

# Sastav lipida stanične membrane jetre mužjaka štakora Sprague Dawley hranjenih masnom i slatkom hranom i tretiranih metforminom ili liraglutidom

---

**Ganjto, Marija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:094879>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike**

**Marija Ganjto**

**SASTAV LIPIDA STANIČNE  
MEMBRANE JETRE MUŽJAKA  
ŠTAKORA SPRAGUE DAWLEY  
HRANJENIH MASNOM I SLATKOM  
HRANOM I TRETIRANIH  
METFORMINOM ILI LIRAGLUTIDOM**

**Završni rad**

**Osijek, 2018.**

Rad je ostvaren u: Medicinskom fakultetu u Osijeku

Mentor rada: prof. dr. sc. Marija Heffer

Rad ima 35 listova, 2 tablice i 2 slike.

## Zahvala

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Mariji Heffer na mentorstvu, prenesenom znanju i pomoći tijekom izrade završnog rada.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Senki Blažetić na prenesenom znanju i stručnom vođenju tijekom izrade završnog rada.

Također hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su mi pružili potrebnu podršku i pomoć.

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Metabolički sindrom.....	1
1.2. Promjene u sastavu stanične membrane kod inzulinske rezistencije .....	2
1.2.1. Sastav i struktura stanične membrane .....	3
1.2.2. Fluidnost stanične membrane i membranski proteini povezani s inzulinskom rezistencijom .....	4
1.2.3. Inzulinski receptor .....	4
1.2.4. Transport glukoze preko stanične membrane .....	5
1.2.5. Učinak masti u prehrani na funkcionalnost stanične membrane u odnosu s inzulinskom rezistencijom .....	5
1.3. Gangliozidi .....	5
1.3.1. Struktura i metabolizam .....	6
1.3.2. Funkcija gangliozida .....	6
1.3.3. Gangliozidi i bolest .....	6
1.4. Utjecaj antidijabetika metformina i liraglutida na sastav stanične membrane .....	7
1.4.1. Metformin .....	7
1.4.2. Liraglutid.....	8
2. Hipoteza .....	9
3. Cilj.....	10
4. Materijal i metode .....	11
4.1. Ustroj studije.....	11
4.2. Materijal.....	11
4.3. Metode .....	11
4.3.1. Izolacija gangliozida .....	11
4.3.2. Kvantitativna analiza gangliozida .....	12
4.4. Statističke metode.....	13
5. Rezultati .....	14
6. Rasprava .....	18
7. Zaključci.....	21
8. Sažetak .....	22
9. Summary .....	23
10. Literatura (referencije) .....	24
11. Životopis.....	29

## Popis kratica

AMPK	AMP-aktivirana protein kinaza
DPP-4	dipeptidil peptidaza-4
GIP	inzulintropni polipeptid ovisan o glukozi, (eng. <i>glucose-dependent insulinotropic polypeptide</i> )
GLP-1	glukagonu sličan peptid-1, (eng. <i>glucagon-like peptide-1</i> )
GLUT	transporter glukoze, (eng. <i>glucose transporter</i> )
HFHSD	prehrana bogata mastima i šećerom, (eng. <i>high fat high sugar diet</i> )
HFHSD+L	prehrana bogata mastima i šećerom uz terapiju liraglutidom
HFHSD+M	prehrana bogata mastima i šećerom uz terapiju metforminom
HPTLC	silika-gel pločice visoke sposobnosti razlučivanja, (eng. <i>High Performance Thin-Layer Chromatography</i> )
IDF	Međunarodna dijabetička federacija, (eng. <i>International Diabetes Federation</i> )
IRS-1	supstrat inzulinskog receptora-1
LPL	lipoprotein lipaza
MUFA	mononezasićene masne kiseline, (eng. <i>monounsaturated fatty acids</i> )
NAFLD	nealkoholna masna jetra, (eng. <i>non-alcoholic fatty liver disease</i> )
NEFA	neesterificirane masne kiseline, (eng. <i>non-esterified fatty acids</i> )
PE	fosfatidil-etanolamin
PUFA	polinezasićene masne kiseline, (eng. <i>polyunsaturated fatty acids</i> )
SD	standardna dijeta
SFA	zasićene masne kiseline, (eng. <i>saturated fatty acids</i> )
TLC	tankoslojna kromatografija, (eng. <i>Thin-Layer Chromatography</i> )
TNF- $\alpha$	čimbenik nekroze tumora, (eng. <i>tumor necrosis factor</i> )

## 1. Uvod

## 1. Uvod

### 1.1. Metabolički sindrom

Metabolički sindrom skupina je metaboličkih poremećaja koja obuhvaća inzulinsku rezistenciju, hipertenziju, poremećen metabolizam glukoze, dislipidemiju te pretilost. Ovi poremećaji rizični su faktori za nastanak kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa tipa 2. Najčešće je prihvaćena definicija metaboličkog sindroma ona Međunarodne dijabetičke federacije (*International Diabetes Federation, IDF*) koja metabolički sindrom opisuje kao prisutnost središnje pretilosti (opseg struka  $\geq 102$  cm kod muškaraca i  $\geq 88$  cm kod žena), zajedno s dvije ili više sljedećih značajki: trigliceridi  $\geq 1,7$  mmol/L, HDL-kolesterol  $\geq 1,04$  kod muškaraca i  $\geq 1,29$  kod žena, sistolički krvni tlak  $\geq 130$  ili dijastolički  $\geq 85$  mm Hg i glukoza natašte  $\geq 6,1$  mmol/L ili poznata povijest dijabetesa tipa 2 (1).

Smatra se da je uzrok razvoju ovoga sindroma suvremeni način života koji uključuje nepravilnu prehranu, izloženost stresu, nedostatak sna i neaktivnost. Prevalencija metaboličkog sindroma u svijetu visoka je i stalno se povećava stoga se javlja potreba za pronalaskom farmakoloških preparata koje bi spriječile razvoj ovoga sindroma. Sukladno tome, važno je otkriti mehanizam nastanka metaboličkih promjena kako bi se mogla provoditi što specifičnija, dakle i uspješnija terapija. Liječenje metaboličkog sindroma usmjereno je na smanjenje štetnih učinaka njegovih značajki, što podrazumijeva smanjenje tjelesne težine, poboljšanje osjetljivosti na inzulin, smanjenje krvnog tlaka i razine triglicerida. Cilj je normalizirati ove parametre, što se može postići farmakološkom terapijom, a dijeta može biti moćno sredstvo sprječavanja razvoja metaboličkog sindroma.

Naime, postoji pretpostavka da loša prehrana izravno utječe na promjene u sastavu stanične membrane i da se većina simptoma metaboličkog sindroma javlja zbog poremećenog metabolizma uzrokovanog upravo tim promjenama. Epidemiološke studije sugeriraju da zapadni stil prehrane uzrokuje metabolički sindrom dok dijete bogate voćem, povrćem, žitaricama, ribom i mliječnim proizvodima s niskim udjelom masnoće imaju zaštitnu ulogu (2). Prehrana bogata zasićenim masnim kiselinama (engl. *saturated fatty acids, SFA*) smanjuje osjetljivost na inzulin i povećava lipide u krvi, dok zamjena zasićenih masnih kiselina za ugljikohidrate i mononezasićene masne kiseline (engl. *monounsaturated fatty acids, MUFA*) poništava ove abnormalnosti i u zdravih osoba i u dijabetičara (3, 4, 5, 6). Dijete obogaćene mononezasićenim masnim kiselinama dovode do manje potrebe za inzulinom i do niže koncentracije glukoze u plazmi u usporedbi s dijetom s niskim mastima i visokim ugljikohidratima u bolesnika s dijabetesom tipa 2 (7). Ljudi koji koriste maslinovo ulje imaju

## 1. Uvod

nižu inzulinsku rezistenciju od onih koji koriste suncokretovo ulje, a maslinovo ulje je izvor n-6 polinezasićenih masnih kiselina (engl. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) (8). Dijete obogaćene mononezasićenim masnim kiselinama mogu poboljšati osjetljivost na inzulin i u zdravih osoba i u dijabetičara (3, 4, 5). Primjena ovih kiselina može povećati razine glukagonu sličnog peptida-1 (engl. *glucagon-like peptide-1*, GLP-1). GLP-1 je hormon sa širokim rasponom fizioloških djelovanja koji ga čine snažnim sredstvom za snižavanje glukoze u krvi s mogućnošću modificiranja prirodne povijesti dijabetesa tipa 2. Kod životinjskih modela nativni GLP-1 stimulira  $\beta$ -stanice na proliferaciju i može imati brojne kardiovaskularne i druge prednosti. Sniženje glukoze uzrokovano GLP-1 ovisno je o glukozi, stoga to ograničava rizik od hipoglikemije. Međutim, njegov vrlo kratak poluživot posljedica je brzog metabolizma enzimom dipeptidil peptidaza-4 (DPP-4) koji ograničava njegov terapijski potencijal, što može pridonijeti povećanom lučenju inzulina (9). Eksperimentalne studije na životinjama i staničnim kulturama pokazale su da zasićene masne kiseline teže oksidiraju te se akumuliraju kao lipotoksični produkti uzrokujući smanjenu funkciju  $\beta$ -stanica, dok se čini da MUFA i PUFA sprječavaju razvoj tih događaja usmjeravanjem masti u oksidaciju ili sintezu triglicerida (10). Dokazano je da je plazmatska glukoza značajno smanjena nakon mediteranske i visokouglikohidratne dijeta, osim toga ukazala je na poboljšanje osjetljivosti na inzulin (11). Nadalje, oleinska kiselina može promicati inzulinski prijenos signala i inhibira jetrenu rezistenciju na inzulin i glukoneogenezu. (12).

### 1.2. Promjene u sastavu stanične membrane kod inzulinske rezistencije

Inzulinska rezistencija ključna je značajka koja patogenetski povezuje metabolički sindrom, dijabetes tip 2 i kardiovaskularne poremećaje. Inzulinska rezistencija karakterizirana je smanjenjem mogućnosti inzulina da ostvari svoje fiziološke funkcije u tkivima, uzrokujući hiperinzulinemiju kao kompenzacijski odgovor na održavanje homeostaze glukoze (13). Ovo stanje u konačnici rezultira zatajenjem gušterače jer  $\beta$ -stanice više nisu sposobne izdržati hipersekreciju inzulina, što dovodi do propadanja stanica i smanjenje lučenja inzulina. Dakle, hiperinzulinemija uzrokovana inzulinskom rezistencijom doprinosi propadanju  $\beta$ -stanica i razvoju dijabetesa. Najvažnije promjene kod otpornosti na inzulin opažene su na ciljnim tkivima inzulina kao što su masno tkivo, mišići i jetra. U masnom tkivu, osim smanjenog unosa glukoze, postoje promjene u metabolizmu lipida (smanjen unos masnih kiselina uslijed smanjene ekspresije lipoproteina lipaze (LPL) i proteina-4 za vezanje masnih kiselina (engl. *fatty acid-binding protein 4*, FABP4)) (14). Osim toga, vjeruje se da inzulinska rezistencija povećava oslobađanje neesterificiranih masnih kiselina (engl. *non-esterified fatty acid*, NEFA)



## 1. Uvod

uslijed pojačane lipolize (15). U skeletnom mišićju, unos glukoze također je smanjen zbog inzulinske rezistencije, a situacija se pogoršava povećanjem dostupnosti masnih kiselina iz masnog tkiva u plazmi. U jetri, inzulinska rezistencija uzrokuje smanjenje sinteze glikogena zajedno s povećanom glukoneogenezom, lipogenezom i sintezom proteina. Prisutnost inzulinske rezistencije u inzulinu osjetljivim ciljnim tkivima rezultira abnormalnostima kao što su hiperglikemija, hiperinzulinemija, hipertrigliceridemija (koje su uobičajene značajke metaboličkog sindroma). Štoviše, inzulinska rezistencija ima posljedice i u lipidnom i proteinskom sastavu stanične membrane, što mijenja njenu fluidnost, strukturu i funkcionalnost (11).

### 1.2.1. Sastav i struktura stanične membrane

Promjene u dinamičkim svojstvima stanične membrane (npr. fluidnost stanične membrane), može biti jedan od događaja kod kojih pretilost utječe na osjetljivost na inzulin (16). Značajna razlika u molekularnoj konfiguraciji masnih kiselina, osobito u stupnju nezasićenosti, čini razliku u svojstvima jednom kada je ugrađena u staničnu membranu. Kod ljudi, demonstriran je odnos između sastava masnih kiselina u membranama skeletnih mišića i osjetljivosti na inzulin: što je veći postotak PUFA-e, to je bolja inzulinska aktivnost (17). Membranski fosfatidil-etanolamin (PE) i sfingomijelin nezavisni su prediktori inzulinske rezistencije i kod mršavih i kod pretilih osoba (18).

Fosfolipidi glavni su sastojci bioloških membrana, a od njih glicerofosfolipidi pojavljuju se najčešće. Međutim, u biološkim membranama fosfolipidi se ne raspoređuju ravnomjerno, umjesto toga formiraju mikrodomene ili splavi različitog sastava lipida. Glavnina membrana obogaćena je glicerofosfolipidima koji su labavo pakirani u tekućem-neuređenom stanju koje pokazuje visoku fluidnost. Nasuprot tome, lipidne splavi imaju visok sadržaj glicerofosfolipida, sfingolipida i glikozilfosfatidilinozitola. Te su domene bogate i kolesterolom za koji se smatra da pridonosi čvrstom pakiranju lipida ispunjavanjem prostora između drugih lipidnih molekula pa se ovakve domene zovu uređenima (19). Varijanta splavi, kaveole, pojavljuje se kao prugasta invaginacija na staničnoj membrani i karakterizirana je prisutnošću proteina kaveolina (integralni protein od 21 kDa) (20). *In vitro* studije pokazale su da kaveolin može djelovati kao aktivator inzulinskog receptora (21).

Naime, predloženo je da je inzulinska rezistencija ne samo uzrok, nego i posljedica poremećaja lipida kao što je dislipidemija i / ili abnormalnosti sastava fosfolipida stanične membrane. Kao uzrok, inzulinska rezistencija može biti odgovorna za promjene u membranskim parametrima,

## 1. Uvod

posebno u sadržaju membranskog sfingomijelina i PE preko promjena u izmjeni tvari između stanica i plazmatskih lipoproteina, stimulaciji unosa fosfolipida u stanicu ili biosinteze fosfolipida (18). Drugo, inzulinska rezistencija je posljedica abnormalnosti membranskih fosfolipida. Izmjene u sastavu membranskih fosfolipida mogu imati ulogu u djelovanju inzulina mijenjanjem fluidnosti membrane, i kao posljedicu, mijenjanje signalnog puta inzulina (11).

### 1.2.2. Fluidnost stanične membrane i membranski proteini povezani s inzulinskom rezistencijom

Promjene u sastavu fosfolipida stanične membrane rezultiraju promjenama u sveukupnim fizikalno-kemijskim svojstvima dvosloja, kao što je fluidnost. Osim toga, takve promjene mogu modulirati funkciju membranskih proteina koji sudjeluju u djelovanju inzulina. Strukturalne studije pokazuju da su interakcije membranskih proteina i lipidnih molekula od velike važnosti za njihovu stabilnost, regulaciju unosa glukoze, vezanje inzulina i ekspresiju inzulinskog receptora (18).

### 1.2.3. Inzulinski receptor

Inzulin djeluje putem inzulinskog receptora, integralnog membranskog proteina iz porodice protein tirozin kinaze. Nakon vezanja inzulina, receptor se autofosforilizira na tirozinskim ostacima i time postaje sjedno mjesto za druge proteine, prenoseći signal na metaboličke i mitogene signalne mreže (22). Smanjenje regulacije aktivnosti inzulinskog receptora i supstrata inzulinskog receptora (IRS-1) javlja se u tkivima osjetljivim na inzulin i može biti odgovorno za razvoj inzulinske rezistencije (23).

Aktivnost inzulinskog receptora, kao i njegov afinitet za inzulin, ovisi o strukturi i funkcionalnoj cjelovitosti i fluidnosti stanične membrane, koji su pak ovisni o lipidnom sastavu membrane. Smanjena fluidnost membrane uzrokovana povišenim sadržajem zasićenih masnih kiselina u fosfolipidnom dvosloju dovodi do smanjenja broja inzulinskih receptora i njihovog afiniteta za inzulin. Nasuprot tome, prisutnost polinezasićenih masnih kiselina (specifično n-3 masnih kiselina) u dvosloju fosfolipida povećava membransku fluidnost i povezana je s poboljšanom osjetljivošću na inzulin (24). Masne kiseline također mogu modulirati djelovanje protein kinaze C, čija aktivacija može dovesti do povećane serin/treonin fosforilacije supstrata inzulinskog receptora. Ova konformacijska promjena dovodi do smanjenja tirozinske fosforilacije supstrata inzulinskog receptora čime se smanjuje aktivacija nizvodnog signalnog puta inzulina i uzrokuje inzulinsku rezistenciju (25).

## 1. Uvod

### 1.2.4. Transport glukoze preko stanične membrane

Transporteri glukoze (engl. *glucose transporter*, GLUT) specifični su transportni proteini koji olakšavaju difuziju glukoze u stanice. GLUT su integralni membranski proteini koji sadrže 12 transmembranskih uzvojnica, a oba kraja (amino i karboksilni) izložena su na citoplazmatskoj strani membrane. Ovi proteini olakšavaju kretanje glukoze samo u termodinamički preferiranom smjeru.

GLUT4 se razlikuje od drugih transportera glukoze po tome što je oko 90 % GLUT4 izdvojeno u unutarstaničnim vezikulima u odsutnosti inzulina. Nakon stimulacije inzulinskog receptora unutarstanične zalihe translocirane su na stanične membrane (mišićnih) stanica. Kulminacija se događa kada dođe do spajanja (fuzije) membrane s vezikulima koje sadržavaju GLUT4.

Sadržaj masnih kiselina u sastavu stanične membrane može utjecati na prijenos glukoze GLUT-om. Weijers i sur. ukazali su da pomak od nezasićenih prema zasićenima masnim kiselinama u staničnim membranama neutralizira mehanizam odgovoran za umetanje GLUT4 u staničnu membranu, gušćim pakiranjem fosfolipida čime utječe na transport glukoze i osjetljivost na inzulin (26).

### 1.2.5. Učinak masti u prehrani na funkcionalnost stanične membrane u odnosu s inzulinskom rezistencijom

Vrsta i količina dijetalnih masti utječe na sastav lipida staničnih membrana i modulira interakcije s proteinima uključenim u regulaciju osjetljivosti na inzulin, ali i procesa povezanih s drugim komponentama metaboličkog sindroma kao što je dislipidemija i hipertenzija (27).

## 1.3. Gangliozidi

Gangliozidi su kiseli glikosfingolipidi koji sadrže sijalinsku kiselinu, a najviše su eksprimirani u živčanom sustavu. Do sada je identificirano 188 gangliozida u kralježnjaka, koji se međusobno razlikuju po karakterističnim ugljikohidratnim strukturama. U stanicama, gangliozidi su primarno smješteni unutar vanjskog lista stanične membrane i integralne (neodvojive) su komponente mikrodomena (lipidnih splavi) na staničnoj površini zajedno sa sfingomijelinom i kolesterolom s kojima sudjeluju u staničnom prepoznavanju, staničnoj aktivnosti, metabolizmu, adheziji i prijenosu signala (28).

## 1. Uvod

### 1.3.1. Struktura i metabolizam

Glikolipidi su biomolekule koje se sastoje od jednog ili više ugljikohidratnih ostataka vezanih za hidrofobnu lipidnu skupinu glikozidnom vezom. Glikolipidi koji u svome sastavu imaju aminoalkohol sfingozin i masnu kiselinu vezanu preko serina, odnosno ceramidno sidro, nazivaju se glikosfingolipidi. Upravo u tu skupinu (glikosfingolipide) ubrajaju se i gangliozidi.

Gangliozidi su kiseli glikosfingolipidi koji sadrže jednu ili više sijalinskih kiselina (obično N-acetilneuraminsku kiselinu, a rjeđe ili nikako N-glikolilneuraminsku kiselinu) vezanu na unutarnju ili vanjsku galaktozu osnovnog ugljikohidratnog lanca (29). Gangliozidi su primarno sintetizirani u endoplazmatskom retikulumu i kasnije modificirani u Golgijevom aparatu postupnim dodavanjem dodatnih ugljikohidratnih skupina na postojeću akceptorsku lipidnu molekulu. Reakcije su katalizirane nizom specifičnih glikoziltransferaza (30).

### 1.3.2. Funkcija gangliozida

Gangliozidi su pronađeni u različitim tkivima i tjelesnim tekućinama, a najviše su izraženi u živčanom sustavu gdje ih je i deset puta više nego u ekstraneuralnim tkivima. Na površini stanice, gangliozidi sudjeluju u staničnom prepoznavanju, adheziji i prijenosu signala unutar specifičnih mikrodomena, kaveola, lipidnih splavi ili glikosfingolipidima obogaćenih mikrodomena, zajedno s ostalim membranskim komponentama kao što su sfingomijelin i kolesterol. Osim toga što su prisutni u staničnoj membrani, pokazano je postojanje gangliozida i na jezgrinoj ovojnici gdje imaju važnu ulogu u moduliranju homeostaze unutarstaničnog i intranuklearnog kalcija, a posljedično tome i stanične funkcije.

### 1.3.3. Gangliozidi i bolest

Primijećeno je da postoji poveznica između sastava lipidnih splavi i inzulinske rezistencije. Sposobnost vezanja inzulina na inzulinski receptor te prenošenje signala na nizvodne molekule regulirano je gangliozidima. Studije rađene na staničnim kulturama i *in vivo* modeli na miševima s isključenim genom *ST3gal5* (31) pokazuju kako su gangliozidi fiziološki regulatori osjetljivosti inzulinskog receptora. Također je primijećeno da dijabetične životinje imaju smanjen broj kompleksnih gangliozida što dovodi do pretpostavke da smanjen broj gangliozida izravno utječe na sposobnost inzulinskih receptora da vežu inzulin. Nedostatak prijenosa signala inzulinskim receptorom ometa signalni put koji dovodi na membranu transporter glukoze (GLUT4) i posljedično dolazi do povišenja koncentracije glukoze u krvi. Udruženo djelovanje inzulinskog receptora i kaveolina-1 potrebno je za optimalan odgovor inzulina *in*

## 1. Uvod

*vivo* (32). U odsutnosti GM3 gangliozida, inzulinski receptor zajedno s kaveolinom-1 relativno je nepokretan i osjetljiv na inzulin. Kada je GM3 povećan (kao kod tretmana s čimbenikom nekroze tumora, engl. *tumor necrosis factor- $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ), inzulinski receptori udružuju se s GM3, time se oslobađaju od interakcije s kaveolinom-1, postaju pokretni (mobilni) i čine inzulinski receptor rezistentnim na inzulin.

Prostorno usmjerena mutageneza identificirala je kationski ostatak (Lys-944) koji je potreban za vezanje inzulinskog receptora i GM3, ovo može poslužiti kao način za ispitivanje doprinose li interakcije inzulinski receptor-gangliozid razvoju inzulinske rezistencije (33).

Ako se pokaže da sastav gangliozida stanične membrane utječe na razvoj inzulinske rezistencije, enzimi koji sudjeluju u sintezi i razgradnji gangliozida, potencijalni su cilj u terapiji dijabetesa tipa 2.

### 1.4. Utjecaj antidijabetika metformina i liraglutida na sastav stanične membrane

Neki od postojećih antidijabetika, primjerice metformin i liraglutid, mogu posredno djelovati na sastav membrane što će se ovom studijom istražiti.

#### 1.4.1. Metformin

Metformin je antidijabetik prve linije kod pacijenata s dijabetesom tipa 2. Ublažava hiperglikemiju bez stimuliranja sekrecije inzulina, povećanja težine ili uzorkovanja hipoglikemije. Uz to, metformin ima pozitivan učinak na cirkulirajuće lipide koji su povezani s povećanim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti (34, 35). Dva učinka metformina; smanjena proizvodnja glukoze u jetri i povećan unos u skeletne mišićne stanice, implicirani su kao glavni doprinos učinkovitom smanjenju glukoze. Metformin za ciljno mjesto svoga djelovanja ima enzim AMPK (AMP- aktivirana protein kinaza) čime potiče mišiće na unos glukoze iz krvi (36).

Mehanizam kojim metformin poboljšava kontrolu razine glukoze u krvi uglavnom je utjecaj na smanjenje proizvodnje glukoze u jetri i u manjoj mjeri, povećanjem periferne osjetljivosti na inzulin, uz istodobno blokirajuće djelovanje na gastrointestinalnu apsorpciju glukoze, modulirajuće djelovanje na crijevnu mikrofloru i poticanje inkretinskog sustava (37).

Inkretini su dio endokrinog sustava koji sudjeluje u fiziološkoj regulaciji homeostaze u krvi. Izolirani su inzulotropni polipeptid ovisan o glukozi (engl. glucose-dependent insulinotropic polypeptide, GIP) i GLP-1. GIP luče K-stanice duodenuma, a GLP-1 luče L-

## 1. Uvod

stanice tankog crijeva. Kada je koncentracija glukoze u krvi povišena, GIP i GLP-1 potiču snažniju sintezu inzulina i njegovo izlučivanje iz  $\beta$ -stanica gušterače. S porastom koncentracije inzulina raste i unos glukoze u tkiva. GLP-1 smanjuje i izlučivanje glukagona iz  $\alpha$ -stanica gušterače. Pad koncentracije glukagona i povišenje koncentracije inzulina smanjuju stvaranje glukoze u jetri, samim time javlja se pad koncentracije glukoze u krvi. U dijabetesu tip 2 inkretinski sustav je oštećen.

Metformin pokazuje nekoliko korisnih „nuspojava“ kao što su smanjenje pretilosti, antihepatosteatotsko i protuupalno djelovanje, a ispituje se njegovo djelovanje u liječenju pretilosti (38), nealkoholne masne jetre (eng. *non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) (39), sindroma policističnih jajnika (40) i određenih vrsta raka (41).

Leptin je hormon koji je deriviran iz adipocita, koji ima snažne učinke i centralno i periferno. U mozgu, leptin inhibira unos hrane, potiče potrošnju energije i regulira autonomnu živčanu kontrolu igrajući glavnu ulogu u regulaciji tjelesne težine (42). U perifernim tkivima, leptin izravno djeluje na jetru, mišiće i gušteraču kako bi pojačao oksidaciju masti (43) ili inhibiciju sekrecije inzulina (44). Mutacije u funkciji leptina (*ob/ob*) ili genu za leptinski receptor (*db/db*) uzrokuju abnormalnosti kao što su hiperfagija, dijabetes, hiperkortizolemija, neplodnost, netolerancija hladnoće, masna jetra i aberacije kostura (45). Leptinska rezistencija igra ključnu ulogu u patogenezi pretilosti (46), dok je hepatička (jetrena) leptinska rezistencija ključna odrednica akumulacije lipida u jetri (47). Metformin povećava (ekspresiju) jetrenih (OB-Rb), ali ne i bubrežnih (OB-Ra, OB-Rc i OB-Rd) leptinskih receptora. Također, metformin može izravno pojačati jetrenu osjetljivost na leptin, ovo može pridonijeti njegovim antisteatotskim učincima, osobito u kontekstu pretilosti (48).

### 1.4.2. Liraglutid

Liraglutid je analog GLP-1 s podudarnošću sekvence od 97% s humanim GLP-1 koji se veže na GLP-1 receptor i aktivira ga (49). Liraglutid potiče lučenje inzulina u ovisnosti od glukoze, također i snižava visoko lučenje glukagona (u ovisnosti od glukoze) (50, 51, 52). Nadalje, snižava tjelesnu težinu i količinu masnog tkiva kroz mehanizme koji obuhvaćaju smanjenje gladi i sniženje unosa energije. Isto tako, snižava i sistolički krvni tlak.

Ne postoje biokemijske studije koje su ispitivale djelovanje antidijabetika metformina i liraglutida na sastav jetrenih lipida na modelu životinja hranjenih masnom i slatkim dijetom pa je cilj ove studije testirati sastav staničnih membrana u ovom modelu.

## 2. Hipoteza

## 2. Hipoteza

Hranjenje mužjaka štakora Sprague Dawley hranom bogatom mastima i šećerima dovodi do promjene sastava lipida staničnih membrana jetre što u konačnici rezultira inzulinskom rezistencijom i razvojem dijabetesa. Antidijabetici metformin i liraglutid popravljaju metabolizam glukoze i posredno utječu na ispravljanje disbalansa gangliozida u staničnim membranama jetre pretilih životinja tretiranih ovim lijekovima.

### 3. Cilj

### 3. Cilj

Cilj je istraživanja ekstrahirati i karakterizirati gangliozide stanične membrane jetre smznutih tkiva iz arhive, prikupljenih od mužjaka Sprague Dawley štakora hranjenih standardnom hranom ili masnom i slatkim hranom. Usporediti sastav i količinu gangliozida stanične membrane jetre kod životinja hranjenih masnom i slatkim dijetom s istim kod životinja koje su osim obogaćene prehrane dobivale antidijabetike metformin ili liraglutid.



## 4. Materijal i metode

## 4. Materijal i metode

### 4.1. Ustroj studije

Ovo je studija parova u kojoj su uspoređene životinje na standardnoj dijeti prema životinjama na dijeti bogatoj mastima i šećerima; životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima prema životinjama tretiranim masnom i slatkom hranom i antidijabeticima metforminom ili liraglutidom.

### 4.2. Materijal

Studija je napravljena na tkivima koja su prikupljena u projektu 'Uloga oksidativnog stresa u razvoju poremećenog vaskularnog odgovora kod pretilih, predijabetičkih štakora starije dobi tretiranih s metforminom i liraglutidom' odobrenog od strane Etičkog povjerenstva za istraživanje Medicinskog fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/16-08/15; Broj: 2158-61-07-16-143; dana 16. prosinca 2016.) voditeljice dr. Ines Drenjančević. Za dio studije koji se nalazi u završnom radu ishodišno je dodatno odobrenje od strane istog tijela pod brojem 2158-61-07-18-101.

U početnoj su studiji bila 32 mužjaka Sprague Dawley štakora podijeljena u 4 skupine: mužjaci na standardnoj dijeti, mužjaci hranjeni slatkim i masnom hranom i mužjaci tretirani metforminom i liraglutidom uz tretman obogaćenom hranom. Životinje su bile na navedenoj dijeti od 44. tjedna starosti. Nakon 6 tjedna hranjenja trećoj i četvrtoj skupini životinja uvedena je andijabetička terapija. Sve životinje su žrtvovane u dobi od 64. tjedna kada su prikupljena tkiva. Ekstrakcija gangliozida napravljena je kod tri nasumično izabrane životinje iz svake skupine - ukupno dvanaest životinja.

### 4.3. Metode

Gangliozidi su izolirani i analizirani iz svježe smrznutih uzoraka jetrenog tkiva 12 životinja. Nakon disekcije uzorci tkiva čuvani su na  $-80^{\circ}\text{C}$  do analize. Ekstrakcija gangliozida je napravljena Svennerholmovom metodom (53).

#### 4.3.1. Izolacija gangliozida

Izolacija gangliozida iz jetrenog tkiva provedena je organskim otapalima u nekoliko koraka.

Izvaganim uzorcima (0,25 g) dodana je destilirana voda (450  $\mu\text{L}$ ) nakon čega je uzorak homogeniziran u Potterovom homogenizatoru. Zatim je homogenatu dodan metanol (1 200  $\mu\text{L}$ )

#### 4. Materijal i metode

u omjeru metanol-voda 8:3. Uzorak je promiješan na miješalici. U sljedećem koraku dodan je kloroform (600 $\mu$ L), čime je dobiven omjer kloroform-metanol-voda 4:8:3. Redoslijed otapala je bitan kako bi se osigurala maksimalna precipitacija hidrofobnih proteina. Nakon dodavanja kloroforma, uzorak je ponovno promiješan na miješalici. Netopljivi dio smjese odvojen je centrifugiranjem na 5 000 g tijekom 15 minuta. Odvojen je supernatant te je u njega dodana voda (375  $\mu$ L). Ponovno je uslijedilo centrifugiranje (5 000 g, 15 min) nakon čega se otopina razdvojila na dvije faze. Gornja (polarna) faza je odvojena i korištena za daljnju izolaciju (u njoj se nalaze polarni gangliozidi). Zatim je polarna faza uparena u sušioniku pri 90° C.

##### 4.3.2. Kvantitativna analiza gangliozida

Za razdvajanje gangliozida korištena je tankoslojna kromatografija (eng. *Thin-Layer Chromatography*, TLC) na silika-gel pločicama visoke sposobnosti razlučivanja (eng. *High Performance Thin-Layer Chromatography*, HPTLC).

Prvo je učinjena aktivacija HPTLC pločica koja je napravljena tako da se pločica zagrijala na 110° C tijekom 15 min. Nakon toga na pločicu su nanjeni standard i uzorci iz jetrenog tkiva. Standard je sadržavao sljedeće gangliozide: GM1, GM3, GD1a, GD1b i GT1b. Osim njih kao standard je poslužio i Cronassial (lijek proizvođača La Fidia Farmaceutici koji u svom sastavu ima četiri osnovna gangliozida ekstrahirana iz govedeg mozga: GM1, GD1a, GD1b, GT1b. Lijek je povučen s tržišta kada se otkrilo da može izazvati Guillain-Barré sindrom, ali se još uvijek koristi u znanstvene svrhe). Na pločice je nanošeno po 2  $\mu$ L uzorka iz tkiva jetre pomoću Hamilton igle. Zatim je pločica razvijena u sustavu otapala kloroform-metanol-0,25% CaCl<sub>2</sub> u omjeru 55:45:10. Pločica je izvađena iz otapala i dobro osušena u uspravnom položaju. Nakon toga pločica je ravnomjerno poprskana Svennerholm reagensom, pokrivena staklom jednakih dimenzija i zagrijana u sušioniku (110° C, 30 min). Gangliozidi bi ovim postupkom trebali poprimiti ljubičastu boju, ali su ovdje poprimili smeđu boju zbog oksidacije koja se dogodila zbog prisutnosti hemoglobina.

Pločice su skenirane, a intenzitet obojenja analiziran je korištenjem javno dostupnog Image J programa (NIH, Bethesda, MD, USA).

## 4. Materijal i metode

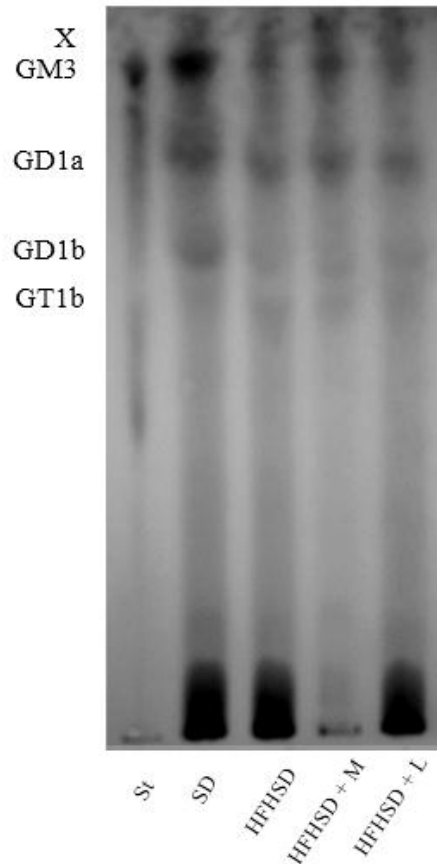
### 4.4. Statističke metode

Normalnost distribucije podataka provjerena je Shapiro-vim - Wilk testom. Razlika u količini gangliozida testirana je Mann-Whitneyevim U testom, a razina značajnosti postavljena je na  $P= 0,05$ . Navedena statistička analiza provedena je u programu Statistica 13.

## 5. Rezultati

### 5. Rezultati

Nakon ekstrakcije gangliozida, tipovi i količina gangliozida analizirani su tankoslojnom kromatografijom (Slika 1.).

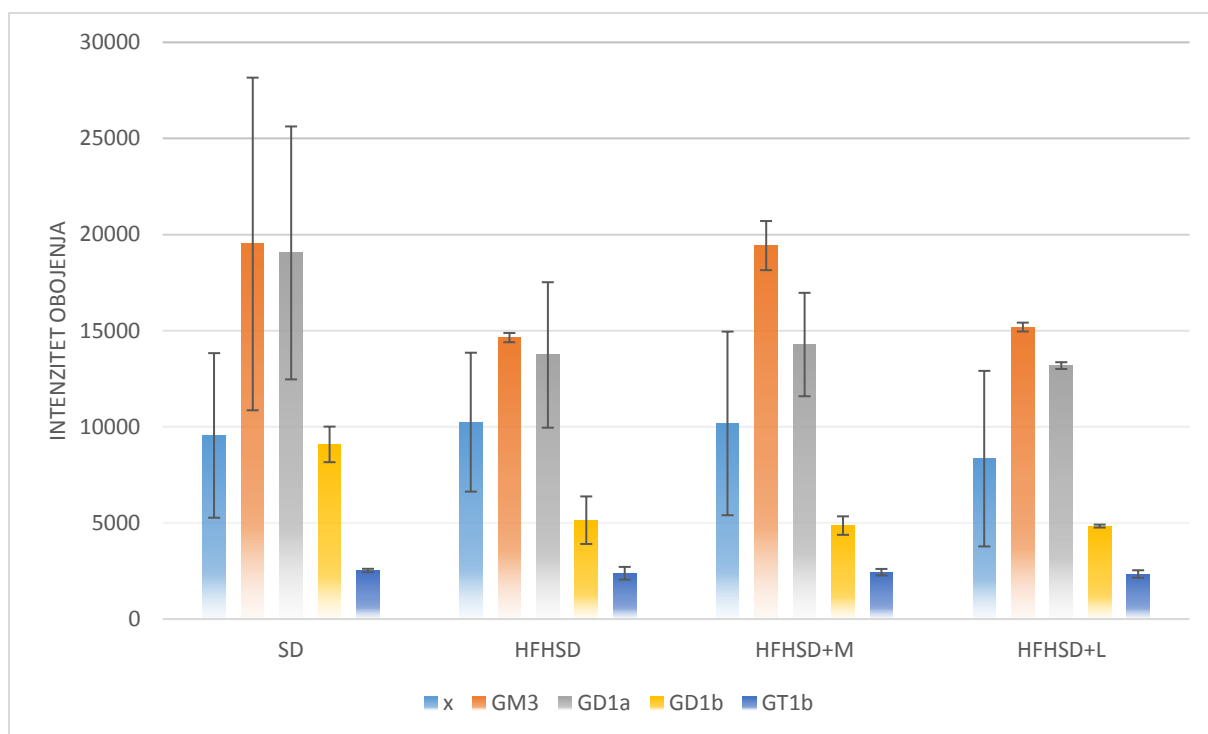


Slika 1. TLC pločica nakon vizualizacije Svennerholm reagensom i obrade u Image J programu  
Opis kratica: St – standard, SD – uzorak iz životinje na standardnoj dijeti, HFHSD – uzorak životinje na prehrani bogatoj mastima i šećerom (eng. *high fat high sugar diet*), HFHSD+M – uzorak životinje koja je uz obogaćenu prehranu bila na terapiji metforminom, HFHSD+L – uzorak životinje koja je uz obogaćenu prehranu bila na terapiji liraglutidom, X – nepoznati gangliozid

Budući da su za ekstrakciju uzoraka korištene jetre koje prethodno smravanju nisu perfundirane, osim gangliozida na pločici su vidljivi i druge molekule kao što su lipidi. Bez obzira na dobiveno, zahvaljujući standardu, identificirani su gangliozidi.

Korištenjem programa Image J izmjeren je intenzitet obojenja svakog pojedinog gangliozida, te su rezultati prikazani u obliku srednje vrijednosti dobivenih rezultata (Slika 2.)

## 5. Rezultati



Slika 2. Količina i tipovi gangliozida po skupinama. Opis kratica: SD – standardna dijeta, HFHSD – engl. *high fat high sugar diet*, prehrana bogata mastima i šećerom; HFHSD+M – HFHSD uz tretman metforminom, HFHSD+L – HFHSD uz tretman liraglutidom.

Statistički značajne razlike unutar grupa nema, ali je vidljivo smanjenje dominantnog GM3 gangliozida kao posljedica prehrane bogate mastima i šećerom. Također, vidljivo je da metformin pokazuje veće povećanje količine GM3 od liraglutida.

U svim analiziranim skupinama u najvećoj koncentraciji prisutan je GM3, dok je drugi po redu po količini GD1a. U kontrolnoj skupini gangliozidi a serije (GM3 i gangliozid X, kojeg nije moguće točno odrediti) zauzimaju 48,66% od ukupnih gangliozida. Vidljivo je da kao posljedica prehrane bogate mastima i šećerom udio gangliozida a serije prelazi 50% ukupnih gangliozida (Tablica 1).

## 5. Rezultati

Tablica 1. Udio pojedinih tipova gangliozida unutar skupina

GANGLIOZID	SKUPINA ŽIVOTINJA			
	SD	HFHSD	HFHSD+M	HFHSD+L
<b>X</b>	15,995 %	22,196 %	19,884 %	19,007 %
<b>GM3</b>	32,671 %	31,729 %	37,955 %	34,601 %
<b>GD1A</b>	31,892 %	29,771 %	27,898 %	30,037 %
<b>GD1B</b>	15,212 %	11,144 %	9,494 %	11,018 %
<b>GT1B</b>	4,166 %	5,161 %	4,765 %	5,338 %

\* SD – standardna dijeta, HFHSD – engl. *high fat high sugar diet*, prehrana bogata mastima i šećerom; HFHSD+M – HFHSD uz tretman metforminom, HFHSD+L – HFHSD uz tretman liraglutidom.

Tablica 2. Koeficijenti promjene dobiveni iz omjera srednjih vrijednosti intenziteta obojenosti

Gangliozid	Usporedba skupina					
	HFHSD vs SD	HFHSD+M vs SD	HFHSD+L vs SD	HFHSD+M vs HFHSD	HFHSD+L vs HFHSD	HFHSD+L vs HFHSD+M
<b>X</b>	1,072 ↑	1,066 ↑	0,874 ↓	0,994 ↓	0,815 ↓	0,820 ↓
<b>GM3</b>	0,750 ↓	0,996 ↓	0,778 ↓	1,327 ↑	1,037 ↑	0,782 ↓
<b>GD1a</b>	0,721 ↓	0,750 ↓	0,692 ↓	1,040 ↑	0,960 ↓	0,923 ↓
<b>GD1b</b>	0,566 ↓	0,535 ↓	0,532 ↓	0,945 ↓	0,941 ↓	0,995 ↓
<b>GT1b</b>	0,943 ↓	0,966 ↓	0,928 ↓	1,024 ↑	0,984 ↓	0,961 ↓

\* SD – standardna dijeta, HFHSD – engl. *high fat high sugar diet*, prehrana bogata mastima i šećerom; HFHSD+M – HFHSD uz tretman metforminom, HFHSD+L – HFHSD uz tretman liraglutidom; ↓ = smanjenje; ↑ = povećanje; napravljena je statistička analiza i rezultati nisu pokazali statistički značajnu razliku smanjenja odnosno povećanja između skupina životinja.

Prehrana bogata mastima i šećerom generalno uzrokuje smanjenje gangliozida b i c serije, kao i GM3, dok dolazi do povećanja količine X gangliozida, za kojeg zbog položaja na TLC pločici možemo zaključiti da pripada a – seriji. Jednak učinak ima i sam metformin, dok u kombinaciji

## 5. Rezultati

s prehranom bogatom mastima i šećerom dolazi do toga da je učinak metformina obrnut, tj. dolazi do povećanja većine gangliozida, posebno GM3 koji se pod utjecajem same prehrane bogate mastima i šećerom najviše smanjuje (Tablica 2.). Sam liraglutid djeluje tako da smanjuje količinu svih gangliozida, dok u kombinaciji sa hranom bogatom mastima i šećerom dolazi do povećanja samo GM3.

## 6. Rasprava

### 6. Rasprava

Kao što je pokazano i u prijašnjim studijama, (54) GM3 je i u ovome istraživanju pokazano je smanjenje količine kod životinja. Kod životinja na masnoj i slatkoj prehrani tretiranih metforminom i liraglutidom vrijednosti su povišene u odnosu na one kod životinja na masnoj i slatkoj prehrani. Iz toga možemo zaključiti da oba antidijabetika utječu na povećanje ekspresije GM3, ali isto tako metformin se pokazao kao djelotvorniji lijek u povećanju ekspresije, jer djeluje i na ostale gangliozide iz b i c skupine.

Što se tiče do sada objavljenih znanstvenih radova, uloga ostalih gangliozida u reguliranju osjetljivosti na inzulin manje je jasna. Poznato je da je autofosforilacija inducirana inzulinom otopljenih i djelomično pročišćenih inzulinskih receptora iz limfoblasta i skeletnih mišića reducirana djelovanjem nekoliko gangliozida (GM3, GM2, GM1, GD1a i GT1b) (55, 56).

GD1a je također imao značajno niže vrijednosti kod skupine životinja na masnoj i slatkoj prehrani u odnosu na životinje na standardnoj dijeti, što je u korelaciji sa studijama koje su pokazale smanjenje GD1a kod životinja koje su razvile dijabetes (54). Osim toga, u skupini životinja tretiranih metforminom javile su se veće vrijednosti u odnosu na skupinu životinja tretiranih liraglutidom, iako kod GD1a povećanje ekspresije nije toliko veliko kao kod GM3.

GD1b ima također snižene vrijednosti u skupini životinja na masnoj i slatkoj prehrani, ali još niže vrijednosti nalaze se u skupinama životinja tretiranih antidijabeticima, što pokazuje da ovi antidijabetici nemaju utjecaja na povećanje ekspresije GD1b.

Što se tiče GT1b, također je snižen u skupini životinja na masnoj i slatkoj prehrani, ali mu je vrijednost još niža u skupini tretiranoj liraglutidom, dok se metformin i u ovome slučaju pokazao kao djelotvorniji što se tiče povećanja ekspresije ovoga gangliozida.

Jedini koji je pokazao više vrijednosti u skupini životinja na masnoj i slatkoj prehrani u odnosu na skupinu na standardnoj dijeti je nepoznati gangliozid (X) kod kojega su vrijednosti u skupini tretiranoj metforminom slične onoj kod životinja na masnoj i slatkoj prehrani, a najniže su vrijednosti kod skupine tretirane liraglutidom.

Budući da je glavni mehanizam djelovanja liraglutida povećanje cAMP-a i drugih glasnika, a metformin djeluje ne samo na povišenje istog preko više nizvodnih puteva već i na unos glukoze te izravnu aktivaciju enzima kao što su AMPK, moguće je da metformin zbog takvog kompleksnijeg djelovanja pokazuje jači učinak na ekspresiju ovih gangliozida (57).



## 6. Rasprava

Neke od prethodnih studija ne govore u prilog ovakvim rezultatima (58, 59). Naime, u njima je prezentirano kako povećana ekspresija GM3 utječe na stvaranje inzulinske rezistencije, gdje se inzulinski receptor umjesto s kaveolinom-1 spaja s GM3 čime inzulinski receptor čini rezistentnim na inzulin. Nasuprot tome, studija koja se bavila kasno-nastupajućom pretilošću i inzulinskom rezistencijom kod miševa kojima je nedostajala sialiltransferaza St3Gal-II (St3Gal-II premješta sialinsku kiselinu na terminalnu galaktozu gangliozida GM1 i GD1b kako bi sintetizirala GD1a i GT1b) govori o tome kako je kod miševa s isključenim genom St3Gal2, koji su zbog isključenja toga gena razvili pretilost i inzulinsku rezistenciju, pronađen manjak fosforiliranog inzulinskog receptora u adipoznom tkivu od 68%, a u jetri je pronađen manjak od 29% uz usporedno smanjenje ekspresije gangliozida GM3 i GD1a te potpunu odsutnost GT1b gangliozida (54). Ovo upućuje na to da kod štakora još uvijek nije došlo do razvoja inzulinske rezistencije, ali da se promjene vidljive na gangliozidima odvijaju u tom smjeru. Također, jasno je vidljiv pozitivan učinak oba antidijabetika.

Cilj ovoga istraživanja bio je ekstrahirati i karakterizirati gangliozide stanične membrane jetre mužjaka Sprague Dawley štakora hranjenih standardnom hranom ili masnom i slatkim hranom te usporediti sastav i količinu gangliozida stanične membrane jetre kod životinja hranjenih masnom i slatkim dijetom sa istim kod životinja koje su, osim obogaćene prehrane, dobivale antidijabetike metformin ili liraglutid. Naime, ovo je prva biokemijska studija koja je ispitala djelovanje antidijabetika metformina i liraglutida na sastav jetrenih lipida na modelu životinja hranjenih masnom i slatkim hranom.

Jetre mužjaka korištene u ovom istraživanju prikupljene su u sklopu projekt 'Uloga oksidativnog stresa u razvoju poremećenog vaskularnog odgovora kod pretilih, predijabetičkih štakora starije dobi tretiranih s metforminom i liraglutidom'. Zbog kompleksnosti istraživanja tijekom prikupljanja uzoraka nije bilo moguće napraviti perfuziju, nego je tkivo svježe smrznuto. Perfuzijom bi se uklonila krv iz jetre i time bi se značajno smanjila oksidacija željeza koja se tijekom ekstrakcije pokazala kao otežavajući faktor pri izolaciji gangliozida. Također, zbog prisutnosti željeza, nakon vizualizacije Svennerholmovim reagensom bandovi su poprimili smeđu boju, dok su inače ljubičaste boje. Kromatografsko razdvajanje bilo je otežano zbog prisutnosti željeza koje je stvaralo pozadinu te se gangliozidi nisu mogli u potpunosti razdvojiti. Osim toga, smeđa pozadina otežala je i očitavanje rezultata.

Uzevši sve u obzir, niti jedan lijek nije pokazao statistički značajno povećanje ekspresije gangliozida u staničnim membranama, iako je metformin povećao ekspresiju GM3, GD1a, GT1b i X gangliozida, a liraglutid samo ekspresiju GM3, kod ostatka gangliozida

## 6. Rasprava

povećanje je izostalo ili se čak i smanjila ekspresija pojedinih gangliozida (GD1b pri terapiji metforminom, te GD1a, GD1b, GT1b i X gangliozida pri terapiji liraglutidom). Uzrok ovakvom rezultatu koje je pokazalo nespecifično djelovanje antidijabetika može biti interferencija željeza koja je otežala očitavanje rezultata.

U svrhu boljeg razdvajanja gangliozida mogla bi se napraviti modifikacija tekuće faze za tankoslojnu kromatografiju, gdje bi se mogao promijeniti omjer otapala kako bi se izbjegao nastanak pozadine i kako bismo dobili oštrije ograničene bandove gangliozida. Također, trebalo bi se otkriti koji se gangliozid izolirao tankoslojnom kromatografijom, a u ovome je istraživanju nepoznat. Kao posljedica dobivenih rezultata planira se uhodavanje nove modificirane metode izolacije gangliozida iz prokrvljenih organa što bi povećalo mogućnosti za analizu.

## 7. Zaključci

### 7. Zaključci

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- masna i slatka prehrana pokazuju mogući utjecaj na sastav i količinu gangliozida stanične membrane jetre štakora, tako da smanjuju ekspresiju većine gangliozida u staničnim membranama,
- antidijabetici metformin i liraglutid pokazali su različit utjecaj na povećanje, odnosno smanjenje ekspresije gangliozida u staničnim membranama,
- metformin se pokazao kao učinkovitiji lijek što se tiče povećanja ekspresije gangliozida staničnih membrana u predijabetičkih životinja jer djeluje na veći broj različitih tipova gangliozida.

## 8. Sažetak

### 8. Sažetak

**Uvod:** Postoji pretpostavka da loša prehrana izravno utječe na promjene u sastavu stanične membrane. Osim toga primijećeno je kako dijabetične životinje imaju smanjen broj gangliozida u staničnim membranama što dovodi do pretpostavke da smanjen broj gangliozida izravno utječe na razvoj dijabetesa tip 2. Kako neki od postojećih antidijabetika mogu utjecati na sastav stanične membrane ispitan je njihov utjecaj.

**Cilj:** Usporediti sastav i količinu gangliozida stanične membrane jetre mužjaka Sprague Dawley na masnoj i slatkoj dijeti te životinja koje su uz takvu prehranu dobivale i antidijabetike metformin i liraglutid.

**Materijal i metode:** Istraživanje je provedeno na tkivu 12 nasumično odabranih životinja, po 3 životinje iz svake skupine. Izolacija gangliozida iz jetrenog tkiva napravljena je Svennerholmovom metodom organskim otapalima, dok je za njihovo razdvajanje korištena tankoslojna kromatografija (TLC) na silika-gel pločicama visoke sposobnosti razlučivanja (HPTLC).

**Rezultati:** Prehrana bogata mastima i šećerom uzrokuje smanjenje gangliozida b i c serije, kao i GM3, dok dolazi do povećanja količine X gangliozida. Učinak metformina je obrnut, tj. dolazi do povećanja većine gangliozida, posebno GM3. Sam liraglutid djeluje tako da smanjuje količinu svih gangliozida, dok u kombinaciji sa hranom bogatom mastima i šećerom dolazi do povećanja samo GM3.

**Zaključak:** Masna i slatka prehrana utječe na smanjenje ekspresije gangliozida staničnih membrana i samim time mijenja sastav stanične membrane. Nadalje, antidijabetici su pokazali različit utjecaj na povećanje, odnosno smanjenje ekspresije gangliozida u staničnim membranama.

**Ključne riječi:** mužjaci štakora, metformin, liraglutid, gangliozidi, jetra, stanična membrana, dijabetes melitus tip 2

## 9. Summary

### 9. Summary

Liver plasma membrane lipid composition in Sprague Dawley male rats fed with fatty and sweet food and treated with metformin or liraglutide

**Introduction:** There is assumption that bad food consumption affects alternations in composition of cell membrane. Additionally, animals which have diabetes also have decreased number of gangliosides what leads to assumption that decreased number of gangliosides directly affects development of diabetes type 2. Since some of antidiabetics can affect composition of cell membrane their influence was examined.

**Aim:** Purpose of this study was to compare composition and quantity of gangliosides in liver cell membrane in Sprague Dawley male rats fed with fatty and sweet food and animals that have been given antidiabetics metformin and liraglutide along with such diet.

**Materials and methods:** Research was carried out on tissue of 12 randomly selected animals, 3 animals from each group (males on standard diet, males fed with fatty and sweet food, males fed with fatty and sweet food who got metformin along with their diet and males fed with fatty and sweet food who got liraglutide along with their diet). Extraction of gangliosides from liver tissue was made by Svennerholm's method of organic solvents, while for their separation was used Thin-Layer Chromatography (TLC) on High Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC) silica-gel tiles.

**Results:** Fatty and sweet food causes decrease in gangliosides of b and c series, so as in GM3 ganglioside, but it increases quantity of X ganglioside. Effect of metformin is reversed here, respectively metformin increases majority of gangliosides, especially GM3. Liraglutide decreases quantity of all gangliosides, while in combination with fatty and sweet food liraglutide increases only GM3.

**Conclusion:** Fatty and sweet food affect the reduction of ganglioside expression in cell membranes and thus change composition of cell membrane. Furthermore, antidiabetics have shown different influences on the increase or decrease in the expression of gangliosides in cell membranes.

**Key words:** Male Rats, Liraglutide, Metformin, Gangliosides, Liver, Cell Membrane, Diabetes Mellitus Type 2

## 10. Literatura (referencije)

## 10. Literatura (referencije)

1. MSD priručnik dijagnostike i terapije pod pokroviteljstvom Hrvatskog liječničkog zbora 2014. Dostupno na adresi: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/poremecaji-prehrane/pretilost-i-metabolicki-sindrom/metabolicki-sindrom>  
Datum pristupa: 22.8.2018.
2. Lutsey PL, Steffen LM, Stevens J. Dietary Intake and the Development of the Metabolic Syndrome: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Circulation*. 2008;117(6):754–61.
3. Salas J, López MJ, Jansen S, Zambrana JL, Castro P, Paniagua JA, i sur. The diet rich in monounsaturated fat modifies in a beneficial way carbohydrate metabolism and arterial pressure. *Med. Clínica*. 1999;113: 765–9.
4. Vessby B, Uusitupa M, Hermansen K, Riccardi G, Rivellese AA, Tapsell LC, i sur. Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU study. *Diabetologia*. 2001Sep;44(3):312–9.
5. Parillo M, Rivellese A, Ciardullo A, Capaldo B, Giacco A, Genovese S, i sur. A high-monounsaturated-fat/low-carbohydrate diet improves peripheral insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism*. 1992;41(12):1373–8.
6. Schwab U, Lauritzen L, Tholstrup T, Haldorsson TI, Riserus U, Uusitupa M, i sur. Effect of the amount and type of dietary fat on cardiometabolic risk factors and risk of developing type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and cancer: a systematic review. *Food Nutr Res*. 2014;58(1):25145.
7. Garg A. High-monounsaturated-fat diets for patients with diabetes mellitus: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. 1998Jan;67(3).
8. Soriquer F, Rojo-Martínez G, Antonio IED, Adana MRD, Catalá M, Merelo M, i sur. Prevalence of obesity in south-east Spain and its relation with social and health factors. *Eur J Epidemiol*. 2003;19(1):33–40.
9. Beysen C, Karpe F, Fielding BA, Clark A, Levy JC, Frayn KN. Interaction between specific fatty acids, GLP-1 and insulin secretion in humans. *Diabetologia*. 2002Jan;45(11):1533–41.
10. Gaster M, Rustan AC, Beck-Nielsen H. Differential Utilization of Saturated Palmitate and Unsaturated Oleate: Evidence From Cultured Myotubes. *Diabetes*. 2005;54(3):648–56.

## 10. Literatura (referencije)

11. Perona JS. Membrane lipid alterations in the metabolic syndrome and the role of dietary oils. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1859(9):1690–703.
12. Wang X, Li Y-L, Wu H, Liu J-Z, Hu J-X, Liao N, i sur. Antidiabetic Effect of Oleanolic Acid: A Promising Use of a Traditional Pharmacological Agent. *Phytother Res*. 2011;25(7):1031–40.
13. Petersen KF, Shulman GI. Etiology of Insulin Resistance. *Am J Med*. 2006;119(5).
14. Clemente-Postigo M, Tinahones F, Cardona F. 162 Adipose Tissue Gene Expression Of Factors Related To Lipid Processing In Obesity. *Atherosclerosis Supplements*. 2011;12(1):36–7.
15. Frayn KN, Williams CM, Arner P. Are Increased Plasma Non-Esterified Fatty Acid Concentrations a Risk Marker for Coronary Heart Disease and other Chronic Diseases? *Clin Sci*. 1996;90(4):243–53.
16. Wiernsperger NF, Membrane physiology as a basis for the cellular effects of metformin in insulin resistance and diabetes, *Diabetes Metab J*. 1999;25:110–27.
17. Pan DA, Lillioja S, Milner MR, Kriketos AD, Baur LA, Bogardus C, i sur. Skeletal muscle membrane lipid composition is related to adiposity and insulin action. *J Clin Invest*. 1995Jan;96(6):2802–8.
18. Younsi M, Quilliot D, Al-Makdissy N, Delbachian IEN, Drouin P, Donner M, i sur. Erythrocyte membrane phospholipid composition is related to hyperinsulinemia in obese nondiabetic women: Effects of weight loss. *Metabolism*. 2002;51(10):1261–8.
19. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000;1(1):31–9.
20. Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP. Caveolins, a Family of Scaffolding Proteins for Organizing “Preassembled Signaling Complexes” at the Plasma Membrane. *J Biol Chem*. 1998;273(10):5419–22.
21. Nystrom FH. Caveolin-1 Interacts with the Insulin Receptor and Can Differentially Modulate Insulin Signaling in Transfected Cos-7 Cells and Rat Adipose Cells. *Mol Endocrinol*. 1999;13(12):2013–24.
22. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414(6865):799–806.
23. Das UN. A defect in the activity of  $\Delta 6$  and  $\Delta 5$  desaturases may be a factor predisposing to the development of insulin resistance syndrome. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005;72(5):343–50.

## 10. Literatura (referencije)

24. Storlien LH, Pan DA, Kriketos AD, Oconnor J, Caterson ID, Cooney GJ, i sur. Skeletal muscle membrane lipids and insulin resistance. *Lipids*. 1996;31(1).
25. Haag M, Dippenaar NG. Dietary fats, fatty acids and insulin resistance: short review of a multifaceted connection. *Med Sci Monit*. 2005;11.
26. Weijers RN. Lipid Composition of Cell Membranes and Its Relevance in Type 2 Diabetes Mellitus. *Curr Diabetes Rev*. 2012;8(5):390–400.
27. Barcelo F, Perona JS, Prades J, Funari SS, Gomez-Gracia E, Conde M, i sur. Mediterranean-Style Diet Effect on the Structural Properties of the Erythrocyte Cell Membrane of Hypertensive Patients: The Prevencion con Dieta Mediterranea Study. *Hypertens*. 2009;54(5):1143–50.
28. Yu RK, Tsai Y-T, Ariga T, Yanagisawa M. Structures, Biosynthesis, and Functions of Gangliosides-an Overview. *J Oleo Sci*. 2011;60(10):537–44.
29. Yu R, Yanagisawa M, Ariga T. Glycosphingolipid Structures. *Comprehensive Glycoscience*. 2007;:73–122.
30. Maccioni HJF. Glycosylation of glycolipids in the Golgi complex. *J Neurochem*. 2007;103(s1):81–90.
31. Yamashita T, Hashiramoto A, Haluzik M, Mizukami H, Beck S, Norton A, i sur. Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(6):3445–9.
32. Cohen AW, Razani B, Wang XB, Combs TP, Williams TM, Scherer PE, i sur. Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;285(1).
33. Kabayama K, Sato T, Saito K, Loberto N, Prinetti A, Sonnino S, i sur. Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(34):13678–83.
34. Stumvoll M, Nurjhan N, Perriello G, Dailey G, Gerich JE. Metabolic Effects of Metformin in Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *N Engl J Med*. 1995;333(9):550–4.
35. Wiernsperger NF, Bailey CJ. The Antihyperglycaemic Effect of Metformin. *Drugs*. 1999;58:31–9.
36. Hardie DG, Carling D. The AMP-Activated Protein Kinase. Fuel Gauge of the Mammalian Cell? *Eur J Biochem*. 1997;246(2):259–73.
37. Ikeda T, Iwata K, Murakami H. Inhibitory effect of metformin on intestinal glucose absorption in the perfused rat intestine. *Biochem Pharmacol*. 2000;59(7):887–90.



## 10. Literatura (referencije)

38. Malin SK, Kashyap SR. Effects of metformin on weight loss. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity*. 2014;21(5):323–9.
39. Zheng J, Woo S-L, Hu X, Botchlett R, Chen L, Huo Y, i sur. Metformin and metabolic diseases: a focus on hepatic aspects. *Front Med*. 2015;9(2):173–86.
40. Misso ML, Teede HJ. Metformin in women with PCOS, CONS. *Endocrine*. 2014;48(2):428–33.
41. Leone A, Gennaro ED, Bruzzese F, Avallone A, Budillon A. New Perspective for an Old Antidiabetic Drug: Metformin as Anticancer Agent. *Adv Cancer Res Treat*. 2013;;:355–76.
42. Zhang J, Scarpace PJ. The soluble leptin receptor neutralizes leptin-mediated STAT3 signalling and anorexic responses in vivo. *Br J Clin Pharmacol*. 2009;158(2):475–82.
43. Muoio DM, Dohm GL. Peripheral metabolic actions of leptin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2002;16(4):653–66.
44. Marroquí L, Gonzalez A, Ñeco P, Caballero-Garrido E, Vieira E, Ripoll C, i sur. Role of leptin in the pancreatic  $\beta$ -cell: effects and signaling pathways. *J Mol Endocrinol*. 2012;49(1).
45. Coleman DL. Diabetes-Obesity Syndromes in Mice. *Diabetes*. 1982;31:1–6.
46. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, i sur. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet*. 1996;348(9021):159–61.
47. Fishman S, Muzumdar RH, Atzmon G, Ma X, Yang X, Einstein FH, i sur. Resistance to leptin action is the major determinant of hepatic triglyceride accumulation in vivo. *FASEB J*. 2007;21(1):53–60.
48. Tang X, Li J, Xiang W, Cui Y, Xie B, Wang X, i sur. Metformin increases hepatic leptin receptor and decreases steatosis in mice. *J Endocrinol*. 2016;230(2):227–37.
49. Knudsen LB, Nielsen PF, Huusfeldt PO, Johansen NL, Madsen K, Pedersen FZ, i sur. Potent Derivatives of Glucagon-like Peptide-1 with Pharmacokinetic Properties Suitable for Once Daily Administration. *J Med Chem*. 2000;43(9):1664–9.
50. Nauck M. Incretin therapies: highlighting common features and differences in the modes of action of glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Diabetes Obes Metab*. 2016May;18(3):203–16.
51. Du Q, Wang Y-J, Yang S, Zhao Y-Y, Han P. Liraglutide for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus: A Meta-analysis of Randomized Placebo-Controlled Trials. *Adv Ther*. 2014;31(11):1182–95.

## 10. Literatura (referencije)

52. Robinson LE, Holt TA, Rees K, Randeve HS, Ohare JP. Effects of exenatide and liraglutide on heart rate, blood pressure and body weight: systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 2013;3(1).
53. Svennerholm L. Chromatographic separation of human brain gangliosides. *J Neurochem*. 1963;10(9):613–23.
54. Lopez PH, Aja S, Aoki K, Seldin MM, Lei X, Ronnett GV, i sur. Mice lacking sialyltransferase ST3Gal-II develop late-onset obesity and insulin resistance. *Glycobiology*. 2016;27(2):129–39.
55. Nojiri H, Stroud M, Hakomori S. A specific type of ganglioside as a modulator of insulin- dependent cell growth and insulin receptor tyrosine kinase activity. Possible association of ganglioside-induced inhibition of insulin receptor function and monocytic differentiation induction in HL- 60 cells. *J Biol Chem*. 1991;266:4531–7
56. Sasaki A, Hata K, Suzuki S, Sawada M, Wada T, Yamaguchi K, i sur. Overexpression of Plasma Membrane-associated Sialidase Attenuates Insulin Signaling in Transgenic Mice. *J Biol Chem*. 2003;278(30):27896–902.
57. Trkulja V, Klarica M, Šalković-Perinić M ur. *Temeljna klinička farmakologija*, 11. izdanje, Medicinska naklada, 2011.
58. Inokuchi J. GM3 and diabetes. *Glycoconj J*, 2014;31:193-197
59. Inokuchi J-I. Membrane microdomains and insulin resistance. *FEBS Lett*. 2009;584(9):1864–71.

11. Životopis

11. Životopis

Ime i prezime:

Marija Ganjto

Datum i mjesto rođenja:

4.7.1996., Nova Gradiška

Obrazovanje:

2015. – 2018. Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku

2011. – 2015. Isusovačka klasična gimnazija s pravom javnosti u Osijeku

2007. – 2011. Osnovna škola Tenja u Tenji

2003. – 2007. Osnovna škola Okučani u Okučanima

## 11. Životopis