

Spolne razlike u oksidativnom i antioksidativnom statusu NOD miševa hranjenih prehranom s visokim udjelom masti

Serenčeš, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:028744>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Marina Serenčes

**SPOLNE RAZLIKE U OKSIDATIVNOM I
ANTIOKSIDATIVNOM STATUSU NOD
MIŠEVA HRANJENIH PREHRANOM S
VISOKIM UDJELOM MASTI**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2024. godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za metabolizam i starenje, Institut Ruđer
Bošković u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Roberta Belužića.
Nastavnica imenovana od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Morana Dulić.

Zahvale

Zahvaljujem se svom mentoru, dr. sc. Robertu Belužiću, na uloženom trudu i vremenu te na ukazanom povjerenju i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se dr.sc. Sandri Sobočanec, bez čije pomoći ovaj rad teško da bi bio završen; hvala na svakom savjetu, pomoći, komentaru i sugestiji.

Veliko hvala dr.sc. Mariji Pinterić, koja je sve prošla sa mnom, na ukazanom povjerenju i strpljenju u nizu situacija koje su poremetile izradu ovog rada. Marija, hvala ti, bez tebe ništa ne bi bilo moguće.

Zahvaljujem se cijelom Laboratoriju za metabolizam i starenje, u trenucima kada je bilo upitno što želim dalje, upravo Vi ste me uvjerali da je ovo pravi poziv za mene i da radni kolektiv može biti i kao obitelj.

Hvala mojim vilama: Ivani, Martini, Eleni i Matei, koje su mi pomogle da ponekad zaboravim na studentske brige i koje su mi uljepšale studentske dane. Iako možda u trenucima nismo bile blizu, uvijek ste me saslušale i oraspoložile. Pravo prijateljstvo ne poznaje udaljenost, a vi to svakodnevno dokazujete.

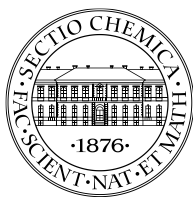
Hvala mojoj sestri Dori i mom bratu Borni, koji su bili velika podrška i rame za plakanje tijekom studiranja. I u trenucima kada sam se osjećala kao da je stanje bezizlazno, bili ste tu i nikad se neću moći dovoljno zahvaliti.

Na kraju se želim zahvaliti svojim roditeljima, jer bez njih ništa ne bi bilo moguće. Hvala što ste mi bili vjetar u leđa, što ste me uvijek podupirali i bili tu za mene, i u lakšim i u težim trenucima (a bilo ih je). Naučili ste me i pokazali koje su to prave vrijednosti u životu, da se svakim danom trudim biti bolja osoba i da nikad ne trebam odustajati od svojih snova i ciljeva.

Sadržaj

SAŽETAK.....	X
ABSTRACT	XII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Dijabetes.....	3
2.1.1. <i>Razvoj dijabetesa i razlike u razvoju bolesti.....</i>	<i>3</i>
2.2. Modeli za istraživanje DMT1.....	4
2.2.1. <i>NOD miševi.....</i>	<i>4</i>
2.3. Oksidativni stres i antioksidativna obrana	5
2.3.1. <i>Karbonilacija proteina.....</i>	<i>6</i>
2.3.2. <i>Antioksidativni enzimi: katalaza i superoksid–dismutaza.....</i>	<i>7</i>
2.4. Prehrana bogata mastima	8
2.5. Utjecaj prehrane na oksidativni stres	10
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. Pokusne životinje.....	11
3.2. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima u jetri NOD miševa	12
3.3. Određivanje stupnja lipidne peroksidacije.....	14
3.4. Određivanje stupnja karbonilacije proteina	15
3.5. Određivanje ekspresije proteina Western analizom.....	17
§ 4. REZULTATI.....	24
4.1. Aktivnost superoksid–dismutaze u uzorcima jetri NOD miševa	24
4.1.1. <i>MnSOD u kratkom periodu hranjenja HFD ishranom</i>	<i>24</i>
4.1.2. <i>MnSOD u dugom periodu hranjenja HFD ishranom.....</i>	<i>25</i>
4.1.3. <i>CuZnSOD u kratkom periodu hranjenja HFD ishranom.....</i>	<i>26</i>
4.1.4. <i>CuZnSOD u dugom periodu hranjenja HFD ishranom.....</i>	<i>27</i>
4.2. Aktivnost katalaze u uzorcima jetri NOD miševa.....	28
4.2.1. <i>Kratki period HFD.....</i>	<i>28</i>
4.2.2. <i>Dugi period HFD.....</i>	<i>29</i>
4.3. Stupanj lipidne peroksidacije.....	30
4.3.1. <i>Stupanj lipidne peroksidacije nakon 6 tjedana hranjenja HFD.....</i>	<i>30</i>
4.3.2. <i>Stupanj lipidne peroksidacije nakon 6 mjeseci hranjenja HFD.....</i>	<i>31</i>
4.4. Stupanj karbonilacije uzoraka jetri NOD miševa.....	33

4.4.1. Stupanj karbonilacije nakon 6 tjedana hranjenja HFD prehranom	33
4.4.2. Stupanj karbonilacije nakon 6 mjeseci hranjenja HFD prehranom	34
4.5. Određivanje ekspresije proteina Western analizom.....	35
4.5.1. <i>FASN</i>	36
4.5.2. <i>PGC1α</i>	36
4.5.3. <i>CAT</i>	37
4.5.4. <i>PPARγ</i>	38
4.5.5. <i>HADHB</i>	39
4.5.6. <i>Sirt3</i>	40
4.5.7. <i>SOD2</i>	41
4.5.8. <i>SOD1</i>	42
4.5.9. Mitohondrijski kompleksi oksidativne fosforilacije.....	43
§ 5. RASPRAVA	49
§ 6. ZAKLJUČAK	52
§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	53
§ 8. LITERATURNI IZVORI.....	55
§ 9. ŽIVOTOPIS	LIX



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

SPOLNE RAZLIKE U OKSIDATIVNOM I ANTIOKSIDATIVNOM STATUSU NOD MIŠEVA HRANJENIH PREHRANOM S VISOKIM UDJELOM MASTI

Marina Serenčes

Dijabetes je bolest u kojoj dolazi do poremećaja u dostavi inzulina ili općeg nedostatka inzulina u organizmu. Dobar model za proučavanje svih poremećaja u metaboličkoj regulaciji, oksidativnom stresu i mitohondrijskoj obrani su NOD (engl. *non-obese diabetic*) miševi koji spontano razvijaju dijabetes. Kod ovog soja miševa dokazane su razlike u osjetljivosti na razvijanje dijabetesa ovisno o spolu, što je ključno u razvoju terapije prilikom liječenja. U ovom radu je promatran utjecaj standardne prehrane (engl. *standard fat diet*, SFD) i prehrane s visokim udjelom masti (engl. *high-fat diet*, HFD) na metaboličke promjene uzrokovane prehranom na oksidacijsko oštećenje, antioksidacijsku obranu i ekspresiju ključnih proteina u metabolizmu lipida i mitohondrijske funkcije u uzorcima jetri ženki i mužjaka NOD miševa. Promatrana je karbonilacija proteina, razina lipidne peroksidacije, aktivnost superoksid-dismutaze i aktivnost katalaze. Western analizom određena je ekspresija antioksidativnih enzima i proteina uključenih u regulaciju metabolizma.

(72 stranice, 24 slike, 17 tablica, 46 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: antioksidativna obrana, dijabetes, NOD miševi, oksidativni stres, prehrana s visokim udjelom masti, standardna prehrana

Mentor: dr. sc. Robert Belužić, zn. sur.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Morana Dulić

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Morana Dulić

2. doc. dr. sc. Ivan Nemet

3. prof. dr. sc. Mirta Rubčić

Zamjena: prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

Datum diplomskog ispita: 26. srpnja 2024.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

SEX-RELATED DIFFERENCES IN OXIDATIVE AND ANTIOXIDATIVE STATUS OF NOD MICE FED WITH HIGH-FAT DIET

Marina Serenčes

Diabetes is a disease in which there is a disturbance in the delivery of insulin or a general lack of insulin in the body. A good model for studying all disorders in metabolic regulation, oxidative stress and mitochondrial defense are NOD mice (non-obese diabetic), which spontaneously develop diabetes. In this strain of mice, sex-sensitive differences in susceptibility to developing diabetes have been demonstrated, which is crucial for the development of appropriate therapy in treatment. In this paper, the influence of standard diet (SFD) and high-fat diet (HFD) on metabolic changes caused by diet on oxidative damage, antioxidant defense and expression of key proteins in lipid metabolism and mitochondrial function in liver samples of female and male NOD mice was observed.

Protein carbonylation, lipid peroxidation level, superoxide dismutase activity and catalase activity were observed. Western blot was used to determine the expression of antioxidant enzymes and proteins involved in the regulation of metabolism.

(72 pages, 24 figures, 17 tables, 46 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: antioxidative defense, diabetes, high-fat diet, NOD mice, oxidative stress, standard-fat diet

Mentor: Dr. Robert Belužić, Research Associate

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Morana Dulić, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Morana Dulić, Assistant Professor
 2. Dr. Ivan Nemet, Assistant Professor
 3. Dr. Mirta Rubčić, Professor
- Substitute: Dr. Ita Gruić Sovulj, Assistant Professor

Date of exam: 26th of July, 2024

Marina Serenčes

Diplomski rad

§ 1. UVOD

Dijabetes i povezani metabolički poremećaji predstavljaju značajan globalni zdravstveni problem, a time i izazov za znanstvenu zajednicu. Prehrana s visokim udjelom masti (engl. *high fat diet*, HFD) je dobar model za induciranje metaboličkog sindroma kod glodavaca, što je vrijedan alat za istraživanje patofizioloških mehanizama povezanih s ovim stanjima. Jedan od ključnih mehanizma kroz koji HFD ispoljava svoje štetne učinke je oksidativni stres, karakteriziran neravnotežom u proizvodnji reaktivnih kisikovih vrsta i antioksidativne obrane organizma.

Oksidativni stres se veže uz patogenezu niza metaboličkih bolesti. Vodi staničnom oštećenju kroz lipidnu peroksidaciju, karbonilaciju proteina i oksidaciju DNA te na taj način doprinosi progresiji inzulinske rezistencije, upalnog odgovora u organizmu i disfunkciji β -stanica u gušterači. Antioksidativni obrambeni sustav, koji se sastoji od enzima kao što su superoksid-dismutaza (SOD) i katalaza, ima ključnu ulogu u ublažavanju oksidativnog stresa. SOD katalizira pretvorbu superoksidnih radikala u vodikov peroksid kojeg potom katalaza prevodi u vodu i kisik te na taj način sprječava oksidativnu štetu.

Proučavanje markera oksidativne štete poput peroksidacije lipida i karbonilacije proteina uz praćenje aktivnosti antioksidativnih enzima pruža vrijedan uvid u oksidativni status organizma pri različitim tipovima prehrane. Nadalje, određivanje razine ekspresije relevantnih proteina dalje razjašnjava adaptivni odgovor organizma na produženu izloženost oksidativnom stresu.

NOD miševi su česte modelne životinje za istraživanje autoimunog dijabetesa, no pružaju i koristan uvid u prehranom uzrokovane metaboličke promjene. Uslijed hranjenja NOD miševa prehranom s povišenim udjelom masti u kraćem i dužem periodu, moguće je procijeniti dinamiku oksidativnog stresa i odgovarajućeg antioksidativnog odgovora,

Cilj ovog istraživanja je kombinacijom biokemijskih metoda izmjeriti aktivnost enzima i markera oksidativnog stresa te Western analizom odrediti razinu ekspresije proteina. Usporedbom oksidativnog i antioksidativnog profila između grupa NOD miševa hranjenih prehranom s povišenim udjelom masti u kraćem periodu (6 tjedana) i dužem periodu (6 mjeseci), želi se objasniti dinamika prehrane na oksidativni stres i antioksidativnu obranu.

Razumijevanje odnosa trajanja hranjenja prehranom s povišenim udjelom masti i odgovora na oksidativni stres je ključno za razvoj strategija za smanjenje nepovoljnih utjecaja prehrane na metaboličke poremećaje.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Dijabetes

Šećerna bolest ili dijabetes je bolest koja prati poremećaje metabolizma ugljikohidrata, proteina i masti uzrokovana manjkom ili apsolutnim nedostatkom inzulina. Tradicionalno, dijabetes se dijeli u dvije kategorije: šećerna bolest tipa 1 (engl. *diabetes mellitus type 1*, DMT1) i šećerna bolest tipa 2 (engl. *diabetes mellitus type 2*, DMT2).¹

Šećerna bolest tipa 1 ili šećerna bolest ovisna o inzulinu (engl. *insulin dependent diabetes mellitus*, IDDM) je autoimuna bolest koja se najčešće manifestira u ranoj dobi i djetinjstvu i od ovog tipa boluje od 5 do 10% dijabetičara. Na patogenezu DMT1 utječu genetska predispozicija i okolišni faktori, no nije potpuno razjašnjeno na koji način.^{2,3}

Šećerna bolest tipa 2 ili inzulin-neovisan dijabetes (engl. *non-insulin dependent diabetes mellitus*, NIDDM) karakterizira se kao višefaktorna i poligenetska bolest od koje boluje 90-95% svih dijabetičara. Etiologija DMT2 je kompleksna i rizik oboljenja raste s dobi, pretilošću, sjedilačkim načinom života i određenim etničkim pripadnostima. Karakteriziran je otpornošću organizma na inzulin i progresivnim manjkom lučenja inzulina.^{4,5}

Dijabetes predstavlja globalni zdravstveni problem, i po zadnjim podacima, preko 500 milijuna ljudi u dobi od 20 do 79 godina boluje od nekog tipa dijabetes. Sve je zastupljeniji među adolescentima, s preko 130 000 novootkrivenih slučajeva svake godine. Čak 1 od 11 osoba u Europi boluje od dijabetesa, a 36% čine nedijagnosticirani slučajevi.^{6,7} Iako je inzulin otkriven prije više od 100 godina, ne postoji terapija za zaustavljanje ili smanjenje progresije DMT1, zbog čega postoji velik interes i potreba za razvojem novih pristupa liječenju i terapija s ciljem prevencije i umanjenja potencijalnih komplikacija i povećanja kvalitete života oboljelih.⁸

2.1.1. Razvoj dijabetesa i razlike u razvoju bolesti

Razvoju dijabetesa doprinosi niz genetskih čimbenika u kombinaciji s okolišnim faktorima i načinom života. Razvoj bolesti je češće zapažen kod muških jedinki i ispoljava opasniji fenotip u odnosu na ženke, no postoji i značajan utjecaj hormona u trudnoći i menopauzi i koji

se povezuju uz češću pojavnost kod ženki u određenim dobnim skupinama. Prehrana bogata prerađenim šećerima, ugljikohidratima te procesiranom hranom uvelike povećava rizik od oboljenja, kao i socioekonomski status, fizička aktivnost, sjedilački način života, pušenje, alkohol i stres.^{9, 10, 11}

Problem u razvitku učinkovitih terapijskih strategija je činjenica da je većina dostupnih radova i objavljenih istraživanja provedena na pripadnicima muškog spola, dok je kod dijabetesa i mnogih drugih bolesti i poremećaja utjecaj spolnih hormona vrlo bitan faktor, kako za razvoj bolesti, tako i za kontrolu istih. Tako primjerice estrogen ima zaštitnu ulogu u razvoju DMT2 kod žena u reproduktivnoj dobi što povećava rizik oboljenja od DMT2 u menopauzi. Stoga Nacionalni institut za zdravlje (engl. *The National Institute of Health, NIH*) zahtjeva provođenje istraživanja na oba spola i stvaranje svijesti o spolno specifičnim faktorima rizika za prevenciju, razvoj novih kliničkih uputa i razvoj personaliziranih terapija.

¹²

2.2. Modeli za istraživanje DMT1

Razlike u spolu kod modelnih glodavaca slične su kao kod ljudi oboljelih od dijabetesa, zbog čega su upravo glodavci dobar odabir za istraživanje spola kao biološke varijable u ljudskom dijabetesu.¹³

Nedostatak inzulina i hiperglikemija se kod glodavaca mogu inducirati na razne načine: postoje glodavci koji spontano razvijaju dijabetes, glodavci kod kojih se dijabetes eksperimentalno inducira primjenom citotoksičnih kemikalija koje ciljaju beta-stanice gušterače ili se uvode specifične genske mutacije.¹⁴

Najčešće se kao modeli koriste NOD (engl. *non-obese diabetic*) miševi, IDDM (engl. *insulin dependant diabetes mellitus*) štakori, KDP (engl. *Komeda diabetes prone*) štakori te Akita miševi.¹⁵

2.2.1. NOD miševi

NOD miševi su najčešće korišten model za istraživanje dijabetesa tipa 1. Pripadnici ovog soja imaju genetsku predispoziciju za razvijanje autoimunog dijabetesa s karakteristikama sličnim ljudskom DMT1. Infiltracija imunoloških stanica u β -stanice gušterače počinje između petog i

šestog tjedna starosti kod ženki, a kod mužjaka malo kasnije. Nakon početnog stanja perinzulitisa, počinju se uočavati očiti simptomi dijabetesa poput pojačane konzumacije vode i povećan broj mokrenja uz gubitak tjelesne mase.¹⁶

Najvažniji genetski faktor za razvoj DMT1 kod NOD miševa je MHC II (engl. *major histocompatibility complex*): MHC je veliki lokus na DNA kralježnjaka s nizom polimorfnih gena koji kodiraju za proteine na površini stanice i ključni su za prezentaciju antigena efektorskim stanicama adaptivnog imunološkog sustava.⁹

2.3. Oksidativni stres i antioksidativna obrana

Oksidativni stres je stanje neravnoteže između proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i sposobnosti organizma da poništi njihovo štetno djelovanje u organizmu korištenjem antioksidansa, te je ključan faktor u razvoju niza metaboličkih bolesti i poremećaja. U ROS-ove se svrstavaju slobodni radikali poput superoksidnog aniona (O_2^-), hidroksilnog radikala ($\cdot OH$) i vrste poput vodikovog peroksida (H_2O_2). ROS-ovi mogu dolaziti iz endogenih izvora kao što su mitohondriji za vrijeme staničnog disanja, peroksisomi, enzimi obitelji citokroma P450 ili stanica imunološkog sustava, ili iz egzogenih izvora poput okolišnih zagađivača, zračenja, dima duhana, alkohola i određenih skupina lijekova.^{17,18} Obrana od oksidativne štete temelji se na djelovanju enzimatskih antioksidansa poput superoksid-dismutaze, katalaze, glutation peroksidaze i peroksiredoksina, ili na djelovanju neenzimatskih antioksidansa poput vitamina C i E, glutationa i flavonoida. Stanični efekti koji se mogu pratiti kao odgovor na stanični stres uključuju oštećenje DNA gdje ROS-ovi uzrokuju mutacije i lomove u lancima, oksidaciju proteina koja mijenja njihovu funkciju i dovodi do agregacije proteina i poremećaju u staničnom signaliziranju ili pak lipidnu peroksidaciju.^{19,20}

Lipidna peroksidacija odnosi se na oksidativnu razgradnju lipida, s naglaskom na višestruko nezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acids*, PUFAs), što vodi k oštećenju stanične membrane i poremećajima stanične funkcije. Temelji se na djelovanju ROS-ova na način da stvaraju lipidne radikale izvlačenjem atoma vodika iz masne kiseline, koji potom reagira s kisikom i stvara lipidni peroksidni radikal dalje sa sljedećom masnom kiselinom u lančanoj reakciji. Osim stvaranja lipidnih radikala, nastaju i sekundarni reaktivni

aldehidi poput malondialdehida (MDA) i 4-hidroksinonenala (4-HNE). Kronična hiperglikemija vodi porastu koncentracije ROS-ova u procesima koji uključuju kovalentno vezanje ugljikohidratnih podjedinica na proteine u procesu glikacije i poremećaje u funkcioniranju mitohondrija, a pojačana lipidna peroksidacija doprinosi disfunkciji β -stanica gušterače, inzulinskoj rezistenciji i vaskularnim komplikacijama.²¹

Oksidativni stres i lipidna peroksidacija su usko povezani uz razvoj metaboličkih poremećaja koji uključuju pretilost, dijabetes, nealkoholne masne jetre (engl. *non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) i kardiovaskularne bolesti. Procjena oksidativnog stresa i peroksidacije lipida ima središnju ulogu u kontroliranju metaboličkih bolesti, a terapijske strategije podrazumijevaju promjene u načinu života koje uključuju prehranu bogatu antioksidansima i redovitu fizičku aktivnost te farmakološke faktore poput N-acetilcisteina (NAC) i koenzima Q10.^{22, 23}

2.3.1. Karbonilacija proteina

Karbonilacija proteina smatra se bitnim markerom oksidativnog oštećenja proteina. Očituje se kao post-translacijska modifikacija proteina uzrokovana oksidativnim stresom. Proces karbonilacije uključuje uvođenje karbonilnih grupa na bočne ogranke aminokiselinskih ostataka u proteinu preko oksidativnih mehanizama.²⁴

Oksidativni stres vodi povećanju karboniliranih derivata proteina preko niza mehanizama koji uključuju fragmentaciju i oksidaciju zbog metalom-katalizirane oksidacije, napada hidroksilnih radikala, reaktivnih međuprodukata lipidne peroksidacije poput MDA i 4-HNE ili pak zbog oksidativne deaminacije aminokiselinskih ostataka lizina i arginina.²⁵

Karbonilacija utječe na funkciju proteina, stanično signaliziranje i općenitu staničnu homeostazu. Dolazi do inaktivacije enzima zbog promjena u aktivnom mjestu što rezultira smanjenjem katalitičke aktivnosti, povećava se i sklonost proteina agregaciji što može rezultirati razvojem neurodegenerativnih bolesti.²⁶

Postoji niz metoda koje se koriste za detekciju i kvantifikaciju stupnja karbonilacije proteina, a najčešće korištene su spektrometrija masa, ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*), western analiza i spektrofotometrijske analize.

ELISA je osjetljiva i vrlo specifična metoda za kvantifikaciju karbonilacije proteina. Temelji se na derivatizaciji karbonilnih grupa na proteinu uz pomoć otopine 2,4-

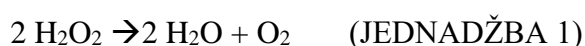
dinitrofenilhidrazina (DNPH), što rezultira stvaranjem stabilnih hidrazona koji se detektiraju korištenjem specifičnih antitijela.²⁷

Karbonilacija se povezuje uz razvoj neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti, kardiovaskularnih poremećaja i dijabetesa, te uz razvoj raka: oksidativni stres u tumoru vodi karbonilaciji proteina koja utječe na rast tumora, metastaza te odgovora na terapiju.²⁸

2.3.2. Antioksidativni enzimi: katalaza i superoksid–dismutaza

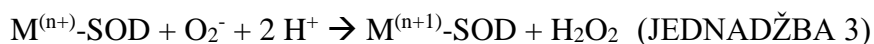
Katalaza je ključan antioksidativni enzim u zaštiti stanica od oksidativne štete. Primarna uloga katalaze je smanjenje oksidativnog stresa uzrokovanog vodikovim peroksidom kao produkt djelovanja ROS-ova u nizu metaboličkih procesa primarno u peroksisomima i mitohondrijima. To je tetramerni enzim koji u svojoj strukturi ima hem, prostetičku skupinu esencijalnu za katalitičku aktivnost. Željezni centar hema prolazi kroz cikličku redoks reakciju između Fe^{3+} i Fe^{2+} stanja. Osim što sudjeluje u detoksikaciji od vodikovog peroksida, doprinosi i staničnom signaliziranju, redoks homeostazi i metaboličkoj regulaciji.^{29,30}

Katalitički proces se odvija u dva koraka: redukcija H_2O_2 u vodu i kisik preko hem skupine (jednadžba 1), te redukcija hema koji je oksidiran u prvom koraku.³¹



Superoksid–dismutaze (engl. *superoxide dismutase*, SOD) smatraju se prvom crtom obrane od ROS-ova. Imaju ulogu katalize disproporcioniranja superoksidnog aniona $\text{O}_2^{\cdot-}$ na molekularni kisik O_2 i vodikov peroksid H_2O_2 . Postoje tri vrste SOD-ova ovisno o metalnom kofaktoru u strukturi i lokalizaciji u stanici. Citosolni oblik SOD-a (CuZnSOD ili SOD1) ima dinuklearni metalni centar koji se sastoji od bakra i cinka, dok se u matriksu mitohondrija nalazi MnSOD (ili SOD2) koji u svojoj strukturi umjesto iona bakra i cinka ima ion mangana. Treći tip je vanstanični SOD (EC-SOD ili SOD3) koji također u svojoj strukturi ima metalne ione bakra i cinka. Razlika u aktivnost CuZnSOD i MnSOD se može odrediti pomoću cijanida koji inhibira CuZnSOD, a pritom nema nikakvog utjecaja na MnSOD.³²

Mehanizam disproporcioniranja superoksidnog aniona u vodikov peroksid uključuje redukciju (jednadžba 2) i ponovnu oksidaciju (jednadžba 3) redoks aktivnog metalnog centra u aktivnom mjestu enzima.³³



Iako se svi oblici izozima SOD-ova razlikuju u proteinskoj strukturi, genskom lokusu, metalnom kofaktoru i prostornom razmještanju u stanici, pokazuju istu katalitičku ulogu u obrani od ROS-ova.³⁴

Superoksidni anioni ne mogu lako preći mitohondrijske membrane, a zbog svoje štetnosti se ne smije dugo zadržati na mjestu generiranja i mora ga disproporcionirati SOD koji se nalazi blizu mjesta generiranja.³⁵

Postoje različite tehnike mjerenja aktivnosti SOD-a temeljene na povezivanju generiranja superoksidnog radikala enzimatski ili fotokemijski s raspadom ovog radikala čija oksidacija je spriječena SOD-om. Jedna od metoda koristi ksantin i ksantin–oksidazu (engl. *xanthine oxidase*, XOD) za generiranje superoksidnih radikala koji potom reagiraju s 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolij-kloridom (I.N.T.) i daju crvenu formazansku boju. Aktivnost SOD-a se mjeri postotkom inhibicije ove reakcije: jedna jedinica SOD-a odgovara 50% inhibicije redukcije I.N.T.-a pod uvjetima eksperimenta.^{36,37}

Aktivnost katalaze i SOD-a je regulirana na više načina koji uključuju regulaciju genske ekspresije, post-translacijske modifikacije poput fosforilacije, acetilacije i ubikvitilacije te interakciju s drugim staničnim proteinima.

2.4. Prehrana bogata mastima

Prehrana bogata mastima, HFD, se često koristi u istraživanjima koja se provode na glodavcima, a koja imaju cilj proučavati niz bolesti i metaboličkih simptoma koji uključuju i dijabetes tipa 1 i tipa 2. Predstavljaju vrijedan alat u razumijevanju patogeneze ovih stanja, što podrazumijeva i razvoj novih terapijskih strategija.^{38,39}

Sastav prehrane bogate mastima varira, osim u udjelu masti, i u udjelu ugljikohidrata i proteina. U odnosu na standardnu prehranu koja sadrži od 10 do 15% masti, HFD se sastoji od čak 40 do 60% masti iz raznih izvora poput kokosovog, suncokretovog i kukuruznog ulja i sala iz raznih životinjskih prerađevina. Sadržaj ugljikohidrata se obično smanjuje radi postizanja izokalorijskih uvjeta u usporedbi sa standardnom prehranom, dok se udio proteina, iako može varirati, nastoji održati podjednakim kako bi se izbjegla pothranjenost proteinima. 38,40

Glodavci na HFD vrlo brzo dobivaju na težini akumulacijom adipoznog tkiva primarno u visceralnom masnom tkivu. Ovo je posljedica hiperplazije (povećanog broja) i hipertrofije (povećane veličine) adipocita.

Kao posljedica ovakve prehrane, dolazi do hiperglikemije, hiperinzulinemije i poremećene tolerancije na glukozu, što uvelike podsjeća na simptome dijabetesa kod ljudi. Osim klasičnih simptoma, uočava se i povišeni sadržaj triglicerida i kolesterola koji vode razvoju ateroskleroze u povezanih kardiovaskularnih stanja, te upalnih procesa od kojih su najizraženiji oni u adipoznom tkivu, jetri i mišićima. 40

Uobičajeni protokoli predlažu početak uvođenja ovakve prehrane već od trećeg tjedna starosti, iako nisu rijetki ni slučajevi gdje se glodavci prvo hrane standardnom prehranom u određenom trajanju, nakon čega ih se stavlja na HFD. Trajanje ovakvog hranjenja također varira, od 6 tjedana do preko nekoliko mjeseci. U eksperimentima je nužno imati i kontrolu, koja je hranjena sličnim udjelom proteina i makronutrijenata ali s nižim udjelom masti u odnosu na HFD.

Prilikom ovakvog tretmana redovito se prate tjelesna težina i količina konzumirane hrane. Metaboličke funkcije se prate provođenjem testa tolerancije na glukozu (engl. *glucose tolerance tests*, GTT), i testom tolerancije na inzulin (engl. *insulin tolerance tests*, ITT). Osim toga, prate se koncentracija glukoze, inzulina, lipida i markera upale. Adipozno tkivo, jetra, bubrezi, mišići i mozak su samo neki od organa koji se skupljaju, pohranjuju i koriste za histološka i molekularna testiranja. 41

Glodavci na HFD pokazuju velike sličnosti s ljudskim metaboličkim bolestima i poremećajima, što pruža relevantan uvid u navedena stanja. Pružaju kontrolirane eksperimentalne uvjete i omogućavaju genetsku manipulaciju za proučavanje interakcija između gena i prehrane, no treba voditi računa o mogućim ograničenjima. Razlike u fiziologiji glodavaca i ljudi mogu ograničiti tumačenje rezultata, varijabilnost u sadržaju

hrane može otežati reproducibilnost protokola, a treba voditi računa i o etičnosti induciranja bolesti i poremećaja kod životinja.⁴²

2.5. Utjecaj prehrane na oksidativni stres

Kako se oksidativni stres povezuje sa starenjem i nizom bolesti, postoji velik interes za otkrivanjem glavnih uzročnika i utjecaja istih. Nedvojbeno je da postoji utjecaj prehrane u zaštiti protiv oksidativne štete i povezanih stanja. Uvriježeno mišljenje je da standardna prehrana s ograničenim sadržajem količine masti, ugljikohidrata i proteina smanjuje oksidativni stres, a rezultati istraživanja ukazuju na postojanje tri mehanizma koji sudjeluju u antioksidativnoj obrani. Prehrana značajno utječe na količinu nastalih ROS-ova primarno zbog pojačane oksidacije masnih kiselina i mitohondrijske disfunkcije, povećanu aktivnost antioksidativnih enzima i obrtaja oksidiranih makromolekula, a najčešće je riječ o međusobno povezanim putevima.⁴³

U slučaju prehrane s povišenim udjelom masti, organizam više ne može učinkovito metabolizirati reaktivne međuprodukte i popravljati nastalu štetu. Zbog toga dolazi do oštećenja lipida, proteina i DNA što doprinosi razvoju metaboličkog sindroma. HFD povećava unos slobodnih masnih kiselina u mitohondrije, što rezultira nepotpunom oksidacijom masnih kiselina i produkcijom ROS-ova. Pretjerana količina generiranih elektrona u lancu prijenosa elektrona uzrokuje curenje istih elektrona koji u reakciji s kisikom tvore superoksidne radikale.⁴⁴ Također, HFD može aktivirati NADPH–oksidazu, enzimski kompleks koji sudjeluje u proizvodnji superoksidnih radikala preko citokina čija koncentracija je povišena za vrijeme trajanja ovakve prehrane.⁴⁵ Posljedica HFD je i porast razina pro-upalnih citokina poput TNF- α , IL-6 i MCP-1 koji stimuliraju proizvodnju ROS-ova i aktiviraju puteve koji povećavaju oksidativni stres i doprinose stanju kronične upale u organizmu.⁴⁶

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Pokusne životinje

U okviru istraživanja korišteni su uzorci jetre ženki i mužjaka miševa soja NOD (engl. *non-obese diabetic*). Ovaj soj miševa spontano razvija dijabetes tipa 1 (diabetes mellitus tip 1) te se koristi kao glavni model za proučavanje autoimunog dijabetesa. Životinje su uzgojene u Pogonu laboratorijskih životinja, Instituta Ruđer Bošković, pri 22 °C s 50-70%-tnom vlažnosti zraka. Po tri jedinice držane su u jednom kavezu s pravilnom izmjenom svjetlosti i mraka u trajanju od dvanaest sati. Mužjaci i ženke miševa uzeti su u pokus u dobi od mjesec dana te su hranjeni prehranom s visokim udjelom masti (masti 58%, proteina 18%, ugljikohidrata 24%, Mucedola) kroz 6 tjedana (jedna pokusna skupina), odnosno 6 mjeseci (druga pokusna skupina). Kao kontrole uzeti su mužjaci i ženke hranjene kroz isti period standardnom prehranom (11,4% masti, 62,8% ugljikohidrata i 25,8% proteina, Mucedola).

Životinje su raspoređene u 8 skupina, a svaka skupina se sastojala od 3 životinje istog spola (Tablica 1). Po završetku pokusa životinje su anestetizirane intraperitonealnom injekcijom ketamina i ksilazina (Ketamidol 10%, Richter pharma Ag; Xylazine 2%, Alfasan International). Izolirani uzorci jetri NOD miševa pohranjeni su u tekućem dušiku do daljnjih analiza. Projekt je financirala Hrvatska zaklada za znanost, a sve navedene procedure odobrilo je Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske. Procedure su provedene u skladu s direktivom 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća.

Tablica 1. Skupine NOD miševa čiji uzorci jetri su korištenih u eksperimentima

Spol	♂	♂	♀	♀	♂	♂	♀	♀
Prehrana	SFD	HFD	SFD	HFD	SFD	HFD	SFD	HFD
Period hranjenja	6 mjeseci	6 mjeseci	6 mjeseci	6 mjeseci	6 tjedana	6 tjedana	6 tjedana	6 tjedana

Prehrana sa standardnim udjelom masti (engl. *standard fat diet*, SFD), prehrana s povišenim udjelom masti (engl. *high fat diet*, HFD)

3.2. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima u jetri NOD miševa

S ciljem određivanja ukupne koncentracije proteina i određivanja aktivnosti antioksidativnih enzima, izvagane su jednake količine uzoraka jetre (45-50 mg) miševa hranjenih s visokim udjelom masti u kratkom periodu (6 tjedana) i duljem periodu (6 mjeseci). Uzorci su prebačeni u staklenu epruvetu za homogeniziranje s fosfatnim puferom 1 x PBS (137 mM NaCl, 1,76 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 2,68 mM KCl; PBS (engl. *phosphate buffer saline*)) i inhibitorima proteaza (cOmplete™ EDTA-free EASYpack, Roche, Švicarska) kako bi se napravio 5% homogenat. Uzorci su homogenizirani 10 puta na najvećoj brzini korištenjem homogenizatora na 1600 rpm (Potter S Homogenizer, B.Braun Biotech International), nakon čega je homogenat centrifugiran na 2000 g tijekom 5 minuta na 4°C. Supernatant je prebačen u novu epruvetu i sonificiran 2 puta po 30 sekundi, nakon čega je centrifugiran na 16 000 g u trajanju 14 minuta na 4°C. Supernatant je ponovno prebačen u čistu epruvetu i korišten za daljnje analize.

3.2.1. Određivanje ukupne koncentracije proteina BCA metodom

Za određivanje ukupne koncentracije proteina u svakom uzorku jetre korištena je BCA metoda (engl. *bicinchoninic acid*) s ciljem normaliziranja uzoraka u svim sljedećim pokusima. Uzorci proteina razrijeđeni su u 1 x PBS-u. Za standarde je korištena otopina albumina iz govedeg seruma u koncentracijama od 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL i 0,06 mg/mL. Uzorci su razrijeđeni 50 puta. Na mikrotitarsku pločicu s 96 jažica nanese po 20 µL razrijeđenog uzorka, standarda i slijepe probe (1 x PBS). Potom je u svaku jažicu dodano 200 µL BCA reagensa (A:B u omjeru 50:1; Pierce™ BCA Protein Assay Kit, ThermoFischer Scientific SAD). Uslijedila je inkubacija uzoraka na 37°C u trajanju 30 minuta, nakon čega je mjerena apsorbancija pri $\lambda=570$ nm (ELISA čitač, LabSystem Multiskan MS, Artisan Technology Group, SAD). Uz podatke o apsorbanciji standarda konstruirana je standardna krivulja s pripadnom jednačbom pravca, iz koje je potom izračunata koncentracija proteina za svaki pojedini uzorak.

3.2.2. Određivanje aktivnosti superoksid–dismutaze

S ciljem određivanja aktivnosti SOD-s u uzorcima jetre, korišten je 5% homogenat jetre pripremljen u 1 x PBS-u s inhibitorima proteaza (cOmplete™ EDTA-free EASYpack, Roche, Švicarska). Za određivanje ukupnog SOD-a pripremljeni su uzorci proteina koncentracije 0,05 µg/µL.

Za određivanje SOD-a korišten je RANSOD komplet (Randox Laboratories) u kojem se za generiranje superoksidnih radikala koriste ksantin i ksantin–oksidaza. Superoksidni radikali nastali ovom reakcijom reduciraju 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofeil)5-feniltetrazolijev klorid (I.N.T.) i kao produkt nastaje ljubičasti formazan. Njega je moguće detektirati mjerenjem apsorbancije pri $\lambda=505$ nm, no obzirom da SOD uklanja superoksidne radikale, sprječava razvoj ljubičaste boje.

Na pločicu s 96 jažica nanese se 5 µL standarda u duplikatima i 5 µL uzoraka u triplikatima. Potom je u jažice dodano 170 µL supstrata R1 (0,05 mM ksantin, 0,025 mM I.N.T., 0,94 mM EDTA, 40 mM CAPS, pH 10,2) i pločica je miješana 1 minutu, nakon čega je dodano 25 µL otopine R2 ksantin–oksidaze i očitana je apsorbancija na $\lambda=505$ nm nakon 30 sekundi. Apsorbancija je mjerena i nakon 3 minute kako bi se dobili podaci za ukupan sadržaj SOD-a i baždarni pravac. U novi set uzoraka je potom dodan KCN kako bi se inhibirala aktivnost CuZnSOD te kako bi se mogla odrediti samo aktivnost MnSOD. Nakon 30 min inkubacije s KCN-om 5 µL uzorka je dodano na pločicu u triplikatima, dodano je 170 µL supstrata R1 i 25 µL ksantin–oksidaze te je očitana apsorbancija pri $\lambda=505$ nm nakon 30 sekundi i nakon 3 minute za određivanje MnSOD. Oduzimanjem vrijednosti MnSOD od ukupno izmjenjenog SOD-a dobivena je aktivnost CuZnSOD.

3.2.3. Određivanje aktivnosti katalaze

Za određivanje aktivnosti katalaze korišten je 5% homogenat uzoraka jetri u 1 x PBS-u s inhibitorima proteaza (cOmplete™ EDTA-free EASYpack, Roche, Švicarska). Potom su uzorci razrijeđeni 500 puta u 50 mM PBS-u (43 mM Na₂HPO₄, 50 mM KH₂PO₄, pH = 7) te je dodano po 500 µL u dvije kvarcne kivete. U prvu kvarcnu kivetu je dodano 250 µL 50 mM PBS-a koji je poslužio kao slijepa proba. U drugu kvarcnu kivetu je dodano 250 µL otopine vodikovog peroksida ($c(\text{H}_2\text{O}_2)= 30$ mM, konačna koncentracija H₂O₂ u reakciji je 10 mM)

nakon čega je odmah zabilježena vrijednost apsorbancije pri $\lambda=240$ nm. Apsorbancija je zabilježena i nakon 30 sekundi pri istoj valnoj duljini.

Za konstruiranje baždarnog pravca izmjerene su apsorbancije uzoraka vodikova peroksida (52mM, 47 mM, 35 mM, 28 mM, 21 mM, 14 mM, 7 mM, 3,5 mM). Uz podatke o apsorbanciji vodikova peroksida konstruirana je standardna krivulja s pripadnom jednadžbom pravca, iz koje je potom izračunata aktivnost katalaze za svaki pojedini uzorak. Tako izražena aktivnost katalaze u U/mg proteina odgovara μmol razgrađenog H_2O_2 po minuti po mg proteina.

3.3. Određivanje stupnja lipidne peroksidacije

Lipidna peroksidacija je proces u kojem slobodni radikali, poput reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta, napadaju dvostruke C-C veze u lipidima, što rezultira odcjepljenjem atoma vodika s atoma ugljika i ugradnjom molekule kisika.

Analiza reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (engl. *thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS) je široko korištena metoda za procjenu lipidne peroksidacije kao indikatora oksidativnog stresa. U analizi se mjeri količina sekundarnih produkata lipidne peroksidacije koji podrazumijevaju MDA i ostale tiobarbiturne reaktivne vrste (engl. *thiobarbituric acid*, TBA) u reakciji koja rezultira nastankom MDA-TBA₂ adukata u kiselim i visokotemperaturnim uvjetima. Nastali adukti su ružičaste boje i apsorbiraju svjetlost pri $\lambda=532$ nm, a intenzitet obojenja je proporcionalan koncentraciji MDA i drugih TBA-supstanci u uzorku.

3.3.1. Priprema uzoraka i standarda za određivanje stupnja lipidne peroksidacije

Za određivanje lipidne peroksidacije metodom TBARS korišten je 5% homogenat jetre u 1 x PBS-u s inhibitorima proteaza. Potom je pripremljen i niz otopina 1,1,3,3-tetrametoksipropanona (od 100 mM otopine TMP-a u 96% etanolu) u destiliranoj vodi u rasponu od 0,06 μM do 10 μM koje su korištene kao MDA standard.

3.3.2. Detekcija TBARS

U smjesu 200 μL uzorka i 200 μL standarda dodano je 200 μL 2% natrijevog dodecil sulfata (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS). Sadržaj epruvete je kratko vorteksiran i inkubiran na sobnoj temperaturi u trajanju 5 minuta. Na uzorke i standarde je potom dodano 500 μL TBA reagensa (TBA u octenoj kiselini 1 : 1 u destiliranoj vodi, pH = 3,5). Uzorci su potom još jednom vorteksirani i inkubirani 1 sat na 95°C, nakon čega su ohlađeni na sobnu temperaturu. Uslijedilo je centrifugiranje na sobnoj temperaturi na 4000 g. Supernatant je prebačen u duplikatima od 200 μL na pločicu s 96 jažica. Fluorescencija je očitana pri $\lambda=532/553$ nm na čitaču pločica (Tecan Infinite M Nano⁺, Tecan). Iz vrijednosti fluorescencije MDA standarda konstruirana je standardna krivulja iz čije jednadžbe pravca izračunata koncentracija MDA-TBA adukta u uzorcima. Za normaliziranje detektiranih oštećenja koristi se koncentracija proteina u pojedinim uzorcima dobivena BCA metodom.

3.4. Određivanje stupnja karbonilacije proteina

Određivanje stupnja karbonilacije određeno je pomoću ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) metode koja se temelji na reakciji karbonilnih skupina na proteinima iz uzorka i otopine 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). DNPH reagira s karbonilnim skupinama koje nastaju kao posljedica oksidativnog oštećenja na proteinima, odnosno aminokiselinskim ostacima lizina, treonina, prolina i arginina, a kao rezultat daju stabilne derivate dinitrofenilhidrazona (DNP). DNP spojevi određuju se pomoću specifičnog anti-DNP protutijela čime se oksidativno oštećenje proteina može kvantificirati dodavanjem otopine TMB i STOP otopine koje daju žuto obojenje koje se mjeri pri $\lambda=450$ nm.

3.4.1. Priprema uzoraka za određivanje stupnja karbonilacije

Nakon određivanja koncentracije proteina u pojedinim uzorcima jetre BCA metodom, uzorci su razrijeđeni do masene koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$. Potom je na pločicu za ELISA-u (Maxisorp 96 wells, Sigma-Aldrich) nanoseno po 100 μL uzorka u triplikatu u svaku jažicu odnosno 1 μg proteina. Pločica je inkubirana preko noći na 4°C kako bi se proteini zalijepili na pločicu.

3.4.2. Detekcija karboniliranih ostataka ELISA metodom

Nakon prekonodne inkubacije, jažice su dva puta isprane s 200 μL pufera za ispiranje I, nakon čega je dodano 200 μL derivatizacijske otopine DNPH. Pločica s uzorcima je inkubirana u mraku na sobnoj temperaturi u trajanju 45 minuta. Nakon inkubacije s DNPH otopinom, jažice su isprane tri puta s po 200 μL pufera za ispiranje II i tri puta s po 200 μL pufera za ispiranje I. Potom je u jažice dodano po 250 μL pufera za blokiranje, nakon čega je uslijedila inkubacija na sobnoj temperaturi uz treskanje (300 rpm) u trajanju 1 sata. Jažice su potom inkubirane sa 100 μL primarnog protutijela na sobnoj temperaturi uz treskanje (300 rpm) u trajanju 2 sata. Nakon inkubiranja primarnim protutijelom, jažice su isprane četiri puta s 200 μL pufera za ispiranje III te je dodano po 100 μL sekundarnog antitijela koje je inkubirano na sobnoj temperaturi uz treskanje (300 rpm) u trajanju 1 sata. Nakon toga, svaka jažica je isprana tri puta s 200 μL pufera za ispiranje III i jedan put s 200 μL pufera za ispiranje I. Do pojave plavog obojenja u jažicama došlo je dodatkom 100 μL otopine supstrata peroksidaze (TMB otopina), a daljnji razvitak boje i reakcije prekinut je dodatkom 100 μL STOP otopine. Nakon promjene boje u žutu, izmjerena je apsorbancija pri $\lambda=450$ nm (Multiskan EX, ThermoLabsystems).

Tablica 2. Sastav otopina korištenih u određivanju stupnja karbonilacije proteina

Otopina	Sastav otopine	Proizvođač
Pufer za ispiranje I	1 x PBS (137 mM NaCl, 1,76 mM KH ₂ PO ₄ , 10mM Na ₂ HPO ₄ , 2,68 mM KCl)	/
Pufer za ispiranje II	1 x PBS : 96% etanol (50 : 50)	Kemika
Pufer za ispiranje III	1 x PBS + 0,1% Tween 20	Sigma- Aldrich
DNPH otopina	DNPH + 3-fluorocetna kiselina ($\gamma = 20$ mg/mL)	Sigma- Aldrich
Derivacijska otopina DNP	DNPH otopina u 1 x PBS ($\gamma = 0,5$ mg/mL, pH = 6,0-6,5)	
Pufer za blokiranje	I-Block™ Protein-Based Blocking Reagent	Invitrogen
STOP otopina	0,3 M H ₂ SO ₄	Sigma- Aldrich
Supstrat peroksidaze (TMB otopina)	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin	ThermoFisher Scientific
Primarno protutijelo na DNP	Rabbit anti-DNP primary antibody (D9656) : pufer za blokiranje (1 : 8000)	Sigma- Aldrich
Sekundarno protutijelo s konjugiranom peroksidazom	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP Conjugate (1706515): Pufer za blokiranje (1 : 4000)	Bio-Rad

3.5. Određivanje ekspresije proteina Western analizom

Western blot metoda, zvana i *immunoblotting*, je vrlo popularna tehnika za analizu ekspresije proteina, post-translacijskih modifikacija i interakcija među proteinima. Korištenjem specifičnih antitijela, Western analiza omogućava detektiranje ciljnih proteina

visokom specifičnošću i osjetljivošću. Metoda se sastoji od nekoliko ključnih koraka: priprave uzoraka, gel elektroforeze, transfera proteina, blokiranja membrane, inkubacije antitijela i detekcije.

Priprava uzoraka podrazumijeva homogenizaciju tkiva ili lizu stanica u pogodnom puferu koji sadrži inhibitore proteaza i fosfataza radi sprječavanja raspadanja proteina. Slijedi kvantifikacija proteina nekom od metoda (BCA analizom ili Bradfordovom metodom) kako bi se osiguralo da se na gelove nanosi jednaka količina uzoraka.

Slijedi gel elektroforeza u kojoj se proteini razdvajaju na temelju molekulske mase korištenjem natrijevog dodecil sulfata (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) na poliakrilamidnom gelu. Odabir koncentracije gela ovisi o molekulskoj masi ciljnih proteina.

Proteini se transferiraju na poliviniliden fluorid (PVDF) ili nitroceluloznu membranu na kojoj se blokiraju sva mjesta bez vezanih proteina, nakon čega slijedi inkubacija primarnim pa sekundarnim antitijelima i detekcija ciljanih proteina najčešće kemiluminescencijskim tehnikama.

Osim što osigurava visoku specifičnost i osjetljivost zbog korištenja antitijela, mogućnost kvantifikacije ekspresije proteina i primjenu na velikom broju proteina, postoje i neka ograničenja. Tako primjerice kvaliteta i dostupnost antitijela ograničavaju detekciju određenih proteina. Iako je ovo semi-kvantitativna metoda, postizanje točnih i istinitih rezultata zahtijeva preciznu kontrolu i normalizaciju, a varijabilnost u pripremi uzoraka, gel elektroforezi i efikasnosti transfera može utjecati na reproducibilnost.

3.5.1. Izolacija proteina

Pripremljen je 5% homogenat jetri miševa u RIPA puferu (50 mM Tris pufer, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 12 mM Na-deoksikolat, 1% Triton) s inhibitorima proteaza (cOmplete™ EDTA-free EASYpack, Roche, Švicarska). Uzorak jetre (~50 mg) je dodan u 1 mL Ripa pufera i homogeniziran 10 puta na brzini 1600 rpm, nakon čega su uzorci centrifugirani na 2000 g u trajanju 5 minuta na 4°C. Supernatant je prebačen u čistu Eppendorf tubicu od 1,5 mL i sonificiran 2 puta po 30 sekundi, nakon čega je centrifugiran na 16 000 g u trajanju 15 minuta na 4°C.

3.5.2. Denaturirajuća elektroforeza

Proteini su razdvojeni na temelju mase korištenjem denaturirajuće elektroforeze na poliakrilamidnom gelu SDS-PAGE. Poliakrilamidni gelovi debljine 1,5 mm pripremljeni su u aparaturi za izlivanje gelova (Mini-PROTEAN Tetra, BIO-RAD, SAD) izlivanjem dvaju 10%-tnih donjih gelova za razdvajanje (tablica 3), jednog 12,5%-tnog gela (tablica 4) i 4%-tnih gornjih gelova za sabijanje (tablica 5). Po izlivanju donjeg gela za razdvajanje u aparaturu, gel je nadslojen 2-izopropanolom (Sigma-Aldrich) kako bi se spriječila inhibicija polimerizacije na zraku i polimerizacija je provedena u trajanju 30 minuta. Potom je izliven 2-izopropanol, a na donji gel je izliven gornji gel za sabijanje u koji je umetnut češljic za formiranje jažica te je polimerizacija provedena u trajanju 30 minuta.

Tablica 3. Sastav 10%-tnog poliakrilamidnog gela za razdvajanje u debljini 1,5 mm za vertikalnu elektroforezu

SASTOJAK	V/mL
4x Tris-HCl	3,75
H ₂ O	6,25
akrilamid (Sigma Aldrich, SAD)	5
APS (Sigma Aldrich, SAD)	0,15
TEMED (Sigma Aldrich, SAD)	0,015

Tablica 4. Sastav 12,5%-tnog poliakrilamidnog gela za razdvajanje u debljini 1,5 mm za vertikalnu elektroforezu

SASTOJAK	V/mL
4x Tris-HCl	1,875
H ₂ O	2,5
akrilamid (Sigma Aldrich, SAD)	3,125
APS (Sigma Aldrich, SAD)	0,075
TEMED (Sigma Aldrich, SAD)	0,0075

Tablica 5. Sastav 4%-tnog poliakrilamidnog gela za sabijanje u debljini 1,5 mm za vertikalnu elektroforezu

SASTOJAK	V/mL
4x Tris-HCl	1,25
H ₂ O	3
akrilamid (Sigma Aldrich, SAD)	0,67
APS (Sigma Aldrich, SAD)	0,50
TEMED (Sigma Aldrich, SAD)	0,005

Po završetku polimerizacije, iz gela je izvučen češljic i gel je umetnut u aparaturu za vertikalnu elektroforezu (Mini-PROTEAN Tetra, BIO-RAD, SAD) uz pufer za elektroforezu (10 x pufer za elektroforezu: 30 g/L Tris-HCl, 144 g/L glicin, 10 g/L SDS, pH=8,5). Prije nanošenja na gel, proteini su razrijeđeni na koncentraciju 15 µg/µL u PBS-u. U 16 µL uzorka proteina dodano je 4 µL boje za nanošenje (5 x koncentrat boje: 312,5 mM, 4x Tris HCl, 12%SDS, 30% glicerol, 0,2% bromfenol plava, 1,716 M merkaptotanol). Uzorci su denaturirani na 95°C u trajanju 10 minuta, kratko centrifugirani i nanoseni na gel u volumenu od 15 µL. U prvu jažicu je nanoseno 3 µL proteinskog markera Precision Plus Protein™ Standard Dual Color (BIO-RAD, SAD).

Prvih 30 minuta elektroforeza se provodi pri stalnom naponu od 80 V uz struju od 0,03 do 0,06 A i u tom periodu proteini dolaze do gela za razdvajanje. Nakon što je fronta proteina dosegla gel za razdvajanje, napon se pojača na 120 V do dolaska fronte do dna gela za razdvajanje (otprilike 1,5 sat).

3.5.3. Transfer proteina

S gela je po završetku denaturirajuće SDS-PAGE elektroforeze uklonjen gel za sabijanje, nakon čega je uronjen u pufer za transfer (0,025 M Tris-HCl, 0,192 M glicin, 20% metanol, pH=8,5). PVDF membrane (Immun-Blot PVDF Membrane for Protein Blotting, BIO-RAD, SAD) aktivirane su kratkom inkubacijom u metanolu te potom prebačene u pufer za transfer. U kazetu za prijenos proteina su složeni sljedećim redoslijedom spužva, filter papir,

membrana, gel, filter papir i spužva, a između pojedinih koraka je valjkom istisnut zrak između pojedinih komponenti. Prijenos je podešen na 100 mA u trajanju 18 sati na 4°C.

3.5.4. Vizualizacija proteina i detekcija proteina od interesa

Nakon transfera, membrane su isprane u 1 x PBS-u na tresilici u trajanju 10 minuta, a potom inkubirane 30 sekundi u otopini za bojenje (0,1% Amido black 10B, 20% metanol, 2% octena kiselina, dH₂O). Nakon bojenja, membrane su uronjene u otopinu za odbojavanje (45% metanol, 7% octena kiselina, dH₂O) u dva navrata u trajanju 30 minuta. Na taj način su vizualizirani svi proteini na membrani koja je potom fotografirana (Alliance Q9 mini Imaging System, UVITEC).

Membrane su zatim isprane u redestiliranoj vodi 4 puta u trajanju 2 minute i inkubirane u otopini za blokiranje (I-BlockTM Protein-Based Blocking Reagent, Invitrogen) pri sobnoj temperaturi na tresilici u trajanju 1 sata. Na membrane je potom dodano primarno antitijelo koje je inkubirano na tresilici preko noći na 4 °C (tablica 6).

Nakon inkubacije primarnim antitijelom, membrane su isprane tri puta u TNT puferu (TN pufer, 0,1% Triton-X) u trajanju 10 minuta i inkubirane sa sekundarnim protutijelom (tablica 7) na sobnoj temperaturi na tresilici u trajanju 1 sata. Membrane su po završetku inkubacije sa sekundarnim antitijelom isprane TNT puferom tri puta u trajanju 10 minuta.

Mjesta vezanja sekundarnog antitijela vizualizirana su uz pomoć kemiluminescentnog supstrata ECL (PerkinElmer, SAD, Pierce, SAD). Otopina je pripremljena miješanjem otopine A i otopine B u omjeru 1 : 1 nakon čega je na svaku membranu nanesen odgovarajući volumen otopine za razvijanje (200-500 µL) koja je inkubirana u trajanju 1 minute ručnim miješanjem. Detekcija kemiluminescentnog signala provedena je na uređaju za vizualizaciju Alliance Q9 mini Imaging System, UVITEC.

Tablica 6. Primarna antitijela korištena u detekciji ekspresije proteina Western analizom

Protutijelo	Proizvođač	Domaćin	Razrjeđenje
CAT	Abcam (ab1877)	zec	1:16000
FASN (G-11)	Santa Cruz Biotechnology (sc- 48357)	miš	1:1000
HADHB (C-6)	Santa Cruz Biotechnology (sc- 271496)	miš	1:1000
PGC1 α	Novus Biologicals (NBP1-04676)	zec	1:1000
SIRTSDS3	Cell signaling (D22A3)	zec	1:2000
SOD1	Abcam(ab16831)	zec	1:4000
SOD2	Abcam(ab13533)	zec	1:8000
PPAR γ	Santa Cruz Biotechnology (sc- 7196)	zec	1:1000
Total OXPHOS Blue Native WB Antibody Coctail	Abcam (ab110412)	miš	1:6000

Tablica 7. Sekundarna antitijela korištena u detekciji ekspresije proteina Western analizom

Antitijelo	Proizvođač	Domaćin	Razrjeđenje
HRP konjugat, protutijela na miša (L005680 A)	BIO-RAD (1706516)	koza	1:5000
HRP konjugat, protutijela na zeca (L005679 B)	BIO-RAD (1706515)	koza	1:5000

3.5.5. Densitometrija

Densitometrija je provedena u svrhu kvantifikacije intenziteta vrpce proteina na gelovima koje su detektirane Western analizom. Fotografije dobivene po završetku Western analize prvo su prebačene u *grayscale* format, nakon čega su iz .jpg formata prebačene u .tif format korištenjem komercijalno dostupnog programa Corel Photo-Paint (2024). Potom su pojedine fotografije učitane u besplatni program Bio-Rad Image Lab (verzija 6.1) radi mjerenja gustoće obojenja svake pruge na membrani u odnosu na prvu u kontrolnoj skupini.

3.5.6. Statistička analiza

Za statističku analizu podataka u ovom diplomskom radu korišten je softverski program SPSS za Windows (v.17.0, IBM, Armonk, NY, SAD). Provedena je dvosmjerna ANOVA kako bi se otkrila interakcija učinka prehrane i spola na svaku ispitanu varijablu tijekom kratkog ili dugog perioda hranjenja. Ako je primijećena značajna interakcija, napravljen je post-hoc test sa Bonferronijevom korekcijom za usporedbu razlika između grupa. Statistička značajnost je postavljena na $p < 0,05$.

§ 4. REZULTATI

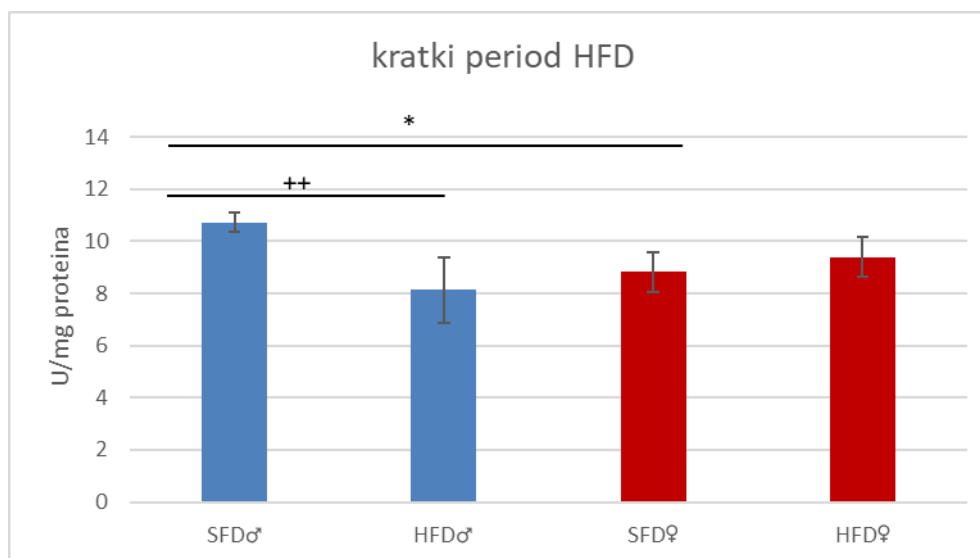
4.1. Aktivnost superoksid–dismutaze u uzorcima jetri NOD miševa

4.1.1. MnSOD u kratkom periodu hranjenja HFD ishranom

Aktivnost MnSOD za vrijeme kratkotrajnog hranjenja HFD ishranom prikazana je u tablici 8 i na slici 1. Opažena je značajna povezanost između spola i prehrane ($p < 0,05$). Ženke imaju značajno manju MnSOD aktivnost od mužjaka u SFD prehrani ($p < 0,05$), dok HFD uzrokuje sniženu MnSOD aktivnost samo kod mužjaka ($^{++}p < 0,01$).

Tablica 8. Aktivnost MnSOD (srednja vrijednost \pm standardno odstupanje) u stanicama jetre mužjaka i ženki NOD miševa hranjenih SFD prehranom i HFD prehranom u trajanju 6 tjedana.

	Srednja vrijednost / U/mg proteina	Standardno odstupanje
SFD ♂	10,73	$\pm 0,38$
HFD ♂	8,13	$\pm 1,24$
SFD ♀	8,82	$\pm 0,75$
HFD ♀	9,39	$\pm 0,76$



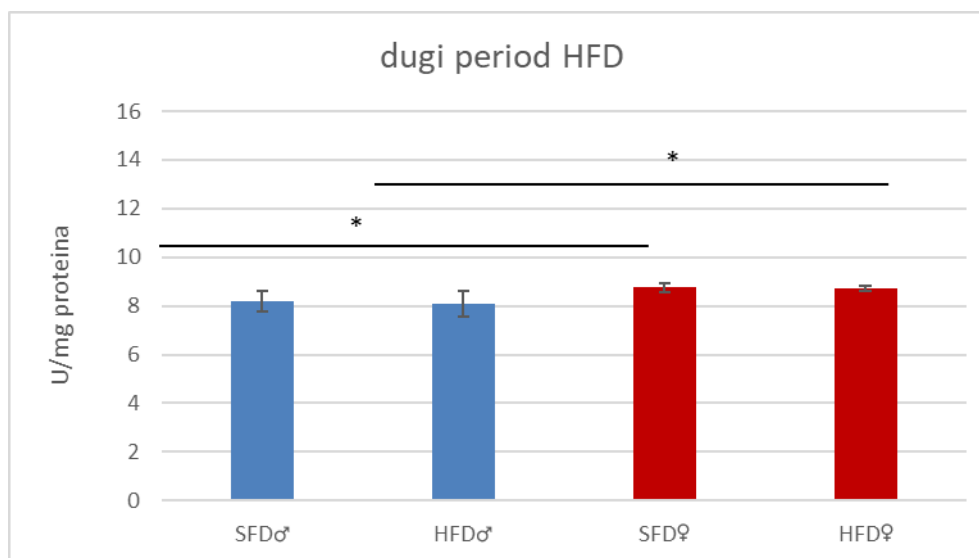
Slika 1. Aktivnost MnSOD (srednja vrijednost \pm standardno odstupanje) u stanicama jetre mužjaka i ženki NOD miševa hranjenih SFD prehranom i HFD prehranom u trajanju 6 tjedana.

4.1.2. MnSOD u dugom periodu hranjenja HFD ishranom

Aktivnost MnSOD za dugotrajnog hranjenja HFD ishranom prikazana je u tablici 9 i na slici 2. Uočeno je da nema povezanosti spola i prehrane. Ženke pokazuju puno veću aktivnost MnSOD od mužjaka u oba tipa prehrane (* $p < 0,05$). Nije uočena razlika u aktivnosti obzirom na SFD i HFD prehranu.

Tablica 9. Aktivnost MnSOD (srednja vrijednost \pm standardno odstupanje) u stanicama jetre mužjaka i ženki NOD miševa hranjenih SFD prehranom i HFD prehranom u trajanju 6 mjeseci.

	Srednja vrijednost / U/mg proteina	Standardno odstupanje
SFD ♂	8,19	$\pm 0,43$
HFD ♂	8,09	$\pm 0,51$
SFD ♀	8,75	$\pm 0,19$
HFD ♀	8,71	$\pm 0,11$



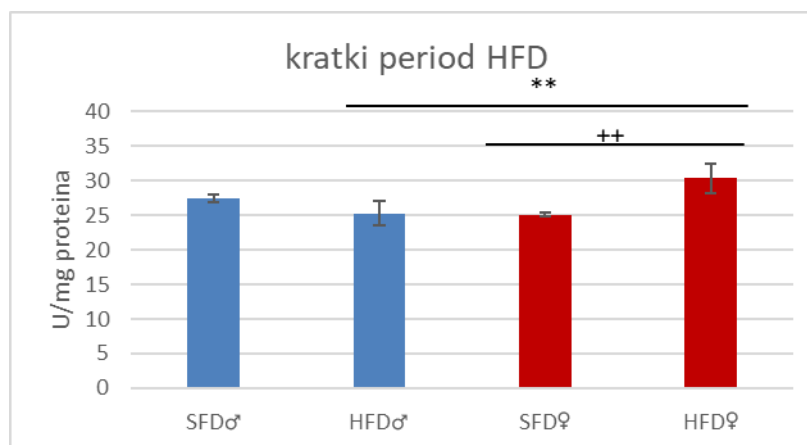
Slika 2. Aktivnost MnSOD (srednja vrijednost \pm standardno odstupanje) u stanicama jetre mužjaka i ženki NOD miševa hranjenih SFD prehranom i HFD prehranom u trajanju 6 mjeseci.

4.1.3. CuZnSOD u kratkom periodu hranjenja HFD ishranom

Aktivnost CuZnSOD za vrijeme kratkotrajnog hranjenja HFD ishranom prikazana je u tablici 10 i na slici 3. Zabilježena je značajna povezanost između spola i prehrane ($p < 0,01$). Ženke pokazuju veću aktivnost CuZnSOD u odnosu na mužjake samo u HFD uvjetima ishrane ($**p < 0,01$), dok HFD uzrokuje povećanje aktivnost CuZnSOD kod ženki ($^{++}p < 0,01$), dok se kod mužjaka bilježi niža aktivnost.

Tablica 10. Aktivnost CuZnSOD (srednja vrijednost \pm standardno odstupanje) u stanicama jetre mužjaka i ženki NOD miševa hranjenih SFD prehranom i HFD prehranom u trajanju 6 tjedana.

	Srednja vrijednost / U/mg proteina	Standardno odstupanje
SFD ♂	27,39	$\pm 0,60$
HFD ♂	25,3	$\pm 1,71$
SFD ♀	25,11	$\pm 0,23$
HFD ♀	30,39	$\pm 2,14$



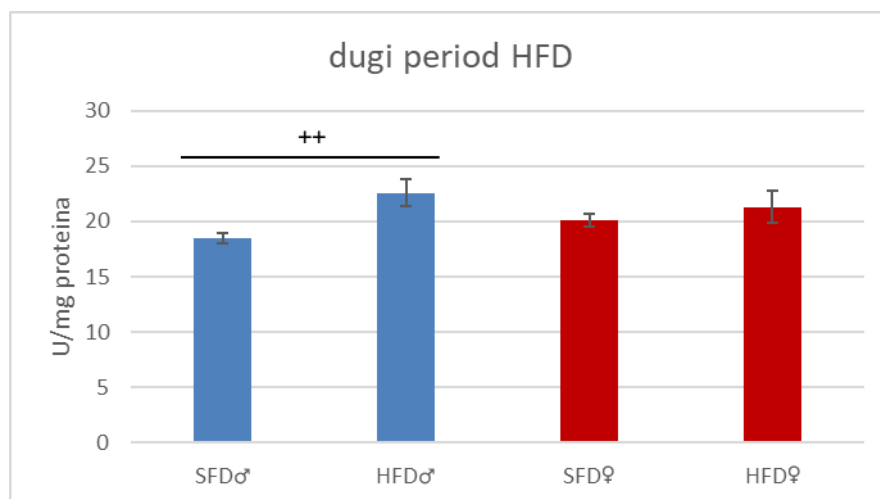
Slika 3. Aktivnost CuZnSOD (srednja vrijednost \pm standardno odstupanje) u stanicama jetre mužjaka i ženki NOD miševa hranjenih SFD prehranom i HFD prehranom u trajanju 6 tjedana.

4.1.4. CuZnSOD u dugom periodu hranjenja HFD ishranom

Aktivnost CuZnSOD za vrijeme dužeg trajanja hranjenja HFD prehranom prikazana je u tablici 11 i na slici 4. Zabilježena je značajna povezanost između spola i prehrane ($p < 0,05$). Uočeno je da nema razlike kod ženki u aktivnosti CuZnSOD ni u SFD ni u HFD uvjetima prehrane. HFD pak uzrokuje porast CuZnSOD aktivnosti jedino u mužjaka ($^{++}p < 0,01$).

Tablica 11. Aktivnost CuZnSOD (srednja vrijednost \pm standardno odstupanje) u stanicama jetre mužjaka i ženki NOD miševa hranjenih SFD prehranom i HFD prehranom u trajanju 6 mjeseci.

	Srednja vrijednost / U/mg proteina	Standardno odstupanje
SFD ♂	18,47	$\pm 0,43$
HFD ♂	22,60	$\pm 1,2$
SFD ♀	20,10	$\pm 0,59$
HFD ♀	21,30	$\pm 1,47$



Slika 4. Aktivnost CuZnSOD (srednja vrijednost \pm standardno odstupanje) u stanicama jetre mužjaka i ženki NOD miševa hranjenih SFD prehranom i HFD prehranom u trajanju 6 mjeseci.

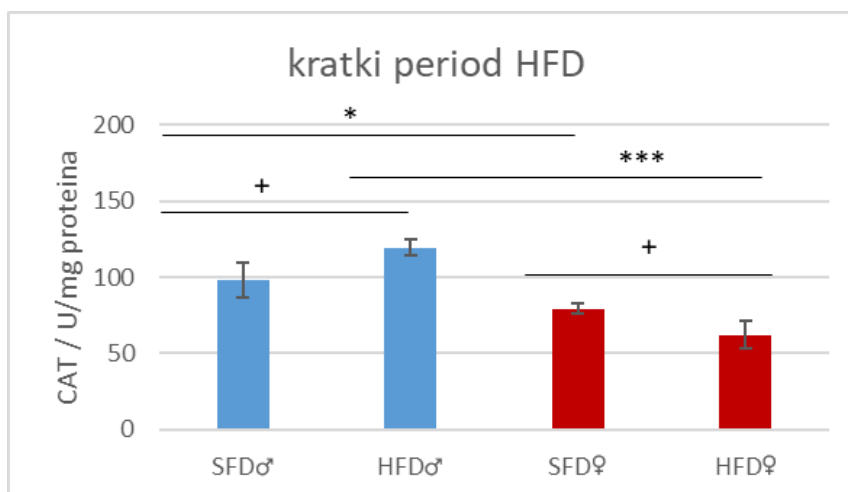
4.2. Aktivnost katalaze u uzorcima jetri NOD miševa

4.2.1. Kratki period HFD

Prilikom mjerenja aktivnosti katalaze u kratkom periodu hranjenja (Tablica 12, slika 5), uočena je značajna povezanost između spola i prehrane ($p < 0,01$). Ženke imaju znatno nižu aktivnost katalaze od mužjaka i u SFD ishrani ($*p < 0,05$) i u većoj mjeri u HFD ($***p < 0,001$). Mužjaci imaju značajno veću aktivnost katalaze u HFD u odnosu na SFD ishranu ($+p < 0,05$), a ženke značajno nižu katalaznu aktivnost u HFD u odnosu na SFD ishranu ($+p < 0,05$).

Tablica 12. Aktivnost katalaze (srednja vrijednost \pm standardno odstupanje) u stanicama jetre mužjaka i ženki NOD miševa hranjenih SFD prehranom i HFD prehranom u trajanju 6 tjedana

	Srednja vrijednost / U/mg proteina ⁻¹	Standardno odstupanje
SFD ♂	98,21	$\pm 11,62$
HFD ♂	119,43	$\pm 5,47$
SFD ♀	79,40	$\pm 2,94$
HFD ♀	62,00	$\pm 9,13$



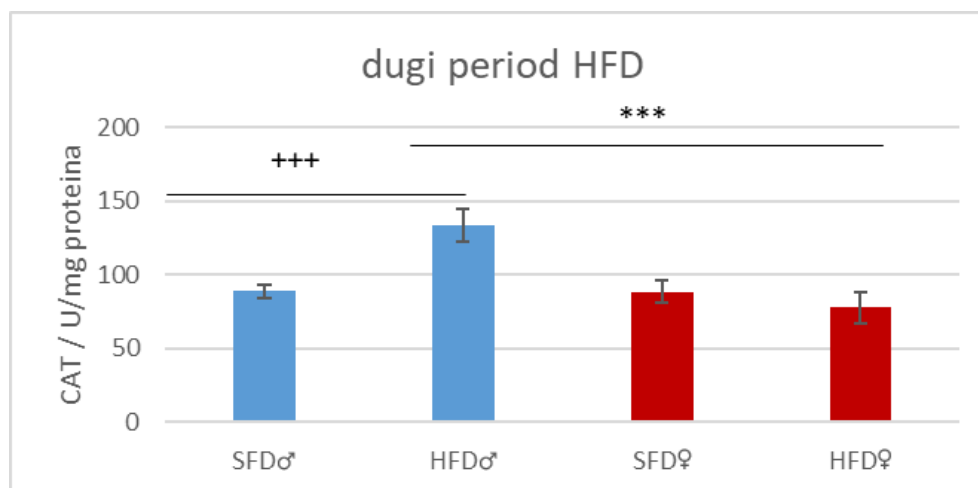
Slika 5. Aktivnost katalaze (srednja vrijednost \pm standardno odstupanje) u stanicama jetre mužjaka i ženki NOD miševa hranjenih SFD prehranom i HFD prehranom u trajanju 6 tjedana

4.2.2. Dugi period HFD

U slučaju kada su NOD miševi hranjeni HFD-om u periodu od 6 mjeseci, uočena je povezanost između spola i prehrane ($p < 0,01$) (Tablica 13, slika 6). Ženke imaju manju aktivnost katalaze od mužjaka u HFD uvjetima ($***p < 0,001$). Također, HFD uzrokuje povećanu katalaznu aktivnost samo u mužjaka ($+++p < 0,001$).

Tablica 13. Aktivnost katalaze (srednja vrijednost \pm standardno odstupanje) u stanicama jetre mužjaka i ženki NOD miševa hranjenih SFD prehranom i HFD prehranom u trajanju 6 mjeseci

	Srednja vrijednost / U/mg protiena ⁻¹	Standardno odstupanje
SFD ♂	89,1	$\pm 4,55$
HFD ♂	133,7	$\pm 10,90$
SFD ♀	88,6	$\pm 7,17$
HFD ♀	77,6	$\pm 10,56$



Slika 6. Aktivnost katalaze (srednja vrijednost \pm standardno odstupanje) u stanicama jetre mužjaka i ženki NOD miševa hranjenih SFD prehranom i HFD prehranom u trajanju 6 mjeseci

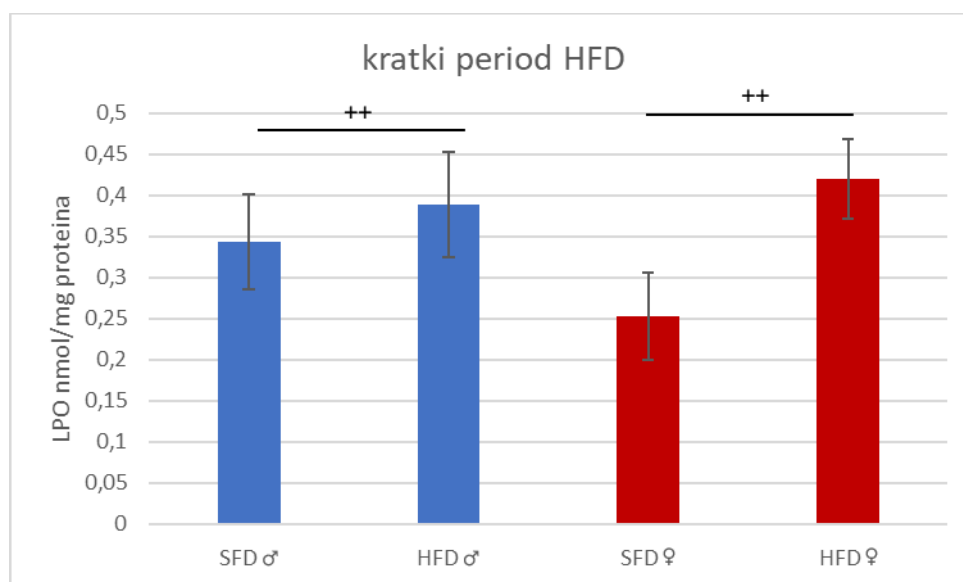
4.3. Stupanj lipidne peroksidacije

4.3.1. Stupanj lipidne peroksidacije nakon 6 tjedana hranjenja HFD

Vrijednosti stupnja lipidne peroksidacije u uzorcima jetre NOD miševa koji su hranjeni HFD prehranom u trajanju 6 tjedana navedeni su u tablici 14 zajedno s podacima o standardnom odstupanju te su prikazani i grafički (slika 7). Prilikom mjerenja stupnja lipidne peroksidacije nakon kraćeg trajanja hranjenja HFD prehranom, uočeno je da ne postoji povezanost između spola i prehrane. Također je uočeno kako ne dolazi do značajnih razlika oksidacijskom oštećenju lipida između mužjaka i ženki, no oba spola pokazuju veća lipidna oštećenja prilikom hranjenja HFD prehranom u odnosu na SFD ($^{++}p < 0,05$)

Tablica 14. Stupanj lipidne peroksidacije (srednja vrijednost \pm standardno odstupanje) u stanicama jetre mužjaka i ženki NOD miševa hranjenih SFD prehranom i HFD prehranom u trajanju 6 tjedana

	Srednja vrijednost / nmol/mg proteina	Standardno odstupanje
SFD ♂	0,343	$\pm 0,0579$
HFD ♂	0,388	$\pm 0,0638$
SFD ♀	0,252	$\pm 0,0531$
HFD ♀	0,419	$\pm 0,0486$



Slika 7. Stupanj lipidne peroksidacije (srednja vrijednost \pm standardno odstupanje) u stanicama jetre mužjaka i ženki NOD miševa hranjenih SFD prehranom i HFD prehranom u trajanju 6 tjedana

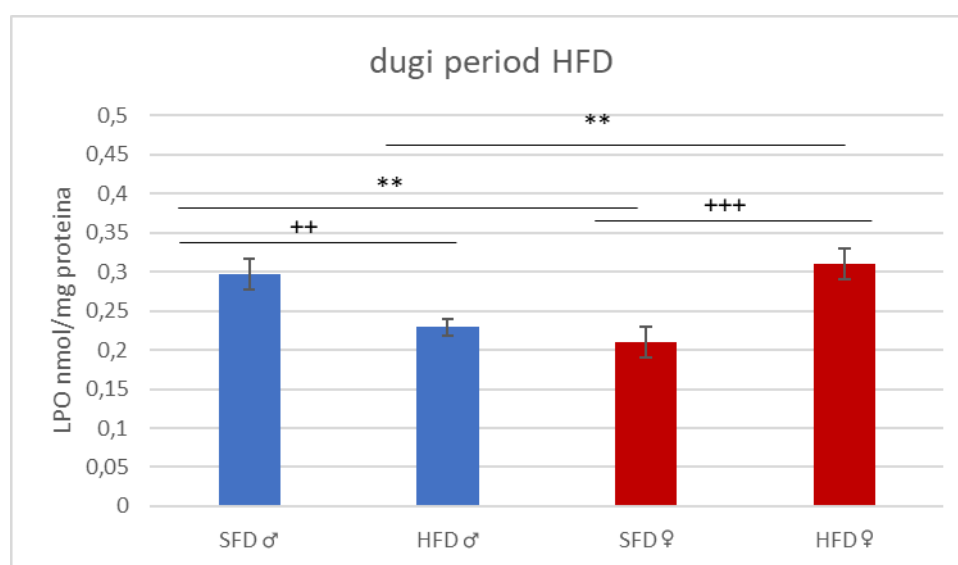
4.3.2. Stupanj lipidne peroksidacije nakon 6 mjeseci hranjenja HFD

Stupanj lipidne peroksidacije u uzorcima jetri NOD miševa koji su hranjeni HFD prehranom u trajanju 6 tjedana navedeni su u tablici 15 uz podatke o standardnom odstupanju te su prikazani grafički (slika 8).

Uočeno je da postoji značajna povezanost između spola i prehrane na razinu TBARS. U slučaju SFD, ženke su imale znatno niže razine TBARS u usporedbi s mužjacima (** $p < 0,01$). U slučaju HFD prehrane, ovaj odnos je obrnut i ženke su pokazale znatno više razine TBARS u odnosu na mužjake (** $p < 0,001$).

Tablica 15. Stupanj lipidne peroksidacije (srednja vrijednost \pm standardno odstupanje) u stanicama jetre mužjaka i ženki NOD miševa hranjenih SFD prehranom i HFD prehranom u trajanju 6 mjeseci

	Srednja vrijednost / nmol/mg proteina	Standardno odstupanje
SFD ♂	0,297	$\pm 0,0227$
HFD ♂	0,229	$\pm 0,0147$
SFD ♀	0,211	$\pm 0,0213$
HFD ♀	0,313	$\pm 0,0261$



Slika 8. Stupanj lipidne peroksidacije (srednja vrijednost \pm standardno odstupanje) u stanicama jetre mužjaka i ženki NOD miševa hranjenih SFD prehranom i HFD prehranom u trajanju 6 mjeseci

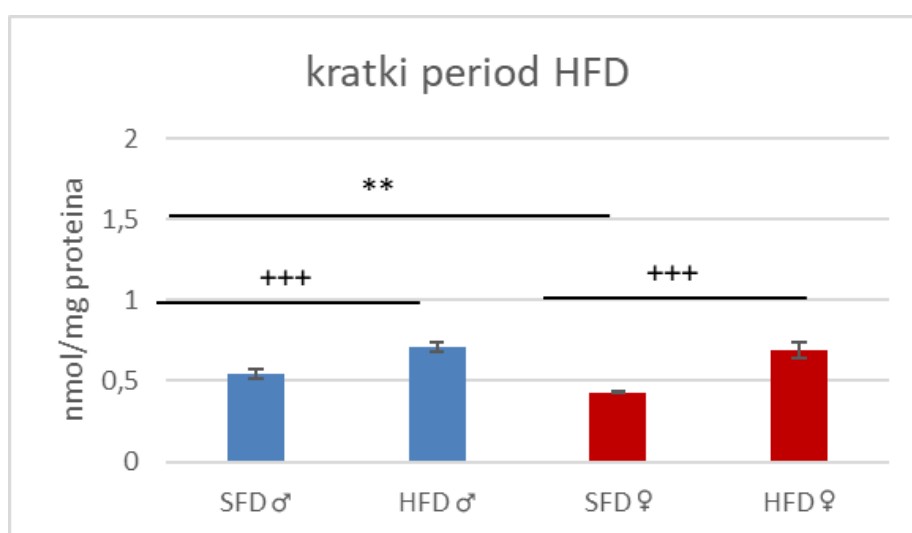
4.4. Stupanj karbonilacije uzoraka jetri NOD miševa

4.4.1. Stupanj karbonilacije nakon 6 tjedana hranjenja HFD prehranom

Vrijednosti stupnja karbonilacije proteina u uzorcima jetre NOD miševa koji su hranjeni HFD prehranom u trajanju 6 tjedana navedeni su u tablici 16 uz podatke o standardnom odstupanju te su prikazani i grafički (slika 9). Prilikom mjerenja stupnja karbonilacije proteina nakon kraćeg trajanja hranjenja HFD prehranom, uočena je značajna povezanost spola i prehrane ($p < 0,05$). Ženke imaju manja oštećenja od mužjaka u SFD ishrani (** $p < 0,01$), dok HFD uzrokuje značajno oštećenje proteina u oba spola (+++ $p < 0,001$) u odnosu na SFD ishranu.

Tablica 16. Stupanj karbonilacije proteina (srednja vrijednost \pm standardno odstupanje) u stanicama jetre mužjaka i ženki NOD miševa hranjenih SFD prehranom i HFD prehranom u trajanju 6 tjedana

	Srednja vrijednost / nmol/mg proteina	Standardno odstupanje
SFD ♂	0,5461	$\pm 0,030$
HFD ♂	0,7085	$\pm 0,029$
SFD ♀	0,4291	$\pm 0,008$
HFD ♀	0,6887	$\pm 0,049$



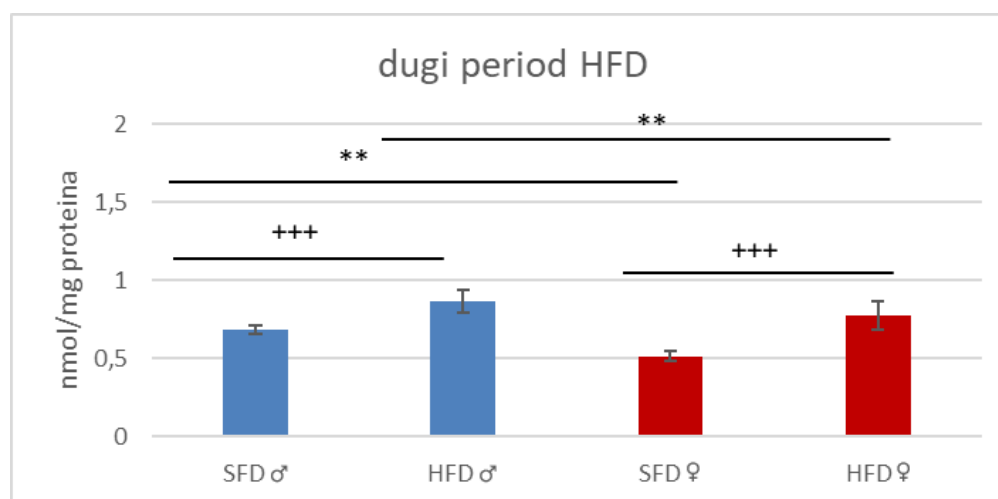
Slika 9. Stupanj karbonilacije proteina (srednja vrijednost \pm standardno odstupanje) u stanicama jetre mužjaka i ženki NOD miševa hranjenih SFD prehranom i HFD prehranom u trajanju 6 tjedana

4.4.2. Stupanj karbonilacije nakon 6 mjeseci hranjenja HFD prehranom

Vrijednosti stupnja karbonilacije proteina u uzorcima jetre NOD miševa koji su hranjeni HFD prehranom u trajanju 6 mjeseci navedeni su u tablici 17 uz podatke o standardnom odstupanju te su prikazani grafički (slika 10). Prilikom mjerenja stupnja karbonilacije proteina nakon duljeg perioda hranjenja HFD prehranom, uočeno je da nema povezanosti između spola i prehrane. Ženke imaju manje oštećenje nego mušjaci u oba tipa prehrane (** $p < 0,01$). HFD prehrana uzrokuje znatno oštećenje proteina u oba spola (+++ $p < 0,001$) u odnosu na SFD prehranu.

Tablica 17. Stupanj karbonilacije proteina (srednja vrijednost \pm standardno odstupanje) u stanicama jetre mužjaka i ženki NOD miševa hranjenih SFD prehranom i HFD prehranom u trajanju 6 mjeseci

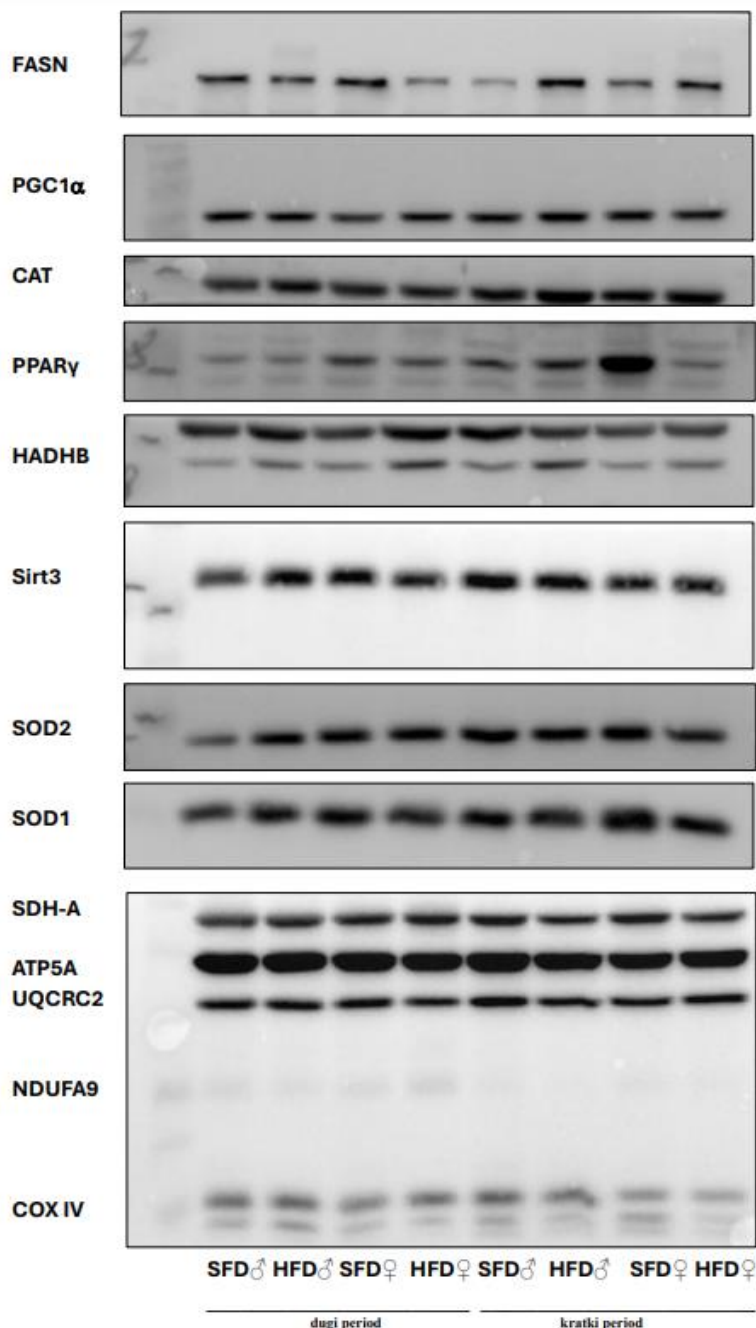
	Srednja vrijednost / nmol/mg proteina	Standardno odstupanje
SFD ♂	0,6867	$\pm 0,03$
HFD ♂	0,8662	$\pm 0,07$
SFD ♀	0,5161	$\pm 0,03$
HFD ♀	0,7792	$\pm 0,09$



Slika 10. Stupanj karbonilacije proteina (srednja vrijednost \pm standardno odstupanje) u stanicama jetre mužjaka i ženki NOD miševa hranjenih SFD prehranom i HFD prehranom u trajanju 6 mjeseci

4.5. Određivanje ekspresije proteina Western analizom

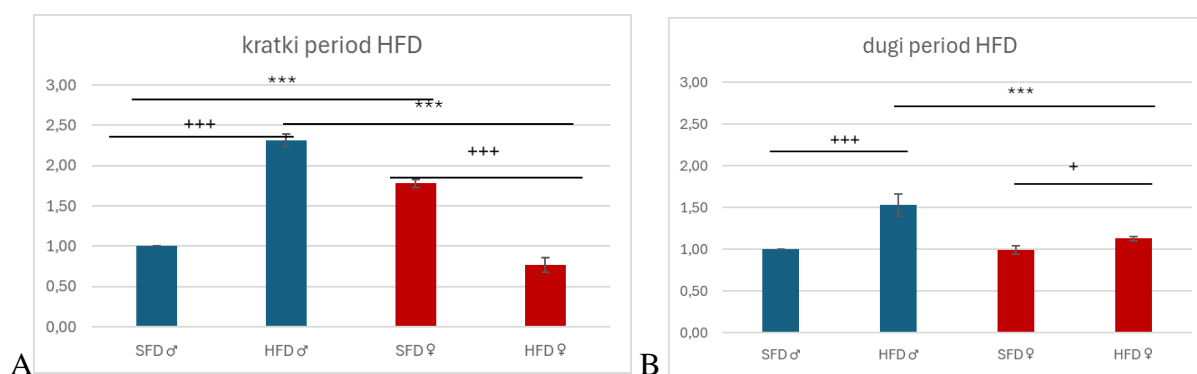
Western analiza korištena je za provjeru ekspresije proteina koji sudjeluju u različitim staničnim procesima koji uključuju i antioksidativnu obranu (Slika 11) u uzorcima jetri ženki i mužjaka NOD miševa koji su hranjeni prehranom s visokim udjelom masti u trajanju 6 tjedana i 6 mjeseci.



Slika 11. Reprezentativni prikaz Western analize ekspresije proteina FASN, PGC1 α , CAT, PPAR γ , HADHB, Sirt3, SOD2, SOD1 i mitohondrijskih kompleksa oksidativne fosforilacije (SDH-A, ATP5A, UQCRC2, NDUFA9, COX IV).

4.5.1. *FASN*

Ekspresija *FASN* (sintaza masnih kiselina, engl. *fatty acid synthase*) u slučaju kratkotrajnog hranjenja HFD prehranom prikazana je na slici 12A. Uočena je značajna povezanost između spola i kratkotrajnog hranjenja HFD prehranom ($p < 0,01$). Ženke imaju značajno više ekspresiju *FASN* u odnosu na mužjake u SFD uvjetima ($***p < 0,001$), no uočena je značajno niža ekspresija *FASN* u HFD uvjetima ($***p < 0,001$). HFD prehrana je prouzročila značajno više ekspresiju *FASN* kod mužjaka ($+++p < 0,001$), dok je kod ženki uočeno značajno sniženje ekspresije *FASN* ($+++p < 0,001$).



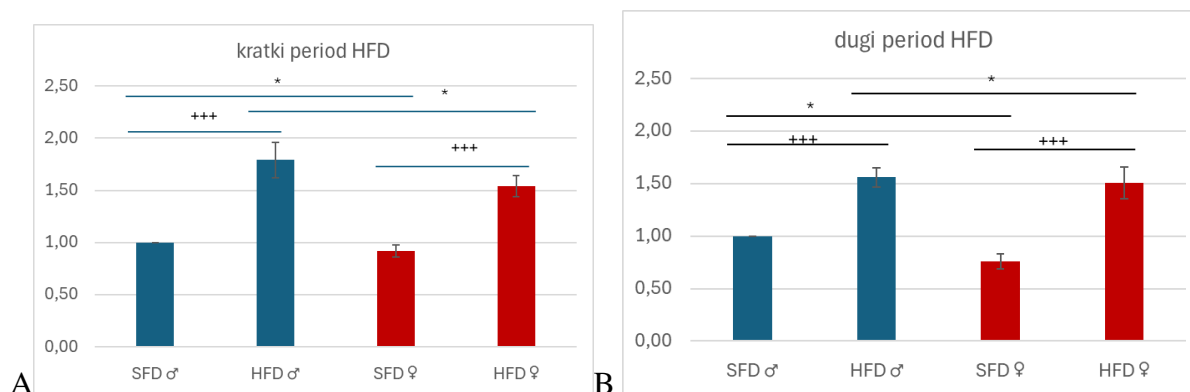
Slika 12. Grafički prikaz ekspresije *FASN* u NOD miševa oba spola kratkotrajnog hranjenja SFD i HFD prehranom. $+++p < 0,001$, HFD vs. SFD; $***p < 0,001$, ženke vs. mužjaci (A) i dugotrajnog hranjenja SFD i HFD prehranom. $+p < 0,05$, $+++p < 0,001$, HFD vs. SFD; $***p < 0,001$, ženke vs. mužjaci (B). Dvosmjerna Anova s Bonferonni korekcijom je provedena kako bi se utvrdio efekt spola odnosno prehrane u jetri miševa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardno odstupanje. $N = 3$ uzorka po grupi.

U slučaju hranjenja HFD prehranom u dužem periodu (slika 12B), uočena je povezanost između prehrane i spola ($p < 0,01$) u ekspresiji *FASN*-a. Ženske pokazuju znatno nižu ekspresiju *FASN*-a u odnosu na mužjake u HFD uvjetima ($***p < 0,001$). HFD prehrana je uzrokovala znatno višu ekspresiju *FASN*-a kod mužjaka ($+++p < 0,001$), dok je kod ženki uzrokovala rubno povećanje *FASN*-a ($+p < 0,05$).

4.5.2. *PGC1 α*

Ekspresija peroksisomalnog koaktivatora 1α receptora aktiviranog proliferatorom, engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-alpha*, *PGC1 α*) koji

sudjeluje u mitohondrijskoj biogenezi i metabolizmu u kratkom trajanju hranjenja HFD ishranom prikazana je grafički na slici 13A. U slučaju kratkotrajnog hranjenja HFD prehranom, nema značajne povezanosti između hranjenja i spola. Kod ženki je uočena nešto niža ekspresija PGC1 α u odnosu na mužjake bez obzira na tip ishrane (* $p < 0,05$). HFD prehrana je uzrokovala značajno višu ekspresiju PGC1 α u oba spola (+++ $p < 0,001$).

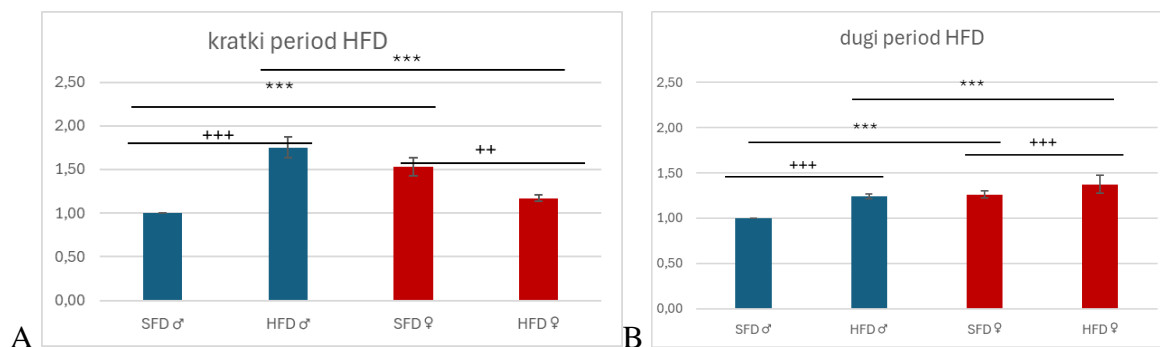


Slika 13. Grafički prikaz ekspresije PGC1 α u NOD miševa oba spola kratkotrajnog hranjenja SFD i HFD prehranom. +++ $p < 0,001$, HFD vs. SFD; * $p < 0,05$, ženke vs. mužjaci (A) i dugotrajnog hranjenja SFD i HFD prehranom. +++ $p < 0,001$, HFD vs. SFD; * $p < 0,05$, ženke vs. mužjaci (B). Dvosmjerna Anova s Bonferonni korekcijom je provedena kako bi se utvrdio efekt spola odnosno prehrane u jetri miševa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardno odstupanje. N = 3 uzorka po grupi.

Za vrijeme dužeg hranjenja HFD ishranom (Slika 13B), uočeni su vrlo slični trendovi kao i u slučaju kratkotrajnog hranjenja HFD prehranom. Nema povezanosti između hranjenja i spola tijekom dugog perioda hranjenja. Ženke pokazuju nižu ekspresiju PGC1 α u odnosu na mužjake bez obzira na tip ishrane (* $p < 0,05$). HFD prehrana je prouzrokovala višu ekspresiju PGC1 α u oba spola (+++ $p < 0,001$).

4.5.3. CAT

Ekspresija katalaze (CAT) u uvjetima kratkotrajnog hranjenja HFD prehranom prikazana je na slici 14A. Postoji značajna razlika između hranjenja i spola tijekom kratkog perioda hranjenja ($p < 0,001$). Ženke imaju značajno višu ekspresiju CAT-a u odnosu na mužjake u SFD (** $p < 0,001$), a u uvjetima HFD značajno nižu ekspresiju CAT-a od mužjaka (** $p < 0,001$). HFD ishrana je uzrokovala značajno višu ekspresiju CAT-a u mužjaka (+++ $p < 0,001$), dok je u ženki značajno snizila ekspresiju CAT-a (++ $p < 0,01$).

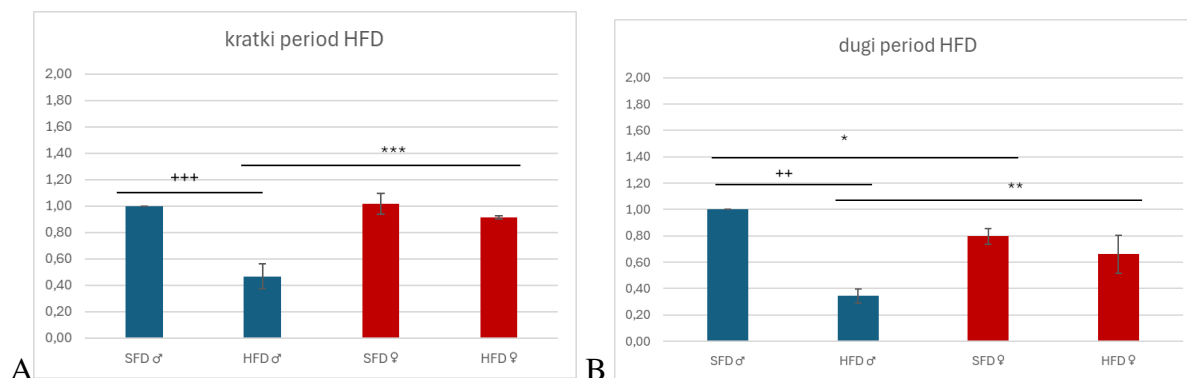


Slika 14. Grafički prikaz ekspresije CAT u NOD miševa oba spola kratkotrajnog hranjenja SFD i HFD prehranom. ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ HFD vs. SFD; *** $p < 0,001$ ženke vs. mužjaci (A) i dugotrajnog hranjenja SFD i HFD prehranom. +++ $p < 0,001$ HFD vs. SFD; *** $p < 0,001$ ženke vs. mužjaci (B). Dvosmjerna Anova s Bonferonni korekcijom je provedena kako bi se utvrdio efekt spola odnosno prehrane u jetri miševa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardno odstupanje. N = 3 uzorka po grupi.

Ekspresija CAT-a za vrijeme dužeg trajanja hranjenja HFD prehranom prikazana je na slici 14B. Uočeno je da nema značajne povezanost između hranjenja i spola tijekom dugog perioda hranjenja. Ženke imaju značajno nižu ekspresiju CAT u odnosu na mužjake bez obzira na tip prehrane (** $p < 0,001$), dok je HFD ishrana uzrokovala značajno višu ekspresiju CAT u oba spola (+++ $p < 0,001$).

4.5.4. PPAR γ

Ekspresija proteina PPAR γ (peroksisomalnog receptora gama aktiviranog proliferatorom, engl *peroxisome proliferator activated receptor gamma*) prikazana je grafički na slici 15A u slučaju kratkotrajnog hranjenja HFD ishranom (Slika 14A). Postoji značajna povezanost između hranjenja i spola ($p < 0,001$). Ženke pokazuju značajno višu ekspresiju PPAR γ u odnosu na mužjake u uvjetima HFD ishrane (** $p < 0,001$). Isto tako, HFD ishrana je uzrok značajno niže ekspresije PPAR γ samo kod mužjaka (+++ $p < 0,001$).

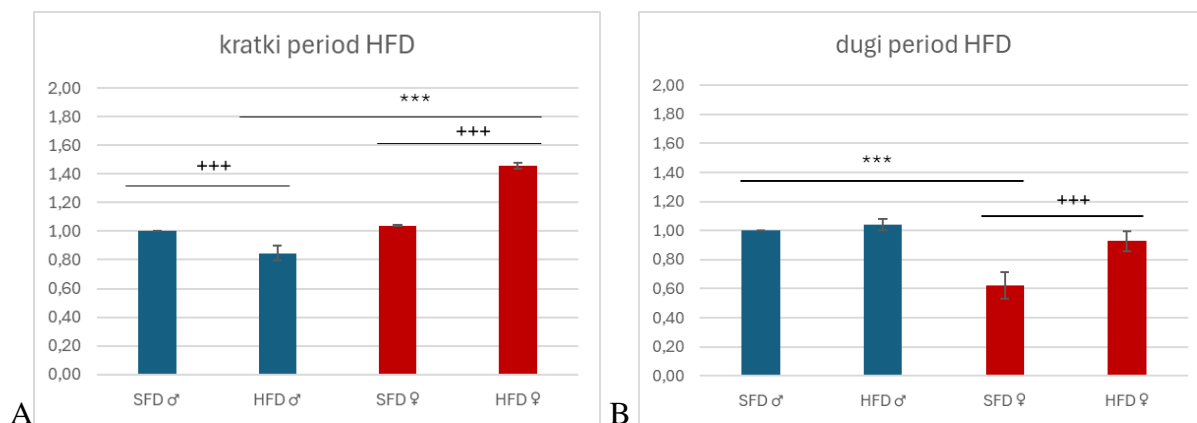


Slika 15. Grafički prikaz ekspresije PPAR γ u NOD miševa oba spola kratkotrajnog hranjenja SFD i HFD prehranom. +++p<0.001, HFD vs. SFD; ***p<0.001, ženke vs. mužjaci (A) i dugotrajnog hranjenja SFD i HFD prehranom. ++p<0.01, HFD vs. SFD; *p<0,05, **p<0,01, ženke vs. mužjaci. Dvosmjerna Anova s Bonferonni korekcijom je provedena kako bi se utvrdio efekt spola odnosno prehrane u jetri miševa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardno odstupanje. N = 3 uzorka po grupi.

U slučaju dužeg perioda hranjenja HFD prehranom, uočena je značajna povezanost hranjenja i spola (Slika 15B). Ženke imaju značajno nižu ekspresiju PPAR γ u odnosu na mužjake u SFD uvjetima (*p<0,05), dok u HFD uvjetima ženke imaju značajno višu ekspresiju PPAR γ (**p<0,01). HFD prehrana je uzrokovala značajno nižu ekspresiju PPAR γ samo kod mužjaka (**p<0,01).

4.5.5. HADHB

Za HADHB (hidroksiacil-CoA dehidrogenaza podjedinica beta), ekspresija proteina za vrijeme kratkotrajnog hranjenja HFD prehranom prikazana je na slici 16A. Postoji značajna povezanost između hranjenja i spola tijekom kratkog perioda hranjenja HFD-om (p<0,001). Ženke imaju značajno višu ekspresiju HADHB u odnosu na mužjake u HFD uvjetima (**p<0,001). HFD prehrana je uzrokovala znatno višu ekspresiju HADHB u ženki (+++p<0,001), dok je kod mužjaka izazvala znatno nižu ekspresiju HADHB (+++p<0,001).

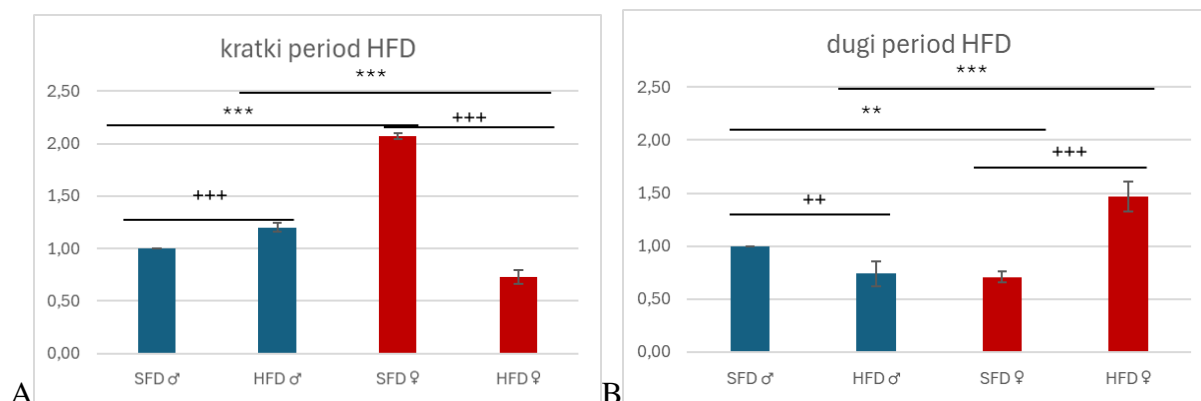


Slika 16. Grafički prikaz ekspresije HADHB u NOD miševa oba spola kratkotrajnog hranjenja SFD i HFD prehranom. +++ $p < 0,001$ HFD vs. SFD; *** $p < 0,001$ ženke vs. mužjaci (A) i dugotrajnog hranjenja SFD i HFD prehranom. +++ $p < 0,001$ HFD vs. SFD; *** $p < 0,001$ ženke vs. mužjaci (B). Dvosmjerna Anova s Bonferonni korekcijom je provedena kako bi se utvrdio efekt spola odnosno prehrane u jetri miševa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardno odstupanje. N = 3 uzorka po grupi

Uočena je značajna povezanost između hranjenja i spola tijekom dugog perioda hranjena ($p < 0,01$) za HADHB (Slika 16B). Ženke imaju značajno nižu ekspresiju HADHB u odnosu na mužjake u SFD uvjetima (** $p < 0,001$). HFD ishrana je uzrokovala znatno višu ekspresiju HADHB samo kod ženki (++++ $p < 0,001$).

4.5.6. Sirt3

Ekspresija proteina Sirt3 (mitohondrijska deacetilaza, sirtuin 3), koji sudjeluje u regulaciji metaboličkih puteva u stanici, prikazana je na slici 17A u slučaju kratkog perioda HFD prehrane. Uočena je značajna povezanost između prehrane i spola tijekom kratkog perioda hranjenja HFD prehranom ($p < 0,001$). Ženke pokazuju značajno višu ekspresiju Sirt3 u odnosu na mužjake u SFD uvjetima (** $p < 0,001$) ali značajno nižu u HFD uvjetima (** $p < 0,001$). HFD ishrana je uzrokovala značajno višu ekspresiju Sirt3 u mužjaka (++++ $p < 0,001$) dok je kod ženki uzrokovala smanjenje Sirt3 (++++ $p < 0,001$).

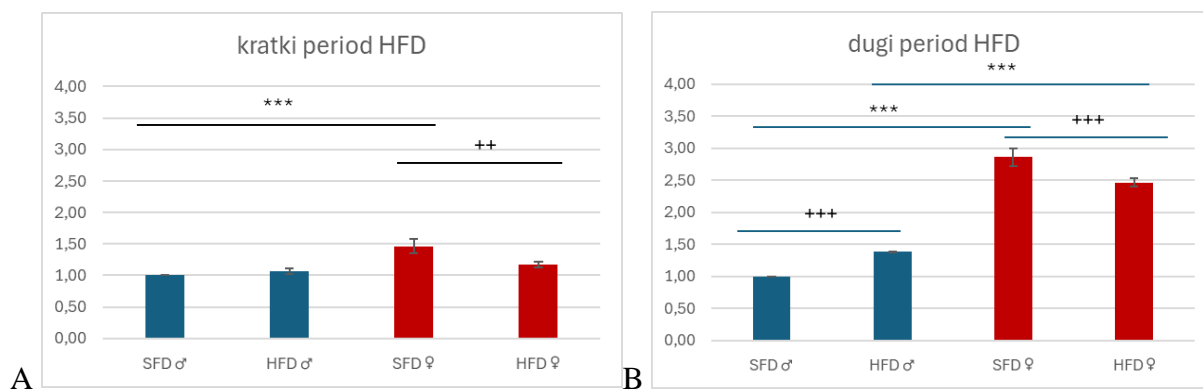


Slika 17. Grafički prikaz ekspresije Sirt3 u NOD miševa oba spola kratkotrajnog hranjenja SFD i HFD prehranom. +++ $p < 0.001$, HFD vs. SFD; *** $p < 0.001$, ženke vs. mužjaci (A) i dugotrajnog hranjenja SFD i HFD prehranom. ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0.001$, HFD vs. SFD; ** $p < 0,01$, *** $p < 0.001$, ženke vs. mužjaci (B). Dvosmjerna Anova s Bonferonni korekcijom je provedena kako bi se utvrdio efekt spola odnosno prehrane u jetri miševa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardno odstupanje. N = 3 uzorka po grupi.

U slučaju dugog perioda hranjenja HFD ishranom (Slika 17B), postoji značajna povezanost između hranjenja i spola ($p < 0,001$). Ženke pokazuju značajno nižu ekspresiju Sirt3 u odnosu na mužjake u SFD uvjetima (** $p < 0,01$), ali značajno višu u HFD uvjetima (***) $p < 0,001$). HFD prehrana uzrokuje značajno nižu ekspresiju Sirt3 kod mužjaka (++) $p < 0,01$ dok je kod ženki uzrokovala jako povećanje ekspresije Sirt3 (++) $p < 0,001$.

4.5.7. SOD2

Ekspresija SOD2 u slučaju kratkotrajnog hranjenja HFD ishranom je prikazana na slici 18A. Zapažena je značajna razlika između hranjenja i spola tijekom kratkog perioda hranjenja HFD-om ($p < 0,01$). Ženke imaju znatno višu ekspresiju SOD2 u odnosu na mužjake u SFD prehrani (***) $p < 0,001$). HFD ishrana je uzrokovala znatno nižu ekspresiju SOD samo kod ženki (++) $p < 0,01$.

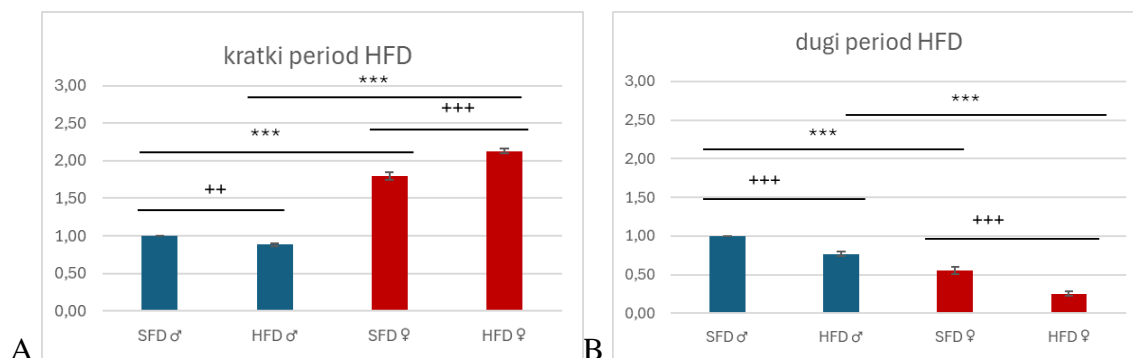


Slika 18. Grafički prikaz ekspresije SOD2 u NOD miševa oba spola kratkotrajnog hranjenja SFD i HFD prehranom. ++ $p < 0,01$ HFD vs. SFD; *** $p < 0,001$ ženke vs. mušjaci (A) i dugotrajnog hranjenja SFD i HFD prehranom. +++ $p < 0,001$ HFD vs. SFD; *** $p < 0,001$ ženke vs. mušjaci. Dvosmjerna Anova s Bonferonni korekcijom je provedena kako bi se utvrdio efekt spola odnosno prehrane u jetri miševa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardno odstupanje. N = 3 uzorka po grupi.

U slučaju dugotrajnog hranjenja HFD prehranom, uočena je povezanost hranjenja i spola u ekspresiji SOD2 ($p < 0,001$) (Slika 18B). Ženke su imale značajno višu ekspresiju SOD2 u odnosu na mušjake u oba tipa prehrane (** $p < 0,001$). HFD ishrana je uzrokovala značajno višu ekspresiju SOD2 u mušjaka (+++ $p < 0,001$), dok je kod ženki značajno snizila ekspresiju SOD2 (+++ $p < 0,001$).

4.5.8. SOD1

Rezultati ekspresije SOD1 u uzorcima gdje su NOD miševi hranjeni HFD ishranom u kratkom periodu su prikazani na slici 19A. Uočena je značajna povezanost hranjenja i spola tijekom kratkog perioda HFD hranjenja. Ženke imaju značajno višu ekspresiju SOD1 u odnosu na mušjake, neovisno o prehrani (** $p < 0,001$). HFD ishrana je uzrokovala značajno nižu ekspresiju SOD1 u mušjaka (++) $p < 0,001$) i u većoj mjeri kod ženki (+++ $p < 0,001$).



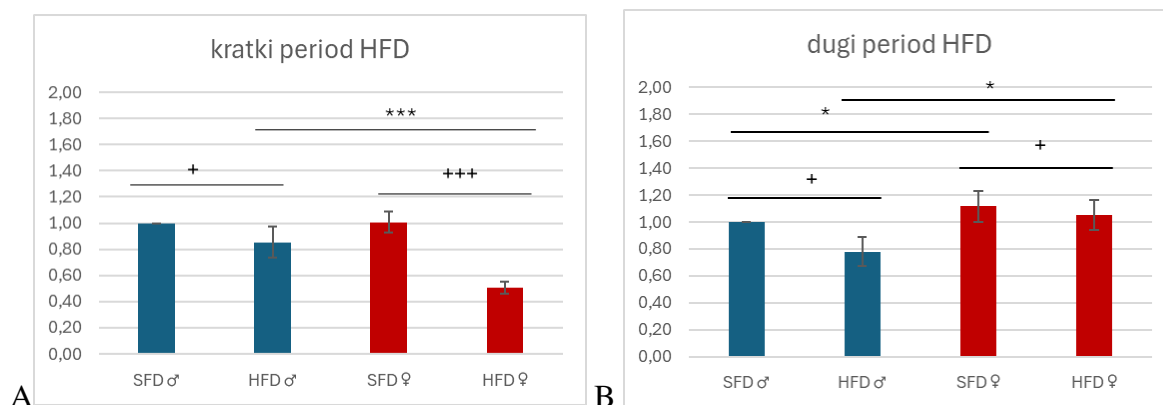
Slika 19. Grafički prikaz ekspresije SOD1 u NOD miševa oba spola kratkotrajnog hranjenja SFD i HFD prehranom. ++ $p < 0,001$, +++ $p < 0,001$ HFD vs. SFD; *** $p < 0,001$ ženke vs. mužjaci (A) i i dugotrajnog hranjenja SFD i HFD prehranom. +++ $p < 0,001$ HFD vs. SFD; *** $p < 0,001$ ženke vs. mužjaci (B). Dvosmjerna Anova s Bonferonni korekcijom je provedena kako bi se utvrdio efekt spola odnosno prehrane u jetri miševa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardno odstupanje. N = 3 uzorka po grupi.

Za vrijeme duljeg trajanja hranjenja HDF ishranom, uočeno je da nema povezanosti hranjenja i spola (Slika 19B) Ženke pokazuju značajno nižu ekspresiju SOD1 u odnosu na mužjake, neovisno o ishrani (** $p < 0,001$). HFD ishrana uzrokuje značajno nižu ekspresiju SOD1 u oba spola (+++ $p < 0,001$).

4.5.9. Mitochondrijski kompleksi oksidativne fosforilacije

SDH-A (kompleks II)

Ekspresija SDH-A (kompleks sukcinat dehidrogenaze podjedinica A, engl. *succinate dehydrogenase complex, subunit A*, kompleks II) u slučaju kratkog perioda hranjenja HFD prehranom prikazana je na slici 20A. Uočena je značajna povezanost između hranjenja i spola ($p < 0,01$). Ženke pokazuju značajno nižu ekspresiju kompleksa II u odnosu na mužjake u HFD uvjetima (** $p < 0,001$). HFD ishrana je uzrokovala značajno nižu ekspresiju kompleksa II kod mužjaka (+ $p < 0,05$) i u većoj mjeri kod ženki (+++ $p < 0,001$).

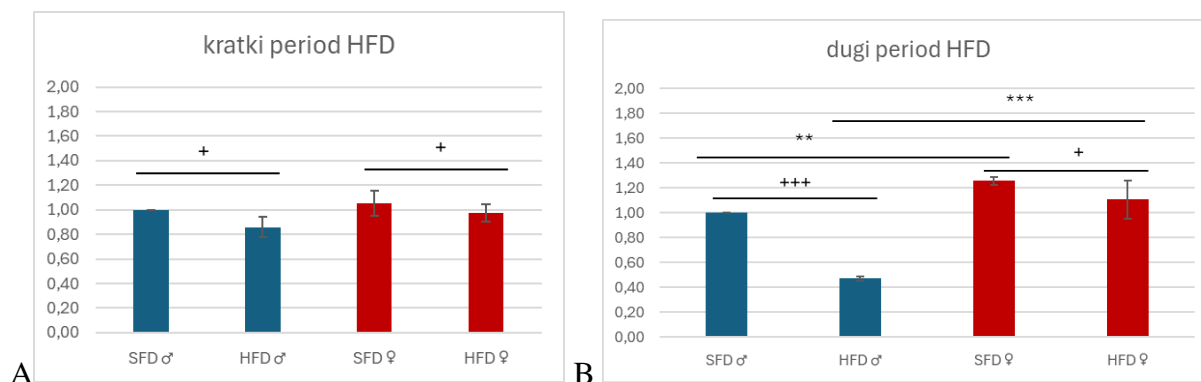


Slika 20. Grafički prikaz ekspresije SDH-A (kompleks II) u NOD miševa oba spola kratkotrajnog hranjenja SFD i HFD prehranom. + $p < 0,05$, +++ $p < 0,001$, HFD vs. SFD; *** $p < 0,001$, ženke vs. mužjaci (A) i dugotrajnog hranjenja SFD i HFD prehranom. + $p < 0,05$, HFD vs. SFD; ** $p < 0,01$, ženke vs. mužjaci (B). Dvosmjerna Anova s Bonferonni korekcijom je provedena kako bi se utvrdio efekt spola odnosno prehrane u jetri miševa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardno odstupanje. N = 3 uzorka po grupi.

U slučaju ekspresije SDH-A u slučaju dužeg trajanja HFD ishrane (slika 20B), nije uočena povezanost između hranjenja i spola. Ženke pokazuju znatno višu ekspresiju kompleksa II u odnosu na mužjake, neovisno o ishrani (* $p < 0,05$). HFD ishrana uzrokuje znatno nižu ekspresiju kompleksa II bez obzira na spol (+ $p < 0,05$).

ATP5A (kompleks V)

Rezultati ekspresije ATP5A (F1 alfa podjedinica ATP-sintaze, engl. *ATP synthase F1 subunit alpha*, kompleks V) u slučaju HFD ishrane u kraćem periodu prikazani su grafički na slici 21A. Nije uočena povezanost između hranjenja i spola za vrijeme kratkog perioda hranjenja HFD prehranom. Nije uočena niti razlika između spolova. HFD prehrana je uzrokovala značajno nižu ekspresiju kompleksa V u oba spola (+ $p < 0,05$).

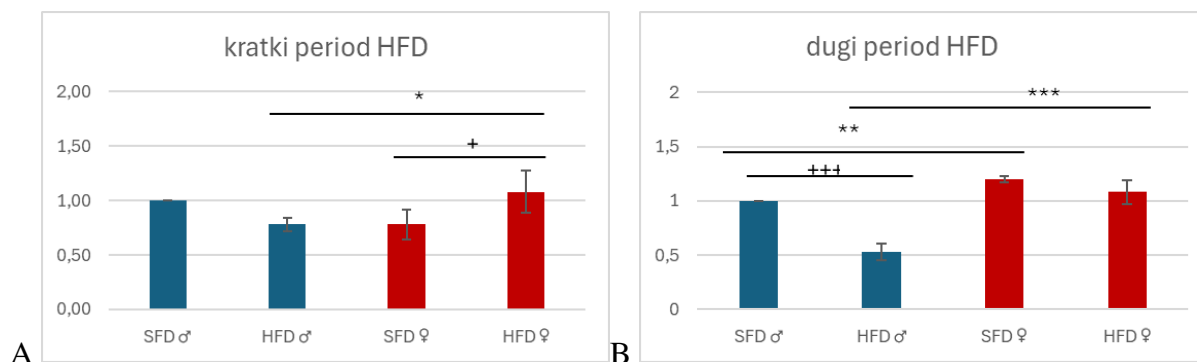


Slika 21. Grafički prikaz ekspresije ATP5A (kompleks V) u NOD miševa oba spola kratkotrajnog hranjenja SFD i HFD prehranom. + $p < 0,05$, HFD vs. SFD (A) i dugotrajnog hranjenja SFD i HFD prehranom. + $p < 0,05$, +++ $p < 0,001$ HFD vs. SFD; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ženke vs. mužjaci (B). Dvosmjerna Anova s Bonferonni korekcijom je provedena kako bi se utvrdio efekt spola odnosno prehrane u jetri miševa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardno odstupanje. N = 3 uzorka po grupi.

S druge strane, u slučaju duljeg trajanja ishrane HFD-om, uočena je značajna povezanost između hranjenja i spola (Slika 21B). Ženske imaju značajno višu ekspresiju kompleksa V u odnosu na mužjake u SFD (** $p < 0,01$) i HFD uvjetima (** $p < 0,001$). HFD ishrana je uzrokovala značajno nižu ekspresiju kompleksa V i to u većoj mjeri kod mužjaka (+++ $p < 0,001$) i manjoj mjeri kod ženki (+ $p < 0,05$).

UQCRC2 (kompleks III)

Ekspresija UQCRC2 (citokrom b-c1 kompleks podjedinica 2, engl. *cytochrome b-c1 complex subunit 2*, kompleks III) za kratkog perioda hranjenja HFD prehranom prikazana je na slici 22A. Uočena je značajna povezanost između hranjenja i spola tijekom kratkog perioda hranjenja ($p < 0,01$). Također je uočena značajno viša ekspresija kompleksa III u ženki u odnosu na mužjake u HFD uvjetima (* $p < 0,05$). HFD prehrana je uzrokovala značajno nižu ekspresiju kompleksa III u oba spola (+ $p < 0,05$).

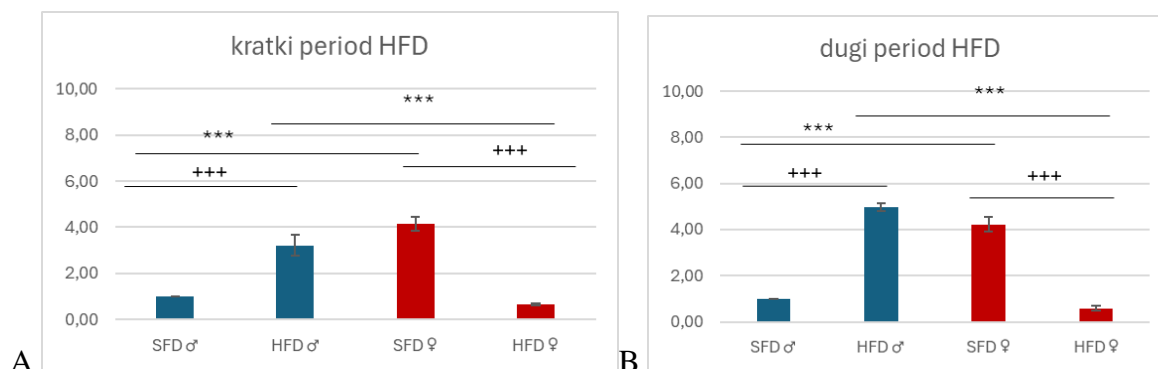


Slika 22. Grafički prikaz ekspresije UQCRC2 (kompleks III) u NOD miševa oba spola kratkotrajnog hranjenja SFD i HFD prehranom. $+p<0,05$ HFD vs. SFD; $*p<0,05$, $***p<0,001$ ženke vs. mužjaci (A) i dugotrajnog hranjenja SFD i HFD prehranom. $+++p<0,001$ HFD vs. SFD; $**p<0,01$, $***p<0,001$ ženke vs. mužjaci (B). Dvosmjerna Anova s Bonferonni korekcijom je provedena kako bi se utvrdio efekt spola odnosno prehrane u jetri miševa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardno odstupanje. N = 3 uzorka po grupi.

U slučaju hranjenja HFD ishranom u duljem periodu, uočena je značajna povezanost između hranjenja i spola ($p<0,01$) (slika 22B). Ženke imaju znatno višu ekspresiju kompleksa III u odnosu na mužjake u SFD ($**p<0,01$) i HFD uvjetima ($***p<0,001$). HFD ishrana je prouzrokovala značajno nižu ekspresiju kompleksa III samo kod mužjaka ($+++p<0,001$).

NDUFA9 (kompleks I)

Ekspresija proteina NDUFA9 (NADH dehidrogenaza (ubikvinon) 1 alfa podkompleks podjedinica 9, engl. *NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex subunit 9*, kompleks I) za vrijeme trajanja hranjenja HFD prehranom u kratkom periodu je prikazana na slici 23A. Opažena je razlika između hranjenja i spola tijekom kratkog perioda hranjenja HFD prehranom ($p<0,001$). Uočena je značajno viša ekspresija kompleksa I u ženki u odnosu na mužjake u SFD uvjetima ($***p<0,001$) i značajno niža ekspresija u HFD uvjetima ($***p<0,001$). HFD ishrana je uzrokovala značajno nižu ekspresiju kompleksa I kod mužjaka ($+++p<0,001$) i značajno nižu ekspresiju C1 kod ženki ($+++p<0,001$).

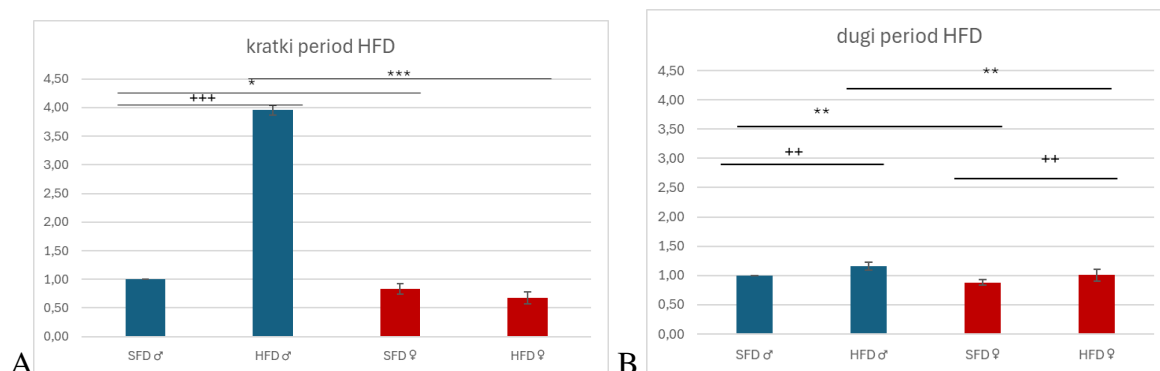


Slika 23. Grafički prikaz ekspresije NDUFA9 (kompleks I) u NOD miševa oba spola kratkotrajnog hranjenja SFD i HFD prehranom. +++ $p < 0,001$ HFD vs. SFD; *** $p < 0,001$ ženke vs. mužjaci (A) i dugotrajnog hranjenja SFD i HFD prehranom. +++ $p < 0,001$ HFD vs. SFD; *** $p < 0,001$ ženke vs. mužjaci (B). Dvosmjerna Anova s Bonferonni korekcijom je provedena kako bi se utvrdio efekt spola odnosno prehrane u jetri miševa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardno odstupanje. N = 3 uzorka po grupi.

Za vrijeme trajanja dužeg perioda hranjenja HFD prehranom, uočena je značajna povezanost hranjenja i spola ($p < 0,001$) (Slika 23B). Ženke pokazuju značajno više ekspresiju kompleksa I u odnosu na mužjake u SFD (** $p < 0,001$) i značajno nižu ekspresiju u HFD uvjetima (** $p < 0,001$). HFD ishrana je uzrokovala značajno višu ekspresiju kompleksa I kod mužjaka (+++ $p < 0,001$) i značajno nižu ekspresiju kompleksa I u ženki (+++ $p < 0,001$).

COX-IV (kompleks IV)

Ekspresija COX-IV (citokrom c oksidaza, engl *cytochrome c oxidase*, kompleksa IV) za vrijeme kratkotrajnog hranjenja HFD prehranom je prikazana na slici 24A. Uočena je značajna povezanost između hranjenja i spola tijekom kratkog perioda hranjenja ($p < 0,001$). Uočena je i značajno niska ekspresija kompleksa IV u ženki u usporedbi s mužjacima u SFD uvjetima (* $p < 0,05$) i značajno niža ekspresija u HFD uvjetima (** $p < 0,001$). HFD ishrana je uzrokovala znatno višu ekspresiju kompleksa IV u mužjaka (+++ $p < 0,001$).



Slika 24. Grafički prikaz ekspresije COX-IV (kompleks IV) u NOD miševa oba spola kratkotrajnog hranjenja SFD i HFD prehranom. +++ $p < 0,001$ HFD vs. SFD; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ ženke vs. mužjaci (A) i dugotrajnog hranjenja SFD i HFD prehranom. ++ $p < 0,01$ HFD vs. SFD; ** $p < 0,01$ ženke vs. mužjaci (B). Dvosmjerna Anova s Bonferonni korekcijom je provedena kako bi se utvrdio efekt spola odnosno prehrane u jetri miševa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardno odstupanje. N = 3 uzorka po grupi.

U slučaju dužeg trajanja HFD prehrane (Slika 24B), za kompleks IV nije uočena povezanost između hranjenja i spola. Ženke imaju značajno nisku ekspresiju kompleksa IV u odnosu na mužjake bez obzira na prehranu (** $p < 0,01$). HFD ishrana je uzrokovala značajno višu ekspresiju kompleksa IV u oba spola (** $p < 0,01$).

§ 5. RASPRAVA

U ovom istraživanju uspoređivan je oksidativni i antioksidativni profil između grupa miševa hranjenih prehranom s povišenim udjelom masti u kraćem periodu (6 tjedana) i duljem periodu (6 mjeseci) u usporedbi s pripadajućim kontrolama hranjenim standardnom prehranom. Cilj je bio vidjeti postoje li spolne razlike u odgovoru na kraći, odnosno dulji period hranjenja s HFD kako bi se objasnio utjecaj prehrane na oksidativni stres i antioksidativnu obranu, kao i na ekspresiju ključnih proteina u metabolizmu lipida i mitohondrijske funkcije u uzrocima jetri ženki i mužjaka NOD miševa. Analiza parametara oksidativnog oštećenja pokazala je da prehrana s visokim udjelom masti uzrokuje oksidativna oštećenja već nakon kraćeg perioda hranjenja s HFD u jetri mužjaka i ženki NOD miševa. Isti efekt je prisutan i nakon duljeg perioda hranjenja s HFD. To ukazuju i potvrđuju već postojeća istraživanja koja pokazuju da prehrana s visokim udjelom masti uzrokuje povećanje oksidativnog stresa i kao posljedicu oksidativno oštećenje proteina. Određivanjem oštećenja lipida, odnosno lipidne peroksidacije, pokazana je ista stvar u kratkom periodu hranjenja HFD gdje je došlo do povećanja oštećenja lipida i kod mužjaka i kod ženki u jetri NOD miševa. Ovi rezultati ukazuju na potencijal HFD da uzrokuje oksidativni stres i oksidativna oštećenja. Kako bi se organizam nosio s uzročnicima oksidativnog stresa, on aktivira antioksidativnu obranu, prije svega u obliku antioksidativnih enzima. Stoga su u ovom istraživanju određene aktivnosti glavnih antioksidativnih enzima, katalaze i superoksid–dismutaze. Mužjaci nakon kratkog perioda HFD pokazuju značajno smanjenje MnSOD-a i nepromijenjen CuZnSOD, a pokazuju značajno višu aktivnost katalaze. Međutim, iako dolazi do upregulacije katalaze, ta antioksidativna obrana nije dovoljna da spriječi oštećenja proteina i lipida kako je pokazala analiza karbonilacije i lipidne peroksidacije. Nadalje, nakon duljeg perioda hranjenja s HFD, kod mužjaka NOD miševa dolazi do povećanja CuZnSOD-a i jakog povećanja aktivnosti katalaze koje nije dovoljno da spriječi oštećenje proteina, ali su zato oštećenja lipida manja u odnosu na standardnu prehranu. Ženke NOD miševa hranjene različitim periodima HFD pokazuju puno manje promjena u aktivnosti antioksidativnih enzima SOD i katalaze. Zanimljivo je uočiti kako nakon duljeg hranjenja s HFD nema nikakvih značajnih promjena u aktivnosti antioksidativnih enzima, dok nakon kraćeg perioda HFD dolazi do povećanja

CuZnSOD aktivnosti, ali također i do smanjenja aktivnosti katalaze. S obzirom na navedene promjene u aktivnostima antioksidativnih enzima kod ženki, nije čudno što dolazi do povećanog oštećenja i lipida i proteina uslijed kratkotrajnog, a također i dugotrajnog hranjenja s HFD.

Uspoređivanjem aktivnosti antioksidativnih enzima i oštećenja te utjecaja spola, uočeno je da ženke imaju niža oštećenja proteina u odnosu na mužjake na standardnoj prehrani te nakon duljeg perioda hranjenja s HFD. Nadalje, ženke imaju i niža oštećenja lipida na standardnoj prehrani, ali nakon duljeg perioda hranjenja s HFD pokazuju značajno veća oštećenja nego mužjaci na istoj hrani. Značajno više oštećenje lipida nakon duljeg hranjenja s HFD bi moglo biti posljedica izostanka povećanja aktivnosti antioksidativnih enzima nakon duljeg hranjenja s HFD. Ovo istraživanje pokazuje da postoji velika razlika u odgovoru na prehranu s visokim udjelom masti s obzirom na spol i duljinu trajanja prehrane.

Antioksidativni enzimi analizirani su i na proteinskom nivou, te iako postoje značajne razlike s obzirom na prehranu, duljina trajanja prehrane i spol, razina ekspresije često ne prati aktivnost samih proteina, što ukazuje na važnost određivanja aktivnosti, a ne samo ekspresije proteina.

Analiza proteina koji sudjeluju u aktivaciji mitohondrijske biogeneze (PGC1 α), te metabolizmu masti (PPAR γ , FASN, HADHB i Sirt3) pokazuju značajne razlike ovisno o prehrani, spolu i duljini trajanja tretmana. Prehrana s visokim udjelom masti se pokazala jakim aktivatorom mitohondrijske biogeneze, potičući ekspresiju PGC1 α . kod mužjaka, dok se kod ženki bilježi niža ekspresija PGC1 α , no ženke općenito imaju viši postotak masti u organizmu, što može biti razlog pojačane ekspresije gena uključenih u metabolizam lipida i drugih mitohondrijskih funkcija. PPAR γ pokazuje znatno nižu ekspresiju u HFD kod mužjaka neovisno o trajanju, a zanimljivo je kako kod ženki nema promjene u ekspresiji te također pokazuju znatno višu ekspresiju u odnosu na mužjake u HFD: Viša ekspresija PPAR γ u ženki u HFD uvjetima ukazuje da ženke imaju veći potencijal adipogeneze i bolju osjetljivost na inzulin povećanjem skladištenja masnih kiselina u masnim stanicama (smanjujući lipotoksičnost). Povećana sinteza masti pokazana je povećanom ekspresijom FASN-a u HFD kod svih skupina osim u ženki nakon kratkotrajnog hranjenja s HFD, gdje je zato povećana oksidacija masnih kiselina što se vidi iz povećane ekspresije HADHB, povećavajući skladištenje masnih kiselina u masnim stanicama (smanjuje lipotoksičnost). Sirtuin 3, glavna mitohondrijska deacetilaza i regulator mnogih mitohondrijskih proteina uključenih u

metabolizam lipida i glukoze, pokazuje različitu ekspresiju u odnosu na spol i prehranu s visokim udjelom masti. Dok kod mužjaka nakon kratkotrajnog hranjenja s HFD dolazi do povećanja ekspresije, kod ženki dolazi do smanjenja ekspresije s tretmanom HFD. Zanimljivo, nakon dugotrajnog hranjenja s HFD ekspresija Sirt3 je u potpunosti inverzna – kod mužjaka dolazi do smanjenja ekspresije dok kod ženki dolazi do povećanja na HFD. Ovaj rezultat ukazuje na složenu regulaciju ekspresije Sirt3 obzirom na duljinu trajanja hranjenja s HFD i obzirom na spol.

U slučaju mitohondrijskih kompleksa oksidativne fosforilacije, zabilježena je pojačana ekspresija kompleksa I i IV u HFD ishrani kod mužjaka, dok je u kompleksima II, III i V opažena snižena ekspresija u slučaju HFD hranjenja. Ženke pak pokazuju nižu ekspresiju svih kompleksa u HFD uvjetima osim kompleksa IV, što ukazuje na kompleksan i značajan međuodnos spola i ishrane. Ženke u slučaju kompleksa I i II pokazuju nižu ekspresiju u HFD uvjetima od mužjaka, dok je ekspresija kompleksa III, IV i V povišena u HFD uvjetima u usporedbi s mužjacima.

Ženke su se pokazale nestabilnije u odnosu na mužjake, odnosno češće razvijaju dijabetes od mužjaka na standardnoj hrani, zbog čega se vrijednosti aktivnosti i ekspresije proteina i oštećenja u SFD uvjetima za ženke razlikuju. Obzirom da dijabetes remeti čitav niz fizioloških i molekularno bioloških parametara, moguće je da kod njih dolazi do odstupanja na standardnoj prehrani koja je prepuna ugljikohidrata. HFD svakako uzrokuje veći postotak dijabetesa i kod mužjaka i kod ženki i to već nakon kratkog perioda HFD, no na SFD je svakako više ženki razvilo dijabetes od mužjaka, ali obzirom na to da razvijaju dijabetes sa starenjem, moguće da je to uzrok zašto se rezultati razlikuju za ženke na SFD prehrani u kratkom i dugom periodu.

§ 6. ZAKLJUČAK

Rezultati svih analiza dokazuju tezu da postoji utjecaj spola i prehrane na razinu oksidacijskog stresa, oštećenje proteina i lipida te aktivnosti enzima uključenih u antioksidativnu obranu i na kraju na ekspresiju različitih proteina uključenih u metabolizam i obranu od različitih reaktivnih vrsta koje uzrokuju štetu u organizmu. Oštećenja se bilježe uz oba spola, iako kod ženki nešto više nego kod mužjaka, dok je utjecaj HFD prehrane na oštećenje proteina, povećanu aktivnost antioksidativnih enzima i pojačanu ekspresiju proteina uključenih u obranu organizma neupitan i uzrokuje pojačanu ekspresiju enzima uključenih u antioksidativnu obranu te proteina koji sudjeluju u metaboličkim procesima s ciljem održavanja homeostaze u organizmu. Analize pokazuju potrebu za individualnim pristupom u razvoju terapije prilikom tretiranja različitih metaboličkih poremećaja uzrokovanih prehranom, jer su spolno uzrokovane razlike zajedno s prehranom bogatom mastima nedvojbene.

§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ATP5A – F1 alfa podjedinica ATP-sintaze (engl. *ATP synthase F1 subunit alpha*)

BCA – bicinkonična kiselina (engl. *bicinchoninic acid*)

CAT – katalaza (engl. *catalase*)

COX-IV – citokrom c oksidaza (engl. *cytochrome c oxidase*)

DMT1 – šećerna bolesti tipa 1 (engl. *diabetes mellitus type 1*)

DMT2 – šećerna bolest tipa 2 (engl. *diabetes mellitus type 2*)

DNP – dinitrofenilhidrazon

DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazin

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

ECL – kemiluminescentni supstrat (engl. *enhanced chemiluminescence*)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

ELISA – imunoenzimski test (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

FASN – sintaza masnih kiselina (engl. *fatty acid synthase*)

GTT – test tolerancije na glukozu (engl. *glucose tolerance tests*)

HADHB – hidroksiacil-CoA dehidrogenaza trifunkcijskog multienzimskog kompleksa podjedinica beta (engl. *Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Trifunctional Multienzyme Complex Subunit Beta*)

HFD – prehrana s visokim udjelom masti (engl. *high fat diet*)

4-HNE – 4-hidroksinonenal

IDDM – šećerna bolest ovisna o inzulinu (engl. *insulin dependent diabetes mellitus*)

IL-6 – interleukin 6

I.N.T. – 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolij-klorid

ITT – test tolerancije na inzulin (engl. *insulin tolerance tests*)

KDP – (engl. *Komeda diabetes prone*)

MCP-1 – monocitni kemotaktični orotein 1 (engl. *monocyte chemoattractant protein 1*)

MDA – malondialdehid

MHC – glavni histokompatibilni kompleks (engl. *major histocompatibility complex*)

NAC – N-acetilcistein

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

- NAFLD – nealkoholna masna jetra (engl. *non-alcoholic liver disease*)
- NDUFA9 – NADH dehidrogenaza (ubikvinon) 1 alfa podkompleks podjedinica 9 (engl. *NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex subunit 9*)
- NIDDM – inzulin-neovisan dijabetes (engl. *non-insulin dependent diabetes mellitus*)
- NIH – Nacionalni institut za zdravlje (engl. *The National Institute of Health*)
- NOD – (engl. *non-obese diabetic*)
- PBS – fosfatni pufer (engl. *phosphate buffer saline*)
- PGC1 α – peroksisomalni koaktivator 1 α receptora aktiviranog proliferatorom (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1-alpha*)
- PPAR γ – peroksisomalni receptor gama aktiviran proliferatorom (engl. *peroxisome proliferator activated receptor gamma*)
- PUFAs – višestruko nezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acids*)
- PVDF – polivinil difluorid
- RIPA – (engl. *radioimmunoprecipitation assay buffer*)
- ROS – reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)
- SDH-A – kompleks sukcinat dehidrogenaze podjedinica A, engl. *succinate dehydrogenase complex, subunit A*)
- SDS – natrijev dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*)
- SDS – PAGE – denaturirajuća elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (engl. *sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis*)
- SFD – prehrana sa standardnim udjelom masti (engl. *standard-fat diet*)
- SIRT3 – mitohondrijska deacetilaza, sirtuin 3
- SOD – superoksid-dismutaza (engl. *superoxide dismutase*)
- TBA – tiobarbiturna kiselina (engl. *thiobarbituric acid*)
- TBARS – reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (engl. *thiobarbituric acid reactive substances*)
- TMP – 1,1,3,3-tetrametoksipropanon
- TMB – tetrametilbenzidin (engl. *tetramethylbenzidine*)
- TNF- α – tumorski faktor nekroze α (engl. *tumor necrosis factor α*)
- UQCRC2 – citokrom b-c1 kompleks podjedinica 2 (engl. *cytochrome b-c1 complex subunit 2*)
- XOD – ksantin oksidaza (engl. *xantine oxidase*)

§ 8. LITERATURNI IZVORI

1. American Diabetes Association. “*Diagnosis and classification of diabetes mellitus.*” *Diabetes care* Vol. 32 Suppl 1 (2009) str. 62-7.
2. B. Draznin, V.R. Aroda, G. Bakris, G. Benson, F.M. Brown, R. Freeman, J. Green, E. Huang, D. Isaacs, S. Kahan, et al. *Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. Diabetes Care* 2022, **45**, str. 17–38.
3. L.A. DiMeglio, C. Evans-Molina, R.A. Oram, Type 1 Diabetes. *Lancet* 2018, **391**, str. 2449–2462.
4. K.G. Alberti, P.Z. Zimmet, Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998, **15** (7), str. 539-553.
5. Committee of the Japan Diabetes Society on the Diagnostic Criteria of Diabetes Mellitus et al. “Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus.” *J. Diabetes Invest.* vol. 1,5 (2010), str. 212-28.
6. L.J. Andes, Y.J. Cheng, D.B. Rolka, E.W. Gregg, G. Imperatore, Prevalence of Prediabetes Among Adolescents and Young Adults in the United States, 2005-2016. *JAMA Pediatr.* 2020, **174**(2).
7. <https://www.niddk.nih.gov/health-information/health-statistics/diabetes-statistics> (datum pristupa 27.05.2024.)
8. E.K. Sims, L.J.A. Carr, A.R. Oram, L.A. DiMeglio, C. Evans-Molina, 100 years of insulin: celebrating the past, present and future of diabetes therapy. *Nature medicine*, (2021), **27**(7), str. 1154–1164.
9. D.A. Tur, N.V. Khotskin, A.E. Akulov, Sex difference feeding behaviour of NOD SCID mice in a pharmacological model of type 1 diabetes, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* (2021), **105** (5), str. 984-988.
10. R.D. Leslie, C. Evans-Molina, J. Freund-Brown et al., Adult-Onset Type 1 Diabetes: Current Understanding and Challenges. *Diabetes Care.* 2021, **44**(11), str. 2449-2456.
11. J.N. Todd, S. Srinivasan, T.I. Pollin, Advances in the Genetics of Youth-Onset Type 2 Diabetes. *Curr Diab Rep* **18**, 57 (2018),

12. C.M. Cherian, H.R. Reeves, D. De Silva et al, Consideration of sex as a biological variable in diabetes research across twenty years. *Biol Sex Differ* **15**, 19 (2024).
13. S. Fang, Z. Patel, M.D. Paoli, G.H. Werstuck, Sex Differences in the Development of Hyperglycemia in Rodent Models of Diabetes and Obesity. *J Diab Res Ther*, 2022, **7**(1).
14. X. Peng, G. Rao, X. Li, N. Tong, Y. Tian, X. Fu, Preclinical models for Type 1 Diabetes Mellitus - A practical approach for research. *Int J Med Sci*. 2023, **20**(12), str. 1644-1661.
15. A. J. King, The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol*. 2012; **166** (3), str. 877-894.
16. D. Chen, T.C. Thayer, L. Wen, F.S. Wong, Mouse Models of Autoimmune Diabetes: The Nonobese Diabetic (NOD) Mouse. *Methods Mol Biol*. 2020; **2128**, str. 87-92.
17. W. Dröge, Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 2002; **82**, str. 47–95.
18. T.L. Merry, M. Ristow, Mitohormesis in exercise training. *Free Radic. Biol. Med.* 2016; **98**, str. 123–130.
19. B. Halliwell, Free radicals and antioxidants – quo vadis?, *Trends Pharmacol. Sci.* , Vol 32 (3), 2011, str. 125-130.
20. C.J. Weydert, J.J. Cullen. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature protocols* vol. 5,1 (2010), str. 51-66.
21. H. Yin et al. “Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis.” *Chemical reviews* vol. 111,10 (2011), str. 5944-72.
22. A. Phaniendra, D.B. Jestadi, L. Periyasamy, Free radicals: Properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J. Clin. Biochem.* 2015; **30**, str. 11–26.
23. M.A. Darenskaya et al. “Oxidative Stress: Pathogenetic Role in Diabetes Mellitus and Its Complications and Therapeutic Approaches to Correction.” *Bull. Exp. Biol. Med.* vol. 171,2 (2021), str. 179-189.
24. I. Dalle-Donne, D. Giustarini, R. Colombo et al. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med*. 2003; **9**(4), str. 169–176.
25. M. Knaś, M. Maciejczyk, I. Daniszewska, A. Klimiuk, J. Matczuk, U. Kołodziej, D-Waszkiel, J. Ladny, M. Zendzian-Piotrowska, A. Zalewska, Anna, Oxidative Damage to the Salivary Glands of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes-Temporal Study: Oxidative Stress and Diabetic Salivary Glands. *J. Diabetes Res*. 2016. str. 1-13.

26. M. Hecker, A.H. Wagner. "Role of protein carbonylation in diabetes." *J. Inherited Metab. Dis.* vol. 41,1 (2018): str. 29-38.
27. G. Colombo et al. "A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples." *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* vol. 1019 (2016): str. 178-190.
28. I. Dalle-Donne et al. "Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression." *J. Cell. Mol. Med.* vol. 10,2 (2006), str. 389-406.
29. R.G. Cutler, Oxidative stress and aging: Catalase is a longevity determinant enzyme. *Rejuvenation Res.* 2005; 8(3), str. 138-140.
30. D.E. Heck et al. "Mechanisms of oxidant generation by catalase." *Ann. N. Y. Acad. Sci.* vol. 1203 (2010), str. 120-125.
31. D. Scibior, H. Czczot. Catalase: structure, properties, functions. *Postepy Hig. Med. Dosw.* vol. 60 (2006), str. 170-180.
32. I.N. Zelko et al. "Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression." *Free Radical Biol. Med.* vol. 33,3 (2002), str. 337-349.
33. E.K. Hodgson, I. Fridovich. "Reversal of the superoxide dismutase reaction." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* vol. 54,1 (1973), str. 270-274.
34. J. Zlatković, D. Filipović. "Stress-induced alternations in CuZnSOD and MnSOD activity in cellular compartments of rat liver." *Mol. Cell. Biochem.* vol. 357,1-2 (2011): str. 143-150.
35. C.M.C. Andrés, J.M. Pérez de la Lastra, C. Andrés Juan, F.J. Plou, E. Pérez-Lebeña, Superoxide Anion Chemistry-Its Role at the Core of the Innate Immunity. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(3), 1841
36. J.M. McCord, I. Fridovich, I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 1968, 243 (21), str. 5753-5760.
37. L.B. Campos-Shimada, E. Hideo Gilglioni, R. Fernandes Garcia, E. Rizato Martins-Maciel, E. Luiza Ishii-Iwamoto, C. Luzia Salgueiro-Pagadigorria, Superoxide dismutase: a review and a modified protocol for activities measurements in rat livers. *Arch. Physiol. Biochem.*, (2020) 126(4), str. 292-299.
38. R. Buettne et al., High-fat diet-induced obesity mice models: metabolic and inflammatory aspects. *Endocrinology*, (2007) 148(11), str. 5415-5423.

39. M.S. Winzell, B. Ahrén, The high-fat diet–fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes*, (2004) 53 (Suppl 3), str. 215-219.
40. N. Hariri, L. Thibault, High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr. Res. Rev.* (2010) 23(2), str. 270-299.
41. A. Heydemann, “An Overview of Murine High Fat Diet as a Model for Type 2 Diabetes Mellitus.” *J. Diabetes Res.* vol. 2016 (2016): 2902351.
42. M. Doulberis et al. “Rodent models of obesity.” *Minerva endocrinol.* vol. 45,3 (2020), str. 243-263.
43. M.E. Walsh, Y. Shi, H. Van Remmen, The effects of dietary restriction on oxidative stress in rodents, *Free Radic. Biol. Med.* (2014), 66, str. 88-99.
44. A.J. Anderson et al, "Mitochondrial reactive oxygen species mediate lipid peroxidation but not inflammation in obese mice" (2009). *J. Clin. Invest.* 119(5), str. 573-581.
45. C.F. Liang et al., "NADPH oxidase and mitochondrial reactive oxygen species: a cross-talk in the signaling pathways of angiotensin II-induced hypertrophy and fibrosis in rat cardiomyocytes" (2013). *Cell. Signalling*, 25(2), str. 310-318.
46. M. Mittal et al. "Inflammation and oxidative stress: the molecular connectivity" (2014). *Mediators Inflammation*, 2014, 610856.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Marina Serenčeš

Datum rođenja: 20. svibnja 1997.

Mjesto rođenja: Vinkovci

Obrazovanje

2004.–2012. Osnovna škola August Cesarec, Ivankovo

2012.–2016. Srednja škola Gimnazija Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci

2016.–2022. Preddiplomski studij kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2022.–2024. Diplomski studij kemije, smjer: analitička kemija i biokemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2016., 2017., 2018. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka (Dan i noć na PMF-u)

2022. Smotra Sveučilišta u Zagrebu