

# Promjene metabolizma željeza u mozgu i jetri mužjaka Sprague Dawley štakora izloženih masnoj i slatkoj hrani

---

**Mikulec, Katarina**

**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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:879374>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-14**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske  
dijagnostike**

**Katarina Mikulec**

**PROMJENE METABOLIZMA ŽELJEZA  
U MOZGU I JETRI MUŽJAKA  
SPRAGUE DAWLEY ŠTAKORA  
IZLOŽENIH MASNOJ I SLATKOJ  
HRANI**

**Završni rad**

**Osijek, 2018.**



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske  
dijagnostike**

**Katarina Mikulec**

**PROMJENE METABOLIZMA ŽELJEZA  
U MOZGU I JETRI MUŽJAKA  
SPRAGUE DAWLEY ŠTAKORA  
IZLOŽENIH MASNOJ I SLATKOJ  
HRANI**

**Završni rad**

**Osijek, 2018.**

Rad je izrađen u Laboratoriju za neurobiologiju na Medicinskom fakultetu Osijek.

Mentorica rada: prof. dr. sc. Marija Heffer.

Rad ima 39 listova, 0 tablica i 16 slika.

## **ZAHVALE:**

*„Per aspera ad astra“*

*Zahvaljujem najprije svojoj mentorici prof. dr. sc. Mariji Heffer koja mi je omogućila izradu završnog rada pod svojim vodstvom. Veliko hvala na savjetima, strpljenju i vremenu izdvojenom za moje brojne upite.*

*Zahvaljujem i Miloradu Zjaliću na pruženoj pomoći i savjetima, te strpljenju i vremenu pri upoznavanju s radom u laboratoriju. Bez Vaših šala i svakodnevnog smijeha u labosu, cijeli ovaj proces bio bi puno teži.*

*Posebnu zahvalnost iskazujem svojoj obitelji na pruženoj potpori tijekom studija!*

*Također, zahvaljujem i svome dečku Ivanu koji mi je bio ogromna podrška i oslonac prilikom pisanja završnog rada!*

*I, kako šećer uvijek dolazi na kraju, želim zahvaliti Ljilji i Doris na nezaboravnim trima godinama prijateljstva. Hvala vam, žene moje, što ste uvijek uz mene i neka tako ostane dok nas smrt ne rastavi! ☺*

# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD .....   | 1  |
| 1.1. Pretilost.....   | 1  |
| 1.1.1. Dijabetes .....  | 2  |
| 1.2. Životinjski modeli za predijabetes i DM2.....  | 3  |
| 1.3. Poremećaj metabolizma željeza u DM2.....   | 4  |
| 1.4. Povezanost dijabetesa, metabolizma željeza i amiloidoze .....  | 6  |
| 1.5. Antidijabetici.....  | 8  |
| 1.5.1. Metformin .....  | 8  |
| 1.5.2. Liraglutid.....  | 9  |
| 2. HIPOTEZA .....   | 11 |
| 3. CILJEVI .....  | 12 |
| 4. MATERIJALI I METODE .....  | 13 |
| 4.1. Ustroj studije .....   | 13 |
| 4.2. Materijali .....   | 13 |
| 4.3. Metode.....  | 13 |
| 4.3.1. Određivanje transferina i pTau .....   | 14 |
| 4.3.2. Određivanje nNOS.....  | 15 |
| 4.3.3. Određivanje PCNA .....   | 16 |
| 4.3.4. Metoda po Perlsu .....   | 16 |
| 4.3.5. Dokazivanje amiloida Kongo crvenom .....   | 17 |
| 4.4. Statističke metode .....   | 17 |
| 5. REZULTATI.....   | 18 |
| 5.1. Imunohistokemijska kvantifikacija transferinskog receptora u supstanciji nigri (SNR) štakora izloženih HFHSD i antidijabeticima..... | 18 |

|   |    |
|---|----|
| 5.2. Histološka kvantifikacija bojenja Perls-DAB u supstanciji nigri (SNR) štakora izloženih HFHSD i antidijabeticima.....      | 19 |
| 5.3. Imunohistokemijska kvantifikacija pTau u supstanciji nigri (SNR) štakora izloženih HFHSD i antidijabeticima.....           | 21 |
| 5.4. Histološka kvantifikacija bojenja Kongo crvenom u supstanciji nigri (SNR) štakora izloženih HFHSD i antidijabeticima ..... | 21 |
| 5.5. Imunohistokemijska kvantifikacija nNOS u supstanciji nigri (SNR) štakora izloženih HFHSD i antidijabeticima.....           | 23 |
| 5.6. Histološka kvantifikacija bojenja prema Perlsovoj metodi u jetri štakora izloženih HFHSD i antidijabeticima.....           | 24 |
| 5.7. Imunohistokemijska kvantifikacija PCNA antigena u jetri štakora izloženih HFHSD i antidijabeticima .....                   | 26 |
| 6. RASPRAVA.....  | 28 |
| 7. ZAKLJUČAK .....  | 32 |
| 8. SAŽETAK.....   | 33 |
| 9. SUMMARY .....  | 34 |
| 10. LITERATURA.....   | 35 |
| 11. ŽIVOTOPIS .....   | 39 |



## POPIS KRATICA

|           |  |
|-----------|--|
| A $\beta$ | $\beta$ -amiloid   |
| AD        | Alzheimerova bolest (engl. <i>Alzheimer's disease</i> )                                      |
| AMP       | adenozin monofosfat  |
| ATP       | adenozin trifosfat   |
| BSA       | goveđi serum (engl. <i>bovine serum albumin</i> )  |
| cAMP      | ciklički adenzin monofosfat  |
| DAB       | diaminobenzidin  |
| DDP-4     | dipeptidil peptidaza 4 (engl. <i>dipeptidyl peptidase-4</i> )                                |
| DIO       | modeli pretilosti potaknute prehranom (engl. <i>diet-induced obese</i> )                     |
| DM2       | dijabetes melitus tipa 2 (engl. <i>type II diabetes mellitus</i> )                           |
| GIP       | želučani inhibicijski peptid (engl. <i>gastric inhibitory peptide</i> )                      |
| GLP-1     | glukagonu sličan peptid (engl. <i>glucagone like peptide 1</i> )                             |
| HF        | dijeta bogata mastima (engl. <i>high fat</i> )   |
| HFHSD     | dijeta bogata mastima i šećerima (engl. <i>high fat high sucrose diet</i> )                  |
| HFHSD – L | životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima tretirane liraglutidom                        |
| HFHSD – M | životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima tretirane metforminom                         |
| HRP       | peroksidaza iz hrena (engl. <i>horseradish peroxidase</i> )                                  |
| IAPP      | amiloidni polipeptid otočića (engl. <i>islet amyloid polypeptide</i> )                       |
| nNOS      | neuronska sintaza dušikovog oksida (engl. <i>neuronal nitric oxide synthase</i> )            |
| PBS       | fosfatni pufer (engl. <i>phosphate-buffered saline</i> )                                     |
| PCNA      | jezgrin nuklearni proliferirajući antigen (engl. <i>proliferating cell nuclear antigen</i> ) |
| pTau      | fosforilirani Tau protein (engl. <i>phosphorylated Tau protein</i> )                         |
| ROS       | reaktivni kisikovi spojevi (engl. <i>reactive oxygen species</i> )                           |

|     |   |
|-----|---|
| SD  | standardna dijeta (engl. <i>standard diet</i> )                           |
| SNR | supstancija nigra retikularis ( <i>substantia nigra pars reticulata</i> ) |
| TBS | trometaminski pufer (engl. <i>tris-buffered saline</i> )                  |
| TFR | transferinski receptor (engl. <i>transferrin receptor</i> )               |

# 1. UVOD

## 1.1. Pretilost

Prekomjerna tjelesna težina, odnosno pretilost, nastaje pretjeranim unosom hrane bogate mastima i ugljikohidratima u organizam. To je složena i često sprječiva bolest koja utječe na cijeli organizam. Broj je zahvaćenih u porastu, posebice među djecom i adolescentima, pa je pretilost vodeća bolest suvremene civilizacije. Definirana je indeksom tjelesne mase ili BMI (engl. *body mass indeks*) koji se računa iz tjelesne mase i visine ( $\text{kg/m}^2$ ). Ako je omjer tih vrijednosti između 18,5 i 25, osoba ima normalni BMI; vrijednosti niže od 18,5 ukazuju na pothranjenost, one iznad 25 smatraju se prekomjernima, dok je vrijednost veća ili jednaka 30  $\text{kg/m}^2$  medicinski relevantna pretilost (1).

Pretilost je rizični faktor za niz kroničnih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti, hipertenzija, hiperkolesterolemija, opstruktivna apneja, nealkoholna masna ciroza jetre, dijabetes i druge. Ove bolesti značajno smanjuju kvalitetu života i dovode do preuranjene smrti. Stoga, odnos između tjelesne težine i smrtnosti predstavlja područje velikog interesa za zdravstvene djelatnike već desetljećima. Pokazalo se da je povećanje tjelesne težine između osamnaeste i pedesete godine života pozitivno povezano sa smrtnošću (2). Upravo zbog činjenice da pretilih ljudi svakim danom ima sve više, ta se bolest proučava na životinjskim modelima. Oni znanstvenicima omogućuju kontrolu genetskih i okolišnih čimbenika *in vivo* te dobivanje novih saznanja koja se mogu primijeniti u terapiji kod ljudi. Najčešći su modeli mali glodavci (štakori ili miševi) zbog svoje veličine, ekonomske pristupačnosti, lakog održavanja, mogućeg uzgoja u velikom broju te malog zahtjeva za prostorom (3). Kod njih se pretilost izaziva hranom bogatom mastima, a povećanje tjelesne mase izražava se percentilima odstupanja od standardne tjelesne težine (4).

Povećan BMI pokazao se i rizikom za razvoj Alzheimerove bolesti (engl. *Alzheimer's disease*, AD). AD najčešći je klinički dijagnosticiran oblik demencije karakteriziran gubitkom pamćenja, gubitkom ili usporavanjem kognitivnih funkcija te promjenom osobnosti (5). Tipična je makroskopska promjena atrofija mozga, a na staničnoj razini postoje dva karakteristična neuropatološka obilježja; izvanstanični talozi  $\beta$ -amiloida ( $A\beta$ ), koji se još nazivaju senilni plakovi, te unutarstanični neurofibrilarni snopovi. Smatra se da nakupljanje tih dvaju patoloških markera dovodi u konačnici do smrti neurona i uslijed toga do kognitivnih i bihevioralnih promjena. Također, u pretilih bolesnika upalni citokini poput TNF- $\alpha$ , IL-6 i MCP-1 induciraju

inzulinsku rezistenciju zaustavljanjem signalizacije inzulina. Posljedično se povećavaju koncentracije cirkulirajućih faktora rasta sličnih inzulinu (IGF) koji zatim potiču razvoj raka. Isto tako, pretila žene u postmenopauzi imaju veći rizik od razvoja raka dojke jer kod njih poticaj za proliferaciju dolazi iz masnog tkiva koje zamjenjuje jajnike u biosintezi estrogena (6).

Brojna istraživanja pokazala su kako gubitak kilograma značajno smanjuje rizik nastanka navedenih bolesti. Rezultati *Švedske studije za pretilost* navode da gubitak kilograma pomoću barijatrijske operacije smanjuje većinu kardiovaskularnih čimbenika rizika te poboljšava srčanu strukturu i funkciju (7). Gubitak kilograma također povezan sa značajnim smanjenjem rizika razvoja dijabetesa (8). Ključna je rana dijagnoza i rano liječenje bolesti uzrokovanih pretilošću, što će značajno produžiti životni vijek pojedinca.

### **1.1.1. Dijabetes**

Dijabetes je kronična bolest metabolizma u ljudi i životinja obilježena djelomičnim ili potpunim nedostatkom inzulina koja rezultira hiperglikemijom. Ona dovodi do brojnih komplikacija kao što su neuropatije, nefropatije, retinopatije te razne kardiovaskularne bolesti. Brojne su klasifikacije dijabetesa, no najčešće se koristi tip I i tip II dijabetes (9). Tip I obuhvaća oko deset posto svih slučajeva dijabetesa, a razvija se kao posljedica autoimunog uništenja  $\beta$ -stanica gušterače odgovornih za proizvodnju inzulina (3).

Dijabetes tipa II (DM2), koji obuhvaća devedeset posto slučajeva, kronična je bolest u kojoj prvo dolazi do hiperglikemije i hiperinzulinemije, a zatim i do rezistencije inzulinskih receptora na inzulin, posljedičnog poremećaja unutarstanične signalizacije i promjena u metabolizmu ugljikohidrata, masti i proteina (10). Ta je bolest posljedica interakcije između genetskih, okolišnih i rizičnih čimbenika kao što su pušenje, alkohol, fizička neaktivnost, sjedilački način života i drugi. Najvažniji faktor rizika predstavlja pretilost koja može utjecati na razvoj inzulinske rezistencije i progresiju bolesti (10).

Kod pretilosti dolazi do nakupljanja masnog tkiva i neesterificiranih masnih kiselina koje potiču inzulinsku rezistenciju te disfunkciju alfa i beta stanica gušterače i neke druge patofiziološke mehanizme koji dovode do DM2. Kao rezultat ovih promjena, razine glukagona i glukoze iz jetre, koje rastu tijekom gladovanja, nisu potisnute obrokom (11). U biokemijskim nalazima krvi vidi se hiperinzulinemija i hiperglikemija, no stanice gladuju zato što ne mogu

internalizirati glukozu. Posljedice su staničnog gladovanja povećan osjećaj gladi i umora, povećana osmolarnost krvi i posljedično stalan osjećaj žeđi i nagona za pijenjem koje dovodi do učestalog mokrenja. Važni su medijatori otpuštanja inzulina inkretini GLP-1 (engl. *glucagon-like peptide 1*) i GIP (engl. *gastric inhibitory peptide*). U osoba je s DM2 aktivnost GIP-a oštećena, no inzulotropni je učinak GLP-1 očuvan te se on smatra potencijalnim kandidatom za terapijsku primjenu (11).

## 1.2. Životinjski modeli za predijabetes i DM2

Incidencija pretilosti, predijabetesa i DM2 raste širom svijeta te je za razumijevanje patofiziologije i moguće terapije ovih bolesti vrlo važan razvoj životinjskih modela koji dijele karakteristike ljudske pretilosti. Poznato je da postoji genetska predispozicija za pretilost, no većina slučajeva ljudske pretilosti smatraju se poligenim, što je rezultat integrirane aktivnosti gena koji zasebno nose mali rizik (4). Upravo zbog toga životinjski modeli mogu biti podjeljeni u različite kategorije. Kako je pretilost glavni čimbenik predispozicije za DM2, sposobnost životinjskog modela da prvo razvije pretilost, a konačno i dijabetes, je glavni kriterij odabiranja pogodnog modela (3).

Modeli pretilosti potaknute prehranom (DIO, engl. *diet-induced obese*) često se rabe u proučavanju poligenskih uzroka pretilosti. Smatra se da DIO životinje bolje oponašaju pretilost kod ljudi od većine genetski modificiranih modela te su najbolji izbor za testiranje potencijalnih terapeutika (4). Uzgojeni Sprague Dawley štakori izloženi visoko energetske dijeti najčešće se koriste kao poligenski modeli pretilosti. Neki sojevi DIO štakora kroz generacije postaju pretili bez nužnosti izlaganja posebnoj dijeti, a fenotip je izraženiji kod mužjaka nego u ženki. Također je jasno da izloženost životinja dijeti bogatoj mastima (HF) dovodi do razvoja pretilosti. HF dijeta brzo smanjuje središnje djelovanje inzulina i leptina te izravno utječe na odgovarajuće unutarstanične signalne putove u ciljnim neuronima hipotalamusa, ali i drugim dijelovima mozga (4).

Pokazano je kako HF dijete promiču hiperglikemiju i rezistenciju cijelog tijela na inzulin te je općeprihvaćeno mišljenje da takve dijete mogu biti korištene u razvoju valjanog modela za metaboličke sindrome s inzulinskom rezistencijom te oštećenom funkcijom beta-stanica gušterače (12). Provedeno je i usporedno istraživanje između Sprague Dawley i Wistar štakorskih modela na HF dijeti. Rezultati su pokazali da HF dijeta povećava unos energije,

tjelesnu težinu, masu masnog tkiva u tijelu, veličinu adipocita, adiponektin i koncentraciju leptina u plazmi, a smanjuje oralnu toleranciju glukoze i u Wistar i u Sprague Dawley štakora (13). Stoga se oba modela mogu koristiti za istraživanje pretilosti i DM2.

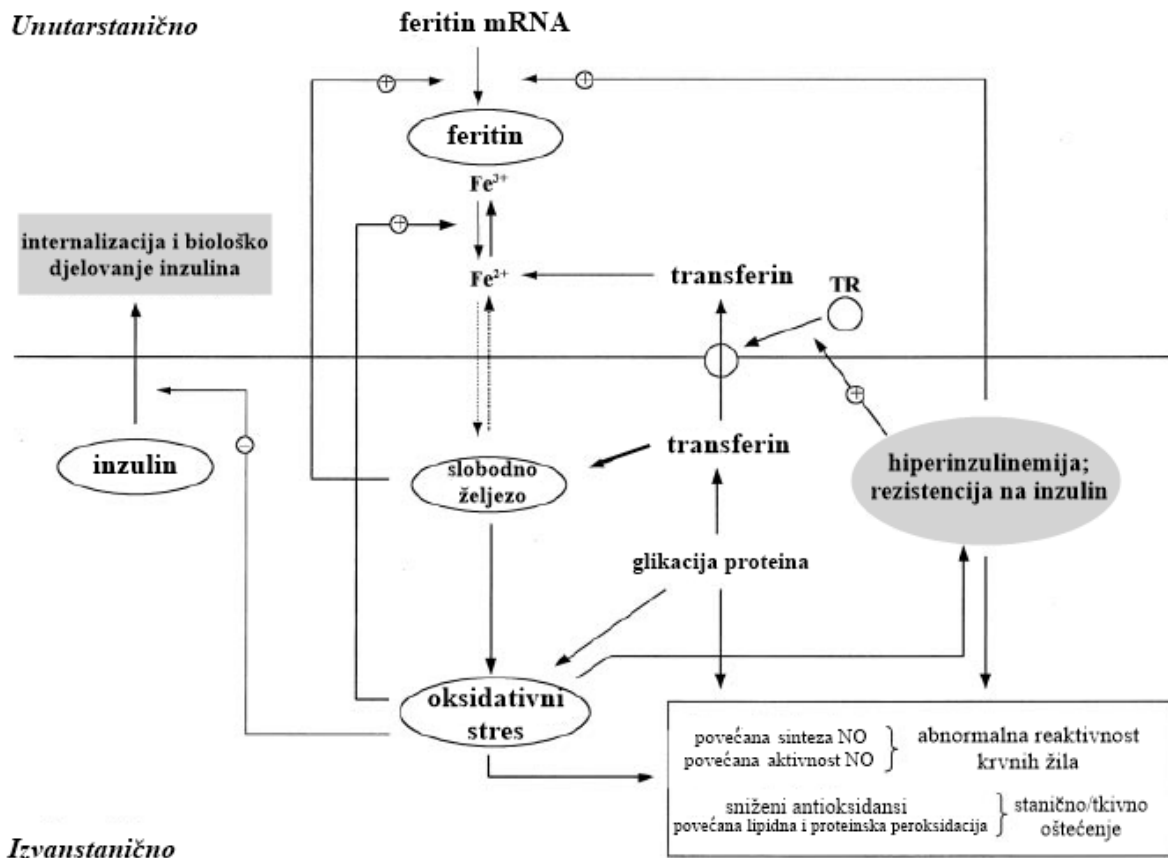
Danas su medicinska istraživanja gotovo nemoguća bez uporabe različitih pokusnih životinja, pri čemu životinje mogu biti izložene boli, patnji i strahu. Postoje brojni zakoni i propisi kojima se nastoje regulirati eksperimentalni postupci na životinjskim modelima. S ciljem smanjenja broja životinja korištenih u pokusima, Russell i Burch predstavili su tri R model prema kojemu su važni zamjena laboratorijskih životinja neživotinjskim (alternativnim) modelima (engl. *replacement*), smanjenje broja životinja u istraživanjima (engl. *reduction*) te pružanje najbolje moguće njege onima kojima će se ipak koristiti u eksperimentalnim postupcima (engl. *refinement*). Četvrto R naknadno je dodao Ronald Blank, a ono govori o odgovornosti (engl. *responsibility*) (3).

### **1.3. Poremećaj metabolizma željeza u DM2**

Kao odgovor na stanično gladovanje, dolazi do brojnih metaboličkih promjena kojima se nastoji održati stalna proizvodnja ATP-a u stanicama (14). Među ostalim, dolazi i do poremećaja u odlaganju željeza (15). Ioni željeza sudjeluju u oksido-reduktivnim reakcijama iz kojih se dobiva energija za stanični rad jer imaju rijetku sposobnost osciliranja između dvovalentnog i trovalentnog stanja. Ta sposobnost omogućuje željezu prienos elektrona te ga čini važnim za mnoge biološke funkcije kao što su transport kisika hemoglobinom, stanična ATP sinteza pomoću citokroma C i akonitaze, te sinteza DNA pomoću ribonukleotid-reduktaze (15). Međutim, željezo također može oštetiti tkiva kataliziranjem konverzije vodikovog peroksida na ione sa slobodnim radikalom koji napadaju stanične membrane, proteine i DNA (16).

U normalnim uvjetima željezo cirkulira vezano za transferin do stanica gdje se onda iskorištava. Kod DM2 povećana koncentracija inzulina potiče pojačanu sintezu feritina, proteina koji omogućava pohranu željeza u stanice. Inzulin ujedno inducira translokaciju transferinskih receptora na stanične membrane, gdje posreduje pri unosu izvanstaničnog željeza u makrofage i hepatocite (17). Željezo povećava oksidativni stres u stanicama uzrokujući inhibiciju internalizacije i djelovanja inzulina, što dovodi do hiperinzulinemije i rezistencije na inzulin. Slobodno željezo potiče sintezu feritina, dok oksidativni stres povećava otpuštanje

željeza s feritina, što čini petlju koja potiče oštećenje stanice. Inzulinska rezistencija i oksidativni stres uzrokuju oštećenje endotela i drugih ciljnih tkiva. Glikacija proteina, koja je prisutna u dijabetesu, nadalje pojačava ove abnormalnosti stimulirajući otpuštanje željeza s transferina, povećanjem oksidativnog stresa i izravno uzrokujući oštećenje endotela (17).



Slika 1. Željezo u inzulinskoj rezistenciji i oksidativnom stresu. (Prema slici iz članka autora Fernandez-Real JM i sur. (17)).

U pretilosti se također pojačano luči hepcidin, jetreni hormon koji regulira homeostazu željeza, a koji je primarno pod kontrolom upalnih medijatora kao što su IL-6, CRP i drugi. On se veže za ferroportin, transmembranski protein koji prenosi željezo iz unutrašnjosti stanice u međustanični prostor i dovodi do njegove razgradnje, smanjenja apsorpcije željeza iz crijeva i izlaska iz retikuloendotelnog sustava. Kako je pretilost kronično upalno stanje, posljedično dolazi do porasta koncentracije hepcidina, što dovodi do smanjene količine željeza u krvi. Nadalje, dolazi do premještanja željeza iz cirkulacije i njegove pohrane u enterocitima, hepatocitima, makrofagima i nekim moždanim strukturama, kao što su dopaminergičke jezgre, što dodatno čini željezo nedostupnim (15, 18).

Normalno se željezo u mozgu nalazi kao hem željezo (u hemoglobinu eritrocita i u enzimima) te kao ne-hem željezo. Dio ne-hem željeza prisutan je u mozgu vezan na protein, koji je sličan feritinu te se smatra skladištem za potrebe mozga (19). Ostatak je lokaliziran u bazalnim ganglijima, osobito u strukturi *globus pallidus* i SNR-u (*substantia nigra pars reticulata*). Nakupljanje željeza u ovim regijama može dovesti do oštećenja zbog proizvodnje slobodnih radikala te posljedične smrti neurona (20). Usporedno s nakupljanjem željeza dolazi i do nakupljanja amiloida koji potiče neurodegeneraciju. Uz to, inzulin slobodno prolazi krvno-moždanu barijeru te su njegove posljedice u središnjem živčanom sustavu slične onima u periferiji – razvoj inzulinske rezistencije i dijabetesa tipa III, odnosno Alzheimerove bolesti (AD) (21). Ako se ne liječi, inzulinska rezistencija dovodi do iscrpljivanja kompenzatornih mehanizama, kolapsa i smrti stanica.

#### **1.4. Povezanost dijabetesa, metabolizma željeza i amiloidoze**

Željezo je uključeno u mnogobrojne procese unutar mozga, uključujući sintezu mijelina, funkciju neurotransmitera te proizvodnju energije koja je moguća zbog njegove sposobnosti da mijenja valentna stanja (22). Upravo ova sposobnost promjene valentnih stanja može dovesti i do toksičnosti željeza. U normalnim uvjetima željezo se pohranjuje kao ferihidrit, redoks-neaktivan željezov oksihidroksid unutar skladišnog proteina feritina. No kada je funkcija feritina ugrožena ili je postignuta previsoka koncentracija željeza, povećavaju se razine redoks-aktivnog labilnog oblika željeza. Takvo željezo sudjeluje u Fenton reakciji gdje nastaju reaktivni kisikovi spojevi (ROS) koji pak uzrokuju oksidativni stres i oštećenje neurona. Oksidativni je stres ključni čimbenik u AD, neurodegenerativnom poremećaju koji karakterizira masovna smrt neurona rezultirajući gubitkom pamćenja, psihozama i demencijom (22). U mozgu AD pacijenata povećan je oksidativni stres, na što nam ukazuju povećane aktivnosti antioksidansa kao što su glutation reduktaza, glutation peroksidaza, superoksid dismutaza i katalaza (23).

Ključno je za patologiju AD nakupljanje neurotoksičnog peptida  $\beta$ -amiloida ( $A\beta$ ).  $A\beta$  je peptid građen od 39 do 43 aminokiselina te se čini kako je on glavni sastojak senilnih plakova u mozgu AD pacijenata (24). Njegovo nakupljanje unutar neurona dovodi do izvanstaničnog taloženja, te stvaranja unutarstaničnih neurofibrilarnih snopova (5). Ove manifestacije dovode do poremećaja proizvodnje energije, aktivacije imunološkog sustava te disfunkcije neurona koje rezultiraju smrću (22). U senilnim plakovima osoba s AD zabilježena je prisutnost željeza,



bakra i cinka, a u neposrednoj blizini plakova nađeni su feritin i transferin, što govori u prilog pretpostavci da nakupljanje i / ili poremećaj željeza doprinosi razvoju AD. Također, manjak regulacije željeza može dovesti do disfunkcije mitohondrija, što predstavlja ranu promjenu u AD. Zanimljiva je i ekspresija proteina hemokromatoze, koji je znak opterećenja željezom, u reaktivnim astrocitima i neuronima (25). DM2 je, kao i AD, bolest u kojoj dolazi do formiranja amiloida. Depoziti amiloidogenog peptida nalaze se u Langerhansovim otočićima gušterače pacijenata oboljelih od DM2. Amiloidni depozit iz otočića nastaje precipitacijom peptida koji je građen od 37 aminokiselina te je nazvan amiloidni polipeptid otočića (engl. *islet amyloid polypeptide*, IAPP) (26). Fiziološki IAPP nastaje u  $\beta$ -stanicama gušterače i luči se zajedno s inzulinom. Djeluje kao signal za sitosti i odlaganje masti, kombinirajući funkcionalne aspekte inzulina i glukagona u regulaciji unosa hrane i tjelesne težine.

DM2 ima i jasnu kognitivnu komponentu koja uključuje oslabljenu pozornost i pamćenje, te u krajnjem slučaju neurodegeneraciju, što je posebice vidljivo u starijih pacijenata. Svaki aspekt inzulinske rezistencije u DM2 (npr. hiperinzulinemija, hiperglikemija, netolerancija glukoze, hipertenzija) predstavlja neovisan faktor rizika za AD. Iako inzulinski receptori u mozgu imaju različitu strukturu i funkciju od onih koji se nalaze periferno, povećane su koncentracije inzulina povezane sa smanjenjem funkcije središnjeg živčanog sustava te je zabilježeno povećanje aktivnosti vezanja inzulina u mozgu osobe s AD (26). No unatoč povećanom inzulinskom vezanju, aktivnost je inzulinskog receptora smanjena u AD mozgu, u skladu s inzulinskom rezistencijom. Prisutna je i hiperinzulinemija u plazmi, što upućuje na to da se promjene karakteristične za DM2 (hiperinzulinemija i inzulinska rezistencija) često nalaze u osoba s AD (26). Čini se da inzulinska rezistencija ujedno ubrzava biološko starenje formirajući krajnje produkte glikacije te posljedično ROS, koji uzrokuju oksidativni stres (23).

Uz nakupljanje željeza u amiloidnim plakovima, zapaženo je i njegovo nakupljanje u neurofibrilarnim snopovima, gdje se feri željezo ( $Fe^{3+}$ ) veže na Tau protein i dolazi do agregacije hiperfosforiliranog Tau te stvaranja snopova (23). Neurofibrilarni su snopovi prvenstveno građeni od hiperfosforiliranog Tau proteina i dodatni su marker rane neurodegeneracije u mozgu. Tau fosforilacija potaknuta je i pomoću nekoliko protein kinaza koje su aktivirane kaskadom signalizacije inzulinskog receptora u mozgu, čime se potiče stvaranje snopova (27). Još je jedan marker neurodegeneracije neuronska sintaza dušikovog oksida (nNOS). Dušikov je oksid važna signalna molekula u ljudskom tijelu koja ima ključnu ulogu u komunikaciji između stanica i neurona, regulaciji krvnog tlaka te aktivaciji imunosti. No, hiperprodukcija dušikovog oksida od nNOS-a osnovni je uzrok neurodegenerativnih

poremećaja i neuropatske boli (28). Višak dušikovog oksida može narušiti proizvodnju stanične energije putem interakcije sa željezo-sumporovim centrima na elektronskom lancu u mitohondrijima. Uz to dolazi i do stvaranja reaktivnih dušikovitih spojeva te ROS-a koji dodatno oštećuju neurone.

## **1.5. Antidijabetici**

Antidijabetici, odnosno hipoglikemici, sredstva su kontroliranja razine glukoze u krvi. Oralni su antidijabetici djelotvorni samo u slučaju *dijabetesa melitusa*, odnosno kada pacijent još uvijek ima očuvanu funkciju Langerhansovih otočića. Prilikom dijagnoze bolesti većina bolesnika ima prekomjernu tjelesnu težinu te nemaju mogućnost postizanja ili održavanja normoglikemije bez uporabe oralnih hipoglikemika. Danas postoji široka paleta antidijabetika za kliničku uporabu te se dijele na derivate sulfonilureje, bigvanidine, inhibitore alfa-glukozidaze, tiazolidinedione, agoniste receptora glukagonu sličnog peptida, inhibitore dipeptidil peptidaze 4 i druge (10, 29). U kasnijim fazama bolesti, kada više nema očuvane funkcije Langerhansovih otočića, daje se rekombinantni inzulin (29). Ispravljanje metabolizma glukoze antidijabeticima pozitivno djeluje na disbalans željeza smanjujući njegovu količinu u stanicama jer stanice opet mogu koristiti glukozu kao primarni izvor energije te dolazi do gašenja kompenzatornih mehanizama očuvanja proizvodnje ATP-a.

### **1.5.1. Metformin**

Metformin pripada skupini bigvanidina, jednom od glavnih razreda antidijabetika. Pokazao se uspješnim u snižavanju razine glukoze u krvi, povećavanju osjetljivosti na inzulin te smanjenju rizika od hipoglikemije i kardiovaskularnih bolesti (10). Koristi se u kontroli DM2, kao i u osoba sa predijabetesom (30).

Poznato je da terapija predijabetesa sprječava ili odgađa razvoj dijabetesa. Rizične su skupine zahvaćene predijabetesom pretile osobe ili žene koje su oboljele od gestacijskog dijabetesa. U predijabetesu metformin sprječava progresiju do inzulinske rezistencije i / ili disfunkcije beta-stanica povezane s disglukemijom (30). Primarno pojačava djelovanje inzulina u jetri smanjivanjem sinteze glukoze metaboličkim putem glukoneogeneze. Također poboljšava djelovanje inzulina u skeletnim mišićima, što pridonosi njegovom terapijskom djelovanju.

Potiče anaerobni metabolizam u crijevima, povećava cirkulirajuće razine GLP-1 povećanjem samog lučenja peptida ili smanjenjem aktivnosti dipeptidil peptidaze 4 (engl. *dipeptidyl peptidase-4*, DDP-4) koja inaktivira GLP-1. Kako GLP-1 povećava otpuštanje inzulina ovisno o glukozu iz gušterače, ovaj mehanizam može pomoći u očuvanju beta-stanica (30). Nadalje, pokazalo se da snižava koncentracije kolesterola, triglicerida i HDL-a u pretilih osoba koje još nisu razvile dijabetes. Kombinacija pravilne prehrane, tjelovježbe i terapije metforminom mogla bi smanjiti rizik razvoja dijabetesa tipa 2 (31).

Kod osoba koje su već razvile DM2, metformin snižava razinu glukoze i povećava osjetljivost na inzulin te inhibira kompleks 1 na respiratornom lancu u mitohondrijima, što dovodi do promjene u ravnoteži stanične energije. Ta promjena povećava aktivnost AMP protein kinaze koja inhibira glukoneogenezu u jetri djelujući na konverziju laktata i glicerola u glukozu, čime se posredno smanjuje količina glukoze u krvi. Koncentracija je metformina najveća u portalnoj cirkulaciji te se smatra da je jetra epicentar njegova djelovanja. Nadalje, smanjuje apsorpciju glukoze iz probavnog trakta i povećava unos glukoze posredovane inzulinom u skeletne mišiće (32, 33). U mišićima dolazi do povećanja tirozin kinazne aktivnosti inzulinskog receptora te pojačane aktivnosti i translokacije GLUT-4 prijenosnika glukoze. Metformin djeluje tako da smanjuje koncentraciju inzulina u cirkulaciji te je za njega karakteristično da, ukoliko dođe do predoziranja, neće nastupiti hipoglikemija. Kod pojedinaca s dijabetesom povećane su i koncentracije glukagona koji potiče glukoneogenezu, glikogenolizu i ketogenezu, a inhibira glikogenezu i glikolizu. Posljedica je svih navedenih metaboličkih procesa porast glukoze u krvi. Terapija metforminom djeluje na signalne putove glukagona, inhibirajući ih te smanjujući koncentraciju glukoze (29, 32).

### **1.5.2. Liraglutid**

Antidijabetik liraglutid analog je glukagonu sličnog peptida i djeluje kao agonist na receptor glukagonu sličnog peptida – GLP-1. GLP-1 luče L-stanice distalne crijevne sluznice primarno kao odgovor na prisutnost hranjivih tvari u crijevnom lumenu. Poluživot mu je manji od dvije minute zbog brze razgradnje enzimom DPD-4. On snižava razinu glukoze u krvi povećanjem količine inzulina oslobođenog iz beta-stanica gušterače nakon obroka. Također, potiskuje sekreciju glukagona i usporava pražnjenje želuca. Zbog svojih učinka na homeostazu glukoze, pokazao se primamljivim za razvoj antidijabetika (34).

Liraglutid je 97% homologan s endogenim ljudskim GLP-1 te ima dulji poluživot (deset do dvanaest sati) za razliku od nekih drugih hipoglikemika ove skupine, kao što je eksenatid (35). Dulji je poluživot posljedica modifikacije peptida s aminokiselinskom zamjenom te dodatka lanca masnih kiselina koji omogućuje vezanje na cirkulirajuće proteine plazme, čime se usporava apsorpcija i izbjegava razgradnja enzimom DPP-4 (34). Pokazao se boljim od eksenatida u smanjenju HbA1c, krvnog tlaka, glukoze u krvi natašte, triglicerida te slobodnih masnih kiselina, uz manje nepoželjnih nuspojava (36). Prvenstveno je odobren za kontrolu šećerne bolesti, no otkrivena je značajna uloga liraglutida u smanjenju tjelesne težine te se stoga počeo koristiti kod pretilih osoba kao preventivna mjera razvoja dijabetesa (34). Pokazalo se da mehanizam odgovoran za gubitak kilograma induciran liraglutidom jest dugoročno smanjenje apetita i unosa hrane, za razliku od učinaka na potrošnju energije (37).

Kada je razina glukoze u krvi povećana, liraglutid povećava količinu cAMP molekula u stanicama, što je signal za otpuštanje inzulina iz beta-stanica gušterače, te istodobno smanjuje pojačano izlučivanje glukagona. Kako se razina glukoze smanjuje, liraglutid reducira izlučivanje inzulina i više ne inhibira otpuštanje glukagona (38). Kao i metformin, povezan je s niskim rizikom od hipoglikemije.

## **2. HIPOTEZA**

Pretilost povećava zalihe željeza u jetri i dopaminergičkim jezgrama mozga, dok terapije metforminom i liraglutidom smanjuju količinu željeza. Usporedno s nakupljanjem željeza dolazi i do nakupljanja amiloida koji potiče neurodegeneraciju, a davanje antidijabetika djeluje neuroprotektivno i smanjuje količinu amiloida.

### 3. CILJEVI

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. Uporabom histološkog bojenja jetre prema Perlsovoj metodi i imunohistokemijskim bojenjem na PCNA usporediti sadržaj željeza i regenerativnu sposobnost jetre životinja izloženih standardnoj dijeti i dijeti obogaćenoj mastima i šećerima, a zatim procijeniti utjecaj antidijabetika metformina i liraglutida na naredne dvije skupine životinja hranjene mastima i šećerima.
2. Uporabom modifikacije histološkog bojenja Perls-DAB na rezovima mozga i imunohistokemijskim bojenjem na transferinske receptore procijeniti sadržaj željeza u dopaminergičkim jezgrama mozga kod četiriju skupine životinja.
3. Uporabom histološke boje Kongo crvene i imunohistokemijom na pTau procijeniti količinu amiloida i brojnost neurofibrilarnih snopova kao markera degeneracije na rezovima mozga u četiri skupine životinja.
4. Međusobno usporediti učinak metformina i liraglutida na sadržaj željeza u jetrenom i moždanom tkivu predijabetičkih životinja.
5. Usporediti količinu amiloida i neurofibrilarnih snopova u mozgu životinja na standardnoj dijeti i dijeti obogaćenoj mastima i šećerima, a zatim međusobno usporediti životinje hranjene obogaćenom dijetom koje nisu tretirane antidijabeticima sa skupinama koje su tretirane antidijabeticima. Isto učiniti s imunoreaktivnošću na nNOS kao dodatnim markerom neurodegeneracije.

## **4. MATERIJALI I METODE**

### **4.1. Ustroj studije**

Studija je ustrojena kao istraživanje parova (životinje na standardnoj dijeti prema životinjama na dijeti bogatoj mastima i šećerima; životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima prema životinjama koje su pored masne i slatke hrane tretirane metforminom i liraglutidom).

### **4.2. Materijali**

Studija je načinjena na arhivi tkiva prikupljenih u sklopu projekta 'Uloga oksidativnog stresa u razvoju poremećenog vaskularnog odgovora kod pretilih, predijabetičkih štakora starije dobi tretiranih s metforminom i liraglutidom' koji je odobrilo Etičko povjerenstvo 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 ovaj dio studije, koji se nalazi u završnom radu, dobiveno je odobrenje istog tijela pod brojem 2158-61-07-18-107. U studiju su uključena 32 mužjaka Sprague Dawley štakora podijeljena u četirima skupinama: 1. životinje na standardnoj dijeti, 2. životinje na dijeti obogaćenoj mastima i šećerima, 3. životinje na obogaćenoj dijeti tretirane metforminom, 4. životinje na obogaćenoj hrani tretirane liraglutidom. Životinje su bile na navedenoj dijeti od 44. tjedna starosti. Nakon šest tjedana hranjena, trećoj i četvrtoj skupini životinja uvedena je andijabetička terapija. Sve su životinje žrtvovane u dobi od 64. tjedna, kada su prikupljena tkiva. Tkiva su fiksirana 4% paraformaldehidom (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, SAD) u trajanju od četrdeset osam sati na +4°C, krioprotektirana u nizu saharoza 10%, 20%, 30% na +4°C u trajanju potrebnom da tkiva potonu u pojedinoj otopini saharoze na dno posude. Tkiva su potom smrznuta u pothlađenom 2-metilbutanu (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, SAD) i pohranjena u hladnjaku na -80 C do daljnje obrade.

### **4.3. Metode**

32 uzorka fiksirane i krioprotektirane jetre izrezana su na kriostatu (Leica CM3050 S, Wetzlar, Njemačka) na debljinu 20µm te su preparati do daljnje obrade pohranjeni u de Olmoshu (otopini za krioprotekciju) na -20°C (39). Dio rezova ispran je 1xPBS-om (engl.

*phosphate buffered saline*, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, SAD) te navučen na predmetna stakla presvučena želatinom. Preparati su osušeni preko noći na sobnoj temperaturi, nakon čega su obojeni histološkom bojom Prusko modriilo (metoda po Perlsu) kojom se dokazuje prisutnost željeza (40), a reakcija je pojačana inkubiranjem u otopini diaminobenzidina (DAB, Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD) priređenoj prema uputama proizvođača. 32 uzorka tkiva mozga narezana su u koronarnom smjeru na 35 $\mu$ m te pohranjena u de Olmoshu na -20°C. Rezovi su isprani u 1xPBS-u, navučeni na stakla i osušeni preko noći na sobnoj temperaturi, a zatim obojani modificiranom metodom Perls-DAB za dokazivanje malih količina željeza (40). Susjedni rezovi obojeni su histološkim bojenjem Kongo crvenom kojom se prikazuju plakovi amiloida (41). Pri određivanju transferina i pTau (markera degeneracije) korištena su biotinizirana kozja protu-mišja protutijela (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD), a za nNOS kozja protu-zečja protutijela (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD). Za određivanje PCNA antigena (markera proliferacije) na uzorcima jetre korištena su kozja protu-mišja protutijela (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD). Histološki preparati fotografirani su mikroskopom (Zeiss Axioskop 2 MOT, Jena, Germany) s kamerom Olympus DP-70 i kvantificirani u programu ImageJ v.1.80 s njegovim FIJI dodatkom (engl. *plugin*).

#### **4.3.1. Određivanje transferina i pTau**

U prvom koraku izvršeno je ispiranje rezova od de Olmosha - tri puta u 1xPBS-u. Potom su rezovi stavljeni u predtretman vodikovim peroksidom volumnog udjela 1% (Kemika, Zagreb) s dvjema izmjenama po dvadeset minuta s ciljem blokiranja endogenih peroksidaza. Zatim su prebačeni u blokirajuću otopinu te inkubirani na +4°C tijekom četiri sata uz stalno miješanje. Blokirajuća otopina bila je 1% BSA (engl. *bovine serum albumin*, Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, SAD) bez detergenta, uz dodatak 5% kozjeg seruma (Gibco, Invitrogen, Auckland, NZ). Nakon blokiranja nespecifičnih vezanja protutijela, dio rezova prebačen je u otopinu primarnog protutijela na transferin (Gibco, Invitrogen, Auckland, NZ), dio u otopinu primarnog protutijela na pTau (Millipore, Temecula, CA, SAD) razrjeđenja 1:500. Protutijela su pripravljena razrjeđivanjem u blokirajućoj otopini. Uslijedila je inkubacija preko noći na tresilici, na +4°C. Nakon inkubacije, rezovi su isprani tri puta po deset minuta u 1xPBS-u. Po završetku ispiranja, rezovi su premješteni u otopinu sekundarnog kozjeg protu-mišjeg protutijela (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD) razrijeđenog u otopini za blokiranje, razrjeđenja 1:500 te inkubirani na +4°C na tresilici kroz četiri sata.



Rezovi su potom isprani tri puta po deset minuta u 1xPBS-u te stavljeni u otopinu terciarnog kompleksa (1:250 avidin + 1:250 biotin HRP, Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD). Nakon terciarnog kompleksa, koji se inkubirao dva sata na +4°C uz neprekidno miješanje, rezovi su isprani tri puta po deset minuta u 1xPBS-u te jednom u 1xTBS-u (engl. *tris-buffered saline*, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, SAD), također deset minuta. Uslijedila je vizualizacija imunoreaktivnosti u DAB-u čije je razvijanje za transferin trajalo tri minute, a za pTau tri minute i četrdeset sekundi. Vremena razvijanja jednaka su u svim grupama. Preparati su potom navučeni na predmetna stakalca te ostavljeni da se osuše. Preparati su pokriveni Vectamount pokrivalom za imunohistokemijske preparate (Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD) i pokrovnim stakalcem.

#### **4.3.2. Određivanje nNOS**

Rezovi su izvađeni iz de Olmosha, te isprani tri puta u 1xPBS-u. Stavljeni su u predtretman 1%-tnim vodikovim peroksidom dva puta po dvadeset minuta radi blokiranja endogenih peroksidaza. Prebačeni su u blokirajuću otopinu (1% BSA, 1% Triton X-100, 5% kozjeg seruma) te inkubirani tijekom četiri sata na +4°C uz konstantno miješanje. Potom su rezovi prebačeni u otopinu primarnog protutijela na nNOS (Chemicon, Temecula, CA, SAD) razrijeđenog u otopini za blokiranje 1:1000, te inkubirani preko noći na +4°C na tresilici. Rezovi su isprani tri puta u 1xPBS-u po deset minuta te premješteni u otopinu sekundarnog kozjeg protu-zečjeg protutijela (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD) pripravljenog razrjeđivanjem u bloking otopini, u razrjeđenju 1:1000 te inkubirani tijekom četiri sata na +4°C na tresilici. Uslijedilo je ispiranje tri puta po deset minuta u 1xPBS-u. Rezovi su potom stavljeni u otopinu terciarnog kompleksa (1:250 avidin + 1:250 biotin HRP, Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD) na +4°C uz neprekidno miješanje, tijekom dva sata. Isprani su tri puta po deset minuta u 1xPBS-u te jednom kroz deset minuta u 1xTBS-u. Uslijedilo je razvijanje u DAB-u trajanja dvije minute i trideset sekundi, koje je jednako za sve grupe. Preparati su zatim navučeni na predmetna stakalca i ostavljeni da se osuše. Pokriveni su Vectamount pokrivalom za imunohistokemijske preparate (Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD) i pokrovnim stakalcem.

### 4.3.3. Određivanje PCNA

Nakon ispiranja od de Olmsh otopine, rezovi su prošli kroz postupak oporavka antigena u citratnom puferu ( $0,128\text{mol/dm}^3$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, SAD),  $0,0357\text{mol/dm}^3$  monohidrat limunske kiseline (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, SAD), do  $100\text{ml}$   $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{pH} = 6.0$ ) pri temperaturi od  $95^\circ\text{C}$  tijekom jednog sata te potom stavljeni na hlađenje. Zatim su prebačeni u predtretman 1%-tnim vodikovim peroksidom s dvjema izmjenama po dvadeset minuta. Nakon toga, rezovi su prebačeni u blokirajuću otopinu bez detergenta te inkubirani na  $+4^\circ\text{C}$  tijekom četiri sata na tresilici kako bi blokirali nespecifično vezanje protutijela. Potom su premješteni u otopinu primarnog protutijela na PCNA antigen (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, Texas, SAD) pripremljenog razrjeđivanjem u blokirajućoj otopini, u razrjeđenju 1:500. Rezovi su inkubirani preko noći na  $+4^\circ\text{C}$ , na tresilici. Nakon inkubacije u primarnom protutijelu isprani su tri puta po deset minuta u 1xPBS-u te premješteni u otopinu sekundarnog kozjeg protu-mišjeg protutijela (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD), također razrjeđenog u blokirajućoj otopini, u razrjeđenju 1:1000. Inkubirani su na  $+4^\circ\text{C}$  kroz četiri sata, na tresilici. Potom su rezovi isprani tri puta po deset minuta u 1xPBS-u. Prebačeni su u otopinu tercijarnog kompleksa (1:250 avidin + 1:250 biotin HRP, Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD) na  $+4^\circ\text{C}$  uz neprekidno miješanje, tijekom dva sata. Po završetku su inkubacije rezovi isprani tri puta u 1xPBS-u po deset minuta, te jednom u 1xTBS-u tijekom deset minuta. Zatim je uslijedila vizualizacija imunoreaktivnosti u DAB-u čije je razvijanje trajalo jednu minutu i trideset sekundi. Vremena razvijanja jednaka su za sve grupe. Preparati su potom navučeni na predmetna stakalca te ostavljeni da se osuše. Potom su pokriveni Vectamount pokrivalom za imunohistokemijske preparate (Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD) i pokrovnim stakalcem.

### 4.3.4. Metoda po Perlsu

Korišteni su rezovi jetre i mozga koji su prethodno navučeni na predmetna stakalca te ostavljeni na sobnoj temperaturi da se osuše preko noći. Inkubirani su na tresilici u trajanju od šezdeset minuta u otopinu za dokazivanje prisutnosti željeza (metoda po Perlsu, sastav: 1 dio 4% kalijev ferocijanid, 2 dijela  $\text{H}_2\text{O}$ , 1 dio 0,2N HCl). Po isteku vremena, isprani su u destiliranoj vodi kroz šezdeset sekundi. Rezovi su zatim uronjeni u 1%-tnu otopinu vodikova peroksida u metanolu te ostavljeni sedamdeset pet minuta na  $+4^\circ\text{C}$ , na tresilici. Uslijedilo je ispiranje u destiliranoj vodi kroz šezdeset sekundi te razvijanje u DAB-u. Vrijeme razvijanja za

rezove jetre iznosilo je tri minute, a za rezove mozgova deset minuta. Vremena razvijanja jednaka su za sve grupe. Preparati su pokriveni Vectashield medijem za pokrivanje stakalaca (Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD) i pokrovnica.

#### **4.3.5. Dokazivanje amiloida Kongo crvenom**

Rezovi izvađeni iz de Olmosha isprani su tri puta u 1xPBS-u te zatim prebačeni u destiliranu vodu na trideset sekundi. Potom su inkubirani u otopini Kongo crvene boje (Congo red  $0,0217\text{mol/dm}^3$ , 50%-tni etanol 100ml) u trajanju od sedam minuta. Uslijedilo je ispiranje dva puta u vodi iz slavine, te prebacivanje u otopinu diferencijatora ( $\text{NaOH } 0,05\text{mol/dm}^3$ , 80%-tni etanol 100ml). Rezovi su inkubirani u diferencijatoru sve dok se nisu obezbojili. Po završetku su isprani tri puta u destiliranoj vodi te navučeni na predmetna stakalca. Preparati su ostavljeni da se osuše na zraku. Pokriveni su Vectashield medijem za pokrivanje (Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD) i pokrovnica.

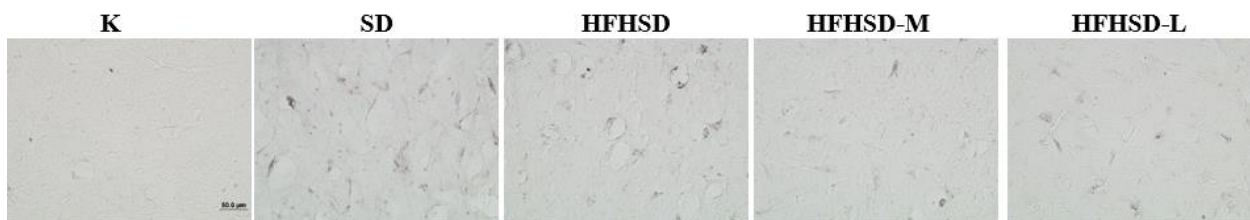
#### **4.4. Statističke metode**

Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Saphiro-Wilkovim testom. Numerički podaci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju normalne raspodjele, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane su Studentovim t testom, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyevim U-testom. Sve su P-vrijednosti dvostrane. Za ocjenu značajnosti dobivenih rezultata odabrana je razina značajnosti  $\alpha = 0,05$ . Statistička obrada napravljena je u programu Statistica 12 (Quest Software Inc., Aliso Viejo, CA, SAD).

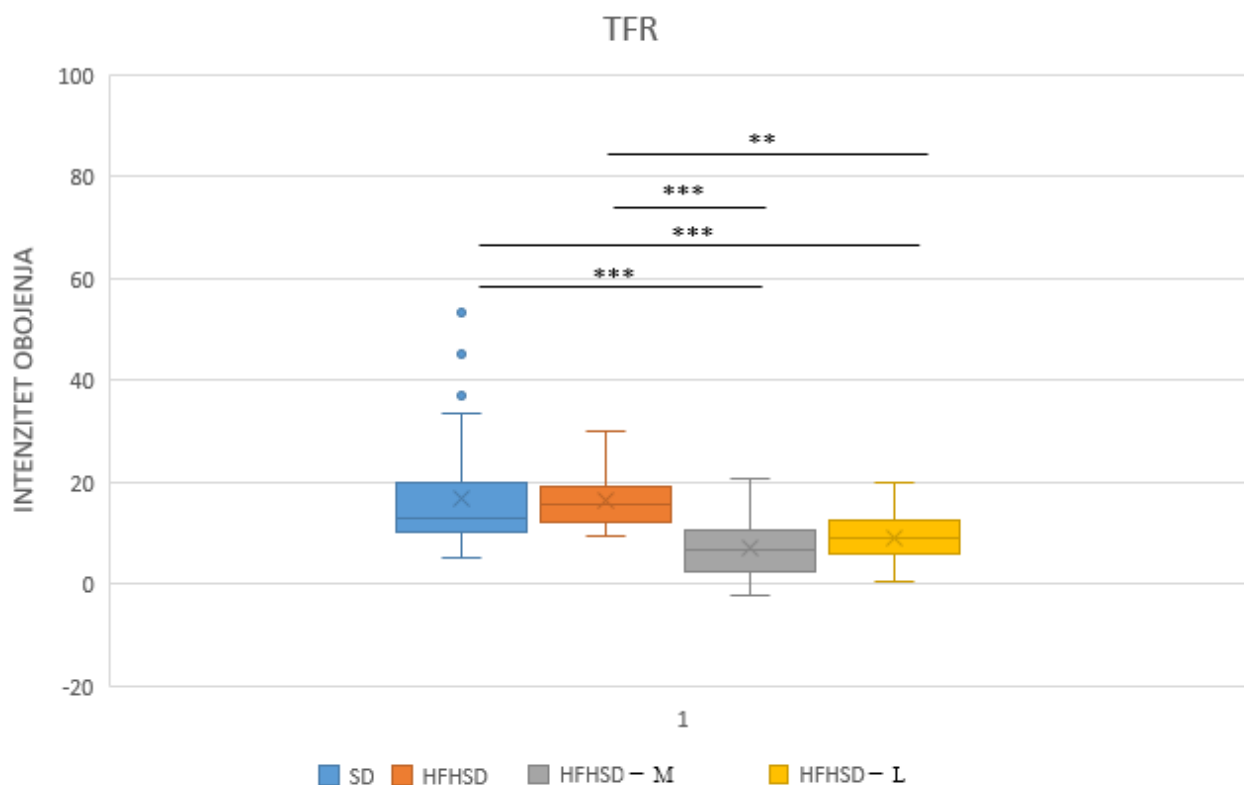
## 5. REZULTATI

### 5.1. Imunohistokemijska kvantifikacija transferinskog receptora u supstanciji nigri (SNR) štakora izloženih HFHSD i antidijabeticima

Ekspresija transferinskog receptora ne slijedi normalnu distribuciju. SD skupina ima statistički značajno više transferinskog receptora u usporedbi sa skupinama tretiranim antidijabeticima metforminom i liraglutidom ( $P < 0,001$ ). Statistički je značajno smanjena ekspresija transferinskog receptora u skupinama životinja tretiranih antidijabeticima metforminom ( $P < 0,001$ ), odnosno liraglutidom ( $P < 0,005$ ) u usporedbi sa životinjama koje nisu tretirane lijekovima, ali su bile na HFHSD.



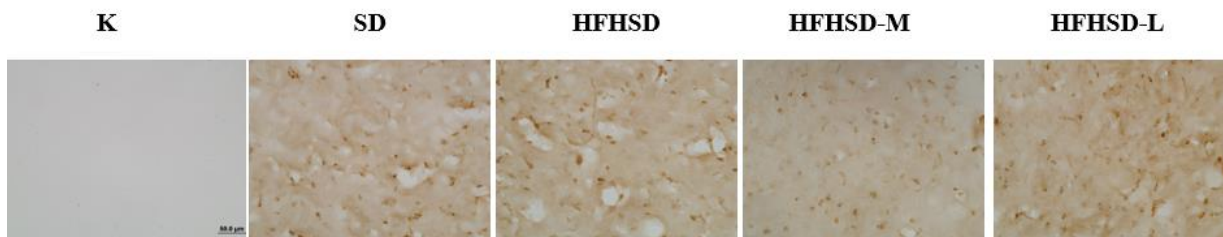
Slika 2. Imunohistokemijski prikazi SNR regije Sprague Dawley mužjaka testiranih protutijelom na transferinski receptor. Povećanje 400x, veličina skale 50µm. S lijeva na desno: K - kontrola, SD - životinje na standardnoj dijeti, HFHSD - životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima, HFHSD-M - životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima tretirane metforminom, HFHSD-L - životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima tretirane liraglutidom.



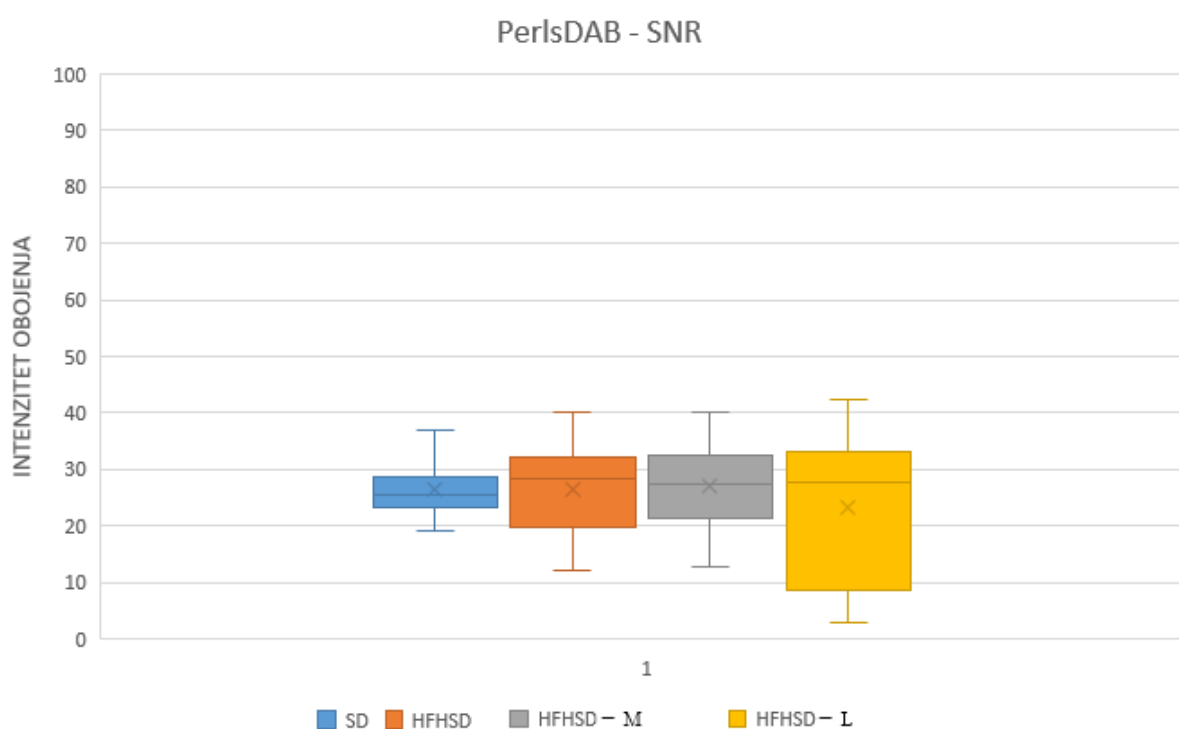
Slika 3. Ekspresija transferinskog receptora u SNR regiji mozga Sprague Dawley mužjaka. Mann-Whitney U-test. (\* statistička značajnost < 0,05; \*\* statistička značajnost < 0,005; \*\*\* statistička značajnost < 0,001)

## 5.2. Histološka kvantifikacija bojenja Perls-DAB u supstanciji nigri (SNR) štakora izloženih HFHSD i antidijabeticima

Željezo u SNR regiji ne pokazuje statistički značajnu razliku u ekspresiji. Iz grafa se pak vidi kako skupina HFHSD ima veću količinu željeza u odnosu na SD skupinu. Skupine tretirane metforminom i liraglutidom imaju nešto manju ekspresiju željeza od skupine na obogaćenoj dijeti.



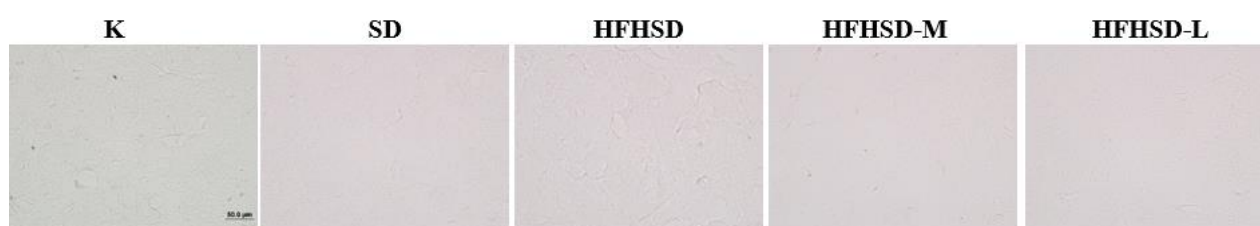
Slika 4. Prikazi SNR regije Sprague Dawley mužjaka obojene modifikacijom histološkog bojenja Perls-DAB. Povećanje 400x, veličina skale 50 $\mu$ m. S lijeva na desno: K - kontrola, SD - životinje na standardnoj dijeti, HFHSD - životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima, HFHSD-M - životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima tretirane metforminom, HFHSD-L - životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima tretirane liraglutidom.



Slika 5. Ekspresija željeza u SNR regiji mozga Sprague Dawley mužjaka. Mann-Whitney U-test. (\* statistička značajnost < 0,05; \*\* statistička značajnost < 0,005; \*\*\* statistička značajnost < 0,001)

### 5.3. Imunohistokemijska kvantifikacija pTau u supstanciji nigri (SNR) štakora izloženih HFHSD i antidijabeticima

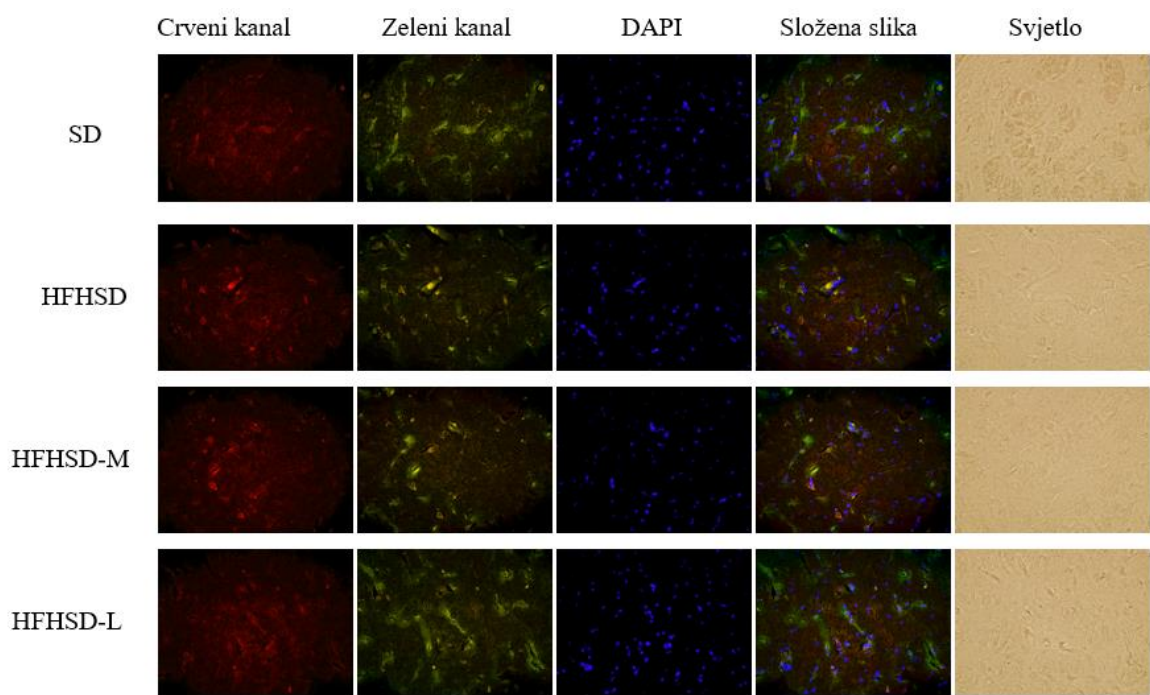
Kod određivanja ekspresije markera degeneracije, pTau proteina, u SNR regiji mozga utvrđeno je kako je intenzitet obojenja jednak ili manji onome od negativne kontrole pa naknadna kvantifikacija nije učinjena. Pretpostavili smo kako ovo nije regija od koje počinje patološka fosforilacija Tau proteina te da, u daljnjim studijama, fokus treba prebaciti, primjerice, na hipotalamus.



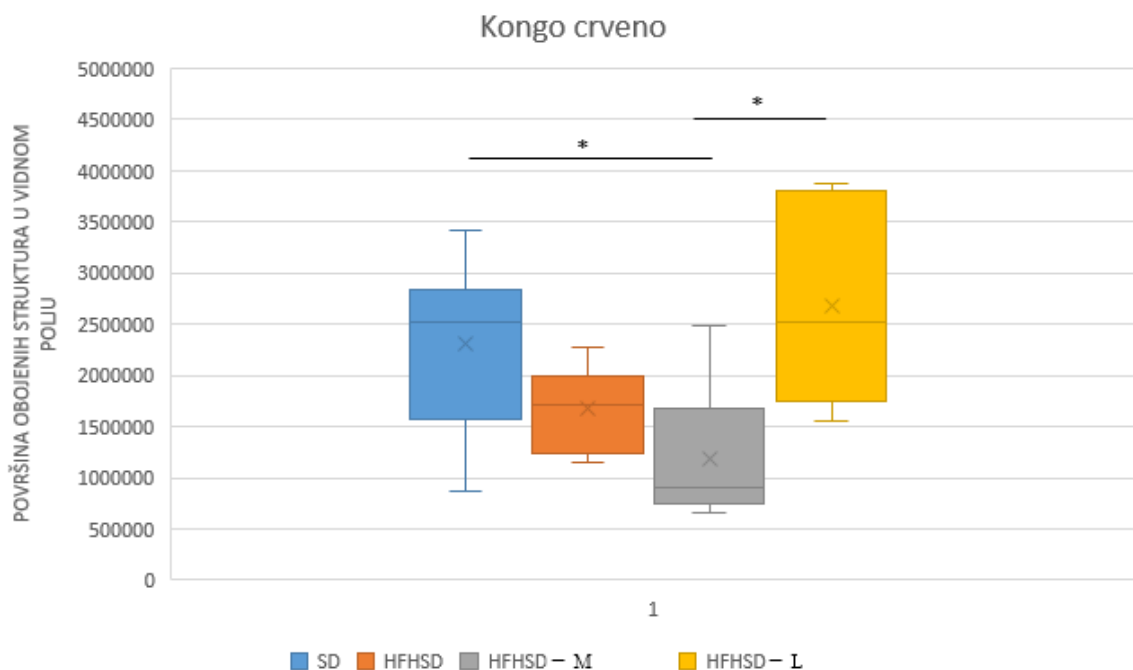
Slika 6. Imunohistokemijski prikazi SNR regije Sprague Dawley mužjaka testiranih protutijelom na pTau. Povećanje 400x, veličina skale 50 $\mu$ m. S lijeva na desno: K - kontrola, SD - životinje na standardnoj dijeti, HFHSD - životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima, HFHSD-M - životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima tretirane metforminom, HFHSD-L - životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima tretirane liraglutidom.

### 5.4. Histološka kvantifikacija bojenja Kongo crvenom u supstanciji nigri (SNR) štakora izloženih HFHSD i antidijabeticima

Ekspresija amiloida ne slijedi normalnu distribuciju. Skupina na standardnoj dijeti ima statistički značajno više amiloida u odnosu na skupinu tretiranu metforminom ( $P < 0,05$ ), no u usporedbi sa skupinom tretiranom liraglutidom ekspresija je manja. Skupina HFHSD ima značajno veću ekspresiju amiloida u odnosu na HFHSD-M skupinu, ali manju ekspresiju u odnosu na HFHSD-L skupinu. Statistički značajno više amiloida vidljivo je u skupini tretiranoj liraglutidom u odnosu na skupinu tretiranu metforminom ( $P < 0,05$ ). Kako bismo bili sigurni da se stvarno radi o amiloidu, ovaj bi rezultat trebalo potkrijepiti imunohistokemijskim dokazima.



Slika 7. Prikazi SNR regije Sprague Dawley mužjaka obojene Kongo crvenom. Povećanje 400x. Odozgo prema dolje: SD - životinje na standardnoj dijeti, HFHSD - životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima, HFHSD-M - životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima tretirane metforminom, HFHSD-L - životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima tretirane liraglutidom.

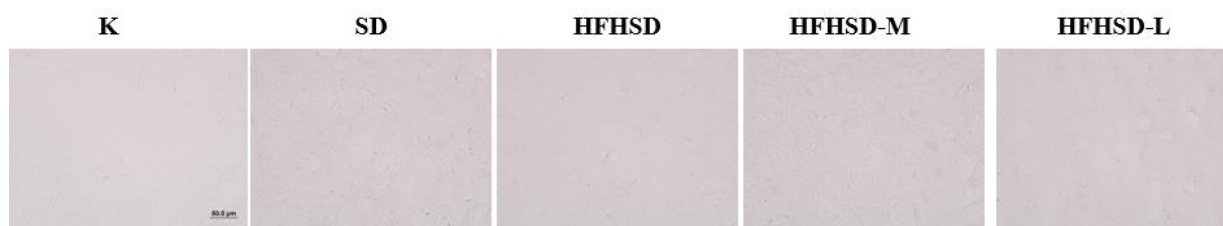


Slika 8. Ekspresija amiloida u SNR regiji mozga Sprague Dawley mužjaka. Mann-Whitney U-test. (\* statistička značajnost < 0,05; \*\* statistička značajnost < 0,005; \*\*\* statistička značajnost < 0,001)

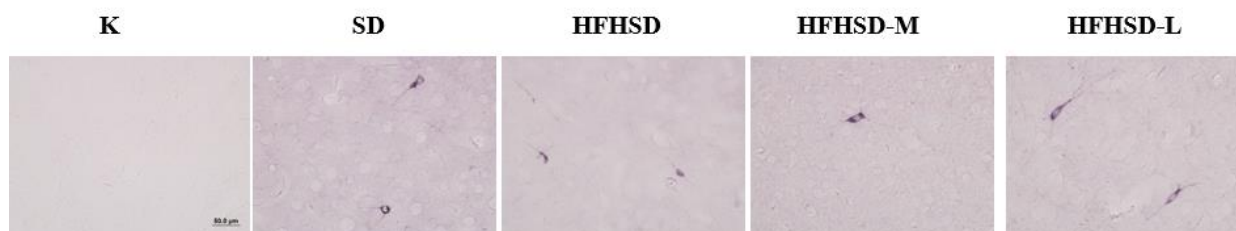


## 5.5. Imunohistokemijska kvantifikacija nNOS u supstanciji nigri (SNR) štakora izloženih HFHSD i antidijabeticima

Prilikom ispitivanja mozga štakora na nNOS, markera plastičnosti, pokazalo se kako nema nNOS pozitivnih stanica u SNR regiji (slika 9). Protutijelo na nNOS radilo je jer nNOS pozitivnih stanica ima u hipokampusu Sprague Dawley mužjaka (slika 10) pa u nekoj narednoj studiji pozornost treba prebaciti baš na ovu regiju mozga.



Slika 9. Imunohistokemijski prikazi SNR regije Sprague Dawley mužjaka testiranih protutijelom na nNOS. Povećanje 400x, veličina skale 50 $\mu$ m. S lijeva na desno: K - kontrola, SD - životinje na standardnoj dijeti, HFHSD - životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima, HFHSD-M - životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima tretirane metforminom, HFHSD-L - životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima tretirane liraglutidom.

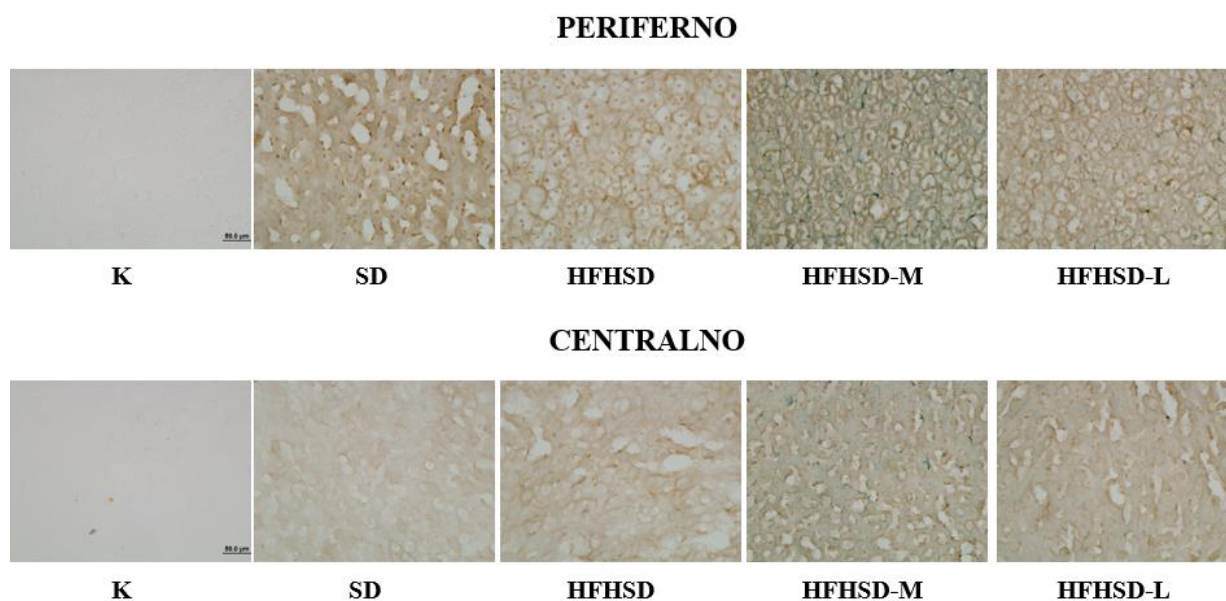


Slika 10. Imunohistokemijski prikazi imunopozitivnih stanica u hipokampusu Sprague Dawley mužjaka testiranih protutijelom na nNOS. Povećanje 400x, veličina skale 50 $\mu$ m. S lijeva na desno: K - kontrola, SD - životinje na standardnoj dijeti, HFHSD - životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima, HFHSD-M - životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima tretirane metforminom, HFHSD-L - životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima tretirane liraglutidom.

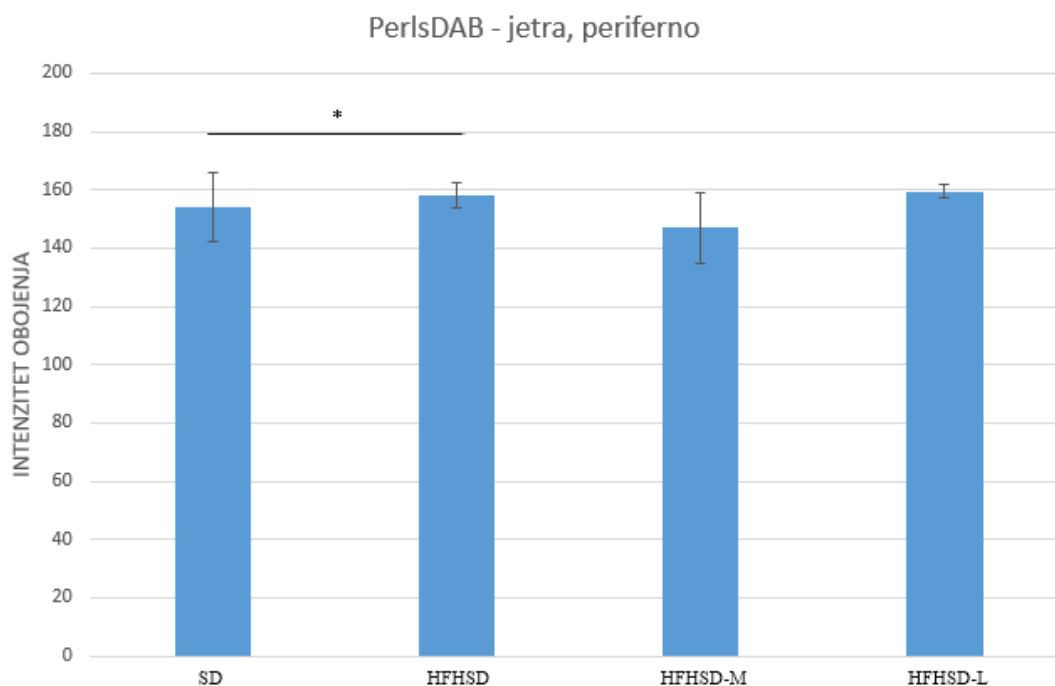
## 5.6. Histološka kvantifikacija bojenja prema Perlsovoj metodi u jetri štakora izloženih HFHSD i antidijabeticima

Ekspresija željeza periferno u jetri slijedi normalnu distribuciju. HFHSD skupina ima statistički značajno više željeza od SD skupine ( $P < 0,05$ ). Skupine hranjene obogaćenom dijetom te potom tretirane antidijabeticima metforminom i liraglutidom ne pokazuju statistički značajnu razliku u odnosu na SD i HFHSD skupine.

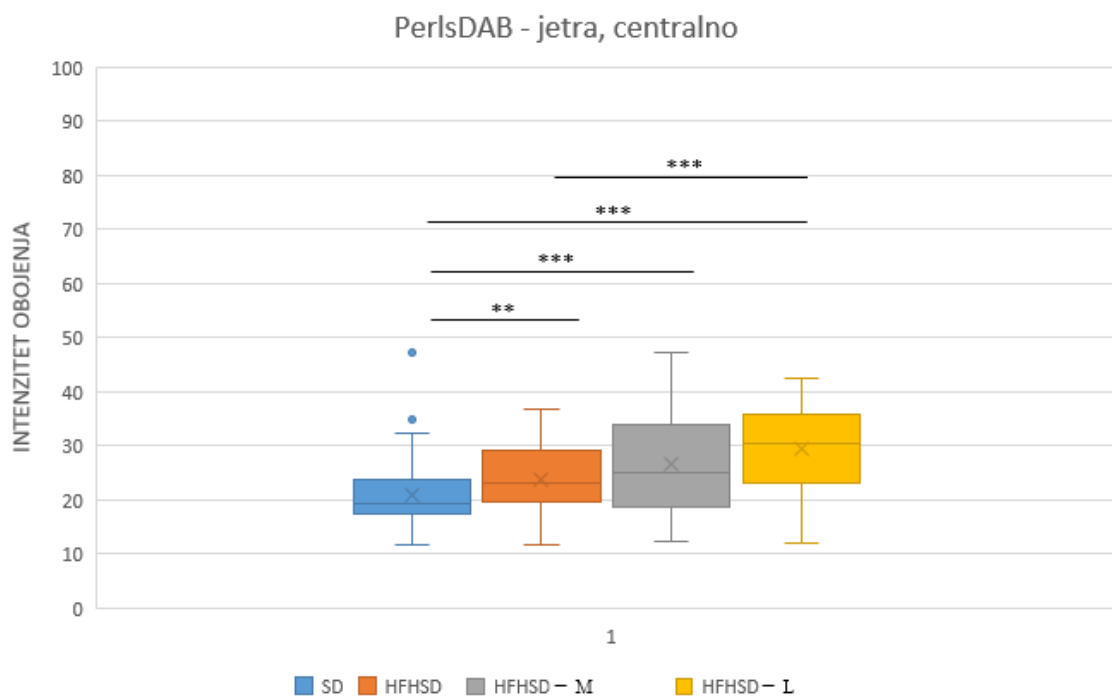
Ekspresija željeza centralno u jetri ne slijedi normalnu distribuciju. Skupine tretirane metforminom i liraglutidom imaju statistički značajno više željeza u usporedbi sa SD skupinom ( $P < 0,001$ ), kao i HFHSD skupina u usporedbi sa SD skupinom ( $P < 0,005$ ). Također statistički značajno više željeza ima i HFHSD-L skupina u odnosu na HFHSD skupinu ( $P < 0,001$ ). Skupina na obogaćenju dijeti pokazuje manje nakupljanje željeza u usporedbi sa skupinama tretiranih antidijabeticima.



Slika 11. Prikazi jetre Sprague Dawley mužjaka obojeni histološkom bojom Prusko modriilo (metoda po Perlsu). Povećanje 400x, veličina skale 50µm. S lijeva na desno: K - kontrola, SD - životinje na standardnoj dijeti, HFHSD - životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima, HFHSD-M - životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima tretirane metforminom, HFHSD-L - životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima tretirane liraglutidom.



Slika 12. Ekspresija željeza u jetri (periferno) Sprague Dawley mužjaka. Studentov t test. (\* statistička značajnost < 0,05; \*\* statistička značajnost < 0,005; \*\*\* statistička značajnost < 0,001)



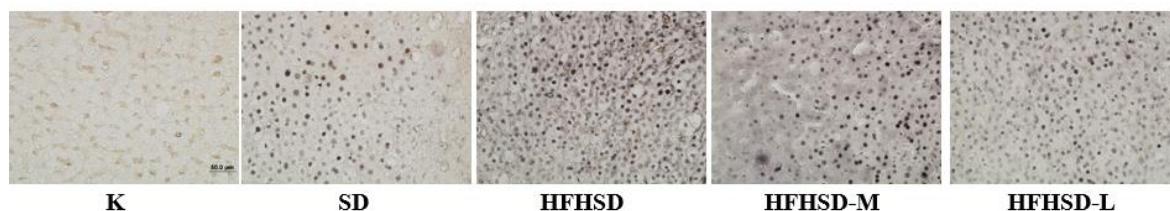
Slika 13. Ekspresija željeza u jetri (centralno) Sprague Dawley mužjaka. Mann-Whitney U-test. (\* statistička značajnost < 0,05; \*\* statistička značajnost < 0,005; \*\*\* statistička značajnost < 0,001)

## 5.7. Imunohistokemijska kvantifikacija PCNA antigena u jetri štakora izloženih HFHSD i antidijabeticima

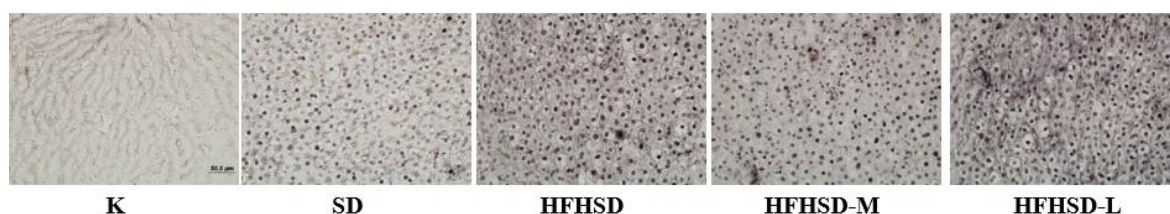
Marker proliferacije, PCNA antigen, prati normalnu distribuciju periferno u slučaju usporedbe SD skupine sa skupinama HFHSD i HFHSD-M, gdje statistički značajnu ekspresiju ( $P < 0,001$ ) imaju skupine HFHSD i HFHSD-M u usporedbi sa SD skupinom. Ekspresija PCNA antigena ne slijedi normalnu distribuciju između HFHSD i HFHSD-L skupina i statistički značajnija ekspresija je kod HFHSD skupine u odnosu na HFHSD-L ( $P < 0,001$ ).

PCNA antigen prati normalnu distribuciju centralno u slučaju usporedbe SD i HFHSD skupina sa skupinom tretiranom metforminom. Statistički je značajno povećana ekspresija skupine HFHSD-M u usporedbi sa SD skupinom ( $P < 0,001$ ) te HFHSD u odnosu na HFHSD-M ( $P < 0,001$ ). U slučaju usporedbe SD skupine sa HFHSD i HFHSD-L skupinama, te skupina HFHSD-M sa HFHSD-L, distribucija nije normalna. Skupine HFHSD i HFHSD-L imaju statistički značajno povećanu ekspresiju ( $P < 0,001$ ) u usporedbi sa SD skupinom. HFHSD-L ima statistički značajno povećanu ekspresiju PCNA antigena u usporedbi sa HFHSD-M skupinom ( $P < 0,001$ ).

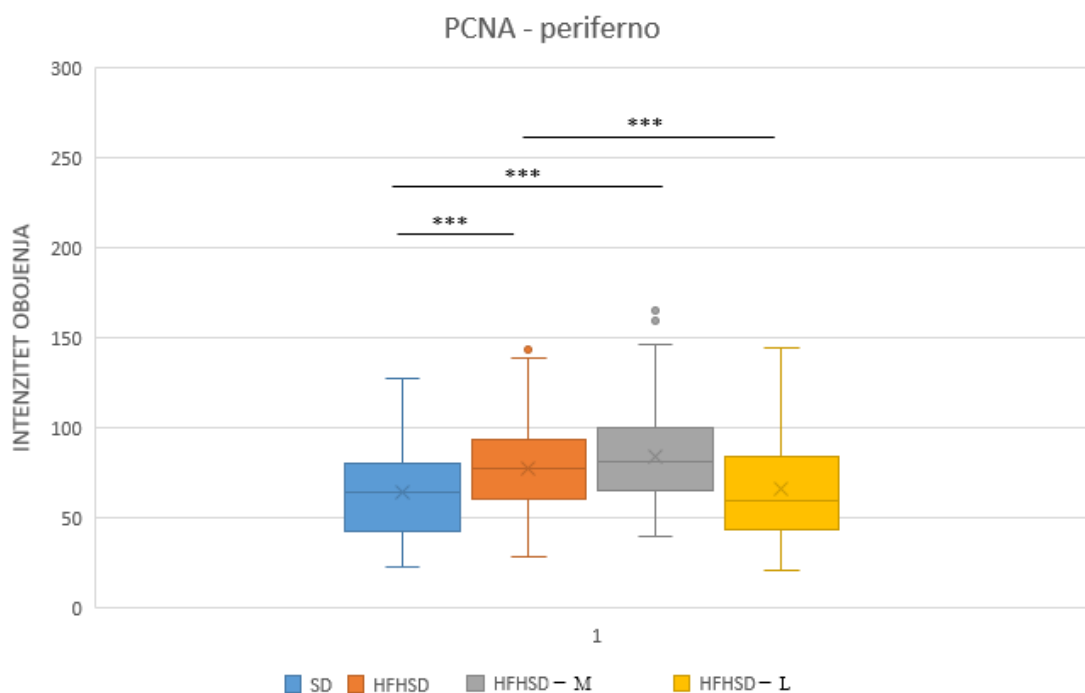
### PERIFERNO



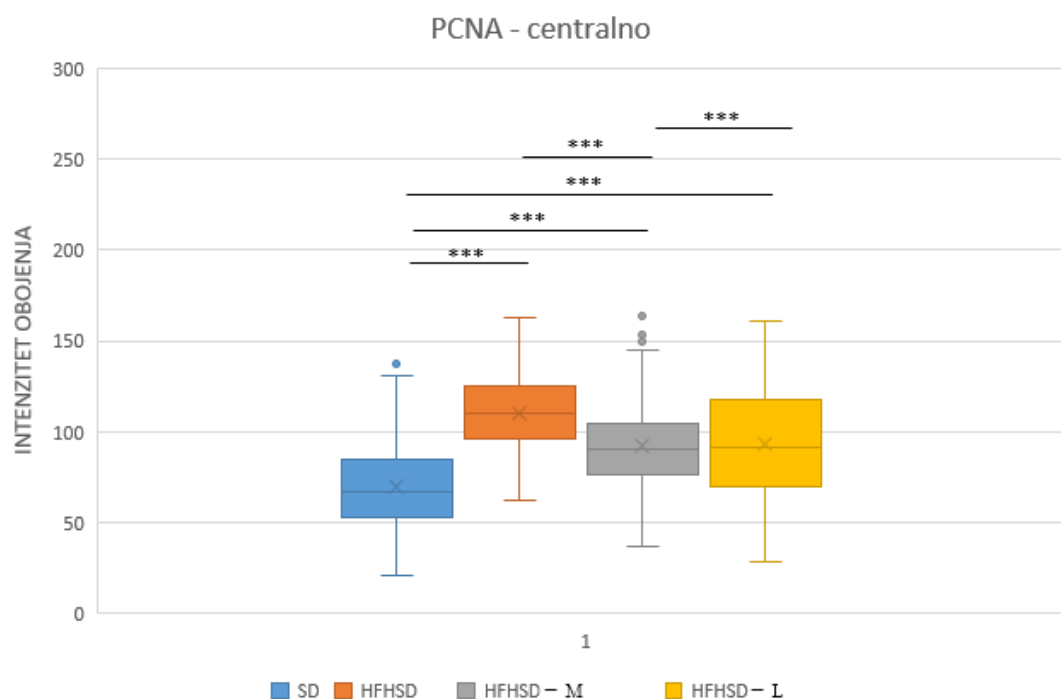
### CENTRALNO



Slika 14. Imunohistokemijski prikazi jetre Sprague Dawley mužjaka testiranih protutijelom na PCNA antigen. Povećanje 400x, veličina skale 50 $\mu$ m. S lijeva na desno: K - kontrola, SD - životinje na standardnoj dijeti, HFHSD - životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima, HFHSD-M - životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima tretirane metforminom, HFHSD-L - životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima tretirane liraglutidom.



Slika 15. Ekspresija PCNA antigena u jetri (periferno) Sprague Dawley mužjaka. Studentov t test i Mann-Whitney U-test. (\* statistička značajnost < 0,05; \*\* statistička značajnost < 0,005; \*\*\* statistička značajnost < 0,001)



Slika 16. Ekspresija PCNA antigena u jetri (centralno) Sprague Dawley mužjaka. Studentov t test i Mann-Whitney U-test. (\* statistička značajnost < 0,05; \*\* statistička značajnost < 0,005; \*\*\* statistička značajnost < 0,001)

## 6. RASPRAVA

Dijabetes tipa 2 metabolički je poremećaj u kojem zbog rezistencije na inzulin ili manjka inzulina dolazi do povećanja koncentracije šećera u krvi tj. hiperglikemije (42). Pretilost predstavlja najznačajniji rizični faktor razvoja ove bolesti (10) prilikom koje, uz mnogobrojne promjene, dolazi i do poremećaja u odlaganju željeza (15). U ljudskom je organizmu feritin odgovoran za pohranu željeza, a transferin za njegov transport. Kod DM2 dolazi do povećanja koncentracije feritina i smanjenja saturacije transferina (17), čemu je posljedica nakupljanje željeza u jetri i dopaminergičkim jezgrama mozga (18). Paralelno dolazi i do nakupljanja  $\beta$ -amiloida te stvaranja neurofibrilarnih snopova (5) u kojima se željezo nakuplja te dolazi do agregacije hiperfosforiliranog Tau proteina, markera neurodegeneracije, koji tvori snopove (23). Ujedno nNOS uzrokuje hiperprodukciju dušikovog oksida, što predstavlja još jedan uzrok neurodegeneracije (28).

U radu je imunohistokemijskim bojenjem analizirana ekspresija transferinskog receptora (TFR) u jezgri SNR, čija neurodegeneracija dovodi do Parkinsonove bolesti. Ekspresija TFR najveća je u skupini životinja hranjenoj dijetom bogatom mastima i šećerima (HFHSD). Skupina hranjena standardnom dijetom (SD) i skupine hranjene HFHSD-om te potom tretirane antidijabeticima pokazuju manju ekspresiju TFR, što se vidi na imunohistokemijskim prikazima preparata i pratećim kvantifikacijama (slike 2 i 3). Tretiranje bilo kojim od dvaju antidijabetika dovodi do značajnog snižavanja količine transferinskog receptora na stanicama SNR jezgre, što bi moglo imati za posljedicu manju količinu uskladištenog željeza u ovim jezgrama. S druge strane, ovo nužno ne mora smanjiti količinu pohranjenog željeza, već samo odražava trenutnu sposobnost tih stanica da u stanicu unesu nove količine željeza. Cheung i suradnici proveli su istraživanje koje je pokazalo povećanu koncentraciju feritina te smanjenu saturaciju transferina u osoba sa predijabetesom (43). Također, Park i suradnici zaključili su kako je smanjena saturacija transferina povezana sa povećanim rizikom poremećaja metabolizma glukoze i inzulinske rezistencije (44). Dakle, pretilost uzrokuje porast koncentracije inzulina, što rezultira porastom internalizacije transferinskih receptora na membrani, posljedica čega je unos slobodnog željeza u stanicu. Zbog velike se količine željeza povećava koncentracija feritina koji je skladišni oblik željeza. Prevelika količina željeza u stanici pak uzrokuje porast oksidativnog stresa koji dovodi do hiperinzulinemije i rezistencije na inzulin (17).

Modifikacijom je histološkog bojenja Perls-DAB na rezovima mozga procijenjena količina željeza u SNR regiji. Rezultati su pokazali kako dolazi do većeg nakupljanja željeza u skupini mužjaka hranjenoj dijetom bogatom mastima i šećerima u usporedbi sa SD skupinom, iako ovo povećanje nije doseglo značajnost. Kako je supstancija nigra dopaminergička jezgra, dolazi do oslobađanja dopamina prilikom konzumacije jela. Dopamin se pregrađuje u neuromelanin koji onda veže željezo na sebe u dopaminergičkim neuronima SNR regije ljudskog mozga i reciklira se nazad u neurone te tako dodatno unosi u njih slobodno željezo (45). Dakle, kod pretilih osoba dolazi do porasta količine željeza u supstanciji nigri što je u skladu s dobivenim rezultatima. Skupine hranjene obogaćenom dijetom i potom tretirane antidijabeticima metforminom i liraglutidom nisu pokazale statistički značajno smanjenje količine željeza (slika 5). Liraglutid ima sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru i njegov je učinak na mozak zaštitni kao u slučaju Alzheimerove bolesti (AD) (46). Metformin također prolazi krvno-moždanu barijeru (47), no čini se kako su učinci tih dvaju antidijabetika izostali u ovom istraživanju. Pretpostavka je da je potrebno vršiti terapiju u dužem vremenskom periodu kako bi se prepoznali učinci ovih terapeutika.

Imunohistokemijom na pTau procijenjena je brojnost neurofibrilarnih snopova te nisu dobiveni statistički značajni rezultati pri usporedbi SD i HFHSD skupina međusobno te sa skupinama tretiranim antidijabeticima. Dokazano je kako HFHSD dijeta, u protokolu hranjenja od 6 tjedana, ne dovodi do neurodegeneracije SNR neurona te zato nije moguće zaključiti djeluju li antidijabetici neuroprotektivno. Svakako bi bilo korisno provesti novo istraživanje u kojem će animalni modeli biti na obogaćenoj dijeti u trajanju dužem od 6 tjedana, kao što je slučaj u ovome istraživanju, te tada procijeniti djelovanje antidijabetika.

Količina amiloida na rezovima u četirima skupinama životinja procijenjena je uporabom histološke boje Kongo crvene. Rezultati pokazuju kako HFHSD skupina ima značajno veću ekspresiju amiloida u odnosu na skupinu na obogaćenoj dijeti tretiranoj metforminom, dok skupina tretirana liraglutidom pokazuje veću količinu amiloida od HFHSD skupine (slika 8). SD skupina ima statistički značajno više amiloida u odnosu na skupinu tretiranu metforminom, no u usporedbi sa skupinom tretiranom liraglutidom ekspresija je manja. Dobiveni rezultati nisu u skladu sa dosadašnjim istraživanjima. Primjerice, Gallagher i suradnici u svojem su istraživanju na rezovima mozga miševa sa Alzheimerovom bolešću pokazali nakupljanje  $\beta$ -amiloida u senilnim plakovima koristeći bojenje Kongo crveno (25). Ramos-Rodriguez i suradnici proučavali su vaskularne promjene uzrokovane predijabetesom na miševima hranjenim obogaćenom dijetom te došli do zaključka kako dolazi do nakupljanja  $\beta$ -amiloida

koji posljedično pogoršava centralnu AD patologiju (48). Zato bi u slučaju našeg istraživanja rezultat vrijedilo provjeriti imunohistokemijskim bojenjem na amiloid.

Imunoreaktivnošću na nNOS, kao dodatnim markerom neurodegeneracije, procijenjena je ekspresija kod životinja na standardnoj dijeti i HFHSD te međusobno između životinja hranjenih obogaćenom dijetom sa skupinama koje su dodatno tretirane antidijabeticima. No, ovo istraživanje pokazalo je kako u SNR regiji koja je proučavana, nema nNOS pozitivnih stanica (slika 9). Inače dolazi do povećane aktivnosti nNOS i porasta količine dušikova oksida pri pretjeranom unosu hrane i dijabetesu, što uzrokuje oštećenje stanica. Tako su Mastrocola i suradnici opisali kako kod hiperglikemičnih (dijabetičkih) štakora dolazi do povećanja razine ROS-a, dušikovog oksida i ekspresije nNOS enzima u mitohondrijima mozga (49). Zajedničkim snagama oksidativni i dušični stres oštećuju moždane mitohondrije dijabetičkih štakora što dovodi do smrti neurona. U našem bi slučaju studiju valjalo proširiti i na hipokampus, čija je funkcija u procesima memorije višestruko istražena, a koji je jedno od prvih mjesta zahvaćenih neurodegeneracijom Alzheimerovog tipa, kako bi se utvrdila mogućnost ovog dvostrukog udarca na neurone.

Rezultati bojenja jetre Perlsovom metodom su pokazali kako u HFHSD skupini dolazi do povećanog nakupljanja željeza u odnosu na SD skupinu (slike 12 i 13). Ovi podaci govore nam kako pretilost povećava zalihe željeza u jetri. Zheng i suradnici, u istraživanju kineske populacija, pomoću magnetske rezonance procijenili su jetrenu koncentraciju željeza te su pokazali kako dolazi do preopterećenja jetre željezom (50). Antidijabetička terapija metforminom i liraglutidom, na kojoj su Sprague Dawley štakori bili od 50. do 64. tjedna starosti, nije uspjela smanjiti nakupljanje željeza u jetri. Moguće je objašnjenje da je jetra bila pod prevelikim preopterećenjem željezom te nije uspjela kompenzirati to u kratkom periodu terapije antidijabeticima, baš kao i u slučaju SNR jezgre.

Regenerativnu sposobnost jetre životinja na standardnoj dijeti i dijeti obogaćenom mastima i šećerima usporedili smo imunohistokemijom na PCNA antigen. Analiziranjem grafičkog prikaza i fotografija preparata (slike 14, 15 i 16) vidimo kako je ekspresija antigena značajnije izražena u HFHSD skupini u usporedbi sa SD skupinom. Naime, jetra biva oštećena dijetom obogaćenom mastima i šećerima pa zbog njene sposobnosti regeneracije pokušava to oštećenje kompenzirati što diobom, što prepisivanjem gena. Također možemo vidjeti kako skupine hranjene dijetom obogaćenom mastima i šećerima te potom tretirane antidijabeticima metforminom i liraglutidom uspijevaju regenerirati jetru. PCNA je ujedno i pokazatelj koja



grupa životinja ima najveće oštećenje jetre, vjerojatno izazvano nakupljanjem masti. U našem su slučaju to HFHSD i HFHSD-M skupine. Centralni se dio regenerira nešto brže od perifernog dijela zbog bolje opskrbe krvlju, no učinci se vide i u perifernom dijelu. Kako bismo do kraja razumjeli postojanje razlike u centralnom i perifernom dijelu, trebalo bi procijeniti opterećenje hepatocita masnim kapljicama. To se može učiniti histološkim bojenjima uljno crvenom bojom i Sudanskim crnilom.

Uzimajući u obzir rezultate navedenih radova, kao i rezultate ovog istraživanja, može se zaključiti kako u predijabetesu dolazi do brojnih metaboličkih promjena u jetri i mozgu Sprague Dawley štakora. Prvenstveno dolazi do nakupljanja željeza u jetri i jezgrama središnjeg živčanog sustava, koje onda za sobom vuče niz drugih reakcija koje nadalje pogoduju oštećenju stanica i tkiva. Antidiabetici su se pokazali malo djelotvornijim u moždanom u usporedbi s jetrenim tkivom. Postavljenu hipotezu ovog završnog rada nismo mogli u potpunosti potvrditi. U narednim istraživanjima bilo bi korisno životinje tretirati sa dijetom obogaćenom mastima i šećerima, kao i s antidiabeticima metforminom i liraglutidom dulje nego što je provedeno u ovome istraživanju.

## 7. ZAKLJUČAK

Provedeno istraživanje i dobiveni rezultati dovode do sljedećih zaključaka:

1. U jetri dolazi do većeg nakupljanja željeza i izražaja PCNA antigena kod mužjaka Sprague Dawley štakora koji su bili na dijeti obogaćenoj mastima i šećerima u usporedbi sa životinjama na standardnoj dijeti. Antidiabetici metformin i liraglutid nisu imali značajan utjecaj na životinje na obogaćenoj dijeti.
2. U moždanoj jezgri *substantia nigra pars reticulata* dolazi do povećanog nakupljanja željeza kod životinja hranjenih obogaćenom dijetom u usporedbi sa skupinom na standardnoj, a antidiabetici nisu uspjeli smanjiti količinu željeza kod životinja na obogaćenoj dijeti. Povećanje željeza prati povećanje izražaja transferinskih receptora.
3. Imunohistokemijom na pTau nisu dobiveni statistički značajni rezultati te nije moguće zaključiti djeluju li antidiabetici neuroprotektivno na mužjake Sprague Dawley štakora.

## 8. SAŽETAK

**Uvod:** Pretilost nastaje prekomjernim unosom hrane i rizični je faktor za niz kroničnih bolesti, uključujući i dijabetes. Dijabetes tipa 2 metabolički je poremećaj u kojem dolazi do rezistencije na inzulin. Posljedično se javljaju mnogobrojne promjene u organizmu među kojima i poremećaji metabolizma željeza u jetri i mozgu. Pomoću životinjskih je modela predijabetesa moguće pratiti promjene u organizmu te utjecaj terapije antidijabeticima na te promjene.

**Ciljevi:** Procijeniti sadržaj željeza u jetri i supstanciji nigri (SNR) bojenjem prema Perlsovoj metodi, a u SNR regiji imunohistokemijom na transferinski receptor (TFR). Kongo crvenom procijeniti količinu amiloida na rezovima mozga. Imunohistokemijskim metodama procijeniti regenerativnu sposobnost jetre.

**Materijali i metode:** U studiju su uključena 32 mužjaka Sprague Dawley štakora podijeljena u četiri skupine: 1. životinje na standardnoj dijeti, 2. životinje na dijeti obogaćenoj mastima i šećerima, 3. i 4. životinje na obogaćenoj dijeti tretirane metforminom, odnosno liraglutidom. Histološkim bojenjima metodom po Perlsu detektirano je željezo, a Kongo crvenom amiloid. Imunohistokemijski, pomoću protutijela na TFR, fosforilirani Tau (pTau), neuronsku nitrid oksid sintazu (nNOS) i jezgrin proliferirajući antigen (PCNA) detektirani su pripadajući markeri.

**Rezultati:** Postoji statistički značajna razlika u slučaju bojenja na željezo te PCNA antigena, dok u slučaju pTau, nNOS te Kongo bojenja nije utvrđena statistički značajna razlika. Antidijabetici metformin i liraglutid nisu uspjeli pokazati svoje terapijske učinke u provedenoj studiji.

**Zaključak:** U predijabetesu dolazi do poremećaja metabolizma željeza u jetri i mozgu te oštećenja tkiva.

**Ključne riječi:** dijabetes; jetra; SNR regija; željezo

## 9. SUMMARY

Changes in iron metabolism in the brain and liver of Sprague Dawley male rats exposed to fatty and sweet food

**Introduction:** Obesity is caused by excessive food intake and is a risk factor for a number of chronic diseases, including diabetes. Type 2 diabetes is a metabolic disorder with a resistance to insulin. Consequently, there are many changes in the body, among which are iron metabolism disorders in the liver and brain. Using animal models of prediabetes, it is possible to monitor changes in the body and the effect of antidiabetic therapy on these changes.

**Goals:** To evaluate iron content in the liver and substance nigra (SNR) by staining according to Perls method, and in the SNR region by immunohistochemistry on transferrin receptor (TFR). To evaluate the amount of amyloid on brain slices using histological color Congo red. To evaluate the regenerative liver function by using immunohistochemical methods

**Materials and methods:** The study included 32 male Sprague Dawley rats divided into 4 groups: 1 animals on standard diet, 2 animals on high fat and high sucrose diet, 3 animals on enriched diet treated with metformin, 4 animals on enriched diet treated with liraglutide. With histological stainings by the Perls method we detected iron, and by Congo red we detected amyloid. Using immunohistochemical analysis by antibodies for TFR, phosphorylated Tau (pTau), neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA), respective markers were detected.

**Results:** The results showed statistically significant differences in case of staining for iron and PCNA antigen, while in the case of pTau, nNOS and Congo red staining there were no statistically significant differences. Antidiabetics metformin and liraglutide failed to demonstrate their therapeutic effects in the conducted study.

**Conclusion:** Prediabetes causes iron metabolism disorders in the liver and brain which lead to tissue damage.

**Keywords:** diabetes; liver; SNR region; iron

## 10. LITERATURA

1. Pi-Sunyer X, M.D. The Medical Risks of Obesity. *Postgrad Med.* 2009;121(6):21-33.
2. Allman-Farinelli M. Invited Commentary: Body Mass Indeks and Mortality. *Am J Epidemiol.* 2014;179(2):145-146.
3. Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, Kamper E. The Use of Animal Model sin the Study of Diabetes Mellitus. *In vivo.* 2009;23:245-258.
4. Lutz TA, Woods SC. Overview of Animal Models of Obesity. *Curr Protoc Pharmacol.* 2012; CHAPTER: Unit5.61. doi:10.1002/0471141755.ph0561s58.
5. Emmerzaal TL, Kiliaan AJ, Gustafson DR. 2003-2013: A Decade of Body Mass Indeks, Alzheimer's Disease, and Dementia. *J Alzheimer's Disease.* 2015;43:739-755.
6. Wang J, Yang DL, Chen ZZ, Gou BF. Associations of body mass index with cancer incidence among populations, genders, and menopausal status: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiology.* 2016;42:1-8.
7. Ryden A, Torgerson JS. The Swedish Obese Subjects Study-what has been accomplished to date?. *SOARD.* 2006;2:549-560.
8. Wannamethee SG, Shaper AG, Walker M. Overweight and obesity and weight change in middle aged men: impact on cardiovascular disease and diabetes. *J Epidemiol Community Health.* 2005;59:134-139.
9. King AJ. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol.* 2012;166:877-894.
10. Wu Y, Ding Y, Tanaka Y, Zhang W. Risk Factors Contributing to Type 2 Diabetes and Recent Advances in the Treatment and Prevention. *Int J Med Sci.* 2014;11(11):1185-1200.
11. Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends. *Oman Med J.* 2012;27(4):269-273.
12. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of human Obesity in Rodents. *Obesity.* 2007;15(4):798-808.
13. Marques C, Meireles M, Norberto S, Leite J, Freitas J, i sur. High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte.* 2016;5(1):11-21.
14. Albu JB, Heilbronn LK, Kelley DE, Smith SR, Azuma K, i sur. Metabolic Changes Following a 1-Year Diet and Exercise Intervention in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 2010;59:627-633.

15. Becker C, Orozco M, Solomons NW, Schümann K. Iron metabolism in obesity: How interaction between homeostatic mechanisms can interfere with their original purpose. Part 1: Underlying homeostatic mechanisms of energy storage and iron metabolisms and their interaction. *J Trace Elem Med Biol.* 2015;30:195-201
16. Andrews NC, M.D., Phd. Disorders of iron metabolism. *NEJM.* 1999;341(26):1986-1995.
17. Fernandez-Real JM, Lopez-Bermejo A, Ricart W. Cross-Talk Between Iron Metabolism and Diabetes. *Perspectives in Diabetes.* 2002;51:2348-2354.
18. Abo Zeid AA, El-Saka MH, Abdalfattah AA, Zineldeen DH. Potential factors contributing to poor iron status with obesity. *Alexandria J Med.* 2014;50:45-48.
19. Hallgren B, Sourander P. The effect of age on the non-haemin iron in the human brain. *J Neurochem.* 1958;3:41-51.
20. Morris CM, Candy JM, Keith AB, Oakley AE, Taylor GA, Pullen RGL, i sur. Brain Iron Homeostasis. *J Inorg Biochem.* 1992;41:257-265.
21. Butterfield DA, Di Domenico F, Barone E. Elevated risk of type 2 diabetes for development of Alzheimer disease: A key role for oxidative stress in brain. *BBA.* 2014;1842:1693-1706.
22. Everett J, Cespedes E, Shelford LR, Exley C, Collingwood JF, i sur. Ferrrous iron formation following the co-aggregation of ferric iron and the Alzheimer's disease peptide  $\beta$ -amyloid (1-42). *J R Soc.* 2014; Interface 11:20140165.
23. Grünblatt E, Bartl J, Riederer P. The link between iron, metabolic syndrome, and Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 2011;118:371-379.
24. Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem.* 2010;345:91-104.
25. Gallagher JJ, Finnegan ME, Grehan B, Dobson J, Collingwood JF, Lynch MA. Modest Amyloid Deposition is Associated with Iron Dysregulation, Microbial Activation, and Oxidative Stress. *Journal of Alzheimer's Disease.* 2012;28:147-161.
26. Zhao WQ, Townsend M. Insulin resistance and amyloidogenesis as common molecular foundation for type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *BBA.* 2009;1792:482-496.
27. Freude S, Plum L, Schnitker J, Leeser U, Udelhoven M, i sur. Peripheral Hyperinsulinemia Promotes Tau Phosphorylation In Vivo. *Diabetes.* 2005;54:3343-3348.

28. Mukherjee P, Cinelli MA, Kang S, Silverman RB. Development of nitric oxide synthase inhibitors for neurodegeneration and neuropathic pain. *Chem Soc Rev.* 2014;43:6814-6838.
29. Krentz AJ, Baley CJ. Oral Antidiabetic Agents. Current Role in Type 2 Diabetes Mellitus. *Drugs.* 2005;65(3):385-411.
30. Hostalek U, Gwilt M, Hildemann S. Therapeutic Use of Metformin in Prediabetes and Diabetes. *Drugs.* 2015;75:1071-1094.
31. Freemark M, Bursey D. The Effects of Metformin on Body Mass Indeks and Glucose Tolerance in Obese Adolescents With Fasting Hyperinsulinemia and a Family History od Type 2 Diabetes. *Pediatrics.* 2001;107(4):E55.
32. Pernicova I, Korbonits M. Metformin – mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nature Reviews Endocrinology.* 2014;10:143-156.
33. Turner R, UKPDS Group. Effects of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *The Lancet.* 1998;352:854-865.
34. Ladenheim EE. Liraglutide and obesity: a review of the data so far. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:1867-1875.
35. Potts JE, Gray LJ, Brady EM, Khunti K, Davies MJ, Bodicoat DH. The Effect od Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Agonists on Weight Loss in Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Mixed Treatment Comparison Meta-Analysis. *PLOS ONE.* 2015;10(6):e0126769.
36. Buse JB, Rosenstock J, Sesti G, et al; LEAD-6 Study Group. Liraglutide once a day versus exenatide twice a day for type 2 diabetes: a 26-week randomised, parallel-group, multinational, open-label trial (LEAD-6). *Lancet.* 2009;374(9683):39-47.
37. van Can J, Sloth B, Jensen CB, Flint A, Blaak EE, Saris WH. Effects of the once-daily GLP-1 analog liraglutide on gastric emptying, glycemic parameters, appetite and energy metabolism in obese, non-diabetic adults. *International Journal of Obesity.* 2014;38:784–793.
38. Greig SL, Scott LJ. Insulin Degludec/Liraglutide: A Review in Type 2 Diabetes. *Drugs.* 2015;75:1523-1534.
39. Estrada LI, Robinson AA, Amaral AC, Giannaris EL, Heyworth NC, Mortazavi F, i sur. Evaluation of Long-Term Cryostorage of Brain Tissue Sections for Quantitative Histochemistry. *J Histochem Cytochem.* 2017;65(3):153-171.

40. Sands SA, Leung-Toung R, Wang Y, Connelly J, LeVine SM. Enhanced Histochemical Detection of Iron in Paraffin Sections of Mouse Central Nervous System Tissue: Application in the APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *ASN Neuro*. 2016;1-14.
41. Clement CG, Truong LD. An evaluation of Congo red fluorescence for the diagnosis of amyloidosis. *Hum Pathol*. 2014;45:1766-1772.
42. Malmenäs M, Bouchard JR, Langer J. Retrospective Real-World Adherence in Patients With Type 2 Diabetes Initiating Once-Daily Liraglutide 1,8mg or Twice-Daily Exenatide 10µg. *Clin Ther*. 2013;35(6):795-807.
43. Cheung CL, Cheung TT, Lam KS, Cheung BM. High ferritin and low transferrin saturation are associated with pre-diabetes among a national representative sample of U.S. adults. *Clin Nutr*. 2013;32:1055-1060.
44. Park RJ, Moon JD. Low transferrin saturation is associated with impaired fasting glucose and insulin resistance in the South Korean adults: the 2010 Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabet Med*. 2015;32:673-678.
45. Double KL, Gerlach M, Schünemann V, Trautwein AX, Zecca L, i sur. Iron-binding characteristics of neuromelanin of the human substantia nigra. *Biochem Pharmacol*. 2003;66(3):489-494.
46. Hunter K, Hölscher C. Drugs developed to treat diabetes, liraglutide and lixisenatide, cross the blood brain barrier and enhance neurogenesis. *BMC Neurosci*. 2012;13:33.
47. Yarchoan M, Arnold SE. Repurposing Diabetes Drugs for Brain Insulin Resistance in Alzheimer Disease. *Diabetes*. 2014;63:2253-2261.
48. Ramos-Rodriguez JJ, Ortiz-Barajas O, Gamero-Carrasco C, de la Rosa PR, Infante-Garcia C, i sur. Prediabetes-induced vascular alterations exacerbate central pathology in APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2014;48:123-135.
49. Mastrocola R, Restivo F, Vercellinato I, Danni O, Brignardello, i sur. Oxidative and nitrosative stress in brain mitochondria of diabetic rats. *J Endocrinol*. 2005;187:37-44.
50. Zheng X, Jiang T, Wu H, Zhu D, Wang L, i sur. Hepatic iron stores are increased as assessed by magnetic resonance imaging in a Chinese population with altered glucose homeostasis. *Am J Clin Nutr*. 2011;94:1012-1019.



## 11. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** Katarina Mikulec

**Datum i mjesto rođenja:** 10. studenog 1996., Vinkovci

**Adresa stanovanja:** Ulica Nikole Tesle 2A, 32280 Jarmina

**Kontakt:** 095/883 9279

**E-mail:** mikuleckatarina@gmail.com

### **Obrazovanje:**

2015. – 2018. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Osijek

2011. – 2015. Prirodoslovno-matematička gimnazija, Gimnazija Matije Antuna Reljkovića Vinkovci

2003. – 2011. Osnovna škola Matije Gupca u Jarmini