

Učinak nadomjestka karnozina na razinu oksidativnog stresa kod Sprague-Dawley štakora na visokoslanjoj dijeti

Zidar, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:432624>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ana Zidar

UČINAK NADOMJESTKA KARNOZINA
NA RAZINU OKSIDATIVNOG STRESA
KOD SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA NA
VISOKOSLANOJ DIJETI

Diplomski rad

Osijek, 2023.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ana Zidar

UČINAK NADOMJESTKA KARNOZINA
NA RAZINU OKSIDATIVNOG STRESA
KOD SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA NA
VISOKOSLANOJ DIJETI

Diplomski rad

Osijek, 2023.

Rad je ostvaren u: Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju, Medicinskog fakulteta u Osijeku

Mentor rada: doc. dr. sc. Zrinka Mihaljević

Rad ima 35 listova, 6 tablica i 8 slika

ZAHVALE

Veliku zahvalnost izražavam mentorici doc. dr. sc. Zrinki Mihaljević na iskazanom povjerenju, korisnim savjetima i pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem Petru Šušnjari, mag. med. lab. diagn. na pomoći pri radu u laboratoriju.

Zahvaljujem svojoj obitelji, posebno roditeljima, sestri i dečku na strpljenju, razumijevanju i podršci tijekom studija.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Utjecaj soli na endotel.....	1
1.1.1. Važnost dušikovog oksida (NO) u mehanizmu vazodilatacije.....	1
1.2. Oksidativni stres	2
1.2.1. Slobodni radikali.....	3
1.2.2. Lipidna peroksidacija.....	3
1.3. Napredni oksidirani proteinski proizvodi (AOPP).....	5
1.4. Antioksidativna aktivnost.....	5
1.4.1. Neenzimski antioksidansi.....	6
1.5. Metode za utvrđivanje razine oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta.....	7
1.5.1. Reaktivne supstance tiobarbituratne kiseline.....	7
1.5.2. Određivanje antioksidativnog kapaciteta plazme	7
1.6. Karnozin	7
1.6.1. Svojstva karnozina.....	8
1.6.2. Karnozin kao antioksidans	8
2. HIPOTEZA	10
3. CILJEVI	10
4. MATERIJALI I METODE	12
4.1. Ustroj studije	12
4.2. Materijal	12
4.3. Metode	12
4.3.1. ELISA metoda	13
4.3.2. Mjerenje oksidativnog stresa	14
4.3.3. Mjerenje antioksidativnog kapaciteta	15
4.3.4. Mjerenje apsorbancije uzoraka nanofotometrom P330 UV/VIS, IMPLLEN.....	17
4.4. Statističke metode	17
5. REZULTATI	18
5.1. Razina naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda (AOPP) u serumu i uzorcima bedrenih mišića	18
5.2. Razina oksidativnog stresa (TBARS) u serumu Sprague-Dawley štakora.....	20
5.3. Razina antioksidativnog kapaciteta (FRAP) u serumu Sprague-Dawley štakora	21
6. RASPRAVA	23
7. ZAKLJUČAK	26

8. SAŽETAK	27
9. SUMMARY	28
10. LITERATURA	29
11. ŽIVOTOPIS	34

Popis kratica

AOPP - napredni oksidirani proteinski proizvodi (engl. *advanced oxidation protein products*)

CAR – karnozin (engl. *carnosine*)

CAT – katalaza (engl. *catalase*)

FRAP - sposobnost plazme da reducira željezo (engl. *Ferric reducing ability of plasma*)

GPx – glutation-peroksidaza (engl. *glutathione peroxidase*)

GR – glutation reduktaza (engl. *glutathione reductase*)

H₂O₂ – vodikov peroksid (engl. *hydrogen peroxide*)

MDA – malondialdehid (engl. *malondialdehyde*)

NaCl - natrijev klorid (engl. *sodium chloride*)

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NO - dušikov oksid (engl. *nitric oxide*)

ROS - reaktivni kisikovi radikali (engl. *reactive oxygen species*)

SOD – superoksid-dismutaza (engl. *superoxide dismutase*)

TBA – tiobarbiturna kiselina (engl. *thiobarbituric acid*)

TBARS - reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (engl. *Thiobarbituric acid reactive substances*)

TCA – trikloroocetna kiselina (engl. *trichloroacetic acid*)

TPTZ – željezo-2,4,6,tripiridil-s-triazin (engl. *iron-2,4,6,tripyridyl-s-triazine*)

1. UVOD

1.1. Utjecaj soli na endotel

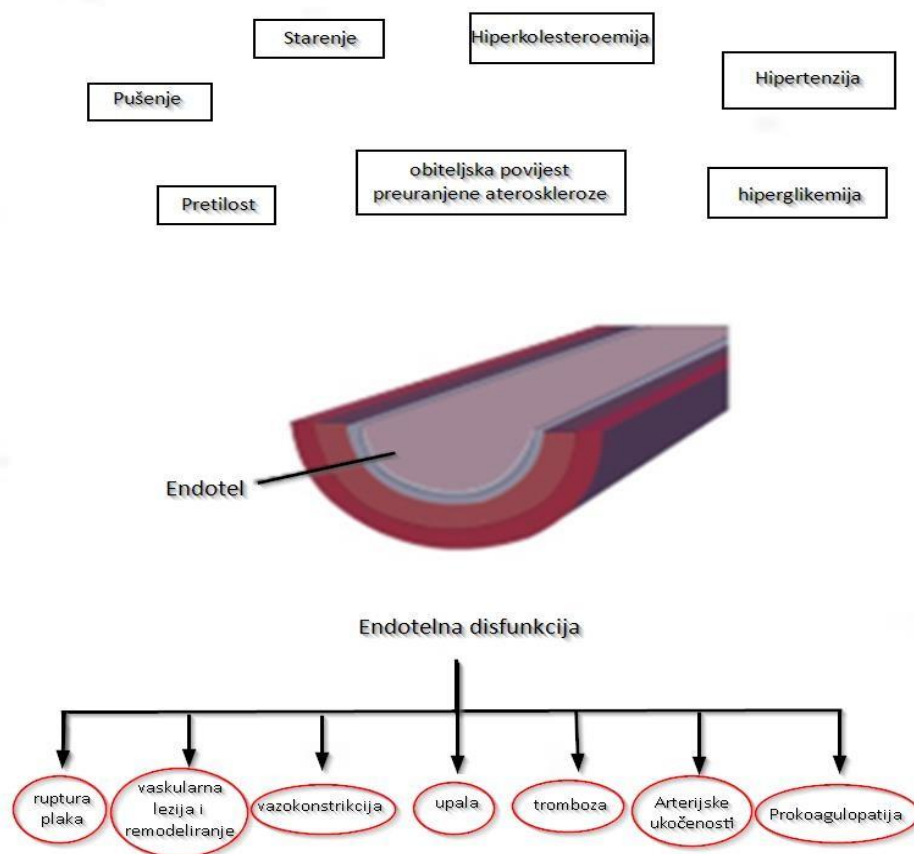
Vaskularni endotel odnosno monosloj endotelnih stanica, sačinjava unutarnju staničnu ovojnici arterija, vena i kapilara, stoga je u izravnom kontaktu s komponentama i stanicama krvi. Aktivno kontrolira stupanj vaskularne relaksacije i stezanja, te ekstravazaciju otopljenih tvari, tekućine, makromolekula, hormona, trombocita i krvnih stanica (1). Endotelne stanice imaju jedinstvenu funkciju koja uključuje kontrolu vaskularnoga tonusa, regulaciju proliferacije glatkih mišićnih stanica, modulaciju propusnosti vaskularne stijenke, modulaciju migracije leukocita, i inhibiciju agregacije trombocita (2). Također jedna od najznačajnijih uloga endotela je oslobađanje jednog od najvažnijih posrednika vazodilatacije – dušikovog oksida (NO) (3).

Dokazano je da prekomjerman unos soli u prehrani doprinosi razvoju kardiovaskularnih bolesti koji je neovisan o dobro poznatoj sposobnosti povećanja arterijskog tlaka kod nekih osoba. Na genskoj razini, prekomjerna količina soli dovodi do povećanog stvaranja slobodnih kisikovih radikala što za posljedicu ima nastajanje oksidativnog stresa i oštećenje staničnih struktura. Zbog gubitka zaštitne uloge endotela smanjuje se biodostupnost dušikova oksida i povećava se razina reaktivnih kisikovih radikala (4 - 6). U takvim uvjetima dolazi do razvoja endotelne disfunkcije. Patomehanizmi endotelne disfunkcije uključuju smanjenu produkciju i dostupnost NO, te nerazmjer između vazodilatatora i vazokonstriktora izvedenih iz endotela. Nekoliko tradicionalnih kardiovaskularnih čimbenika rizika povezano je s promjenama endotelne funkcije kao što su pušenje, sjedilački i nepravilan način života, starenje, hiperkolesterolemija, arterijska hipertenzija, hiperglikemija te obiteljska anamneza preuranjene aterosklerotske bolesti (**Slika 1.**).

1.1.1. Važnost dušikovog oksida (NO) u mehanizmu vazodilatacije

Dušikov oksid otpušta se iz endotelnih stanica kao odgovor na stres krvnih žila i na djelovanje spojeva poput acetilkolina i bradikininina. Istraživanja provedena na normotenzivnim pokusnim životinjama dokazala su kako je ključna značajka prehrambenog učinka soli neovisnog o tlaku smanjenje bioraspoloživosti vaskularnog dušikovog oksida (NO) koje ograničava dilataciju ovisnu o endotelu. Smanjenje dušikovog oksida snažno je povezano s povećanim razinama reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) koje stvara NAD(P)H oksidaza, ksantin oksidaza ili nevezana endotelna dušik oksid sintaza unutar vaskularne stijenke, što dovodi ne samo do uklanjanja dušikovog oksida, već i do poremećaja signalnih putova koji posreduju njegovu proizvodnju. Posljedično tome

nastaju promjene vaskularne reaktivnosti u mikro i makrocirkulaciji zbog povećanog unosa kuhinjske soli (NaCl) prehranom. Dušikov oksid koji je nastao iz endotela gubi svoju ulogu djelovanja na tonus krvnih žila zbog djelovanja reaktivnog metabolita kisika. U takvim uvjetima može doći do endotelne disfunkcije koja može uzrokovati nastanak, razvoj i daljnju progresiju kardiovaskularnih bolesti (7).



Slika 1. Čimbenici koji mijenjaju endotelnu funkciju i posljedice endotelne disfunkcije (Izvor: original autorice rada)

1.2. Oksidativni stres

Pojam oksidativni stres prvi je definirao Helmut Sies kao neravnotežu između proizvodnje oksidansa i antioksidativne obrane koja može rezultirati oštećenjem bioloških sustava (8). Dakle, oksidativni stres predstavlja neravnotežu između proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i endogenog antioksidativnog obrambenog sustava. U fiziološkim uvjetima, unutar stanice proizvode se male količine ROS-a, koje utječu na staničnu signalizaciju, te ih antioksidacijski obrambeni sustav može lako smanjiti. Međutim, u patofiziološkim uvjetima, proizvodnja ROS

premašuje kapacitet puferiranja antioksidativnog obrambenog sustava, što dovodi do oštećenja i smrti stanica (9). Prekomjerna količina oksidansa neenzimatski oštećuje makromolekule, uključujući proteine, nukleinske kiseline i lipide koji sačinjavaju stanične membrane (10). Utjecaj oksidativnog stresa na organizam ovisi o vrsti oksidansa, sastavu i djelovanju različitih antioksidanata. Laboratorijskim metodama može se mjeriti ukupna razina oksidativnog stresa. Kao što su mjerenje produkata lipidne peroksidacije (reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline) ili antioksidativnog kapaciteta (sposobnost reduciranja željeza u plazmi).

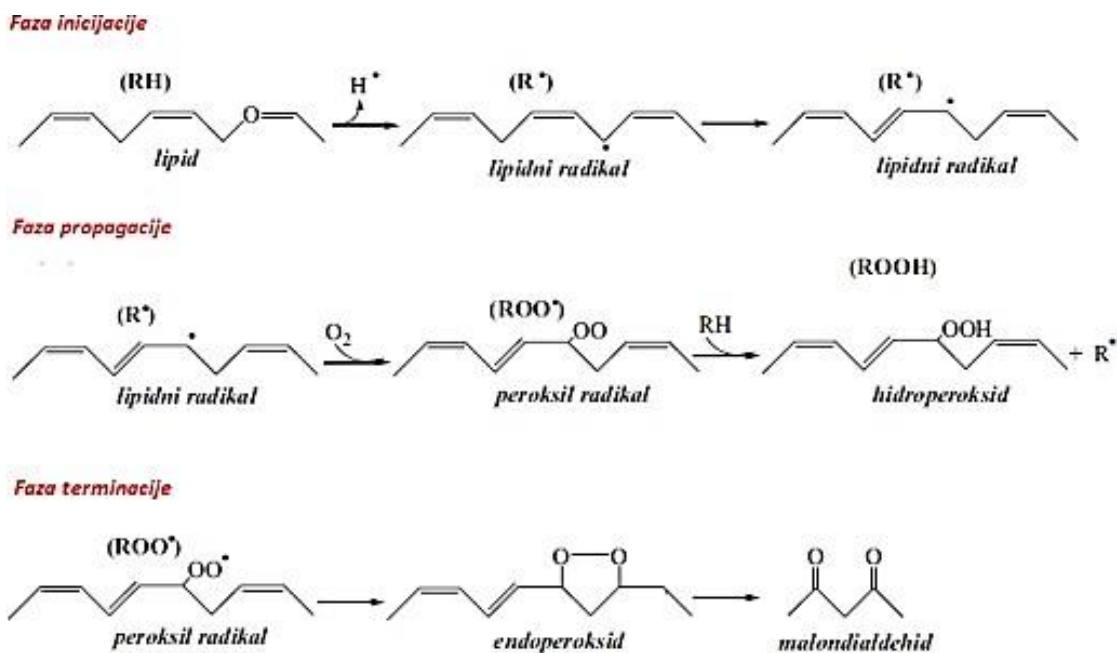
1.2.1. Slobodni radikali

Slobodni radikali (ROS, engl. *reactive oxygen species*) predstavljaju skup nestabilnih molekula uključujući vodikov peroksid (H_2O_2), hidroksilni radikal (OH^\cdot), superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$) i hipoklornu kiselinu (11). Imaju visoku reaktivnost koju im daju jedan ili više nesparenih elektrona. Glavni izvor staničnih ROS mitohondrijski je respiratorni lanac. Tijekom sinteze ATP-a proizvodi se ROS tijekom normalnog metabolizma kisika. Zato se ROS smatraju nusproduktima tijekom energetske perfuzije stanične aktivnosti (11). Nastaju iz molekularnog kisika utjecajem zračenja ili redukcijom oksidativnih enzima, lipidnom peroksidacijom, djelovanjem stresa, pušenja te nezdravog načina života (12). Visoke razine ROS-a mogu uzrokovati oksidativno oštećenje ili inducirati apoptozu tijekom imunološke obrane ili patoloških stanja. Istraživanja su pokazala da su različite kardiovaskularne bolesti, tumori, upalne i neurološke bolesti barem djelomično povezane s prekomjernom proizvodnjom reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) (13). Međutim, stvaranje ROS-a prirodni je dio aerobnog života. Bazalne razine ROS-a imaju važnu ulogu u mnogim procesima homeostaze koji uključuju metabolizam, imunitet, rast i diferencijaciju (14).

1.2.2. Lipidna peroksidacija

Stanične membrane zbog visokog sadržaja polinezasićenih masnih kiselina, posebno su osjetljive na oštećenje ROS-a, što se naziva lipidna peroksidacija. Peroksidacija lipida je proces u kojem vrste slobodnih radikala kao što su oksilni radikali, peroksilni radikali i hidroksilni radikali uklanjaju elektrone iz lipida i zatim proizvode reaktivne intermedijere koji mogu proći kroz daljnje reakcije (15). Peroksidacija lipida izravno oštećuje fosfolipide. Također može djelovati kao signal stanične smrti koji inducira programiranu smrt stanice. Postoje dva načina na koja se pokreće peroksidacija lipida: neenzimski ili enzimski. Lipidna peroksidacija odvija se u tri koraka (**Slika**

2.). Prvi korak naziva se inicijacija. U njemu dolazi do formiranja slobodnih radikala. U drugom koraku, koraku propagacije stvaraju se lanaci slobodnih radikala. Terminacija je posljednji korak u kojemu dolazi do stvaranja ne-radikalnih produkata (16). Inicijacija je korak u kojem dolazi do napada visoko reaktivnog oksidansa ($\text{HO}_2\cdot$, $\text{RO}_2\cdot$), koji izdvaja atom vodika iz metilenske skupine ($-\text{CH}_2-$) nezasićene masne kiseline pri čemu dolazi do nastanka lipidnog radikala. Nakon toga slijedi korak propagacije u kojem lipidni radikal reagira s molekulom kisika pri čemu nastaje peroksilni lipidni radikal. Peroksilni lipidni radikal reagira s drugom molekulom polinezasićene masne kiseline te nastaju molekula hidroperoksida i lipidni radikal. Lipidni hidroperoksid reducira se antioksidansima ili glutation peroksidazom (17). To je zadnji, terminacijski korak lipidne peroksidacije. Lipidna peroksidacija može dovesti do rupture stanice i otpuštanja njezinog sadržaja. Dokazano je da tkiva kojima je poremećen rad brže ulaze u lipidnu peroksidaciju. Razlog njihove veće peroksidabilnosti manjak je antioksidativnih mehanizama (18).



Slika 2. Shematski prikaz faza lipide peroksidacije (Pribavljeno i prerađeno iz (19) uz dozvolu autora)

1.3. Napredni oksidirani proteinski proizvodi (AOPP)

Napredni oksidirani proteinski proizvodi ili AOPP (engl. *advanced oxidation protein products*) predstavljaju nove biljege oksidativnog oštećenja proteina (20). Prvi put su otkriveni 1996. godine u plazmi pacijenta koji je imao kroničnu uremiju. Dokazano je da potiču oksidativni stres i upalu te na taj način sudjelovati u mnogim patofiziološkim procesima različitih bolesti (21) kao što su Parkinsonova bolest, multipla skleroza, osteoartritis, uremija, hipertrigliceridemija i ateroskleroza (22). Prethodne studije su pokazale da AOPP mogu povećati stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta i izlučivanje citokina te na taj način dovesti do oštećenja endotelne stanice i nastanka endotelne disfunkcije (23). Razine AOPP-a u plazmi u pozitivnoj su korelaciji s krvnim tlakom. Zbog toga predstavljaju neovisne čimbenike rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti jer povećavaju akumulaciju lipida u aterosklerotskim plakovima. AOPP induciraju reakciju oksidacijskog stresa in vivo aktiviranjem oksidativnog metabolizma neutrofila i monocita (24) i dulje vrijeme cirkuliraju u krvi pacijenata, budući da je za njihovu razgradnju u stanicama potrebno nekoliko sati ili dana. Napredni oksidirani proteinski proizvodi (AOPP) potječu od oksidacijski modificiranog albumina (njegovih agregata ili fragmenata), ali također i od fibrinogena i lipoproteina. Nastaju u reakciji kloriranih oksidansa, poput kloramina i hipokloričaste kiseline (HOCl), s proteinima plazme. Predstavljaju najčešći marker oksidativnog stresa u mnogim bolestima (25). Zbog osjetljivosti, stabilnosti, praktičnosti i cijene detekcije, uloga AOPP-a u predviđanju težine oksidativnog stresa i prognoze bolesti postala je sve važnija (26).

1.4. Antioksidativna aktivnost

Antioksidansi su kemijski spojevi koji sprječavaju stvaranje slobodnih radikala. Djeluju na tri načina: mogu sniziti energiju slobodnih radikala, spriječiti njihovo nastajanje ili prekinuti lančanu reakciju oksidacije. Na taj način sprječavaju nastanak oksidativnog stresa i štite stanice od toksičnih učinaka slobodnih radikala (27).

Antioksidativni obrambeni sustavi uravnotežuju razinu prooksidansa i antioksidansa za održavanje redoks homeostaze. Poremećena redoks ravnoteža u korist prooksidansa dovodi do oksidativnog stresa. Enzimi su antioksidansi koji uklanjaju superoksidne radikale i vodikov peroksid. Enzimaska redukcija lipidnih peroksida uključuje oksidaciju glutationa. Neenzimska reakcija lipidnih peroksida povezana s vitaminom E, a reakcija radikala sa vitaminom C i E. Organizam uz pomoć ovih vitamina može sam proizvesti antioksidanse, dok se ostali moraju unijeti hranom (28).

Antioksidativni obrambeni sustavi dijele se na dvije vrste: enzimске antioksidanse i neenzimске antioksidanse. Enzimski antioksidansi nastaju gotovo isključivo endogeno, dok podrijetlo neenzimskih antioksidansa može biti endogeno ili egzogeno (29). U glavne endogene antioksidativne obrambene sustave ubrajaju se nuklearni faktor eritroid 2, tioredoksin i glutathion (GSH). Egzogeni antioksidansi mogu biti prirodnog ili sintetskog porijekla. Sintetski fenolni antioksidansi (SPA) najčešće su korišteni sintetski antioksidansi zbog velike stabilnosti i dostupnosti.

1.4.1. Neenzimski antioksidansi

U neenzimске antioksidanse ubrajaju se koenzim Q10, glutathion, karotenoidi, flavonoidi i vitamin C. Koenzim Q10 derivat je kinona i važan element svake pojedine ljudske stanice. Djeluje kao nosilac elektrona i protona koji opskrbljuju mitohondrije. Stoga je od ključnog značaja za opskrbu stanica energijom koja se proizvodi u organizmu. Glutathion je tripeptid (cistein, glicin i glutaminska kiselina) koji se nalazi u visokim koncentracijama u tkivima (30). Najvažniji je antioksidans u organizmu i ima ključnu ulogu u smanjenju oksidativnog stresa, održavanju redoks ravnoteže, poboljšanju metaboličke detoksikacije i regulaciji imunološkog sustava. Karotenoidi su klasa terpenoidnih pigmenata izgrađenih od osam izoprenskih jedinica (31). Djeluju kao antioksidansi, kao hvatači slobodnih radikala, u lipofilnim sredinama kao što su membrane i lipoproteini. Antioksidativno djelovanje karotenoida može smanjiti peroksidaciju lipida, oksidativni stres i upalne reakcije u stanicama i tkivima. Flavonoidi imaju blagotvoran učinak na kardiovaskularni sustav zbog svojih antioksidativnih svojstava. Ona proizlaze iz sposobnosti smanjenja oksidacije lipoproteina niske gustoće, čime se poboljšavaju lipidni profili. Drugi pozitivan učinak na kardiovaskularni sustav je sposobnost flavonoida da proizvedu vazodilataciju i reguliraju apoptotske procese u endotelu (32). U vitamine topive u vodi ubraja se vitamin C. Askorbinska kiselina važan je antioksidans i djeluje kao kofaktor različitih biosintetskih puteva u imunološkom sustavu. Važan je esencijalni nutrijent koji ljudsko tijelo ne može sintetizirati. Njegov antioksidativni učinak proizlazi iz sposobnosti doniranja elektrona, i na taj način štiti molekule od oksidativnog oštećenja (33).

1.5. Metode za utvrđivanje razine oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta

Brojna istraživanja dokazala su da je oksidativni stres povezan sa razvojem brojnih bolesti. Međutim, postoji problem pri određivanju razine oksidativnog stresa, budući da ne postoje standardizirane metode njegovog određivanja. U svrhu određivanja oksidativnog stresa mjeri se razina ROS-a i enzimskih komponenti. Za utvrđivanje razine oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta koristi se metoda spektrofotometrije. Spektrofotometrija omogućuje mjerenje koncentracije tiobarbituratskih reaktivnih spojeva (TBARS), te antioksidativnog kapaciteta kojim se određuje sposobnost reduciranja željeza u plazmi (FRAP) (34).

1.5.1. Reaktivne supstance tiobarbituratne kiseline

Metoda kojom se mjere reaktivne supstance tiobarbituratne kiseline (TBARS) mjeri produkte peroksidacije lipida i predstavlja mjeru oksidativnog stresa (34). Slobodni radikali reagiranjem sa staničnim komponentama uzrokuju lipidnu peroksidaciju kojoj je produkt malondialdehid (MDA). TBA reagira s MDA te daje signal koji se može spektrofotometrijski zabilježiti i tako otkriti razinu lipoperoksidacijskih aldehida tj. razinu oksidativnog stresa. Određivanje oksidativnog stresa (TBARS) spektrofotometrijskom metodom temelji se na mjerenju na valnoj duljini od 572 nm i 532 nm.

1.5.2. Određivanje antioksidativnog kapaciteta plazme

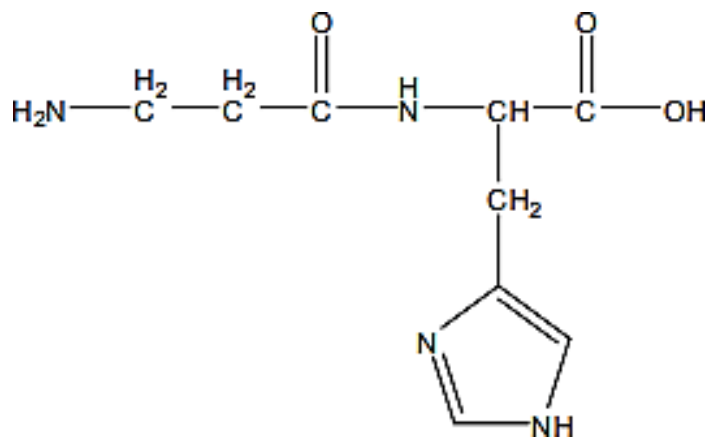
Za određivanje antioksidativnog kapaciteta plazme koristi se FRAP metoda (engl. *Ferric reducing antioxidant power assay*). Dolazi do redukcije Fe^{3+} u Fe^{2+} pri smanjenom pH unutar plazme ili seruma u prisutnosti antioksidansa, to uzrokuje promjenu žuto obojenog kompleksa u plavo obojeni produkt koji se spektrofotometrijski bilježi pri absorbanciji od 593 nm (35).

1.6. Karnozin

Karnozin (CAR; β -alanil-L-histidin) je dipeptid kojeg grade dvije aminokiseline alanin i L-histidin. Nalazi se u visokim koncentracijama u mozgu, mišićima i gastrointestinalnom tkivu ljudi i prisutan je u svim kralješnjacima (36). Prvi put je izoliran ranih 1900-ih (37). Postao je poznat po svojoj ulozi unutarstaničnog pH pufera, osobito u skeletnim mišićima (38).

1.6.1. Svojstva karnozina

Karnozin je krutina pri sobnoj temperaturi, molekularne mase 226,23 (**Slika 3.**). Prirodno se nalazi u organizmu, posebice u mozgu, srcu i mišićnim tkivima. Djeluje protiv procesa koji doprinose promjeni strukture stanice. Karnozin je jak antioksidans koji svojim djelovanjem uklanja slobodne radikale. Još jedno važno svojstvo karnozina je inhibicija glikacije, kojim sprječava vezanje glukoze na bjelančevine.



Slika 3. Struktura karnozina (Pribavljeno i prerađeno iz (39) uz dozvolu autora)

1.6.2. Karnozin kao antioksidans

Brojna istraživanja pokazala su kako karnozin ima protuupalnu, neuroprotektivnu, antioksidativnu aktivnost i djeluje kao „čistač” ROS-a (40). Djeluje kao antioksidans koji stabilizira i štiti staničnu membranu. Reagira s reaktivnim kisikovim radikalima i sprječava nastanak oksidativnog stresa. Također je aktivan i kada su štetne komponente već formirane djelovanjem slobodnih radikala poput lipidnih peroksida i njihovih sekundarnih produkata. Na ovaj način tkiva su zaštićena i od ”drugog vala” štetnih učinaka ovih tvari. Primjerice, karnozin blokira vrlo reaktivni krajnji proizvod lipidne peroksidacije – malondialdehid (MDA). MDA, ukoliko se ne eliminira, može prouzročiti oštećenje lipida, enzima i DNA te ima značajnu ulogu u razvoju ateroskleroze, upalnih promjena te općenito procesa starenja. Također, karnozin smanjuje peroksidaciju lipida, ali također inhibira oksidativnu modifikaciju proteina izloženog hidroksilnim radikalima (41) i poboljšava antioksidativni kapacitet (42). Kontrolom oksidativnog stresa, suzbijanjem glikacije i

keliranjem metalnih iona, karnozin može smanjiti štetne posljedice kao što je oštećenje DNA. Stoga je uporaba karnozina korisna kod starenja i patologija povezanih sa visokim unosom soli (npr. ateroskleroza, visoki krvni tlak). Istraživanja su pokazala da je karnozin koristan za liječenje dijabetesa i Parkinsonove bolesti (43). Budući da ublažava dijabetičku nefropatiju štiteći stanice podocita i mezangija (44). Istraživanja su pokazala kako je koncentracija karnozina u tkivu veća od drugih antioksidansa (45).

2. HIPOTEZA

Suplementacija karnozina smanjiti će oksidativni stres uzrokovan visokim unosom soli kod Sprague-Dawley štakora.

3. CILJEVI

Cilj ovog istraživanja je:

1. Istražiti učinak suplementacije karnozinom na proizvode oksidacije proteina i napredne oksidirane proteinske proizvode (AOPP) u serumu i tkivima Sprague-Dawley štakora prije i nakon visokog unosa soli uz suplementaciju karnozinom; razine malondialdehida (MDA), stvaranje ROS-a i vrijednosti antioksidativnog kapaciteta nakon suplementacije karnozinom.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Provedeno istraživanje eksperimentalna je studija na tkivima pokusnih laboratorijskih životinja (Sprague-Dawley štakorima). Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku (KLASA: 602-04/23-08/03, URBROJ: 2158-61-46-23-34).

4.2. Materijal

Kao materijal istraživanja korišteni su pohranjeni uzorci seruma i bedrenog mišića pokusnih Sprague-Dawley štakora. Za dobivanje uzoraka korišteni su Sprague-Dawley štakori starosti 8 - 10 tjedana.

Životinje su nasumično podijeljene u četiri skupine:

1. KONTROLA (CTRL) - zdravi netretirani štakori.
2. HSD - štakori koji su kroz 7 dana konzumirali hranu sa visokim udjelom kuhinjske soli (4 % NaCl-a).
3. CTRL + CAR- štakori koji su kroz 7 dana konzumirali uobičajenu hranu sa niskim udjelom kuhinjske soli (0,4 % NaCl-a) i kroz oralnu sondu dobili su 150 mg/kg suplementaciju karnozina.
4. HSD + CAR - štakori koji su kroz 7 dana konzumirali hranu sa visokim udjelom kuhinjske soli (4 % NaCl-a) i kroz oralnu sondu (kanilu) dobili 150 mg/kg tjelesne mase suplementaciju karnozina.

4.3. Metode

Uzgoj životinja i uzorkovanje tkiva i seruma provedeno je u Vivariju Medicinskog fakulteta Osijek. Mjerenje naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda (AOPP), razine malondialdehida (MDA) (stvaranje ROS-a) i vrijednosti antioksidativnog kapaciteta (FRAP) nakon suplementacije karnozinom provedeno je u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek.

4.3.1. ELISA metoda

Korištenjem komercijalno dostupnog ELISA kita metodom spektrofotometrije provedeno je mjerenje naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda (AOPP) u serumu i uzorcima bedrenih mišića. Ova metoda koristi tehniku kvantitativnog enzimskog imunološkog testa. Antitijela specifična za AOPP prethodno su obložena na mikroploču. Standardi i uzorci odpipetirani su u jažice i svaki prisutni AOPP vezao se s imobiliziranim antitijelom. Nakon uklanjanja svih nevezanih tvari, u jažice je dodano protutijelo specifično za AOPP konjugirano biotinom. Nakon ispiranja, peroksidaza hrena (HRP) konjugirana s avidinom dodana je u jažice. Nakon ispiranja kako bi se uklonio sav nevezani reagens avidin-enzim, otopina supstrata dodana je u jažice i boja se razvila proporcionalno količini AOPP vezanog u početnom koraku. Zaustavio se razvoj boje i izmjerio se intenzitet boje.

Prvi korak bio je priprema reagensa, uzoraka i standarda. Za pripremu reagensa korišteni su graduirani spremnici. Reagensi su stavljeni na sobnu temperaturu (18 - 25 °C) 30 minuta prije upotrebe. Biotin antitijelo i HRP-avidin centrifugirani su prije otvaranja. Biotin-antitijelo zahtijeva 100-struko razrjeđenje. Za pripremu razrjeđenja dodano je 10 µL biotin-antitijela i 990 µL biotin-antitijela razrjeđivača. HRP-avidin zahtijeva 100-struko razrjeđenje. Za pripremu razrjeđenja dodano je 10 µL HRP-avidina i 990 µL razrjeđivača HRP-avidina. Puffer za ispiranje pripremljen je razrjeđivanjem 20 ml koncentrata pufera za ispiranje (25 x) u deioniziranoj ili destiliranoj vodi kako bi dobili 500 ml pufera za ispiranje (1 x). Standard je pripremljen centrifugiranjem na 6000 - 10000 okretaja u minuti 30 sekundi. Dodano je 1,0 mL razrjeđivača uzorka kako bi se dobila otopina od 1000 nmol/ml. Standard je promiješan i otavljen da odstoji 15 minuta uz lagano miješanje prije pravljenja razrjeđenja. Otpipetirano je 250 µl razrjeđivača uzorka u svaku epruvetu (S0 - S6). Korištena je temeljna otopina za proizvodnju dvostruke serije razrjeđenja. Nerazrijeđeni standard korišten je kao visoki standard (1000 nmol/ml). Razrjeđivač uzorka korišten je kao nulti standard (0 nmol/ml). Za pripremu seruma korištena je epruveta za odvajanje seruma (SST). Uzorci su ostavljani da se zgrušaju dva sata na sobnoj temperaturi prije centrifugiranja 15 minuta na 1000 x g. Serum je uklonjen, a uzorci su alikvotirani i pohranjeni na -20 °C. Za pripremu homogenata tkiva korišteno je 100 mg tkiva koje je isprano s 1XPBS, homogenizirano u 1 ml 1X PBS i pohranjeno preko noći na -20 °C. Nakon što su provedena dva ciklusa smrzavanja i odmrzavanja kako bi se razbile stanične membrane, homogenati su centrifugirani 5 minuta na 5000 x g, 2 - 8 °C. Supernat je uklonjen i odmah ispitan. Nakon postupka pripreme reagensa, uzoraka i

standarda dodano je 100 μL standarda i uzorka u svaku jažicu. Prekriveni su ljepljivom trakom i inkubirani 2 sata na 37 °C. Zatim je uklonjena tekućina iz svake jažice i dodano je 100 μL biotin-antitijela u svaku jažicu. Inkubirano je 1 sat na 37 °C. Svaka jažica je aspirirana i isprana. Ovaj postupak ponovljen je dva puta za ukupno tri ispiranja. Svaka jažica isparana je puferom za ispiranje (200 μl) i ostavljena je da odstoji 2 minute. Potpuno uklanjanje tekućine u svakom koraku ključno je za dobru izvedbu. Nakon posljednjeg ispiranja, uklonjen je sav preostali pufer za ispiranje. Zatim je dodano 100 μL HRP avidina u svaku jažicu. Mikrotitarska ploča prekrivena je novom ljepljivom trakom i inkubirana je 1 sat na 37 °C. Nakon toga je ponovljen postupak ispiranja i aspiracije pet puta. Dodano je 90 μL TMB supstrata u svaku jažicu. Inkubirano je 15 - 30 minuta na 37 °C zaštićeno od svjetlosti. Zatim je dodano 50 μL stop otopine u svaku jažicu. Očitana je optičku gustoću svake jažice unutar 5 minuta pomoću čitača mikropločica na 450 nm.

4.3.2. Mjerenje oksidativnog stresa

Iz skupljenih uzoraka krvi spektrofotometrijskom metodom izmjerene su reaktivne supstance tiobarbituratne kiseline (TBARS). Metoda za TBARS mjeri produkte peroksidacije lipida i predstavlja mjeru oksidativnog stresa. Slobodni radikali reagiranjem sa staničnim komponentama uzrokuju lipidnu peroksidaciju kojoj je produkt malondialdehid (MDA). TBA reagira s MDA te daje signal koji se može spektrofotometrijski zabilježiti i tako otkriti razinu lipoperoksidacijskih aldehida tj. razinu oksidativnog stresa. Metoda je nespecifična, jer se druge tvari vežu na tiobarbiturnu kiselinu. Zato je u uzorak je dodana triklorooctena kiselina koja je istaložila proteine, a zatim se supernatant koristio za daljnje mjerenje.

Otpipetirano je 500 μL uzorka i 1 ml TCA u falconicu od 15 ml. Ukoliko nekih uzoraka ima manje od 500 μL , a uz činjenicu da je potrebno još 40 μL za kasniji FRAP, onda je preporučeno uzimati od svih uzoraka 400 μL , ne bi li za sve uzorke bila ujednačena količina za analizu. Za 400 μL uzorka dodano je 800 μL TCA. Centrifugirano je 15 min na 5 000 okretaja na 4 °C. Zatim je otpipetirano 750 μL supernatanta (**Slika 4.**) pa dodano još 750 μL TBA u novu falconicu od 15 mL. TBA se teško otapa, te je potrebno postupno dodavanje HCl. Pripremljene otopine HCl mogu stajati na sobnoj temperaturi. Ostale otopine pripremljene su svježe (**Tablica 1.**) Zatim je kuhano 10 min na 100 °C u vodenoj kupelji i ohlađeno na ledu.



Slika 4. Odvajanje supernatanta nakon centrifugiranja za TBARS metodu (Izvor: original autorice rada)

Tablica 1. Priprema otopina za metodu TBARS

Priprava 0,6 M HCl (100 ml)	94,92 ml H ₂ O 5,08 ml 36,5 % HCl
Priprava 0,02 M HCl (100 ml)	96,67 ml H ₂ O 3,33 ml 0,6 M HCl
Priprava TCA (40 ml) u falconici od 50 ml za 36 uzoraka	40 ml 0,6 M HCl 8 g TCA
Priprava TBA (40 ml) u falconici od 50 ml za 36 uzoraka	40 ml 0,02 M HCl 0,268 g TBA

4.3.3. Mjerenje antioksidativnog kapaciteta

Iz skupljenih uzoraka krvi spektrofotometrijskom metodom izmjerene su sposobnosti reduciranja željeza u plazmi (FRAP). FRAP metoda služi za mjerenje razine antioksidativnog kapaciteta. Bazira se na spektrofotometriji. Redukcija Fe³⁺ - TPTZ (2,4,6-tris (2-piridil) - s-triazin) u Fe²⁺ - TPTZ dolazi pri smanjenom pH unutar plazme ili seruma u prisutnosti antioksidanata te to uzrokuje promjenu žuto obojenog kompleksa u plavo obojeni produkt koji se spektrofotometrijski

4. MATERIJALI I METODE

bilježi. Prvo je pripremljen acetatni pufer (**Tablica 2.**) i izmjeren mu je pH. Zatim je nulirana apsorbanacija svježe pripremljenog reagensa (slijepa proba) pri valnoj duljini 593 nm. Nakon toga je otpipetirano 1,125 ml svježe pripremljenog reagensa u 8 kivetu. Uzorak s reagensom potrebno promiješati koristeći čepić za kivetu ili komadić parafilm, nakon dodavanja. U trenutku dodavanja 37,5 μ L prvog uzorka u prvu kivetu, uključena je štoperica, kivetu s reagensom i dodanim uzorkom vraćena je na njezino mjesto u stalku za kivete (prekriven tijekom cijelog postupka), zatim nakon 30 sekundi dodan je drugi uzorak u drugu kivetu s reagensom, i tako do kraja za svih 8 uzoraka. U trenutku dodavanja posljednjeg uzorka, ostaje 30 sekundi do ispunjenja 4 minute. Točno u trenutku navršavanja 4 minute, izmjerena je apsorbanaciju prvog dodanog uzorka u prvoj kivetu, i svakih 30 sekundi svaki sljedeći uzorak (valna duljina 593 nm).

Tablica 2. Priprema otopina za FRAP metodu

Priprava 40 mM HCl (1 L)	U 900 ml vode dodano 3,43 ml 36,5 % HCl pa dopunjeno vodom do 1 L, čuvano na sobnoj temperaturi
Priprava TPTZ (50 ml) - omotan u aluminijsku foliju; fotosenzitivan (5 ml, pripremiti svježe)	50 ml 40 mM HCl 0,1561 g TPTZ
Priprava FeCl ₃ (50 ml) - 5 ml, pripremiti Svježe	50 ml H ₂ O 0,2758 g FeCl ₃
Priprava Na-acetatnog pufera (1 L, pH = 3,6)	Otopljeno je 3,1 g natrij-acetata i 16 ml octene kiseline u 1 L destilirane vode; pH mora biti 3,6, čuvano u hladnjaku na + 4 °C
Priprava reagensa (30 ml) – omotati ga u aluminijsku foliju	pufer 25 ml TPTZ 2,5 ml x 2 (u dvije falconice od 50 ml) FeCl ₃ 2,5 ml

4.3.4. Mjerenje apsorbancije uzoraka nanofotometrom P330 UV/VIS, IMPLEN

Apsorbancija uzorka kod TBARS metode izmjerena je nanofotometrom P330 UV/VIS, IMPLEN (Slika 5.) pri 572 i 532 nm s malondialdehidom (MDA) koji se koristio kao standard (μM MDA). Očitani su blank (za serum koristi TBA kao blank), zatim su uzorci očitani prvo na 572 nm (šumovi), nakon toga na 532 nm. Od apsorbancije na 532 nm oduzeta je apsorbancija na 572 nm. Apsorbancija uzorka za FRAP metodu mjerila se također nanofotometrom P330 UV/VIS, IMPLEN pri 593 nm sa standardom (mM/L Trolox).



Slika 5. Implen nanofotometar P330 UV/VIS (Izvor: fotografirala autorica rada)

4.4. Statističke metode

Za statističku analizu i usporedbu rezultata korišten je test za jednosmjernu analizu varijanci za nezavisne uzorke (One-Way ANOVA) ili u slučaju neravnomjerne distribucije dobivenih podataka Holm-Sidak test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Razina statističke značajnosti određena je sa $p < 0,05$. Za statističku analizu upotrebljen je statistički program SigmaPlot 11.2 (Systat Software, Inc., Chicago, SAD). Za grafički prikaz dobivenih rezultata korišten je GraphPad Prism5 (San Diego, CA, SAD).

5. REZULTATI

5.1. Razina naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda (AOPP) u serumu iuzorcima bedrenih mišića

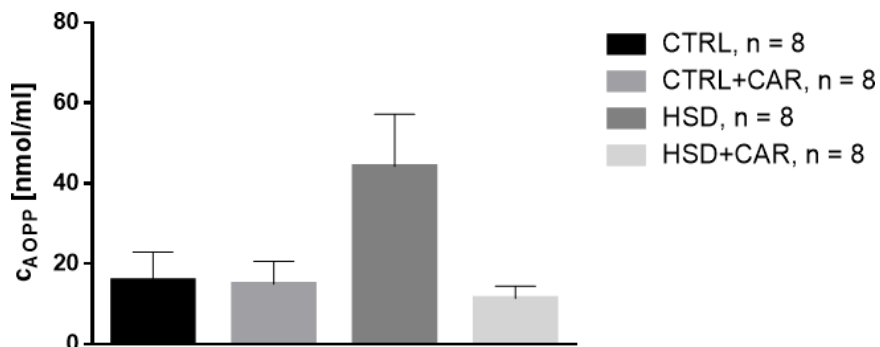
Usporedbom rezultata između ispitivanih skupina utvrđena je statistički značajno veća koncentracija naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda u serumu u grupi HSD (**Slika 6. A, Tablica 3.**). Rezultati su pokazali kako je razina naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda značajno povišena u skupini štakora koji su podvrgnuti prehrani sa visokim udjelom kuhinjske soli (4 % NaCl-a) u usporedbi s CTRL, CTRL + CAR i HSD + CAR skupinama u uzorcima seruma (**Tablica 3.**). Također, rezultati pokazuju kako je razina naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda smanjena nakon suplementacije karnozinom u kombinaciji s unosom visokog udjela kuhinjske soli. Razina naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda u uzorcima bedrenih mišića statistički je značajno veća također u HSD grupi u odnosu na ostale skupine (**Slika 6. B, Tablica 4.**).

Tablica 3. Usporedba razine AOPP u serumu među eksperimentalnim skupinama.

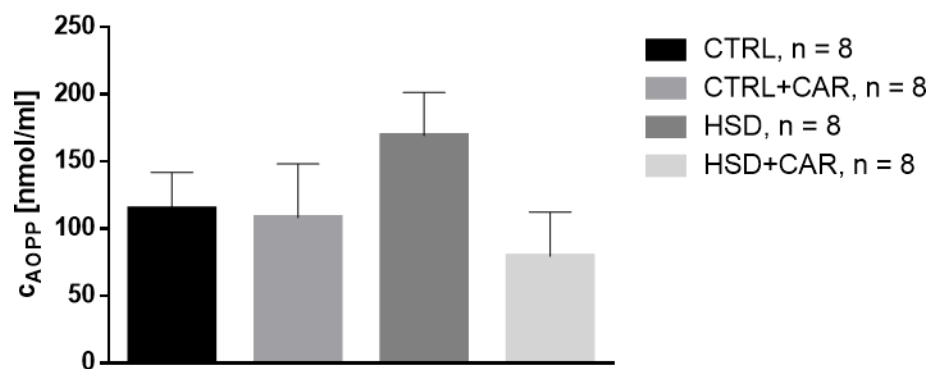
Grupa	AOPP [nmol/ml]	One-WayANOVA/Holm-Sidak test	Statistički značajno	P vrijednost
CTRL	15,91 (7,04)	CTRL + CAR u usporedbi s CTRL	Ne	0,8091
CTRL + CAR	14,97 (5,67)	HSD u usporedbi s CTRL	Da	< 0,0001
HSD	44,26 (12,96)	HSD + CAR u usporedbi s CTRL	Ne	0,6108
HSD + CAR	11,43 (3,09)	HSD u usporedbi s CTRL + CAR	Da	< 0,0001
		HSD + CAR u usporedbi s CTRL + CAR	Ne	0,6108
		HSD + CAR u usporedbi s HSD	Da	< 0,0001

Rezultati su opisani kao aritmetička sredina (standardna devijacija). Razina statističke značajnosti određena je sa $p < 0,05$. CTRL – kontrola; zdravi netretirani štakori, CAR – karnozin, HSD – štakori hranjeni hranom sa visokim udjelom kuhinjske soli.

A)



B)



Slika 6. Razina naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda (AOPP) u uzorcima A)seruma i B) bedrenih mišića. Rezultati su opisani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Stupići prikazuju aritmetičku sredinu, a okomite crte s graničnikom standardnu devijaciju. CTRL – kontrola; zdravi netretirani štakori, CAR – karnozin, HSD – štakori hranjeni hranom sa visokim udjelom kuhinjske soli.

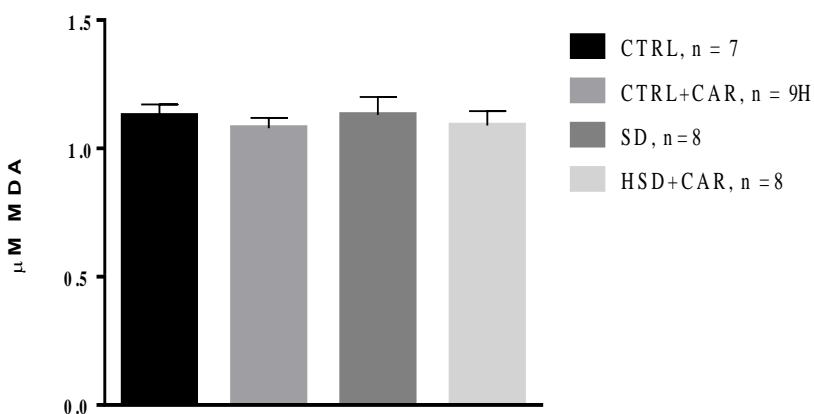
Tablica 4. Usporedba koncentracija AOPP u uzorcima bedrenih mišića među eksperimentalnim skupinama.

Grupa	AOPP [nmol/ml]	One-WayANOVA/Holm-Sidak's test	Statistički značajno	P vrijednost
CTRL	114,6 (27,05)	CTRL + CAR u usporedbi s CTRL	Ne	0,7037
CTRL + CAR	108,2 (40,02)	HSD u usporedbi s CTRL	Da	0,0111
HSD	169,3 (32,00)	HSD + CAR u usporedbi s CTRL	Ne	0,1256
HSD + CAR	79,42 (32,98)	HSD u usporedbi s CTRL + CAR	Da	0,0051
		HSD + CAR u usporedbi s CTRL + CAR	Ne	0,1812
		HSD + CAR u usporedbi s HSD	Da	< 0,0001

Rezultati su opisani kao aritmetička sredina (standardna devijacija). Razina statističke značajnosti određena je sa $p < 0,05$. CTRL – kontrola; zdravi netretirani štakori, CAR – karnozin, HSD – štakori hranjeni hranom sa visokim udjelom kuhinjske soli.

5.2. Razina oksidativnog stresa (TBARS) u serumu Sprague-Dawley štakora

Razina oksidativnog stresa određena mjerenjem TBARS u serumu Sprague-Dawley štakora između svih ispitivanih skupina (Slika 7., Tablica 5.) nije se značajno razlikovala.



Slika 7. Razina oksidativnog stresa (TBARS) u serumu Sprague-Dawley štakora. Rezultati su opisani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (One-Way ANOVA). Stupići prikazuju aritmetičku sredinu, a okomite crte s graničnikom standardnu devijaciju. CTRL – kontrola; zdravi netretirani štakori, CAR – karnozin, HSD – štakori hranjeni hranom sa visokim udjelom kuhinjske soli.

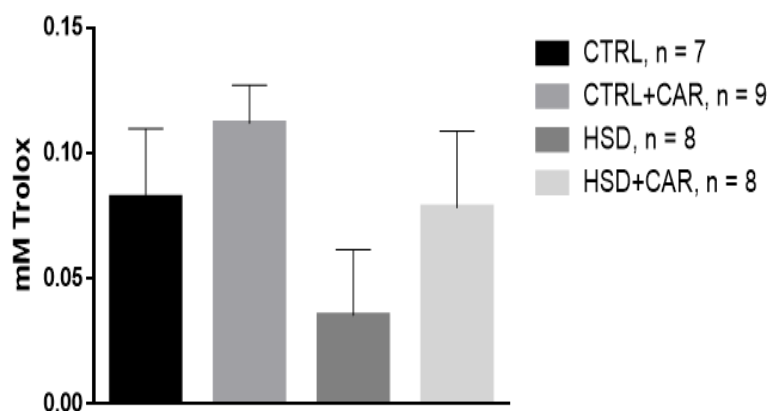
Tablica 5. Usporedba razine oksidativnog stresa (TBARS) u uzorcima seruma između eksperimentalnih skupina.

Grupa	TBARS [μM MDA]	One-WayANOVA/Holm-Sidak's test	Statistički značajno	P vrijednost
CTRL	1,126 (0,05)	CTRL + CAR u usporedbi s CTRL	Ne	0,4846
CTRL + CAR	1,080 (0,04)	HSD u usporedbi s CTRL	Ne	0,9343
HSD	1,130 (0,07)	HSD + CAR u usporedbi s CTRL	Ne	0,4908
HSD + CAR	1,089 (0,06)	HSD u usporedbi s CTRL + CAR	Ne	0,4286
		HSD + CAR u usporedbi s CTRL + CAR	Ne	0,9343
		HSD + CAR u usporedbi s HSD	Ne	0,4846

Rezultati su opisani kao aritmetička sredina (standardna devijacija). Razina statističke značajnosti određena je sa $p < 0,05$. CTRL – kontrola; zdravi netretirani štakori, CAR – karnozin, HSD – štakori hranjeni hranom sa visokim udjelom kuhinjske soli.

5.3. Razina antioksidativnog kapaciteta (FRAP) u serumu Sprague-Dawley štakora

U skupini HSD utvrđena je statistički značajna razlika u razini antioksidativnog kapaciteta u serumu u odnosu na ostale skupine (Slika 8., Tablica 6.).



Slika 8. Razina antioksidativnog kapaciteta (FRAP) u serumu Sprague-Dawley štakora. Rezultati su opisani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (One-Way ANOVA). Stupići prikazuju aritmetičku sredinu, a okomite crte s graničnikom standardnu devijaciju. CTRL – kontrola; zdravi netretirani štakori, CAR – karnozin, HSD – štakori hranjeni hranom sa visokim udjelom kuhinjske soli.

Tablica 6. Usporedba razine antioksidativnog kapaciteta (FRAP) u uzorcima seruma između eksperimentalnih skupina

Grupa	FRAP [mM Trolox]	Holm-Sidak's test	Statistički značajno	P vrijednost
CTRL	0,082 (0,03)	CTRL + CAR u usporedbi s CTRL	Ne	0,0973
CTRL + CAR	0,112 (0,01)	HSD u usporedbi s CTRL	Da	0,0126
HSD	0,035 (0,03)	HSD + CAR u usporedbi s CTRL	Ne	0,7860
HSD + CAR	0,078 (0,03)	HSD u usporedbi s CTRL + CAR	Da	0,0001
		HSD + CAR u usporedbi s CTRL + CAR	Ne	0,0973
		HSD + CAR u usporedbi s HSD	Da	0,0262

Rezultati su opisani kao aritmetička sredina (standardna devijacija). Razina statističke značajnosti određena je sa $p < 0,05$. CTRL – kontrola; zdravi netretirani štakori, CAR – karnozin, HSD – štakori hranjeni hranom sa visokim udjelom kuhinjske soli.

6. RASPRAVA

Brojna istraživanja su dokazala kako prekomjeren unos soli u prehrani predstavlja rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti koji je neovisan o dobro poznatoj sposobnosti povećanja arterijskog tlaka kod nekih osoba (46, 47). Istraživanja provedena na normotenzivnim pokusnim životinjama dokazale su da je ključna značajka ovog učinka prehranske soli neovisnog o tlaku smanjenje bioraspoloživosti vaskularnog dušikovog oksida (NO) koje ograničava dilataciju ovisnu o endotelu (48, 49). Smanjenje dušikovog oksida snažno je povezano s povećanim razinama reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) koje stvara NAD(P)H oksidaza, ksantin oksidaza ili nevezana endotelna dušik oksid sintaza unutar vaskularne stijenke, što dovodi ne samo do uklanjanja dušikovog oksida, već i do poremećaja signalnih putova koji posreduju njegovu proizvodnju. Posljedično tome nastaju promjene vaskularne reaktivnosti u mikro i makrocirkulaciji zbog povećanog unosa kuhinjske soli (NaCl) prehranom (7). Na genskoj razini, prekomjerna količina soli dovodi do povećanog stvaranja slobodnih kisikovih radikala što za posljedicu ima nastajanje oksidativnog stresa i oštećenje staničnih struktura (4). Povećanje oksidativnog stresa dovodi do aktivacije endotelnih stanica i razvoja upale (50). Povećano istraživanje uloge oksidativnog stresa u različitim bolestima usmjerilo je znanstvenike na proučavanje lijekova koji sprječavaju stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) ili mijenjaju njihov metabolizam. Karnozin (CAR; β -alanil-L-histidin) je dipeptid koji ima protuupalnu, antioksidativnu aktivnost i djeluje kao „čistač” ROS-a. Karnozin je antioksidans koji stabilizira i štiti staničnu membranu. Prirodno se nalazi u organizmu, posebice u mozgu, srcu i mišićnim tkivima. Karnozin reagira s reaktivnim kisikovim radikalima i sprječava nastanak oksidativnog stresa. Također je aktivan i kada su štetne komponente već formirane djelovanjem slobodnih radikala poput lipidnih peroksida i njihovih sekundarnih produkata. Na ovaj način tkiva su zaštićena i od ”drugog vala” štetnih učinaka ovih tvari (40). Brojne kliničke studije proučavale su terapijski potencijal karnozina za liječenje bolesti poput dijabetesa i s njim povezanih komplikacija, kao i umora, starenja i neuroloških poremećaja (51, 52, 53). Rezultati velikog broja studija o djelovanju suplementacije karnozinom u liječenju Parkinsonove bolesti i dijabetesa prikazuju da ovaj dipeptid pozitivno utječe na liječenje te da usporava starenje organizma (43, 54). Još jedan od značajnih učinaka karnozina uočili su Vittorio Calabrese i suradnici (55). Njihova studija pokazala je da karnozin može modulirati oksidativni stres i upalu u mozgu i bubrezima, potiskujući interaktivnu sinergiju oštećenja između ova dva

organa. Karnozin blokira vrlo reaktivni krajnji proizvod lipidne peroksidacije – malondialdehid (MDA). MDA, ukoliko se ne eliminira, može prouzročiti oštećenje lipida, enzima i DNA te ima značajnu ulogu u razvoju ateroskleroze, upalnih promjena te općenito procesa starenja (41). Kontrolom oksidativnog stresa, suzbijanjem glikacije i keliranjem metalnih iona, karnozin može smanjiti štetne posljedice kao što je oštećenje DNA. Stoga je uporaba karnozina korisna kod starenja i patologija povezanih sa visokim unosom soli (npr. ateroskleroza, visoki krvni tlak) (43). Postoje brojne studije koje su proučavale utjecaj visokog unosa soli na oštećenje vaskularne funkcije i povećanje razine oksidativnog stresa te utjecaj karnozina njegovim antioksidativnim djelovanjem na smanjenje razine lipidne peroksidacije te lipoproteina niske gustoće u serumu ostarjelih štakora (4, 6, 41). Međutim, ne postoje studije koje su ispitale učinak karnozina na razinu oksidativnog stresa nakon visokog unosa soli. Naša studija ispitala je učinak suplementacije karnozinom na napredne oksidirane proteinske proizvode (AOPP) u serumu i tkivima Sprague-Dawley štakora prije i nakon visokog unosa soli uz suplementaciju karnozinom, te razine malondialdehida (MDA), stvaranje ROS-a i vrijednosti antioksidativnog kapaciteta nakon suplementacije karnozinom.

Naši rezultati su pokazali kako nije došlo do značajnog povećanja oksidativnog stresa koji je određivan TBARS metodom, koja mjeri produkte peroksidacije lipida i predstavlja mjeru oksidativnog stresa. Međutim, razina naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda u serumu štakora bila je značajno povišena u skupini štakora koji su bili podvrgnuti prehrani sa visokim udjelom kuhinjske soli (4 % NaCl-a) u odnosu na ostale skupine te smanjena nakon suplementacije karnozina. Također, razina naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda u uzorcima bedrenih mišića statistički je značajno bila veća u skupini štakora koji su bili podvrgnuti prehrani sa visokim udjelom kuhinjske soli o odnosu na ostale skupine. Napredni oksidirani proteinski proizvodi novi su pokazatelji oksidativnog oštećenja proteina. Oni potiču oksidativni stres i upalu te na taj način sudjeluju u mnogim patofiziološkim procesima različitih bolesti. Prethodne studije su pokazale da AOPP mogu povećati stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta i izlučivanje citokina te na taj način dovesti do oštećenja endotelne stanice i nastanka endotelne disfunkcije (23). AOPP induciraju reakciju oksidacijskog stresa in vivo aktiviranjem oksidativnog metabolizma neutrofila i monocita (24) i dulje vrijeme cirkuliraju u krvi pacijenata, jer je za njihovu razgradnju u stanicama potrebno nekoliko sati ili dana. Napredni oksidirani proteinski proizvodi (AOPP) potječu od oksidacijski modificiranog albumina (njegovih agregata ili fragmenata), ali također i od fibrinogena i

lipoproteina. Nastaju u reakciji kloriranih oksidansa, poput kloramina i hipokloričaste kiseline (HOCl), s proteinima plazme. Najčešći su marker oksidativnog stresa u mnogim bolestima kao što su Parkinsonova bolest, multipla skleroza, osteoartritis, uremija i druge (25) te su osjetljiviji pokazatelj oksidativnog stresa od TBARS metode budući da je stvaranje naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda (AOPP) nepovratno i ne može jednostavno biti hidrolizirano proteolitičkim enzimima. Nadalje, naši rezultati pokazuju da se razina antioksidativnog kapaciteta, koja je mjerena FRAP metodom, značajno razlikovala u eksperimentalnoj skupini koja je konzumirala hranu s visokim udjelom kuhinjske soli. U toj eksperimentalnoj skupini utvrđena je značajno niža razina antioksidativnog kapaciteta u serumu štakora. Najviša razina antioksidativnog kapaciteta utvrđena je u skupini štakora koji su kroz 7 dana konzumirali uobičajenu hranu sa niskim udjelom kuhinjske soli (0,4 % NaCl-a) i kroz oralnu sondu dobili su 150 mg/kg suplementaciju karnozina. Takvi rezultati su očekivani i u skladu su s prethodno provedenim istraživanjima (34, 56). Karnozin predstavlja veliki interes u brojnim istraživanjima u medicini jer mehanizmi njegovog djelovanja nisu još u potpunosti jasni. Ima jaka antioksidativna svojstva i njegova je primjena u liječenju različitih bolesti vrlo svestrana. Stoga je njegovo istraživanje od velikog interesa kod proučavanja različitih bolesti. Rezultati ove studije potvrđuju povećanje oksidativnog stresa nakon dijete s visokim unosom soli te ukazuju na učinkovito antioksidativno djelovanje karnozina na oksidativni stres uzrokovan povećanim unosom soli.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata dobiveni su sljedeći zaključci:

1. Povećani unos soli uzrokuje povećanje oksidativnog stresa kod Sprague-Dawley štakora
2. Nadomjestak karnozina dovodi do smanjenja oksidativnog stresa u serumu i tkivima štakora nakon konzumiranja hrane sa visokim udjelom kuhinjske soli
3. Karnozin dovodi do porasta antioksidativnog kapaciteta kod štakora nakon konzumiranja hrane sa visokim udjelom kuhinjske soli

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Ispitati učinak suplementacije karnozinom na proizvode oksidacije proteina i napredne oksidirane proteinske proizvode u serumu i tkivima Sprague-Dawley štakora prije i nakon visokog unosa soli uz suplementaciju karnozinom; razine malondialdehida, stvaranje ROS-a i vrijednosti antioksidativnog kapaciteta nakon suplementacije karnozinom.

Nacrt studije: Pokusno (eksperimentalno) istraživanje.

Materijali i metode: Sprague-Dawley štakori bili su podijeljeni u četiri skupine: zdravi netretirani štakori, štakori koji su konzumirali hranu sa visokim udjelom kuhinjske soli, štakori koji su konzumirali uobičajenu hranu sa niskim udjelom kuhinjske soli i kroz oralnu sondu dobivali suplementaciju karnozina te štakori koji su konzumirali hranu sa visokim udjelom kuhinjske soli i kroz oralnu sondu dobivali suplementaciju karnozina. Mjerenje naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda, razine malondialdehida i vrijednosti antioksidativnog kapaciteta nakon suplementacije karnozinom provodilo se u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek.

Rezultati: Rezultati su pokazali kako je razina naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda značajno povišena u skupini štakora koji su podvrgnuti prehrani sa visokim udjelom kuhinjske soli u usporedbi s ostalim skupinama u uzorcima seruma te smanjena nakon suplementacije karnozinom. Razina oksidativnog stresa određena mjerenjem TBARS u serumu Sprague-Dawley štakora između svih ispitivanih skupina nije se značajno razlikovala. U skupini štakora koji su podvrgnuti prehrani sa visokim udjelom kuhinjske soli utvrđena je značajna razlika u razini antioksidativnog kapaciteta u serumu u odnosu na ostale skupine.

Zaključak: Rezultati potvrđuju da je povećani oksidativni stres povezan s unosom visokog udjela kuhinjske soli te da nadomjestak karnozina ima antioksidativni učinak.

Ključne riječi: karnozin; napredni oksidirani proteinski proizvodi; oksidativni stres; Sprague-Dawley štakori

9. SUMMARY

The effect of carnosine supplementation on the level of oxidative stress in Sprague-Dawley rats on a high-salt diet

Objectives: To examine the effect of carnosine supplementation on protein oxidation products and advanced oxidized protein products in serum and tissues of Sprague-Dawley rats before and after high salt intake with carnosine supplementation; malondialdehyde levels, ROS formation and antioxidant capacity values after carnosine supplementation.

Study design: Experimental research

Materials and Methods: Sprague-Dawley rats were divided into four groups: healthy untreated rats, rats that consumed a high-salt diet, rats that consumed a normal low-salt diet and received carnosine supplementation through an oral gavage, and rats that consumed with a high content of table salt and received carnosine supplementation through an oral tube. The measurement of advanced oxidized protein products, malondialdehyde levels and antioxidant capacity values after carnosine supplementation was carried out in the Laboratory for Molecular and Clinical Immunology of the Faculty of Medicine Osijek.

Results: The results showed that the level of advanced oxidized protein products was significantly increased in the group of rats fed a high salt diet compared to other groups in serum samples and decreased after carnosine supplementation. The level of oxidative stress determined by measuring TBARS in the serum of Sprague-Dawley rats was not significantly different between all the investigated groups. In the group of rats that were subjected to a diet with a high content of table salt, a significant difference in the level of antioxidant capacity in the serum was found compared to the other groups.

Conclusion: The results confirm that increased oxidative stress is associated with high salt intake and that carnosine replacement has an antioxidant effect.

Keywords: carnosine; advanced oxidized protein products; oxidative stress; Sprague-Dawley rats

10. LITERATURA

1. Krüger-Genge A, Blocki A, Franke RP, Jung F. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(18):4411.
2. Čavka A, Tadžić R, Grizelj I, Unfirer T, Mihaljević Z, Mihalj M i sur. Endotelna funkcija-funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. *Medicinski Vjesnik*. 2012;44:135-146.
3. Harris RA, Nishiyama SK, Wray DW, Richardson RS. Ultrasound assessment of flow-mediated dilation: a tutorial. *Hypertension*. 2010;55(5):1075–1085.
4. Ćosić A. Uloga oksidativnog stresa u razvoju poremećenog vaskularnog odgovora pod utjecajem visokog unosa natrijeva klorida kod Sprague-Dawley štakora (doktorska disertacija). Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera, Medicinski fakultet Osijek; 2016.
5. Matic A, Jukic I, Stupin A, et al. High salt intake shifts the mechanisms of flow-induced dilation in the middle cerebral arteries of Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;315(3):H718-H730. doi:10.1152/ajpheart.00097.2018
6. Cosic A, Jukic I, Stupin A, et al. Attenuated flow-induced dilatation of middle cerebral arteries is related to increased vascular oxidative stress in rats on a short-term high salt diet. *J Physiol*. 2016;594(17):4917-4931. doi:10.1113/JP272297
7. Čavka A i suradnici. Effects of AT1 Receptor Blockade on Plasma Thromboxane A2 (TXA2) Level and Skin Microcirculation in Young Healthy Women on Low Salt Diet. *Kidney Blood Press Res*. 2013;37:432-442.
8. Jay H, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature Public Health Emergency Collection*. 2021;20(9):689–709.
9. Pol A, Gilst WH, Adriaan A, Meer P. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. *European Journal of Heart Failure*. 2019;21(4):425–435.
10. Daenen K, Andries A, Mekahli D, Schepdael AV, Jouret F, Bammens B. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatric nephrology*. 2019;34(6):975-991.
11. Yang S, Lian G. ROS and diseases: role in metabolism and energy supply. *Molecular and cellular biochemistry*. 2020;467(1-2):1-12.

12. Ćosić A, Novak S, Jukić I, Stupin A, Mihaljević Z, Rašić L, i sur. Primjena laboratorijskih metoda u dijagnosticiranju oksidativnog stresa na primjeru animalnog modela prekomjernog unosa soli. *Cardiol Croat.* 2017;12:78.
13. Senoner T, Dichtl W. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target. *Nutrients.* 2019;11(9):2090.
14. Shadel GS, Horvath TL. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell.* 2015;163(3):560-9.
15. Su LJ, Zhang JH, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D i sur. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy and Ferroptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2019;2019:5080843.
16. Rochette L, Dogon G, Rigal E, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Lipid Peroxidation and Iron Metabolism: Two Corner Stones in the Homeostasis Control of Ferroptosis. *International Journal of Molecular Sciences.* 2023;24(1):449.
17. Özben T. Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc.* 1998;75(2):199-212.
18. Štefan L, Tepšić T, Zaviđić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipid peroxidation - causes and consequences. *Medicina.* 2007;43:84-93.
19. Đikić D. Fiziologija oksidativnog stresa u ljudi i životinja (protokol za praktikum). 2013.
20. Mihaljević Z. Utjecaj akutne i intermitentne hiperbarične oksigenacije na reaktivnost krvnih žila kod zdravih Sprague-Dawley štakora. *Doktorska disertacija.* 2018.
21. Ou H, Huang Z, Mo Z, Xiao J. The characteristics and roles of advanced oxidation protein products in atherosclerosis. *Cardiovasc Toxicol.* 2017;17(1):1-12.
22. Pasquali L, Pecori C, Lucchesi C, LoGerfo A, Iudice A, Siciliano G i sur. Plasmatic oxidative stress biomarkers in multiple sclerosis: relation with clinical and demographic characteristics. *Clinical biochemistry.* 2015;48(1-2):19-23.
23. Zhongyuan L, Xinqiang Y, Wangsheng J, Wei L, Siyuan Z, Congrui L i sur. Advanced oxidation protein products induce microglia-mediated neuroinflammation via MAPKs-NF- κ B signaling pathway and pyroptosis after secondary spinal cord injury. *J Neuroinflammation.* 2020;17:90.

24. Witko-Sarsat V, Gausson V, Nguyen AT, Touam M, Drüeke T, Santangelo F i sur. AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: A potential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients. *Kidney Int.* 2003;64:82–91.
25. Selmeçi L. Advanced oxidation protein products (AOPP): novel uremic toxins, or components of the non-enzymatic antioxidant system of the plasma proteome. *Free Radical Research.* 2011;45:1115–1123.
26. Yali S, Jing L, Zhuolin Q, Donghong C, Chen L, Xiaoning L i sur. Advanced oxidation protein products from the follicular microenvironment and their role in infertile women with endometriosis. *Experimental and therapeutic medicine.* 2018;15(1):479-486.
27. Jasna Lovrić, Jadranka Sertić. Harperova ilustrirana biokemija; Slobodni radikali i antioksidacijske hranjive tvari. Medicinska naklada, Zagreb. 2011;482-486.
28. H. Sies. Strategies of antioxidant defense. *European journal of biochemistry.* 1993;215:213-219.
29. Jaganjac M, Sredoja Tisma V, Zarkovic N. Short Overview of Some Assays for the Measurement of Antioxidant Activity of Natural Products and Their Relevance in Dermatology. *Molecules.* 2021;26(17):5301.
30. Minichl D, Brown BI. A Review of Dietary (Phyto) Nutrients for Glutathione Support. *Nutrients.* 2019;11(9):2073.
31. Lintig J, Moon J, Lee J, Ramkumar S. Carotenoid Metabolism at the Intestinal Barrier. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2020;1865(11):158580.
32. Ciumărnean L, Milaciu MV, Runcan O, Vesa SC, Răchișan AL, Negrean V i sur. The Effects of Flavonoids in Cardiovascular Diseases. *Molecules.* 2020;25(18):4320.
33. Milani GP, Macchi M, Guz-Mark A. Vitamin C in the Treatment of COVID-19. *Nutrients.* 2021;13(4):1172.
34. Katalinić V, Salamunić I, Pažanin S, Mulić R, Milišić M, Ropac D. The Antioxidant Power and Level of Lipid Peroxidation Products in the Sera of Apparently Healthy Adult Males. *Collegium antropologicum.* 2007;1:165-171.
35. Stupin A, Ćosić A, Novak S, Vesel M, Jukić I, Popović B i sur. Reduced dietary selenium impairs vascular function by increasing oxidative stress in Sprague-Dawley rat aortas. *Int J Environ Res Public Health (Basel, Switzerland).* 2017;14(6):591.

36. Jukić I, Kolobarić N, Stupin A, Matic A, Kozina N, Mihaljević Z i sur. Carnosine, Small but Mighty-Prospect of Use as Functional Ingredient for Functional Food Formulation. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(7):1037.
37. Creighton JV, Gonçalves LS, Artioli GG, Tan D, Elliott-Sale KJ, Turner MD i sur. Physiological Roles of Carnosine in Myocardial Function and Health. *Advances in Nutrition*. 2022;13(5):1914–1929.
38. Saunders B, Elliott-Sale K, Artioli GG, Swinton PA, Dolan E, Roschel H i sur. β -Alanine supplementation to improve exercise capacity and performance: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Sports Medicine*. 2017;51(8):658–69.
39. Kralik G, Sak-Bosnar M. Općenito o karnozinu. *Krmiva*. 2012;54:159.
40. Xing L, Chee ME, Zhang H, Zhang W, Mine Y. Karnozin—prirodni bioaktivni dipeptid: biodostupnost, bioraspoloživost i zdravstvene prednosti. *Journal of Food Bioactives*. 2019;5:8–17.
41. Kim MY, Kim EJ, Kim YN, Choi C, Lee BH. Effects of α -lipoic acid and L-carnosine supplementation on antioxidant activities and lipid profiles in rats. *Nutrition Research and Practice*. 2011;5:421.
42. Ma XY, Jiang ZY, Lin YC, Zheng CT, Zhou GL. Dietary supplementation with carnosine improves antioxidant capacity and meat quality of finishing pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2010;94:286–295.
43. Menini S, Iacobini C, Fantauzzi CB, Pugliese G. L-carnosine and its Derivatives as New Therapeutic Agents for the Prevention and Treatment of Vascular Complications of Diabetes. *Current Medicinal Chemistry*. 2020;27(11):1744-1763.
44. Aldini G, Courten B, Regazzoni L, Gilardoni E, Ferrario G, Baron G i sur. Understanding the antioxidant and carbonyl sequestering activity of carnosine: direct and indirect mechanisms. *Free Radical Research*. 2021;55(4):321-330.
45. Klebanov GI, Teselkin YO, Babenkova IV, Popov IN, Levin G, Tyulina OV, Vladimirov YA. Evidence for a direct interaction of superoxide anion radical with carnosine. *IUBMB Life*. 1993;43:99.
46. Riches SP, Piernas C, Aveyard P, Sheppard JP, Rayner M, Albury C i sur. A Mobile Health Salt Reduction Intervention for People With Hypertension: Results of a Feasibility Randomized Controlled Trial. *JMIR Mhealth Uhealth*. 2021;9(10):26233.

47. Rorije NMG, Rademaker E, Schrooten EM, Wouda RD, Van Der Heide JH, Van Den Born BJH. High-salt intake affects sublingual microcirculation and is linked to body weight change in healthy volunteers: a randomized cross-over trial. *J Hypertens.* 2019;37(6):1254-1261.
48. Boegehold MA. The effect of high salt intake on endothelial function: reduced vascular nitric oxide in the absence of hypertension. *J Vasc Res.* 2013;50(6):458-67.
49. Bądryńska B, Vaneckova I, Sadowski J, Hojną S, Kompanowska-Jeziarska E. Effects of systemic and renal intramedullary endothelin-1 receptor blockade on tissue NO and intrarenal hemodynamics in normotensive and hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2021;910:174445.
50. Yi B, Titze J, Rykova M, Feuerecker M, Vassilieva G, Nichiporuk I, i sur. Effect of dietary salt levels on monocytic cells and immune responses in healthy human subjects: a longitudinal study. *Transl Res.* 2017;166(1):103-110.
51. Menini S, Iacobini C, Fantauzzi CB, Pugliese G. L-carnosine and its Derivatives as New Therapeutic Agents for the Prevention and Treatment of Vascular Complications of Diabetes. *Curr Med Chem.* 2020;27(11):1744-1763.
52. Kubota M, Kobayashi N, Sugizaki T, Shimoda M, Kawahara M, Tanaka KI. Carnosine suppresses neuronal cell death and inflammation induced by 6-hydroxydopamine in an in vitro model of Parkinson's disease. *PLoS One.* 2020;15(10):e0240448.
53. Banerje S, Ghosh TK, Poddar MK. Carnosine reverses the aging-induced down regulation of brain regional serotonergic system. *Mech Ageing Dev.* 2015;152:5-14.
54. Bermúdez ML, Seroogy KB, Genter MB. Evaluation of Carnosine Intervention in the Thy1-aSyn Mouse Model of Parkinson's Disease. *Neuroscience.* 2019;411:270-278.
55. Calabrese V, Scuto M, Salinaro AT, Dionisio G, Modafferi S, Ontario ML i sur. Hydrogen Sulfide and Carnosine: Modulation of Oxidative Stress and Inflammation in Kidney and Brain Axis. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(12):1303.
56. Benzie IF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of „Antioxidant Power“: The FRAP Assay. *Analytical biochemistry.* 1996;239:70-76.

11. ŽIVOTOPIS**Osobni podatci:**

Ime i prezime: Ana Zidar

Datum i mjesto rođenja: 08.06.1999., Osijek

Adresa: B.J. Jelačića 27, 33515, Orahovica

Adresa e-pošte: ana.zidar080699@gmail.com

Obrazovanje:

2015. - 2018.: Opća gimnazija Stjepan Ivšić Orahovica

2018. - 2021.: Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

2021. – 2023.: Diplomski sveučilišni studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Projekti:**AKTIVNO**

Sudjelovanje na Festivalu znanosti "Boje" 8.4. - 13.4. 2019.

Sudjelovanje na seminaru "Primjena rekombinantne DNA tehnologije u biotehnologiji", Osijek 2.10.2020.

Sudjelovanje u radionici "Osnove znanstvenog istraživanja", Medicinski fakultet Osijek 4. - 5.12.2020.

Sudjelovanje na Festivalu znanosti „Priroda i društvo“ 24. – 29.4.2023.

PASIVNO

Sudjelovanje na studentskom kongresu OSCON 2021."International translational medicine congress of students and young physicians", Medicinski fakultet Osijek 19.3. - 20.3.2021.

Sudjelovanje na studentskom kongresu OSCON 2022."Mind & Matter", Medicniski fakultet Osijek, 30.3. - 01.4.2022.

Sudjelovanje na "8th Internacional Student Congres Graz- Conecting Health Sciences", Medical University of Graz Austria, 16.6. - 18.6.2022.

Sudjelovanje na konferenciji Plexus – "Internacionalna Plexus conference- conecting and inspiring young biomedical professionals from around the world", održana u Hrvatski dom Split 23.7. - 25.7.2022.

Sudjelovanje na konferenciji Brain Gut - "Brain-Gut Axis Conference,, održana u Zagrebu 8.10. - 9.10.2022.

Sudjelovanje na studentskom kongresu OSCON 2023."Pediatrics", Medicinski fakultet Osijek, 30.3. – 1.4. 2023.

Nagrade:

Dekanova nagrada za uspješnost u studiranju u akademskoj 2020./2021. godini.

Dekanova nagrada za uspješnost u studiranju u akademskoj 2021./2022. godini.