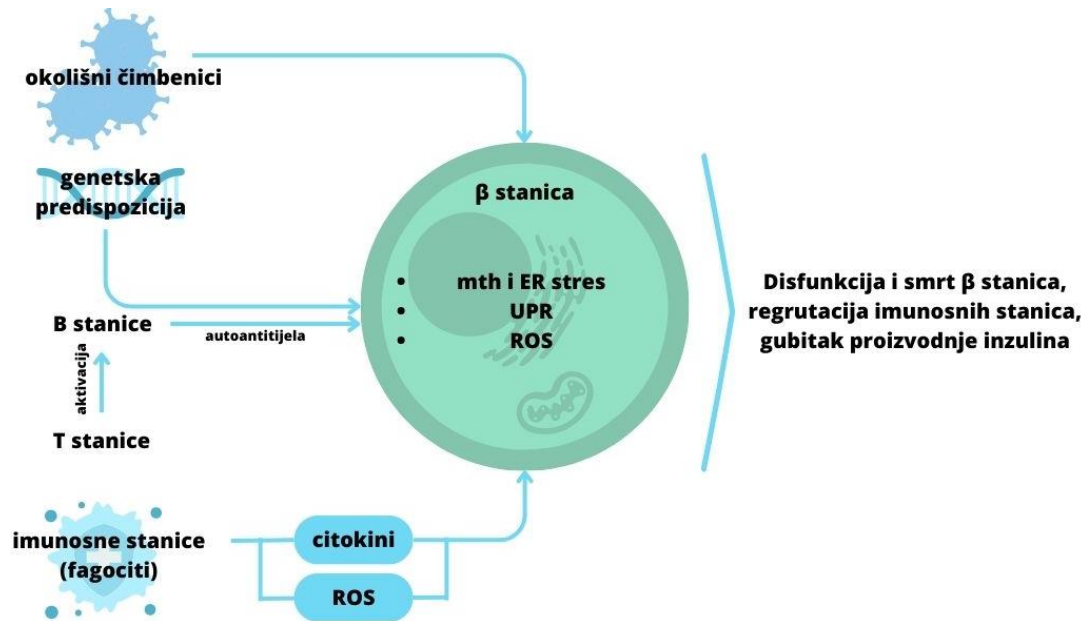


Slika 1. Autoimunost u DMT1 - Organizam stvara autoantitijela koja napadaju stanice koje proizvode inzulin; β stanice u Langerhans-ovim otočićima u gušterači. Pojavom autoantigena dolazi do aktivacije B stanica i posljedičnog stvaranja autoantitijela specifičnih za β stanice. Dendritičke stanice (engl. *Dendritic cells*, DC) prezentiraju autoantigene CD4+ i CD8+ T stanicama. CD4+ T stanice pomažu u aktiviranju B stanica, a CD8+ T stanice napadaju izravno β stanice. Smatra se da aktivirane B stanice stupaju u interakciju s dendritičkim stanicama i CD8+ T stanicama.(2)

Prezentacija autoantigena B stanicama i dendritičkim stanicama potiče aktivaciju T stanica specifičnih za β stanice. Ovaj kompleksni imunosni odgovor dovodi do daljnje produkcije autoantitijela koja napadaju β stanice (slika 1).(2) Aktivirani fagociti, neutrofili te DC, sintetiziraju ROS kako bi odstranili patogene, no u slučaju DMT1, formiranje ROS doprinosi autoimunom napadu. Otpuštanje ROS uzrokuje štetu β stanicama stvaranjem upale te povećanjem autoimunog napada protiv β stanica što dovodi do progresije DMT1.

Upala u otočiću također je povezana s povećanim razinama citokina IL-1β, IL-6, IL-10, IL-17, TNF-α i IFN-γ. Navedene citokine luče imunosne stanice prisutne u otočićima, aktivirane putem imunogeničnih signala disfunkcionalnih β stanica. Citokin IL-1β samostalno, ili u kombinaciji s TNF-α i IFN-γ, uzrokuje

supresiju inzulinske sekrecije te dovodi do daljnje disfunkcije i smrti β stanica.(3) β stanice reagiraju na imunosni stres aktivacijom kompenzacijskih mehanizama, kao što je odmotani proteinski odgovor (engl. *Unfolded protein response*, UPR), kako bi se obnovila stanična homeostaza. Međutim, produljena aktivacija UPR može dovesti do nakupljanja pogrešno savijenih proteina i time disfunkcijom te apoptozom β stanica.(4)



Slika 2. Patogeneza DMT1

Dijabetes mellitus tipa 2 (DMT2) odnosi se na smanjenu osjetljivost odnosno reakciju stanica na prisutnost inzulina unutar organizma.

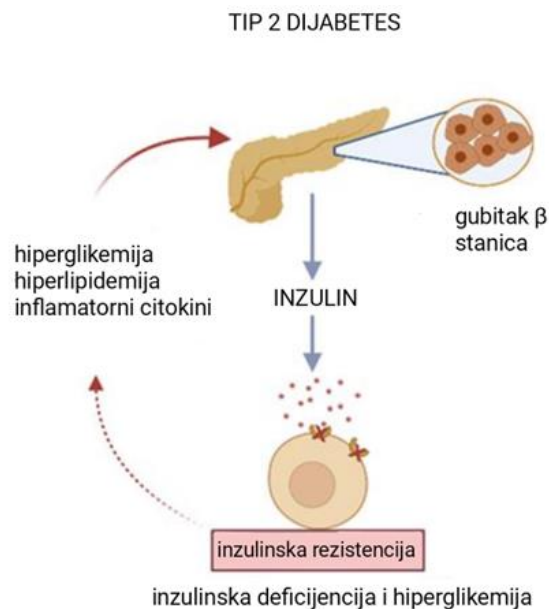
Tip 2 dijabetes mellitus (DMT2) metabolički je poremećaj koji narušava djelovanje i/ili lučenje inzulina, uzrokuje hiperglikemiju i disfunkciju više tkiva i organa. Razvoj DMT2 je složen i uključuje više faktora, pri čemu su genetska predispozicija i nedovoljna tjelesna aktivnost ključne komponente.

Patogeneza DMT2 uključuje disfunkciju i apoptozu β stanica, narušenu oksidaciju masnih kiselina, pretjeranu akumulaciju lipida i disregulaciju jetrenih procesa.(5). Apoptoza β stanica posljedica je stresa endoplazmatskog retikuluma (ER), kronične hiperglikemije i hiperlipidemije, inflamatornih

citokina te oksidacijskog stresa. Navedeni čimbenici uzrokuju smanjenje lučenja inzulina.(5)

Narušena oksidacija slobodnih masnih kiselina u skeletnim mišićima dovodi do njihovog nakupljanja što rezultira razvitkom inzulinske rezistencije.

Disfunkcija u adipoznom tkivu dovodi do narušavanja količine otpuštanja masnih kiselina u cirkulaciju i inzulinske rezistencije.(6) Inzulinska rezistencija sprječava normalnu sintezu glikogena i metabolizam glukoze putem Krebsovog ciklusa što rezultira povećanom lipogenezom. Nadalje, DMT2 uzrokuje povećanu proizvodnju glukoze u jetri (engl. *hepatic glucose production*, HGP).(7)



Slika 3. Tip 2 dijabetes (8)

Inflamatorni citokini poput $\text{TNF-}\alpha$ te IL-6 pridonose patogenezi DMT2 ili blokiranjem djelovanja inzulina ili induciranjem inzulinske rezistencije. DMT2 najčešće se očituje u osoba starijim od 45 godina, no zbog smanjene fizičke aktivnosti, sve je više prisutan u djece i adolescenata.(9)

Gestacijski dijabetes mellitus (GDM) vrsta je dijabetesa koji se javlja tijekom trudnoće, nastankom spontane hiperglikemije.(10,11)

Monogeniski dijabetes vrsta je dijabetesa koji se nasljeđuje autosomno dominantno. Jedan od oblika monogeniskog dijabetesa je Dijabetes zrele dobi kod mladih (engl. *Maturity – onset diabetes of the young*, MODY).(10) MODY, ovisno o mutiranom genu, može uzrokovati hiperglikemiju, inzulinsku rezistenciju te neispravnu regulaciju i funkciju β stanica.(12)

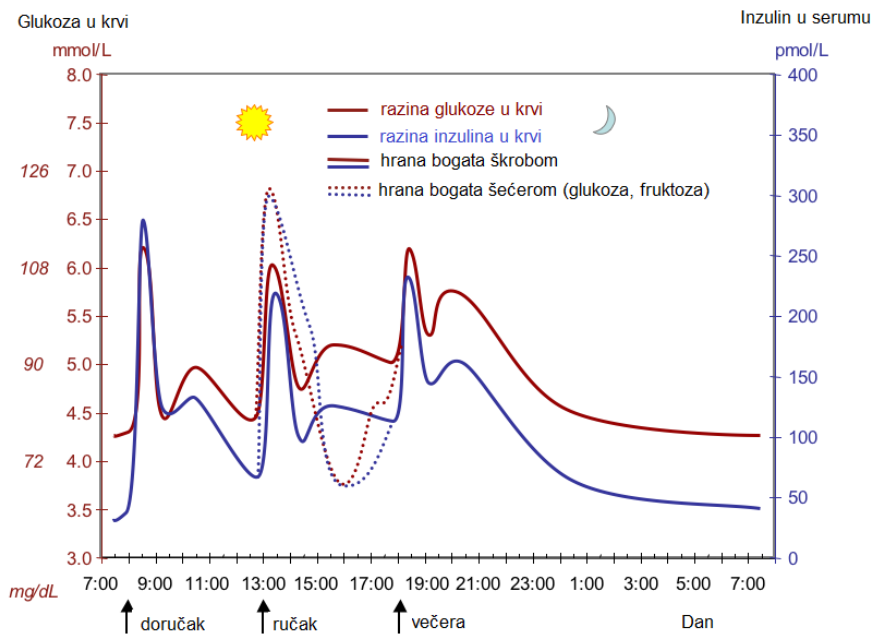
Sekundarni dijabetes posljedica je endokrinih i neendokrinih poremećaja. Poremećaji endokrinog sustava mogu dovesti do neuravnoteženosti homeostaze razina glukoze. Pretpostavlja se da osim poremećaja, određene mutacije i pojedini lijekovi uzrokuju sekundarni dijabetes.(13)

1.1.1. Dijagnostika i liječenje dijabetesa

Posljedice dijabetesa su mnogobrojne te je važno da se dijagnosticira u ranim fazama bolesti.(14)

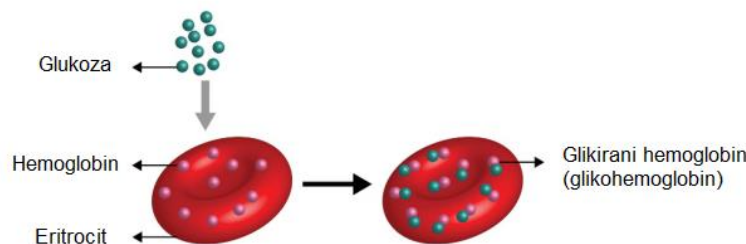
Fluktuacije šećera u krvi i hormona inzulina koji snižava šećer u ljudi tijekom dana s tri obroka prikazana je u slici 4.

Najčešći oblici dijagnostike dijabetesa su testovi HbA1c, oralni glukozni test tolerancije (engl. *Oral glucose tolerance test*, OGTT), šećer u krvi natašte (engl. *Fasting blood sugar*, FBS) i glukoza u krvi natašte (engl. *Fasting plasma glucose*, FPG) koji mjere glukozu u krvi najmanje 8 sati od posljednje konzumacije hrane. To su često prvi testovi koji se rade za provjeru predijabetesa i dijabetesa.(14)



Slika 4. Fluktuacije šećera u krvi (crveno) i hormona inzulina koji snižava šećer (plavo) kod ljudi tijekom dana s tri obroka. Naglašen je jedan od učinaka obroka bogatog šećerom u odnosu na obrok bogat škrobom.(15)

Hemoglobin A1C (HbA1c)



Slika 5. HbA1c test (16)

Test glikiranog hemoglobina (HbA1c) omogućuje uvid u prosječnu razinu glukoze u krvi pojedinca u prethodna 2-3 mjeseca koja korelira s procijenjenim poluživotom eritrocita.(17)

OGTT test mjeri koliko dobro će stanice apsorbirati glukozu nakon konzumacije 75 g glukoze. Ako je razina glukoze u plazmi ≥ 11.1 mmol/L, tada se pojedinac dijagnosticira kao dijabetičar. FPG testom moguće je utvrditi da pojedinac

nema toleranciju na glukozu ukoliko nakon konzumacije 75 g glukoze ima razinu glukoze u plazmi ≥ 7.8 mmol/L. (14)

Tablica 1. Spektar homeostaze glukoze i dijabetes melitus (DM).(18)

	Normalna razina glukoze u krvi	Predijabetičko stanje	Stanje dijabetesa
FPG	< 100 mg/dL (< 5,6 mmol/L)	100-125 mg/dL (5,6-6,9 mmol/L)	> 126 mg/dL (> 7,0 mmol/L)
2 sata glukoza u plazmi	< 140 mg/dL (< 7,8 mmol/L)	140-199 mg/dL (7,8-11 mmol/L)	> 200 mg/dL (>11,1 mmol/L)
HbA1c	< 5,6 %	5,7-6,4%	> 6,5%

Liječenje DMT1 uključuje terapiju inzulinom kako bi se održale homeostazne razine glukoze u krvi. To je omogućeno uz nadomještanje razina inzulina pomoću egzogenih kratkodjelujućih/dugodjelujućih inzulinskih zamjena te uz često kapilarno praćenje glukoze u krvi i količine ugljikohidrata u prehrani. (2)

Liječenje DMT2 podrazumijeva promjenu načina života te korištenje antihiperglikemijskih sredstava poput biguanida, inhibitora DPP-IV, sulfonireje i dr. (tablica 2) (19)

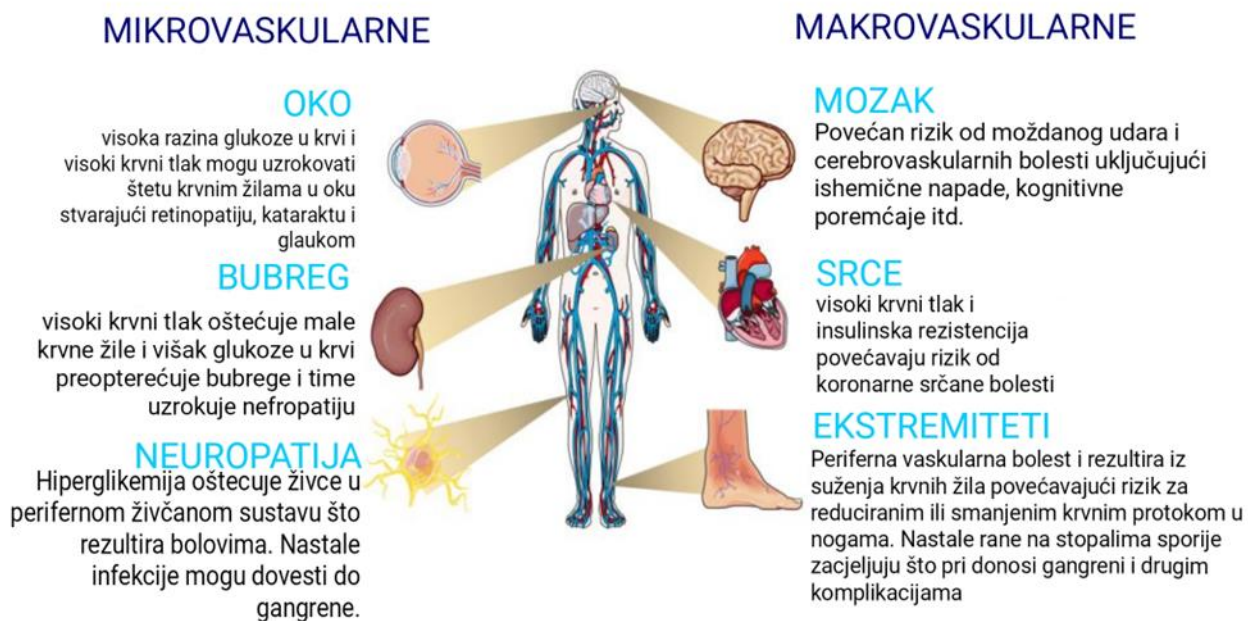
Tablica 2. Lijekovi u dijabetes mellitusu (DM) (19)

Vrsta	Tip DM/grupa	Lijek (<i>komercijalni naziv</i>)
Biguanidi	DMT2	Metformin (<i>Glucophage, Fortamet</i>)
Sulfonilureja	DMT2	(<i>Gliclazid, Glimepirid, Glipizid, Glibenclamid, Tolbutamid</i>)
Meglitinidi	DMT2	Repaglinid, Nateglinid
Tiazolidinedioni (TZD)	DMT2	Pioglitazon
GLP-1 receptor agonisti	DMT2	Dulaglutid, Liraglutid, Liksisenatid, Albiglutid, Eksenatid (<i>Trulicity, Tanzeum, Bydureon, Victoza</i>)
DPP-IV inhibitori	DMT2	Sitagliptin, Linagliptin, Alogliptin, Vildagliptin, Saksagliptin (<i>Januvia, Onglyza, Nesina</i>)
SGLT-2 inhibitori	DMT2	Dapagliflozin, Empagliflozin, Canagliflozin (<i>Invokana, Farxiga, Jardiance</i>)
Inzulin	DMT1/ Brzo-, srednje- i dugodjelujući	<i>Tresiba, Toujeo, Afrezza, Levemir, Lantus</i>
α -glukozidaza inhibitor	DMT2	Akarboza
Kombinacije lijekova		<i>Janumet, Jentadueto, Kombiglyze, Tradjenta, Kazano, Oseni</i>

1.1.2. Komplikacije šećerne bolesti

Visoke razine glukoze u krvi izazvane dijabetesom rezultiraju u dijabetičkoj nefropatiji, retinopatiji, neuropatiji te dijabetičkoj katarakti (slika 6). Dijabetes uzrokuje oštećenje glomerularnih kapilara, a time uzrokuje pojavu proteina u urinu. Napretkom bolesti, dolazi do povećanja osmotskog tlaka u žilama retine i njihovog potencijalnog puknuća što uzrokuje oslabljenu opskrbu mrežnice krvlju te posljedično dolazi do stvaranja ožiljnog tkiva i oštećenja vida. Još jedna komplikacija dijabetesa je upala gušterače koja može dovesti do obstruktivnog pankreatitisa. DM u nekim slučajevima može dovesti do bolesti srca i srčane smrti. Pojedinci koji boluju od DM-a izloženi su posljedicama povezanim sa slobodnim radikalima. Dijabetes se također dijagnosticira kao snažan čimbenik rizika za razvitak raka.(14)

GLAVNE KOMPLIKACIJE DIJABETESA



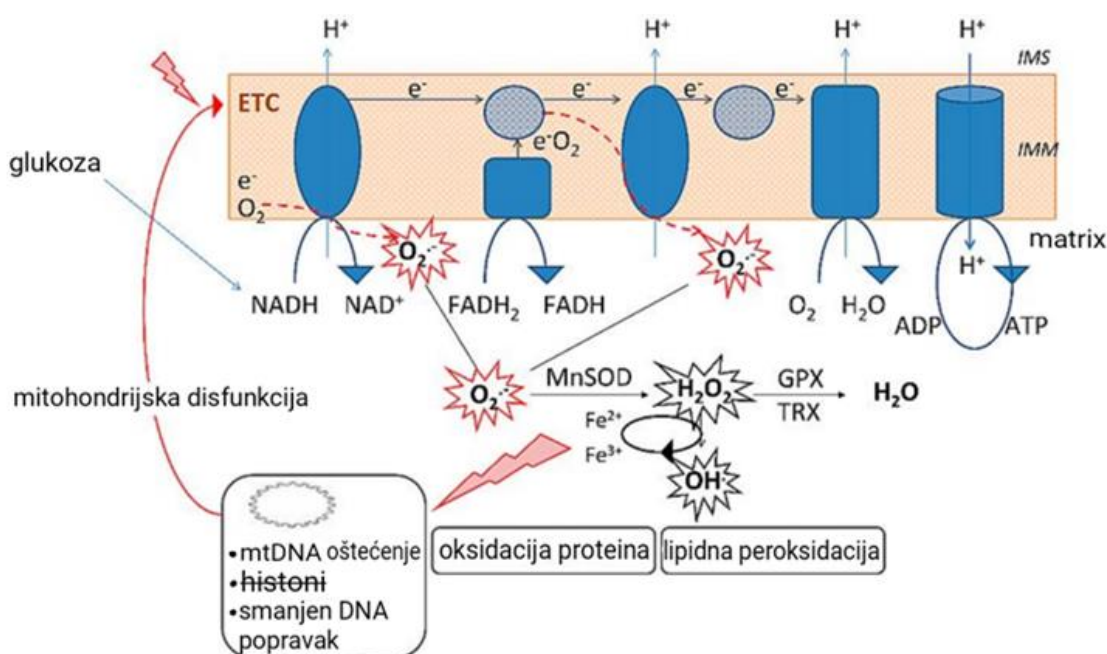
Slika 6. Glavne komplikacije u dijabetesu (20)

1.2. Uloga oksidacijskog stresa u šećernoj bolesti

1.2.1 Oksidacijski stres u dijabetesu i njegove posljedice

Produkcija ROS dio je normalnog staničnog metabolizma.(21)

Kao produkt metaboličkih puteva koji se odvijaju na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani, nastaju i reaktivne kisikove vrste poput superoksidnog aniona, hidrogen peroksida te hidroksilnog radikala. ROS imaju važnu ulogu u staničnoj funkciji, obrani protiv patogena, regulaciji signalizacije u stanici, preživljavanju te proliferaciji.(3)



Slika 7. Stvaranje mitohondrijskog superoksida ($O_2^{\bullet-}$) putem lanca elektronskog transporta (engl. *electron transport chain*, ETC) i uloga enzima mangan superoksid dismutaze (MnSOD), enzima za neutralizaciju superoksida prisutnog u unutrašnjosti mitohondrija, u procesu detoksikacije. Povišene razine $O_2^{\bullet-}$ uzrokuju oštećenje makromolekula, uključujući lipide, proteine i nukleinske kiseline te potiču disfunkciju mitohondrija. Odsutnost histona u mitohondrijskoj DNA (mtDNA) i ograničeni mehanizmi popravka DNA čine mitohondrije izrazito osjetljivima na oštećenje DNA inducirano $O_2^{\bullet-}$.

ADP: Adenozin difosfat; ATP: Adenozin trifosfat; GPX: Glutation peroksidaza; H₂O₂: Vodikov peroksid; IMM: Unutarnja mitohondrijska membrana; IMS: Međumembranski prostor; O₂^{•-}: Superoxidni anion; OH[•]: Hidroksilni radikal; TRX: Tioredoksin reduktaza.(21)

ROS su visoko reaktivne molekule i potencijalno mogu dovesti do oštećenja proteina, nukleinskih kiselina i lipida. Stanični odgovor na prisutnost ROS je aktivacija obrambenih mehanizama pomoću kojih se regulira proizvodnja ROS te na taj način sprječava oksidativno oštećenje. Primarni obrambeni mehanizmi su enzimski antioksidansi – superoksid dizmutaza (SOD), katalaza (CAT), te glutacion peroksidaza (GPx). Navedeni enzimi uklanjaju višak ROS i na taj način održavaju staničnu homeostazu.(21)

Tablica 3. Antioksidansi u enzimskoj inaktivaciji slobodnih radikala (22)

Enzimski antioksidansi	Lokacija	Enzimska reakcija
Superoksid dismutaza: EC-SOD Mn-SOD Cu-Zn-SOD	Mitohondrij	$O_2^{\bullet-} + SOD \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Katalaza	Peroksisom	$2H_2O_2 + CAT \rightarrow 2H_2O + O_2$
Glutation peroksidaza, GPx	Mitohondrij/citosol	$2GSH + 2H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O + O_2$

Tijekom hiperglikemije, povećane razine NADH i FADH₂ dovode do povećanja transporta elektrona kroz respiratorni lanac mitohondrija što potiče proizvodnju ROS. Pretjerana razina glukoze u krvi može uzrokovati vezanje glukoze za aktivno mjesto SOD-a i glikacijom smanjiti aktivnost SOD. Superoxidni anion (O₂^{•-}), prekursor većine vrsta ROS, nastaje transferom jednog elektrona (e⁻) na molekulu kisika. NADPH oksidaza (NOX) i Xantin oksidaza su enzimi koji mogu stvoriti superoksidni anion kao produkt njihove normalne funkcije. Hidrogen peroksid (H₂O₂) nastaje dizmutacijom O₂^{•-} uz pomoć SOD enzima. H₂O₂ parcijalno može biti reduciran kako bi generirao

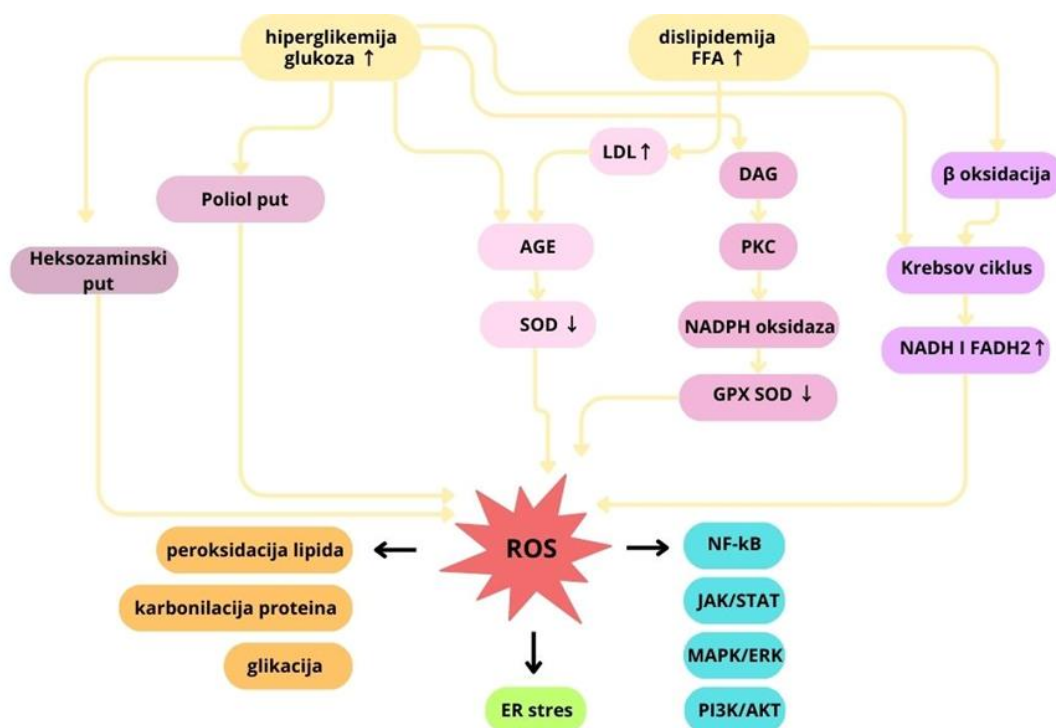
hidroksidni ion i hidroksilni radikal ($\text{OH}\bullet$) redukcijom prijelaznih metala. Kompletna redukcija H_2O_2 u H_2O može se odviti pomoću CAT i GPx.(21)

Hiperglikemija uzrokuje nakupljanje ROS-ova pomoću različitih mehanizama. Put DAG-PKC-NADPH oksidaze je jedan od puteva koji se aktivira hiperglikemijom i uzrokuje produkciju ROS. Hiperglikemija uzrokuje povišene razine DAG koji zatim aktivira PKC koja zatim stimulira NADPH oksidazu da stvara ROS.(23)

Aktivacija poliolnog puta uzrokuje depleciju NADPH i GSH što dovodi do akumulacije fruktoze koja može uzrokovati oksidacijski stres putem neenzimske glikacije.(2,23)

Hiperglikemija uzrokuje i pretjeranu aktivaciju heksozaminskog puta koji je odgovoran za izgradnju glikozilnih lanaca u proteinima i lipidima. Tijekom hiperglikemije, velika količina fruktoza-6-fosfata ulazi u put te u konačnici dolazi do modifikacije proteina.(2, 24)

Povećana proizvodnja ROS u DM može inducirati lipidnu peroksidaciju, karbonilaciju proteina te glikaciju. Peroksidacija membranskih lipida narušava fluidnost i strukturu membrana te narušava stanične funkcije. ROS mogu oksidirati lipoprotein niske gustoće (engl. *Low density lipoprotein*, LDL) u izvanstaničnom matriksu što doprinosi stvaranju plakova. ROS može izravno reagirati sa slobodnim sulfhidrilnim skupinama, što rezultira oksidativnim modifikacijama i posljedično ER stresom jer dolazi do nakupljanja nesmotanih i/ili pogrešno smotanih proteina u lumenu ER-a. Izlaganjem proteina šećerima (glukozi i fruktozi) nastaju glikirani proteini i lipidi (engl. *Advanced glycation end products*, AGE) koji stimuliraju upalni odgovor otpuštanjem proupalnih citokina te promicanjem napredovanja plakova i oksidacijskog stresa.(23)



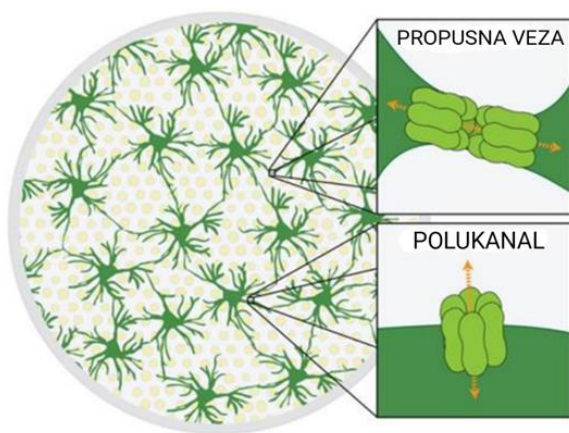
Slika 8. Oksidacijski stres u DM.

ROS djeluju kao signalne molekule koje aktiviraju nekoliko puteva osjetljivih na stres. ROS aktiviraju MAPK/ERK signalni put koji se sastoji od više proteina čija je funkcija stanična proliferacija, diferencijacija, motilnost, odgovor na stres, apoptoza te stanično preživljavanje.(23,25) ROS mogu aktivirati JAK/STAT signalni put koji je esencijalan za proliferaciju, diferencijaciju, migraciju i apoptozu.(26,27) Signalni put koji uključuje aktivaciju NF-κB uzrokuje ekspresiju gena uključenih u proinflamatorni odgovor (oštećenje vlastitih tkiva) te aktivacije Bcl proteina uključenih u regulaciju apoptoze.(3,28) ROS mogu deaktivirati ili aktivirati dijelove PI3K-Akt signalnog puta i na taj način utjecati na promjer krvnih žila i protok krvi. Put je također uključen u migraciju stanica i odgovor na faktore rasta.(23,29)

1.2.2. Učinak oksidacijskog stresa na središnji živčani sustav (SŽS)

Kao što je prethodno navedeno, hiperglikemija uzrokuje niz komplikacija više organa i tkiva, što uključuje i središnji živčani sustav (slika 6). Hiperglikemija uzrokovana dijabetesom dovodi do promjena u krvnom protoku, promjene integriteta krvno-moždane barijere (engl. *Blood brain barrier*, BBB), promjene u metabolizmu mozga, neurotransmiterima te utječe na kognitivne funkcije. (30)

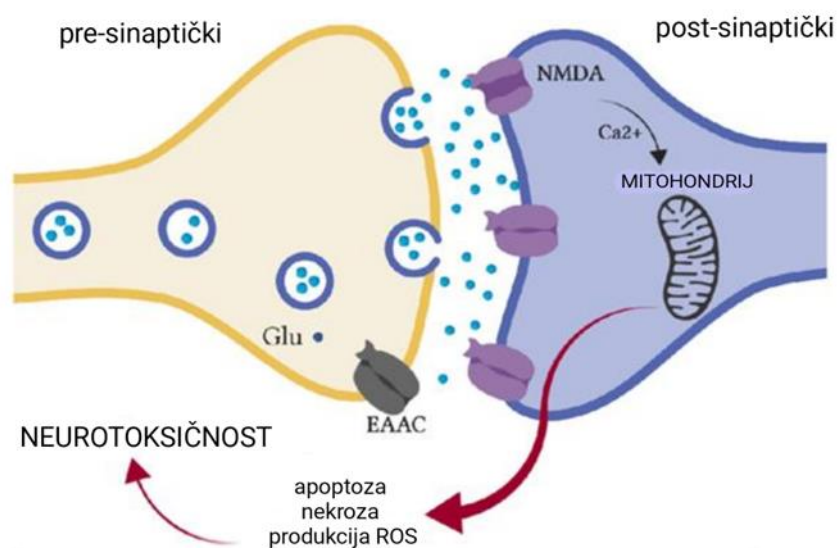
Astrociti su stanice SŽS te je njihova zadaća održavanje homeostaze u mozgu. Astrociti reguliraju unos glutamata, opskrbljuju neurone nutrijentima, puferiraju ione kalija te pružaju antioksidacijski učinak neuronima. Protein propusne veze (engl. *Gap junction protein*), Koneksin 43 (engl. *Connexin 43*, Cx43), nalazi se na membrani astrocita i važan je za njihovu funkciju (slika 9) – stvara spojne kanale koji omogućuju međustaničnu difuziju malih molekula i iona poput glutamata, glutationa, glukoze, ATP-a, Ca^{2+} , Na^{2+} , K^{+} i drugih. (31) Visoke razine glukoze utječu na SŽS na način da narušavaju propusnu vezu između stanica astrocita i time utječu na smanjenje u njihovoj komunikaciji. (30) Osim smanjenja komunikacije uzrokovanog hiperglikemijom, prekomjerni oksidacijski stres utječe na ekspresiju i funkciju Cx43 u astrocitima na način da dolazi do degradacije propusnih veza koje tvore Cx43. (31)



Slika 9. Propusna veza u stanicama astrocita (32)

Hiperglikemija uzrokuje narušavanje funkcije i signalizacije Cx proteina i u retinalnim pericitima. Zajedno, poremećaji u propusnim vezama dovode do problema s mikrovaskulaturom mozga te smanjenja osjetilnih i kognitivnih funkcija.(30)

Hipoglikemija može uzrokovati nekrozu neurona u SŽS na način da dovodi do energetskeg deficita i ispuštanja ekscitatornih aminokiselina (aspartat i glutamat). Ekscitatorne aminokiseline su neurotransmiteri koji stimuliraju ekspresiju ekscitatornih receptora u dendritima neurona koji uzrokuju protok kalcijevih iona u neurone i time induciraju neuronalnu nekrozu (slika 10).(34)



Slika 10. Neuronalna nekroza i neurotoksičnost izazvana protokom kalcijevih iona (33)

Astroцити osiguravaju preživljavanje neurona tijekom nedostatka glukoze. U stanju hipoglikemije, astroцити su odgovorni za opskrbu neurona energijom. Glikogen pohranjen u astroцитима štiti od hipoglikemijom induciranoг оštećenja mozga i osigurava održavanje neuronalnih funkcija tijekom energetske deprivacije.(34)

Akumulacija unutarstaničnog kalcija uzrokuje lipolizu odnosno povećanje razina slobodnih masnih kiselina. Proces lipolize rezultira oslobađanjem

reaktivnih kisikovih vrsta i kemotaksijom neutrofila što uzrokuje upalu i oštećenje stanice. Ako stanica ne uspije regulirati pretjerano nakupljanje kalcija, funkcija neurona se poremeti na način da dolazi do pada membranskog potencijala te disfunkcije u ATP sintazi (hidroliza ATP-a).(34)

1.3. Uloga fitoterapije u prevenciji oksidacijskog stresa i kontroli glikemije

Globalna prevalencija dijabetesa i dalje raste djelomično zbog brze urbanizacije i porasta starosti stanovništva. To je povezano s paralelnim porastom prevalencije dijabetičkih vaskularnih komplikacija koje značajno pogoršava šećerna bolest. Stoga još uvijek postoji potreba za sigurnim i učinkovitim alternativnim/adjuvantnim terapijskim intervencijama. Sve je veća potreba za terapijskim opcijama koje pružaju prirodni proizvodi, naročito onima biljnog porijekla. Oksidacijski stres izazvan hiperglikemijom ključan je za razvoj dijabetesa i dijabetičkih komplikacija. Nadalje, upala izazvana oksidacijskim stresom i inzulinska rezistencija ključni su za oštećenje endotela i napredovanje dijabetičkih komplikacija. Istraživanja na ljudima i životinjama pokazale su da polifenoli mogu smanjiti oksidacijski stres, hiperglikemiju i spriječiti dijabetičke komplikacije uključujući dijabetičku retinopatiju, dijabetičku nefropatiju i dijabetičku perifernu neuropatiju. Dio terapijskih učinaka polifenola pripisuje se njihovom modulacijskom učinku na endogene antioksidativne sustave.

Fitokemikalije su sekundarni kemijski metaboliti koji se prirodno pojavljuju u voću, povrću i bilju za koje se zna da imaju različite strukture i mogu promicati zdravstvene dobrobiti kod ljudi.(35) One su ključne za rast, razvoj i zaštitu

biljaka, uključujući zaštitu od štetnih insekata i mikroorganizama, kao i od ekstremne temperature i izloženosti ultraljubičastom zračenju. (36)

Farmakološki aktivni sastojci iz tradicionalnih ljekovitih biljaka dobili su veliku pozornost kao izvori novih spojeva, farmaceutskih međuproizvoda i kemijskih izvora za sintetske ili polusintetske lijekove zbog njihovog snažnog farmakološkog djelovanja, niske toksičnosti i ekonomske održivosti. Iz tradicionalnih ljekovitih biljaka izolirane su brojni spojevi, uključujući alkaloida, flavonoide i terpenoide, a kliničke i eksperimentalne studije upućuju da ti spojevi imaju korisna farmakološka svojstva kao što su antiinfektivni, antioksidativni i protuupalni učinci.

Neke fitokemikalije prepoznate su kao bioaktivni sastojci uobičajeno dostupnih lijekova poput salicilata dobivenih iz kore vrbe koji su prisutni u aspirinu, kinin koji se nalazi u kori kina i koristi se za liječenje malarije. (37,38) Međutim, najveću skupinu fitokemikalija u biljkama čine polifenoli (npr. flavanoni, flavonoidi) zbog svoje sposobnosti hvatanja slobodnih radikala. (39)

Učinci antioksidacijskih fitokemikalija na endogene puteve antioksidansa odnose se na učinke na mitohondrijski razdvojni protein 2 (UCP2) i mitohondrijske funkcije u dijabetičkim komplikacijama, glutation peroksidazu 4 (GPx4) i koenzim Q (CoQ) u dijabetičkim komplikacijama i ferroptozu, SIRT proteine, učinke polifenola na nuklearni faktor (2) sličan 2 (Nrf2) i endogeni antioksidacijski sustav (tablica 4). Važno je naglasiti da je mitohondrijsko stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) ključno je za oksidacijski stres izazvan hiperglikemijom i pridonosi razvoju i napredovanju dijabetičkih komplikacija.

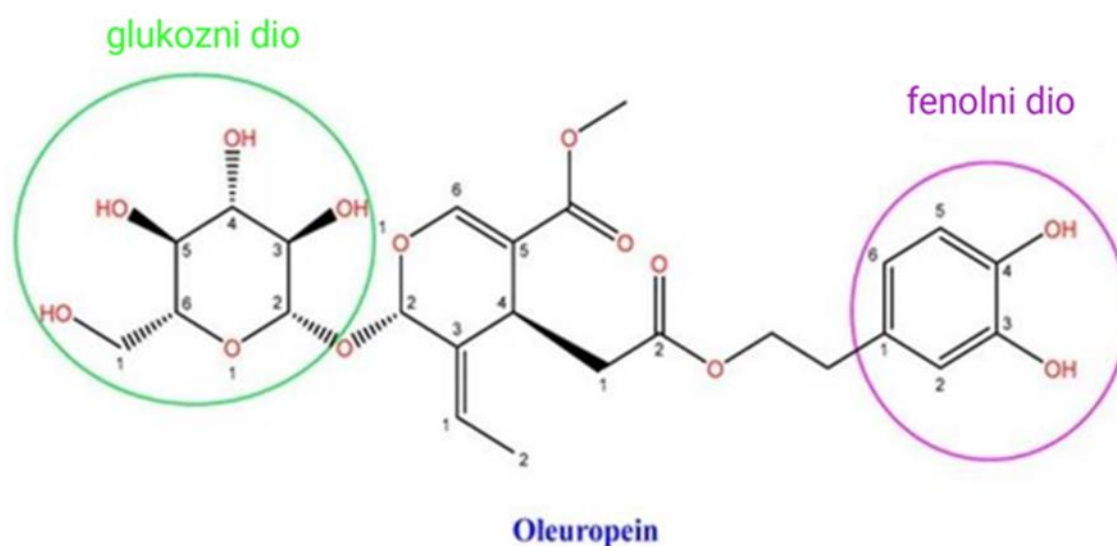
Tablica 4. Primjeri učinaka polifenola na endogene antioksidativne sustave u dijabetičkim stanjima. (40)

Antioksidacijski sustav	Primjeri polifenola	Učinak
UCP2/mitochondrialni kompleks 1	Kavena kiselina Antocijanini	<i>In vitro</i> zaštita stanica retine, poboljšanje mitohondrijske funkcije (41) Poboljšanje rad srca očuvanjem funkcije mitohondrija u životinjskom modelu dijabetesa (42)
SIRT proteini	Resveratrol	Poboljšana aktivnost GSH, CAT SOD i funkcija mitohondrija putem aktivacije SIRT1/PGC-1 α /FOXO3a.
GSH/GPx4/Xc– sustav (inhibicija ferroptoze)	Glabridin i kalikozin	Reno-protektivni učinak u modelu dijabetičke nefropatije (DN) u štakora (43)
	Naringenin	Kardio-protektivni učinak (44)
	Astragalozid-IV	<i>In vitro</i> zaštita stanica retine (45)
	Kvercetin i kriptoklorogenska kiselina	Zaštita funkcije β -stanica (46)
Nrf-2	Epigallocatehin-3-galat (EGCG)	Reno-protectivni učinak u DN (47)
	Kurkumin	Zaštitni učinak kod oštećenja retine u dijabetesu (48)

Oleuropein je fenolni spoj koji se nalazi u lišću i plodu masline. List masline ima najveći udio oleuropeina u fenolnoj frakciji. U posljednje se vrijeme istražuje zbog svojih pozitivnih učinaka na organizam. *In vitro* i *in vivo* studije pokazale su da oleuropein ima antioksidativna, antimikrobna, antifungalna, kardioprotektivna, antitumorska i hipolipidemijska svojstva. Antioksidacijski učinak oleuropeina potječe iz njegove hidroksilne skupine koja donira atom vodika i na taj način sprječava oksidaciju (slika 11). Oleuropein može ukloniti slobodne radikale (engl. *radical scavenger*). Istraživanja pokazuju da

oleuropein može smanjiti mogućnost stvaranja ROS i reaktivnih dušikovih vrsta (RNS) u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. Također, oleuropein povećava aktivnost i razinu enzimskih antioksidansa poput SOD, GPx, i CAT i reducira peroksidaciju lipida i inhibira oksidaciju LDL kolesterola.(49,50)

Genoprotektivni učinak oleuropeina može smanjiti oštećenje DNA uzrokovano oksidacijskim stresom aktivacijom sistemskih antioksidacijskih sustava. Pronađeno je da oleuropein također inhibira ekspresiju iNOS, sprječava stvaranje karboniliranih proteina te povećava aktivnost važnih enzima uključenih u metaboličke procese.(51)



Slika 11. Kemijska struktura oleuropeina (52)

2. CILJ RADA

Glavni cilj rada bio je utvrditi učinak terapije polifenolnog ekstrakta izdvojenog iz lišća masline na oksidacijski stres izazvan dijabetesom i mozgu štakora.

Glavni cilj rada podijeljen je na više zadataka koji se odnose na:

- Utvrđivanje lipoperoksidacije određivanjem razine malonaldehida (MDA) u tkivu mozga u dijabetičnoj (DMT1), dijabetičkoj skupini liječenoj ekstraktom polifenola lišća masline (DMT1+PF) i skupini hranjenoj s visoko-masnom hranom (DMT2);
- Utvrđivanje ekspresije enzimskih antioksidansa SOD1, SOD2 i GPX1 u mozgu mužjaka Wistar štakora Western blot (WB) analizom;
- Utvrđivanje ekspresije enzimskih antioksidansa SOD1, SOD2 i GPX1 u mozgu mužjaka Wistar štakora kojima je dijabetes izazvan streptozotocinom (SZT) Western blot (WB) analizom;
- Utvrđivanje ekspresije enzimskih antioksidansa SOD1, SOD2 i GPX1 u mozgu mužjaka Wistar štakora hranjenima visoko-masnom hranom (HFD) Western blot (WB);
- Utvrđivanje učinka terapije polifenolnog ekstrakta izdvojenog iz lišća masline na oksidacijski stres izazvan dijabetesom analizom ekspresije SOD1, SOD2 i GPX1 Western blot (WB) analizom;
- Statističku procjenu dobivenih rezultata.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

Ekstrakt lišća masline (OLE) pripremljen je S-L ekstrakcijom uz pomoć ultrazvuka (Sonopuls model HD 2070, Bandelin, Berlin, Njemačka) te analiziran primjenom sustava Agilent 1290 UPLC-DAD metodom (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) prema metodi Giacometti i sur (53). Polifenolni ekstrakt lišća masline (OLE) otopljen u sterilnoj fiziološkoj otopini korišten je u terapiji (TOLE). Primijenjena doza OLE bila je 1024 mg/kg, a koncentracija oleuropeina u ekstraktu je bila 45,96 mg/kg. (54)

3.1.1. Kemikalije

Kemikalije za ekstrakciju i analizu OLE: etanol, mravlja kiselina, metanol i acetonitril (HPLC čistoće) su nabavljeni od J.T. Baker (Avantor Performance Materials B.V., Deventer, Nizozemska). Oleuropein (OLE) i drugi korišteni standardi fenolnih spojeva su nabavljeni od Extrasynthese (Genay CEDEX, Francuska). Čista voda dobivena je sustavom za pročišćavanje GenPure™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA 02451, USA).

Kemikalije za određivanje TBARS: 2- tiobarbiturna kiseline (TBA, $C_4H_4N_2O_2S$), dimetil sulfoksid (DMSO, $(CH_3)_2SO$), trikloroctena kiselina (TCA, Cl_3CCOOH) i 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP, $(C_2H_5O)_2CHCH_2CH(OC_2H_5)_2$) nabavljeni su od Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD).

Ostale kemikalije: Tris-(hidroksimetil)-aminometan (TRIS baza, $NH_2C(CH_2OH)_3$) i 1, 4- ditiotreitol (DTT, $(C_2H_3OHSH)_2$) su nabavljeni od Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD). Glicin (NH_2CH_2COOH) je nabavljen od Bio-Rad (Hercules, CA, USA). TWEEN® 20 Detergent (polietilen glikol sorbitan monolaurat) je nabavljen od Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Amonijev

persulfat (APS, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) i natrijev dodecilsulfat (SDS, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$) su nabavljeni od Alfa Aesar (Thermo Fisher (Kandel) GmbH, Landau, Njemačka). Mlijeko u prahu, akrilamid/bis-akrilamid (4X, 37.5:1) i TEMED (tetrametiletilendiamin, $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$) su nabavljeni od Applichem (Darmstadt, Njemačka). Ponceau S je nabavljen od Carl Roth (Karlsruhe, Njemačka). Klorovodična kiselina (HCl) i etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), 96%-tni su nabavljeni od Gram-Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska). Metanol (HPLC čistoće) je nabavljen od J. T. Baker (Avantor Performance Materials B.V., Deventer, Nizozemska). NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x) i NuPAGE® Antioxidant su nabavljeni od Invitrogena (Carlsbad, Kalifornija, USA). Pierce™ ECL Western Blotting Substrate i PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder su nabavljeni od Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). Malondialdehid bis(dietil acetal) je nabavljen od Acros Organics (Geel, Belgija). TCA (trikloroetena kiselina, $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$) i BHT (butilhidroksitoulén, $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$) su nabavljeni od Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD). Tiobarbiturna kiselina (TBA, $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) i etil-acetat ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) su nabavljeni od Kemike (Zagreb, Hrvatska).

3.1.2. Protutijela, gelovi i membrane

Gelovi: Pripremljeni gelovi u laboratoriju su sadržavali gel za sabijanje (4%, pH 6,8) i gel za razdvajanje (12%, pH 8,8).

Ostalo:

Kitovi: Pierce™ BCA Protein Assay Kit (kat.br. 23227) nabavljen od Thermo Scientific (Rockford, IL, USA).

Primarna protutijela: GPX1 (kat.br. M01019, monoklono, zečje, gen Gpx1, razr. 1:1000), SOD1 (kat.br. M00238, monoklono, zečje, gen Sod1, razr. 1:1000) i SOD2 (kat.br. M00349, monoklono, zečje, gen Sod2, razr. 1:1000) nabavljeni su od Booster Biological Technology (Pleasanton, CA,

USA). β -aktin (kat.br.4970, monoklono, zečje, razr. 1:1000) nabavljen je od Cell Signaling (CST, Leiden, Nizozemska).

Sekundarna protutijela: Peroksidaza-konjugirani (HRP) kozji anti-zečji IgG (H+L) (Booster Biological Technology, Pleasanton, CA, USA, razr. 1 : 5000).

Roti-PVDF 0,45 μ m membrana (Kat.br. D-76185, Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka) korištena je za transfer proteina za WB.

3.2. Eksperimentalni model šećerne bolesti

U radu su korištene lijeve polutke mozga mužjaka Wistar štakora, podijeljenih u 4 skupina životinja: **C (Kontrola)** - kontrolna skupina bez tretmana; **DMT1**-skupina s razvijenim dijabetesom nakon 8 dana izazvanim *i.p.* iniciranjem streptozotocina (SZT); **DMT1+OLE**- skupina s razvijenim dijabetesom nakon 8 dana izazvanim *i.p.* iniciranjem streptozotocina (SZT) i posttretirane *i.p.* iniciranjem ekstrakta polifenola lišća masline, koncentracije 1024 mg/kg; **DMT2**-skupina je 30 dana hranjena standardnom laboratorijskom hranom 50% (w/w) obogaćenom palminim uljem. Skupine su sadržavale 3-5 životinja, starosti 2-3 mjeseca. Životinje su svakodnevno vagane, te im je praćena razina glukoze, razina triglicerida i ukupnog kolesterola u perifernoj krvi pomoću testnih trakica i Akku Chek analizatora (Roche Diabetes Care, USA).(55)

Dizajn eksperimenta opisan je u istraživačkom projektu MZOS „335-0000000-0221“ mentora ovog rada. Svi eksperimentalni postupci provedeni su u skladu s Europskom direktivom 86/609/EEC i Preporukom 2007/526/65/EC. Etičko povjerenstvo Odjela za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci (Kl.: 644-01/16-01/03-01, Ur.br.: 2170-57-005-01-16-5 od 14. rujna 2016.) odobrilo je pokus na životinjama.

3.3. Metode

3.3.1. Priprema homogenata mozga

Cijela polutka velikog mozga štakora uzeta je za ekstrakciju proteina. Uzorak je izvagan u tubicu s keramičkim kuglicama i dodan adekvatan volumen 100 mM Tris-HCl pufera (pH 7,6) da bi se pripremio 10% homogenat. Puferu su dodani inhibitori fosfataze i proteaze (PhosSTOP™ i cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche).



Slika 12. Bead Ruptor 12 homogenizator (Omni, Perkin Elmer, Kennesaw, GA, USA)

Homogenizacija je provedena primjenom Bead Ruptor 12 homogenizatora (Omni, Perkin Elmer, Kennesaw, GA, USA) (slika 12) uz korištenje 1,4 mm keramičkih kuglica. Program homogenizacije je bio: snaga 4,0 u tri ciklusa, svaki ciklus 15 sek, razmak između ciklusa 30 sek, temperatura 24-25°C. Tubice s homogenatom mozga su zatim centrifugirane pomoću centrifuge s hlađenjem 5427R (Eppendorf, Hamburg, Njemačka), 10 min pri 5000 rpm 4°C, a odvojeni i alikvotirani supernatanti su pohranjeni na -80°C do analize.

3.3.2. Određivanje proteina

Koncentracija ukupnih proteina u ekstraktima mozga određena pomoću kita Pierce™ BCA Protein Assay Kit prema uputama proizvođača i prilagođeno za primjenu Nanodrop-a (slika 13).



Slika 13. NanoDrop One spektrofotometar (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)

3.3.3. SDS-PAGE i Western blot analiza

SDS-PAGE (*eng.* sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis) i Western blot (WB) analiza korišteni su na uzorcima ukupnog proteinskog ekstrakta mozga na pripremljenim Bis-Tris 4-12% gelovima primjenom Mini-PROTEAN® tetra-vertikalan sustava za elektroforezu (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) i PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Bojanje SDS-PAGE gela je provedeno pripremljenom koloidalnom Comassie blue (CCB) bojom. Koncentracija proteina od 20 µg bila je prilagođena za svaki uzorak. Razvijanje je provedeno pri potencijalu 195 V tijekom 70 min uz Laemmli pufer za razvijanje. Nakon završetka razvijanja, gel je ispran s ddH₂O (3x5 min, na tresilici), bojan s CCB (preko noći na +4°C) te odbojan s ddH₂O.

Koncentracija proteina od 50 µg bila je prilagođena za WB analizu uz provedbu istog postupka razvijanja kao u SDS-PAGE. Nakon razvijanja, gelovi su stabilizirani 15 min u TBS-u, proteini su transferirani na PVDF membranu „polusuhim transferom“ korištenjem SD10 polusuhi upijač (Cleaver Scientific Ltd., Rugby, Warwickshire, UK) pri jakosti struje 275 mA tijekom 30 min. Nakon transfera, membrane su bojane Ponceau S bojom za provjeru uspješnosti transfera te su nakon ispiranja boje s ddH₂O, postavljene 1 sat u

otopinu za blokiranje membrane (5% mlijeko u prahu u TBST-u). Slijedila je inkubacija membrana s primarnim protutijelima pri 4°C u hladnjaku (statično, bez miješanja) tijekom dva dana. Nakon toga, membrane su isprane s TBST-om (5x15 min) na tresilici (uz miješanjem, 40 rpm), nakon čega su inkubirane 2 sata na sobnoj temperaturi (ST) sa sekundarnim protutijelom (HRP), uz miješanje (40 rpm). Nakon ove inkubacije, membrane su isprane s TBST-om (5x15 min) na ST.

Smjesa reagensa Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) u omjeru 1:1 (5 minuta, mrak) korištena je za vizualizaciju proteina na membranama, a intenzitet vrpce dokumentiran Image Quant LAS 500 chemiluminescence CCD camera (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, HP7 9NA, UK). Vrpce su kvantificirane denzitometrijski korištenjem ImageJ softvera za analizu slike (National Institutes of Health, Bethesda, SAD).

3.3.4. TBARS

Koncentracija malondialdehida (MDA, *eng.* malondialdehyde), kao produkta lipidne peroksidacije, određena je za uzorke homogenata mozga prema protokolu Feldman (55), s malim modifikacijama. Za određivanje baždarnog pravca je pripremljen niz serijskih razrijeđenja matične otopine (500 µM) standarda TEP (*eng.* 1, 1, 3, 3-tetraethoxypropane) s ddH₂O, u koncentracijama 500 µM; 100 µM; 50 µM; 10 µM; 5 µM; 2,5 µM; 1,25 µM; 0,625 µM; 0,3125 µM; 0 µM (proba). Ukratko, pripremljene su otopine: 10% TCA (w/v), 0,67% (w/v) TBA. U 100 µL svakog uzorka ili pripremljenog razrijeđenja standarda dodano je 200 µL 10% ledeno hladne TCA kako bi se istaložili proteini. Smjesa je inkubirana 15 min u ledenoj kupelji, nakon čega je centrifugirana na 2200 x g, 15 min pri +4°C. Nakon centrifugiranja, 200 µL supernatanta je preneseno u novu tubicu u koju je dodano 200 µL 0,67% (w/v) TBA. Smjesa je inkubirana 10 min pri 100°C u ThermoMixer® C uređaju

(Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka). Uzorci su ohlađeni na RT te je očitana apsorbanacija na 532 nm. Svaki uzorak i svaki standard je izmjeren u duplikatu koristeći Eppendorf BioSpectrometer® basic (Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka). Pomoću očitanih apsorbanacija otopina standarda konstruiran je baždarni pravac (Prilog 1) iz kojeg je izračunata nepoznata koncentracija MDA u uzorcima.

3.4. Statistička obrada podataka

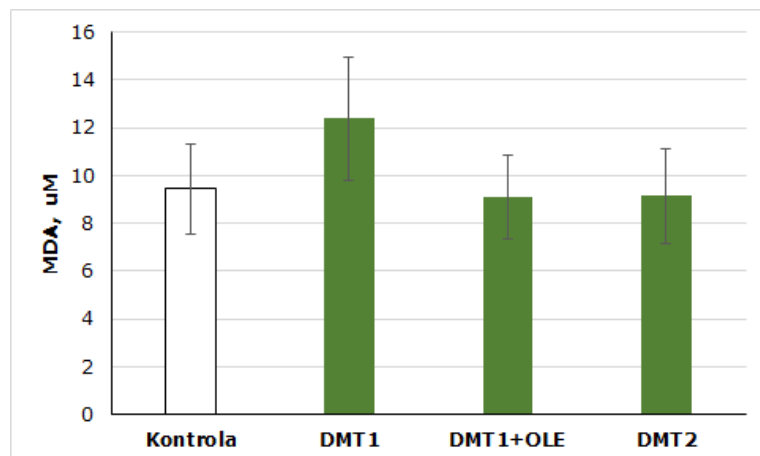
Podaci su procijenjeni programom Statistica (softverski sustav za analizu podataka), verzija 14 (TIBCO Software Inc., 2020., Palo Alto, CA, SAD). Rezultati su prikazani relativno u postotcima u odnosu na kontrolnu skupinu (DMT1 i DMT2 skupina), na DMT1 skupinu (DMT1+OLE i DMT2) kao srednja vrijednost skupine $\pm$ standardno odstupanje (SD). Razlike između skupina procijenjene su jednosmjernom analizom varijance (ANOVA One-way) praćenom *post hoc* Schefféovim testom. Regresijska analiza (linearna regresijska analiza) korištena je za usporedbu međusobne ovisnosti varijabli. Statistička značajnost je određena sa p vrijednosti manjom od 0,05 ($p < 0.05$) za faktor korelacije R.

4. REZULTATI

4.1. TBARS

Povećane razine reaktivnih tvari tiobarbituratne kiseline (TBARS) ukazuju na toksičnost hiperglikemije koja uzrokuje povećanu peroksidaciju lipida. Za procjenu lipoperoksidacije mozga dijabetičkih Wistar štakora određen je malonaldehid (MDA) kao najpoznatiji pokazatelj oksidativnog oštećenja, osobito peroksidacije lipida. U provedenim eksperimentalnim uvjetima (n=3) pronađene su sljedeće vrijednosti razine MDA: kontrola $9,44 \pm 1,88$; DMT1 $12,39 \pm 2,59$; DMT1+PF $9,10 \pm 1,75$; DMT2 $9,14 \pm 1,98$ (slika 14). Veća razina MDA mozga u dijabetičkih štakora skupine DMT1 (za 31,3%) u odnosu na kontrolnu skupinu, dok u skupini DMT2 nije pronađeno povećanje TBARS. Terapija ekstraktom lišća masline vratila je razinu TBARS-a u razini normale (kontrolna skupina) obnavljanjem aktivnosti antioksidansa u skupini DMT1+PF.

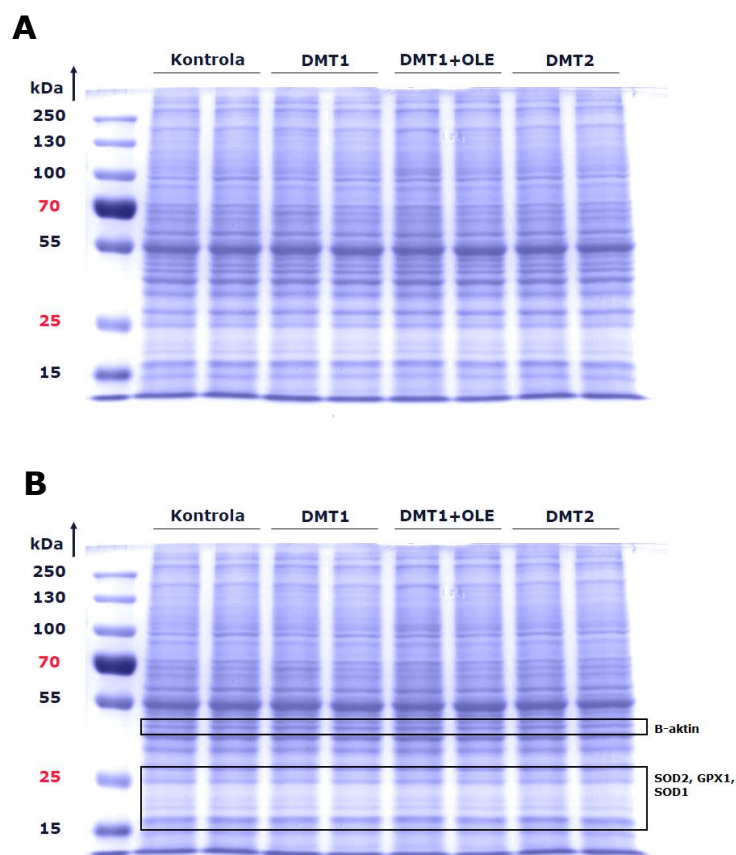
Statistički značajna razlika između kontrolne skupine i DMT1 skupine nije pronađena. Kruskal-Wallis test (višestruka usporedba p vrijednosti) pokazala je statistički značajnu razliku vrijednosti MDA između skupina DMT1 i DMT2 ($p=0,0140$).



Slika 14. Reaktivni spojevi tiobarbituratne kiseline (TBARS) određeni spektrofotometrijski u homogenatu mozga Wistar štakora. Rezultati su izraženi kao malonaldehid (MDA) u μM u kontrolnoj, DMT1, DMT1+OLE i DMT2 skupinama.

4.2. SDS-PAGE

Slika 15A prikazuje SDS-PAGE 10% homogenata uzoraka mozga u kontrolnoj, DMT1, DMT1+OLE i DMT2 skupini. Analizom ukupnih proteina po pojedinoj vrpici ovisno o skupini, nije uočena značajna razlika između skupina. Položaj analiziranih protutijela je prikazan na slici 15B.

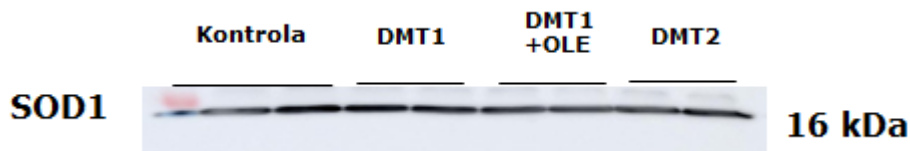


Slika 15. (A) SDS-PAGE gel (Bis-Tris 4-10%) 10% homogenata mozga netretirane (kontrolne), DMT1, DMT1+OLE i DMT2 skupine. Svaka jažica je sadržavala 20 μ g proteina. (B) Na istom SDS-PAGE gelu označene su pozicije protutijela koja su analizirana Western blot analizom: SOD1 (16 kDa), GPX1 (22 kDa), SOD2 (25 kDa), β -aktin (45 kDa).

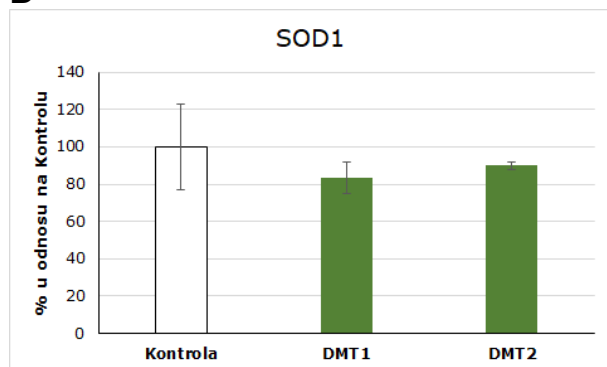
4.3. Western blot (WB) analiza

4.3.1. WB analiza superoksid dismutaze 1 (SOD1)

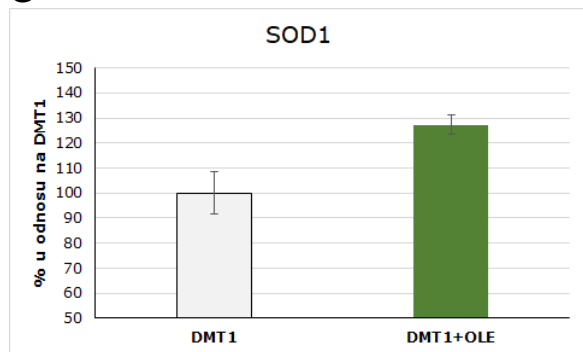
A



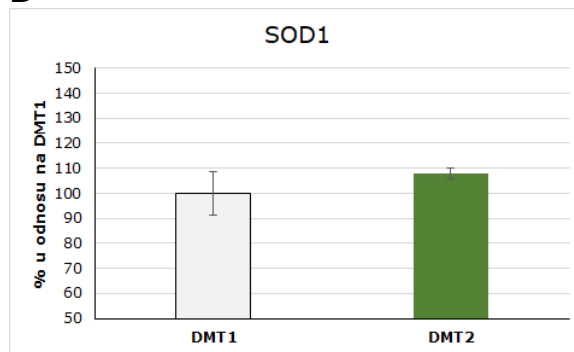
B



C



D



Slika 16. Imunoblot SOD1 u homogenatu mozga štakora. (A) Reprezentativna slika Western blot analize SOD1 u kontrolnoj, DMT1, DMT1+OLE i DMT2 skupini, (B) Prikazana ekspresija SOD1 odnosi se na normaliziranu razinu Kontrole, (C, D) Prikazana ekspresija SOD1 odnosi se na normaliziranu razinu DMT1. Za svaku skupinu, vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost $\pm$ SD ($n=3$). Statistička značajnost određena je jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) praćenom post hoc Schefféovim testom ($p<0,05$).

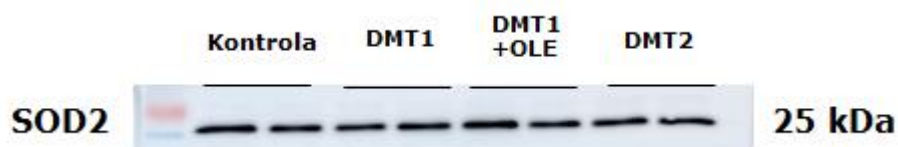
U provedenim eksperimentalnim uvjetima (n=3) pronađene su sljedeće vrijednosti postotka ekspresije SOD1 (normalizirane u odnosu na Kontrolu): kontrola $100 \pm 22,8$; DMT1 $83 \pm 8,5$ i DMT2 $90 \pm 2,3$ % (slika 16B). Nije bilo statističke značajnosti između istraživanih skupina.

Kao što je prikazano na slici 16A, u skupinama DMT1 i DMT2 pronađena je supresija SOD1 u odnosu na kontrolu, ali ne statistički značajno. Terapija ekstraktom lišća masline skupine DMT1 eksprimirala je citosolni SOD1 (slika 16C). Međutim, ova povećana ekspresija nije bila statistički značajna.

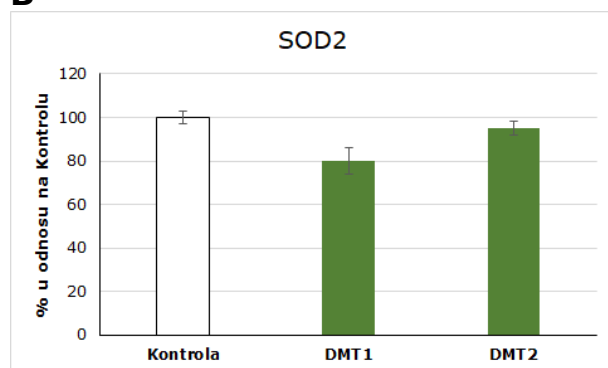
Analizom varijance pronađena je statistička značajnost promjene ekspresije SOD1 svih skupina ($p=0,050$).

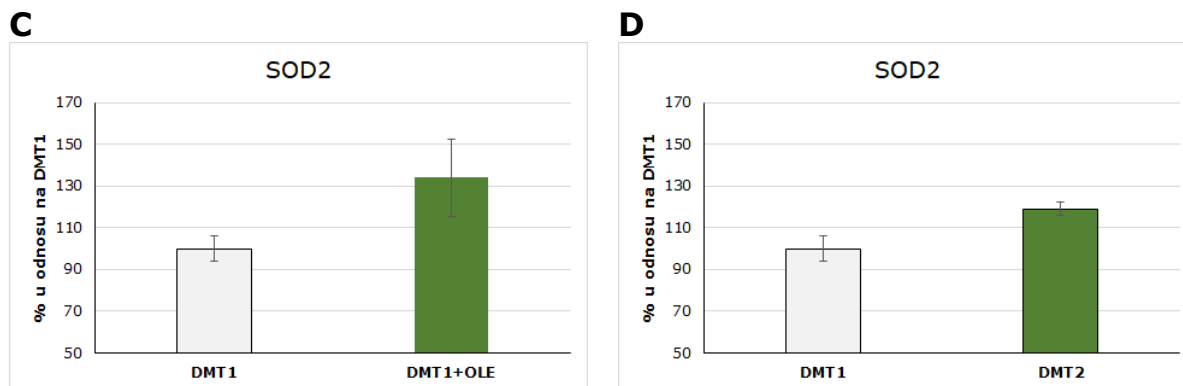
4.3.2. WB analiza superoksid dismutaze 2 (SOD2)

A



B



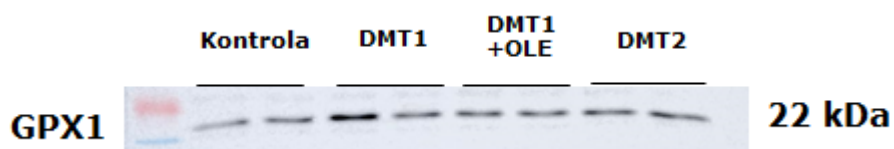


Slika 17. Imunoblot SOD2 u homogenatu mozga štakora. (A) Reprezentativna slika Western blot analize SOD2 u kontrolnoj, DMT1, DMT1+OLE i DMT2 skupini, (B) Prikazana ekspresija SOD2 odnosi se na normaliziranu razinu Kontrole, (C, D) Prikazana ekspresija SOD2 odnosi se na normaliziranu razinu DMT1. Za svaku skupinu, vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost $\pm$ SD ($n=3$). Statistička značajnost određena je jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) praćenom post hoc Schefféovim testom ($p<0,05$).

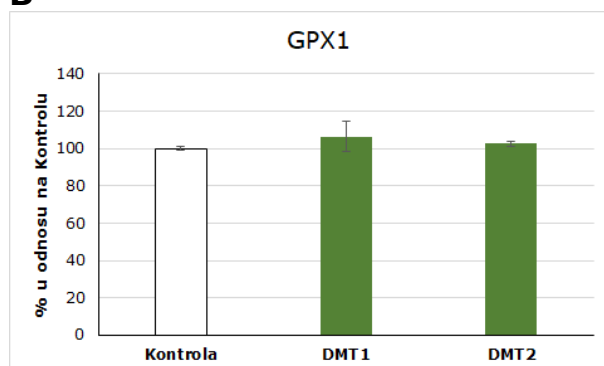
U provedenim eksperimentalnim uvjetima ($n=3$) pronađene su sljedeće vrijednosti postotka ekspresije SOD2 (normalizirane u odnosu na Kontrolu): kontrola $100 \pm 3,1$; DMT1 $80 \pm 5,9$ i DMT2 $95 \pm 3,2$ % (slika 17B). Statistički značajna razlika pronađena je između skupina DMT1 i DMT1+PF ($p=0,011$). Kao što je prikazano na slici 17C, terapija ekstraktom lišća masline značajno je eksprimirala mitohondrijski SOD2. Analizom varijance pronađena je statistička značajnost promjene ekspresije SOD2 svih ispitivanih skupina ($p=0,009$). SOD2 je pokazao statistički značajnu pozitivnu korelaciju sa SOD1 ($r=0,67$) i negativnu sa GPX1 ($r=-0,74$).

4.3.3. WB analiza glutation peroksidaze 1 (GPX1)

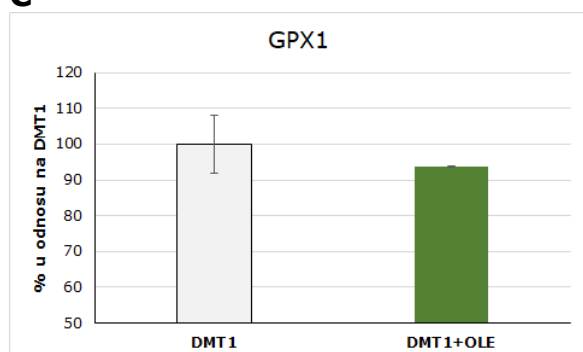
A



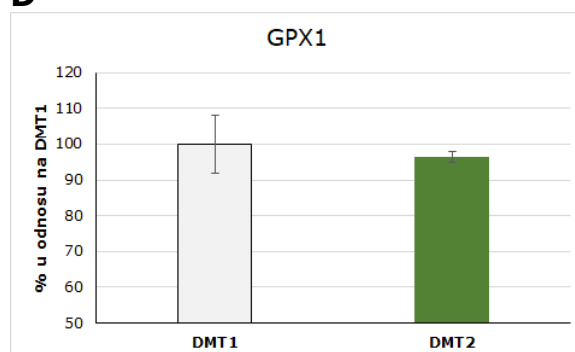
B



C



D



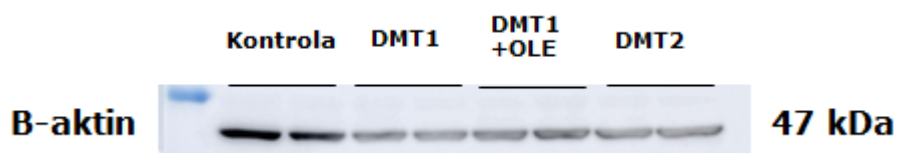
Slika 18. Imunoblot GPX1 u homogenatu mozga štakora. (A) Reprezentativna slika Western blot analize GPX1 u kontrolnoj, DMT1, DMT1+OLE i DMT2 skupini, (B) Prikazana ekspresija GPX1 odnosi se na normaliziranu razinu Kontrole, (C, D) Prikazana ekspresija GPX1 odnosi se na normaliziranu razinu DMT1. Za svaku skupinu, vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost $\pm$ SD ($n=3$). Statistička značajnost određena je jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) praćenom post hoc Schefféovim testom ($p<0,05$).

U provedenim eksperimentalnim uvjetima ($n=3$) pronađene su sljedeće vrijednosti postotka ekspresije GPX1 (normalizirane u odnosu na Kontrolu): kontrola $100 \pm 1,2$; DMT1 $107 \pm 8,2$ i DMT2 $103 \pm 1,4$ % (slika 18B). Statistički

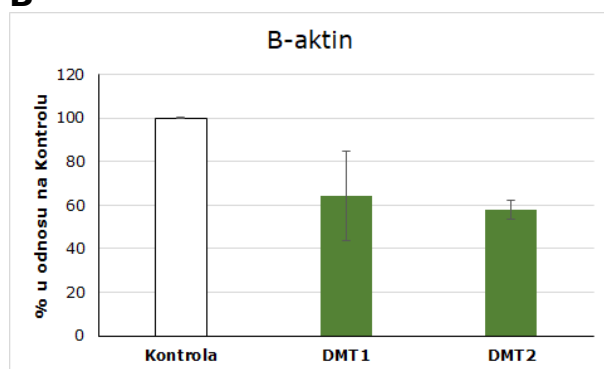
značajna razlika između skupina nije pronađena. Kako je prethodno navedeno, GPX1 je pokazao statistički značajnu negativnu korelaciju sa SOD2 ($r=-0,74$).

4.3.4. WB analiza B-aktina (β -Akt)

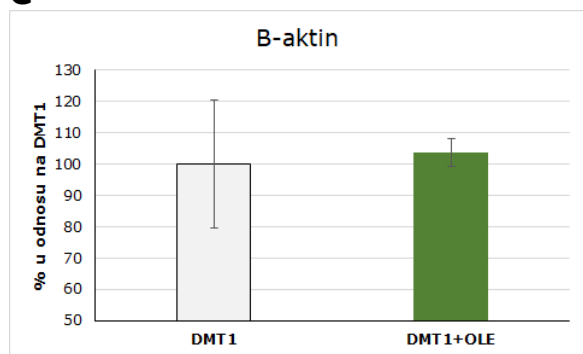
A



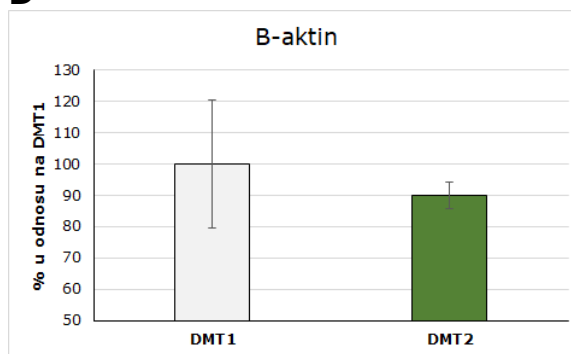
B



C



D



Slika 19. Imunoblot β -aktin u homogenatu mozga štakora. (A) Reprezentativna slika Western blot analize β -aktina u kontrolnoj, DMT1, DMT1+OLE i DMT2 skupini, (B) Prikazana ekspresija β -aktina odnosi se na normaliziranu razinu Kontrole, (C, D) Prikazana ekspresija β -aktina odnosi se na normaliziranu razinu DMT1. Za svaku skupinu, vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost $\pm$ SD ($n=3$). Statistička značajnost određena je jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) praćenom post hoc Schefféovim testom ($p<0,05$).

U provedenim eksperimentalnim uvjetima ($n=3$) pronađene su sljedeće vrijednosti postotka ekspresije β -aktina (normalizirane u odnosu na Kontrolu): kontrola $100 \pm 0,4$; DMT1 $64 \pm 13,2$; DMT2 $58 \pm 2,5$ % (slika 19B). Terapija ekstraktom lišća masline je blago eksprimirala β -aktin (slika 19C), ali ne statistički značajno. Visoko-masna hrana (skupina DMT2) je suprimirala β -aktin u odnosu na skupinu DMT1 (slika 19D). Statistički značajna razlika ekspresije β -aktina pronađena je Scheffe testom između kontrolne skupine i DMT1 skupine ($p=0,000$) te kontrolne skupine i DMT2 skupine ($p=0,000$). Kruskal-Wallis testom (višestruka usporedba p vrijednosti) pronađena je statistički značajna razlike između kontrolne skupine i DMT2 skupine ($p=0,039$).

Analizom varijance pronađena je statistička značajnost promjene ekspresije β -aktina svih ispitivanih skupina ($p=0,000$).

5. DISKUSIJA

U mediteranskoj kuhinji i kulturi značajnu ulogu imaju maslinovo ulje i plodovi masline. Maslinovo lišće se još u antičko doba koristilo za liječenje niza bolesti. Međutim, tek u današnje vrijeme prepoznati su ključni sastojci odgovorni za ove učinke. Oleuropein je većinski polifenol sadržan u fenolnoj frakciji lišća masline. Uz mnoge korisne učinke, oleuropein je antioksidans. Osim antioksidacijskog učinka, pokazalo se da je oleuropein antihipertenziv, ima kardioprotektivne, protuupalne, antikancerogene, antiangiogene i neuroprotektivne funkcije, te stoga može imati terapijski potencijal za niz ljudskih poremećaja. Dodatak prehrani s visokim sadržajem oleuropeina, OPIACE, dugoročno je smanjio hiperglikemiju i oštećenu toleranciju glukoze u TSOD miševa, ali nije imao učinka na pretilost. (56)

U ovom radu je istraživana učinkovitost ekstrakta maslinova lišća s visokim sadržajem oleuropeina na oksidacijski stres u mozgu štakora uzrokovan hiperglikemijom. Pretpostavili smo da hiperglikemija potiče nastajanje ROS-a kao medijatora disfunkcije endotelne stanice kod dijabetesa. Dokazano je da ROS izazivaju ekspresiju antioksidacijskih enzima u nekim tkivima, a ovaj se fenomen smatra dokazom postojeće toksičnosti ovisne o kisiku. U ovoj studiji istraživana je lijeva polutka velikog mozga.

U zdravih osoba, antioksidacijski enzimi uspostavljaju normalne fiziološke uvjete u organizmu (stanici, tkivu, organu). Međutim, u dijabetičnim osoba, niske razine antioksidacijskih enzima ili prekomjerna proizvodnja slobodnih radikala dovodi do neispravnog uklanjanja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Jetra i bubrezi su glavni organi odgovorni za proizvodnju antioksidacijskih enzima. U našoj studiji je istraživana mozak zbog sklonosti oksidaciji uslijed visokog udjela višestruko-nezasićenih masnih kiselina u strukturi lipida mozga. U studiji Park i sur (57), u miševa je SZT-izazvan dijabetes i tretiran prahom maslinovog lišća. Dokazano je da je tretman ublažio oksidacijski stres poboljšavanjem antioksidacijskih enzima u plazmi, pri čemu se pokazalo da su

aktivnosti SOD i CAT bile značajno niže u dijabetičkih miševa i veće u dijabetičkim skupinama tretiranim dodacima s maslinovim lišćem. Aktivnost glutathion peroksidaze (GPX) također je pratila sličan trend aktivnosti SOD i CAT i bila je povišena u tretiranim skupinama. Autori sugeriraju da prah maslinova lišća izaziva zaštitni učinak izazivanjem uklanjanja ROS-a, čime se smanjuju komplikacije povezane s dijabetesom. (57)

Dijabetes melitus (DM) povezan je s patološkim promjenama u SŽS kao i promjenama u oksidacijskom stresu. U studiji Ceretta i sur (58) istraživao je učinak aloksanom-izazvanog dijabetesa na životinjskom modelu (Wistar štakori, jednokratno 150 mg/kg aloksana, *i.p.*), a petnaest dana nakon izazvanog dijabetesa procijenjeno je pamćenje štakora korištenjem zadatka prepoznavanja predmeta. U mozgu štakora mjereni su parametri oksidacijskog stresa i aktivnost antioksidacijski enzima, SOD i CAT. Rezultati su pokazali da štakori s dijabetesom nisu imali promjene u pamćenju prepoznavanja. Međutim, rezultati su pokazali neuravnoteženost aktivnosti SOD i CAT (striatum, amigdala, hipokampus) u dijabetičkih štakora u modelu dijabetesa izazvanog aloksanom. U našoj studiji smo koristili polutku velikog mozga, stoga naš rezultat pokazuje prosječnu ekspresiju antioksidacijskih enzima.

Ceriello i sur (59) pokazali su da visoka razina glukoze izaziva povećanje ekspresije antioksidacijskih enzima (SOD1, SOD2, CAT, GPX) u ljudskim endotelnim stanicama, sugerirajući da povišene razine glukoze mogu izazvati oksidacijski stres u stanicama.

Razine serumskog MDA bile su izrazito povećane (183,6%) u štakora kojima je dijabetes izazvan sa SZT (60 mg/kg, jedna doza).(60) Unos ekstrakta maslinova lišća (20,3% w/v) u dozi 200 mg/kg snizio je MDA (109,4%), odnosno, 400 mg/kg (58,4%) tijekom 8 tjedana tretmana. Razine serumske glukoze, inzulina, ukupnih proteina, albumina, triglicerida, kolesterola, kolesterola lipoproteina niske gustoće (LDL-C), kolesterola lipoproteina vrlo niske gustoće (VLDL-C), kreatin kinaze (CK), laktat dehidrogenaze (LDH) i malondialdehida (MDA) bile su značajno povećane u dijabetičkih štakora, dok

se serumski SOD, GSH i CAT povećao, a smanjila CK, LDH i MDA u dijabetičkim skupinama tretiranim sa obje doze ekstrakta. Male promjene u serumskim razinama SOD, GSH, MDA i CAT pronađene su u zdravih štakora tretiranih istim dozama ekstrakta maslinova lišća. (60)

Ovo istraživanje (60), suprotno prethodnom, (59) upućuje na različite razine enzimskih antioksidansa ovisnih o tkivu, odnosno izvoru u kojem se određuju. Naši rezultati su pokazali da dijabetes i terapija ekstraktom maslinova lišća utječe na neuravnoteženosti uzrokovane oksidacijskim stresom u tkivu velikog mozga, naročito na razini antioksidansa u mitohondrijima (SOD2). Osim toga, značajna lipoperoksidacija je utvrđena u dijabetičkoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu što je u sukladnosti sa literaturnim podacima. U našoj studiji je 8 dana nakon injektiranja SZT i utvrđenih simptoma dijabetesa, započeo tretman ekstraktom maslinova lišća i trajao je 2 tjedna (ukupno 7 tretmana). U tako kratkom eksperimentalnim uvjetima, akutnog dijabetesa (DMT1) i kratkog perioda tretiranja OLP ipak je ostvarena značajna pozitivna promjena antioksidacijskog stanja u tkivu mozga. Za pretpostaviti je da bi daljnja primjena mogla potpuno regulirati promjene uzrokovane hiperglikemijom. Unatoč ovim rezultatima, potrebna su daljnja istraživanja koja istražuju potencijal polifenolnih sastojaka maslinova lišća u smanjenju prevalencije dijabetesa kroz razumijevanje njegovih učinaka na metabolizam glukoze.

U studiji Verma i sur (61) provedeno je istraživanje procjene aktivnost antioksidacijskih enzima SOD, CAT i glutathion S transferaze (GST) u bolesnika s DMT2 i zdravih ispitanika u populaciji sjeverne Indije. Istraživanje je provedeno u krvi na 474 bolesnika i 301 zdravih ispitanika. Razine aktivnosti SOD i GST bile su značajno niže u bolesnika s DMT2 nego u zdravih ispitanika, dok je vrijednost CAT bile više u bolesnika s DMT2 nego kod zdravih ispitanika. Rezultati su pokazali da su se aktivnosti enzima smanjivale sa starosti uzdravih i dijabetičnih ispitanika. Razina GST se značajno smanjila u muškaraca s dijabetesom, a GST i SOD u žena.

U našoj studiji nismo dobili značajne promjene razine TBARS niti ekspresije SOD1, SOD2 i GPX1.

6. ZAKLJUČCI

Istraživanjem ekspresije antioksidacijskih enzima SOD1, SOD2 i GPX i razine MDA u mozgu dijabetičnih štakora nakon SZT izazvanog dijabetesa (DMT1) i tretmana ekstraktom polifenola lišća masline utvrdili smo razlike između ispitanih skupina. SOD2 je bio značajno eksprimiran u skupini liječenih životinja ekstraktom polifenola lišća masline.

U skupini hranjenoj visoko-masnom hranom (DMT2) nismo pronašli značajne razlike u odnosu na Kontrolu te razlike DMT1 i DMT2 u mozgu štakora.

Na uravnoteženje antioksidacijskog statusa mozga dijabetičnih životinja vjerojatno ima utjecaj prisutni neenzimski antioksidansi topljivi u lipidima.

7. LITERATURA

1. Sakran N, Graham Y, Pintar T, Yang W, Kassir R, Willigendael EM et al. The many faces of diabetes. Is there a need for re-classification? A narrative review. *BMC Endocr Disord*. 2022 Jan 7;22(1):9.
2. Katsarou A, Gudbjörnsdottir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ et al. Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Mar 30;3:17016.
3. Newsholme P, Cruzat VF, Keane KN, Carlessi R, de Bittencourt PI Jr. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochem J*. 2016 Dec 15;473(24):4527-50.
4. Zajec A, Trebušak Podkrajšek K, Tesovnik T, Šket R, Čugalj Kern B, Jenko Bizjan B, et al. Pathogenesis of Type 1 Diabetes: Established Facts and New Insights. *Genes (Basel)*. 2022 Apr 16;13(4):706.
5. Lin Y, Sun Z. Current views on type 2 diabetes. *J Endocrinol*. 2010 Jan;204(1):1-11.
6. Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 May;9(5):367-77.
7. Jiang S, Young JL, Wang K, Qian Y, Cai L. Diabetic-induced alterations in hepatic glucose and lipid metabolism: The role of type 1 and type 2 diabetes mellitus (Review). *Mol Med Rep*. 2020 Aug;22(2):603-11.
8. Khin PP, Lee JH, Jun H. Pancreatic Beta-cell Dysfunction in Type 2 Diabetes. *Eur J Inflamm*. 2023 Dec;21:1721727X2311541.
9. Shi J, Fan J, Su Q, Yang Z. Cytokines and Abnormal Glucose and Lipid Metabolism. *Front Endocrinol*. 2019 Oct 30;10:1664-2392.
10. Goyal R, Jialal I. Diabetes Mellitus Type 2. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing;2021. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30020625/>
11. Plows JF, Stanley JL, Baker PN, Reynolds CM, Vickers MH. The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. 2018 Oct 26;19(11):3342.
12. Tshivhase A, Matsha T, Raghubeer S. Diagnosis and Treatment of MODY: An Updated Mini Review. *Applied Sciences* 2021;11:9436.
13. Chwalba A, Dudek A and Otto-Buczkowska E. Secondary Diabetes. *Austin J Nutr Metab*. 2020; 7(2): 1077.
14. Alam S, Hasan MdK, Neaz S, Hussain N, Hossain MdF, Rahman T. Diabetes Mellitus: Insights from Epidemiology, Biochemistry, Risk Factors, Diagnosis,

- Complications and Comprehensive Management. *Diabetology* 2021;2:36–50.
15. Daly ME, Vale C, Walker M, Littlefield A, Alberti KG, Mathers JC. Acute effects on insulin sensitivity and diurnal metabolic profiles of a high-sucrose compared with a high-starch diet. *Am J Clin Nutr.* 1998 Jun;67(6):1186–96.
 16. The HbA1C test: Uses, Target Levels and Procedure [Internet]. Diabetes Blog - Get Expert Advice on Diabetes Control & Wellness at BeatO. BeatO Blogs; 2022 [cited 2023 Aug 8]. Dostupno na: <https://www.beatoapp.com/blog/the-hba1c-test-uses-target-levels-and-procedure/>
 17. Sherwani SI, Khan HA, Ekhzaimy A, Masood A, Sakharkar MK. Significance of HbA1c Test in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Patients. *Biomark Insights.* 2016;11:95–104.
 18. Verma N. A Study of HbA1c, fasting and 2 hour plasma glucose levels in current smokers presenting at a tertiary care hospital in North India. *Int J Adv Med.* 2018 Jan 18;5(1):38.
 19. Pratley RE. The Early Treatment of Type 2 Diabetes. *The American Journal of Medicine.* 2013 Sep;126(9):S2–S9.
 20. Jiang J, Dutta S. Complications. RCSB: PDB-101. 2017 Apr 1. Dostupno na: <https://pdb101.rcsb.org/global-health/diabetes-mellitus/monitoring/complications>
 21. Burgos-Morón E, Abad-Jiménez Z, Marañón AM, Iannantuoni F, Escribano-López I, López-Domènech S, et al. Relationship Between Oxidative Stress, ER Stress, and Inflammation in Type 2 Diabetes: The Battle Continues. *J Clin Med.* 2019 Sep 4;8(9):1385.
 22. Banerjee M, Vats P. Reactive metabolites and antioxidant gene polymorphisms in Type 2 diabetes mellitus. *Redox Biol.* 2014;2:170–7.
 23. Tan Y, Cheong MS, Cheang WS. Roles of Reactive Oxygen Species in Vascular Complications of Diabetes: Therapeutic Properties of Medicinal Plants and Food. *Oxygen.* 2022 Jul 2;2(3):246–68.
 24. Ighodaro OM. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2018 Dec;108:656–62.
 25. Park JH, Park KK, Choe JY, Jang KM. Identification of sphingosine 1-phosphate level and MAPK/ERK signaling in pancreatic β cells. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 2021 Dec;26(4):252–8.
 26. Harrison DA. The Jak/STAT pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 Mar 1;4(3):a011205.

27. Gurzov EN, Stanley WJ, Pappas EG, Thomas HE, Gough DJ. The JAK/STAT pathway in obesity and diabetes. *FEBS J.* 2016 Aug;283(16):3002-15.
28. Zhao Y, Krishnamurthy B, U.A. Mollah Z, W.H. Kay T, E. Thomas H. NF- κ B in Type 1 Diabetes. *IADT.* 2011 Jun 1;10(3):208-17.
29. Cai J, Wang H, Sang H, Ye R, Cao Y, Jing M, et al. Insulin enhances neointimal hyperplasia following arterial injury through the PI3K/Akt pathway in type 1 diabetic rats. *Mol Med Rep.* 2020 Oct 22;22(6):5472-8.
30. Gandhi GK, Ball KK, Cruz NF, Dienel GA. Hyperglycaemia and Diabetes Impair Gap Junctional Communication among Astrocytes. *ASN Neuro.* 2010 Mar 5;2(2):AN20090048.
31. Le HT, Sin WC, Lozinsky S, Bechberger J, Vega JL, Guo XQ, et al. Gap junction intercellular communication mediated by connexin43 in astrocytes is essential for their resistance to oxidative stress. *J Biol Chem.* 2014 Jan 17;289(3):1345-54.
32. Boal AM, Risner ML, Cooper ML, Wareham LK, Calkins DJ. Astrocyte Networks as Therapeutic Targets in Glaucomatous Neurodegeneration. *Cells.* 2021 Jun 2;10(6):1368.
33. Afshari AR, Fanoudi S, Rajabian A, Sadeghnia HR, Mollazadeh H, Hosseini A. Potential protective roles of phytochemicals on glutamate-induced neurotoxicity: A review. *Iran J Basic Med Sci.* 2020 Sep;23(9):1113-23.
34. Martínez-Piña DA, Alvarado-Fernández GA, González-Guevara E, et al. Hypoglycemia and Brain: The Effect of Energy Loss on Neurons. U: Raghav A, ur. Basics of Hypoglycemia. IntechOpen; 2022. doi:10.5772/intechopen.104210
35. Hasler CM, Blumberg JB. Phytochemicals: biochemistry and physiology. Introduction. *J Nutr.* 1999 Mar;129(3):756S-757S.
36. Martinez K.B., Mackert J.D., McIntosh M.K. Nutrition and Functional Foods for Healthy Aging. Elsevier; Amsterdam, The Netherlands: 2017. Polyphenols and Intestinal Health; pp. 191-210.
37. Desborough MJR, Keeling DM. The aspirin story - from willow to wonder drug. *Br J Haematol.* 2017 Jun;177(5):674-83.
38. Bharadwaj K.C., Gupta T., Singh R.M. Chapter 9—Alkaloid Group of Cinchona Officinalis: Structural, Synthetic, and Medicinal Aspects. In: Tewari A., Tiwari S., editors. Synthesis of Medicinal Agents from Plants. Elsevier; Amsterdam, The Netherlands: 2018. pp. 205-227.
39. Gu R, Wang Y, Long B, Kennelly E, Wu S, Liu B, et al. Prospecting for bioactive constituents from traditional medicinal plants through ethnobotanical approaches. *Biol Pharm Bull.* 2014;37(6):903-15.

- 40.Akpoveso OP, Ubah EE, Obasanmi G. Antioxidant Phytochemicals as Potential Therapy for Diabetic Complications. *Antioxidants (Basel)*. 2023 Jan 4;12(1):123.
- 41.Zhang M, Wang L, Wen D, Ren C, Chen S, Zhang Z, et al. Neuroprotection of retinal cells by Caffeic Acid Phenylethyl Ester (CAPE) is mediated by mitochondrial uncoupling protein UCP2. *Neurochem Int*. 2021 Dec;151:105214.
- 42.Huang PC, Wang GJ, Fan MJ, Asokan Shibu M, Liu YT, Padma Viswanadha V, et al. Cellular apoptosis and cardiac dysfunction in STZ-induced diabetic rats attenuated by anthocyanins via activation of IGFI-R/PI3K/Akt survival signaling. *Environ Toxicol*. 2017 Dec;32(12):2471-80.
- 43.Tan H, Chen J, Li Y, Li Y, Zhong Y, Li G, et al. Glabridin, a bioactive component of licorice, ameliorates diabetic nephropathy by regulating ferroptosis and the VEGF/Akt/ERK pathways. *Mol Med*. 2022 May 20;28(1):58.
- 44.He Y, Wang S, Sun H, Li Y, Feng J. Naringenin ameliorates myocardial injury in STZ-induced diabetic mice by reducing oxidative stress, inflammation and apoptosis via regulating the Nrf2 and NF- κ B signaling pathways. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:946766.
- 45.Tang X, Li X, Zhang D, Han W. Astragaloside-IV alleviates high glucose-induced ferroptosis in retinal pigment epithelial cells by disrupting the expression of miR-138-5p/Sirt1/Nrf2. *Bioengineered*. 2022 Apr;13(4):8240-54.
- 46.Li D, Jiang C, Mei G, Zhao Y, Chen L, Liu J, et al. Quercetin Alleviates Ferroptosis of Pancreatic β Cells in Type 2 Diabetes. *Nutrients*. 2020 Sep 27;12(10):2954.
- 47.Sun W, Liu X, Zhang H, Song Y, Li T, Liu X, et al. Epigallocatechin gallate upregulates NRF2 to prevent diabetic nephropathy via disabling KEAP1. *Free Radic Biol Med*. 2017 Jul;108:840-57.
- 48.Xie T, Chen X, Chen W, Huang S, Peng X, Tian L, et al. Curcumin is a Potential Adjuvant to Alleviates Diabetic Retinal Injury via Reducing Oxidative Stress and Maintaining Nrf2 Pathway Homeostasis. *Front Pharmacol*. 2021;12:796565.
- 49.Al-Azzawie HF, Alhamdani MS. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sci*. 2006 Feb 16;78(12):1371-7.
- 50.Omar SH. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci Pharm*. 2010;78(2):133-54.

- 51.Hassen I, Casabianca H, Hosni K. Biological activities of the natural antioxidant oleuropein: Exceeding the expectation – A mini-review. *Journal of Functional Foods*. 2015 Oct;18:926-40.
- 52.Rishmawi S, Haddad F, Dokmak G, Karaman R. A Comprehensive Review on the Anti-Cancer Effects of Oleuropein. *Life* 2022;12:1140
- 53.Giacometti J, Žauhar G, Žuvić M. Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Major Phenolic Compounds from Olive Leaves (*Olea europaea* L.) Using Response Surface Methodology. *Foods*. 2018 Sep 6;7(9):149.
- 54.Giacometti J, Muhvić D, Grubić-Kezele T, Nikolić M, Šoić-Vranić T, Bajek S. Olive Leaf Polyphenols (OLPs) Stimulate GLUT4 Expression and Translocation in the Skeletal Muscle of Diabetic Rats. *Int J Mol Sci*. 2020 Nov 26;21(23):8981.
- 55.Feldman E. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) Assay Reagents and Materials : Protocol : AMDCC Protoc. 2004;1-3.
- 56.Murotomi K, Umeno A, Yasunaga M, Shichiri M, Ishida N, Koike T, Matsuo T, Abe H, Yoshida Y, Nakajima Y. Oleuropein-Rich Diet Attenuates Hyperglycemia and Impaired Glucose Tolerance in Type 2 Diabetes Model Mouse. *J Agric Food Chem*. 2015 Aug 5;63(30):6715-22.
- 57.Park J-H, Jung J-H, Yang J-Y, Kim H-S. Olive leaf down-regulates the oxidative stress and immune dysregulation in streptozotocin-induced diabetic mice. *Nutr Res [Internet]*. 2013;33(11):942-51.
- 58.Ceretta LB, Réus GZ, Abelaira HM, Ribeiro KF, Zappellini G, Felisbino FF, et al. Increased oxidative stress and imbalance in antioxidant enzymes in the brains of alloxan-induced diabetic rats. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012.
- 59.Ceriello A, dello Russo P, Amstad P, Cerutti P. High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes*. 1996 Apr;45(4):471-7.
- 60.Al-Attar AM, Alsalmi FA. Effect of *Olea europaea* leaves extract on streptozotocin induced diabetes in male albino rats. *Saudi J Biol Sci [Internet]*. 2019;26(1):118-28.
- 61.Verma S, Sagar N, Vats P, Abbas M, Banerjee M, Hospital B. Antioxidant enzyme levels as markers for type 2 diabetes mellitus. *Int J Bioassays*. 2013;2(4):685-90.

Rujana Zoraja

Datum rođenja: 21/09/2001 | **Državljanstvo:** hrvatsko | **Spol:** Žensko | **Telefonski broj:**

(+385) 957683269 (Mobilni telefon) | **E-adresa:** rujana.zoraja108@gmail.com | **LinkedIn:**

<https://www.linkedin.com/in/rujana-zoraja-018590277/> | **Instagram:**

<https://www.instagram.com/rrzoraja/?next=%2F> | **Adresa:** Kralja Zvonimira 4, 47000, Karlovac, Hrvatska (Kućna)

● O MENI

Studentica treće godine preddiplomskog studija „Biotehnologija i istraživanje lijekova“ na Odjelu za Biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci.

● OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2016 – 2020 Karlovac, Hrvatska

GIMNAZIJSKO OBRAZOVANJE Gimnazija Karlovac

2020 – TRENUTAČNO Rijeka, Hrvatska

STUDENT Sveučilište u Rijeci, Odjel za Biotehnologiju

Internetske stranice <https://www.biotech.uniri.hr/hr/>

19/05/2023

INFECTIOUS DISEASE TRANSMISSION MODELS FOR DECISION-MAKERS Coursera

Internetske stranice <https://www.coursera.org/account/accomplishments/certificate/SZRZWXE2PZ7J>

07/2023

DRUG DEVELOPMENT Coursera

Internetske stranice <https://www.coursera.org/account/accomplishments/certificate/H33W66TWC985>

07/2023

DRUG DISCOVERY Coursera

Internetske stranice <https://www.coursera.org/account/accomplishments/certificate/P37N3TTFQ2QL>

07/2023

DRUG COMMERCIALIZATION Coursera

Internetske stranice <https://www.coursera.org/account/accomplishments/certificate/Q66PW4TP52J2>

EFFECTIVE PROBLEM-SOLVING AND DECISION-MAKING Coursera

Internetske stranice <https://www.coursera.org/account/accomplishments/certificate/U26AVF3XR3KV>

07/2023

PRECISION MEDICINE Coursera

Internetske stranice <https://www.coursera.org/account/accomplishments/certificate/LF4NNAZ56JY3>

07/2023

PROJECT MANAGEMENT: THE BASICS FOR SUCCESS Coursera

Internetske stranice <https://www.coursera.org/account/accomplishments/certificate/ZD37FX4X9MJT>

06/2023

DESIGN AND CONDUCT OF CLINICAL TRIALS Coursera

Internetske stranice <https://www.coursera.org/account/accomplishments/certificate/KEVA9XTCPGNG>

● RADNO ISKUSTVO

09/2022 - 09/2022 Karlovac, Hrvatska

STRUČNA PRAKSA HIZJZ KARLOVAC

- PCR metoda i PCR očitavanje
- ekstrakcija DNA
- API test
- Izrada antibiograma
- Identifikacija bakterija

● JEZIČNE VJEŠTINE

Materinski jezik/jezici: **HRVATSKI**

Drugi jezici:

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna produkcija	Govorna interakcija	
ENGLESKI	C2	C2	C2	C2	C2
NJEMAČKI	A2	B1	A2	A2	A1

Razine: A1 i A2: temeljni korisnik; B1 i B2: samostalni korisnik; C1 i C2: iskusni korisnik

● DIGITALNE VJEŠTINE

MS office

Vješto služenje programskim paketom Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint) | izvršno služenje Microsoft programima Word i PowerPoint

Internetska komunikacija

Vješto korištenje internetom i komunikacijskih programa (Skype, Zoom, Meet) | komunikacijski programi (Teams, Zoom, Skype, Google Meet i sl.)

Društvene mreže

Svakodnevno korištenje interneta i društvenih mreža, učestala upotreba Google alata. | Razvijene i stečene komunikacijske/društvene vještine. | Društvene mreže (Facebook, Instagram, Youtube, Viber, WhatsApp, TikTok)

Računalna grafika

Poznavanje programa Blender | 3D sculpting u Blender-u | Rad u programima za molekularno modeliranje (VMD, Chimera, PyMol, Gamess, Avogadro) | Molekularni dizajn (Avogadro, PyMOL, UCSF Chimera, VDM, Marvin, Gamess) | Poznavanje programa za računalnu kemiju (PyMOL, Avogadro, VDM, Gamess)

Online baze podataka

Protein Data Bank (PDB) | Chempider

• DODATNE INFORMACIJE

MREŽE I ČLANSTVA

Rijeka

Udruga studenata biotehnologije USBRi Članica USBRi

VOZAČKA DOZVOLA

Vozačka dozvola: B

POČASTI I NAGRADE

11/2021

Dobitnica državne stipendije u STEM područjima znanosti za akademsku godinu 2021./2022. –
Ministarstvo znanosti i obrazovanja

2019

Treće mjesto na europskom prvenstvu mažoretkinja 2019. – European majorettes association - EMA

09/09/2018

Treće mjesto na europskom prvenstvu mažoretkinja 2018. – European majorettes association - EMA

2018

Prvo mjesto na državnom prvenstvu mažoretkinja 2018. – Hrvatski mažoret savez

Prilog

Prilog 1. Baždarni pravac standarda TEP (1, 1, 3, 3-tetraetoksipropan)

