

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Miloš M. Đorđević

**MOLEKULARNI MEHANIZMI  
ANTIOKSIDATIVNOG DEJSTVA EKSTRAKTA  
KIČICE (*CENTAURIUM ERYTHRAEA* RAFN) U  
EKSPERIMENTALNOM MODELU DIJABETESA  
PACOVA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Miloš M. Đorđević

**MOLECULAR MECHANISMS OF THE  
ANTIOXIDATIVE EFFECT OF CENTAURY  
(*CENTAURIUM ERYTHRAEA* RAFN) EXTRACT IN  
THE EXPERIMENTAL MODEL OF DIABETES IN  
RATS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

## MENTORI

**dr Svetlana Dinić**, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

Univerzitet u Beogradu

**dr Melita Vidaković**, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković",

Univerzitet u Beogradu

## KOMISIJA

**dr Svetlana Dinić**, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

Univerzitet u Beogradu

**dr Melita Vidaković**, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković",

Univerzitet u Beogradu

**dr Gordana Matić**, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Odeljenju za molekularnu biologiju Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta "Signalni molekuli u dijabetesu: identifikacija potencijalnih bioloških markera uključenih u modifikaciju i integraciju signalnih puteva u cilju predikcije i intervencije u dijabetesu"; potprojekat "Genetska predispozicija za razvoj dijabetesa tip 1 i novi pristupi u prevenciji disfunkcije  $\beta$ -ćelija u dijabetesu: izučavanje puteva prenosa signala posredovanih CXCL12" (OI173020), finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

## **Izjava zahvalnosti**

*Mojoj mentorki, dr Svetlani Dinić, dugujem neizmernu zahvalnost na strpljenju, posvećenosti i entuzijazmu, na nesebičnom deljenju znanja i trudu uloženom od prvog eksperimenta do poslednje tačke kojom je ova disertacija dobila svoj konačni oblik. Zahvalan sam Vam na iskrenoj i prijateljskoj podršci i verovanju u moje sposobnosti. Bili ste mi vetar u leđa onda kada je bilo najpotrebnije. Hvala na svim korisnim savetima i kritikama koje su od mene načinile boljeg naučnika i pre svega bolju osobu.*

*Veliku zahvalnost dugujem mentorki dr Meliti Vidaković na tome što mi je ukazala poverenje i primila u svoj naučni tim kao i na korisnim idejama i stručnim sugestijama tokom izrade i pisanja ove teze.*

*Prof. dr Gordani Matić hvala za svu pomoć i preneto znanje tokom studiranja, na uvođenju u svet molekularne biologije i širenju naučnih vidika i za svu iskrenu podršku tokom prethodnih godina.*

*Dr Goranu Poznanoviću dugujem veliku zahvalnost na otvorenim vratima Laba 27 i ukazanom poverenju da budem deo projekta 173020. Hvala i za sve nenaučne diskusije koje su mi pomogle da bar na kratko odvratim misli od puta koji je bio preda mnom a koji se sada polako bliži kraju.*

*Dr Neveni Grdović, dr Mirjani Mihailović, dr Aleksandri Uskoković i dr Jeleni Arambašić Jovanović veliko hvala za svu pomoć pri realizaciji eksperimentalnog dela teze, na uvođenju u rad u ćelijskoj kulturi i rad sa životinjama i tumačenju dobijenih rezultata, na prijatnim razgovorima, podršci i lepoj saradnji.*

*Dr Danijeli Mišić i dr Branislavu Šileru dugujem zahvalnost za prikupljanje biljnog materijala, pripremi ekstrakta i njegovoj analizi, kao i na stručnim komentarima u vezi sa jedinjenjima prisutnim u istom.*

*Dr Svetlani Ivanović-Matić, dr Ilijani Grigorov, dr Desanki Bogojević, dr Vesni Martinović i Tatjani Milićević hvala na svim korisnim savetima, dobroj atmosferi i osmehu u laboratoriji.*

*Dr Nataši Nestorović zahvaljujem na konstruktivnim sugestijama tokom pripreme rezultata imunohistohemijskog bojenja.*

*Anji dugujem posebnu zahvalnost jer smo zajedno krenuli u ovu priču i zajedno je privodimo kraju. Bilo mi je veliko zadovoljstvo prolaziti sa tobom ovaj put.*

*Joksi i Mari veliko hvala za svaki minut proveden zajedno u labu i van njega, na divnom i iskrenom prijateljstvu. Sa vama je rad bio mnogo zabavniji. Čekam vas sa druge strane.*

*Željku, Ireni, Mileni, Anji P, Sofiji, Sanji, Ljupki, hvala na podršci i što boravak na Institutu čine prijatnim i zabavnim. Lepo je imati takve prijatelje.*

*Zahvaljujem svojoj porodici na podršci i razumevanju koje mi pružaju svih ovih godina.*

*Mojim devojkama, Tanji i Niki, bez kojih sve ovo ne bi imalo nikakvog smisla. Hvala vam do neba!!! A&F*

*Miloš Đorđević*

*Jul 2019.*

# **Molekularni mehanizmi antioksidativnog dejstva ekstrakta kičice (*Centaurium erythraea* Rafn) u eksperimentalnom modelu dijabetesa pacova**

## **Sažetak**

Kičica se u Srbiji tradicionalno koristi za lečenje različitih oboljenja, uključujući i dijabetes. Cilj ovog rada bio je rasvetljavanje mehanizama antioksidativnog i protektivnog dejstva ekstrakta kičice (EK) koji doprinose očuvanju strukture i funkcije  $\beta$ -ćelija pankreasa i ublažavanju komplikacija u dijabetesu. Efekti EK analizirani su na eksperimentalnom modelu dijabetesa pacova izazvanom streptozotocinom (STZ) kao i na Rin-5F  $\beta$ -ćelijama izloženim oksidativnom stresu primenom vodonik peroksida, natrijum nitroprusida ili STZ-a. EK je ispoljio antidijabetogeno dejstvo uočeno kao sniženje nivoa glukoze/glikohemoglobina, poboljšanje lipidnog statusa i povećanje nivoa insulina u cirkulaciji dijabetičnih pacova što se može pripisati detektovanom uticaju EK na očuvanje strukture Langerhansovih ostrvaca i povećanju mase  $\beta$ -ćelija koje proizvode insulin. Antioksidativni efekat EK na  $\beta$ -ćelije ogledao se u redukovanju oksidativnih oštećenja, modulisanju aktivnosti i ekspresije enzima antioksidativne zaštite (CAT, SOD, GPx i GR) i uravnotežavanju aktivnosti redoks-senzitivnih faktora (NF $\kappa$ B, Nrf-2, Sp1, FOXO3A) uključenih u regulaciju transkripcije gena za antioksidativne enzime. Dodatni doprinos EK boljem preživljavanju  $\beta$ -ćelija i sekreciji/ekspresiji insulina ostvaren je finim promenama u aktivnosti Akt, ERK i p38 kinaza kao i PDX-1 i MafA proteina. Pored toga, antioksidativni efekat EK kod dijabetičnih životinja ogledao se u zaštiti eritrocita, jetre i bubrega od gliko-oksidativnih oštećenja što je doprinelo poboljšanju njihovih funkcionalnih parametara. Opisani efekti EK ukazuju na značaj daljeg razjašnjavanja mehanizama antioksidativnog i protektivnog dejstva EK i njegovih komponenti u cilju potencijalnog terapijskog delovanja u dijabetesu.

**Ključne reči:** kičica, diabetes, pankreas,  $\beta$ -ćelije, oksidativni stres, reaktivne vrste kiseonika/azota, antioksidativna zaštita, polifenoli, komplikacije bolesti

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Molekularna biologija



# **Molecular mechanisms of the antioxidative effect of centaury (*Centaureum erythraea* Rafn) extract in the experimental model of diabetes in rats**

## **Abstract**

Centaury is traditionally used in Serbia for treating different diseases, including diabetes. This study aimed to elucidate the mechanisms of the antioxidant and protective effects of the centaury extract (CE) that preserve the structure and function of pancreatic  $\beta$ -cells and alleviate diabetic complications. The effects of the CE were analyzed on the experimental model of streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats and in Rin-5F  $\beta$ -cells exposed to oxidative stress after exposure to hydrogen peroxide, sodium nitroprusside or STZ. The CE exhibited an anti-diabetic effect, observed as a decrease in hyperglycemia and glycohemoglobin concentration, an improved lipid status, and as increased insulin level in the circulation of diabetic rats. These effects can be attributed to the detected impact of the CE on the preservation of the structure of the islets of Langerhans, and on the increase in insulin producing  $\beta$ -cell mass. The antioxidant effect of the CE on  $\beta$ -cells was manifested as a reduction in oxidative damage, changed activities and expression of antioxidant enzymes, CAT, SOD, GPx and GR, and as a readjustment of the activities of redox-sensitive factors, NF $\kappa$ B, Nrf-2, Sp1, FOXO3A, involved in the regulation of gene transcription of antioxidant enzymes. Additional contributions of the CE to improved  $\beta$ -cell survival and insulin secretion/expression were achieved by the fine-tuning of the activities of Akt, ERK and p38 kinases and transcription regulators, PDX-1 and MafA. The antioxidant effect of the CE in diabetic animals was also reflected on increased protection of erythrocytes, liver and kidneys from glyco-oxidative damage, which contributed to the improvement of their functional parameters in diabetic rats. The described effects of the CE point to the importance of further clarification of the mechanisms of the antioxidant and general protective effects of the CE and its components in view of its potential use for therapeutic intervention in diabetes.

**Key words:** centaury, diabetes, pancreas,  $\beta$ -cells, oxidative stress, reactive oxygen/nitrogen species, antioxidant protection, polyphenols, diabetic complications

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Molecular biology

## Lista skraćenica:

•O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	superoksid anjon
AGE	krajnji proizvodi glikacije, eng. <i>advanced glycation end products</i>
ALA	alfa lipoinska kiselina
ALT	alanin aminotransferaza
ARE	antioksidativni regulatorni element, eng. <i>antioxidant response element</i>
AST	aspartat aminotransferaza
BUN	azot uree u krvi, eng. <i>blood urea nitrogen</i>
CAT	katalaza
cDNK	komplementarna DNK, eng. <i>complementary DNA</i>
CML	N(ε)-(karboksimetil)lizin
CoQ10	koenzim Q10
CTGF	eng. <i>connective tissue growth factor</i>
CuZnSOD	bakar-cink superoksid dismutaza
DAG	diacil glicerol
DN	dijabetesna nefropatija
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DPPH•	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal
DT1	dijabetes tipa 1
DT2	dijabetes tipa 2
EGK	ekvivalenti galne kiseline
EK	ekstrakt kičice
EKV	ekvivalenti kvercetina
ELISA	enzimski imunoesej, eng. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ERE	elektrofilni regulatorni element, eng. <i>electrophile response element</i>
ERK	kinaza aktivirana vanćelijskim signalima, eng. <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FAD	flavin adenin dinukleotid
FC	Folin Ciocalteu reagens
FOXO	FoxO proteini, eng. <i>forkhead box O</i>

GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
GDM	gestacioni dijabetes
GLUT	glukozni transporter
GlyHb	glikozilovani hemoglobin
GPx	glutation peroksidaza
GR	glutation reduktaza
GSH	redukovani glutacion
GSIS	sekrecija insulina stimulirana glukozom, eng. <i>glucose-stimulated insulin secretion</i>
GSSG	oksidovani glutacion
GSSP	S-glutacionilovani protein
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	vodonik peroksid
Hb	hemoglobin
HbFe <sup>2+</sup> O <sub>2</sub>	oksigenisana forma hemoglobina
HbFe <sup>3+</sup>	methemoglobin
HBP	put biosinteze heksozamina, eng. <i>hexosamine biosynthesis pathway</i>
HO•	hidroksil radikal
HOCl	hipohlorna kiselina
HOO•	hidroperoksid radikal
HRP	peroksidaza rena, eng. <i>horseradish peroxidase</i>
IDF	Međunarodna federacija za dijabetes, eng. <i>International Diabetes Federation</i>
IFN	interferon
IKK	kinaza koja fosforiliše IκB
IL	interleukin
iRNK	informaciona RNK
IκB	inhibitorski protein κB, eng. <i>inhibitor of κB</i>
JNK	c-Jun N-terminalna kinaza
Keap1	Keap1 protein, eng. <i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
LDL	lipoprotein male gustine, eng. <i>low-density lipoprotein</i>
LOO•	lipidni peroksid

MafA	MafA protein, eng. <i>musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A</i>
MAPK	protein kinaza aktivirana mitogenom, eng. <i>mitogen activated protein kinase</i>
MDA	malondialdehid
MnSOD	mangan superoksid dismutaza
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NAFLD	nealkoholna masna jetra, eng. <i>non-alcoholic fatty liver disease</i>
NFκB	nuklearni faktor-κB
NO•	azot oksid
NOS	azot oksid sintaza
NOX	NAD(P)H oksidaza
Nrf-2	Nrf-2 protein, eng. <i>nuclear factor-erythroid-2-related factor 2</i>
OGA	N-acetil-glukozaminidaza (O-GlcNAza)
OGT	O-GlcNAc (β-vezani N-acetilglukozamin) transferaza
ONOO <sup>-</sup>	peroksinitrit
PARP	poli(ADP-ribozil) polimeraza
PDX-1	PDX-1 protein, eng. <i>pancreatic and duodenal homeobox factor-1</i>
PKC	protein kinaza C
PUFA	polinezasićene masne kiseline, eng. <i>polyunsaturated fatty acids</i>
RAGE	receptor za AGE
RNK	ribonukleinska kiselina
RNS	reaktivne vrste azota, eng. <i>reactive nitrogen species</i>
ROO•	peroksil radikal
ROS	reaktivne vrste kiseonika, eng. <i>reactive oxygen species</i>
SDS	natrijum dodecil sulfat
SMK	slobodne masne kiseline
SNP	natrijum nitroprusid, eng. <i>sodium nitroprusside</i>
SOD	superoksid
Sp1	Sp1 protein, eng. <i>specificity protein 1</i>
SRM	SRM analiza, eng. <i>selected reaction monitoring</i>
SSA	sulfosalicilna kiselina

STZ	streptozotocin
TBA	tiobarbiturna kiselina
TBARS	reaktivne vrste tiobarbiturne kiseline, eng. <i>thiobarbituric acid reactive substances</i>
TEA	trietanol amin
TFC	sadržaj ukupnih flavonoida
TG	trigliceridi
TGF- $\beta$	transformišući faktor rasta $\beta$ , eng. <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TNF- $\alpha$	nekrozni faktor tumora $\alpha$
TPC	sadržaj ukupnih fenola
UDP-GlcNAc	uridin difosfat N-acetilglukozamin
VLDL	lipoprotein veoma male gustine, eng. <i>very-low-density lipoprotein</i>
$\alpha$ 2M	$\alpha$ 2 makroglobulin

# Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Dijabetes.....	1
1.1.1. Tipovi dijabetesa i prateći patofiziološki procesi.....	2
1.1.2. Beta ćelije pankreasa i insulin.....	3
1.1.2.1. Sekretija insulina .....	4
1.1.2.2. Regulatori ekspresije i sekrecije insulina u $\beta$ -ćelijama .....	6
1.1.2.3. Regulacija mase $\beta$ -ćelija .....	7
1.2. Oksidativni stres u dijabetesu .....	9
1.2.1. Oksidativni stres .....	9
1.2.1.1. Reaktivne vrste kiseonika (ROS).....	11
1.2.1.2. Reaktivne vrste azota (RNS).....	12
1.2.1.3. Oksidativna oštećenja biomolekula .....	13
1.2.1.3.1. Oksidativna oštećenja molekula DNK .....	13
1.2.1.3.2. Oksidativna oštećenja lipida – Lipidna peroksidacija.....	13
1.2.1.3.3. Oksidativna oštećenja proteina.....	14
1.2.1.3.4. Oksidativna oštećenja biomolekula kao markeri oksidativnog stresa .....	15
1.2.2. Uloga oksidativnog stresa u narušavanju strukture i funkcije $\beta$ -ćelija.....	16
1.2.3. Uloga oksidativnog stresa u razvoju komplikacija u dijabetesu.....	17
1.2.3.1. Oksidativna oštećenja eritrocita u dijabetesu .....	22
1.2.3.2. Oksidativna oštećenja jetre i bubrega u dijabetesu .....	23
1.3. Endogeni sistem antioksidativne zaštite .....	25
1.3.1. Superoksid dismutaza .....	26
1.3.2. Katalaza.....	27
1.3.3. Glutation peroksidaza i glutacion reduktaza .....	27
1.3.4. Glutation .....	28
1.3.5. Regulacija ekspresije komponenti sistema antioksidativne zaštite.....	29
1.4. Upotreba antioksidanasa i biljnih preparata u tretmanu dijabetesa .....	31
1.4.1. Biljke kao izvori antioksidanasa .....	35
1.4.2. Fitoterapija u tretmanu dijabetesa .....	36
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	39
3. MATERIJAL I METODE.....	42
3.1. Biljni materijal .....	42
3.2. Priprema metanolnog ekstrakta kičice.....	42
3.3. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenola i ukupnih flavonoida u ekstraktu kičice.....	42
3.4. UHPLC/DAD/qqqMS analiza sadržaja fenolnih jedinjenja i sekoiridoida .....	43

3.5. Ispitivanje antioksidativnog potencijala ekstrakta kičice u <i>in vitro</i> eksperimentalnim uslovima.....	45
3.5.1. Sposobnost neutralizacije DPPH• radikala.....	45
3.5.2. Ispitivanje redukujućeg potencijala ekstrakta kičice .....	45
3.5.3. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije vodonik peroksida.....	46
3.5.4. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije azot oksida .....	47
3.5.5. Ispitivanje sposobnosti helacije gvožđa (Fe <sup>2+</sup> ).....	47
3.6. Eksperimentalne životinje .....	48
3.6.1. Izazivanje eksperimentalnog modela dijabetesa.....	48
3.6.2. Izbor doze ekstrakta kičice.....	48
3.6.3. Formiranje eksperimentalnih grupa.....	49
3.6.4. Priprema seruma i eritrocita.....	50
3.6.5. Izolacija i priprema organa .....	51
3.6.6. Biohemijska analiza seruma .....	52
3.6.7. Određivanje koncentracije hemoglobina i glikozilovanog hemoglobina u eritrocitima.....	54
3.6.8. Određivanje koncentracije insulina u serumu .....	55
3.6.9. Određivanje krajnjih proizvoda glikacije u serumu .....	56
3.6.10. Histološka analiza tkiva .....	56
3.6.10.1. Priprema uzoraka za histološku analizu .....	56
3.6.10.2. Hematoksilin-eozin bojenje histoloških preparata .....	56
3.6.10.3. Imunohistohemijsko bojenje histoloških preparata.....	57
3.7. Ćelijska kultura.....	58
3.7.1. Određivanje broja ćelija.....	59
3.7.2. Ispitivanje citotoksičnog efekta ekstrakta kičice na Rin-5F ćelije .....	59
3.7.3. Izazivanje oksidativnog stresa kod Rin-5F ćelija.....	59
3.7.4. Ispitivanje efekta ekstrakta kičice na preživljavanje Rin-5F ćelija u uslovima oksidativnog stresa .....	60
3.7.5. Ispitivanje vijabilnosti ćelija MTT testom.....	60
3.7.6. Ispitivanje efekta ekstrakta kičice na redoks status Rin-5F ćelija .....	60
3.7.6.1. Priprema uzoraka za ispitivanje nivoa lipidne peroksidacije i nivoa oštećenja DNK.....	61
3.7.6.2. Priprema uzoraka za ispitivanje odnosa redukovanog i oksidovanog glutationa i nivoa S-glutacionilacije proteina .....	61
3.7.6.3. Priprema uzoraka za ispitivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite .....	61
3.7.7. Izolacija ukupne RNK i reverzna transkripcija.....	62
3.7.8. Priprema ukupnih ćelijskih lizata.....	63
3.7.9. Priprema jedarnih frakcija ćelija .....	63
3.8. Određivanje koncentracije proteina .....	64



3.9. Određivanje nivoa lipidne peroksidacije .....	64
3.10. Određivanje stepena oštećenja DNK.....	65
3.11. Određivanje odnosa redukovanog i oksidovanog glutationa .....	66
3.12. Određivanje koncentracije S-glutationilovanih proteina .....	67
3.13. Određivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite .....	67
3.13.1. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze .....	67
3.13.1.1. Uklanjanje hemoglobina iz eritrocita .....	68
3.13.2. Određivanje aktivnosti katalaze.....	69
3.13.3. Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze.....	69
3.13.4. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze .....	70
3.14. Imunoblot analiza proteina – Western blot.....	71
3.14.1. Elektroforetsko razdvajanje proteina pod denaturišućim uslovima (SDS-PAGE).....	71
3.14.3. Prenos proteina na membrane .....	72
3.14.4. Imunoblot analiza proteina .....	72
3.15. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (RT-qPCR).....	75
3.16. Statistička obrada podataka .....	76
4. REZULTATI.....	77
4.1. Kvalitativna i kvantitativna analiza hemijskog sastava metanolnog ekstrakta kičice .....	77
4.2. Antioksidativni potencijal ekstrakta kičice u <i>in vitro</i> eksperimentalnim uslovima .....	82
4.3. Uticaj ekstrakta kičice na sistemski oksidativni stres kod pacova u uslovima dijabetesa .....	84
4.3.1. Analiza promena telesne mase i osnovnih biohemijskih parametara u serumu pacova .....	84
4.3.2. Uticaj ekstrakta kičice na strukturne i funkcionalne parametre eritrocita u uslovima dijabetesa .....	86
4.3.2.1. Glikacija i glikozilacija proteina u serumu i eritrocitima u uslovima hiperglikemije.....	86
4.3.2.2. Analiza biomarkera oksidativnog stresa u eritrocitima .....	87
4.3.2.3. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima .....	88
4.3.2.4. Nivo $\alpha 2$ -makroglobulina u serumu i aktivnost Akt kinaze u eritrocitima .....	89
4.4. Antioksidativni efekat ekstrakta kičice u jetri i bubregu u uslovima dijabetesa .....	91
4.4.1. Promena mase jetre i bubrega dijabetičnih pacova .....	91
4.4.2. Analiza biohemijskih parametara oštećenja jetre i bubrega u serumu dijabetičnih pacova .....	92
4.4.3. Analiza oksidativnog oštećenja jetre i bubrega.....	93
4.4.4. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u jetri i bubregu .....	96
4.5. Uticaj ekstrakta kičice na $\beta$ -ćelije pankreasa u uslovima dijabetesa.....	99
4.5.1. Analiza strukturnih i funkcionalnih parametara Langerhansovih ostrvaca dijabetičnih pacova .....	99

4.5.2. Molekularni mehanizmi antioksidativnog i protektivnog dejstva ekstrakta kičice u $\beta$ -ćelijama .....	101
4.5.2.1. Ispitivanje citotoksičnog efekta ekstrakta kičice .....	102
4.5.2.2. Ispitivanje protektivnog efekta ekstrakta kičice na Rin-5F ćelije u uslovima oksidativnog stresa izazvanog primenom $H_2O_2$ .....	103
4.5.2.2.1. Preživljavanje i funkcionalnost Rin-5F ćelija nakon tretmana $H_2O_2$ .....	103
4.5.2.2.2. Analiza parametara oksidativnog stresa u Rin-5F ćelijama nakon tretmana $H_2O_2$ .....	104
4.5.2.2.3. Ekspresija enzima antioksidativne zaštite u Rin-5F ćelijama nakon tretmana $H_2O_2$ .....	106
4.5.2.3. Ispitivanje efekta ekstrakta kičice na Rin-5F ćelije u uslovima oksidativnog stresa izazvanog primenom SNP-a .....	109
4.5.2.3.1. Preživljavanje i funkcionalnost Rin-5F ćelija nakon tretmana SNP-om .....	109
4.5.2.3.2. Analiza parametara oksidativnog stresa u Rin-5F ćelijama nakon tretmana SNP-om .....	110
4.5.2.3.3. Ekspresija enzima antioksidativne zaštite u Rin-5F ćelijama nakon tretmana SNP-om .....	112
4.5.2.4. Ispitivanje efekta ekstrakta kičice na Rin-5F ćelije u uslovima oksidativnog stresa izazvanog primenom STZ-a .....	114
4.5.2.4.1. Preživljavanje i funkcionalnost Rin-5F ćelija nakon tretmana STZ-om .....	114
4.5.2.4.2. Analiza parametara oksidativnog stresa u Rin-5F ćelijama nakon tretmana STZ-om .....	115
4.5.2.4.3. Ekspresija enzima antioksidativne zaštite u Rin-5F ćelijama nakon tretmana STZ-om .....	117
4.5.2.5. Uticaj ekstrakta kičice na regulatorne procese u $\beta$ -ćelijama u uslovima oksidativnog stresa indukovano STZ-om .....	120
4.5.2.5.1. Aktivnost faktora uključenih u regulaciju transkripcije gena za enzime antioksidativne zaštite u $\beta$ -ćelijama .....	120
4.5.2.5.2. Analiza regulatora signalnih puteva preživljavanja i ekspresije/sekrecije insulina u $\beta$ -ćelijama .....	123
5. DISKUSIJA .....	127
5.1. Fitohemijska karakterizacija i antioksidativni potencijal ekstrakta kičice .....	128
5.2. Ekstrakt kičice poboljšava biohemijske parametre dijabetesa .....	130
5.3. Ekstrakt kičice smanjuje sistemski oksidativni stres i doprinosi očuvanju strukturnih i funkcionalnih parametara eritrocita .....	133
5.4. Ekstrakt kičice ublažava oksidativni stres i doprinosi očuvanju funkcije jetre i bubrega dijabetičnih pacova .....	137
5.5. Ekstrakt kičice poboljšava preživljavanje i funkcionalnost $\beta$ -ćelija pankreasa u dijabetesu putem različitih mehanizama delovanja .....	142
6. ZAKLJUČCI .....	153
7. LITERATURA .....	157

# 1. UVOD

---

## 1.1. Dijabetes

Dijabetes (lat. *diabetes mellitus*) predstavlja skup metaboličkih promena koje karakteriše povišena koncentracija glukoze u krvi (hiperglikemija) usled poremećaja u sekreciji i/ili biološkom dejstvu hormona insulina (American Diabetes Association, 2014). Insulin je hormon koji se sintetiše u  $\beta$ -ćelijama pankreasa i ima glavnu ulogu u regulaciji koncentracije glukoze u krvi. Nekontrolisana hiperglikemija vremenom dovodi do oštećenja mnogih tkiva i organa, kao što su retina, bubreg, jetra, periferni nervi, srce i krvni sudovi, što vodi ka razvoju komplikacija i povećava rizik od prevremene smrti.

Visoka učestalost i rasprostranjenost bolesti svrstavaju dijabetes u jedno od četiri najčešćih nezaraznih oboljenja. Prema podacima Međunarodne federacije za dijabetes (eng. *International Diabetes Federation*, IDF) u svetu je 2017. godine bilo oko 425 miliona odraslih osoba (starosti od 20 do 79 godina) obolelih od dijabetesa, od čega je gotovo 50% bez postavljene dijagnoze (Cho i sar., 2018). U našoj zemlji, prema podacima Instituta za javno zdravlje "Dr Milan Jovanović Batut", ima oko 750000 obolelih osoba (Registar za dijabetes u Srbiji, 2016). Procenjuje se da će se do 2045. godine broj obolelih od dijabetesa u svetu povećati na 629 miliona, pri čemu se najveći porast broja obolelih očekuje u zemljama u razvoju. Veliki broj osoba obolelih od dijabetesa iziskuje i znatne troškove lečenja. Na godišnjem nivou se za direktne troškove lečenja dijabetesa potroši preko 727 milijardi dolara (Cho i sar., 2018). Međutim, i pored toga, aktuelna terapija dijabetesa ne daje odgovarajuće rezultate i godišnje u svetu od dijabetesa umire blizu četiri miliona ljudi. U našoj zemlji dijabetes je treći vodeći uzrok smrtnosti i na godišnjem nivou se registruje oko 3000 umrlih od dijabetesa ili njegovih komplikacija (Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut", 2018).

### 1.1.1. Tipovi dijabetesa i prateći patofiziološki procesi

Na osnovu patofizioloških procesa koji se nalaze u osnovi razvoja dijabetesa razlikuju se četiri osnovne kategorije bolesti: dijabetes tipa 1, dijabetes tipa 2, gestacioni dijabetes i specifični oblici dijabetesa.

Dijabetes tipa 1 (DT1), koji pogađa oko 10% obolelih od dijabetesa, nastaje kao posledica selektivnog autoimunog razaranja  $\beta$ -ćelija pankreasa i karakteriše se delimičnim ili potpunim izostankom sinteze i sekrecije insulina (International Diabetes Federation, 2017). Autoimuni proces je posredovan  $CD4^+$  i  $CD8^+$  T ćelijama i makrofagama koje infiltriranjem u  $\beta$ -ćelije pankreasa dovode do razvoja hronične inflamacije – insulitisa. Ovaj tip dijabetesa se može razviti u bilo kom životnom dobu ali je najčešći kod dece i adolescenata, a osobe kod kojih dolazi do razvoja DT1 imaju genetičku predispoziciju za razvoj autoimunih poremećaja. U kombinaciji sa još uvek nedovoljno razjašnjenim faktorima iz spoljašnje sredine, kod predisponiranih osoba se pokreće niz imunoloških reakcija koje rezultuju selektivnim narušavanjem strukture  $\beta$ -ćelija pankreasa. U trenutku dijagnostikovanja bolesti, u cirkulaciji obolelih osoba se u 85-90% slučajeva mogu detektovati autoantitela na ćelije Langerhansovih ostrvaca, na insulin, dekarboksilazu glutaminske kiseline, kao i autoantitela na tirozin fosfataze IA-2 i IA-2 $\beta$  (American Diabetes Association, 2014). Kod određenog broja osoba sa dijagnozom DT1 proces destrukcije  $\beta$ -ćelija nije posredovan autoimunom reakcijom (Maldonado i sar., 2003). Ovaj podtip dijabetesa je označen kao idiopatski dijabetes tipa 1 i najčešće se javlja kod osoba afro-američkog i azijskog porekla. Osobama obolelim od DT1 neophodna je terapija insulinom kako bi se regulisala koncentracija glukoze u krvi, ali i pored redovne terapije kod obolelih dolazi do razvoja komplikacija.

Dijabetes tipa 2 (DT2) je najčešći tip ove bolesti (85-90% obolelih) i nastaje usled poremećaja u sekreciji i biološkom dejstvu insulina – razvoju insulinske rezistencije. Iako se DT2 najčešće razvija kod osoba starijih od 40 godina, uočen je porast incidence bolesti kod mlađih osoba i adolescenata (Danaei i sar., 2011). S' obzirom da se hiperglikemija razvija postepeno i u početnom stadijumu oboleli ne primećuju klasične simptome bolesti, DT2 često ostaje nedijagnostikovan po

nekoliko godina (American Diabetes Association, 2014). Osobama obolelim od DT2, u ranoj fazi, nije potrebna terapija insulinom, već se održavanje koncentracije glukoze u krvi može postići korekcijom ishrane, pojačanom fizičkom aktivnošću i upotrebom odgovarajućih lekova sa hipoglikemijskim dejstvom. I ovaj tip dijabetesa karakteriše progresivni gubitak  $\beta$ -ćelija ali je, za razliku od DT1 gde je u trenutku dijagnostikovanja bolesti broj  $\beta$ -ćelija umanjen za 70-90%, masa  $\beta$ -ćelija redukovana za 25-50% (Kloppel i sar., 1985). Iako se dugo vremena smatralo da autoimuni odgovor nije uključen u proces gubitka  $\beta$ -ćelija u DT2 (Kahn, 2003), novije studije su dokazale prisustvo ćelija imunog odgovora u pankreasu osoba obolelih od DT2 (Boni-Schnetzler i sar., 2008; Donath i sar., 2008). Brooks-Worrell i Palmer (2012) ukazuju na to da je autoimuna reakcija uključena u patogenezu DT1 i DT2, ali da se u slučaju DT1 autoimuna reakcija pokreće u odgovoru na faktore iz spoljašnje sredine dok je u slučaju DT2 pokretač hronična inflamacija usled gojaznosti i poremećenog metabolizma.

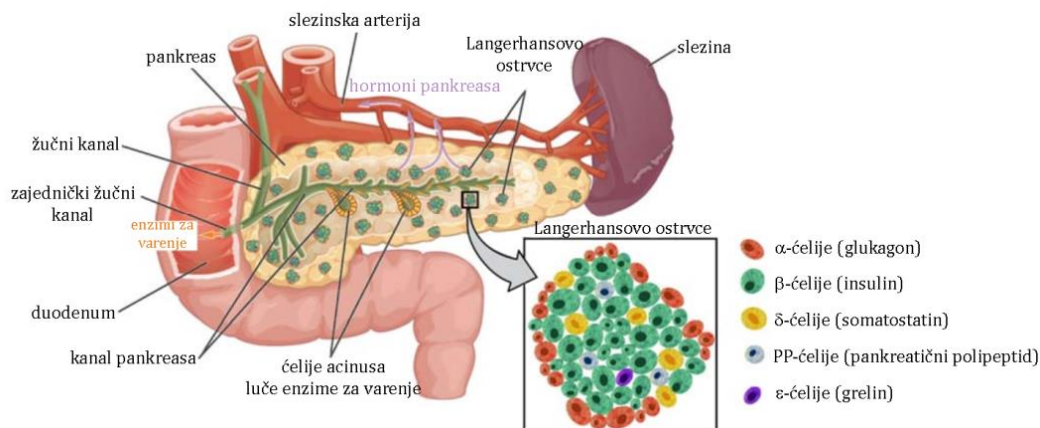
Gestacioni dijabetes (GDM) je čest poremećaj u trudnoći i definisan je kao dijabetes koji se javlja ili prvi put dijagnostikuje tokom trudnoće, najčešće između 24. i 28. nedelje (Bellamy i sar., 2009). Poremećaj u kontroli glikemije tokom trudnoće može izazvati komplikacije i kod majke i kod fetusa. Simptomi GDM posle porođaja u većini slučajeva nestaju, ali su majke podložnije kasnijem razvoju DT2.

U specifične tipove dijabetesa ubrajaju se oblici bolesti koji nastaju usled genetički uzrokovanih poremećaja u funkcionisanju  $\beta$ -ćelija ili poremećaja dejstva insulina, usled određenih bolesti egzokrinog pankreasa i nekih endokrinopatija, kao i tipovi dijabetesa izazvani lekovima ili virusnom infekcijom (American Diabetes Association, 2014).

### **1.1.2. Beta ćelije pankreasa i insulin**

Pankreas je žlezda sa dvojakom funkcijom – endokrinom i egzokrinom. Egzokrini pankreas se sastoji od acinusa koji luče pankreasni sok u kome se nalaze brojni enzimi za varenje, kao što su tripsin, himotripsin, lipaza i amilaza. Endokrini deo pankreasa čine grupacije ćelija označene kao Langerhansova ostrvca, rasuta po egzokrinom delu pankreasa čineći svega 1-5% mase samog organa (Kim i Hebrok, 2001). U okviru ostrvaca razlikuje se nekoliko tipova ćelija koje luče različite

hormone –  $\beta$ -ćelije koje luče insulin,  $\alpha$ -ćelije (glukagon),  $\delta$ -ćelije (somatostatin), PP ćelije (pankreatični polipeptid) i  $\epsilon$ -ćelije (ghrelin), od kojih su najzastupljenije  $\beta$ -ćelije (70-80%) (Dintzis i Liggitt, 2012).



**Slika 1.1. Šematski prikaz anatomije pankreasa.** Preuzeto i modifikovano sa: <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/17-9-the-endocrine-pancreas/>

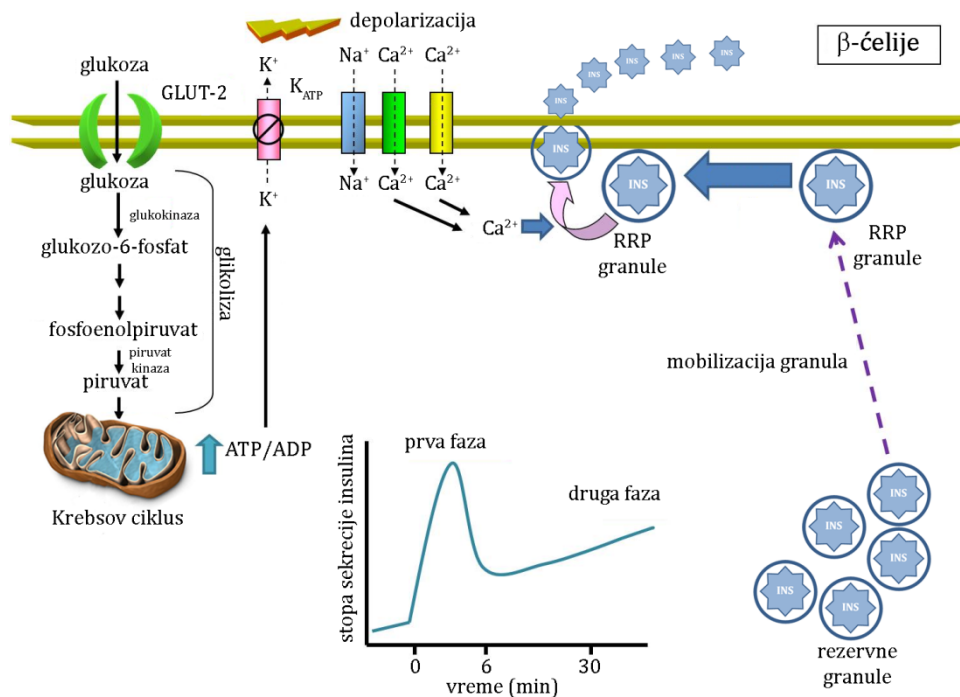
#### 1.1.2.1. Sekrecija insulina

Glukoza predstavlja glavni izvor energije kod kičmenjaka zbog čega je od ključnog značaja održavanje koncentracije glukoze u fiziološkim granicama. Nakon svakog obroka koncentracija glukoze u krvi raste i stimuliše sekreciju insulina koji pojačava proces preuzimanja glukoze i sintezu glikogena u jetri i mišićima, pojačava sintezu triglicerida koji se skladište u adipocitima i stimuliše sintezu proteina. Pored toga, insulin dodatno inhibira sekreciju glukagona čime smanjuje proizvodnju glukoze u jetri (Kangralkar i sar., 2010).

Proces sekrecije insulina stimulisan glukozom (eng. *glucose-stimulated insulin secretion* – GSIS) je dvofazan i odvija se u pulsevima (Stagner i sar., 1980). Nakon porasta koncentracije glukoze, u prvoj fazi dolazi do brze sekrecije insulina koja je praćena smanjenjem nivoa oslobođenog insulina, a zatim sledi druga, odnosno odložena faza sekrecije koja se održava sve do uspostavljanja fiziološkog nivoa glukoze (Curry i sar., 1968). Iako KCl i druge nehranljive supstance koje izazivaju sekreciju mogu pokrenuti prvu fazu sekrecije insulina, druga faza sekrecije se pokreće jedino u prisustvu glukoze, što ukazuje da je druga faza energetski zavisna proces (Rorsman i sar., 2000).

Glukoza ulazi u  $\beta$ -ćelije olakšanom difuzijom posredstvom GLUT-2 transportera glukoze visokog kapaciteta i niskog afiniteta (Newgard i McGarry, 1995). Unutar  $\beta$ -ćelija, enzim glukokinaza koja deluje kao senzor za glukozu i ima ključnu ulogu u GSIS (Matschinsky, 1996), fosforiliše glukozu prevodeći je u glukozo-6-fosfat. Fosforilisana glukoza se u  $\beta$ -ćelijama dalje metaboliše u procesu glikolize pri čemu nastaju piruvat, NADH i ATP. Piruvat i NADH se dalje metabolišu u mitohondrijama kroz Krebsov ciklus (piruvat) i elektron-transportni lanac (NADH) pri čemu takođe nastaje ATP. Porast ATP/ADP odnosa dovodi do zatvaranja ATP senzitivnih  $K^+$  kanala ( $K_{ATP}$ ), depolarizacije membrane i otvaranja voltažno zavisnih kanala za  $Ca^{2+}$ . Porast koncentracije  $Ca^{2+}$  u ćeliji dovodi do spajanja sekretornih granula koje sadrže insulin sa ćelijskom membranom i oslobađanja insulina u cirkulaciju (Rorsman i Renstrom, 2003).

Dvofazna sekrecija insulina omogućena je zahvaljujući tome što se unutar  $\beta$ -ćelija razlikuju dve grupe granula koje sadrže insulin – granule usidrene na membrani (RRP granule, eng. *readily releasable pool*) i rezervne granule (> 95% svih granula) koje se nalaze u citoplazmi (Aizawa i Komatsu, 2005; Straub i Sharp, 2004). Prva faza oslobađanja insulina omogućena je brzom fuzijom RRP granula sa ćelijskom membranom dok su rezervne granule odgovorne za drugu fazu sekrecije. Tokom trajanja prve faze rezervne granule se hemijski modifikuju i zamenjuju RRP granule u procesu označenom kao mobilizacija granula, a koji uključuje jedan ili nekoliko ATP zavisnih reakcija (Parsons i sar., 1995).



**Slika 1.2. Mehanizam dvofazne sekrecije insulina stimulisane glukozom.** Preuzeto i modifikovano iz (Lazo-de-la-Vega-Monroy i Fernandez-Mejia, 2011)

### 1.1.2.2. Regulatori ekspresije i sekrecije insulina u $\beta$ -ćelijama

Regulatorni proteini u  $\beta$ -ćelijama deluju udruženo i formiraju transkripcionu mrežu koja reguliše ne samo ekspresiju gena za insulin već i ekspresiju gena za proteine uključene u regulaciju ekspresije gena za insulin i sekrecije insulina i tako uspostavljaju i održavaju fenotip i funkciju  $\beta$ -ćelija (Lazo-de-la-Vega-Monroy i Fernandez-Mejia, 2009). Neki od tih regulatornih faktora su PDX-1, HNF4 $\alpha$ , MafA, FOXA2 i NeuroD.

PDX-1 (eng. *pancreatic and duodenal homeobox factor-1*, poznat i kao IDX-1, STF-1 ili IPF1) pripada velikoj porodici proteina sa homeodomenom (HD) i ima ključnu ulogu u razvoju pankreasa, diferencijaciji  $\beta$ -ćelija i održavanju funkcije zrelih  $\beta$ -ćelija (Kaneto i sar., 2008). PDX-1 je eksprimiran u prekursorskim ćelijama tokom razvoja pankreasa, dok je u razvijenom pankreasu njegova ekspresija ograničena samo na  $\beta$ -ćelije. Homozigotni PDX-1 (-/-) miševi nemaju pankreas i nakon rođenja razvijaju smrtonosnu hiperglikemiju (Jonsson i sar., 1994), što ukazuje na ključnu ulogu koju PDX-1 ima u nastajanju endokrinog i egzokrinog pankreasa. Gubitak funkcije PDX-1 dovodi do nepravilnog razvoja pankreasa kod



čoveka i miševa (Stoffers i sar., 1997). Diferencijacija  $\beta$ -ćelija i održavanje njihovog fenotipa takođe zahteva PDX-1. U zrelim  $\beta$ -ćelijama, PDX-1 aktivira ekspresiju gena za insulin i drugih gena uključenih u odgovor na glukozu i njen metabolizam, kao što su GLUT-2 i glukokinaza (Waeber i sar., 1996; Watada i sar., 1996). Za održavanje normalne homeostaze glukoze potrebna je i dovoljna količina PDX-1. Heterozigotni PDX-1 (+/-) miševi su neosetljivi na glukozu a u ostrvcima takvih miševa je pojačan proces apoptoze što smanjuje veličinu i narušava građu ostvaca (Brissova i sar., 2002; Johnson i sar., 2003).

MafA (eng. *musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A*), koji pripada grupi bLZ (eng. *basic-leucine zipper*) transkripcionih regulatora, eksprimira se isključivo u  $\beta$ -ćelijama pankreasa i deluje kao snažan transaktivator ekspresije gena za insulin (Kaneto i sar., 2009). Za razliku od PDX-1, koji se eksprimira još u ranoj fazi razvoja pankreasa, ekspresija MafA se pokreće u završnoj fazi diferencijacije  $\beta$ -ćelija. Miševi kod kojih je uklonjen gen za MafA (-/-) su netolerantni na glukozu i razvijaju dijabetes (Zhang i sar., 2005). Iako se ekspresija insulina ne menja, sekrecija insulina stimulisana glukozom, argininom i KCl-om je poremećena kod ovih miševa, što ukazuje da je MafA važan regulator GSIS procesa. Takođe, kod MafA (-/-) miševa vremenom dolazi do narušavanja strukture i funkcije Langerhansovih ostrvaca (Zhang i sar., 2005).

#### 1.1.2.3. Regulacija mase $\beta$ -ćelija

Za održavanje normalne sinteze i sekrecije insulina, pored pravilnog funkcionisanja  $\beta$ -ćelija, potrebna je i njihova dovoljna masa koja je određena brojem i veličinom  $\beta$ -ćelija. Ukupna masa  $\beta$ -ćelija progresivno se povećava tokom fetalnog, neonatalnog i perioda rasta organizma, dostiže svoj maksimum tokom odraslog doba i postepeno opada sa starenjem (Ackermann i Gannon, 2007).

Za povećanje i održavanje mase  $\beta$ -ćelija odgovorni su procesi neogeneze (formiranje novih od prekursorskih ćelija), proliferacije (replikacija ćelija), hipertrofije (povećanje veličine ćelija) i apoptoze (ćelijska smrt). Iako su progenitori  $\beta$ -ćelija identifikovani u pankreasu (Bonner-Weir i sar., 2008; Xu i sar., 2008), za povećanje mase  $\beta$ -ćelija tokom postnatalnog i odraslog doba odgovorni su procesi proliferacije i hipertrofije (Ackermann i Gannon, 2007). Brojni faktori

stimulišu povećanje mase  $\beta$ -ćelija, kao što su glukoza, slobodne masne kiseline i faktori rasta, uključujući peptid sličan glukagonu (GLP-1), insulinotropni polipeptid zavisan od glukoze (GIP), hormon rasta, faktor rasta sličan insulinu (IGF-1), prolaktin, epidermalni faktor rasta (EGF), gastrin i insulin. Faktori rasta ostvaruju svoj efekat na rast  $\beta$ -ćelija aktivacijom odgovarajućih membranskih receptora i pokretanjem signalnih puteva unutar  $\beta$ -ćelija (Rhodes, 2000).

Brojne studije su pokazale autokrino dejstvo insulina na funkcionisanje i preživljavanje  $\beta$ -ćelija (Aikin i sar., 2006; Navarro-Tableros i sar., 2004; Xu i Rothenberg, 1998). Kod čoveka, insulin pozitivno utiče na transkripciju insulina i na proliferaciju  $\beta$ -ćelija (Persaud i sar., 2008). Vezivanjem insulina za transmembranski receptor za insulin (IR) koji ima tirozin-kinaznu aktivnost dolazi do autofosforilacije receptora i regrutovanja adapternih proteina, kao što su IRS (eng. *insulin receptor substrate*) i SHC (eng. *Src homologous collagen-like*) koji podležu fosforilaciji na tirozinskim grupama. Nakon fosforilacije ovi proteini preko svojih SH2 domena interaguju sa signalnim molekulima i aktiviraju brojne signalne puteve, uključujući PI3K/Akt i MAPK (eng. *mitogen activated protein kinase*) signalne puteve (White, 2003). Akt je serin/treonin kinaza koja reguliše ćelijsko preživljavanje, proliferaciju, rast i metabolizam preko fosforilacije različitih proteina, kao što su GSK3, FOXO i CREB (Song i sar., 2005). Pokazano je da pojačana ekspresija aktivne Akt kinaze u  $\beta$ -ćelijama transgenih miševa povećava proliferaciju, neogenezu i veličinu  $\beta$ -ćelija (Bernal-Mizrachi i sar., 2001; Tuttle i sar., 2001). Usled povećane mase  $\beta$ -ćelija povećava se sekrecija insulina i takvi miševi su rezistentni na razvoj dijabetesa indukovanog streptozotocinom. Sa druge strane, smanjenje aktivnosti Akt za 80% usled prekomerne ekspresije neaktivne forme kinaze (eng. *kinase-dead mutant*) u  $\beta$ -ćelijama dovodi do poremećaja u sekreciji insulina (Bernal-Mizrachi i sar., 2004).

MAP kinaze predstavljaju veliku familiju serin/treonin specifičnih proteinskih kinaza koje se aktiviraju u odgovoru na vanćelijske stimulse. Utičući na aktivnost regulatornih proteina gena, MAPK su uključene u proliferaciju i diferencijaciju ćelija i ćelijskom odgovoru na stres (Halliwell i Gutteridge, 2015). Tri najvažnije grupe MAP kinaza su p38 kinaze, kinaze aktivirane vanćelijskim signalima (eng. *extracellular signal-regulated kinase* – ERK), kao što su ERK1 i

ERK2, i c-Jun N-terminalna kinaza (JNK). Aktivacija ERK1/2 kinaza reguliše rast i diferencijaciju ćelija i sintezu proteina (Kahn i sar., 2006). U  $\beta$ -ćelijama insulin aktivira ERK1/2 posredno preko aktivacije Ras proteina koji fosforiliše i aktivira Raf-1 protein koji dalje preko MEK1/2 kinaza aktivira ERK1/2. Glukoza i drugi nutrijenti takođe aktiviraju ERK1/2 u  $\beta$ -ćelijama preko Ras-Raf-1 puta ali je, za razliku od aktivacije insulinom koja ne zavisi od kalcijuma, aktivacija ERK1/2 glukozom zavisna od kalcijuma (Arnette i sar., 2003). ERK kinaza u  $\beta$ -ćelijama učestvuje u regulaciji ekspresije gena za insulin. Izlaganje  $\beta$ -ćelijama glukozi u kraćem vremenskom intervalu (do 6h) povećava transkripciju gena za insulin dok duže izlaganje  $\beta$ -ćelija povišenoj koncentraciji glukoze (48h i više) dovodi do inhibicije promotora gena za insulin. Oba ova procesa su zavisna od aktivnosti ERK1/2 kinaze (Lawrence i sar., 2008). Kinaze p38 (p38 $\alpha$  (MAPK14), p38 $\beta$  (MAPK11), p38 $\gamma$  (MAPK12), p38 $\delta$  (SAPK4)) zajedno sa JNK kinazom učestvuju u odgovoru na različite stimulse, kao što su citokini, UV zračenje, toplotni stres, oksidativni stres i regulišu procese ćelijske diferencijacije i apoptoze (Halliwell i Gutteridge, 2015). Inhibicija aktivnosti p38 kinaze u MIN6  $\beta$ -ćelijama smanjuje ugradnju 5-bromo-2'-dezoksiuridina u molekul DNK što ukazuje na ulogu p38 kinaze u proliferaciji  $\beta$ -ćelija (Burns i sar., 2000).

## **1.2. Oksidativni stres u dijabetesu**

Različiti faktori kao što su autoimuna reakcija, inflamacija, hiperglikemija/glukotoksičnost, lipotoksičnost, adipokini, inkretini i insulinska rezistencija dovode do progresivnog propadanja  $\beta$ -ćelija u dijabetesu (Wajchenberg, 2007). Brojne kliničke i eksperimentalne studije pokazale su da je oksidativni stres jedan od zajedničkih mehanizama preko kojeg ovi faktori narušavaju strukturu i funkciju  $\beta$ -ćelija pankreasa i dovode do razvoja komplikacija u dijabetesu (Robertson, 2004; Valko i sar., 2007).

### **1.2.1. Oksidativni stres**

Kiseonik je jedan od najzastupljenijih i najbitnijih hemijskih elemenata za sve oblike života na Zemlji. Dvoatomska forma kiseonika u atmosferi (O<sub>2</sub>) i

troatomska alotropska modifikacija u stratosferi ( $O_3$  – ozon) omogućavaju opstanak živih organizama (Kohen i Nyska, 2002). Kiseonik ima visoki redoks potencijal što ga čini odličnim oksidujućim sredstvom koje lako prima elektrone od redukujućih supstrata. Međutim, pored pozitivnih efekata, prisustvo kiseonika u biološkim sistemima može imati i negativne posledice. Zbog toga se kiseonik često označava i kao Janus gas (Janus – rimski bog sa dva lica), ili nužno zlo. Postojanje koncepta tzv. kiseoničnog paradoksa koji obuhvata dva ekstremna fiziološka spektra – od esencijalnog do toksičnog – omogućeno je postojanjem kontrolisane ravnoteže između proizvodnje slobodnoradikalnih vrsta i njihovog uklanjanja, a narušavanje ove ravnoteže prouzrokuje oksidativni stres (Hauptmann i Cadenas, 1997).

Slobodni radikali predstavljaju molekule ili delove molekula koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u atomskim ili molekulskim orbitalama usled čega su nestabilni i izuzetno reaktivni (Halliwell i Gutteridge, 2015). U slobodne radikale ubrajaju se reaktivne vrste kiseonika (eng. *reactive oxygen species*, ROS) i reaktivne vrste azota (eng. *reactive nitrogen species*, RNS). ROS uključuju superoksid anjon ( $\cdot O_2^-$ ), vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ), peroksil radikal ( $ROO\cdot$ ) i hidroksil radikal ( $HO\cdot$ ), dok se u RNS ubrajaju azot oksid ( $NO\cdot$ ) i peroksinitrit anjon ( $ONOO^-$ ). ROS i RNS nastaju kao proizvodi normalnog ćelijskog metabolizma i u zavisnosti od koncentracije u ćeliji mogu imati koristan ili štetan efekat (Valko i sar., 2006). U normalnim fiziološkim uslovima ROS i RNS su prisutni u niskim koncentracijama, uključeni su u brojne signalne procese u ćeliji, učestvuju u regulaciji ekspresije gena i ćelijskog rasta, učestvuju u odbrani od raznih infektivnih agenasa kao i u pokretanju mitogenog odgovora (Valko i sar., 2007). U velikim količinama, bilo usled njihove prekomerne proizvodnje ili usled narušavanja antioksidativnog sistema zaštite, slobodni radikali prouzrokuju oksidativna oštećenja lipida, proteina i DNK molekula što dovodi do brojnih patoloških stanja u organizmu i ubrzavanja procesa starenja. Pored toga što direktnim dejstvom oštećuju makromolekule, ROS i RNS aktiviraju brojne signalne puteve u ćeliji i na taj način indirektno oštećuju tkiva. Zbog toga aerobni organizmi moraju konstantno da održavaju ravnotežu između procesa proizvodnje slobodnih radikala i njihovog uklanjanja. Izlaganje egzogenim izvorima oksidantasa kao što su

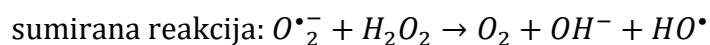
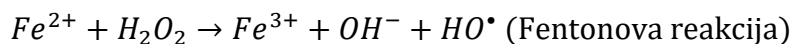
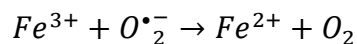
ultraljubičasto i jonizujuće zračenje, teški metali, redoks aktivna jedinjenja, anoksija i hiperoksija koji povećavaju proizvodnju slobodnih radikala dodatno otežava održavanje redoks balansa (Carney i sar., 1991; Floyd, 1991).

#### 1.2.1.1. Reaktivne vrste kiseonika (ROS)

Glavni izvor ROS-ova, samim tim i oksidativnog stresa u ćeliji jesu mitohondrije (Richter i sar., 1995). Tokom procesa proizvodnje ATP-a u transportnom lancu elektrona u mitohondrijama može doći do "curenja" elektrona koji reaguju sa kiseonikom pri čemu nastaje  $\cdot\text{O}_2^-$  (Boveris, 1984). Superoksid anjon može nastati i redukcijom kiseonika od strane NAD(P)H oksidaze (NOX) i ksantin oksidaze (Guzik i sar., 2002; Mehta i sar., 2006). Mali deo  $\cdot\text{O}_2^-$  (~ 0,3 % od ukupne količine  $\cdot\text{O}_2^-$ ) se u citosolu ćelija može naći u protonisanoj formi označenoj kao hidroperoksil radikal ( $\text{HOO}\cdot$ ) a koja u živim sistemima može pokrenuti proces lipidne peroksidacije (Aikens i Dix, 1991; De Grey, 2002).

Superoksid anjon radikal se u seriji spontanijih ili enzimatskih reakcija koje čine deo antioksidativnog sistema zaštite konvertuje u druge slobodne radikale. Pod dejstvom superoksid dismutaze  $\cdot\text{O}_2^-$  se konvertuje u  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Vodonik peroksid nije sam po sebi slobodni radikal jer nema nesparenih elektrona, već se smatra reaktivnim metabolitom kiseonika. Rastvorljiv je u vodi i lako prodire kroz ćelijske membrane što ga čini izuzetno štetnim (Halliwell i Gutteridge, 2015). Ukoliko se ne neutrališe,  $\text{H}_2\text{O}_2$  dovodi do degradacije hema i oslobađanja gvožđa, inaktivacije enzima i oksidacije molekula DNK, lipida i -SH grupa proteina (Halliwell, 2000).

Pored toga,  $\text{H}_2\text{O}_2$  predstavlja izvor  $\text{HO}\cdot$  koji predstavlja jedan od najjačih poznatih oksidujućih agenasa u prirodi (Kohen i Nyska, 2002). Hidroksil radikal prouzrokuje oštećenja skoro svih organskih i neorganskih molekula u ćeliji, uključujući DNK, proteine, lipide, aminokiseline, ugljene hidrate i metale (Halliwell i Gutteridge, 2015). Za razliku od superoksid radikala koji su relativno stabilni, hidroksil radikali su kratko živeći molekuli sa poluživotom od  $10^{-9}$  s pa stoga reaguju sa molekulima u neposrednoj blizini sa visokim afinitetom (Pastor i sar., 2000). Glavni mehanizam kojim  $\text{HO}\cdot$  nastaje u biološkim sistemima je Haber-Weiss-ova reakcija katalizovana gvožđem, koja se zasniva na Fentonovoj reakciji (Haber i Weiss, 1934; Liochev, 1999):



Slično prethodnoj reakciji, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se pod dejstvom mijeloperoksidaza i u prisustvu Cl<sup>-</sup> jona konvertuje u hipohlornu kiselinu (HOCl). HOCl može reagovati sa proteinima, lipidima, nukleinskim kiselinama i ugljenim hidratima, pri čemu mnoge od tih reakcija uključuju formiranje slobodnoradikalskih intermedijera, uključujući i HO<sup>•</sup> (Panassenko i sar., 2013). S' obzirom da sve klase biomolekula sadrže amino grupe (-NH<sub>2</sub>), reakcija HOCl sa -NH<sub>2</sub> grupom smatra se najvažnijom. Hlorinacija -NH<sub>2</sub> grupe i posledično formiranje slobodnih radikala dovodi do degradacije proteina, inaktivacije enzima, denaturacije nukleinskih kiselina, razgradnje ugljenih hidrata i podstiče proces lipidne peroksidacije (Panassenko i sar., 2013).

#### 1.2.1.2. Reaktivne vrste azota (RNS)

U glavne RNS spadaju azot oksid (NO<sup>•</sup>) i azot dioksid (<sup>•</sup>NO<sub>2</sub>), kao i neradikalne vrste poput peroksinitrita (ONOO<sup>-</sup>) (Halliwell i Gutteridge, 2015). Najizučavaniji od svih je NO<sup>•</sup> koji nastaje tokom oksidacije L-arginina u L-citrulin u reakciji koju katalizuje azot oksid sintaza (NOS) (Vincent i sar., 2000). NO<sup>•</sup> lako difunduje kroz membrane pa je stoga od velikog značaja u neuronalnoj signalizaciji. Takođe, NO<sup>•</sup> učestvuje u brojnim fiziološkim procesima, kao što su regulacija krvnog pritiska i regulacija imunog odgovora (Bergendi i sar., 1999).

Osim toga, pod određenim uslovima NO<sup>•</sup> može da reaguje sa drugim radikalima i molekulima. Tokom zapaljenskih procesa pokrenutih oksidativnim stresom, nastaju NO<sup>•</sup> i <sup>•</sup>O<sub>2</sub> koji u međusobnoj reakciji formiraju izuzetno reaktivni ONOO<sup>-</sup>. Iako ova reakcija smanjuje nivo <sup>•</sup>O<sub>2</sub> i drugih ROS i doprinosi održavanju redoks statusa u ćeliji, protonovana forma peroksinitrita (ONOOH) može dovesti do deplecije sulfhidrilnih (-SH) grupa, izazvati fragmentaciju DNK molekula, oksidaciju lipida i proteina i nitraciju aromatičnih aminokiselinskih ostataka proteina (Kohen i Nyska, 2002). Takođe, u reakciji NO<sup>•</sup> sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i HOCl mogu nastati i molekulski derivati (eng. *nitrogen-containing molecular derivatives*) kao što su N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> i NO<sub>2</sub>.

### 1.2.1.3. Oksidativna oštećenja biomolekula

#### 1.2.1.3.1. Oksidativna oštećenja molekula DNK

Slobodni radikali, pre svih HO•, interaguju sa organskim jedinjenjima kroz procese adicije ili oduzimanjem atoma vodonika (H<sup>+</sup>). Adicijom na dvostruke veze u heterocikličnom prstenu nukleotidnih baza DNK molekula ili oduzimanjem H<sup>+</sup> iz metil grupe timina nastaju radikali DNK baza koji u daljoj reakciji mogu dati različito modifikovane baze (Cooke i sar., 2003; Evans i sar., 2004). Radikali DNK baza mogu reagovati sa aromatičnim aminokiselinama u sastavu proteina, pri čemu dolazi do kroslinkovanja DNK i proteina (Dizdaroglu, 1998).

Pored nukleotidnih baza, slobodni radikali mogu izazvati promene i na šećernoj komponenti nukleotida. Oduzimanjem H<sup>+</sup> sa C atoma 2'-dezoksiriboze nastaju radikali koji, u zavisnosti od pozicije C atoma, mogu dati različite proizvode. Kao rezultat oksidativnog oštećenja 2'-dezoksiriboze neki modifikovani proizvodi se oslobađaju iz molekula DNK, neki ostaju u molekulu DNK u izmenjenom obliku, a mogu nastati i prekidi u DNK lancu pri čemu se modifikovani proizvodi mogu naći na 3' ili 5' kraju nastalog prekida (Evans i sar., 2004).

Za razliku od lipida i proteina čiji se oštećeni molekuli mogu ukloniti i zameniti ispravnim u toku odvijanja metaboličkih procesa, oštećeni molekuli DNK zahtevaju aktivaciju složenog sistema za popravku DNK (Evans i sar., 2004). Ukoliko se ne popravi, nastalo oštećenje na DNK molekulu može izazvati promene u genetičkom kodu, a time i mutacije (Ames, 1989).

#### 1.2.1.3.2. Oksidativna oštećenja lipida – Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija predstavlja proces oksidativnog oštećenja polinezasićenih masnih kiselina (eng. *polyunsaturated fatty acids* – PUFA) u ćelijskim membranama. Smatra se glavnim molekularnim mehanizmom koji dovodi do oksidativnog oštećenja ćelijskih struktura i posledičnog umiranja ćelija (Repetto i sar., 2012). Lipidna peroksidacija smanjuje fluidnost membrane, povećava njenu propustljivost za vodu i druge supstance za koje je inače

nepropusna i dovodi do oštećenja membranskih proteina, inaktivacije receptora, enzima i transportnih proteina (Halliwell i Gutteridge, 2015).

Lipidna peroksidacija je lančana reakcija koja započinje oduzimanjem  $H^+$  sa metilenske ( $=CH_2$ ) grupe PUFA od strane jakog oksidanta kao što je  $HO^\bullet$  ili  $HOO^\bullet$  (Girotti, 1985). C-H veza u metilenskoj grupi je nestabilna i podložnija procesu oduzimanja  $H^+$  zbog prisustva susedne dvostruke veze u strukturi PUFA. Na taj način se formira alkil radikal masne kiseline ( $L^\bullet$ ) koji se stabilizuje preuređenjem dvostrukih veza i formiranjem konjugovanog diena. U aerobnim uslovima, konjugovani dien interaguje sa kiseonikom i formira peroksil radikal ( $LOO^\bullet$ ) koji se oduzimanjem  $H^+$  sa drugog molekula PUFA prevodi u hidroperoksid ( $LOOH$ ) uz formiranje novog alkil radikala i propagacije lančane reakcije (Girotti, 1985). U prisustvu dovoljne količine kiseonika i neoksidovanih lipida, početni signal lipidne peroksidacije se uvećava višestruko. Do prekida lančane reakcije dolazi interakcijom između dva  $L^\bullet$ , dva  $LOO^\bullet$  ili između  $L^\bullet$  i  $LOO^\bullet$ . Pored toga, do prekida reakcije može doći interakcijom  $L^\bullet$  ili  $LOO^\bullet$  sa nelipidnim supstratima, kao što su polifenoli, askorbinska kiselina, glutation ili neki aminokiselinski ostaci.

Pored toga što prouzrokuje oštećenja membrane, tokom procesa lipidne peroksidacije nastaju brojni aldehidi. Za razliku od slobodnih radikala, aldehidi su stabilni i mogu delovati kao sekundarni glasnici na mestima udaljenim od mesta nastanka gde dovode do oštećenja DNK i proteina (Repetto i sar., 2012). Kao najvažniji krajnji proizvodi lipidne peroksidacije izdvajaju se 4-hidroksinonenal (HNE) i malondialdehid (MDA) i određivanje njihovog nivoa se često koristi za utvrđivanje procesa lipidne peroksidacije (Esterbauer i Cheeseman, 1990).

#### *1.2.1.3.3. Oksidativna oštećenja proteina*

Izuzimajući vodu, proteini predstavljaju najzastupljeniju vrstu molekula u biološkim sistemima. Iz tog razloga su kod većine organizama proteini glavna meta oksidativnog oštećenja. Slobodni radikali na različite načine dovode do oštećenja aminokiselina i proteina – mehanizmi uključuju reakcije adicije, supstitucije, oduzimanje  $H^+$ , transfer elektrona, fragmentaciju, dimerizaciju (Davies, 2012). Pojedina oštećenja proteina, kao što su formiranje disulfidne veze, S-nitrozilacija i glutationilacija su reverzibilna, dok su druga, poput oksidacije bočnih ostataka



aminokiselina ili isecanje peptidnih veza, ireverzibilna pa takvi proteini moraju biti uklonjeni i zamenjeni (Halliwell i Gutteridge, 2015).

U reakciji slobodnih radikala sa polipeptidnom kičmom ili nekom od bočnih grupa aminokiselina nastaje mnoštvo proteinskih radikala koji mogu imati različite posledice po strukturu i funkciju proteina (Davies, 2005). Oksidativno oštećenje proteina može promeniti funkcionisanje receptora, antitela, proteina uključenih u razne signalne puteve u ćeliji, enzima, strukturnih i transportnih proteina (Halliwell i Gutteridge, 2015). Pored toga, oštećeni proteini mogu izazvati sekundarna oštećenja drugih proteina i biomolekula. Oksidativno oštećenje enzima uključenih u proces popravke oštećenog DNK molekula može smanjiti njihovu aktivnost što povećava stepen oštećenja na DNK i stopu mutacija, dok oštećenja DNK polimeraza smanjuju efikasnost procesa replikacije. Oksidovane ili proteine modifikovane aldehidima (poput MDA ili HNE) imuni sistem može prepoznati kao strane pa dolazi do formiranja antitela i moguće pojave autoimunog odgovora (Halliwell i Gutteridge, 2015).

#### *1.2.1.3.4. Oksidativna oštećenja biomolekula kao markeri oksidativnog stresa*

S' obzirom da je oksidativni stres uključen u etiologiju mnogih bolesti, kao što su dijabetes, kancer, ateroskleroza i neurodegenerativna oboljenja, precizno merenje stepena oksidativnog oštećenja u ćeliji može biti od koristi u određivanju antioksidativnog tretmana u cilju odlaganja ili sprečavanja razvoja bolesti (Halliwell i Whiteman, 2004). Međutim, zbog kratkog polživota i visoke reaktivnosti, precizno merenje nivoa ROS-ova i oksidativnog stresa je izuzetno teško u živim sistemima. Stoga se kao biomarkeri oksidativnog stresa često koriste stabilni molekuli u ćeliji koji nastaju u interakciji biomolekula sa ROS/RNS u uslovima oksidativnog stresa, kao i molekuli sistema antioksidativne zaštite koji se menjaju u odgovoru na pojačani oksidativni stres (Ho i sar., 2013). Višak ROS/RNS dovodi do oksidativnih promena na molekulima DNK, lipida (uključujući membranske fosfolipide), proteina i ugljenih hidrata, pri čemu neke od tih promena imaju direktan uticaj na funkciju datog molekula (npr. inhibicija aktivnosti enzima) koja se određuje uz pomoć odgovarajućeg eseja. Za kliničku upotrebu, pored funkcionalnog značaja, biomarker mora biti lako dostupan,

stabilan u različitim uslovima čuvanja i pripreme uzorka, a esej kojim se utvrđuje mora biti specifičan, dovoljno osetljiv i reproducibilan (Dalle-Donne i sar., 2005).

### **1.2.2. Uloga oksidativnog stresa u narušavanju strukture i funkcije $\beta$ -ćelija**

Beta ćelije pankreasa su naročito podložne delovanju oksidativnog stresa jer poseduju nizak nivo endogene antioksidativne zaštite (Lenzen i sar., 1996). U poređenju sa jetrom, aktivnost katalaze, glutation peroksidaze 1 i bakar-cink superoksid dismutaze u ostrvcima iznosi, redom, 1%, 2% i 29% (Grankvist i sar., 1981; Tiedge i sar., 1997). Još uvek nije u potpunosti razjašnjeno zbog čega  $\beta$ -ćelije imaju tako slab sistem antioksidativne zaštite. Prema jednoj teoriji,  $\beta$ -ćelije su izgubile deo svog antioksidativnog sistema sa evolucijom mozga i placentalnih sisara. Naime, u stresnim uslovima, povećana količina oksidativnog stresa smanjuje sekreciju insulina čime se obezbeđuje dovoljna količina glukoze za mozak i fetus i povećava adaptivna vrednost organizma (Rashidi i sar., 2009). Pored toga, snižena antioksidativna aktivnost u ostrvcima omogućava sekreciju insulina, odnosno GSIS koji je posredovan reaktivnim vrstama kiseonika kao što je  $H_2O_2$ , ali sa druge strane, pojačani i perzistentni oksidativni stres se može negativno odraziti na GSIS proces i dovesti do oštećenja i propadanja  $\beta$ -ćelija pankreasa (Gerber i Rutter, 2017).

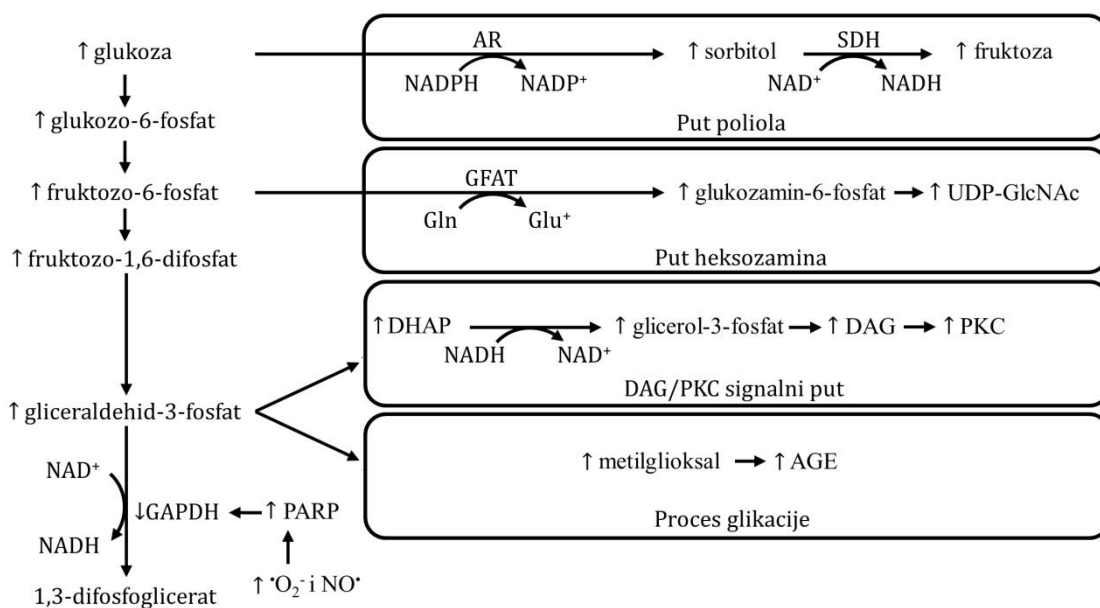
Autoimuna destrukcija  $\beta$ -ćelija tokom razvoja DT1 posredovana je  $CD8^+$  i  $CD4^+$  T limfocitima (DiLorenzo i sar., 1998; Katz i sar., 1993).  $CD8^+$  T limfociti uništavaju  $\beta$ -ćelije oslobađanjem perforina i granzima B ili aktivacijom FAS-L/FAS signalnog puta (Thomas i sar., 2010). Pored uloge pomoćnih ćelija,  $CD4^+$  T ćelije oslobađaju brojne inflamatorne citokine, kao što su interleukin (IL)-1, nekrozni faktor tumora (TNF)- $\alpha$  i interferon (IFN)- $\gamma$ , koji pokreću produkciju ROS i RNS vrsta u  $\beta$ -ćelijama (Lortz i sar., 2000; Suarez-Pinzon i sar., 1996).  $CD4^+$  T ćelije takođe privlače i aktiviraju makrofage (Cantor i Haskins, 2007) koje oslobađanjem  $NO\cdot$  i  $\cdot O_2^-$  dodatno doprinose povećanju nivoa slobodnih radikala i oštećenju  $\beta$ -ćelija. Hronična sistemska inflamacija u DT2 prouzrokuje pojačanu proizvodnju citokina koji putem opisanih mehanizama narušavaju funkciju  $\beta$ -ćelija i smanjuju njihovu vijabilnost (Butler i sar., 2003; Sakuraba i sar., 2002). Takođe, hronično

izlaganje povećanoj koncentraciji glukoze (glukotoksičnost) prouzrokuje brojne štetne efekte, uključujući i proizvodnju ROS i RNS vrsta. Glukotoksičnost i lipotoksičnost su od velikog značaja u procesu razvoja DT2 jer  $\beta$ -ćelije preživljavaju duži vremenski period u uslovima povećane koncentracije glukoze i slobodnih masnih kiselina koje doprinose sporom propadanju  $\beta$ -ćelija (Drews i sar., 2010). Usled povećane koncentracije glukoze pojačan je proces oksidativne fosforilacije što uzrokuje poremećaj funkcionisanja mitohondrija i proizvodnju ROS-ova (Tanaka i sar., 1999). Hronična hiperglikemija izaziva stres endoplazmatskog retikuluma (ER stres) koji pojačava proizvodnju ROS-ova, a koji povratnom spregom pojačavaju ER stres što dodatno doprinosi poremećaju proizvodnje insulina i umiranju  $\beta$ -ćelija (Kaufman i sar., 2010; Leibowitz i sar., 2010). Imajući u vidu navedeno, povećanje antioksidativnog kapaciteta  $\beta$ -ćelija može predstavljati dobar terapijski pristup u cilju smanjenja oksidativnog stresa i povećanja funkcionalnosti  $\beta$ -ćelija.

### **1.2.3. Uloga oksidativnog stresa u razvoju komplikacija u dijabetesu**

Hiperglikemija i oksidativni stres su usko povezani i predstavljaju važne posrednike u razvoju komplikacija u dijabetesu. Glavni izvor ROS-ova u uslovima hiperglikemije je autooksidacija glukoze (Wolff i Dean, 1987). Kao enediol, glukoza se u reakciji zavisnoj od prelaznih metala oksiduje do enediol anjon radikala koji se dalje konvertuje u reaktivne ketoaldehide i  $\cdot\text{O}_2^-$ . Ovako nastali  $\cdot\text{O}_2^-$  može dovesti do peroksidacije lipoproteina male gustine (engl. *low-density lipoprotein*; LDL) što dodatno proizvodi još slobodnih radikala (Tsai i sar., 1994). Takođe, u uslovima hiperglikemije povećana je proizvodnja  $\cdot\text{O}_2^-$  od strane transportnog lanca elektrona u mitohondrijama (Du i sar., 2000; Nishikawa i sar., 2000). Pored toga, hiperglikemija preko aktivacije NF $\kappa$ B transkripcionog faktora povećava ekspresiju NOX i inducibilne NO sintaze (iNOS) i proizvodnju  $\cdot\text{O}_2^-$  i NO $\cdot$  (Spitaler i Graier, 2002) koji u međusobnoj interakciji formiraju ONOO $\cdot$ . Peroksinitrit oštećuje molekul DNK uvođenjem jednolančanih prekida što predstavlja stimulus za aktivaciju poli(ADP-ribozil) polimeraze (PARP) (Garcia Soriano i sar., 2001). Nakon vezivanja za oštećeni DNK molekul PARP formira homodimer i katalizuje isecanje NAD $^+$  do nikotinamida i ADP-riboze, koju dalje koristi za formiranje

poli(ADP-ribozil) polimera koji se kovalentno vezuju za proteine (Virag i Szabo, 2002). Procesu poli(ADP-ribozil)acije, između ostalih, podleže i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH), enzim koji u procesu glikolize katalizuje konverziju gliceraldehid-3-fosfata u 1,3-difosfoglicerat. Poli(ADP-ribozil)acija GAPDH enzima smanjuje njegovu aktivnost (Du i sar., 2000) čime dolazi do akumulacije glikolitičkih intermedijera uzvodno od GAPDH (glukoza → glukoza-6-fosfat → fruktoza-6-fosfat → fruktoza-1,6-difosfat → gliceraldehid-3-fosfat i dihidroksiaceton fosfat). To dovodi do pojačane aktivnosti nekoliko važnih biosintetskih puteva, kao što su put poliola, proces glikacije (neenzimatske glikozilacije proteina), put heksozamina i diacil glicerol (DAG)-protein kinaza C (PKC) signalni put, koji dodatno pojačavaju proizvodnju slobodnih radikala i dovode do oštećenja tkiva i razvoja komplikacija u dijabetesu.



**Slika 1.3. Povećana proizvodnja superoksid anjon radikala i azot oksida u uslovima hiperglikemije smanjuje aktivnost GAPDH i aktivira četiri biosintetska puta koji dovode do oštećenja tkiva i razvoja komplikacija u dijabetesu.** AR – aldehyd reduktaza; SDH – sorbitol dehidrogenaza; GFAT – glutamin-fruktozo-6-fosfat aminotransferaza. Preuzeto i modifikovano iz (Brownlee, 2001).

Poliol put je dvostepeni put konverzije glukoze u fruktozu. Aldehyd reduktaza (AR) najpre, uz učešće nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) kao kofaktora, redukuje glukoze do sorbitola koji se oksiduje do fruktoze posredstvom sorbitol dehidrogenaze uz učešće kofaktora  $\text{NAD}^+$  (Chung i sar.,

2003). Aldehyd reduktaza ima nizak afinitet prema glukozi i pri fiziološkim koncentracijama se mali procenat glukoze metaboliše na ovaj način. Međutim, u uslovima hiperglikemije oko 30% glukoze se usmerava kroz put poliola (Cheng i Gonzalez, 1986). Aktivnost aldehyd reduktaze značajno smanjuje količinu NADPH koji predstavlja i supstrat za glutacion reduktazu koja regeneriše pul glutaciona (GSH), najznačajnijeg neenzimskog antioksidansa u ćeliji. Na taj način pojačana aktivnost aldehyd reduktaze u uslovima hiperglikemije umanjuje antioksidativni kapacitet ćelije. Pojačana aktivnost sorbitol dehidrogenaze takođe predstavlja izvor ROS vrsta jer se tokom oksidacije sorbitola do fruktoze NAD<sup>+</sup> konvertuje u NADH koji predstavlja supstrat za NOX enzim koji redukuje kiseonik do •O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Morre i sar., 2000).

Glikacija predstavlja neenzimatsku reakciju između redukujućih šećera uključujući glukozu sa jedne strane i proteina, lipida ili nukleinskih kiselina sa druge strane (Ahmed, 2005). Proces glikacije započinje formiranjem nestabilnih Šifovih baza koje se prevode u stabilne Amadori proizvode (Paul i Bailey, 1996). Akumulacija velike količine Amadori proizvoda dovodi do njihovog daljeg rearanžmana i kroslinkovanja čime nastaje heterogena grupa molekula označena kao krajnji proizvodi glikacije (eng. *advanced glycation end products*, AGEs). Prekursori AGE-ova mogu nastati autooksidacijom glukoze do glioksala unutar ćelije (Wells-Knecht i sar., 1995), razgradnjom Amadori proizvoda (1-amino-1-deoksifruktozolizin) do 3-dezoksiglukozone i fragmentacijom gliceraldehyd-3-fosfata i dihidroxiaceton fosfata do metilglioksala (Thornalley, 1990). Glioksal, metilglioksal i 3-dezoksiglukozone su veoma reaktivni molekuli i dovode do kroslinkovanja proteina (Ahmed, 2005). Povećana proizvodnja prekursora AGE-ova u ćeliji oštećuje ćelije i tkiva preko tri mehanizma: kovalentna modifikacija unutarćelijskih proteina prekursorima AGE-ova menja funkciju proteina; modifikacija proteina vanćelijskog matriksa utiče na međusobnu interakciju proteina i na njihove interakcije sa integrinskim receptorima; proteini plazme modifikovani prekursorima AGE-ova se vezuju za odgovarajuće receptore za AGE-ove (RAGE) na membrani endotelijalnih i mezangijalnih ćelija i makrofaga i pokreću proizvodnju ROS-ova (Goldin i sar., 2006). Takođe, AGE-RAGE interakcija dovodi do aktivacije transkripcionog faktora NFκB što uzrokuje patološke

promene u ekspresiji gena (Brownlee, 2001). Akumulacija AGE-ova je povećana u dijabetesu i u velikoj meri doprinosi razvoju ateroskleroze, hipertenzije i komplikacija u dijabetesu (Brownlee, 1995).

Zbog povećane količine dihidroksiaceton fosfata u uslovima hiperglikemije povećana je koncentracija DAG-a. Dihidroksiaceton fosfat se redukuje do glicerol-3-fosfata koji naknadno povećava *de novo* sintezu DAG-a (Xia i sar., 1994). Povećana koncentracija DAG-a aktivira PKC, familiju serin/treonin protein kinaza uključenih u kontrolu funkcije brojnih proteina (Geraldés i King, 2010). Familija PKC se sastoji od nekoliko izoformi koje svoje dejstvo ostvaruju u različitim biološkim sistemima (Steinberg, 2008). Fosfatidilserin, kalcijum i DAG ili forbol estri aktiviraju konvencionalne PKC (PKC- $\alpha$ , PKC- $\beta$ 1, PKC- $\beta$ 2 i PKC- $\gamma$ ), grupu novih PKC (PKC- $\delta$ , - $\epsilon$ , - $\theta$  i - $\eta$ ) aktiviraju fosfatidilserin, DAG ili forbol estri, dok su netipične PKC (PKC- $\zeta$  i  $\iota/\lambda$ ) neosetljive na kalcijum, DAG ili forbol estre (Geraldés i King, 2010). Takođe, PKC se mogu aktivirati preko  $H_2O_2$  nezavisno od lipidnih sekundarnih glasnika (Konishi i sar., 1997) i preko  $\cdot O_2^-$  koji nastaje u mitohondrijama u uslovima hiperglikemije (Nishikawa i sar., 2000). Aktivacija različitih izoformi PKC u dijabetesu uzrokuje poremećaje u funkcionisanju endotela, propustljivosti krvnih sudova, angiogenezi, ćelijskom rastu i apoptozi, vazodilataciji, sintezi vanćelijskog matriksa, adheziji leukocita. Takođe, PKC dovodi do zadebljanja bazalne membrane, promena u aktivnosti enzima (kao što su MAPK, fosfolipaza A2,  $Na^+K^+$ -ATPaza) i transkripcionih faktora. Patološke promene u krvnim sudovima koje nastaju kao posledica aktivnosti različitih izoformi PKC dovode do razvoja ateroskleroze, kardiomiopatije, retinopatije, nefro- i neuropatije (Geraldés i King, 2010).

Pojačan priliv glukoze-6-fosfata u put biosinteze heksozamina (eng. *hexosamine biosynthesis pathway*, HBP) dovodi do pojačane proizvodnje uridin difosfat N-acetilglukozamina (UDP-GlcNAc) kao krajnjeg proizvoda ovog puta (Marshall i sar., 1991). UDP-GlcNAc je supstrat za enzim O-GlcNAc transferazu (OGT) koji katalizuje glikozilaciju brojnih citoplazmatskih i jedarnih proteina dodavanjem O-GlcNAc na hidroksilne grupe serina i treonina. Dodavanje O-GlcNAc (O-GlcNAc-ilacija) se smatra analogom fosforilacije (Guinez i sar., 2005) ali je, za razliku od fosforilacije koja je regulisana brojnim kinazama i fosfatazama, ovaj

proces posredovan samo enzimima OGT i N-acetil-glukozaminidazom (O-GlcNAza ili OGA) koja katalizuje uklanjanje O-GlcNAc (Butkinaree i sar., 2010; Zachara i Hart, 2004). Slično procesu fosforilacije/defosforilacije, O-GlcNAc-ilacija dovodi do aktivacije/inhibicije ciljnih proteina. O-GlcNAc modifikovani proteini mogu u isto vreme biti i fosforilisani što utiče na interakcije sa drugim proteinima i njihovu unutarćelijsku lokalizaciju, a time i na funkciju (Wang i sar., 2008). O-GlcNAc-ilacija je uključena u regulaciju mnogih bioloških procesa, kao što su jedarni transport, transkripcija i translacija, prenos signala, reorganizacija citoskeleta, proteozomalna degradacija i apoptoza (Guinez i sar., 2005; Wells i sar., 2001). Pojačana O-GlcNAc-ilacija dovodi do oksidativnog i ER stresa koji uzrokuju pojavu hronične inflamacije i razvoj insulinske rezistencije (Werstuck i sar., 2006).

Putem opisanih mehanizama, hronična hiperglikemija dovodi do oksidativnog stresa koji u značajnoj meri doprinosi razvoju brojnih komplikacija kod dijabetičara, od akutnih metaboličkih (dijabetična ketoacidoza, hipoglikemija) do hroničnih komplikacija koje se kasnije razvijaju (Forbes i Cooper, 2013). Hronične komplikacije se mogu podeliti na mikro- i makrovaskularne, pri čemu su mikrovaskularne komplikacije učestalije (Deshpande i sar., 2008). U mikrovaskularne komplikacije spadaju neuropatija, nefropatija, retinopatija i hepatopatija, dok se u makrovaskularne komplikacije ubrajaju kardiovaskularne bolesti, infarkt i periferna arterijska bolest.

Imajući u vidu da su eritrociti prve ćelijske strukture koje odgovaraju na povišen nivo oksidativnog stresa u uslovima hiperglikemije (Bryszewska i sar., 1995) kao i da stepen njihovog oštećenja predstavlja odraz celokupnog stanja organizma (Tsantes i sar., 2006), naredno poglavlje će biti posvećeno ulozi oksidativnog stresa u narušavanju njihove strukture i funkcije u uslovima dijabetesa. Pored toga, kako dijabetes predstavlja jedan od najčešćih uzroka razvoja bolesti jetre u svetu, a dijabetesna nefropatija koja ne samo da dovodi do smrtnog ishoda već predstavlja i glavni faktor rizika nastanka makrovaskularnih komplikacija, biće reči i o doprinosu oksidativnog stresa u nastanku ovih komplikacija.

### 1.2.3.1. Oksidativna oštećenja eritrocita u dijabetesu

Kao jedinstvene, visoko specijalizovane ćelije bikonkavnog oblika, sa visokom koncentracijom hemoglobina (Hb), eritrociti obavljaju transport O<sub>2</sub> iz pluća do tkiva i CO<sub>2</sub> iz tkiva do pluća. Efikasan transport omogućen je zahvaljujući specijalizovanoj strukturi membrane eritrocita kao i postojanju aktivnog izvora energije u ćeliji i specifičnih fosforilisanih intermedijera (Edwards i Fuller, 1996). Tokom procesa transporta O<sub>2</sub> eritrociti su izloženi promenljivim uslovima sredine i nivoa oksidativnog stresa, što je naročito izraženo u patološkim stanjima.

Zbog visoke koncentracije O<sub>2</sub> i gvožđa (Fe<sup>2+</sup>) koje sadrže, eritrociti su podložni oksidativnom oštećenju, pa stoga poseduju efikasan antioksidativni sistem koji pruža zaštitu ne samo eritrocitima već i drugim tkivima i organima (Siems i sar., 2000). Usled odsustva jedra, zreli eritrociti ne mogu da odgovore sintezom novih proteina ili zamenom oštećenih makromolekula već se oslanjaju na postojeće proteine koji im pružaju zaštitu od oksidativnog stresa. Zbog odsustva mitohondrija, glavni izvor ROS-ova u eritrocitima je oksigenisana forma Hb (HbFe<sup>2+</sup>O<sub>2</sub>) koja se lako oksiduje do metHb (HbFe<sup>3+</sup>) uz otpuštanje •O<sub>2</sub><sup>-</sup> koji u prisustvu H<sup>+</sup> oksiduje drugi molekul HbFe<sup>2+</sup>O<sub>2</sub> do HbFe<sup>3+</sup> uz formiranje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nastali H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalje oksiduje novi molekul HbFe<sup>2+</sup>O<sub>2</sub> i tom prilikom se oslobađa HO•. Oksidacija Hb do metHb se sumirano može prikazati reakcijom:  $4HbFe^{2+}O_2 + 2H^+ \rightarrow 4HbFe^{3+} + 2OH^- + 3O_2$ , uz oslobađanje •O<sub>2</sub><sup>-</sup>, HO• i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Faivre i sar., 1998). U fiziološkim uslovima se nivo metHb u eritrocitima održava ispod 1% u odnosu na ukupni Hb, ali se u uslovima oksidativnog stresa, poput onih koji vladaju u dijabetesu, koncentracija metHb višestruko uvećava. Oksidativna oštećenja eritrocita narušavaju njihovu strukturu, funkciju i metabolizam (Dallak i Jaliah, 2010). Pojačan oksidativni stres u eritrocitima narušava fluidnost membrane i inaktivira receptore i enzime vezane za membranu (Halliwell i Gutteridge, 1986), pojačava proces lipidne peroksidacije (Rohn i sar., 1998) i oksidaciju GSH i -SH grupa proteina (Telci i sar., 2000). Povećana količina ROS-ova u eritrocitima oštećuje i ćelije koje su u bliskom kontaktu sa njima i na taj način doprinose širenju oksidativnog oštećenja (Huertas i sar., 2013). U uslovima hiperglikemije pojačan je proces glikacije hemoglobina (glikozilovani Hb – GlyHb) koji je podložniji



oksidaciji i proteolitičkoj degradaciji od neglikozilovanog Hb (Sen i sar., 2005). Degradacijom Hb oslobađaju se hem i gvožđe koje doprinosi povećanoj proizvodnji slobodnih radikala i oksidativnom oštećenju eritrocita.

Eritrociti menjaju oblik prilikom prolaska kroz uske kapilare čiji je prečnik manji od prečnika samih eritrocita. Sposobnost eritrocita da se pod dejstvom sile izduže i provuku kroz kapilare a zatim povrate prvobitni oblik bez oštećenja označena je kao deformabilitet (Park i sar., 2012). Deformabilitet i agregacija eritrocita, koja predstavlja proces reverzibilnog slepljivanja susednih eritrocita i formiranje struktura nalik lancu, određuju stopu protoka krvi (Singh i Shin, 2009). Promene u sastavu lipida i proteina u eritrocitima u uslovima hronične hiperglikemije smanjuju deformabilitet eritrocita i povećavaju njihovu agregaciju što smanjuje protok eritrocita u mikrocirkulaciji i dotok kiseonika i rezultuje oštećenjem tkiva (Mohanty i sar., 2014).

#### 1.2.3.2. Oksidativna oštećenja jetre i bubrega u dijabetesu

Brojna istraživanja ukazuju na to da se u uslovima dijabetesa javljaju razni poremećaji u jetri, kao što su fibroza, ciroza, nealkoholna masna jetra (eng. *non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD), hepatocelularni karcinom, akutna bolest jetre, virusni hepatitis (Güven i sar., 2006; Levinthal i Tavill, 1999). Jetra je glavni organ koji vrši detoksikaciju organizma i ima važnu ulogu u regulaciji koncentracije glukoze u krvi između obroka kako u fiziološkim, tako i u patološkim stanjima poput dijabetesa (Leclercq i sar., 2007). Jetra spada među prve organe podložne štetnim efektima oksidativnog stresa, a koji dovode do oštećenja tkiva jetre i poremećaja metabolizma proteina, lipida i ugljenih hidrata što zauzvrat povećava oksidativni stres i inflamatorne procese u jetri (Bugianesi i sar., 2005; Leclercq i sar., 2007; Manna i sar., 2010). Pojačana produkcija  $\cdot\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\text{HO}\cdot$  od strane aktiviranih Kupferovih ćelija smatra se glavnim uzrokom oštećenja hepatocita (Wei i sar., 2010). U isto vreme, povećana količina adipocitokina, kao što su leptin i  $\text{TNF-}\alpha$ , pojačava proizvodnju ROS-ova u mitohondrijama hepatocita i dodatno ih oštećuje (Garcia-Compean i sar., 2009). Pojačana proizvodnja ROS-ova izaziva apoptozu i nekrozu hepatocita i oslobađanje inflamatornih citokina što povećava ekspresiju adhezionih molekula i infiltraciju leukocita i aktivira stielatne

ćelije koje proizvode CTGF (eng. *connective tissue growth factor*) i kolagen koji se akumuliraju u vanćelijskom matriksu i uzrokuju pojavu fibroze, ciroze i, na kraju, hepatocelularnog karcinoma (Garcia-Compean i sar., 2009).

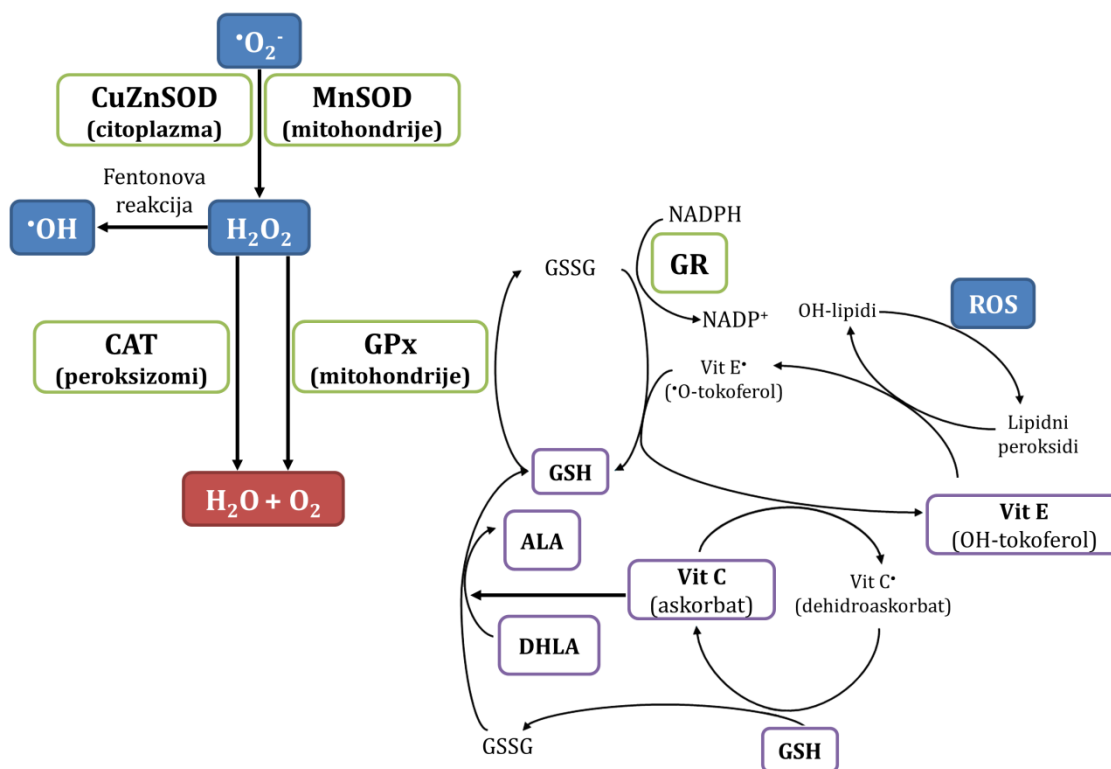
Dijabetesnu nefropatiju (DN) karakterišu proteinurija (pojava proteina u mokraći) i smanjenje stope glomerularne filtracije koja se razvija tokom dužeg vremenskog perioda a može dovesti do terminalne bubrežne insuficijencije (Gross i sar., 2005). DN je takođe glavni faktor rizika nastanka makrovaskularnih komplikacija (Deshpande i sar., 2008). Usled prisustva brojnih ćelija u bubregu koje imaju različitu fiziološku ulogu proces nastanka i razvoja DN je složen. U procesu razvoja DN razlikuje se pet faza: glomerularna hiperfiltracija, početna faza nefropatije, mikroalbuminurija, proteinurija i hronična bubrežna insuficijencija (Mogensen i sar., 1983). Oksidativni stres kao posledica hiperglikemije negativno utiče na endotelijalne, glatke mišićne, tubularne i mezangijalne ćelije, podocyte, inflamatorne ćelije i miofibroblaste u bubregu. Proces preuzimanja glukoze od strane mezangijalnih i tubularnih ćelija u bubregu nije regulisan insulinom, pa ove ćelije ne mogu da kontrolišu količinu preuzete glukoze u uslovima hiperglikemije (Heilig i sar., 1995). Hronična hiperglikemija u mezangijalnim i tubularnim ćelijama stimuliše produkciju AGE-ova, aktivaciju puta poliola i PKC što doprinosi pojačanoj produkciji ROS-ova i oksidativnom stresu (Pacher i sar., 2005). Takođe, glomerularne i tubularne ćelije i fibroblasti u bubregu eksprimiraju NOX i time dodatno doprinose povećanoj produkciji ROS-ova i oštećenju bubrežnog tkiva u uslovima dijabetesa (Shiose i sar., 2001). Pojačana produkcija ROS-ova u glomerulusu i tubulama dovodi do poremećaja u funkcionisanju endotelnih ćelija, infiltracije inflamatornih ćelija i apoptoze glomerularnih ćelija (Pautz i sar., 2002). Oksidativni stres u kombinaciji sa povećanom količinom proinflamatornih citokina, poput TNF- $\alpha$  i IL-1, aktivira brojne signalne puteve (PKC, MAPK, JAK-STAT) koji rezultuju aktivacijom redoks-senzitivnih transkripcionih regulatora NF $\kappa$ B, AP-1, STAT (Mason i Wahab, 2003; Palmer i Paulson, 1997) i povećanjem ekspresije gena za TGF- $\beta$  (eng. *transforming growth factor  $\beta$* ) (Nath i sar., 1998)) i CTGF (Park i sar., 2001). Ovi procesi za posledicu imaju taloženje vanćelijskog matriksa u tubularnim komponentama bubrega i razvoja

tubulointersticijalne fibroze koja predstavlja glavni faktor u napredovanju dijabetesne nefropatije (Mauer i sar., 1984).

### **1.3. Endogeni sistem antioksidativne zaštite**

Konstantna izloženost organizma slobodnim radikalima poreklom iz različitih izvora dovela je do razvoja složenog sistema antioksidativne zaštite. Uopšteno, antioksidans predstavlja bilo koju supstancu koja sprečava, odlaže ili uklanja oksidativno oštećenje sa ciljnog molekula (Halliwell i Gutteridge, 2015). Ne postoji univerzalni "najbolji" antioksidans – različiti antioksidansi reaguju sa različitim slobodnim radikalima sa promenljivom efikasnošću, na različitim mestima i štite različite ciljne molekule.

Antioksidansi se mogu podeliti na endogene i egzogene. U endogene antioksidanse spadaju enzimi kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPx), glutation reduktaza (GR), tioredoksin reduktaza, metalotionein, i neenzimski antioksidansi kao što su glutation (GSH), melatonin, NADPH, koenzim Q-10, cistein, homocistein, metionin, taurin (Andre i sar., 2010; Mates i sar., 2008).



**Slika 1.4. Sistem antioksidativne zaštite.** CAT – katalaza; GPx – glutation peroksidaza; GR – glutation reduktaza; Mn/CuZnSOD – mangan i bakar-cink superoksid dismutaza; GSH – redukovani glutation; GSSG – oksidovani glutation; ALA – alfa lipoinjska kiselina; DHLA – dihidrolipoinjska kiselina; ROS – reaktivne vrste kiseonika:  $\cdot\text{O}_2^-$  - superoksid anjon radikal;  $\cdot\text{OH}$  – hidroksil radikal;  $\text{H}_2\text{O}_2$  – vodonik peroksid. Preuzeto i modifikovano iz (Lazo-de-la-Vega-Monroy i Fernandez-Mejia, 2013).

### 1.3.1. Superoksid dismutaza

Superoksid dismutaza (SOD; EC 1.15.1.1) predstavlja prvu liniju odbrane od ROS-ova i može se naći kod svih aerobnih organizama. SOD katalizuje proces dismutacije  $\cdot\text{O}_2^-$  do  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\text{O}_2$  ( $2\cdot\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ ) (Fridovich, 1997). S' obzirom da su fosfolipidne membrane nepropustljive za  $\cdot\text{O}_2^-$ , SOD je prisutna u svim odeljcima ćelije gde se  $\cdot\text{O}_2^-$  proizvodi (Takahashi i Asada, 1983). Kod sisara se razlikuju tri izoforme SOD: SOD1 (CuZnSOD), SOD2 (MnSOD) i SOD3 (EC-SOD) koje kodiraju različiti geni i koje imaju različitu unutarćelijsku lokalizaciju.

SOD1 ili CuZnSOD je u formi dimera molekulske težine 32 kDa lokalizovana uglavnom u citosolu, mada se mali deo može naći i u nukleusu, lizozomima i peroksizomima (Crapo i sar., 1992). Enzimatska aktivnost CuZnSOD zavisi od prisustva atoma Cu i Zn neophodnih za katalitičku aktivnost (Cu) i pravilno

savijanje i održavanje stabilnosti proteina (Zn) (McCord i Fridovich, 1969). SOD2 ili MnSOD se u formi tetramera molekulske težine 96 kDa nalazi u mitohondrijalnom matriksu (Fridovich i Freeman, 1986). Mangan koji se nalazi u aktivnom centru enzima katalizuje dismutaciju  $\cdot O_2^-$  na sličan način kao i CuZnSOD. Za razliku od CuZnSOD koja je osetljiva na cijanid, MnSOD je relativno otporna, što se eksperimentalno koristi za razlikovanje aktivnosti ove dve izoforme enzima. SOD3 je sekretorna vanćelijska SOD (EC-SOD) sa atomima Cu i Zn u katalitičkom centru i kod većine vrsta je u formi tetramera molekulske težine 135 kDa. EC-SOD se u tkivima prvenstveno nalazi u vanćelijskom matriksu i na površini ćelija, a manji deo se može naći u plazmi i vanćelijskim tečnostima (Fukai i Ushio-Fukai, 2011).

### **1.3.2. Katalaza**

Katalaza (CAT; EC 1.11.1.6) je enzim koji se uglavnom nalazi u peroksizomima i ključni je enzim u metabolizmu  $H_2O_2$ . CAT je tetramerni enzim koji sačinjen od četiri identične, tetraedarno organizovane subjedinice molekulske težine 62 kDa (kod čoveka), od kojih svaka u aktivnom centru ima prostetičnu hem grupu (hem b grupa, slična prostetičnoj grupi hemoglobina) i NADPH kao kofaktor (Glorieux i Calderon, 2017). Glavna uloga CAT jeste dismutacija  $H_2O_2$  do molekula  $O_2$  i  $H_2O$  ( $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ ), pri čemu se enzim najpre oksiduje do visoko valentnog Fe intermedijera koji se zatim, u daljoj reakciji sa  $H_2O_2$  redukuje i vraća u prvobitno stanje. Pri niskim koncentracijama  $H_2O_2$  enzim ispoljava peroksidativno dejstvo i učestvuje u razlaganju malih supstrata, kao što su metanol, etanol, azid, hidroperoksidi (Chance i sar., 1979; Johansson i Borg, 1988; Sies, 1974).

### **1.3.3. Glutation peroksidaza i glutacion reduktaza**

Glutation peroksidaza (GPx; EC 1.11.1.9) predstavlja grupu filogenetski povezanih enzima koji katalizuju redukciju  $H_2O_2$  ili organskih peroksida do  $H_2O$  ili odgovarajućih alkohola, uz upotrebu glutaciona (GSH) kao redukujućeg faktora ( $ROOH + 2GSH \rightarrow ROH + GSSG + H_2O$ ) (Ursini i sar., 1995). Kod sisara, GPx1-4 su selenoproteini sa selenocisteinom u katalitičkom centru, a svoju antioksidativnu

aktivnost ispoljavaju na različitim mestima i u različitim ćelijskim odeljcima. GPx1 je otkrivena 1957. godine kao enzim koji štiti eritrocite od oksidativnog oštećenja (Mills, 1957). To je najzastupljenija selenoperoksidaza koja se u formi tetramera sačinjenog od četiri identične subjedinice molekulske mase 22-23 kDa (Miwa i sar., 1983) nalazi u skoro svim tkivima (Lubos i sar., 2011). GPx2 je najzastupljenija u gastrointestinalnom traktu, GPx3 u plazmi dok se antioksidativni efekat GPx4 ispoljava na membranama (Brigelius-Flohe i Maiorino, 2013). GPx5 je sekretorni protein u epididimisu, a u njenom katalitičkom centru se umesto selenocisteina nalazi cistein (Ghyselinck i Dufaure, 1990). GPx6 je selenoprotein u epitelu oka kod čoveka (Dear i sar., 1991), dok su GPx7 i GPx8 peroksidaze sa cisteinom u aktivnom centru i imaju nisku katalitičku aktivnost.

Tokom katalitičke aktivnosti GPx, GSH se oksiduje do GSSG koji se brzo ponovo redukuje do GSH pod dejstvom glutathion reduktaze ( $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$ ). Glutathion reduktaza (GR; EC 1.8.1.7) se sastoji od dve subjedinice molekulske težine 58 kDa od kojih svaka u aktivnom centru ima flavin adenin dinukleotid (FAD), što GR svrstava u grupu flavoenzima. Za katalitičku aktivnost GR kao kofaktor je neophodan NADPH koji se obezbeđuje iz puta pentozo fosfata (Cole i Kramer, 2016).

#### **1.3.4. Glutathion**

Glutathion (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinilglicin; GSH) je jedan od najvažnijih neenzimskih antioksidanasa u ćeliji. Direktno ili kao kofaktor enzima učestvuje u uklanjanju  $\cdot O_2^-$ ,  $HO\cdot$ ,  $ONOO^-$ , lipidnih peroksil radikala,  $H_2O_2$  (Fang i sar., 2002). Tom prilikom GSH se oksiduje do GSSG koji se pod dejstvom NADPH-zavisne GR redukuje do GSH. U fiziološkim uslovima koncentracija GSH je od 10 do 100 puta veća od koncentracije GSSG. Stoga je odnos GSH/GSSG važan pokazatelj redoks statusa u ćeliji i bilo kakav pomeraj prema oksidovanom stanju (više GSSG) aktivira brojne signalne puteve (uključujući Akt kinazu, protein fosfataze 1 i 2A,  $NF\kappa B$ , JNK kinazu, kinazu 1 aktiviranu signalom za apoptozu, MAP kinaze), što utiče na proliferaciju ćelija i povećava proces apoptoze (Sen, 2000).

Pored toga što učestvuje u održavanju redoks homeostaze, GSH je uključen u brojne druge fiziološke procese, kao što su metabolizam ksenobiotika,

održavanje -SH grupa proteina i drugih molekula, metabolizam estrogena, leukotriena i prostaglandina, učestvuje u procesu redukcije ribonukleotida do dezoksiribonukleotida (Lushchak, 2012).

### **1.3.5. Regulacija ekspresije komponenti sistema antioksidativne zaštite**

Poznato je da eukariotska ćelija poseduje složene mehanizme putem kojih reguliše ekspresiju gena. Jedan od tih mehanizama uključuje regulatorne proteine gena koji vezivanjem za specifične regulatorne sekvence na molekulu DNK (promotore, pojačivače, prigušivače) regulišu transkripciju gena kako u fiziološkim, tako i u stresnim uslovima i time omogućavaju ćeliji da adekvatno odgovori na izmenjene uslove sredine (Gill, 2001). Neki od najvažnijih proteina uključenih u regulaciju transkripcije gena za enzime antioksidativne zaštite su NFκB, Nrf-2, Sp1, FOXO.

Nuklearni faktor-κB (NFκB), prvobitno otkriven kao regulator ekspresije lakog lanca (κB) imunoglobulina u B limfocitima, predstavlja familiju transkripcionih regulatora uključenih u regulaciju ekspresije preko 150 različitih gena (Ghosh i sar., 1998; Pahl, 1999). Pet članova NFκB familije, p50, p52, p65 (RelA), c-Rel i Rel-B, formiraju različite homo- i heterodimere, pri čemu su najčešće aktivne forme p50/p65 i p52/p65 heterodimeri. Svaki od članova NFκB familije poseduje konzervirani N-terminalni region (Rel-homologni domen, eng. *Rel-homology domain*) koji sadrži domene za dimerizaciju, jedarnu lokalizaciju i domen za vezivanje za DNK (Li i Verma, 2002; Silverman i Maniatis, 2001). U neaktivnoj formi NFκB dimeri se u većini ćelija nalaze u citoplazmi u kompleksu sa inhibitornim proteinima označenim kao IκB. U odgovoru na različite stimulse, uključujući citokine, oksidativni stres, virusne i bakterijske patogene, posredstvom IκB proteinske kinaze (IKK) fosforiliše se IκB i degraduje u 26S proteazomu (Ben-Neriah, 2002). Degradacija inhibitorne subjedinice aktivira NFκB koji se translocira u jedro i vezuje za molekul DNK u promotorskim ili pojačivačkim regionima specifičnih gena, uključujući CuZnSOD (Rojo i sar., 2004) i MnSOD (Das i sar., 1995; Xu i sar., 1999). Iako su u promotorskim/pojačivačkim regionima brojnih gena identifikovana NFκB vezujuća mesta, transkripcija pojedinačnih gena

i količina transkribovanih produkata nakon aktivacije NFκB zavisi od brojnih faktora, uključujući sastav NFκB dimera, prirodu stimulusa koji aktivira NFκB, broja konsenzusnih sekvenci za vezivanje NFκB u ciljnom genu kao i od kooperacije sa drugim transkripcionim regulatorima (Karin i sar., 2001; Kumar i sar., 2004).

Nrf-2 (eng. *nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*), član CNC (eng. *Cap 'n' Collar*) podfamilije transkripcionih aktivatora sa leucinskim zatvaračem (eng. *leucine zipper*), je glavni regulator koordinisane ekspresije gena za proteine i enzime uključene u odgovor na ćelijski stres, kao što su SOD, CAT, GPx, NAD(P)H:kinon oksidoreduktaza-1, glutation-S-transferaza, hem oksigenaza-1, glutamat-cisteinska ligaza (enzim uključen u sintezu GSH) i tioredoksin (Chen i Kong, 2004; Dinkova-Kostova i Talalay, 2008; Egger i sar., 2008; Lee i Surh, 2005; Motohashi i Yamamoto, 2004). U odsustvu stresa Nrf-2 se nalazi u citoplazmi ćelija u kompleksu sa represornim proteinom Keap1 (eng. *Kelch-like ECH-associated protein 1*), koji je usidren u aktinski citoskelet (Itoh i sar., 1999) što omogućava proteozomalnu degradaciju i održavanje niskog bazalnog nivoa Nrf-2 proteina (Villeneuve i sar., 2010). U uslovima oksidativnog i elektrofilnog stresa dolazi do prekida procesa ubikvitinacije i proteozomalne degradacije Nrf-2 proteina (Egger i sar., 2005) i njegove disocijacije sa Keap1 proteina i translokacije u jedro. U jedru Nrf-2 formira heterodimere sa drugim transkripcionim regulatorima, kao što su Maf proteini, i vezuje se za uzvodne 5' *cis* regulatorne sekvence označene kao ARE (eng. *antioxidant response element*) i ERE (eng. *electrophile response element*) u promotorima ciljnih gena (Itoh i sar., 1997).

Sp1 (eng. *specificity protein 1*) je opšteprisutan protein koji pripada C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> tipu transkripcionih regulatora sa Zn-prstima i koji može da aktivira ili suprimira transkripciju ciljnih gena u odgovoru na fiziološke ili patološke stimuluse (Tan i Khachigian, 2009). Pokazano je da Sp1 reguliše ekspresiju brojnih gena uključenih u kontrolu različitih ćelijskih procesa, kao što su ćelijski rast (Kaczynski i sar., 2003), diferencijacija (Opitz i Rustgi, 2000), apoptoza (Kaczynski i sar., 2003), angiogeneza (Mazure i sar., 2003), imuni odgovor (Jones i sar., 1986). Sp1 učestvuje i u regulaciji ekspresije CAT (Nenoi i sar., 2001) i SOD (Miao i St Clair, 2009). U promotorskim regionima CAT i SOD nalaze se regioni obogaćeni GC



bazama (GGGCGG) za koje se Sp1 svojim Zn-prstima vezuje visokim afinitetom i olakšava regrutovanje kompleksa transkripcionog faktora TFIID i RNK polimeraze II na promotor (Solomon i sar., 2008).

FOXO3a, poznat i kao FKHL1, pripada FOXO (*forkhead box O*) familiji transkripcionih regulatora u kojoj se još nalaze i FOXO1 (FKHR), FOXO4 (AFX1) i FOXO6. Članovi FOXO familije se vezuju za konzensusnu sekvencu na molekulu DNK (5'-TTGTTTAC-3') i regulišu ekspresiju brojnih gena uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa, preživljavanja ćelija i metabolizma (Carlsson i Mahlapuu, 2002). Pokazano je da je aktivnost FOXO proteina regulisana posttranslacionim modifikacijama (fosforilacija, ubikvitinacija i acetilacija). Oksidativni stres utiče na aktivnost FOXO posredstvom posttranslacionih modifikacija dok FOXO reguliše ćelijski odgovor na oksidativni stres preko povećanja ekspresije CAT i MnSOD (Kops i sar., 2002; Nemoto i Finkel, 2002).

#### **1.4. Upotreba antioksidanasa i biljnih preparata u tretmanu dijabetesa**

Glavni izvor egzogenih antioksidanasa je hrana. Bioaktivne komponente hrane koje imaju antioksidativnu aktivnost uključuju vitamin C (askorbinska kiselina), vitamin E (tokoferol), koenzim Q10, polifenole (flavonoidi, flavoni, flavanoni, proantocijanidini), N-acetil cistein, karotenoide, alfa lipoinsku kiselinu, likopen, selen, itd. (Andre i sar., 2010; Bouayed i Bohn, 2010). Ukoliko su egzogeni antioksidansi prisutni u tkivima i telesnim tečnostima u dovoljnoj koncentraciji oni deluju sinergistički sa endogenim antioksidansima i doprinose očuvanju redoks balansa u organizmu.

Vitamin E predstavlja grupu molekula koju čini osam izoformi rastvorljivih u lipidima:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tokoferol i  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tokotrienol. Najaktivnija forma kod ljudi je  $\alpha$ -tokoferol, čiji su najvažniji izvor biljna ulja, orašasti plodovi, lisnato povrće, klice semena pirinča, pšenice i pamuka, a takođe je dostupan i kao suplement. Antioksidativno dejstvo vitamina E zasniva se na neutralizaciji  $LOO^{\bullet}$  i prekidanju lančane reakcije lipidne peroksidacije u ćelijskim membranama i LDL proteinima ( $LOO^{\bullet} + \alpha\text{-tokoferol-OH} \rightarrow LOOH + \alpha\text{-tokoferol-O}^{-}$ ) (Nimse i Pal, 2015). Antioksidativna aktivnost  $\alpha$ -tokoferola, koja se gubi nakon neutralizacije

LOO•, uspostavlja se dejstvom drugih antioksidanasa, kao što su koenzim Q10 (CoQ10) i vitamin C (Neužil i sar., 1997; Stoyanovsky i sar., 1995). Vitamin E stimulira dejstvo diacilglicerol kinaze (katalizuje prevođenje DAG u fosfatidnu kiselinu) i blokira fosfatidat fosfohidrolazu (katalizuje prevođenje fosfatidata u DAG) kod pacijenata obolelih od dijabetesa i tako smanjuje količinu DAG-a i posledično aktivaciju PKC. Smanjena aktivnost PKC umanjuje negativno dejstvo slobodnih masnih kiselina (SMK) koje u skeletnim mišićima smanjuju osetljivost na insulin preko mehanizama zavisnih od PKC (McCarty, 1998). Nekoliko malih kliničkih studija rađenih u kontrolisanim uslovima pokazalo je korisne efekte upotrebe vitamina E i kombinacije vitamina E i C u smanjenju rizika od kardiovaskularnih oboljenja (Knekt i sar., 1994; Rimm i sar., 1993; Stampfer i sar., 1993) i poboljšanju funkcionisanja bubrega (Gaede i sar., 2001). Sa druge strane, studije rađene na velikom broju pacijenata, kao što su HOPE (eng. *Heart Outcome Prevention Evaluation*) (Yusuf i sar., 2000), ATBC (eng. *Alpha-Tocopherol, B-Carotene Cancer Prevention Study*) (Kataja-Tuomola i sar., 2010), SPACE (eng. *Secondary Prevention with Antioxidants of Cardiovascular Disease in End Stage Renal Disease*) (Boaz i sar., 2000), PPP (eng. *Primary Prevention Project*) (Sacco i sar., 2003) i SECURE (eng. *Study to Evaluate Carotid Ultrasound Changes in Patients Treated With Ramipril and Vitamin E*) (Lonn i sar., 2001) nisu ukazale na pozitivan efekat dnevnog unosa vitamina E na smanjenje rizika pojave kardio- i cerebrovaskularnih oboljenja i nefropatija. Takođe, meta-analizom 19 kliničkih ispitivanja koja su obuhvatala 135967 individua došlo se do zaključka da visoke doze vitamina E (16,5 do 2000 IU/d) mogu povećati smrtnost pacijenata (Miller i sar., 2005). S' obzirom da su i druge kliničke studije pokazale oprečne rezultate, potencijalna korist upotrebe vitamina E kao suplementa kod osoba obolelih od dijabetesa je pod znakom pitanja što iziskuje dodatna istraživanja.

Vitamin C ili askorbinska kiselina je hidrosolubilni vitamin koji ima snažno antioksidativno dejstvo, a učestvuje i u regeneraciji vitamina E i povećanju unutarćelijske koncentracije GSH (Naziroglu i Butterworth, 2005). Vitamin C takođe povećava i apsorpciju gvožđa redukcijom Fe<sup>3+</sup> do Fe<sup>2+</sup> (Halliwell i Gutteridge, 2015). U prisustvu redoks-aktivnih metala (Fe, Cu) vitamin C deluje kao prooksidans i doprinosi formiranju HO• (Halliwell, 1996). Dosadašnja klinička

istraživanja dala su oprečne rezultate u vezi sa upotrebom vitamina C u prevenciji i tretmanu dijabetesa. Osobe sa dijabetesom ili metaboličkim sindromom imaju smanjenu koncentraciju vitamina C i povećan nivo lipidnih peroksida u cirkulaciji (Ford i sar., 2003; Maxwell i sar., 1997; Sinclair i sar., 1994; Sundaram i sar., 1996). Povećana koncentracija vitamina C u plazmi smanjuje rizik od nastanka dijabetesa (Harding i sar., 2008), a pokazano je i da unos vitamina C poboljšava dejstvo insulina, kontrolu glikemije i funkcionisanje endotela krvnih sudova (Paolisso i sar., 1995; Paolisso i sar., 1994; Regensteiner i sar., 2003). Sa druge strane, primena visokih koncentracija vitamina C kod osoba obolelih od DT2 nije normalizovala koncentraciju vitamina C u plazmi, funkcionisanje endotela niti insulinsku rezistenciju (Chen i sar., 2006). Štaviše, primena visokih koncentracija vitamina C povećava stopu komplikacija kardiovaskularnog sistema kod žena u postmenopauzi (Folsom i sar., 2004).

Koenzim Q10, poznat i kao ubikinon, CoQ10 ili vitamin Q10, je liposolubilni kinon prvobitno izolovan 1957 iz mitohondrija govečeta (Greenberg i Frishman, 1990). U transportnom lancu elektrona u mitohondrijama CoQ10 prima elektrone od NADH, sukcinata i glicerol-3-fosfata i prenosi ih na sistem citohroma čime nastaje gradijent protona neophodan za proizvodnju ATP-a (Crane i Navas, 1997). CoQ10 je jedan od najvažnijih lipidnih antioksidanasa i može se naći u većini aerobnih organizama (Saini, 2011). Najvažniji prirodni izvor CoQ10 jesu masne ribe, poput lososa, haringe, skuše, tune, zatim jetra kao i zrna celih žitarica. Većina ljudi obezbeđuje dovoljnu količinu CoQ10 balansiranom ishranom, ali uzimanje CoQ10 u vidu suplemenata može biti od koristi osobama kod kojih je endogena sinteza CoQ10 nedovoljna ili postoji potreba za njegovom povećanom količinom (Overvad i sar., 1999). Kod osoba sa srčanom insuficijencijom, dijabetesom, kao i kod starijih osoba, uočen je potpuni ili delimični nedostatak CoQ10 (Langsjoen i Langsjoen, 1999). To je ukazalo na mogućnost primene CoQ10 u tretmanu dijabetesa, ali su dobijeni rezultati suviše nedosledni da bi se preporučila upotreba CoQ10 u cilju poboljšanja kontrole glikemije i ublažavanja komplikacija u dijabetesu (Chew i sar., 2008; Hamilton i sar., 2009; Hodgson i sar., 2002; Lim i sar., 2008).

Alfa lipoinjska kiselina (eng. *alpha lipoic acid* – ALA) je hidro- i liposolubilno jedinjenje pa se kao takvo može naći i u ćelijskoj membrani i u citoplazmi, kako kod biljaka tako i kod životinja. Kod čoveka se ALA sintetiše u jetri i drugim tkivima gde predstavlja kofaktor enzima piruvat dehidrogenaze i  $\alpha$ -ketoglutarat dehidrogenaze (Busby i sar., 1999). Pored toga, ALA je potrebna tokom oksidativne dekarboksilacije piruvata u acetil-CoA, ključnom koraku koji povezuje procese glikolize i ciklus limunske kiseline (Reed, 1998). ALA i njena redukovana forma, dihidrolipoinjska kiselina (DHHLA) su snažni antioksidansi – neutrališu ROS-ove, heliraju jone metala i učestvuju u regeneraciji vitamina C i E i GSH (Biewenga i sar., 1997). Pored toga, ALA/DHHLA deluju i preko različitih signalnih puteva, kao što su signalni put insulina, NF $\kappa$ B, PKC, kinaza aktivirana 5' adenozin monofosfatom (AMPK) (Gomes i Negrato, 2014). Sintetička ALA se u Evropi i Sjedinjenim Američkim Državama dugo koristi kao suplement u terapiji neuropatija i retinopatija nastalih kao posledica dijabetesa (Shay i sar., 2009; Ziegler i sar., 2004). Brojne kliničke studije u kojima je ALA korišćena u koncentracijama do 2400 mg dnevno ukazale su na postojanje određenih dozno-zavisnih neželjenih efekata upotrebe ALA (Ziegler i sar., 2006; Ziegler i sar., 1995; Ziegler i sar., 2011). Većina neželjenih efekata je uočena u gastrointestinalnom traktu (mučnina, povraćanje, dispepsija, bolovi u abdomenu) ali su zabeleženi i slučajevi pojačanog svraba, bronhitisa i ulceracije kože. Takođe, pokazano je da intraperitonealna primena ALA u koncentraciji 100 mg/kg/dan u toku dve nedelje (doza koja je ekvivalentna 5-10 g/dan kod ljudi) kod pacova povećava količinu lipidnih hidroperoksida i oksidativna oštećenja proteina u plazmi (Çakatay i Kayali, 2005), kao i oksidativna oštećenja proteina u srčanom mišiću (Çakatay i sar., 2005) i mozgu pacova (Kayali i sar., 2006). S' obzirom da primena nižih koncentracija ALA ima malo ili nimalo neželjenih efekata a da u višim dozama pojačava stepen oksidativnih oštećenja dodatna istaživanja će omogućiti određivanje optimalne doze ALA za primenu u tretmanu dijabetesa.

### 1.4.1. Biljke kao izvori antioksidanasa

Imajući u vidu rezultate kliničkih studija o upotrebi aktuelnih antioksidanasa u terapiji dijabetesa može se zaključiti da pojedinačni antioksidansi nisu efikasni na zadovoljavajućem nivou. Sa druge strane, epidemiološke studije ukazuju na to da konzumiranje voća, povrća i žitarica štiti organizam od pojave hroničnih bolesti (Kruk, 2014; Kyrø i sar., 2013; Virtanen i sar., 2013; Yamada i sar., 2011). Voće i povrće sadrži veliku količinu antioksidanasa koji svojim sinergističkim dejstvom doprinose odbrani od oksidativnog stresa mnogo efikasnije od izolovanih i prečišćenih jedinjenja. Postojanje različitih jedinjenja sa antioksidativnim svojstvom u biljkama omogućava održavanje tzv. "antioksidativnog lanca" – nakon neutralizacije slobodnih radikala antioksidans se reciklira zahvaljujući sledećem antioksidansu u lancu (Rafieian-Kopaei i sar., 2013). Kod upotrebe pojedinačnih ili kombinovanih antioksidanasa dolazi do prekida u pomenutom lancu zbog čega terapija sintetičkim antioksidansima ne može zameniti konzumiranje hrane bogate antioksidansima.

Prirodni polifenoli su najzastupljenija grupa antioksidanasa u ljudskoj ishrani. Do sada je identifikovano preko 8000 polifenolnih jedinjenja. Polifenoli predstavljaju sekundarne metabolite koji biljkama pružaju zaštitu od UV zračenja, oksidativnog stresa i raznih patogena (Beckman, 2000). Na osnovu broja fenolnih prstenova i strukturnih elemenata koji ih povezuju polifenoli se klasifikuju na fenolne kiseline (derivati hidroksibenzojeve kiseline i derivati hidroksicinaminske kiseline), flavonoide (antocijanini, flavonoli, flavanoli, flavanoni, flavoni i izoflavoni), lignane i stilbene (Pietta i sar., 2003). Procenjeni dnevni unos polifenola putem hrane iznosi oko 1g (Chun i sar., 2007; Ovaskainen i sar., 2008). Iskoristljivost ovih bioaktivnih komponenti zavisi od načina pripreme, digestije u gastrointestinalnom traktu, njihove apsorpcije u crevima i metabolizma (Scalbert i Williamson, 2000). Tokom procesa apsorpcije polifenoli prolaze proces hidrolize od strane enzima i mikroflore u crevima, konjugacije u intestinalnim ćelijama i na kraju u jetri podležu metilaciji, sulfaciji ili glukuronidaciji nakon čega dospevaju i akumuliraju se u ciljnim tkivima gde ostvaruju svoja biološka svojstva (Scalbert i sar., 2002). Pored antioksidativnog dejstva, polifenoli imaju i antialergijsko,

antiinflamatorno, antiviralno, antimikrobijalno, antiproliferativno, antimutageno, antikancerogeno dejstvo, učestvuju u regulaciji ćelijskog ciklusa, apoptoze, aktivnosti enzima antioksidativne zaštite. Polifenoli takođe učestvuju u regulaciji važnih signalnih puteva u ćeliji, kao što su NFκB, ERK, PI3K/Akt, MAPK i Nrf-2 (Han i sar., 2007).

#### **1.4.2. Fitoterapija u tretmanu dijabetesa**

Epidemiološke razmere dijabetesa širom sveta ukazuju na neophodnost iznalaženja efikasnijih lekova za tretman ovog kompleksnog oboljenja (Zimmet i sar., 2001). Iako je povećana koncentracija glukoze u krvi glavni parametar za definisanje ove bolesti, kontrola glikemije je samo jedan aspekt integrisane kontrole dijabetesa koja obuhvata, kako preventivne mere usmerene ka velikom broju patogenih faktora koji dovode do razvoja dijabetesa, tako i prevenciju i lečenje pratećih komplikacija bolesti (Vennos i Uehlinger, 2010). Naime, sve više dostupnih lekova za tretman dijabetesa omogućava produženje životnog veka obolelih što iziskuje adekvatan tretman komplikacija koje se razvijaju kod dijabetičara. Pored toga, hronična priroda bolesti zahteva integrativan i dugotrajan pristup zbog čega nije dovoljno obezbediti samo efikasnost terapije već i bezbednost i toleranciju na lekove koji se koriste.

Kako lečenje dijabetesa bez neželjenih posledica još uvek predstavlja veliki izazov, to je upotreba biljnih lekova (fitoterapeutika) u tretmanu dijabetesa u ekspanziji zbog efikasnosti, manje neželjenih efekata kao i zbog značajno nižih troškova. Fitoterapeutici sadrže složenu mešavinu različitih hemijskih jedinjenja u relativno malim koncentracijama. Zahvaljujući sinergističkim, antagonističkim i aditivnim interakcijama između pojedinih komponenti fitoterapeutici deluju na različite patogene mehanizme na više različitih nivoa i ostvaruju pozitivan efekat u tretmanu dijabetesa i pratećih komplikacija (Vennos i sar., 2013).

Poznato je da se lekovite biljke koriste za lečenje različitih oboljenja. Tako je zabeleženo preko 1200 biljaka koje se u narodnoj medicini brojnih zemalja koriste za lečenje dijabetesa zbog navodnog hipoglikemijskog efekta (Kesari i sar., 2007). I pored toga što biljke predstavljaju pravo skriveno bogatstvo potencijalno korisnih prirodnih proizvoda koji se mogu koristiti za kontrolu dijabetesa do sada je mali

broj njih detaljno istražen. Lekovite biljke koje su najviše izučavane i koje su se pokazale kao najefikasnije u tretmanu dijabetesa i pratećih komplikacija su *Gentiana olivieri griseb* (Gentianaceae), *Bauhinia forficata koeingii* (Leguminosae), *Eugenia jambolana* L. (Myrtaceae), *Lactuca indica* L. (Compositae), *Mucuna pruriens* Bak. (Leguminosae), *Tinospora cordifolia* W. (Menispermaceae), *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae), *Aporosa lindleyana* Baill (Euphorbiaceae), *Myrtus communis* L. (Myrtaceae), *Rhizoma Polygonati Odorati* (Liliaceae), i *Terminalia pallida* Brand. (Combretaceae) (Jung, M. i sar., 2006). Najčešće korišćene biljke u tretmanu dijabetesa u Srbiji su kičica (*Centaurium erythraea* Rafn), kopriva (*Urtica dioica* L.) i ždraljevina (*Galega officinalis* L.) (Jančić, 1988), a takođe se koristi i lišće crnog duda (*Morus nigra*), koren maslačka (*Taraxacum officinale*), koren cikoriје (*Cichorium intybus*) i mahune pasulja (*Phaseolus vulgaris*) (Pelagić, 1973).

Kičica (*Centaurium erythraea* Rafn) je jednogodišnja ili dvogodišnja zeljasta biljka iz porodice lincura (Gentianaceae), u narodu poznata i kao crveni kantaron, ger, gorka kitica, gorko zelje, grozničavka, mali stozlatnik. Naziv biljke potiče od grčke reči "Κένταυρος", *Kéntauros* jer je prema grčkoj legendi kentaur Hiron koristio kičicu za lečenje rana nanetih otrovnim strelama (Culpeper, 1995).

Kičica poseduje čvrsto, skoro četvrtasto, šuplje stablo visine 30-40 cm koje se grana na vrhu. Prizemni listovi su izduženi, obrnuto jajastog oblika, raspoređeni unakrsno u pršljenove. Listovi na stabljici su naspramni, duguljasto lancetasti, sedeći, po obodu celi i glatki. Cvetovi su petodelni, ružičasti, sakupljeni u štitaste cvasti na vrhu grančica i stabljike. Cveti tokom leta (Tucakov, 2014). Prirodno stanište kičice obuhvata područje od Velike Britanije i Severne Irske na zapadu do Bliskog Istoka i Pakistana na istoku i južno do severnih delova Afrike. Zbog svojih lekovitih svojstava naturalizovana je u mnogim delovima sveta, uključujući Australiju, Novi Zeland, Kanadu, SAD i neke delove Srednje i Južne Amerike. Kičica raste na otvorenim staništima, kao što su obodi šuma, livade, suvi pašnjaci, a često se nalazi i na krečnjačkom tlu i u vlažnim, peskovitim depresijama (Lansdown, 2013).



**Slika 1.5. Kičica (*Centaurium erythraea* Rafn) u prirodi.** Fotografisao dr Branislav Šiler, viši naučni saradnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“.

Kičica ima širok spektar delovanja (lat. *centum* = stotina, *aurum* = zlato – biljka od stotinu zlatnika) pa se podjednako i raznovrsno koristi u narodnoj medicini i u naučnim istraživanjima. Upotreba kičice u narodnoj medicini je opisana u 23 različite zemlje, a 2004. godine je proglašena biljkom godine (Šiler i Mišić, 2016). Kičica i druge biljke iz porodice lincura se koriste kao prirodna aroma prilikom pravljenja različitih alkoholnih i bezalkoholnih pića. Esencija kičice se koristi za ublažavanje probavnih smetnji i za lečenje žutice, rana, kolika i dijabetesa (Blaschek i sar., 2006). U našoj zemlji kičica se tradicionalno koristi za lečenje nadutosti, čireva na želucu, laringitisa, problema sa varenjem, dijabetesa, groznice kao i za poboljšanje apetita (Jarić i sar., 2015; Zlatković i sar., 2014). Nadzemni delovi biljke imaju laksativni, diuretički, sedativni, antipiretički, analgetički, antioksidativni i antihelmintički efekat a koriste se i za smanjenje krvnog pritiska i zapaljenskih procesa (Loizzo i sar., 2008; Šiler i sar., 2014; Valentao i sar., 2001). Fitohemijskim ispitivanjem kičice identifikovana su brojna biološki aktivna jedinjenja, kao što su sekoiridoidni glikozidi, flavonoidi i ksantoni koji ispoljavaju antidijabetogena i antioksidativna svojstva (Aberham i sar., 2011; Kumarasamy i sar., 2003; Stefkov i sar., 2014). Pokazano je da hloroformski ekstrakt kičice inhibira aktivnost  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze (Loizzo i sar., 2008). Vodeno-alkoholni ekstrakt nadzemnih delova kičice deluje preventivno na razvoj insulinske rezistencije i ima hipoglikemijski i hipolipidemijski efekat (Hamza i sar., 2010; Hamza i sar., 2011). Ekstrakt pripremljen od listova kičice ublažava oksidativni stres i oštećenja  $\beta$ -ćelija pankreasa tako što doprinosi očuvanju aktivnosti enzima antioksidativne zaštite (Sefi i sar., 2011).



## 2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

---

Savremena terapija dijabetesa uključuje upotrebu insulina i lekova sa hipoglikemijskim dejstvom kao i korekciju ishrane. Svoj antidijabetogeni efekat različiti lekovi ostvaruju stimulacijom sekrecije insulina, povećanjem periferne apsorpcije glukoze, odlaganjem apsorpcije glukoze u crevima, ili smanjenjem procesa glukoneogeneze u jetri (Kane i sar., 2005). I pored značajnog napretka na polju lečenja dijabetesa postignuti rezultati su daleko od očekivanih. Vremenom pacijenti postaju rezistentni na pojedine tretmane, a sami lekovi mogu imati neželjene čak i toksične efekte, dok terapija insulinom nosi opasnost od pojave hipoglikemije koja je opasna po život obolelih.

Pomenuta ograničenja u lečenju dijabetesa podstakla su istraživanja u cilju poboljšanja aktuelne terapije. Jedan od najvećih izazova u lečenju dijabetesa svakako su oporavak i očuvanje funkcionalnih  $\beta$ -ćelija. Imajući u vidu ulogu oksidativnog stresa u narušavanju strukture i funkcije  $\beta$ -ćelija pankreasa kao i razvoju pratećih komplikacija bolesti, primena antioksidanasa može imati značajna terapijska dejstva. S' obzirom da upotreba aktuelnih antioksidanasa nije pružila željene rezultate u tretmanu dijabetesa sve više se istražuju efekti preparata na bazi biljaka koji ispoljavaju antioksidativna svojstva. Biljni preparati sadrže složenu kombinaciju polifenolnih jedinjenja koja međusobnim sinergističkim, antagonističkim i aditivnim interakcijama mogu da doprinesu odbrani od oksidativnog stresa. Kako ova jedinjenja nastaju kao proizvod sekundarnog metabolizma biljaka pa se stoga ne mogu sintetisati u ljudskom organizmu, ishrana obogaćena biljnim polifenolima može u velikoj meri da utiče na prevenciju i ublažavanje simptoma bolesti. Pored toga, biljni preparati ispoljavaju i manje neželjenih efekata (Dinić i sar., 2013b).

Kičica (*Centaurium erythraea* Rafn) je jednogodišnja ili dvogodišnja zeljasta biljka iz porodice lincura (Gentianacea) koja ispoljava širok spektar delovanja zbog čega se koristi i u narodnoj medicini i u naučnim istraživanjima. U našoj zemlji kičica se tradicionalno koristi za lečenje različitih oboljenja uključujući i dijabetes. Fitohemijskim ispitivanjem kičice identifikovana su brojna biološki aktivna

jedinjenja koja ispoljavaju antidijabetogena i antioksidativna svojstva. Pokazano je da tretman ekstraktom kičice smanjuje oksidativni stres i oštećenja  $\beta$ -ćelija pankreasa kod životinja sa eksperimentalno izazvanim dijabetesom, ali mehanizmi ovakvog efekta kičice nisu još uvek razjašnjeni. Imajući u vidu navedeno, osnovni cilj ove doktorske disertacije bio je rasvetljavanje molekularnih mehanizama antioksidativnog i protektivnog dejstva ekstrakta kičice koji doprinose očuvanju strukture i funkcije  $\beta$ -ćelija pankreasa i ublažavanju komplikacija u eksperimentalnom modelu dijabetesa pacova. Razumevanje ovih mehanizama može otvoriti nove mogućnosti za potencijalna terapijska delovanja u identifikovanim kritičnim tačkama.

U skladu sa postavljenim opštim ciljem definisani su neposredni ciljevi doktorske disertacije:

- **Karakterizacija fitohemijskog sastava ekstrakta kičice (EK) i analiza antioksidativnog potencijala EK u *in vitro* uslovima** određivanjem sadržaja ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktu kao i analizom kvalitativnog i kvantitativnog sastava EK upotrebom UHPLC-qqqMS sistema. Antioksidativni potencijal EK biće utvrđen ispitivanjem sposobnosti neutralizacije DPPH• radikala, redukujućeg potencijala ekstrakta, helacije  $Fe^{2+}$  kao i ispitivanjem sposobnosti neutralizacije  $H_2O_2$  i  $NO\bullet$ ;
- **Ispitivanje uticaja EK na sistemski oksidativni stres kod pacova na model sistemu dijabetesa izazvanom višekratnim injeciranjem rastvora streptozotocina (STZ).** Određivanjem stepena glikacije i glikozilacije, nivoa lipidne peroksidacije, odnosa GSH/GSSG i nivoa S-glutationilacije, kao i određivanjem aktivnosti enzima antioksidativne zaštite (CAT, GPx, GR, SOD) u eritrocitima pacova ispitaće se potencijalna uloga EK u zaštiti eritrocita od gliko-oksidativnih oštećenja. Analizom koncentracije  $\alpha 2$  makroglobulina i aktivnosti Akt kinaze, parametara koji korelišu sa agregacijom i deformabilitetom eritrocita ispitaće se uticaj ekstrakta na funkcionalne parametre ovih ćelija;

- **Ispitivanje antioksidativnog efekta EK u jetri i bubregu dijabetičnih pacova** određivanjem stepena oksidativnog oštećenja DNK, lipida i proteina kao i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u jetri i bubregu pacova.
- **Ispitivanje efekta EK na strukturne i funkcionalne parametre Langerhansovih ostrvaca dijabetičnih pacova** rutinskom histološkom analizom kao i imunohistohemijskom analizom prisustva insulina, glukagona, somatostatina, GLUT-2 i p-Akt kinaze;
- **Ispitivanje protektivnog efekta EK na Rin-5F  $\beta$ -ćelije u uslovima oksidativnog stresa izazvanog primenom vodonik peroksida, natrijum nitroprusida i streptozotocina** analizom uticaja EK na preživljavanje i funkcionalnost ćelija, opšte parametre oksidativnog stresa kao i na ekspresiju enzima antioksidativne zaštite;
- **Ispitivanje uticaja EK na aktivnost regulatora transkripcije gena za enzime antioksidativne zaštite** analizom prisustva p-NF $\kappa$ B-p65, FOXO3A, Sp1 i Nrf-2 proteina u jedarnim frakcijama Rin-5F ćelija tretiranih STZ-om;
- **Ispitivanje efekta EK na regulatorne mehanizme uključene u puteve preživljavanja kao i sekreciju insulina unutar  $\beta$ -ćelija** analizom prisustva fosforilisanih (aktivnih) formi Akt, ERK i p38 kinaza u lizatima ćelija, kao i prisustva PDX-1 i MafA u jedarnim frakcijama ćelija tretiranih STZ-om.

## 3. MATERIJAL I METODE

---

### 3.1. Biljni materijal

Biljni materijal za pripremu metanolnog ekstrakta kičice (EK) sakupljen je 2010. godine na lokalitetu Andrijevića (Crna Gora; 42° 44' 26" S, 19° 48' 12" I). Autentičnost biljnog materijala na terenu potvrdio je dr Branislav Šiler, viši naučni saradnik Odeljenja za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u Beogradu. Sakupljeni biljni materijal je osušen do konstantne mase u sušnici sa stalnim protokom vazduha na sobnoj temperaturi i čuvan u papirnim vrećama, nepropustljivim za svetlost.

### 3.2. Priprema metanolnog ekstrakta kičice

Za pripremu metanolnog EK korišćeni su nadzemni delovi biljke. Osušeni biljni materijal je usitnjen u avanu do sitnog praha pomoću tečnog azota. Ekstrakcija sprašenog materijala izvršena je na sobnoj temperaturi preko noći, u mraku, u 96% metanolu u odnosu 1/5 (w/v), nakon čega je uzorak sonifikovan 20 min u ultrazvučnom kupatilu (Sonorex Super, Bandelin, Germany) i pročišćen propuštanjem kroz celulozni filter-papir (Whatman No. 1). Pročišćeni ekstrakt je, zatim, uparen do suvog u rotacionom vakuum uparivaču (Eppendorf Concentrator 5301, Germany) na temperaturi 30 – 45°C i čuvan u mraku na +4°C do dalje upotrebe. Ukupan prinos ekstrakcije iznosio je  $14,09 \pm 2,60\%$ .

### 3.3. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenola i ukupnih flavonoida u ekstraktu kičice

Sadržaj ukupnih fenola u EK određivan je spektrofotometrijskom metodom sa Folin Ciocalteu (FC) reagensom (Singleton i Rossi, 1965). Metoda se zasniva na kolorimetrijskoj reakciji FC reagensa sa fenoksidnim anjonom, koji nastaje disocijacijom polifenolnih jedinjenja. Tom prilikom se fenoksidni jon oksiduje dok se žuto obojeni FC reagens redukuje do plavo obojenih jona. Reakciona smeša je pripremljena mešanjem 0,2 mL EK rastvorenog u metanolu (0,01; 0,05; 0,1; 0,25;

0,5; 1 mg/mL) i 1 mL 10% FC reagensa (Institut Mol, Stara Pazova, Srbija). Nakon 4 min inkubacije na sobnoj temperaturi u smešu je dodato 0,8 mL 7,5% rastvora NaHCO<sub>3</sub> i smeša je dodatno inkubirana 2 sata na sobnoj temperaturi u mraku. Apsorbanca reakcione smeše u odnosu na slepu probu pripremljenu sa metanolom merena je na 765 nm (Evolution 600 UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA). Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu određen je očitavanjem sa standardne krive formirane na osnovu vrednosti apsorbance standarda galne kiseline u opsegu koncentracija 0,01 – 1 mg/mL rastvorene u metanolu. Rezultati su izraženi u ekvivalentima galne kiseline (µg EGK/mL ekstrakta, odnosno mg EGK/g suvog ekstrakta (SE)).

Sadržaj ukupnih flavonoida u EK određivan je spektrofotometrijskom metodom sa aluminijum hloridom (Djeridane i sar., 2006). Metoda se zasniva na formiranju stabilnog kompleksa između aluminijuma i C-4 keto-grupe, odnosno C-3 ili C-5 hidroksil-grupe flavona i flavonola. Reakciona smeša je pripremljena mešanjem 1 mL EK rastvorenog u metanolu (0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1 mg/mL) i 1 mL 2% metanolnog rastvora aluminijum hlorida. Apsorbanca reakcione smeše u odnosu na slepu probu merena je nakon jednog sata inkubacije na sobnoj temperaturi na 430 nm. Sadržaj ukupnih flavonoida određen je očitavanjem sa standardne krive formirane na osnovu vrednosti apsorbance standarda kvercetina u opsegu koncentracija 0,01 – 1 mg/mL rastvorenog u metanolu. Rezultati su izraženi u ekvivalentima kvercetina (µg EKV/mL ekstrakta, odnosno mg EKV/g SE).

### **3.4. UHPLC/DAD/qqqMS analiza sadržaja fenolnih jedinjenja i sekoiridoida**

Hromatografsko razdvajanje ekstrakta je urađeno na Dionex Ultimate 3000 UHPLC sistemu (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) u čijem se sklopu nalazi binarna pumpa, vakuum degaser, termosta za kolone, auto-sempler i UV/VIS detektor (DAD, eng. *diode array detector*). UHPLC sistem je povezan sa trostrukim kvadripolnim (eng. *triple-quadrupole*) masenim spektrometrom (TSQ Quantum Access MAX, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) koji

funkcionirše po principu elektron sprej jonizacije (HESI, eng. *heated electrospray ionization*). Hromatografsko razdvajanje je urađeno na Hypersil gold C18 koloni (50 x 2,1 mm) sa veličinom čestica od 1,9  $\mu\text{m}$  (Thermo Fisher Scientific, USA), koja je termostatirana na 30°C. Mobilna faza, koja se sastoji od (A) 0,01% rastvora sirćetne kiseline i (B) acetonitrila, eluirana je prema sledećem gradijentu: 5-20% B u prvih 3 min; 20-40% B od 3 do 5 min; 40-50% B od 5 do 7,5 min; 50-60% B u periodu od 7,5-8,5 min; 60-95% B od 8,5 do 10,5 min; 95% B do 11,5 min; 95% do 5% B od 11,5 do 12 min; i na kraju 5% B do 15 min. Protok je podešen na 0,4 mL min<sup>-1</sup>, dok je injekciona zapremina bila 10  $\mu\text{L}$ . DAD podaci su prikupljeni na talasnim dužinama od  $\lambda = 260$  i  $\lambda = 320$  nm. Sve analize su urađene sa rastvorima odgovarajuće čistoće (eng. *MS-grade*) (Fisher Scientific UK, Leics, UK). Chromeleon softver (verzija 2.1) je korišćen za kontrolu UHPLC instrumenta.

Temperatura jonske probe (eng. *vaporizer temperature*) masenog spektrometra je podešena na 350°C. HESI proba je podešena na sledeće parametre: voltaža 3510 V, pritisak nosećeg gasa (N<sub>2</sub>) 28 AU (arbitrarne jedinice; eng. *arbitrary units*), pritisak gasa u jonskom izvoru 0 AU, pritisak auksilarnog gasa 4 AU, temperatura kapilare 270°C, podešavanje jonskih sočiva 0 V i NLS (eng. *neutral loss scanning*). U eksperimentima fragmentacije tokom SRM (eng. *selected reaction monitoring*) analize, disocijacija molekula je indukovana kolizijom (CID, eng. *collision-induced dissociation*), pri čemu je energija kolizione ćelije (cE) podešena na 30 eV, osim u slučaju sekoirodida gde je cE bila 20 eV. Sva jedinjenja, osim ksantona, analizirana su u negativnom jonizacionom modu. Xcalibur softver (verzija 2.1) je korišćen za kontrolu instrumenta, prikupljanje i obradu podataka.

Kvantifikacija jedinjenja urađena je metodom eksternog standarda. Standardi fenola (*p*-kumarna, sinapinska, kafeinska i ferulinska kiselina, luteolin, apigenin, rutin, kvercetin, izokvercitrin, astragalin, kempferol, naringenin i mangiferin) su komercijalno nabavljeni od Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Standardi sekoiridoida, svercijamarina, sverozida i genciopikrina (čistoća 98%) su kupljeni od firme Oskar Tropitzsch (Germany), dok su loganin i sekologanin nabavljeni od firme Sigma-Aldrich.

Rastvori standarda su pripremljeni rastvaranjem 1 mg čiste supstance u 1 mL metanola. Stokovi standarda su razblaženi do koncentracije 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$

metanola. Kalibracioni nivoi su dobijeni rastvaranjem stoka standarda metanolom, najniža koncentracija je 1 ng mL<sup>-1</sup>. Linearna regresiona analiza kalibracionih kriva je pokazala odličnu linearnost uz korelacione koeficijente u opsegu od r= 0,990 do r= 0,999; p < 0,001. Ukupna količina jedinjenja u uzorcima je izražena u jedinicama µg po mg suvog ekstrakta (µg mg<sup>-1</sup> SE). Koncentracija ksantona je izračunata na osnovu kalibracione krive za mangiferin, a prema postupku koji je ranije opisan (Šiler i sar., 2014).

### **3.5. Ispitivanje antioksidativnog potencijala ekstrakta kičice u *in vitro* eksperimentalnim uslovima**

#### **3.5.1. Sposobnost neutralizacije DPPH• radikala**

Sposobnost neutralizacije 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikala određivana je spektrofotometrijskom metodom (Blois, 1958). DPPH• je stabilan slobodni radikal čiji se rastvor karakteriše ljubičastom bojom sa maksimumom apsorpcije na 517 nm. U prisustvu jedinjenja koja deluju kao donori vodonika ljubičasti rastvor DPPH• se redukuje do žuto obojenog DPPH-H. Reakciona smeša je pripremljena mešanjem 0,2 mL EK rastvorenog u metanolu (0,01 – 1 mg/mL) sa 0,8 mL Tris-HCl (100 mM; pH 7,4) i 1 mL etanolnog rastvora DPPH (250 µM). Pripremljena je i pozitivna kontrola koja je umesto EK sadržala metanolni rastvor askorbinske kiseline u istim koncentracijama. Slepa proba pripremljena je dodavanjem metanola u reakcionu smešu umesto uzorka. Apsorbanca reakcione smeše na 517 nm merena je nakon 20 min inkubacije na sobnoj temperaturi u mraku. Procenat neutralizacije DPPH• radikala računat je prema sledećoj formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_c - A_{uz}}{A_c} \times 100,$$

u kojoj  $A_c$  predstavlja apsorbanca etanolnog rastvora DPPH a  $A_{uz}$  apsorbanca rastvora DPPH sa EK, odnosno askorbinskom kiselinom.

#### **3.5.2. Ispitivanje redukujućeg potencijala ekstrakta kičice**

Za određivanje ukupnog redukujućeg potencijala EK korišćena je metoda sa kalijum-fericijanidom i gvožđe-hloridom (Oyaizu, 1986). Metoda se zasniva na

reakciji antioksidansa sa kalijum-fericijanidom ( $\text{Fe}^{3+}$ ) pri čemu nastaje kalijum-ferocijanid ( $\text{Fe}^{2+}$ ), koji u reakciji sa gvožđe-hloridom daje obojeni kompleks čiji je maksimum apsorpcije na 700 nm. Reakciona smeša je pripremljena mešanjem 0,5 mL EK rastvorenog u metanolu (0,01 – 1 mg/mL), odnosno askorbinske kiseline u istim koncentracijama kao pozitivne kontrole, sa 0,5 mL 0,2 M kalijum-fosfatnog ( $\text{K}_2\text{H}/\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) pufera (pH 6,6) i 0,5 mL 1% rastvora kalijum-fericijanida. Reakciona smeša je inkubirana 20 min na 50°C, nakon čega je dodato 0,5 mL 10% trihlorsirćetne kiseline (TCA). Smeša je centrifugirana na 800 x g, (Eppendorf 5415R centrifuga) 20 min, a zatim je 1 mL supernatanta pomešan sa 1 mL destilovane vode i 0,1 mL 0,1% gvožđe-hlorida. Apsorbanca reakcione smeše na 700 nm u odnosu na slepu probu pripremljenu sa destilovanom vodom merena je nakon 10 min inkubacije na sobnoj temperaturi. Rezultat je prikazan kao zavisnost apsorbanca od koncentracije EK, odnosno askorbinske kiseline.

### 3.5.3. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije vodonik peroksida

Sposobnost neutralizacije  $\text{H}_2\text{O}_2$  određivana je spektrofotometrijskim praćenjem promene apsorbanca rastvora  $\text{H}_2\text{O}_2$  na 230 nm (Ruch i sar., 1989). Po 0,5 mL EK rastvorenog u metanolu (0,01 – 1 mg/mL), odnosno askorbinske kiseline u istim koncentracijama kao pozitivne kontrole, pomešano je sa 1,2 mL 40 mM rastvora  $\text{H}_2\text{O}_2$  u 50 mM  $\text{K}_2\text{H}/\text{KH}_2\text{PO}_4$  puferu (pH 7,4). U isto vreme su pripremljene i smeše odgovarajućih koncentracija ekstrakta, odnosno askorbinske kiseline, sa fosfatnim puferom bez  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Apsorbanca reakcione smeše na 230 nm u odnosu na slepu probu merena je nakon 10 min inkubacije. Procenat neutralizacije  $\text{H}_2\text{O}_2$  računat je prema sledećoj formuli:

$$\% \text{ neutralizacije } \text{H}_2\text{O}_2 = \frac{A_1 - (A_2 - A_3)}{A_1} \times 100,$$

gde je  $A_1$  – apsorbanca fosfatnog pufera sa  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;  $A_2$  – apsorbanca uzorka u fosfatnom puferu sa  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;  $A_3$  – apsorbanca uzorka u fosfatnom puferu bez  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



### 3.5.4. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije azot oksida

Sposobnost neutralizacije  $\text{NO}^\bullet$  određivana je spektrofotometrijskom metodom po Garrat-u (Garratt, 1964). Metoda se zasniva na određivanju količine nitrata i nitrita koji nastaju u reakciji  $\text{NO}^\bullet$  oslobođenog iz vodenog rastvora natrijum nitroprusida (eng. *sodium nitroprusside*; SNP) na fiziološkoj pH vrednosti, sa kiseonikom. Količina nitrata i nitrita nastalih u reakciji određuje se Griess-Ilosvay reakcijom. Reakciona smeša je pripremljena mešanjem 2 mL 10 mM rastvora SNP-a u 0,1 M  $\text{K}_2\text{H}/\text{KH}_2\text{PO}_4$  puferu (pH 7,4) i 0,5 mL EK rastvorenog u metanolu (0,01 – 1 mg/mL), odnosno kurkumina kao pozitivne kontrole u istim koncentracijama. Smeša je inkubirana 150 min na 25°C, nakon čega je 1 mL smeše pomešan sa 1 mL Griess reagensa, koji se priprema tako što se u 0,33% rastvor sulfonilamida u 20% sirćetnoj kiselini nakon 5 min doda jednaka količina 0,1% naftiletilendiamin dihlorida. Apsorbanca reakcione smeše na 540 nm merena je nakon inkubacije 30 min na 25°C. Procenat neutralizacije  $\text{NO}^\bullet$  računat je prema sledećoj formuli:

$$\% \text{ neutralizacije } \text{NO}^\bullet = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100,$$

gde je  $A_0$  apsorbanca uzorka pre a  $A_1$  apsorbanca uzorka nakon reakcije sa Griess reagensom.

### 3.5.5. Ispitivanje sposobnosti helacije gvožđa ( $\text{Fe}^{2+}$ )

Sposobnost helacije  $\text{Fe}^{2+}$  jona određivana je spektrofotometrijskom metodom po Dinis-u (Dinis i sar., 1994). Metoda se zasniva na formiranju crveno obojenog kompleksa između ferozina i  $\text{Fe}^{2+}$  jona, koji u reakciji nastaju od  $\text{FeSO}_4$ , i smanjenju intenziteta boje u prisustvu helirajućih supstanci. Reakciona smeša je pripremljena mešanjem 0,5 mL 0,125 mM  $\text{FeSO}_4$  i 0,5 mL EK rastvorenog u metanolu (0,01 – 1 mg/mL), odnosno EDTA kao pozitivne kontrole u istim koncentracijama. Smeša je inkubirana 2 min na sobnoj temperaturi u mraku, a zatim je dodato 0,5 mL 0,3125 mM ferozina. U isto vreme su pripremljene i smeše odgovarajućih koncentracija ekstrakta, odnosno EDTA, sa 1 mL vode. Apsorbanca reakcione smeše na 562 nm merena je nakon vorteksovanja i inkubacije 10 min na sobnoj temperaturi. Procenat helacije  $\text{Fe}^{2+}$  jona računat je prema sledećoj formuli:

$$\% \text{ helacije } Fe^{2+} = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100,$$

gde je  $A_0$  – apsorbanca slepe probe pripremljene sa vodom,  $A_1$  – apsorbanca uzorka u smeši sa  $FeSO_4$  i ferozinom,  $A_2$  – apsorbanca uzorka u smeši sa vodom.

### 3.6. Eksperimentalne životinje

U eksperimentalnom radu korišćeni su albino mužjaci pacova soja *Wistar* starosti 2,5 meseca, težine 220-250 g, uzgajani u uzgajalištu Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković” u Beogradu. Životinje su gajene u kontrolisanim uslovima, na temperaturi  $22 \pm 2^\circ C$ , relativnoj vlažnosti vazduha 50% i definisanom dnevno-noćnom ciklusu sa smenom na 12 sati. Sve životinje su tokom izvođenja eksperimenta imale *ad libitum* pristup vodi i standardnoj laboratorijskoj hrani za glodare (Veterinarski zavod Subotica AD, Srbija). Svi eksperimenti u okviru ove disertacije urađeni su u skladu sa etičkim načelima Evropske komisije za zaštitu životinja 2010/63/EU i odobreni od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković” (broj rešenja 2-14/10).

#### 3.6.1. Izazivanje eksperimentalnog modela dijabetesa

Eksperimentalni model dijabetesa kod životinja izazvan je pomoću streptozotocina (STZ, MP Biomedicals LLC, Solon, OH, USA) koji je rastvaran u svežem natrijum-citratnom puferu (0,1 M; pH 4,5) i injeciran intraperitonealnim putem u dozi 40/mg/kg/dan tokom pet uzastopnih dana (O'Brien i sar., 1996). Višekratno injeciranje niskih koncentracija STZ-a izaziva ograničenu apoptozu  $\beta$ -ćelija što pokreće autoimunu reakciju koja uklanja preostale  $\beta$ -ćelije, simulirajući na taj način mehanizme koji leže u osnovi razvoja DT1 (Cardinal i sar., 2001). Razvoj dijabetesa kod životinja potvrđen je određivanjem nivoa glukoze u krvi uzetoj iz repne vene 24h nakon poslednje doze STZ-a. Pacovi sa nivoom glukoze višim od 20 mmol/L smatrani su dijabetičnim.

#### 3.6.2. Izbor doze ekstrakta kičice

Za potrebe *in vivo* eksperimenta EK je rastvaran u destilovanoj vodi (10 mg/mL) i aplikovan oralnim putem u dozi 100 mg/kg. Prema literaturnim

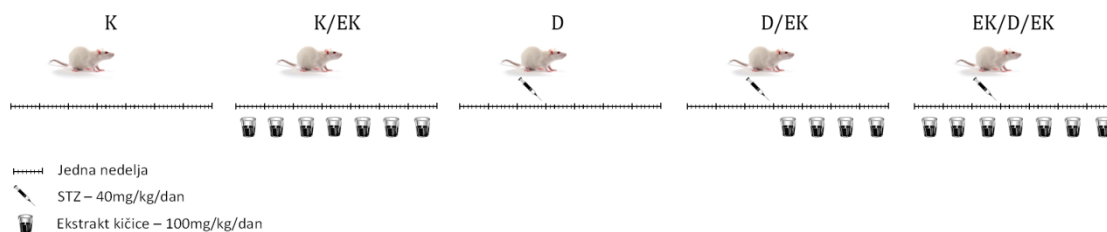
podacima, EK je korišćen u dozi 125 – 500 mg/kg kod dijabetičnih pacova (Sefi i sar., 2011; Stefkov i sar., 2014), odnosno 2 g/kg kod dijabetičnih miševa (Hamza i sar., 2010; Hamza i sar., 2011). Do primenjene doze ekstrakta u ovoj disertaciji došlo se na osnovu upotrebe kičice u narodnoj medicini u Srbiji (dve kafene kašike kičice preliterati sa 200 mL ključale vode, ostaviti da stoji 15 min, procediti i piti dva do tri puta na dan; izvor: <http://www.mocbilja.rs/index.php/proizvod/caj-od-nadzemnog-dela-kicice/>). Empirijskim putem utvrđeno je da dve kafene kašike osušenog biljnog materijala teže 5 g. Prosečna težina osobe u Srbiji iznosi 79 kg, što daje prosečan dnevni unos 126,6 – 189,9 mg osušene biljne mase/kg, odnosno 17,83 – 26,7 mg ekstrakta/kg telesne mase čoveka. Primenom faktora za korekciju doze između pacova i čoveka, koji iznosi 5,3 (Nair i Jacob, 2016), prosečan dnevni unos za pacova iznosi 94,54 – 141,5 mg ekstrakta/kg, pa je stoga za dalji rad izabrana doza ekstrakta od 100 mg/kg kao najoptimalnija.

### **3.6.3. Formiranje eksperimentalnih grupa**

Eksperimentalne životinje su podeljene u pet grupa po sedam (n=7) životinja:

- K – kontrolna grupa životinja koje su injecirane i.p. odgovarajućom zapreminom citratnog pufera;
- K/EK – grupa životinja tretiranih EK koje su injecirane i.p. odgovarajućom zapreminom citratnog pufera;
- D – grupa dijabetičnih životinja;
- D/EK – grupa dijabetičnih životinja tretiranih EK tokom četiri nedelje od poslednje doze STZ-a. Ova grupa životinja označena je kao posttretirana grupa;
- EK/D/EK – grupa dijabetičnih životinja kod kojih je tretman EK počeo dve nedelje pre prve doze STZ-a, trajao tokom izazivanja dijabetesa i još četiri nedelje nakon poslednje doze STZ-a. Ova grupa životinja označena je kao pretretirana grupa.

Telesne mase svih životinja merene su na početku i na kraju eksperimenta, neposredno pre žrtvovanja. Dodatno, telesne mase životinja iz grupa K/EK, D/EK i EK/D/EK merene su svakodnevno kako bi sve životinje primile odgovarajuću količinu ekstrakta.



**Slika 3.1. Šematski prikaz eksperimentalnih grupa životinja.** Za opis grupa videti tekst iznad

### 3.6.4. Priprema seruma i eritrocita

Četiri nedelje nakon izazivanja dijabetesa životinje su žrtvovane brzom dekapitacijom i jedan deo krvi je sakupljan radi dobijanja seruma. Krv je ostavljena da koaguliše 20 min na sobnoj temperaturi a zatim centrifugirana na 2000 x g, 15 min. Supernatant koji sadrži serum je izdvajan i čuvan na -80°C do korišćenja. Serum je korišćen za određivanje nivoa glukoze, insulina, triglicerida, kreatinina, uree, aktivnosti alanin i aspartat aminotransferaza (ALT i AST, redom), stepena glikacije proteina.

Drugi deo krvi je sakupljan u epruvete sa antikoagulansom heparinom (1000 IU heparina) i centrifugiran na 2000 x g, 10 min. Izdvojena plazma u vidu supernatanta je alikvotirana i čuvana na -80°C do korišćenja. Nakon izdvajanja plazme talog eritrocita je ispiran tri puta sa tri volumena hladnog rastvora NaCl (0,9 %) sa centrifugiranjem između (2000 x g, 10 min). Isprani eritrociti su zatim rastvoreni u tri zapremine destilovane vode (+4°C, 30 min na ledu). Lizati eritrocita su korišćeni za određivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite ([Poglavlje 3.13.](#)), nivoa lipidne peroksidacije ([Poglavlje 3.9.](#)), nivoa hemoglobina (Hb) i glikozilovanog hemoglobina (GlyHb) ([Poglavlje 3.6.7.](#)) i nivoa glikozilacije proteina. Za određivanje odnosa redukovano i oksidativnog glutaciona (GSH/GSSG) i nivoa S-glutationilovanih proteina (GSSP) lizati eritrocita su mešani sa 5% rastvorom sulfosalicilne kiseline (SSA) u odnosu 1:1 (v/v), inkubirani 5 min

na sobnoj temperaturi i centrifugirani na 8000 x g, 5 min. Supernatant je neutralizovan dodavanjem trietanol amina (50  $\mu$ L 4M TEA na 1 mL supernatanta) i korišćen za određivanje odnosa GSH/GSSG ([Poglavlje 3.11.](#)), dok je talog korišćen za određivanje nivoa GSSP ([Poglavlje 3.12.](#)).

### 3.6.5. Izolacija i priprema organa

Repni deo pankreasa, u kome se nalazi najveći broj Langerhansovih ostrvaca, je nakon žrtvovanja izdvojen za histološke analize.

Nakon izolacije pankreasa izolovani su jetra i bubreg i merena je njihova masa. Jedan deo tkiva izdvojen je za pripremu komet eseja ([Poglavlje 3.10.](#)). Tkivo je sukcesivno usitnjavano u hladnom HBBS puferu (1 mM CaCl<sub>2</sub>; 5 mM KCl; 0,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0,4 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 140 mM NaCl; 4 mM NaHCO<sub>3</sub>; 0,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 6 mM D-glukoza) koji je sadržao 20mM EDTA i 10% DMSO (dimetilsulfoksid). Tkivo je najpre isečeno na krupne komade, pufer u kome je sečeno je uklanjao a nakon dodavanja svežeg pufera ceo proces je ponavljan. Treći put je tkivo usitnjeno na fine komadiće i iz suspenzije je uzeto po 10  $\mu$ L po uzorku.

Jedan deo tkiva jetre i bubrega izdvojen je za pripremu ukupnih homogenata. Tkivo (0,5 g jetre; 0,3 g bubrega) je najpre mehanički usitnjeno a zatim homogenizovano u ručnom staklenom homogenizeru na +4°C u 10 zapremina saharoznog pufera (0,25 M saharoza; 0,1 M EDTA; 0,05 M Tris-HCl, pH 7,4). Nakon sonifikacije (tri puta po 15 sek/20 kHz/+4°C) izdvajano je po 0,5 mL homogenata i centrifugirano na 10000 x g, 15 min/+4°C. Supernatant je mešan sa 5% rastvorom SSA u odnosu 1:1 (v/v), inkubiran 5 min na sobnoj temperaturi a zatim centrifugiran na 8000 x g, 5 min/+4°C. Dobijeni talog je korišćen za određivanje nivoa GSSP ([Poglavlje 3.12.](#)). Preostali homogenat tkiva centrifugiran je na 100000 x g, 90 min/+4°C i supernatanti su alikvotirani za određivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite ([Poglavlje 3.13.](#)) i imunoblot analizu ([Poglavlje 3.14.](#)) i zamrzavani na -80°C do korišćenja.

Jedan deo tkiva jetre i bubrega izdvojen je za određivanje odnosa GSH/GSSG ([Poglavlje 3.11.](#)). Tkivo je mehanički usitnjeno a zatim homogenizovano u ručnom staklenom homogenizeru na +4°C u 5 zapremina fosfatnog pufera (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 mM EDTA; pH 7,5). Homogenat je centrifugiran na 10000 x g,

15 min/+4°C, a zatim je supernatant pomešan sa istom zapreminom 5% SSA, vorteksovan i inkubiran 5 min na sobnoj temperaturi. Uzorci su zatim centrifugirani na 5000 x g, 5 min a supernatanti su neutralizovani dodavanjem 50 µL 4M TEA na 1 mL supernatanta. Tako pripremljeni uzorci su alikvotirani i zamrzavani na -80°C do korišćenja.

Jedan deo tkiva jetre i bubrega izdvojen je za pripremu 10% homogenata u 1,15% rastvoru KCl za određivanje nivoa lipidne peroksidacije ([Poglavlje 3.9.](#)). Ostatak tkiva je zamrznut u tečnom azotu i čuvan na -80°C.

### 3.6.6. Biohemijska analiza seruma

Koncentracija glukoze, triglicerida, kreatinina, BUN-a i aktivnosti ALT i AST određivani su u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku "INEP" (Institut za primenu nuklearne energije, Beograd).

Nivo glukoze određivan je spektrofotometrijski GOD-PAP enzimskom metodom. Metoda se zasniva na oksidaciji aldehidne grupe glukoze od strane enzima glukozo oksidaze. Tom prilikom nastaje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koji u reakciji sa fenolom i 4-aminoantipirinom, u prisustvu peroksidaze rena (eng. *horseradish peroxidase*; HRP), daje ružičasto obojeni hinonimin čiji je maksimum apsorpcije na 505 nm. Intenzitet ružičaste boje proporcijalan je koncentraciji glukoze u ispitivanom uzorku. Koncentracija glukoze izražena je u mmol/L.

Koncentracija triglicerida (TG) određivana je spektrofotometrijski GPO-PAP enzimskom metodom. Metoda se zasniva na hidrolizi TG od strane enzima lipaze pri čemu nastaju glicerol i slobodne masne kiseline. U prisustvu ATP-a i glicerol kinaze, nastali glicerol se prevodi u glicerol-3-fosfat koji se u sledećem koraku oksiduje glicerol fosfat oksidazom do dihidroksiaceton fosfata i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nastali H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u prisustvu HRP reaguje sa fenolom i 4-aminoantipirinom i daje ružičasto obojeni hinonimin. Koncentracija triglicerida izražena je u mmol/L.

Koncentracija ukupnog holesterola određivana je metodom po Zlatkis-u (Zlatkis i sar., 1953). Metoda se zasniva na reakciji holesterola sa feri solima u koncentrovanoj sumpornoj kiselini pri čemu se formira kompleksno jedinjenje ljubičaste boje sa maksimumom apsorpcije svetlosti na 560 nm. Reakciona smeša je pripremljena mešanjem 0,1 mL plazme sa 2,9 mL glacijalne sirćetne kiseline i

2 mL 10% FeCl<sub>3</sub> u koncentrovanoj sumpornoj kiseline. Nakon vorteksovanja i hlađenja reakcione smeše određivana je njena apsorbanca na 560 nm u odnosu na slepu probu koja je sadržala 3 mL CH<sub>3</sub>COOH i 2 mL FeCl<sub>3</sub>. Za određivanje koncentracije HDL holesterola, VLDL i LDL proteini su najpre precipitovani heparin Mg<sup>2+</sup> albuminom: 0,5 mL plazme je pomešano sa 1 mL radnog rastvora koji je sadržao 150 IU heparina, 20 mM MgCl<sub>2</sub> i 1% BSA, smeša je inkubirana 15 min na 20°C a zatim centrifugirana na 3500 x g, 20 min/+4°C. Nakon centrifugiranja 0,2 mL supernatanta je izdvojeno za određivanje koncentracije HDL metodom po Zlatkis-u. Koncentracija LDL holesterola određena je pomoću Friedewald-ove formule:  $LDL = TC - HDL - TG/2,2$ , gde je TC – koncentracija ukupnog holesterola, TG – koncentracija triglicerida (Friedewald i sar., 1972). Koncentracije ukupnog holesterola, HDL i LDL izražene su u mmol/L.

Koncentracija kreatinina u serumu određivana je pomoću Creatinine (serum) Colorimetric Assay Kit-a (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) prema uputstvima proizvođača. Metoda se zasniva na reakciji kreatinina sa solima pikrinske kiseline (pikratima) u baznoj sredini, pri čemu nastaje žuto obojeno jedinjenje sa maksimumom apsorpcije na 490 nm. Intenzitet boje je proporcionalan koncentraciji kreatinina u ispitivanom uzorku. U odgovarajuće bunariće mikrotitar ploče dodavano je po 15 µL standarda kreatinina, odnosno ispitivanih uzoraka seruma, svi u triplikatu. Zatim je dodavano po 0,1 mL CRB (Creatinine Reaction Buffer) i 0,1 mL CCR (Creatinine Color Reagent). Optička gustina izračunata je kao razlika između apsorbanaci uzoraka na 490 nm nakon 7 min i 1 min inkubacije ( $\Delta OD = A_{490 (7 \text{ min})} - A_{490 (1 \text{ min})}$ ). Koncentracija kreatinina određivana je sa standardne krive formirane na osnovu vrednosti apsorbanace standarda kreatinina a rezultati su izraženi u µmol/L.

Koncentracija BUN-a (eng. *blood urea nitrogen*) u serumu određivana je spektrofotometrijski GLDH metodom. Metoda se zasniva na hidrolizi uree od strane enzima ureaze pri čemu nastaju amonijak i ugljen dioksid. U prisustvu enzima glutamat dehidrogenaze (GLDH), amonijak reaguje sa α-ketoglutaratom i daje glutaminsku kiselinu. Tom prilikom se NADH oksiduje u NAD<sup>+</sup>. Promena brzine oksidacije NADH prati se spektrofotometrijski na 340 nm i proporcionalna je koncentraciji uree. Koncentracija uree izražena je u mmol/L.

Katalitička aktivnost AST u serumu merena je IFCC metodom. Metoda se zasniva na reakciji transaminacije između L-aspartata i 2-ketoglutarata pri čemu nastaju oksalacetat i L-glutamat. U prisustvu malat dehidrogenaze oksalacetat oksiduje NADH u NAD<sup>+</sup>. Promena brzine oksidacije NADH proporcionalna je katalitičkoj aktivnosti AST koja je izražena u jedinicama/litru (U/L)

Katalitička aktivnost ALT u serumu merena je IFCC metodom. U reakciji transaminacije između L-alanina i 2-oksoglutarata nastaju piruvat i L-glutamat. U prisustvu laktat dehidrogenaze piruvat oksiduje NADH u NAD<sup>+</sup>. Promena brzine oksidacije NADH proporcionalna je katalitičkoj aktivnosti ALT koja je izražena u U/L.

### **3.6.7. Određivanje koncentracije hemoglobina i glikozilovanog hemoglobina u eritrocitima**

Koncentracija Hb u eritrocitima određivana je spektrofotometrijski metodom po Drabkin-u (Drabkin i Austin, 1935). Reakciona smeša je pripremljena mešanjem 0,02 mL lizata eritrocita sa 5 mL Drabkin reagensa (0,25 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>; 20 mM KCN; 0,1 M K<sub>2</sub>H/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pufer (pH 7,0)). Apsorbanca reakcione smeše u odnosu na slepu probu koja je sadržala Drabkin reagens merena je nakon 15 min inkubacije na sobnoj temperaturi u mraku na 545 nm. Koncentracija Hb je računata prema formuli:  $Hb = A_{545\text{ nm}} \times 36,77$ , a rezultati su izraženi kao g Hb/100 mL krvi.

Koncentracija GlyHb određivana je spektrofotometrijski metodom po Parker-u (Parker i sar., 1981). Lizati eritrocita u količini koja je sadržala 10 mg Hb razblaživani su do 1 mL fiziološkim rastvorom, mešani sa 1 mL 0,5 M oksalne kiseline. Smeša je inkubirana 4h na 100°C nakon čega su uzorci ostavljani da se ohlade. Nakon hlađenja u epruvete je dodavan 1 mL TCA (400 g/L), uzorci su vorteksovani i centrifugirani na 2000 x g, 10 min. Zatim je 1,5 mL supernatanta mešan sa 0,5 mL 0,05 M tiobarbiturne kiseline i inkubiran 30 min na 40°C. Apsorbanca reakcione smeše u odnosu na slepu probu koja je sadržala 1 mL fiziološkog rastvora merena je nakon hlađenja uzoraka (15 min na sobnoj temperaturi) na 443 nm. Koncentracija GlyHb očitavana je sa standardne krive formirane na osnovu vrednosti apsorbance standarda fruktoze u opsegu



koncentracija 60 – 500  $\mu\text{mol/L}$  rastvorene u fiziološkom rastvoru i izražena u  $\mu\text{mol/g Hb}$ .

### 3.6.8. Određivanje koncentracije insulina u serumu

Koncentracija insulina u serumu pacova određivana je enzimskim imunoesejem (eng. *enzyme linked immunosorbent assay*; ELISA), prema uputstvu proizvođača (Rat / Mouse Insulin ELISA Kit, EMD Millipore, MO, USA). Metoda se zasniva na vezivanju insulina iz uzorka za monoklonalno anti-insulinsko antitelo vezano za dno bunarića u mikrotitar ploči a zatim vezani insulin reaguje sa biotinilovanim anti-insulinskim antitelom. Za biotinilovano antitelo se zatim vezuje HRP čija se aktivnost meri spektrofotometrijski na 450 nm nakon dodavanja supstrata 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Porast apsorbance direktno je proporcionalan koncentraciji insulina u uzorku.

Svi rastvori su pre upotrebe temperirani na sobnu temperaturu i pripremljeni prema uputstvu proizvođača. Svi bunarići mikrotitar ploče su najpre ispirani tri puta sa po 300  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje. U bunariće predviđene za uzorke i slepu probu dodavano je po 10  $\mu\text{L}$  Assay Buffer-a, a zatim je u bunariće predviđene za slepu probu, standarde insulina i kontrolne uzorke dodavano po 10  $\mu\text{L}$  Matrix Solution-a. U odgovarajuće bunariće je zatim dodavano po 10  $\mu\text{L}$  standarda, kontrolnih uzoraka i uzoraka seruma pacova. Svi standardi i uzorci dodavani su u duplikatu. U bunariće je zatim dodavano po 80  $\mu\text{L}$  antitela. Nakon inkubacije u trajanju od 2 h na sobnoj temperaturi bunarići su ispirani tri puta sa po 300  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje i u svaki bunarić je dodavano po 100  $\mu\text{L}$  Enzyme Solution-a. Ploča je inkubirana 30 min na sobnoj temperaturi a zatim su svi bunarići ispirani 6 puta sa po 300  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje. Nakon poslednjeg ispiranja u svaki bunarić je dodavano po 100  $\mu\text{L}$  TMB. Reakcija je zaustavljena nakon inkubacije u trajanju od 15-20 min dodavanjem 100  $\mu\text{L}$  stop rastvora, nakon čega je u ELISA čitaču (Sunrise Basic, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria) merena apsorbance na 450 nm. Koncentracija insulina u ispitivanim uzorcima očitavana je sa standardne krive formirane na osnovu vrednosti apsorbance standarda insulina i izražena u  $\text{ng/mL}$ .

### **3.6.9. Određivanje krajnjih proizvoda glikacije u serumu**

Količina krajnjih proizvoda glikacije (eng. *advanced glycation products*; AGEs) u serumu pacova određivana je metodom koja se zasniva na specifičnoj fluorescenciji AGE-ova (Yanagisawa i sar., 1998; Kalousova i sar., 2002). Uzorci seruma razblaživani su (1:50) u PBS puferu (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10 mM KCl; 70 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 340 mM NaCl; pH 7,4) a intenzitet fluorescentne emisije na 440 nm je meren nakon ekscitacije na 350 nm na luminescentnom spektrometru (LS50B; Perkin-Elmer Ltd., Buckinghamshire, England). Intenzitet fluorescencije izražen je u arbitrarnim jedinicama (AU).

### **3.6.10. Histološka analiza tkiva**

#### **3.6.10.1. Priprema uzoraka za histološku analizu**

Uzorci pankreasa su fiksirani u formaldehidu (4% u PBS puferu) tokom 24h. Nakon fiksacije uzorci tkiva su dehidratirani rastućim koncentracijama etanola (50%, 70%, 96%, 100%), prosvetljavani ksilolom i ukalupljeni u parafin. Od svakog kalupa isečen je odgovarajući broj preseka tkiva debljine 5 µm na rotacionom mikrotomu (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany).

#### **3.6.10.2. Hematoksilin-eozin bojenje histoloških preparata**

Nakon deparafinizacije preseka u ksilolu i rehidratacije u seriji etanola opadajuće koncentracije (100%, 96%, 70%), preseci su ispirani u destilovanoj vodi i bojani hematoksilinom (MP Biomedicals LLC, Solon, OH, USA) 30 sek. Zatim su preseci ispirani u česmenskoj vodi 20 min, kratko (1-2 sek) obezbojeni u kiselom alkoholu (70% etanol; 0,25% HCl), ispirani u česmenskoj vodi 5 min pa bojani eozinom (MP Biomedicals LLC, Solon, OH, USA) 15 sek. Nakon dehidratacije preseka u seriji etanola rastuće koncentracije i prosvetljavanja u ksilolu, pokrovnna stakla su montirana DPX medijumom za montiranje (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). Za vizuelizaciju je korišćen DM RB Photomicroscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) opremljen Leica DFC 320 CCD kamerom.

### 3.6.10.3. Imunohistohemijsko bojenje histoloških preparata

Nakon deparafinizacije preseka u ksilolu i rehidratacije (serija etanola opadajuće koncentracije (100%, 96%, 70%) → destilovana voda → PBS pufer), preseci su inkubirani 20 min u rastvoru H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,3% u metanolu) u cilju blokiranja aktivnosti endogene peroksidaze. Preseci su zatim inkubirani u citratnom puferu (10 mM Na-citrat, pH 6,0; 0.05% Tween 20) na povišenoj temperaturi u cilju demaskiranja odgovarajućih antigena upotrebom mikrotalasne pećnice (citratni pufer je zagrevan do tačke ključanja u mikrotalasnoj pećnici nakon čega su preseci uranjeni u pufer i inkubirani 10 min uz povremeno zagrevanje pufera do tačke ključanja). Nakon hlađenja preseka i permeabilizacije membrana inkubacijom 10 min u 0,3% rastvoru Triton X-100 (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK), preseci su inkubirani 60 min u 3% rastvoru BSA u PBS puferu kako bi se izbegle nespecifične imunoreakcije antitela i okolnog tkiva. Preseci su zatim inkubirani sa odgovarajućim primarnim antitelom razblaženim u PBS puferu (+ 0,2% Tween 20) preko noći na +4°C (Tabela 3.1). Specifičnost primarnih antitela utvrđivana je izostavljanjem antitela na drugom preseku iste pločice (negativna kontrola). Nakon ispiranja primarnog antitela u PBS/Tween 20, preseci su inkubirani sa odgovarajućim sekundarnim antitelima obeleženim HRP (razblaženim u PBS/Tween 20; 1:100) 60 min na sobnoj temperaturi. Vizuelizacija je omogućena upotrebom hromogenog supstrata za peroksidazu, tečnog rastvora 3,3'-diaminobenzidina prema uputstvu proizvođača (DAKO Inc., Carpinteria, CA, USA). Preseci su zatim kontrastirani hematoksilinom, dehidratirani u seriji etanola rastuće koncentracije (70%, 96%, 100%) i prosvetljeni u ksilolu, nakon čega su montirana pokrovna stakla DPX medijumom za montiranje. Za vizuelizaciju je korišćen DM RB Photomicroscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) opremljen Leica DFC 320 CCD kamerom.

**Tabela 3.1. Primarna i sekundarna antitela korišćena u imunohistohemijijskoj analizi**

Naziv	Kat. broj	Poreklo	Razblaženje u PBS	Proizvođač
<b>Primarna antitela</b>				
<b>Insulin (H-86)</b>	sc-9168	Zec	1:100	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
<b>Glukagon (C-18)</b>	sc-7779	Koza	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA
<b>Somatostatin (H-106)</b>	sc-13099	Zec	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA
<b>GLUT-2 (H-67)</b>	sc-9117	Zec	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA
<b>p-Akt 1/2/3 (Ser 473)</b>	sc-7985-R	Zec	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA
<b>Sekundarna antitela</b>				
<b>Anti-zečji IgG-HRP</b>	sc-2379	Goveče	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA
<b>Anti-kozji IgG-HRP</b>	sc-2378	Goveče	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA

### 3.7. Ćelijska kultura

Kao materijal u *in vitro* eksperimentima u ovoj doktorskoj disertaciji korišćena je ćelijska linija insulinoma  $\beta$ -ćelija pacova Rin-5F (ATCC® CRL-2058™). To su adherentne ćelije epitelijalne morfologije koje rastu u monosloju i karakterišu se aktivnom proizvodnjom i sekrecijom insulina.

Ćelije su gajene u flaskovima površine 25 cm<sup>2</sup> u RPMI 1640 medijumu (Roswell Park Memorial Institute medium) (Biological Industries, Beit HaEmek, Israel) u koji je dodat 10% fetalni goveđi serum (eng. *fetal bovine serum*; FBS) (Bio West, Nuaille, France), 2 mM L-glutamin (Biological Industries, Beit HaEmek, Israel) i antibiotici (100 U/mL penicilina i 0,1 mg/mL streptomcina) (Biological Industries, Beit HaEmek, Israel). Kultura ćelija održavana je u inkubatoru (Sanyo Electric Co., Ltd, Osaka, Japan) na temperaturi 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5%

sadržaja CO<sub>2</sub>. Promena medijuma vršena je na svakih 72h, a po dostizanju konfluentnosti 80-90% ćelije su presejavane korišćenjem 0,05% Tripsin-EDTA (Biological Industries, Beit HaEmek, Israel).

### 3.7.1. Određivanje broja ćelija

Brojnost ćelija u flasku određivana je pomoću hemocitometra bojenjem ćelija tripan plavim (eng. *trypan blue*, TB). Nakon tripsinizacije ćelija, 50 µL suspenzije ćelija je mešano sa 50 µL TB (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) a zatim je po 10 µL obojene ćelijske suspenzije ubrizgavano u komore hemocitometra. Upotrebom invertnog mikroskopa (Olympus, Hamburg, Germany) brojane su žive, neobojene ćelije u svih 16 polja jedne a zatim druge komore hemocitometra. Ukupan broj živih ćelija računat je prema formuli:  $broj\ \acute{c}elija/ml = \frac{x_1+x_2}{2} \times 2 \times 10^4$ , gde su x<sub>1</sub> i x<sub>2</sub> broj živih ćelija u komorama hemocitometra, a 10<sup>4</sup> faktor komorice. Za potrebe eksperimenata ćelije su zasejavane u sterilne ploče u gustini 100000 ćelija/cm<sup>2</sup>.

### 3.7.2. Ispitivanje citotoksičnog efekta ekstrakta kičice na Rin-5F ćelije

Rin-5F ćelije su zasejavane u sterilne ploče sa 96 bunarića. Po dostizanju konfluentnosti 60-70% ćelije su tretirane rastućim koncentracijama ekstrakta (0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1 mg/mL) rastvorenim u RPMI medijumu u trajanju od 24h. Citotoksičnost ekstrakta ispitivana je 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolijum bromid (MTT) testom ([Poglavlje 3.7.5.](#)).

### 3.7.3. Izazivanje oksidativnog stresa kod Rin-5F ćelija

Rin-5F ćelije su zasejavane u sterilne ploče sa 96 bunarića. Po dostizanju konfluentnosti 60-70% ćelije su tretirane rastućim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10; 20; 40; 50; 75; 100; 125; 150; 200 µM) u trajanju od 3h, odnosno SNP-a (0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75; 2 mM) i STZ-a (1; 2; 5; 7,5; 10; 12; 13; 15; 17 mM) u trajanju od 24h. SNP i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> su rastvarani u RPMI medijumu, dok su tretmani STZ-a u RPMI medijumu pripremani iz 188 mM STZ-a u natrijum-citratnom puferu (0,1 M; pH 4,5). U daljim eksperimentima korišćene su koncentracije agenasa koje

su dovodile do 50% inhibicije rasta ćelijske kulture (IC<sub>50</sub> doza) a koje su određivane MTT testom ([Poglavlje 3.7.5.](#)).

#### **3.7.4. Ispitivanje efekta ekstrakta kičice na preživljavanje Rin-5F ćelija u uslovima oksidativnog stresa**

Rin-5F ćelije su zasejavane u sterilne ploče sa 96 bunarića. Po dostizanju konfluentnosti 60-70% ćelije u odgovarajućim bunarićima su tretirane IC<sub>50</sub> dozama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (75 µM; 3h), SNP-a (1,25 mM; 24h), odnosno STZ-a (12 mM; 24h) u prisustvu/odsustvu EK (0,05; 0,1; 0,25 mg/mL u RPMI), nakon čega je vijabilnost ćelija ispitivana MTT testom ([Poglavlje 3.7.5.](#)). Na osnovu dobijenih rezultata u daljim eksperimentima korišćena je koncentracija EK sa najvećim pozitivnim uticajem na preživljavanje ćelija (0,25 mg/mL).

#### **3.7.5. Ispitivanje vijabilnosti ćelija MTT testom**

MTT test za ispitivanje vijabilnosti ćelija zasniva se na redukciji žuto obojene tetrazolijum soli (3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolijum bromid) do ljubičastog formazana od strane mitohondrijalne dehidrogenaze na membrani funkcionalnih mitohondrija.

Po završetku odgovarajućeg tretmana, medijum iz bunarića je odlivan i dodavano je po 200 µL MTT-a (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) koncentracije 0,1 mg/mL rastvorenog u RPMI medijumu. Nakon dva sata inkubacije na 37°C u mraku, MTT medijum je odlivan a nesolubilni kristali formazana su rastvarani dodavanjem 100 µL DMSO. ApSORbanca je merena na 570nm pomoću ELISA čitača (Sunrise Basic, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria). Vijabilnost ćelija izražavana je u procentima nakon poređenja sa kontrolnim netretiranim ćelijama, za koje se smatralo da su 100% vijabilne.

#### **3.7.6. Ispitivanje efekta ekstrakta kičice na redoks status Rin-5F ćelija**

Rin-5F ćelije su zasejavane u sterilne ploče sa 6 bunarića. Po dostizanju konfluentnosti 60-70% ćelije su tretirane IC<sub>50</sub> dozom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3h), SNP-a (24h) ili STZ-a (24h) u prisustvu/odsustvu EK (0,25 mg/mL u RPMI). Nakon tretmana ćelije

su ispirane PBS puferom a zatim pokupljene u 1ml PBS pufera, prebačene u epruvetu i centrifugirane na 300 x g, 10 min. Dalja priprema uzoraka za različite eseje opisana je u poglavljima koja slede.

#### 3.7.6.1. Priprema uzoraka za ispitivanje nivoa lipidne peroksidacije i nivoa oštećenja DNK

Talog ćelija je resuspendovan u 200  $\mu$ L PBS-a, od suspenzije ćelija je izdvajano po 10  $\mu$ L za ispitivanje stepena oštećenja molekula DNK ([Poglavlje 3.10.](#)), dok je ostatak suspenzije centrifugiran na 300 x g, 10 min. Talog ćelija je rastvaran u 35  $\mu$ L 1,15% rastvora KCl-a i sonifikovan (tri puta po 5 sek/30 kHz/+4°C), nakon čega je izdvajano 5  $\mu$ L za određivanje koncentracije proteina u uzorcima ([Poglavlje 3.8.](#)) a ostatak je korišćen za ispitivanje nivoa lipidne peroksidacije ([Poglavlje 3.9.](#)). Homogenat je do upotrebe čuvan na -80°C.

#### 3.7.6.2. Priprema uzoraka za ispitivanje odnosa redukovanog i oksidovanog glutationa i nivoa S-glutationilacije proteina

Talog ćelija je resuspendovan u 500  $\mu$ L PBS-a, od suspenzije ćelija je izdvajano po 5  $\mu$ L za određivanje koncentracije proteina ([Poglavlje 3.8.](#)), dok je ostatak centrifugiran na 300 x g, 10 min. Talog ćelija je resuspendovan u 100  $\mu$ L 2,5% SSA a zatim homogenizovan. Homogenat je inkubiran 5 min na sobnoj temperaturi a zatim centrifugiran na 8000 x g, 5 min. Supernatant je neutralizovan dodavanjem 5  $\mu$ L 4M TEA na 100  $\mu$ L supernatanta i korišćen za određivanje odnosa GSH/GSSG ([Poglavlje 3.11.](#)) dok je talog proteina korišćen za određivanje nivoa GSSP ([Poglavlje 3.12.](#)).

#### 3.7.6.3. Priprema uzoraka za ispitivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite

Talog ćelija je resuspendovan u 400  $\mu$ L saharoznog pufera (0,25 M saharoza; 0,1 M EDTA; 0,05 M Tris-HCl, pH 7,4), a zatim je suspenzija ćelija sonifikovana (20 kHz/30 sek/+4°C) i centrifugirana na 14000 x g, 1 min/+4°C. Supernatant je korišćen za određivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite

([Poglavlje 3.13](#)) i imunoblot analizu proteina enzima antioksidativne zaštite ([Poglavlje 3.14](#)).

Medijum u kome su ćelije tretirane je nakon tretmana sakupljan i centrifugiran na 500 x g, 10 min, a 10 µL supernatanta je korišćeno za određivanje koncentracije oslobođenog insulina enzimskim imunoesejem (Rat/Mouse Insulin ELISA Kit, EMD Millipore, MO, USA) ([Poglavlje 3.6.8](#)).

### **3.7.7. Izolacija ukupne RNK i reverzna transkripcija**

Za izolaciju ukupne RNK korišćen je GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Rin-5F ćelije su zasejavane u sterilne ploče sa 6 bunarića. Po dostizanju konfluentnosti 60-70% ćelije u odgovarajućim bunarićima su tretirane IC<sub>50</sub> dozom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3h), SNP-a (24h) ili STZ-a (24h) u prisustvu/odsustvu EK. Nakon završetka tretmana ćelije su ispirane i u bunariće je nalivano po 600 µL pufera za liziranje sa dodatim 286 mM β-merkaptetanolom. Ćelije su pokupljene, prebačene u epruvete i homogenizovane u cilju potpunog liziranja. Na lizirane ćelije je dodavano po 360 µL apsolutnog etanola i svaki uzorak je promešan. Ćelijski lizat je prebacivan u kolonu (GenJET RNA Purification Column) i centrifugiran na 12000 x g, 1 min. Filtrat je odbacivan a na kolonu je dodavano 700 µL pufera 1 za ispiranje (Wash Buffer 1). Nakon centrifugiranja uzorka na 12000 x g, 1 min filtrat je odbacivan, na kolonu je dodavano 600 µL pufera 2 za ispiranje (Wash Buffer 2) i uzorak je ponovo centrifugiran na 12000 x g, 1 min. Nakon odbacivanja filtrata kolona je još jednom ispirana puferom 2 (250 µL) i centrifugirana na 12000 x g, 2 min. Zatim je kolona prebacivana na nove epruvete (RNase-free microcentrifuge tube) a RNK je ispirana sa kolone dodavanjem 50 µL nuclease-free vode na centar kolone i centrifugiranjem na 12000 x g, 1 min. Čistoća i koncentracija dobijene RNK proveravana je na spektrofotometru (NanoPhotometer N60, Implen GMBH, Germany) a kvalitet RNK elektroforetskim razdvajanjem na 1,5% agaroznom gelu. Izolovana RNK je čuvana na -80°C do upotrebe.

U cilju oslobađanja RNK od potencijalno zaostale DNK, izolovana RNK je tretirana DNKazom. Reakciona smeša je pripremana mešanjem 1 µg RNK, 1 µL 10 x reakcionog pufera sa MgCl<sub>2</sub>, (10 x Reaction Buffer with MgCl<sub>2</sub>), 1 µL (1 U) DNKaze I



koja je oslobođena RNKaze (Dnase I, Rnase-free) (Fermentas) i sterilne vode u zapremini do 10  $\mu$ L reakcione smeše koja je zatim inkubirana 30 min na 37°C. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 1  $\mu$ L 50 mM EDTA i inkubacijom na 65°C, 10 min. Ovako pripremljena RNK je korišćena kao matrica za sintezu cDNK (eng. *complementary DNA*; cDNA) u reakciji reverzne transkripcije pomoću RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). Reakciona smeša je sadržala 1  $\mu$ g RNK tretirane DNKazom, 4  $\mu$ L 5 x reakcionog pufera (5 x Reaction Buffer), 1  $\mu$ L oligo (dT) prajmera, 1  $\mu$ L (20 U) inhibitora RNKaze (RiboLock RNase Inhibitor), 2  $\mu$ L 10 mM dNTP, 1  $\mu$ L (200 U) reverzne transkriptaze (RevertAid M-MuLV RT) i sterilne vode do ukupne zapremine reakcione smeše 20  $\mu$ L. Reakciona smeša je inkubirana na 42°C, 60 min, a reakcija je zaustavljena zagrevanjem uzoraka na 70°C, 5 min. Sintetisana cDNK je čuvana na -80°C do upotrebe.

### **3.7.8. Priprema ukupnih ćelijskih lizata**

Rin-5F ćelije su zasejavane u sterilne ploče sa 24 bunarića. Po dostizanju konfluentnosti 60-70% ćelije u odgovarajućim bunarićima su tretirane IC<sub>50</sub> dozom STZ-a (4; 6; 8; 10; 12; 24h) u prisustvu/odsustvu EK. Nakon završetka tretmana ćelije su ispirane PBS puferom a zatim je u bunariće nalivano po 50  $\mu$ L pufera za liziranje ćelija (ProteoJET Mammalian Cell Lysis Reagent, Fermentas). Ploče su inkubirane 30 min/+4°C nakon čega su ćelijski lizati pokupljeni, prebačeni u epruvete i centrifugirani na 16000 x g, 20 min/+4°C. Supernatant je prebačen u novu epruvetu, odvajano je 5  $\mu$ L za određivanje koncentracije proteina ([Poglavlje 3.8.](#)), a ostatak je čuvan na -80°C do upotrebe.

### **3.7.9. Priprema jedarnih frakcija ćelija**

Jedarne frakcije Rin-5F ćelija pripremljene su upotrebom NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents kita (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Rin-5F ćelije su zasejavane u sterilne ploče sa 6 bunarića. Po dostizanju konfluentnosti 60-70% ćelije u odgovarajućim bunarićima su tretirane IC<sub>50</sub> dozom STZ-a (4; 6; 8; 10; 12; 24h) u prisustvu/odsustvu EK. Nakon završetka tretmana

ćelije su ispirane PBS puferom a zatim pokupljene u 1ml PBS pufera, prebačene u epruvetu i centrifugirane na 500 x g, 5 min. Na talog ćelija je dodavano po 100 µL CER I pufera, ćelije su vorteksovane 15 sek a zatim inkubirane 10 min na ledu. Nakon inkubacije u epruvete je dodavano po 5,5 µL CER II pufera, uzorci su vorteksovani 5 sek, inkubirani 1 min na ledu i centrifugirani na 16000 x g, 5 min/+4°C. Supernatanti koji sadrže citosolne frakcije su prebacivani u nove epruvete i čuvani na -80°C. Na talog jedara je dodavano po 50 µL hladnog NER pufera, uzorci su vorteksovani 15 sek a zatim inkubirani 40 min na ledu uz vorteksovanje 15 sek na svakih 10 min. Po isteku inkubacije uzorci su centrifugirani na 16000 x g, 10 min/+4°C. Supernatanti koji sadrži jedarne frakcije ćelija su prebacivani u nove epruvete, odvajano je 5 µL za određivanje koncentracije proteina ([Poglavlje 3.8.](#)), a ostatak je čuvan na -80°C do upotrebe.

### **3.8. Određivanje koncentracije proteina**

Koncentracija proteina u pripremljenim uzorcima određivana je metodom po Lowry-ju (Lowry i sar., 1951). Reakciona smeša je pripremana mešanjem 0,2 mL 100 x razblaženog uzorka proteina i 1 mL sveže pripremljenog rastvora koji je sadržao 0,01% CuSO<sub>4</sub>; 0,02% KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>x4H<sub>2</sub>O; 0,01 N NaOH; 0,4% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Uzorci su vorteksovani i inkubirani 10 min na sobnoj temperaturi, a zatim je dodavano 0,1 mL 50% FC reagensa (Institut Mol, Stara Pazova, Srbija) nakon čega su uzorci dodatno inkubirani 10 min na sobnoj temperaturi. Apsorbanca reakcione smeše u odnosu na slepu probu merena je na 750 nm. Koncentracija proteina u uzorcima očitavana je sa standardne krive formirane na osnovu vrednosti apsorbanca standarda BSA u opsegu koncentracija 0,1 – 0,4 mg/mL rastvorenog u destilovanoj vodi. Koncentracija proteina izražavana je u mg/mL.

### **3.9. Određivanje nivoa lipidne peroksidacije**

Nivo lipidne peroksidacije u uzorcima određivan je spektrofotometrijskim merenjem koncentracije reaktivnih vrsta tiobarbiturne kiseline (eng. *thiobarbituric acid reactive substances*; TBARS). Metoda se zasniva na reakciji malondialdehida (MDA), proizvoda lipidne peroksidacije, sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) na

95°C. Reakciona smeša je pripremana mešanjem 0,1 mL uzorka (homogenati Rin-5F ćelija, jetre i bubrega pripremljeni u 1,15M KCl i lizati eritrocita), 0,2 mL 8,1% natrijum dodecil sulfata (SDS), 1,5 mL 20% CH<sub>3</sub>COOH (pH 3,5), 1,5 mL 0,8% TBA i 0,7 mL dH<sub>2</sub>O. Uzorci su inkubirani na 95°C, 60 min, a zatim ohlađeni do sobne temperature. U ohlađene uzorke je dodavano 1 mL dH<sub>2</sub>O i 5 mL smeše n-butanol/piridin (15/1, v/v) uz jako vorteksovanje. Uzorci su centrifugirani na 3000 x g, 10 min, nakon čega je apsorbancija gornjeg, obojenog sloja u odnosu na slepu probu merena na 532 nm. Koncentracija TBARS u uzorcima očitavana je sa standardne krive formirane na osnovu apsorbanci standarda MDA u opsegu koncentracija 25 – 500 nM/mL, a rezultati su izražavani u nM MDA/100 mg proteina, odnosno µM MDA/g Hb.

### 3.10. Određivanje stepena oštećenja DNK

Za procenu oštećenja DNK u Rin-5F ćelijama, jetri i bubregu korišćen je alkalni komet esej (eng. *single cell gel electrophoresis*; SCGE) (Singh i sar., 1988). Deset mikrolitara ćelijske suspenzije je pomešano sa 75 µL 1% LMPA (eng. *low melting point agarose*) u PBS-u koja je pretemperirana na 42°C i uzorak je razlivan na mikroskopsku pločicu prekrivenu tankim slojem 1,5% agaroze rastvorene u PBS-u. Uzorci su prekrivani pokrovnim staklom i ostavljani 10 min na +4°C da se LMPA stegne. Pokrovno staklo je uklanjano, na uzorke je nanošen još jedan sloj 1% LMPA prekrivan pokrovnim staklom koje je nakon stezanja agaroze uklanjano. Mikroskopske pločice su zatim inkubirane 2h na +4°C u hladnom puferu za lizu (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-baza, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10). Nakon liziranja DNK je denaturisana inkubacijom mikroskopskih pločica 30 min na +4°C u puferu za elektroforezu (300 mM NaOH; 1 mM EDTA; pH 13). Pločice su zatim postavljane u sistem za elektroforezu, koja je trajala 30 minuta na 0,01 kV. Nakon toga, pločice su ispirane 3 x 5 min u puferu za neutralizaciju (0,4 M Tris-HCl; pH 7,4) i bojene SYBR GREEN I bojom za nukleinske kiseline (Sigma-Aldrich, S 9430). Komete su vizuelizovane i fotografisane pomoću fluorescentnog mikroskopa, Leica DMLB (uvećanje 40x) koji je povezan sa CCD kamerom. Kao parametar oštećenja DNK korišćen je moment repa komete koji

predstavlja proizvod dužine repa i procenta DNK u repu komete. Moment repa komete je izražavan u relativnim svetlosnim jedinicama (eng. *relative light units*, RLU) po pikselu. Kvantifikacija momenta repa komete je urađena upotrebom kompjuterskog programa TriTekCometScore™Freeware v1.5.

### **3.11. Određivanje odnosa redukovanog i oksidovanog glutationa**

Odnos GSH/GSSG u Rin-5F ćelijama, jetri, bubregu i lizatima eritrocita određivan je kolorimetrijski pomoću Glutathione Assay Kit-a (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA). Princip metode se zasniva na reakciji –SH grupa glutationa sa 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoevom kiselinom (DTNB; Elmanov reagens) pri čemu nastaje žuto obojena 5-tio-2-nitrobenzoeva kiselina (TNB) koja reaguje sa glutationom i formira GS-TNB disulfid. GR redukuje nastali GS-TNB čime se GSH reciklira i povećava količina nastale TNB. Brzina formiranja TNB je proporcionalna koncentraciji GSH u uzorku.

Svi rastvori su pre upotrebe temperirani na sobnoj temperaturi i pripremljeni prema uputstvu proizvođača (GSH MES Buffer (2x); GSSG Standard; GSH Co-Factor Mixture; GSH Enzyme Mixture; GSH DTNB). U odgovarajuće bunariće mikrotitar ploče nalivano je po 50 µL standarda ili uzoraka (homogenati Rin-5F ćelija, jetre i bubrega i lizati eritrocita, oslobođeni proteina tretmanom SSA i neutralizovani TEA), u duplikatu. Zatim je u bunariće dodavano po 150 µL sveže pripremljenog Assay Cocktail-a (11,25 mL MES Buffer; 0,45 mL Co-Factor Mixture; 2,1 mL Enzyme Mixture; 0,45 mL DTNB; 2,3 mL dH<sub>2</sub>O). Apsorbanca reakcione smeše na 405 nm merena je nakon 25 min inkubacije na sobnoj temperaturi u mraku. Koncentracija GSH određena je očitavanjem sa standardne krive formirane na osnovu vrednosti apsorbance standarda GSH u opsegu koncentracija 0,5 – 16 µM. S' obzirom da GR redukuje GSSG u 2GSH, količina izmerenog GSH predstavlja sumu GSH i GSSG. Za određivanje koncentracije GSSG uzorci i standardi su tretirani 2-vinilpiridinom, koji se kovalentno vezuje za GSH, a ne i za GSSG. Na 50 µL uzorka/standarda dodavano je 2 µL 0,5 M 2-vinilpiridina, uzorci su vorteksovani i inkubirani 60 min na sobnoj temperaturi. Ostatak procedure bio je identičan kao za ukupni GSH. Koncentracija GSSG određena je očitavanjem sa standardne krive

GSSG u opsegu koncentracija 0,25 – 8  $\mu$ M. Koncentracija redukovanog GSH je dobijena oduzimanjem GSSG od vrednosti ukupnog GSH. Koncentracije su izražavane u  $\mu$ M GSH/mg proteina, odnosno  $\mu$ M GSH/g Hb.

### **3.12. Određivanje koncentracije S-glutationilovanih proteina**

Talog proteina dobijen nakon SSA tretmana homogenata Rin-5F ćelija, jetre i bubrega i lizata eritrocita je ispiran sa 500  $\mu$ L sveže pripremljene 1,5% TCA i centrifugiran na 5000 x g, 5 min. Dobijeni talog je rastvoren u 500  $\mu$ L baznog fosfatnog pufera (0,1 M  $K_2H/KH_2PO_4$ , pH 7,4 i 0,25 N NaOH pomešani u odnosu 9:1) i inkubiran 30 min na sobnoj temperaturi. U tim uslovima dolazi do oslobađanja GSH vezanog za SH-grupe proteina. Zatim je u uzorke dodavano 40  $\mu$ L 60% TCA i uzorci su centrifugirani na 5000 x g, 5 min. Supernatanti su alikvotirani i čuvani na -80°C do upotrebe.

Nakon odmrzavanja uzorci su neutralizovani dodavanjem 5  $\mu$ L 4 M TEA na 100  $\mu$ L uzorka. U odgovarajuće bunariće mikrotitar ploče je nalivano po 40  $\mu$ L uzorka, odnosno standarda GSH. Standardi GSH su pripremani u baznom fosfatnom puferu, uz dodatak TEA (5  $\mu$ L 4 M TEA na 100  $\mu$ L standarda). U bunariće je zatim dodavano 140  $\mu$ L 0,3 M  $Na_2H/NaH_2PO_4$  pufera (pH 8,7) i 20  $\mu$ L 0,04% DTNB rastvorenog u 1% natrijum citratnom puferu (pH 6,8). Apsorbanca reakcione smeše na 405 nm merena je nakon 5 min inkubacije na sobnoj temperaturi u mraku. Koncentracija GSSP određena je očitavanjem sa standardne krive formirane na osnovu vrednosti apsorbance standarda GSH u opsegu koncentracija 4 – 256  $\mu$ M. Koncentracije su izražavane u  $\mu$ M GSH/mg proteina, odnosno  $\mu$ M GSH/g Hb.

### **3.13. Određivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite**

#### **3.13.1. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze**

Aktivnost ukupne superoksid dismutaze (SOD) u homogenatima Rin-5F ćelija, jetre i bubrega i lizatima eritrocita određivana je adrenalinskom metodom (Misra i Fridovich, 1972). Metoda se zasniva na sposobnosti SOD da inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina u adrenohrom u alkalnoj sredini. Brzina

autooksidacije adrenalina prati se spektrofotometrijski na osnovu promene apsorbanace tokom 10 minuta na 480 nm. Brzina autooksidacije adrenalina ekvivalentna je nagibu linearnog dela porasta apsorbanace, a procenat inhibicije se koristi kao mera katalitičke aktivnosti enzima.

U reakcionu smešu koju čine 3 mL 0,05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 10,2) i 3x10<sup>-4</sup> M rastvor adrenalina u 0,1 M HCl dodavan je uzorak u količini dovoljnoj da redukuje linearni deo krive autooksidacije adrenalina za 30-40%. Količina uzorka treba da bude tolika da promena apsorbanace u minuti ( $\Delta A/\text{min}$ ) tokom autooksidacije u linearnom delu bude 0,016-0,025. Autooksidacija adrenalina praćena je tokom 10 min na 480 nm. Paralelno je praćena i brzina autooksidacije adrenalina u odsustvu uzorka (kontrolna reakcija). Aktivnost SOD računata je prema formuli

$$SOD \text{ aktivnost} = \frac{(\Delta A_{adr} - \Delta A_{uz}) \times 2 \times R_{uz}}{\Delta A_{adr} \times V_{uz} \times C_{uz}}$$

gde je  $\Delta A_{adr}$  – promena apsorbanace kontrolne reakcije u minuti;  $\Delta A_{uz}$  – promena apsorbanace reakcije sa uzorkom u minuti;  $R_{uz}$  – razblaženje uzorka;  $V_{uz}$  – zapremina uzorka (mL);  $C_{uz}$  – koncentracija proteina u uzorku (mg/mL). Aktivnost SOD izražavana je u jedinicama aktivnosti SOD po mg proteina (U/mg proteina), odnosno U/mg Hb.

Aktivnost MnSOD u uzorcima određivana je istom metodom kao i ukupna SOD. Pre dodavanja uzorka u reakcionu smešu aktivnost CuZnSOD je blokirana dodavanjem 8 mM KCN u uzorak u odnosu 1:1 i inkubacijom 30 min pre početka analize. Aktivnost MnSOD računata je na isti način kao i ukupna SOD. Aktivnost CuZnSOD dobijena je oduzimanjem aktivnosti MnSOD od aktivnosti ukupne SOD.

#### 3.13.1.1. Uklanjanje hemoglobina iz eritrocita

Za određivanje aktivnosti SOD u eritrocitima, iz lizata eritrocita je pre analize uklanjan hemoglobin: 0,5 mL lizata je mešano sa 3 mL hladne dH<sub>2</sub>O i inkubirano 30 min na ledu. Zatim je dodavan 1 mL ledenog 96% etanola (-20°C), uzorci su mućkani a nakon toga je dodavano 0,6 mL ledenog hloroforma (-20°C). Uzorci su dobro promućkani, inkubirani 10 min na ledu i centrifugirani na 2300 x g, 10 min. Supernatant je korišćen za određivanje aktivnosti SOD gore

opisanom metodom. S' obzirom da je CuZnSOD jedina forma SOD koju poseduju eritrociti sisara, određena aktivnost ukupne SOD predstavlja aktivnost CuZnSOD.

### 3.13.2. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze (CAT) u homogenatima Rin-5F ćelija, jetre i bubrega i lizatima eritrocita određivana je metodom po Claiborne-u (Claiborne, 1985). Metoda se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju brzine razlaganja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na 240 nm, pri čemu je pad apsorbance proporcionalan aktivnosti CAT u ispitivanom uzorku. U 1,5 mL podešenog rastvora H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u 0,05 M K<sub>2</sub>H/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> puferu (pH 7,0) dodavan je uzorak i praćen je pad apsorbance na 240 nm u toku 3 min na temperaturi 25°C. Rastvor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je podešavan tako da apsorbance slepe probe bude u opsegu 0,520 – 0,525. Aktivnost CAT u ispitivanim uzorcima računata je prema formuli:

$$CAT \text{ aktivnost} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{bl}) \times 1000 \times V_{rs} \times R_{uz}}{43,6 \times V_{uz} \times C_{uz}}$$

gde je  $\Delta A_{uz}$  – srednja promena apsorbance uzorka u minuti;  $\Delta A_{bl}$  – srednja promena apsorbance slepe probe u minuti;  $R_{uz}$  – razblaženje uzorka;  $V_{rs}$  – zapremina reakcione smeše (mL);  $V_{uz}$  – zapremina uzorka (mL);  $C_{uz}$  – koncentracija proteina u uzorku (mg/mL); 43,6 – molarni ekstinkcioni koeficijent za H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na 240 nm (M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>). Aktivnost CAT izražavana je u jedinicama aktivnosti CAT po mg proteina (U/mg proteina), odnosno U/mg Hb.

### 3.13.3. Određivanje aktivnosti glutathion peroksidaze

Aktivnost glutathion peroksidaze (GPx) u homogenatima Rin-5F ćelija, jetre i bubrega i lizatima eritrocita određivana je metodom po Tamura-i (Tamura i sar., 1982). Princip metode se zasniva na spregnutoj aktivnosti GPx i GR. GPx katalizuje oksidaciju GSH u GSSG uz redukciju organskih hidroperoksida dok GR katalizuje redukciju GSSG u GSH uz oksidaciju NADP kao koenzima. Aktivnost GPx se prati posredno spektrofotometrijskim praćenjem brzine oksidacije NADPH u NADP<sup>+</sup> na 340 nm. Jedinica aktivnosti GPx definisana je kao broj nanomolova oksidovanog NADPH u minuti (nmol NADPH/min)

U kvarcnu kivetu je redom dodavano 1,5 mL dH<sub>2</sub>O; 0,3 mL 1 mM GSH; 0,6 mL 0,2 mM NADPH u 1% NaHCO<sub>3</sub>; 0,1 mL 1 mM NaN<sub>3</sub>; 0,1 mL 1 mM EDTA; 0,3 mL 0,5 M K<sub>2</sub>H/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pufera (pH 7,0); 0,1 mL 0,03 M t-butilhidroperoksid, 0,1 mL uzorka i 0,005 mL GR (100-300 U/mg proteina). Nakon mućkanja reakcione smeše merena je apsorbanca na 340 nm tokom tri minuta, pri temperaturi 25°C. Kao slepa proba korišćeni su rastvori bez dodatog uzorka (1,6 mL dH<sub>2</sub>O). Aktivnost GPx u ispitivanim uzorcima računata je prema formuli:

$$GPx \text{ aktivnost} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{bl}) \times 1000 \times V_{rs} \times R_{uz}}{6,22 \times V_{uz} \times C_{uz}}$$

gde je  $\Delta A_{uz}$  – srednja promena apsorbance uzorka u minuti;  $\Delta A_{bl}$  – srednja promena apsorbance slepe probe u minuti;  $R_{uz}$  – razblaženje uzorka;  $V_{rs}$  – zapremina reakcione smeše (mL);  $V_{uz}$  – zapremina uzorka (mL);  $C_{uz}$  – koncentracija proteina u uzorku (mg/mL); 6,22 – molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH na 340 nm ( $M^{-1}cm^{-1}$ ). Aktivnost GPx izražavana je u jedinicama aktivnosti GPx po mg proteina (nmol NADPH/min/mg proteina), odnosno nmol NADPH/min/mg Hb.

### 3.13.4. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze

Aktivnost GR u homogenatima Rin-5F ćelija, jetre i bubrega i lizatima eritrocita određivana je metodom po Glatzle-u (Glatzle i sar., 1974). Aktivnost GR praćena je posredno spektrofotometrijskim praćenjem brzine oksidacije NADPH u NADP<sup>+</sup> na 340 nm.

U kvarcnu kivetu sipano je redom 0,6 mL 0,5 M K<sub>2</sub>H/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pufera (pH 7,4); 0,1 mL 4 mM GSSG; 0,1 mL 50 mM EDTA; 2 mL dH<sub>2</sub>O; 0,1 mL uzorka i 0,1 mL 2 mM NADPH u 1% NaHCO<sub>3</sub>. Nakon mućkanja reakcione smeše merena je apsorbanca na 340 nm tokom tri minuta, pri temperaturi 25°C. Kao slepa proba korišćeni su rastvori bez dodatog uzorka. Aktivnost GR u ispitivanim uzorcima računata je prema formuli:

$$GR \text{ aktivnost} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{bl}) \times 1000 \times V_{rs} \times R_{uz}}{6,22 \times V_{uz} \times C_{uz}}$$

gde je  $\Delta A_{uz}$  – srednja promena apsorbance uzorka u minuti;  $\Delta A_{bl}$  – srednja promena apsorbance slepe probe u minuti;  $R_{uz}$  – razblaženje uzorka;  $V_{rs}$  –



zapremina reakcione smeše (mL);  $V_{uz}$  – zapremina uzorka (mL);  $C_{uz}$  – koncentracija proteina u uzorku (mg/mL); 6,22 – molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH na 340 nm ( $M^{-1}cm^{-1}$ ). Aktivnost GR izražavana je u jedinicama aktivnosti GR po mg proteina (nmol NADPH/min/mg proteina), odnosno nmol NADPH/min/mg Hb.

### **3.14. Imunoblot analiza proteina – Western blot**

#### **3.14.1. Elektroforetsko razdvajanje proteina pod denaturišućim uslovima (SDS-PAGE)**

Za razdvajanje i karakterizaciju proteina korišćena je tehnika jednodimenzionalnog razdvajanja proteina prema molekulskim masama u poliakrilamidnom gelu u prisustvu SDS-a (SDS-PAGE), po modifikovanoj Laemmli metodi (Laemmli, 1970; Sambrook i sar., 1989).

Proteini su razdvajani u 12% poliakrilamidnom gelu za razdvajanje (11,7% akrilamid; 0,3% metilen-bis-akrilamid; 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,05% amonijum-persulfat (APS) i 0,05% tetrametil-etilen-diamin (TEMED)), preko koga je nalivan 4% gel za skoncentrisavanje uzoraka (3,9% akrilamid; 0,1% metilen-bis-akrilamid; 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,05% APS; 0,1% TEMED). Pre nanošenja na gel proteini su rastvarani u odnosu 1:1 u 2X puferu za uzorke (4% SDS; 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 10%  $\beta$ -merkaptotanol; 20% glicerol i 0,1% bromfenol plavo) i termički denaturisani 5 min na 95°C, a zatim je uzimano 20  $\mu$ g proteina po uzorku za elektroforetsko razdvajanje u mini Bio-Rad sistemu (Mini-PROTEAN II electrophoresis cell). Kao pufer za elektroforezu korišćen je Tris-glicinski pufer (0,195 M glicin; 25 mM Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS). Kroz gel za skoncentrisavanje uzorci su putovali pri naponu 0,12 kV, odnosno 0,15 kV nakon ulaska u gel za razdvajanje. Po završetku elektroforeze (nakon izlaska boje bromfenol plavo iz gela) gelovi su bojani Coomassie plavim ili su korišćeni za prenos proteina na membranu.

Bojenje proteina vršeno je potapanjem gela u rastvor sastava 0,2% Coomassie plavo (Coomassie Brilliant Blue R-250), 45% metanol i 10% glacijalna

sirćetna kiselina, 30-60 min dok je uklanjanje nespecifično vezane boje vršeno u smeši metanola, vode i glacijalne sirćetne kiseline (4,5 : 4,5 : 1; v/v/v).

### **3.14.3. Prenos proteina na membrane**

Elektroforetski razdvojeni proteini prenošeni su na PVDF (*polyvinylidene difluoride*) membrane (Amersham Hybond P 0.45 PVDF, GE Healthcare Life Sciences) pod uticajem električne struje (Burnette, 1981). Nakon završetka elektroforeze, gelovi za razdvajanje su pažljivo uklanjani sa staklene ploče i potapani u ohlađeni pufer za prenos (25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 192 mM glicin; 20% methanol; 0,02% SDS). PVDF membrane odgovarajuće veličine su prvo aktivirane u metanolu 2 min, ispirane u dejonizovanoj vodi i potom prebačene u pufer za prenos. Nakon 30 min, gel i membrana su slagani u sendvič od filter papira (Whatman 3MM) i suđera i postavljani u aparat za transfer (Bio-Rad, Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell). Prenos proteina sa gela na membranu vršen je preko noći na 30 V, nakon čega su membrane bojene 1% Ponceau-S u 5% sirćetnoj kiselini, a gelovi Coomassie plavim, kako bi se proverili ispravnost transfera i elektroforeze.

### **3.14.4. Imunoblot analiza proteina**

Imunoblot analiza proteina rađena je po modifikovanoj metodi (Towbin i sar., 1979). Membrane sa prenetim proteinima su ispirane 3 puta u trajanju od 10 min, u 0,05% rastvoru Tween 20 u TBS puferu (20 mM Tris-HCl, pH 7,6; 150 mM NaCl) – TBS-T. Nakon ispiranja, proteini na membrani su blokirani u rastvoru za blokiranje (5% nemasno mleko u prahu (Blotto, non-fat dry milk, Santa Cruz Biotechnology) rastvarano u TBS-T puferu) 1 h, na sobnoj temperaturi, uz lagano ljuhanje. Membrane su zatim ispirane TBS-T puferom (1x15 min, 3x5 min) i inkubirane sa primarnim antitelom preko noći na +4°C, uz lagano mućkanje (Tabela 3.2). Nakon inkubacije sa primarnim antitelom membrane su ispirane (1x15, 3x5 min u TBS-T puferu) i zatim inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelom obeleženim HRP-om, 1 h na sobnoj temperaturi, uz lagano ljuhanje. Nakon uklanjanja nevezanih antitela ispiranjem u TBS-T puferu (1x15, 4x5 min)

membrane su bojene luminol reagensom (Western Blotting Luminol Reagent, Santa Cruz Biotechnology) i stavljane pod filmove (Hyperfilm ECL, Santa Cruz Biotechnology, RPN 3103 K) u trajanju od 10 sek do 10 min. Za ponovno korišćenje iste membrane za drugo antitelo, membrana je inkubirana 35 min na 55°C u puferu za striping (100 mM  $\beta$ -merkaptotanol; 2% SDS; 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8), zatim ispirana tri puta po 30 min u TBS-T puferu i inkubirana sa drugim antitelom po istom principu.

Kvantitativna analiza optičkih gustina imunopozitivnih traka je urađena u programu TotalLab (Phoretix) v1.1 i izražena kao relativna vrednost.

**Tabela 3.2. Primarna i sekundarna antitela korišćena u imunoblot analizi**

Anti-	Kat. broj	kDa	Poreklo	Razblaženje	Proizvođač
<b>Primarna antitela</b>					
<b><math>\alpha</math>2M (R-19)</b>	sc-8517	185	koza	1:500 u 3% mleku	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
<b>SP1 (E-3)</b>	sc-17824	106	miš	1:250 u 3% BSA	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
<b>FOXO3A (H-144)</b>	sc-11351	97	zec	1:250 u 3% mleku	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
<b>Lamin B (M-20)</b>	sc-6217	67	koza	1:500 u 1% BSA	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
<b>p-NF<math>\kappa</math>B p65 (Ser 311)</b>	sc-33039	65	zec	1:500 u TBS-T	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
<b>NF<math>\kappa</math>B p65 (C-20)</b>	sc-372	65	zec	1:500 u TBS-T	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
<b>CAT</b>	ab16731	65	zec	1:5000 u 3% mleku	Abcam, Cambridge, UK
<b>GR</b>	ab16801	58	zec	1:2000 u 0,5% BSA	Abcam, Cambridge, UK
<b>p-Akt 1/2/3 (Ser 473)</b>	sc-7985-R	56/60	zec	1:500 u TBS-T	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
<b>Akt 1/2/3 (H-136)</b>	sc-8312	56/60	zec	1:500 u TBS-T	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA

<b>Nrf-2 (C-20)</b>	sc-722	57	zec	1:500 u 3% mleku	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
<b>PDX-1 (H-140)</b>	sc-25403	46	zec	1:250 u 1% mleku	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
<b>p-ERK (E-4)</b>	sc-7383	42/44	miš	1:500 u TBS-T	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
<b>ERK (K-23)</b>	sc-94	42/44	zec	1:2000 u 3% mleku	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
<b>p-p38 (Tyr 182)</b>	sc-7975-R	38	zec	1:500 u TBS-T	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
<b>p38<math>\alpha</math> (C-20)</b>	sc-535	38	zec	1:1000 u TBS-T	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
<b>GAPDH (FL-335)</b>	sc-25778	37	zec	1:1000 u 3% mleku	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
<b>MnSOD (FL-222)</b>	sc-30080	25	zec	1:1000 u 3% mleku	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
<b>GPx 1</b>	ab22604	22	zec	1:1000 u 0,5% BSA	Abcam, Cambridge, UK
<b>MafA (F-6)</b>	sc- 390491	36	miš	1:250 u TBS-T	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
<b>CuZnSOD (C-17)</b>	sc-8637	17	koza	1:750 u 3% mleku	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
<b>O-GlcNac</b>	07764		miš	1:2000 u 3% mleku	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
<b>CML</b>	ab27683		koza	1:2000 u TBS-T	Abcam, Cambridge, UK
<b>Sekundarna antitela</b>					
<b>Anti zečji IgG-HRP</b>	sc-2379		goveče	1:2000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
<b>Anti kozji IgG-HRP</b>	sc-2378		goveče	1:2000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
<b>Anti mišji IgG-HRP</b>	7076		konj	1:3000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

### 3.15. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (RT-qPCR)

Ekspresija gena za enzime antioksidativne zaštite (CAT, GPx, GR, MnSOD, CuZnSOD) i insulin u Rin-5F ćelijama ispitivana je kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*; PCR) u realnom vremenu (RT-qPCR). Reakciona smeša za RT-qPCR sastojala se od 5  $\mu$ L Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fischer Scientific), koji je sadržao DNK polimerazu (Maxima Hot Start Taq DNA polimerase), dNTP, odgovarajući pufer za PCR reakciju i fluorescentnu boju SYBR Green I, 1  $\mu$ L cDNK koja je pre dodavanja u RT-qPCR reakciju razblaživana do koncentracije 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ L, po 0,5  $\mu$ L odgovarajućih prajmera za gen od interesa (finalne koncentracije 0,5 pM) i 3  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O. Parovi prajmera korišćeni u analizi prikazani su u Tabeli 3.3. Deset mikrolitara reakcione smeše dodato je u svaki bunarić mikroploče za RT-qPCR (MicroAmp Optical, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) koji su potom zapečaćeni optičkim adhezivnim filmom (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Nakon centrifugiranja u trajanju od 3 min na 1000 x g, ploča je prenetu u termoblok aparata za RT-qPCR (QuantStudio 3 Real-Time PCR system, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Inicijalni korak denaturacije od 10 min na 95°C pratilo je 40 ciklusa koji su se sastojali od koraka denaturacije DNK lanaca 15 sek na 95°C i koraka vezivanja prajmera i elongacije lanaca 1 min na 60°C. Nivo ekspresije ispitivanog gena normalizovan je u odnosu na ekspresiju gena za GAPDH detektovanog u istom uzorku i prikazan kao  $2^{-\Delta Ct}$ , gde je  $\Delta Ct$  razlika između Ct vrednosti gena od interesa i gena za GAPDH.

**Tabela 3.3. Sekvence prajmera korišćenih u RT-qPCR analizi**

Naziv gena		Sekvenca para prajmera 5' - 3'	Dužina fragmenta
<b>CAT</b>	Fw	5'-GCGAATGGAGAGGCAGTGTAC-3'	652 bp
	Rev	5'-GAGTGACGTTGTCTTCATTAGCACTG-3'	
<b>MnSOD</b>	Fw	5'-CAGATCATGCAGCTGCACCA-3'	133 bp
	Rev	5'-TCAGTCCAGGCTGAAGAGCA-3'	
<b>CuZnSOD</b>	Fw	5'-GCAGAAGGCAAGCGGTGAAC-3'	282 bp
	Rev	5'-CGGCCAATGATGGAATGCTC-3'	
<b>GPx</b>	Fw	5'-AGTTCGGACATCAGGAGAATGG-3'	141 bp
	Rev	5'-TAAAGAGCGGGTGAGCCTTC-3'	
<b>GR</b>	Fw	5'-CACTTCCCAGTAGGAAACCC-3'	227 bp
	Rev	5'-GATCGCAACTGGGGTGAGAA-3'	
<b>Insulin</b>	Fw	5'-ATGGCCCTGTGGATGCGCTT-3'	275 bp
	Rev	5'-ACAATGCCACGCTTCTGCCG-3'	
<b>GAPDH</b>	Fw	5'-CAAGGTCATCCATGACAACTTTG-3'	496 bp
	Rev	5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'	

### 3.16. Statistička obrada podataka

Statistička analiza svih dobijenih rezultata je rađena primenom softvera GraphPad Prism v5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Za utvrđivanje značajnosti razlike između eksperimentalnih grupa poređenjem sa odgovarajućom kontrolnom grupom korišćena je jednosmerna analiza varijanse (one-way ANOVA) praćena Bonferroni testom (*Bonferroni's Multiple Comparison Test*). Statistički značajnom smatrana je verovatnoća  $p < 0,05$ . Svi rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (eng. *standard error of mean*).

## 4. REZULTATI

---

### 4.1. Kvalitativna i kvantitativna analiza hemijskog sastava metanolnog ekstrakta kičice

Sadržaj ukupnih fenola (TPC) u metanolnom ekstraktu kičice pripremljenom od nadzemnih delova biljaka iznosio je  $25,13 \pm 0,45$  mg EGK/g SE, dok je sadržaj ukupnih flavonoida (TFC) iznosio  $67,86 \pm 2,10$  mg EKV/g SE (Tabela 4.1.A).

Na osnovu preliminarnih rezultata fitohemijskog ispitivanja sastava EK (rezultati nisu prikazani), za kvantitativnu analizu ekstrakta odabrano je 21 jedinjenje sa najvećim udelom. Metodom eksternog standarda ispitana je količina fenolnih kiselina (*p*-kumarna, sinapinska, kafeinska i ferulinska kiselina), flavonoida iz grupe flavona (luteolin i apigenin), flavonola (kvercetin, rutin, izokvercitrin, kempferol i astragalin) i flavanona (naringenin), ksantona (dekusatin, eustomin, demetileustomin i metilbelidifolin), kao i sekoiridoida (svercijamarin, sverozid, genciopikrin, loganin i sekologanin) (Tabela 4.1.B, Slike 4.1 i 4.2). Dominantna jedinjenja u nadzemnim delovima kičice bili su sekoiridoidi – svercijamarin ( $657,48 \pm 97,62$  mg/g SE), sverozid ( $464,59 \pm 65,24$  mg/g SE) i genciopikrin ( $59,27 \pm 10,92$  mg/g SE). Druga najzastupljenija grupa sekundarnih metabolita u ekstraktu bili su ksantoni, pre svih demetileustomin ( $0,88 \pm 0,08$  mg/g SE) i metilbelidifolin ( $0,88 \pm 0,01$  mg/g SE). Ostala fenolna jedinjenja bila su prisutna u znatno nižim koncentracijama. Među ispitivanim fenolnim kiselinama najveću zastupljenost u ekstraktu imala je ferulinska kiselina ( $0,0258 \pm 0,0017$  mg/g SE), dok je rutin ( $0,0658 \pm 0,0046$  mg/g SE) bio najzastupljeniji među flavonoidima.

**Tabela 4.1. Kvalitativna i kvantitativna analiza metanolnog ekstrakta pripremljenog od nadzemnih delova kičice**

<b>A</b>							
TPC		TFC					
(mg EGK/g SE)		(mg EKV/g SE)					
25,13 ± 0,45		67,86 ± 2,10					
<b>B</b>							
(±) HESI-MS podaci							
No.	Jedinjenje	<i>t<sub>R</sub></i>	Masa	HESI jonizacioni mod	MS <sup>2</sup> fragmenti	Koncentracija	
		(min)	( <i>m/z</i> )		( <i>m/z</i> )	(µg/mg SE)	
1	Kafeinska kiselina <sup>a</sup>	PA	2,51	179	[M-H] <sup>-</sup>	135; 134	0,0043 ± 0,0007
2	Svercijamarin <sup>a</sup>	S	2,71	433	[M+CH <sub>3</sub> COOH -H] <sup>-</sup>	179; 161	657,48 ± 97,624
3	Genciopikrin <sup>a</sup>	S	2,96	415	[M+CH <sub>3</sub> COOH -H] <sup>-</sup>	179; 119	59,270 ± 10,916
4	Loganin <sup>a</sup>	S	3,05	449	[M+CH <sub>3</sub> COOH -H] <sup>-</sup>	227; 127	0,1781 ± 0,0305
5	Sverozid <sup>a</sup>	S	3,09	417	[M+CH <sub>3</sub> COOH -H] <sup>-</sup>	195; 161	464,59 ± 65,239
6	<i>p</i> -Kumarna kiselina <sup>a</sup>	PA	3,38	163	[M-H] <sup>-</sup>	119; 93	0,0171 ± 0,0016
7	Sekologanin <sup>a</sup>	S	3,46	447	[M+CH <sub>3</sub> COOH -H] <sup>-</sup>	155; 123	0,0509 ± 0,0021
8	Ferulinska kiselina <sup>a</sup>	PA	3,70	193	[M-H] <sup>-</sup>	178; 134	0,0258 ± 0,0017
9	Sinapinska kiselina <sup>a</sup>	PA	3,81	223	[M-H] <sup>-</sup>	193; 121	0,0020 ± 0,0002
10	Rutin <sup>a</sup>	F	3,88	609	[M-H] <sup>-</sup>	301; 300	0,0658 ± 0,0046
11	Izokvercitrin <sup>a</sup>	F	4,11	463	[M-H] <sup>-</sup>	300; 243	0,0016 ± 0,0002
12	Astragalin <sup>a</sup>	F	4,41	447	[M-H] <sup>-</sup>	284; 255	0,0006 ± 0,0001
13	Luteolin <sup>a</sup>	F	5,31	285	[M-H] <sup>-</sup>	151; 133	0,0006 ± 0,0002
14	Kvercetin <sup>a</sup>	F	5,38	301	[M-H] <sup>-</sup>	179; 151	0,0040 ± 0,0005

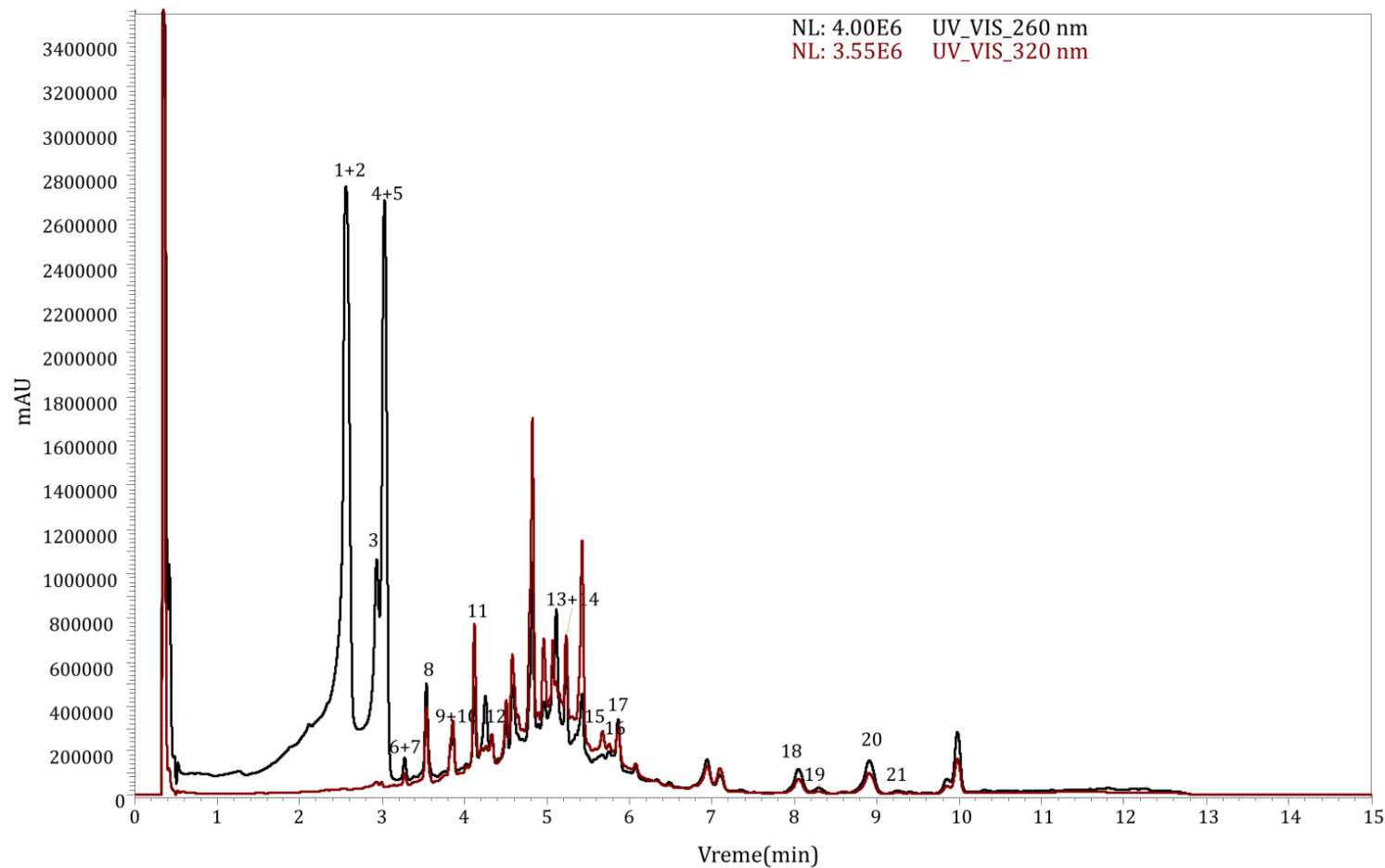


<b>15</b>	Apigenin <sup>a</sup>	F	5,76	269	[M-H] <sup>-</sup>	149; 117	0,0068 ± 0,0004
<b>16</b>	Naringenin <sup>a</sup>	F	5,83	271	[M-H] <sup>-</sup>	151; 119	0,0017 ± 0,0002
<b>17</b>	Kempferol <sup>a</sup>	F	5,92	285	[M-H] <sup>-</sup>	211; 157	0,0006 ± 0,0001
<b>18</b>	Dekusatin <sup>b</sup>	X	8,06	303	[M+H] <sup>+</sup>	245; 202	0,4343 ± 0,0344
<b>19</b>	Eustomin <sup>b</sup>	X	8,49	363	[M+H] <sup>+</sup>	333; 305	0,5854 ± 0,0471
<b>20</b>	Metilbelidifolin <sup>b</sup>	X	9,07	289	[M+H] <sup>+</sup>	274; 217	0,8804 ± 0,0090
<b>21</b>	Demetileustomin <sup>b</sup>	X	9,32	349	[M+H] <sup>+</sup>	319; 291	0,8821 ± 0,0816

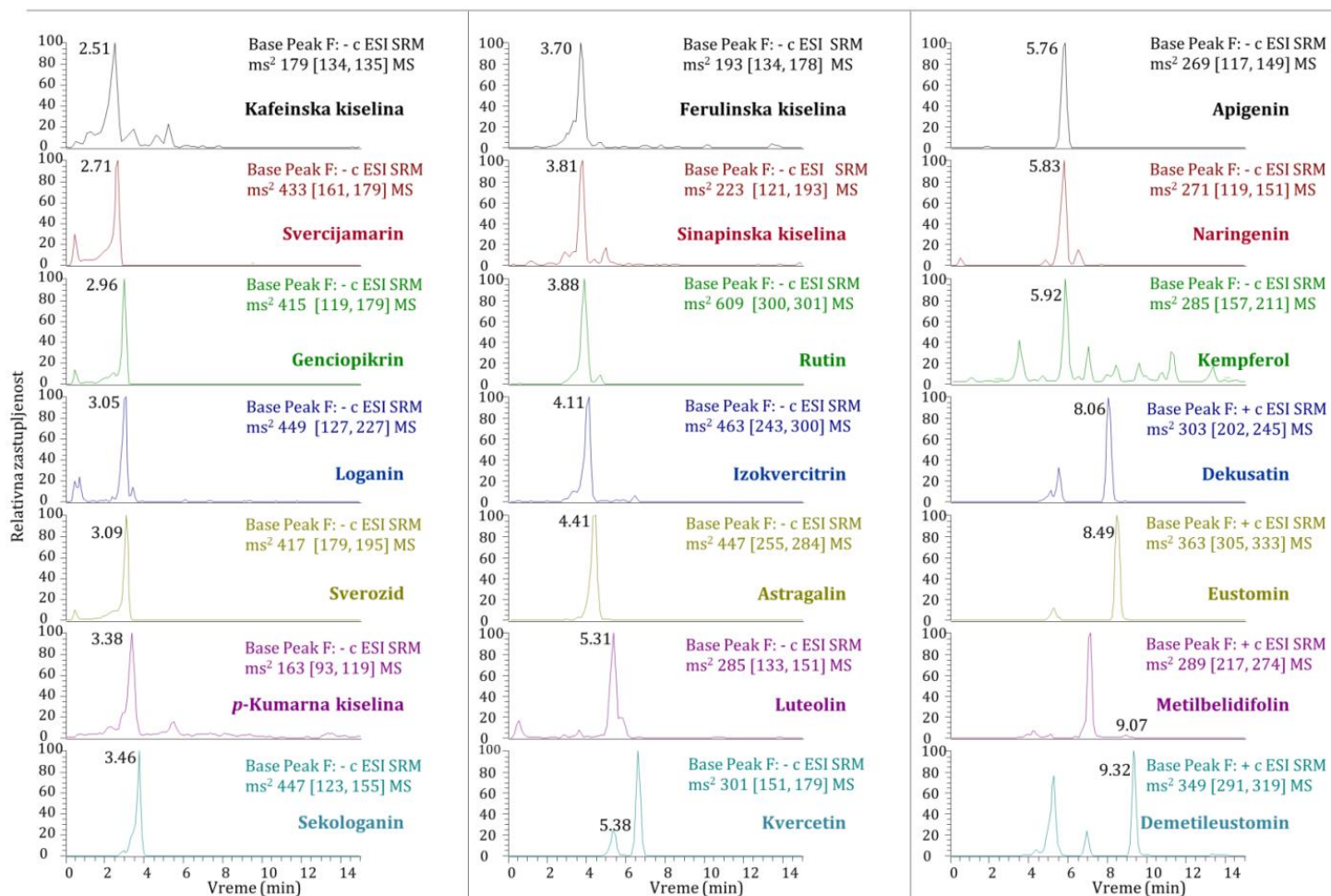
(A) Sadržaj ukupnih fenola (TPC) i ukupnih flavonoida (TFC) u metanolnom ekstraktu kičice. EGK – ekvivalenti galne kiseline; EKV – ekvivalenti kvercetina; SE – suvi ekstrakt. (B) UHPLC/(+/-)HESI-MS i UHPLC/(+/-)HESI-MS/MS analiza odabranih polifenola i sekoiridoida u metanolnom ekstraktu kičice, uključujući broj pika (No), retenciono vreme ( $t_R$ ), masu, glavne MS<sup>2</sup> fragmente dobijene tokom SRM (eng. *Selected Reaction Monitoring*) analize i koncentracije u uzorku ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  SE). Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=3). S – sekoiridoidi; PA – fenolne kiseline; F – flavonoidi; X – ksantoni. Preuzeto i modifikovano iz (Đorđević i sar., 2017).

<sup>a</sup> Potvrđeno na osnovu standardnog jedinjenja

<sup>b</sup> Potvrđeno na osnovu referentnog jedinjenja



**Slika 4.1. UHPLC-DAD hromatogram metanolnog ekstrakta kičice na  $\lambda_{\max}=260$  (crna linija) i 320 nm (crvena linija).** Ispitivana jedinjenja označena su brojevima koji odgovaraju brojevima u Tabeli 1.B. (1 – Kafeinska kiselina; 2 – Svercijamarin; 3 – Genciopikrin; 4 – Loganin; 5 – Sverozid; 6 – p-Kumarinska kiselina; 7 – Sekologanin; 8 – Ferulinska kiselina; 9 – Sinapinska kiselina; 10 – Rutin; 11 – Izokvercitrin; 12 – Astragalin; 13 – Luteolin; 14 – Kvercetin; 15 – Apigenin; 16 – Naringenin; 17 – Kempferol; 18 – Dekusatin; 19 – Eustomin; 20 – Metilbelidifolin; 21 – Demetileustomin).

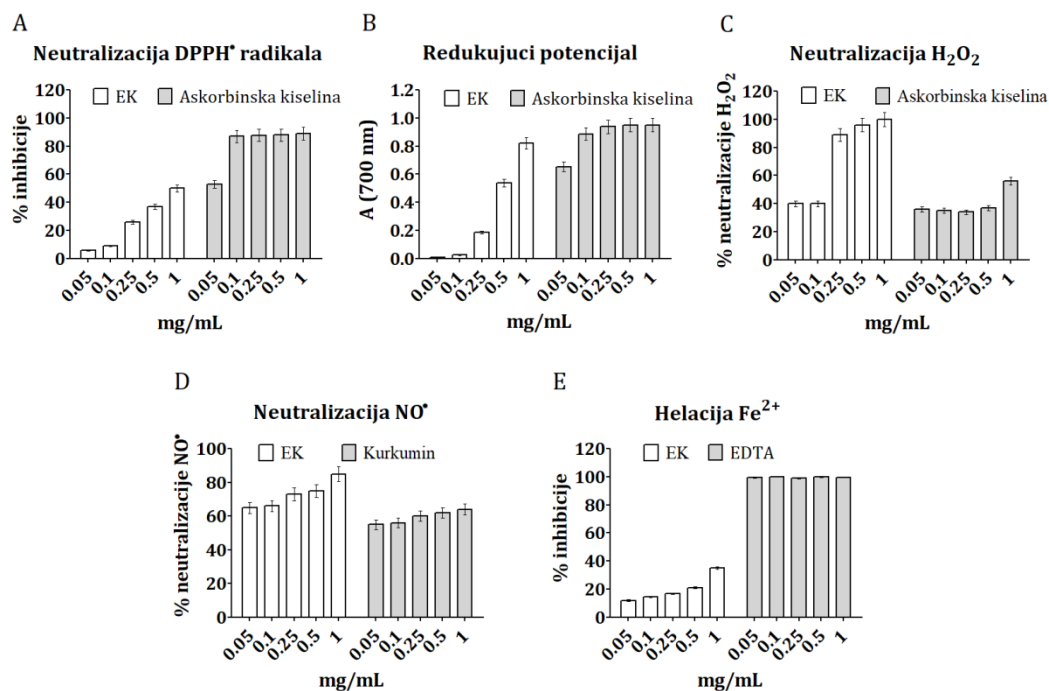


**Slika 4.2. UHPLC-qqqMS SRM hromatogram metanolnog ekstrakta kičice.** Prikazani su hromatogrami pojedinačnih odabranih jedinjenja ekstrakta nakon razdvajanja u posebnim kanalima. Za preciznu identifikaciju i potvrdu jedinjenja, SRM analiza je rađena za svako jedinjenje u duplikatu. Preuzeto i modifikovano iz (Đorđević i sar., 2017).

## 4.2. Antioksidativni potencijal ekstrakta kičice u *in vitro* eksperimentalnim uslovima

Antioksidativni potencijal EK ispitan je primenom sledećih *in vitro* kolorimetrijskih eseja: sposobnost neutralizacije DPPH• radikala, ispitivanje redukujućeg potencijala, sposobnost neutralizacije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sposobnost neutralizacije NO• i sposobnost helacije Fe<sup>2+</sup> (Slika 4.3.). Ispitana je serija rastućih koncentracija ekstrakta a rezultati su upoređeni sa rezultatima odgovarajućih standardnih supstanci u istim koncentracijama. Sposobnost neutralizacije DPPH• radikala rasla je sa porastom koncentracije ekstrakta, ali je u svim ispitanim koncentracijama bila niža od sposobnosti neutralizacije DPPH• radikala izmerene za askorbinsku kiselinu (Slika 4.3.A). Redukujući potencijal EK se značajno uvećavao sa porastom koncentracije tako da je pri najvećoj koncentraciji skoro dostigao redukujući potencijal askorbinske kiseline (Slika 4.3.B). U svim ispitanim koncentracijama EK je ispoljio veću sposobnost neutralizacije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i NO• od askorbinske kiseline, odnosno kurkumina (Slike 4.3.C i 4.3.D, redom). Sposobnost helacije Fe<sup>2+</sup> jona je takođe rasla sa porastom koncentracije EK, ali je bila konstantno niža od odgovarajućih vrednosti izmerenih za EDTA koji je u svim ispitanim koncentracijama helirao blizu 100% prisutnih Fe<sup>2+</sup> jona (Slika 4.3.E).

Rezultati korelacione analize između odgovarajućeg *in vitro* eseja i ukupnog sadržaja fenola i flavonoida u ekstraktu ukazali su na postojanje statistički značajne izražene pozitivne linearne korelacije između TPC i TFC sa svim *in vitro* testovima izuzev sposobnosti neutralizacije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, gde je uočena statistički značajna pozitivna nelinearna korelacija (Tabela 4.2.).



**Slika 4.3. Antioksidativni potencijal metanolnog ekstrakta kičice u *in vitro* eksperimentalnim uslovima.** (A) Sposobnost neutralizacije DPPH<sup>•</sup> radikala; (B) Redukujući potencijal ekstrakta; (C) Sposobnost neutralizacije vodonik peroksida; (D) Sposobnost neutralizacije azot oksida; (E) Sposobnost helacije Fe<sup>2+</sup> jona. Kao standardne supstance u odgovarajućim testovima korišćeni su askorbinska kiselina, kurkumin i EDTA. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (n=6). Preuzeto i modifikovano iz (Đorđević i sar., 2017).

**Tabela 4.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakta kičice je u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem ukupnih fenola i flavonoida**

R (R <sup>2</sup> )	Neutralizacija DPPH <sup>•</sup>	Redukujući potencijal	Neutralizacija H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> &	Neutralizacija NO	Helacija Fe <sup>2+</sup>
TPC	0,927 (0,859) *	0,973 (0,947) **	0,917 (0,841) *	0,962 (0,926) **	0,993 (0,987) ***
TFC	0,947 (0,898) *	0,986 (0,972) **	0,941 (0,885) *	0,970 (0,940) **	0,989 (0,977) **

R – Pearson koeficijent korelacije; R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije; TPC – sadržaj ukupnih fenola u EK; TFC – sadržaj ukupnih flavonoida u EK; \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001; & korelaciona analiza između sposobnosti neutralizacije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i TPC/TFC urađena nakon linearizacije na Log skalu

### **4.3. Uticaj ekstrakta kičice na sistemski oksidativni stres kod pacova u uslovima dijabetesa**

Nakon analize antioksidativne aktivnosti EK u in vitro uslovima, u daljem toku istraživanja ispitani su efekti EK u in vivo uslovima, odnosno na model sistemu dijabetesa pacova. Najpre je analiziran uticaj EK na promenu telesne mase dijabetičnih životinja kao i na osnovne biohemijske parametre karakteristične za dijabetes. Imajući u vidu da eritrociti prvi odgovaraju na povišen nivo oksidativnog stresa u uslovima hiperglikemije i da stepen njihovog oštećenja odražava sistemski oksidativni stres, ispitana je i efekat EK na strukturne i funkcionalne parametre eritrocita.

#### **4.3.1. Analiza promena telesne mase i osnovnih biohemijskih parametara u serumu pacova**

U tabeli 4.3 prikazani su biohemijski parametri karakteristični za dijabetes i promene telesne mase pacova četiri nedelje nakon tretmana STZ-om, odnosno nakon izazivanja dijabetesa. U poređenju sa kontrolnim životinjama (K) čija se telesna masa tokom trajanja eksperimenta uvećala za 52,78%, kod dijabetičnih pacova je zabeležen značajan gubitak telesne mase (-24,23%;  $p < 0,001$ ). Tretman kontrolnih životinja ekstraktom nije bitno uticao na promenu telesne mase (+50,41%), dok je primena EK značajno ublažila pad telesne mase kako u posttretiranoj (-9,60%;  $p < 0,01$ ) tako i u pretretiranoj grupi dijabetičnih životinja (-5,48%;  $p < 0,001$ ).

U poređenju sa kontrolnom grupom, tretman nedijabetičnih životinja ekstraktom nije imao uticaja na nivo glukoze i insulina u serumu. Dijabetična grupa životinja imala je sniženu koncentraciju insulina (3 puta;  $p < 0,001$ ) i povećanu koncentraciju glukoze (4 puta;  $p < 0,001$ ) u poređenju sa kontrolnim pacovima. Pored toga, u eritrocitima dijabetičnih životinja uočena je značajno viša koncentracija GlyHb u odnosu na kontrolne životinje (2,5 puta;  $p < 0,001$ ). Primena EK snizila je koncentracije glukoze (1,5 puta kod D/EK grupe;  $p < 0,01$ , odnosno 2 puta kod EK/D/EK grupe;  $p < 0,001$ ) i GlyHb (1,4 puta kod D/EK grupe;  $p < 0,01$ , odnosno 1,8 puta kod EK/D/EK grupe;  $p < 0,001$ ) i povećala količinu insulina u

serumu (1,7 puta kod D/EK grupe;  $p < 0,01$ , odnosno 2,4 puta kod EK/D/EK grupe i  $p < 0,001$ ) u obe grupe dijabetičnih životinja.

U odnosu na kontrolne uslove, koncentracije TG i LDL holesterola u serumu dijabetičnih životinja bile su povećane 3,2 ( $p < 0,001$ ), odnosno 2,4 puta ( $p < 0,001$ ). Tretman ekstraktom u posttretiranoj grupi dijabetičnih životinja smanjio je koncentraciju TG (za 27,5% u odnosu na D grupu;  $p < 0,05$ ), dok je koncentracija LDL holesterola ostala nepromenjena. Pretretman ekstraktom je, sa druge strane, smanjio koncentracije TG (2,4 puta;  $p < 0,001$ ) i LDL holesterola (1,6 puta;  $p < 0,01$ ) u odnosu na dijabetične životinje. Koncentracije ukupnog i HDL holesterola se nisu značajno menjale između eksperimentalnih grupa.

**Tabela 4.3. Ekstrakt kičice poboljšava osnovne fizičke i biohemijske parametre kod dijabetičnih pacova**

	K	K/EK	D	D/EK	EK/D/EK
N	7	7	7	7	7
$\Delta$ t.m. (%)	+52,78 $\pm$ 3,07	+50,41 $\pm$ 3,87	-24,23 $\pm$ 1,90***	-9,60 $\pm$ 3,05***;+	-5,48 $\pm$ 4,54***; ++
Glukoza (mmol/L)	5,50 $\pm$ 0,09	5,75 $\pm$ 0,28	22,53 $\pm$ 1,04***	15,1 $\pm$ 2,15***; ++	11,27 $\pm$ 1,28*; ***
GlyHb ( $\mu$ mol/g Hb)	3,11 $\pm$ 0,14	3,7 $\pm$ 0,22	7,92 $\pm$ 0,55***	5,68 $\pm$ 0,59**; ++	4,31 $\pm$ 0,17***
Insulin (ng/mL)	0,57 $\pm$ 0,04	0,59 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,02***	0,33 $\pm$ 0,01***; ++	0,45 $\pm$ 0,03*; ***
TG (mmol/L)	0,6 $\pm$ 0,04	0,6 $\pm$ 0,13	1,93 $\pm$ 0,17***	1,4 $\pm$ 0,09***; +	0,8 $\pm$ 0,04***
TC (mmol/L)	2,95 $\pm$ 0,18	2,94 $\pm$ 0,13	3,23 $\pm$ 0,12	3,51 $\pm$ 0,07	3,35 $\pm$ 0,16
HDL (mmol/L)	1,07 $\pm$ 0,05	0,93 $\pm$ 0,10	0,92 $\pm$ 0,02	1,02 $\pm$ 0,04	0,95 $\pm$ 0,04
LDL (mmol/L)	0,92 $\pm$ 0,05	0,71 $\pm$ 0,05	2,18 $\pm$ 0,21***	1,82 $\pm$ 0,16**	1,38 $\pm$ 0,15**

Promena telesne mase ( $\Delta$  t.m.), koncentracije glukoze, glikohemoglobina (GlyHb), insulina, triglicerida (TG), ukupnog holesterola (TC), HDL i LDL holesterola. K – kontrolna grupa; K/EK – kontrolna grupa tretirana ekstraktom; D – dijabetična grupa; D/EK – posttretirana grupa dijabetičnih životinja; EK/D/EK – pretretirana grupa dijabetičnih životinja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM za naznačeni broj životinja (N). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na K; +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ , +++  $p < 0,001$  u odnosu na D. Preuzeto i modifikovano iz (Đorđević i sar., 2017).

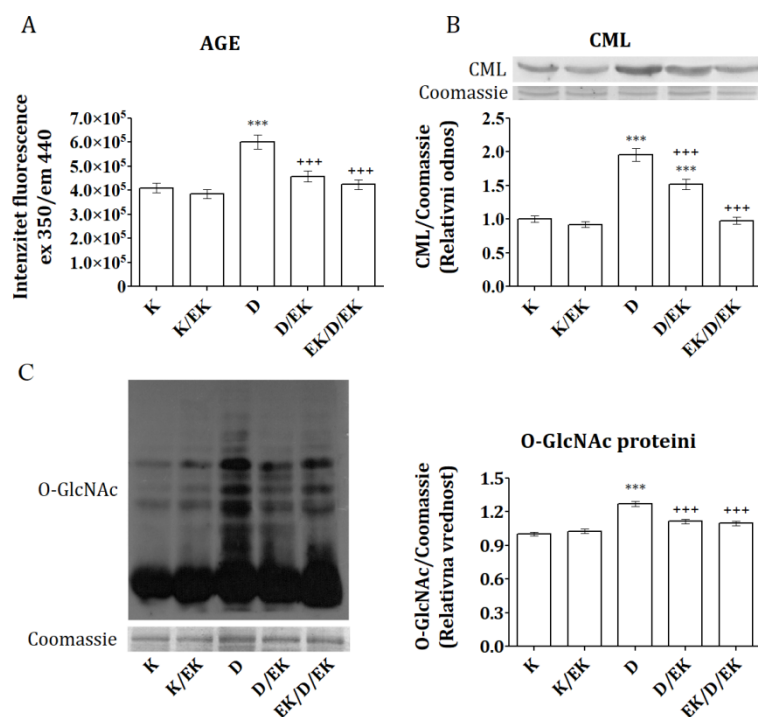
### **4.3.2. Uticaj ekstrakta kičice na strukturne i funkcionalne parametre eritrocita u uslovima dijabetesa**

#### **4.3.2.1. Glikacija i glikozilacija proteina u serumu i eritrocitima u uslovima hiperglikemije**

Uticaj EK na proces glikacije serumskih proteina dijabetičnih pacova praćen je fluorescentnim merenjem krajnjih proizvoda glikacije (AGE) kao i imunoblot analizom prisustva jednog od glavnih krajnjih produkata glikacije N( $\epsilon$ )-(karboksimetil)lizina (CML). Specifična fluorescenca AGE-ova u serumu dijabetičnih pacova bila je povećana 1,5 puta ( $p < 0,001$ ) u poređenju sa K životinjama, dok je kod dijabetičnih životinja tretiranih ekstraktom ona bila na kontrolnom nivou (Slika 4.4.A). Imunoblot analiza proteina seruma ukazala je na povećanu akumulaciju CML-a kod dijabetičnih životinja (Slika 4.4.B). Kod posttretiranih životinja EK je smanjio nivo CML-a u serumu za oko 23% u poređenju sa dijabetičnim životinjama ( $p < 0,001$ ), dok je kod pretretiranih životinja nivo CML-a bio na kontrolnom nivou ( $p < 0,001$  u odnosu na D).

Usled povećanog priliva glukoze u put biosinteze heksozamina u uslovima hiperglikemije povećava se stepen posttranslacione modifikacije proteina na serinu i treoninu dodavanjem  $\beta$ -N-acetilglukozamina (O-GlcNAc). Efekat primene EK na stepen ove modifikacije u lizatima eritrocita ispitan je imunoblot analizom antitelom specifičnim za O-GlcNAc (Slika 4.4.C). U poređenju sa K životinjama, u eritrocitima dijabetičnih pacova detektovano je statistički značajno povećanje nivoa proteina modifikovanih O-GlcNAc ( $p < 0,001$ ). Tretman dijabetičnih pacova ekstraktom smanjio je nivo O-GlcNAc modifikacije u obe dijabetične grupe ( $p < 0,001$ ).



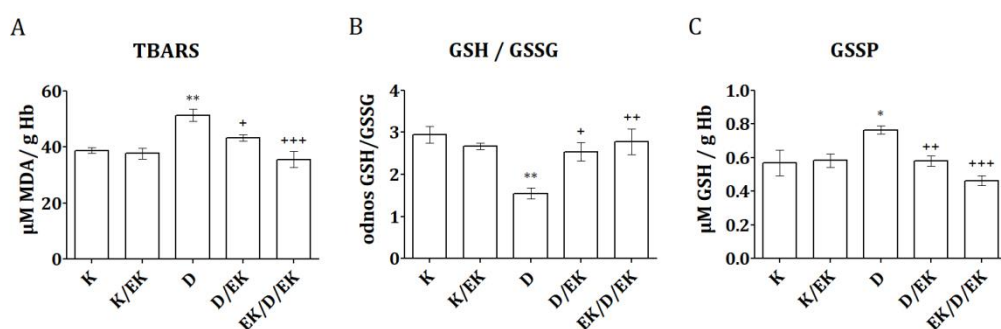


**Slika 4.4. Ekstrakt kičice (EK) smanjuje procese glikacije i glikozilacije proteina u serumu i eritrocitima dijabetičnih pacova.** (A) Efekat EK na nivo AGE-ova u serumu pacova. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± SEM (N=7); (B) Relativne promene u nivou CML-a u serumu pacova; (C) Efekat EK na nivo O-GlcNAc modifikovanih proteina u lizatima eritrocita. Prikazani su reprezentativni blotovi iz tri nezavisna eksperimenta. Intenzitet pozitivnih traka na imunoblotovima određen je pomoću TotalLab (Phoretix) programa. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (N=3) u odnosu na optičku gustinu kontrolnog uzorka koji je arbitrarno označen kao 1. AGE – krajnji proizvodi glikacije; CML - N(ε)-(karboksimetil)lizin; O-GlcNAc - β-N-acetilglukozamin; Coomassie – bojenje Coomassie plavim koje je služilo kao kontrola nanošenja uzoraka. K – kontrolna grupa; K/EK – kontrolna grupa tretirana ekstraktom; D – dijabetična grupa; D/EK – posttretirana grupa dijabetičnih životinja; EK/D/EK – pretretirana grupa dijabetičnih životinja. \*\*\* p < 0,001 u odnosu na K; \*\*\* p < 0,001 u odnosu na D. Preuzeto i modifikovano iz (Đorđević i sar., 2017).

#### 4.3.2.2. Analiza biomarkera oksidativnog stresa u eritrocitima

Stepen oksidativnog stresa u eritrocitima pacova ispitan je određivanjem nivoa lipidne peroksidacije, odnosa GSH/GSSG i određivanjem koncentracije S-glutationilovanih proteina (GSSP). Koncentracija MDA, kao jednog od pokazatelja lipidne peroksidacije, bila je povećana za 33% (p < 0,01) u eritrocitima dijabetičnih pacova u odnosu na K životinje (Slika 4.5.A). Primena ekstrakta snizila je koncentracije MDA i u posttretiranoj (za 16%; p < 0,05) i u pretretiranoj grupi dijabetičnih životinja (za 31%; p < 0,001) u odnosu na D životinje, dok kod K/EK

životinja nije uticala na promenu njegove koncentracije. U eritrocitima dijabetičnih životinja detektovan je pad odnosa GSH/GSSG (oko 2 puta;  $p < 0,01$ ) u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 4.5.B). Nakon tretmana ekstraktom odnos GSH/GSSG se vratio na kontrolni nivo kod obe grupe dijabetičnih životinja ( $p < 0,05$  za D/EK i  $p < 0,01$  za EK/D/EK). Nivo GSSP kod pacova sa dijabetesom bio je veći za 34% ( $p < 0,05$ ) u odnosu na K životinje (Slika 4.5.C). Tretman dijabetičnih pacova ekstraktom je značajno smanjio koncentracije GSSP u obe grupe ( $p < 0,01$  za D/EK i  $p < 0,001$  za EK/D/EK) i vratio ih na kontrolni nivo.

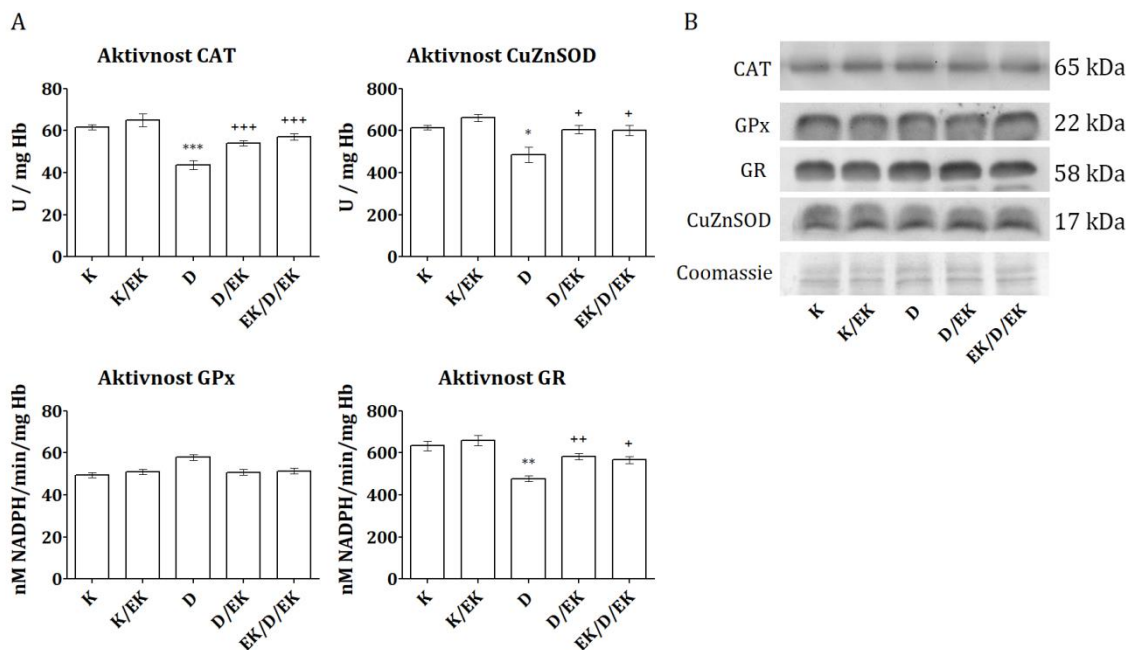


**Slika 4.5. Ekstrakt kičice (EK) smanjuje nivo oksidativnog stresa u eritrocitima dijabetičnih pacova.** (A) lipidna peroksidacija (TBARS); (B) odnos redukovano i oksidovanog glutaciona (GSH/GSSG); (C) nivo S-glutationilovanih proteina (GSSP) u lizatima eritrocita. K – kontrolna grupa; K/EK – kontrolna grupa tretirana ekstraktom; D – dijabetična grupa; D/EK – posttretirana grupa dijabetičnih životinja; EK/D/EK – pretretirana grupa dijabetičnih životinja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (N=7). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  u odnosu na K; +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na D. Preuzeto i modifikovano iz (Đorđević i sar., 2017).

#### 4.3.2.3. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima

Na Slici 4.6. prikazane su aktivnosti i relativni nivoi proteina enzima antioksidativne zaštite CAT, SOD, GPx i GR u eritrocitima pacova. U poređenju sa K životinjama, u eritrocitima dijabetičnih životinja detektovan je blagi porast u aktivnosti GPx (oko 17%), dok su aktivnosti ostalih enzima bile smanjene (Slika 4.6.A). Aktivnost CAT je bila niža za 40% ( $p < 0,001$ ), CuZnSOD za 26% ( $p < 0,05$ ), a GR za 33% ( $p < 0,01$ ). Tretman dijabetičnih pacova EK bio je praćen poboljšanjem aktivnosti enzima antioksidativne zaštite. U posttretiranoj grupi životinja aktivnost CAT se uvećala za 24% ( $p < 0,001$ ), aktivnost CuZnSOD za 25% ( $p < 0,05$ ), dok se aktivnost GR uvećala za 22% ( $p < 0,01$ ) u odnosu na aktivnosti zabeležene kod D životinja. U pretretiranoj grupi dijabetičnih životinja aktivnosti

CAT, CuZnSOD i GR uvećale su se za 31% ( $p < 0,001$ ), 24% ( $p < 0,05$ ), odnosno 19% ( $p < 0,05$ ) u odnosu na D životinje. Promene u aktivnosti enzima antioksidativne zaštite nisu bile praćene promenama na nivou proteina između eksperimentalnih grupa (Slika 4.6.B).



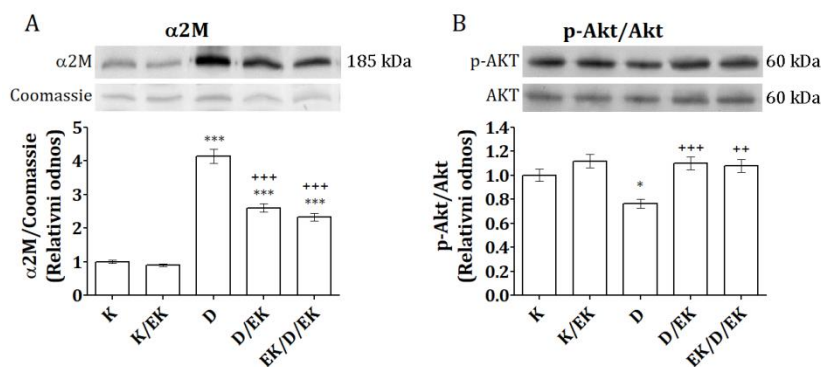
**Slika 4.6. Ekstrakt kičice (EK) moduliše aktivnost enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima dijabetičnih pacova.** (A) Aktivnost enzima antioksidativne zaštite i (B) njihov proteinski nivo u lizatima eritrocita. Prikazani su reprezentativni blotovi iz tri nezavisna eksperimenta. CAT – katalaza; CuZnSOD – bakar-cink superoksid dismutaza; GPx – glutation peroksidaza; GR – glutation reduktaza; Coomassie – bojenje Coomassie plavim koje je služilo kao kontrola nanošenja uzoraka. K – kontrolna grupa; K/EK – kontrolna grupa tretirana ekstraktom; D – dijabetična grupa; D/EK – posttretirana grupa dijabetičnih životinja; EK/D/EK – pretretirana grupa dijabetičnih životinja. Vrednosti za aktivnost enzima (A) su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (N=7). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na K; +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ , +++  $p < 0,001$  u odnosu na D. Preuzeto i modifikovano iz (Đorđević i sar., 2017).

#### 4.3.2.4. Nivo $\alpha 2$ -makroglobulina u serumu i aktivnost Akt kinaze u eritrocitima

U cilju ispitivanja uticaja primene EK na agregaciju eritrocita, ispitana je promena koncentracije  $\alpha 2$ -makroglobulina ( $\alpha 2M$ ) u serumu, za koji je utvrđeno da je u pozitivnoj korelaciji sa procesom agregacije (Torregiani i sar., 1995). U odnosu na kontrolne životinje, u serumu dijabetičnih pacova detektovan je porast nivoa  $\alpha 2M$  4,2 puta ( $p < 0,01$ ). Nakon tretmana ekstraktom, nivo  $\alpha 2M$  u serumu

posttretiranih životinja bio je 1,6 puta manji ( $p < 0,001$ ) od nivoa detektovanog u serumu D životinja, dok je kod posttretiranih bio manji 1,8 puta ( $p < 0,001$ ) (Slika 4.7.A).

Za pravilnu razmenu kiseonika i ugljen-dioksida u tkivima od ključnog značaja je sposobnost eritrocita da se provuku kroz uske kapilare, što je označeno kao deformabilitet eritrocita. Jedan od faktora uključenih u očuvanje deformabiliteta eritrocita jeste i aktivnost PI3-K/Akt signalnog puta (Suhr i sar., 2012). Imajući to u vidu ispitana je relativna promena prisustva i aktivnosti Akt kinaze imunoblot analizom lizata eritrocita specifičnim antitelima za ukupnu i fosforilisanu (aktivnu) formu Akt kinaze (Ser<sup>473</sup>) (Slika 4.7.B). Iako nije detektovana razlika u prisustvu Akt kinaze između eksperimentalnih grupa, aktivnost Akt kinaze, izražena preko odnosa p-Akt/Akt, u eritrocitima dijabetičnih pacova bila je smanjena za 32% ( $p < 0,05$ ) u odnosu na K grupu. Tretman ekstraktom očuvao je aktivnost Akt kinaze u obe grupe dijabetičnih životinja na nivou aktivnosti detektovane u eritrocitima K pacova.



**Slika 4.7. Efekat primene ekstrakta kičice (EK) na (A) prisustvo  $\alpha 2$ -makroglobulina ( $\alpha 2M$ ) i (B) stepen aktivnosti Akt kinaze (prikazan grafički kao odnos fosforilisane (p-Akt) i ukupne (Akt) forme proteina) u eritrocitima pacova.** Prikazani su reprezentativni blotovi iz tri nezavisna eksperimenta. Intenzitet pozitivnih traka na imunoblotovima određen je pomoću TotalLab (Phoretix) programa. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (N=3) u odnosu na optičku gustinu kontrolnog uzorka koji je arbitrarno označen kao 1. Coomassie – bojenje Coomassie plavim koje je služilo kao kontrola nanošenja uzoraka. K – kontrolna grupa; K/EK – kontrolna grupa tretirana ekstraktom; D – dijabetična grupa; D/EK – posttretirana grupa dijabetičnih životinja; EK/D/EK – pretretirana grupa dijabetičnih životinja. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na K; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na D. Preuzeto i modifikovano iz (Đorđević i sar., 2017).

#### **4.4. Antioksidativni efekat ekstrakta kičice u jetri i bubregu u uslovima dijabetesa**

Dugotrajna hiperglikemija i udruženi oksidativni stres u dijabetesu vremenom dovode do razvoja makro- i mikrovaskularnih komplikacija, poput hepatopatije i nefropatije, koje povećavaju stopu smrtnosti kod obolelih osoba. Pored toga što aktivira signalne puteve koji rezultuju povećanom produkcijom ROS-ova, hiperglikemija u dijabetesu narušava i mehanizme antioksidativne zaštite. Povećana količina ROS-ova direktno dovodi do oštećenja jetre i bubrega a utiče i na smanjenje dotoka kiseonika usled pojačanog sistemskog oksidativnog stresa i oštećenja eritrocita, što dodatno doprinosi oštećenju tkiva. Kako bi se ispitalo protektivno delovanje EK na progresiju oštećenja jetre i bubrega u dijabetesu, analizirani su parametri koji odražavaju poremećaj u funkcionisanju jetre i bubrega, markeri oksidativnog stresa kao i promene aktivnosti i ekspresije enzima antioksidativne zaštite ovih organa.

##### **4.4.1. Promena mase jetre i bubrega dijabetičnih pacova**

U Tabeli 4.4. prikazane su relativne promene masa jetre i bubrega u odnosu na telesnu masu životinja na kraju četvrte nedelje od tretmana STZ-om. Kod dijabetičnih životinja zabeležen je značajan porast relativnih masa jetre (72%;  $p < 0,001$ ) i bubrega (67%;  $p < 0,001$ ) u odnosu na odgovarajuće vrednosti koje su zabeležene kod K životinja. Primena EK kod dijabetičnih životinja smanjila je relativnu masu jetre i u posttretiranoj (za 17%;  $p < 0,01$ ) i u pretretiranoj grupi životinja (za 21%;  $p < 0,001$ ). Relativna masa bubrega u odnosu na D životinje nakon tretmana ekstraktom bila je značajno smanjena samo kod EK/D/EK životinja (za 31%;  $p < 0,01$ ).

**Tabela 4.4. Efekat ekstrakta kičice na relativne promene masa jetre i bubrega**

	K	K/EK	D	D/EK	EK/D/EK
N	7	7	7	7	7
jetra / t.m.	2,34 ± 0,01	2,24 ± 0,14	4,02 ± 0,15 ***	3,44 ± 0,16 **:++	3,33 ± 0,16 ***
bubreg / t.m.	0,66 ± 0,01	0,70 ± 0,05	1,10 ± 0,05 ***	0,96 ± 0,04 ***	0,84 ± 0,05 **

Telesne i mase organa su merene na kraju četvrte nedelje od izazivanja dijabetesa. jetra/t.m. – odnos mase jetre prema masi tela; bubreg/t.m. – odnos mase bubrega prema masi tela. K – kontrolna grupa; K/EK – kontrolna grupa tretirana ekstraktom; D – dijabetična grupa; D/EK – posttretirana grupa dijabetičnih životinja; EK/D/EK – pretretirana grupa dijabetičnih životinja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM za naznačeni broj životinja (N). \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 u odnosu na K; ++ p < 0,01, +++ p < 0,001 u odnosu na D.

#### 4.4.2. Analiza biohemijskih parametara oštećenja jetre i bubrega u serumu dijabetičnih pacova

Da bi se ispitao efekat EK na funkcionisanje jetre u uslovima dijabetesa analizirana je aktivnost aminotransferaza specifičnih za jetru – AST i ALT (Tabela 4.5). U odnosu na aktivnosti zabeležene u serumu K životinja, aktivnost AST u serumu dijabetičnih životinja bila je povećana 1,77 puta (p < 0,001) dok je aktivnost ALT bila povećana 4,75 puta (p < 0,001). Tretman ekstraktom nije značajno uticao na aktivnost aminotransferaza kod kontrolnih životinja, dok je kod dijabetičnih životinja uočen pad aktivnosti. Kod D/EK životinja aktivnost AST bila je niža 1,63 puta (p < 0,001) a ALT 2,26 puta (p < 0,001) u odnosu na D grupu. Pad aktivnosti aminotransferaza u odnosu na D grupu je kod EK/D/EK životinja bio izraženiji – aktivnost AST opala je 2,13 puta (p < 0,001) a ALT 4,2 puta (p < 0,001).

Efekat EK na funkcionisanje bubrega ispitan je praćenjem promena u koncentraciji BUN-a i kreatinina, produkata razgradnje proteina koji se uklanjaju iz krvi filtriranjem u bubrezima. Koncentracija BUN-a u serumu dijabetičnih životinja bila je 3 puta veća (p < 0,001) u odnosu na vrednosti kod K životinja, dok je koncentracija kreatinina bila povećana 1,8 puta (p < 0,001) (Tabela 4.5). Posttretman dijabetičnih pacova ekstraktom smanjio je koncentraciju BUN-a za 24% (p < 0,001) a kreatinina za 34% (p < 0,001). Pretretman je imao sličan efekat na koncentracije ispitivanih parametara – u odnosu na D životinje koncentracija BUN-a je bila umanjena za 26% (p < 0,001) a kreatinina za 55% (p < 0,001).

Ovi rezultati su ukazali da primena EK kod dijabetičnih pacova značajno poboljšava opšte stanje i funkcionisanje jetre i bubrega.

**Tabela 4.5. Ekstrakt kičice poboljšava parametre funkcionisanja jetre i bubrega kod dijabetičnih pacova**

	K	K/EK	D	D/EK	EK/D/EK
<b>N</b>	7	7	7	7	7
<b>AST (U/L)</b>	151,55 ± 4,48	170,13 ± 3,78	268,16 ± 9,68 <sup>***</sup>	164,50 ± 9,38 <sup>+++</sup>	125,67 ± 8,58 <sup>+++</sup>
<b>ALT (U/L)</b>	43,15 ± 1,83	56,67 ± 1,14	205,03 ± 14,92 <sup>***</sup>	90,86 ± 5,59 <sup>***,+++</sup>	48,80 ± 3,96 <sup>+++</sup>
<b>BUN (mmol/L)</b>	5,65 ± 0,09	5,55 ± 0,12	16,97 ± 0,16 <sup>***</sup>	13,72 ± 0,44 <sup>***,+++</sup>	13,42 ± 0,40 <sup>***,+++</sup>
<b>Kreatinin (μmol/L)</b>	26,00 ± 1,40	26,50 ± 1,70	47,00 ± 0,99 <sup>***</sup>	35,17 ± 1,81 <sup>**,+</sup>	30,25 ± 1,92 <sup>+++</sup>

AST – aspartat aminotransferaza; ALT – alanin aminotransferaza; BUN – eng. *blood urea nitrogen*. K – kontrolna grupa; K/EK – kontrolna grupa tretirana ekstraktom; D – dijabetična grupa; D/EK – posttretirana grupa dijabetičnih životinja; EK/D/EK – pretretirana grupa dijabetičnih životinja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM za naznačeni broj životinja (N). \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 u odnosu na K; +++p < 0,001 u odnosu na D.

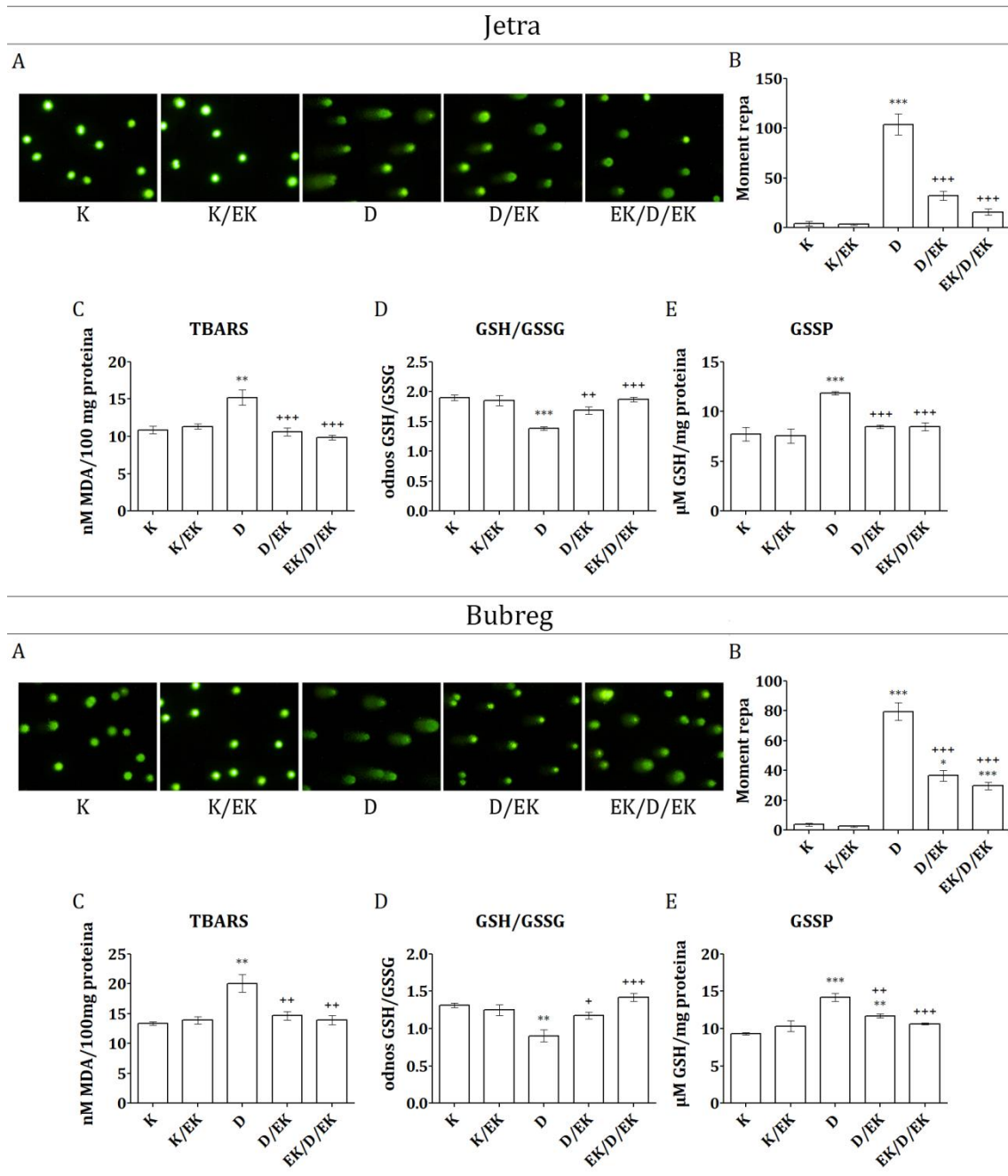
#### 4.4.3. Analiza oksidativnog oštećenja jetre i bubrega

U uslovima oksidativnog stresa dolazi do oštećenja molekula DNK, lipida i proteina u ćeliji. Stepenn oksidativnog oštećenja DNK u jetri i bubregu utvrđen je pomoću alkalnog komet eseja (Slika 4.8.A i 4.8.B). Većina analiziranih ćelija jetre i bubrega kontrolnih životinja imala je neoštećenu DNK, dok je kod dijabetičnih životinja uočeno značajno oštećenje DNK molekula. Količina oštećene DNK u repu komete u jetri dijabetičnih životinja bila je veća 24,3 puta (p < 0,001) u odnosu na K grupu, dok je u bubregu bila povećana 21,5 puta (p < 0,001). Tretman ekstraktom značajno je smanjio stepenn oksidativnog oštećenja DNK u obe dijabetične grupe. Analiza momenta repa komete pokazala je da EK smanjuje oštećenje DNK u jetri 3,25 puta (p < 0,001) kod D/EK životinja, odnosno 6,63 puta (p < 0,001) kod EK/D/EK životinja. Stepenn oštećenja DNK u bubregu smanjio se 2,18 puta (p < 0,001) kod D/EK grupe, odnosno 2,68 puta (p < 0,001) kod EK/D/EK grupe. U jetri i bubregu dijabetičnih životinja uočeno je i povećanje nivoa MDA (Slika 4.8.C). U poređenju sa K grupom, nivo MDA u jetri D pacova bio je povećan 1,4 puta (p < 0,01) dok je u bubregu bio veći 1,5 puta (p < 0,01). Tretman

ekstraktom je redukovao nivo lipidne peroksidacije u jetri i bubregu dijabetičnih životinja do nivoa zabeleženog kod K životinja i u posttretiranoj i u pretretiranoj grupi životinja.

U jetri dijabetičnih pacova uočen je pad odnosa GSH/GSSG za 38% ( $p < 0,001$ ) u odnosu na kontrolne jedinke. U bubregu je takođe zabeležen smanjen odnos GSH/GSSG (za 45%;  $p < 0,01$ ). Tretman ekstraktom je bio praćen povećanjem odnosa GSH/GSSG u jetri i bubregu obe pre- i posttretirane dijabetične grupe do nivoa koji su bliski GSH/GSSG odnosu zabeleženom kod K životinja. Kod dijabetičnih životinja zabeležen je i porast u nivou GSSP u odnosu na K grupu – za 54% u jetri ( $p < 0,001$ ) i za 53% u bubregu ( $p < 0,001$ ). Primena ekstrakta snizila je nivo GSSP i u jetri i u bubrežima obe grupe dijabetičnih životinja.





**Slika 4.8. Ekstrakt kičice (EK) smanjuje stepen oksidativnog oštećenja jetre i bubrega dijabetičnih pacova.** (A) Reprerativne slike oštećenja DNK u jetri (gore) i bubregu (dole) utvrđenog pomoću alkalnog komet eseja; (B) Step en oštećenja DNK je procenjen preko momenta repa komete. Kvantifikacija momenta repa komete je urađena upotrebom kompjuterskog programa TriTekCometScore™Freeware v1.5; (C) lipidna peroksidacija (TBARS); (D) odnos redukovano i oksidovanog glutationa (GSH/GSSG); (E) nivo S-glutationilovanih proteina (GSSP) u homogenatima jetre i bubrega. K – kontrolna grupa; K/EK – kontrolna grupa tretirana ekstraktom; D – dijabetična grupa; D/EK – posttretirana grupa dijabetičnih životinja; EK/D/EK – pretretirana grupa dijabetičnih životinja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (N=7). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na K; +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ , +++  $p < 0,001$  u odnosu na D.

#### 4.4.4. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u jetri i bubregu

U Tabeli 4.6. prikazane su razlike u aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u jetri i bubregu između eksperimentalnih grupa. U jetri dijabetičnih životinja zabeležen je pad u aktivnosti svih ispitivanih enzima u odnosu na odgovarajuće aktivnosti zabeležene kod K životinja. Aktivnost CAT bila je niža za 61% ( $p < 0,001$ ), GPx za 13% ( $p < 0,01$ ), GR za 22% ( $p < 0,01$ ), MnSOD za 67% ( $p < 0,001$ ), dok je aktivnost CuZnSOD opala za 64% ( $p < 0,001$ ). Tretman ekstraktom povećao je aktivnosti ispitivanih enzima u jetri kod obe grupe dijabetičnih životinja. Kod D/EK životinja aktivnost CAT porasla je za 35% ( $p < 0,01$ ), GR za 18% ( $p < 0,05$ ), dok su aktivnosti MnSOD i CuZnSOD bile povećane za 44% ( $p < 0,05$ ), odnosno za 57% ( $p < 0,001$ ). U poređenju sa D grupom, aktivnosti CAT, GPx, GR, MnSOD i CuZnSOD u jetri EK/D/EK životinja porasle su, redom, za 37% ( $p < 0,01$ ), 22% ( $p < 0,001$ ), 30% ( $p < 0,001$ ), 42% ( $p < 0,05$ ) i 51% ( $p < 0,01$ ).

**Tabela 4.6. Efekat ekstrakta kičice (EK) na aktivnost enzima antioksidativne zaštite u jetri i bubregu**

	K	K/EK	D	D/EK	EK/D/EK
<b>Jetra</b>					
<b>CAT<sup>a</sup></b>	300,4 ± 11,7	301,7 ± 17,7	186,7 ± 10,1 <sup>***</sup>	251,8 ± 9,5 <sup>++</sup>	256,4 ± 10,1 <sup>++</sup>
<b>GPx<sup>a</sup></b>	527,9 ± 6,8	510,1 ± 9,2	465,8 ± 7,8 <sup>**</sup>	509,5 ± 11,1	568,3 ± 20,0 <sup>+++</sup>
<b>GR<sup>a</sup></b>	75,3 ± 1,0	77,5 ± 1,2	61,6 ± 2,5 <sup>**</sup>	73,0 ± 2,7 <sup>+</sup>	80,0 ± 3,5 <sup>+++</sup>
<b>MnSOD<sup>a</sup></b>	9,6 ± 0,6	10,3 ± 0,7	5,8 ± 0,4 <sup>***</sup>	8,3 ± 0,4 <sup>+</sup>	8,2 ± 0,3 <sup>+</sup>
<b>CuZnSOD<sup>a</sup></b>	34,5 ± 1,8	32,8 ± 2,1	21,0 ± 1,5 <sup>***</sup>	32,9 ± 2,2 <sup>+++</sup>	31,8 ± 1,6 <sup>++</sup>
<b>Bubreg</b>					
<b>CAT<sup>a</sup></b>	104,7 ± 2,3	106,8 ± 3,0	70,8 ± 1,7 <sup>***</sup>	85,7 ± 1,7 <sup>***;+++</sup>	92,2 ± 1,9 <sup>**;+++</sup>
<b>GPx<sup>a</sup></b>	262,3 ± 1,9	285,3 ± 7,4	433,6 ± 11,6 <sup>***</sup>	355,5 ± 8,7 <sup>***;+++</sup>	350,8 ± 19,8 <sup>***;+++</sup>
<b>GR<sup>a</sup></b>	59,6 ± 2,0	62,4 ± 3,2	86,2 ± 4,0 <sup>***</sup>	71,2 ± 4,0 <sup>+</sup>	72,0 ± 1,4 <sup>+</sup>
<b>MnSOD<sup>a</sup></b>	5,5 ± 0,2	5,5 ± 0,1	3,8 ± 0,1 <sup>***</sup>	4,7 ± 0,3 <sup>+</sup>	5,0 ± 0,2 <sup>++</sup>
<b>CuZnSOD<sup>a</sup></b>	22,1 ± 1,1	23,3 ± 0,6	15,5 ± 0,6 <sup>***</sup>	20,5 ± 1,3 <sup>+</sup>	22,6 ± 1,2 <sup>+++</sup>

<sup>a</sup> – U/mg proteina. CAT – katalaza; GPx – glutation peroksidaza; GR – glutation reduktaza; MnSOD – mangan superoksid dismutaza; CuZnSOD – bakar-cink superoksid dismutaza. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM (N=7). K – kontrolna grupa; K/EK – kontrolna grupa tretirana ekstraktom; D – dijabetična grupa; D/EK – posttretirana grupa dijabetičnih životinja; EK/D/EK – pretretirana grupa dijabetičnih životinja. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na K; +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ , +++  $p < 0,001$  u odnosu na D.

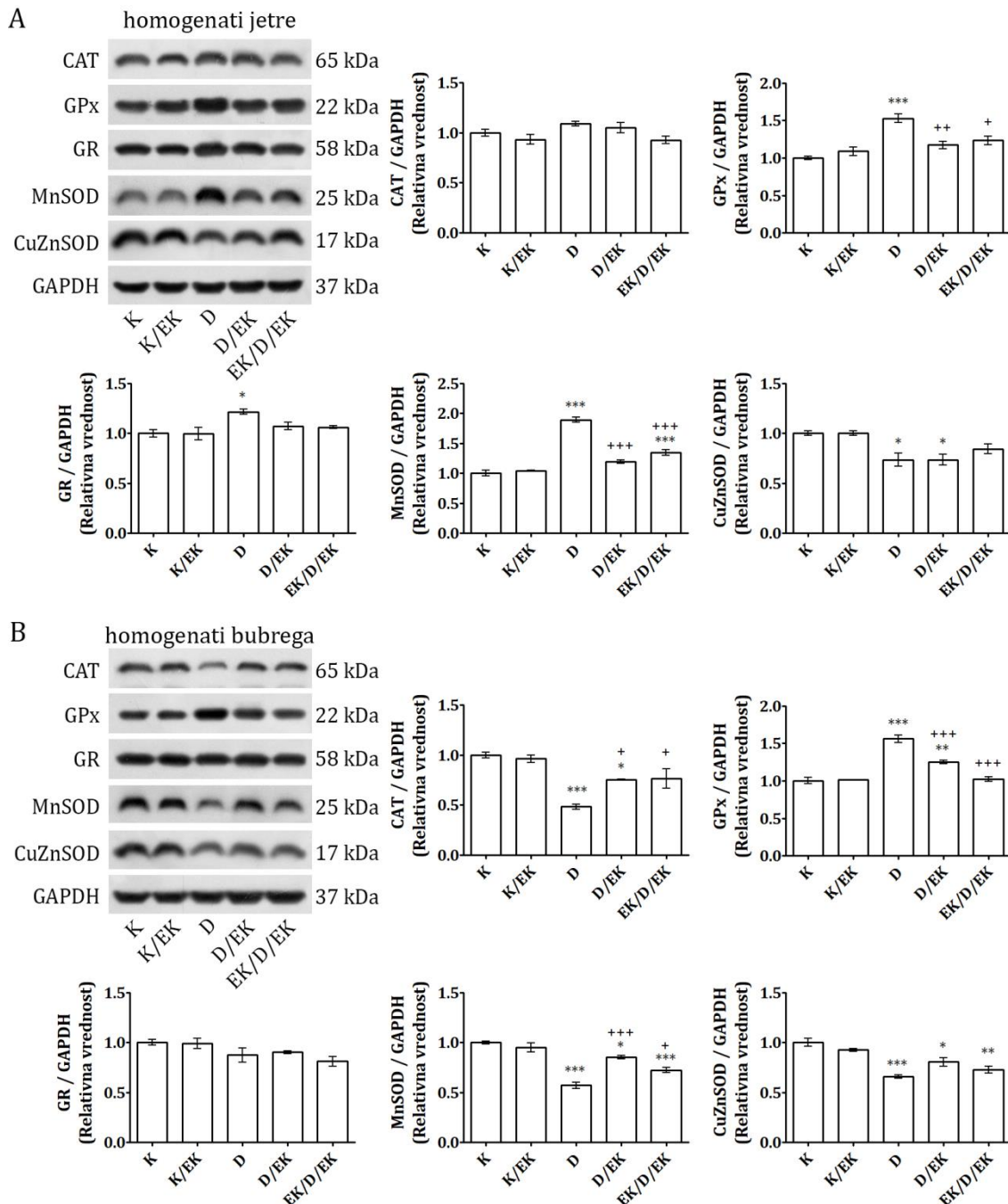
Pored promena u aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u jetri uočene su i promene na nivou proteina. Imunoblot analizom homogenata jetre dijabetičnih pacova zabeleženo je povećanje nivoa proteina GR (za 22%;  $p < 0,05$ ), GPx (za 53%;  $p < 0,001$ ) i MnSOD (za 89%;  $p < 0,001$ ), kao i smanjenje nivoa CuZnSOD (za 27%;  $p < 0,05$ ) u odnosu na K grupu, dok je nivo CAT ostao nepromenjen (Slika 4.9.A). Primena ekstrakta kod dijabetičnih životinja smanjila je značajno nivo GPx (za 23% kod D/EK životinja;  $p < 0,01$ , odnosno za 19% kod EK/D/EK životinja;  $p < 0,05$ ) i MnSOD (za 37% kod D/EK životinja;  $p < 0,001$ , odnosno za 29% kod EK/D/EK životinja;  $p < 0,001$ ). Kod obe grupe dijabetičnih životinja tretiranih ekstraktom zabeleženo je smanjenje nivoa GR (oko 12%) koje nije bilo statistički značajno, dok je nivo CuZnSOD u poređenju sa D životinjama bio blago povećan (oko 15%) kod EK/D/EK životinja.

Promene u aktivnosti i nivou proteina enzima antioksidativne zaštite zabeležene su i u bubrezima dijabetičnih životinja. U poređenju sa K životinjama, aktivnost CAT opala je za 48% ( $p < 0,001$ ), MnSOD za 45% ( $p < 0,001$ ) a CuZnSOD za 43% ( $p < 0,01$ ) (Tabela 4.6.). Sa druge strane, aktivnost GPx u bubrezima D životinja je porasla za 65% ( $p < 0,001$ ), dok je aktivnost GR porasla za 45% ( $p < 0,001$ ) u poređenju sa K grupom. Posttretman ekstraktom doveo je do porasta aktivnosti CAT, MnSOD i CuZnSOD u bubrezima dijabetičnih životinja za 21% ( $p < 0,001$ ), 24% ( $p < 0,05$ ) i 33% ( $p < 0,05$ ), redom. Pretretman ekstraktom je imao veći efekat na aktivnost enzima, pa se, u odnosu na odgovarajuće aktivnosti zabeležene kod D životinja, aktivnost CAT u bubrezima EK/D/EK životinja povećala za 30% ( $p < 0,01$ ), MnSOD za 33% ( $p < 0,01$ ) a CuZnSOD za 46% ( $p < 0,001$ ). Tretman dijabetičnih životinja ekstraktom imao je efekat i na aktivnost GPx i GR. U poređenju sa D grupom, aktivnost GPx kod D/EK i EK/D/EK pacova opala je za 22% ( $p < 0,001$ ), odnosno 24% ( $p < 0,001$ ), dok je aktivnost GR kod obe grupe dijabetičnih životinja tretiranih ekstraktom opala za oko 20% ( $p < 0,05$ ).

Nivo proteina CAT u bubrezima dijabetičnih životinja opao je za 52% ( $p < 0,001$ ) u poređenju sa K životinjama (Slika 4.9B). U bubrezima D životinja uočen je i pad u nivou MnSOD (za 43%;  $p < 0,001$ ) i CuZnSOD (za 34%;  $p < 0,001$ ). Nivo GPx proteina bio je uvećan za 56% ( $p < 0,001$ ) u odnosu na K grupu, dok je nivo GR bio nepromenjen. Tretman dijabetičnih životinja ekstraktom značajno je

povećao nivo CAT (za 55% kod D/EK životinja;  $p < 0,05$ , odnosno za 58% kod EK/D/EK životinja;  $p < 0,05$ ) i MnSOD (za 49% kod D/EK životinja;  $p < 0,001$ , odnosno za 27% kod EK/D/EK životinja;  $p < 0,05$ ), ali i smanjio nivo GPx (za 25% kod D/EK životinja;  $p < 0,001$ , odnosno za 53% kod EK/D/EK životinja;  $p < 0,001$ ).

Kod kontrolnih životinja tretiranih EK nije zabeležena promena u aktivnosti i nivou proteina ni u jetri ni u bubrezima.



**Slika 4.9. Imunoblot analiza proteina homogenata jetre (A) i bubrega (B) na prisustvo enzima antioksidativne zaštite.** Prikazani su reprezentativni blotovi iz tri nezavisna eksperimenta. Grafički prikaz relativnog nivoa proteina enzima antioksidativne zaštite u odnosu na GAPDH. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM u odnosu na optičku gustinu kontrolnog uzorka koji je arbitrarno označen kao 1. CAT – katalaza; GPx – glutation peroksidaza; GR – glutation reduktaza; MnSOD – mangan superoksid dismutaza; CuZnSOD – bakar-cink superoksid dismutaza; GAPDH – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza. K – kontrolna grupa; K/EK – kontrolna grupa tretirana ekstraktom; D – dijabetična grupa; D/EK – posttretirana grupa dijabetičnih životinja; EK/D/EK – pretretirana grupa dijabetičnih životinja. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na K; +  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na D.

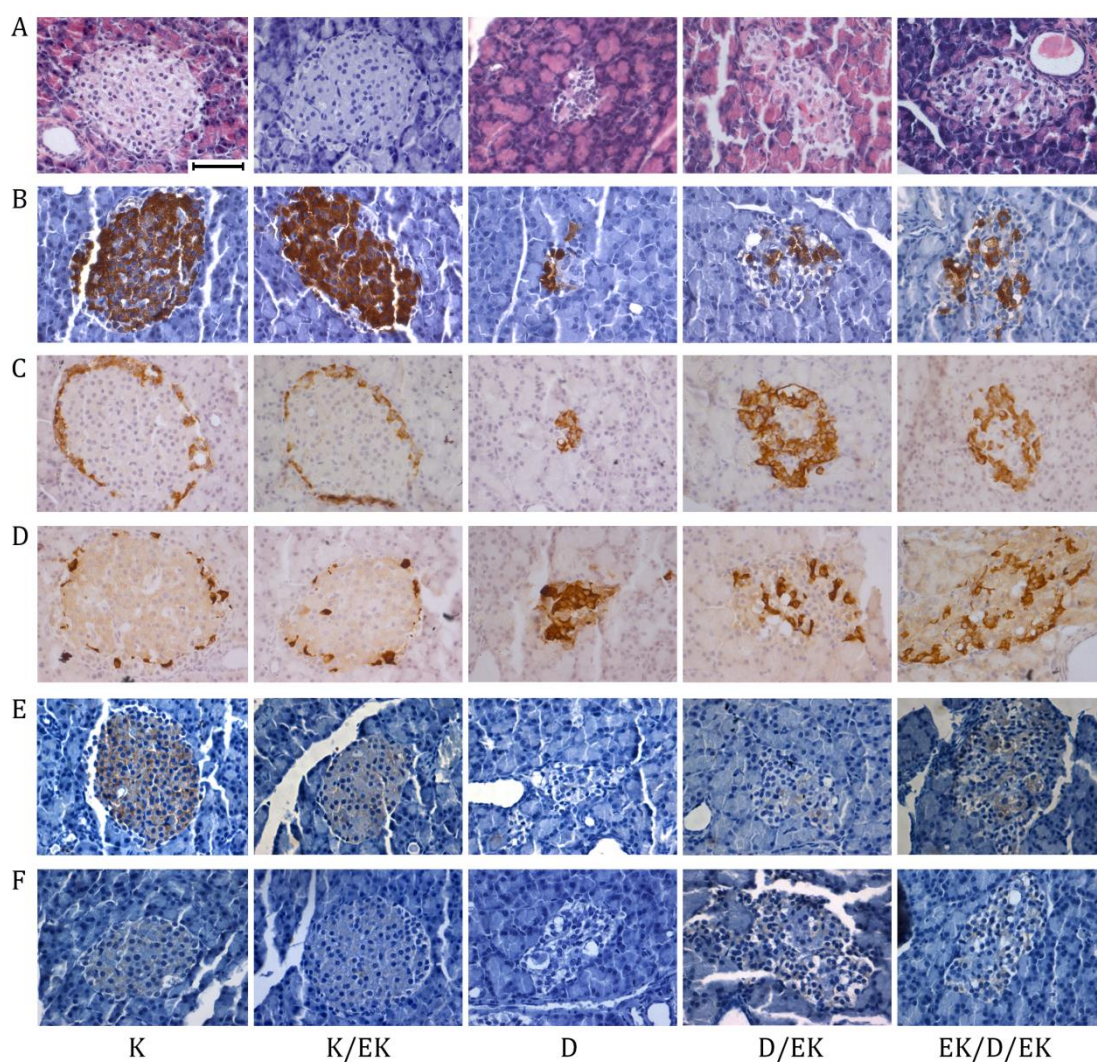
#### **4.5. Uticaj ekstrakta kičice na $\beta$ -ćelije pankreasa u uslovima dijabetesa**

Dijabetes se karakteriše progresivnim gubitkom broja i funkcije  $\beta$ -ćelija pankreasa. Hronična hiperglikemija preko različitih mehanizama narušava sintezu i sekreciju insulina i preživljavanje  $\beta$ -ćelija i doprinosi postojanom pogoršanju funkcionisanja  $\beta$ -ćelija i kontroli metabolizma obolelih osoba (Robertson, 2004).

##### **4.5.1. Analiza strukturnih i funkcionalnih parametara Langerhansovih ostrvaca dijabetičnih pacova**

Histološka analiza Langerhansovih ostrvaca pacova prikazana je na slici 4.10.A. Na rutinski, hematoksilinom i eozinom obojenim presecima pankreasa kontrolnih životinja uočava se da su svetlije obojena Langerhansova ostrvca bila tipičnog ovalnog ili izduženog oblika, okružena tankom vezivnom opnom i odvojena od egzokrinog pankreasa. U poređenju sa kontrolnim životinjama, Langerhansova ostrvca dijabetičnih pacova bila su nepravilnog oblika, manja po veličini i broju, a uočen je i manji broj ćelija prisutnih u ostrvcima. Morfologija ostrvaca kod post- i pretretiranih životinja bila je više nalik ostrvcima kontrolnih životinja što ukazuje na protektivni efekat EK. Ovi rezultati u skladu su sa prisustvom i raspodelom  $\beta$ -,  $\alpha$ - i  $\delta$ -ćelija u ostrvcima detektovanim nakon imunohistohemijskog bojenja preseka pankreasa antitelima na insulin, glukagon i somatostatin. Za razliku od kontrolnih ostrvaca, gde je uočen ravnomeran raspored  $\beta$ -ćelija, u ostrvcima dijabetičnih pacova uočen je poremećen raspored i značajno manji broj ćelija pozitivnih na insulin (Slika 4.10.B). Nakon tretmana ekstraktom detektovano je povećanje broja ćelija pozitivnih na insulin u centralnom regionu ostrvaca dijabetičnih pacova, naročito u pretretiranoj grupi.

Kao što se može videti na slici 4.10.C, kod kontrolnih životinja  $\alpha$ -ćelije su bile organizovane u grupe na obodu ostrvaca, dok su kod dijabetičnih životinja bile smeštene u centralnom delu. Nakon primene ekstrakta lokalizacija  $\alpha$ -ćelija se pomerila ka obodu ostrvaca, što se naročito uočava kod pretretiranih životinja. Većina  $\delta$ -ćelija pozitivnih na somatostatin bila je raspoređena na periferiji ostrvaca kontrolnih životinja, sa malim brojem ćelija prisutnih u centralnom delu (Slika 4.10.D). Kod dijabetičnih životinja uočena je centralna lokalizacija ćelija pozitivnih na somatostatin, dok su kod dijabetičnih životinja tretiranih ekstraktom  $\delta$ -ćelije bile raspoređene po obodu ostrvaca.



**Slika 4.10. Ekstrakt kičice (EK) poboljšava strukturu i funkcionisanje endokrino pankreasa.** (A) Histološki izgled Langerhansovih ostrvaca pankreasa pacova (bojenje hematoxilinom i eozinom, uveličanje 40x). Imunohistohemijaska analiza prisustva insulina (B), glukagona (C), somatostatina (D), GLUT-2 (E) i p-Akt (F) u Langerhansovim ostrvcima

pankreasna pacova (uveličanje 40x). Bar 50  $\mu\text{m}$ . K – kontrolna grupa; K/EK – kontrolna grupa tretirana ekstraktom; D – dijabetična grupa; D/EK – posttretirana grupa dijabetičnih životinja; EK/D/EK – pretretirana grupa dijabetičnih životinja. Preuzeto i modifikovano iz (Đorđević i sar., 2019).

U Langerhansovim ostrvcima kontrolnih životinja uočena je ravnomerna distribucija ćelija pozitivnih na transporter glukoze GLUT-2 koja se podudara sa distribucijom  $\beta$ -ćelija (Slika 4.10.E). Iako kod dijabetičnih životinja nije uočeno prisustvo GLUT-2 transportera, imunohistohemijsko bojenje preseka pankreasa dijabetičnih životinja tretiranih ekstraktom dalo je pozitivan signal na GLUT-2 u centralnoj regiji ostrvaca, naročito u pretretiranoj grupi. Imunohistohemijska analiza pankreasa kontrolnih životinja pokazala je prisustvo aktivirane fosforilisane forme Akt kinaze (p-Akt) ravnomerno raspoređene duž ostrvaca (Slika 4.10.F). Dok u ostrvcima dijabetičnih pacova nije uočeno prisustvo p-Akt, tretman dijabetičnih životinja EK očuvao je prisustvo p-Akt u ostrvcima na nivou uporedivim sa kontrolnim životinjama.

Pozitivan efekat tretmana EK na pokazatelje strukturnih i funkcionalnih karakteristika endokrinog pankreasa kod dijabetičnih pacova otvorio je mogućnost ispitivanja molekularnih mehanizama protektivnog dejstva ekstrakta u  $\beta$ -ćelijama.

#### **4.5.2. Molekularni mehanizmi antioksidativnog i protektivnog dejstva ekstrakta kičice u $\beta$ -ćelijama**

Ispitivanje molekularnih mehanizama antioksidativnog i protektivnog dejstva EK urađeno je *in vitro*, na Rin-5F (ATCC® CRL-2058™) ćelijskoj liniji insulinoma  $\beta$ -ćelija pacova. Ove ćelije se karakterišu aktivnom sintezom i sekrecijom insulina, i kao jedna od najčešće korišćenih  $\beta$ -ćelijskih linija u istraživanjima dijabetesa predstavljaju veoma značajno oruđe za proučavanje patoloških procesa u ćeliji i dejstva potencijalnih lekova za tretman dijabetesa (Dinić i sar., 2013b). Važno je istaći da ćelijske linije kao čista populacija ćelija omogućavaju doslednost u radu i dobijanje reproducibilnih rezultata (Kaur i Dufour, 2012).

Protektivni efekti ekstrakta kičice analizirani su nakon tretmana Rin-5F ćelija  $\text{H}_2\text{O}_2$ , natrijum nitroprusidom (SNP) i streptozotocinom (STZ) koji izazivaju oksidativni stres i oštećenja  $\beta$ -ćelija putem različitih mehanizama Vodoni

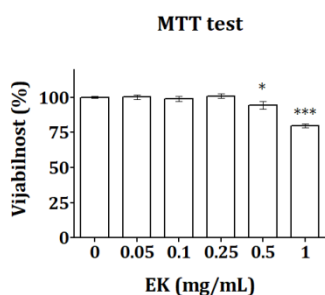
peroksid direktno dovodi do oksidacije lipida, proteina i molekula DNK u ćeliji a takođe predstavlja izvor izuzetno reaktivnog HO•. SNP ili nitrofericijanid (Na<sub>2</sub>[NO-Fe(CN)<sub>5</sub>]) je hidrosolubilno kompleksno jedinjenje koje se klinički koristi kao vazodilatator u tretmanu hipertenzije. U vodenom rastvoru SNP-a oslobađa se NO• pa se u istraživanjima najčešće koristi za ispitivanje citotoksičnog efekta izazvanog nitrozativnim stresom. Međutim, iako je NO• farmakološki aktivna komponenta ovog jedinjenja, SNP takođe pokreće i proizvodnju ROS-ova, naročito HO• preko Fentonove reakcije (Cardaci i sar., 2008). STZ je prirodni derivat nitrozouree koji se najčešće koristi za izazivanje eksperimentalnog modela dijabetesa kod životinja. Kao analog glukoze STZ se selektivno akumulira u β-ćelijama posredstvom GLUT-2 transportera i dovodi do alkilacije i fragmentacije DNK molekula (Lenzen, 2008). Oštećenje DNK molekula aktivira proces reparacije DNK i dovodi do pojačane defosforilacije ATP-a što povećava količinu supstrata za ksantin oksidazu i posledičnog formiranja ROS-ova (•O<sub>2</sub><sup>-</sup>, HO•). Pored toga, STZ oslobađa i NO koji dodatno doprinosi formiranju RNS vrsta (NO• i ONOO<sup>-</sup>) i oštećenju DNK molekula (Dinić i sar., 2013b). U cilju rasvetljavanja molekularnih mehanizama antioksidativnog i protektivnog dejstva EK u uslovima oksidativnog stresa izazvanog delovanjem različitih prooksidanasa, analizirani su preživljavanje i funkcionalnost (produkcija insulina) ćelija kao i stepen oksidativnog stresa praćenjem oštećenja DNK, lipida i proteina i analizom ekspresije i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite (CAT, GPx, GR, MnSOD, CuZnSOD) nakon tretmana Rin-5F ćelija svakim od navedenih agenasa.

#### 4.5.2.1. Ispitivanje citotoksičnog efekta ekstrakta kičice

Imajući u vidu činjenicu da svaki lek u određenoj količini može imati štetno dejstvo, najpre je ispitana citotoksičnost EK. Rin-5F ćelije su tretirane rastućim koncentracijama EK (0,05; 0,1; 0,25; 0,5 i 1 mg/mL) čija je *in vitro* antioksidativna aktivnost prethodno određena (Slika 4.3) i nakon 24h je urađen MTT test vijabilnosti. Kao što se može videti na slici 4.11. primena EK u nižim koncentracijama (0,05; 0,1 i 0,25 mg/mL) nije uticala na preživljavanje Rin-5F ćelija dok su koncentracije EK 0,5 i 1 mg/mL smanjile procenat preživelih ćelija za 6% (p < 0,05), odnosno za 20% (p < 0,001). Stoga su za dalje ispitivanje pozitivnog



efekta EK u uslovima oksidativnog stresa izazvanog primenom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SNP-a i STZ-a odabrane netoksične koncentracije ekstrakta.



**Slika 4.11. Citotoksični efekat ekstrakta kičice (EK) na Rin-5F ćelije.** MTT test preživljavanja nakon tretmana Rin-5F ćelija rastućim koncentracijama EK u trajanju od 24h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM iz minimum tri nezavisna eksperimenta. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na kontrolne ćelije (0 mg/mL). Preuzeto i modifikovano iz (Đorđević i sar., 2019).

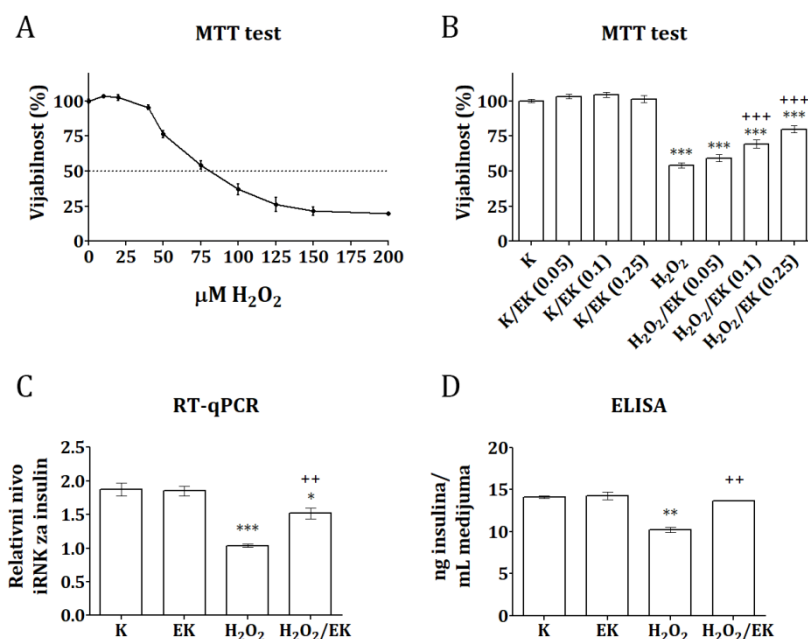
4.5.2.2. Ispitivanje protektivnog efekta ekstrakta kičice na Rin-5F ćelije u uslovima oksidativnog stresa izazvanog primenom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

4.5.2.2.1. Preživljavanje i funkcionalnost Rin-5F ćelija nakon tretmana H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Efekat EK na preživljavanje  $\beta$ -ćelija nakon tretmana H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utvrđen je upotrebom MTT testa. Tretmanom Rin-5F ćelija rastućim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u trajanju od 3h utvrđena je IC<sub>50</sub> doza za H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (75  $\mu$ M) koja je korišćena u svim narednim eksperimentima (Slika 4.12.A). Nakon tretmana ćelija IC<sub>50</sub> dozom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u kombinaciji sa netoksičnim koncentracijama EK zabeleženo je povećanje procenta preživelih ćelija u odnosu na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tretman (Slika 4.12.B). Neznatno povećanje je uočeno sa primenom EK u koncentraciji 0,05 mg/mL (5%), dok su koncentracije EK od 0,1 i 0,25 mg/mL povećale broj preživelih ćelija za 15% ( $p < 0,001$ ), odnosno 26% ( $p < 0,001$ ). S' obzirom da je najveće poboljšanje uočeno nakon primene EK u koncentraciji 0,25 mg/mL, za sve dalje eksperimente korišćena je kombinacija 75  $\mu$ m H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 0,25 mg/mL EK.

Imajući u vidu da Rin-5F ćelije karakteriše aktivna sinteza i sekrecija insulina, efekat EK na funkcionalnost ćelija nakon tretmana H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ispitan je određivanjem nivoa iRNK za insulin primenom RT-qPCR metode i ispitivanjem nivoa insulina oslobođenog u medijum u kome su ćelije gajene primenom ELISA metode (Slika 4.12.C i D). Tretman H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> smanjio je nivo iRNK za insulin (*Ins1* gen)

za oko 45% ( $p < 0,001$ ) u odnosu na nivo iRNK uočen kod kontrolnih ćelija. Kotretman ćelija  $H_2O_2$ /EK povećao je nivo iRNK za insulin u odnosu na  $H_2O_2$ -tretirane ćelije za oko 46% ( $p < 0,01$ ). Takođe, tretman  $H_2O_2$  smanjio je nivo oslobođenog insulina za oko 28% ( $p < 0,01$ ), dok je primenom ekstrakta nivo oslobođenog insulina vraćen na kontrolnu vrednost. Kod kontrolnih ćelija tretiranih ekstraktom nije bilo promene u ekspresiji gena i nivou oslobođenog insulina.



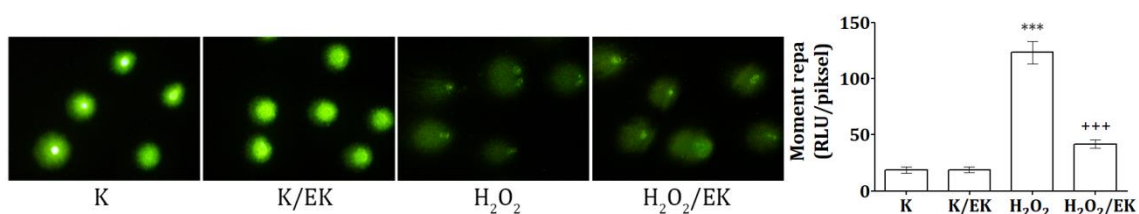
**Slika 4.12. Ekstrakt kičice (EK) povećava preživljavanje i funkcionalnost Rin-5F ćelija tretiranih vodonik peroksidom ( $H_2O_2$ ).** (A) MTT test preživljavanja nakon tretmana Rin-5F ćelija rastućim koncentracijama  $H_2O_2$  u trajanju od 3h. (B) MTT test preživljavanja nakon kotretmana Rin-5F ćelija  $75 \mu M H_2O_2$  ( $IC_{50}$  doza) i netoksičnim koncentracijama EK. (C) Kvantitativna RT-PCR analiza iRNK za insulin u Rin-5F ćelijama nakon kotretmana  $75 \mu M H_2O_2$  i  $0,25 \text{ mg/mL}$  EK. (D) Nivo insulina oslobođenog u medijumu nakon kotretmana Rin-5F ćelija  $75 \mu M H_2O_2$  i  $0,25 \text{ mg/mL}$  EK. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM iz minimum tri nezavisna eksperimenta. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na kontrolne ćelije (K); \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  za kotretman  $H_2O_2$ /EK u odnosu na  $H_2O_2$ .

#### 4.5.2.2.2. Analiza parametara oksidativnog stresa u Rin-5F ćelijama nakon tretmana $H_2O_2$

Za utvrđivanje efekta EK na stepen oksidativnog oštećenja Rin-5F ćelija u uslovima oksidativnog stresa izazvanog primenom  $H_2O_2$ , ćelije su tretirane  $75 \mu M H_2O_2$  u prisustvu/odsustvu EK i nakon 3h ispitani su nivoi oštećenja DNK

(Slika 4.13), lipidne peroksidacije i GSSP-a, odnos GSH/GSSG i aktivnost enzima CAT, GPx, GR, MnSOD i CuZnSOD (Tabela 4.7).

Količina DNK u repu komete kod ćelija tretiranih H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> povećala se 6,6 puta (p < 0,001) u odnosu na kontrolne ćelije, dok je primena EK smanjila oštećenje DNK 2,9 puta (p < 0,001). U odnosu na kontrolne ćelije, koncentracija MDA i GSSP-a u H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-tretiranim ćelijama povećala se 2,3 (p < 0,001), odnosno 3,2 puta (p < 0,001). Pored toga, odnos GSH/GSSG u ćelijama tretiranim H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> opao je za oko 39% (p < 0,01). EK je poboljšao parametre oksidativnog stresa, budući da su koncentracije MDA i GSSP-a bile umanjene za 49% (p < 0,001), odnosno za 55% (p < 0,001) u odnosu na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-tretirane ćelije, dok je odnos GSH/GSSG u kotretiranim ćelijama bio na nivou kontrolnih ćelija (p < 0,001 u odnosu na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-tretman).



**Slika 4.13. Ekstrakt kičice (EK) smanjuje oštećenje DNK u Rin-5F ćelijama tretiranim vodonik peroksidom (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).** Stepen oštećenja DNK u ćelijama utvrđen je primenom alkalnog komet eseja, uz primenu momenta repa komete kao parametra oštećenja. Prikazane su reprezentativne slike kometa iz tri nezavisna eksperimenta. Prisustvo DNK u repu komete je određeno upotrebom TriTekCometScore™Freeware (v.1.5) programa i prikazano grafički kao srednja vrednost ± SEM. K – kontrolne ćelije; K/EK – kontrolne ćelije tretirane EK (0,25 mg/mL) u trajanju od 3h; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – ćelije tretirane 75 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u trajanju od 3h; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/EK – ćelije kotretirane 75 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 0,25 mg/mL EK u trajanju od 3h. \*\*\* p < 0,001 u odnosu na K; +++ p < 0,001 za kotretman H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/EK u odnosu na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u Rin-5F ćelijama nakon 3h tretmana H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u prisustvu/odsustvu EK praćena je spektrofotometrijskim metodama. U odnosu na kontrolne ćelije aktivnost CAT, MnSOD i CuZnSOD u H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-tretiranim ćelijama porasla je za 32% (p < 0,01), 51% (p < 0,001) i 48% (p < 0,001), dok je aktivnost GPx i GR opala za 30% (p < 0,05), odnosno 23% (p < 0,001). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/EK kotretman smanjio je aktivnost CAT i CuZnSOD u poređenju sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tretmanom za oko 17% (p < 0,05) i povećao aktivnost GPx i GR za 40% (p < 0,05), odnosno 20% (p < 0,05). Sa druge strane, zabeleženi pad aktivnosti

MnSOD nakon H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/EK kotretmana za 15% u poređenju sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tretmanom nije bio statistički značajan.

**Tabela 4.7. Opšti parametri oksidativnog stresa u Rin-5F ćelijama tretiranim H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

	C	K/EK	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /EK
<b>TBARS<sup>a</sup></b>	23,73 ± 1,19	29,58 ± 1,48	54,07 ± 2,70 <sup>***</sup>	35,45 ± 1,77 <sup>*,+++</sup>
<b>GSH/GSSG</b>	23,15 ± 1,16	24,01 ± 1,2	14,16 ± 0,71 <sup>**</sup>	24,97 ± 1,25 <sup>+++</sup>
<b>GSSP<sup>b</sup></b>	48,69 ± 2,43	30,8 ± 1,54	153,46 ± 7,67 <sup>***</sup>	68,79 ± 3,44 <sup>+++</sup>
<b>CAT aktivnost<sup>c</sup></b>	3,42 ± 0,15	3,58 ± 0,09	4,54 ± 0,3 <sup>**</sup>	3,77 ± 0,11 <sup>+</sup>
<b>GPx aktivnost<sup>c</sup></b>	2,97 ± 0,17	2,9 ± 0,19	2,07 ± 0,12 <sup>*</sup>	2,9 ± 0,22 <sup>+</sup>
<b>GR aktivnost<sup>c</sup></b>	40,52 ± 0,92	38,62 ± 1,79	31,11 ± 1,69 <sup>***</sup>	37,25 ± 0,26 <sup>+</sup>
<b>MnSOD aktivnost<sup>c</sup></b>	1,18 ± 0,05	1,26 ± 0,07	1,78 ± 0,1 <sup>***</sup>	1,51 ± 0,05 <sup>*</sup>
<b>CuZnSOD aktivnost<sup>c</sup></b>	3,21 ± 0,18	3,3 ± 0,19	4,75 ± 0,17 <sup>***</sup>	3,93 ± 0,17 <sup>+</sup>

Lipidna peroksidacija (TBARS), odnos redukovanog i oksidovanog glutationa (GSH/GSSG), nivo S-glutationilovanih proteina (GSSP), enzimska aktivnost katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GPx), glutation reduktaze (GR), mangan i bakar-cink superoksid dismutaza (MnSOD i CuZnSOD). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM iz minimum tri nezavisna eksperimenta. K – kontrolne ćelije; K/EK – kontrolne ćelije tretirane EK (0,25 mg/mL) u trajanju od 3h; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – ćelije tretirane 75 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u trajanju od 3h; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/EK – ćelije kotretirane 75 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 0,25 mg/mL EK u trajanju od 3h. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 u odnosu na K; + p < 0,05, +++ p < 0,001 za kotretman H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/EK u odnosu na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

<sup>a</sup> nM MDA/100 mg proteina

<sup>b</sup> μM GSH/mg proteina

<sup>c</sup> U aktivnosti/mg proteina

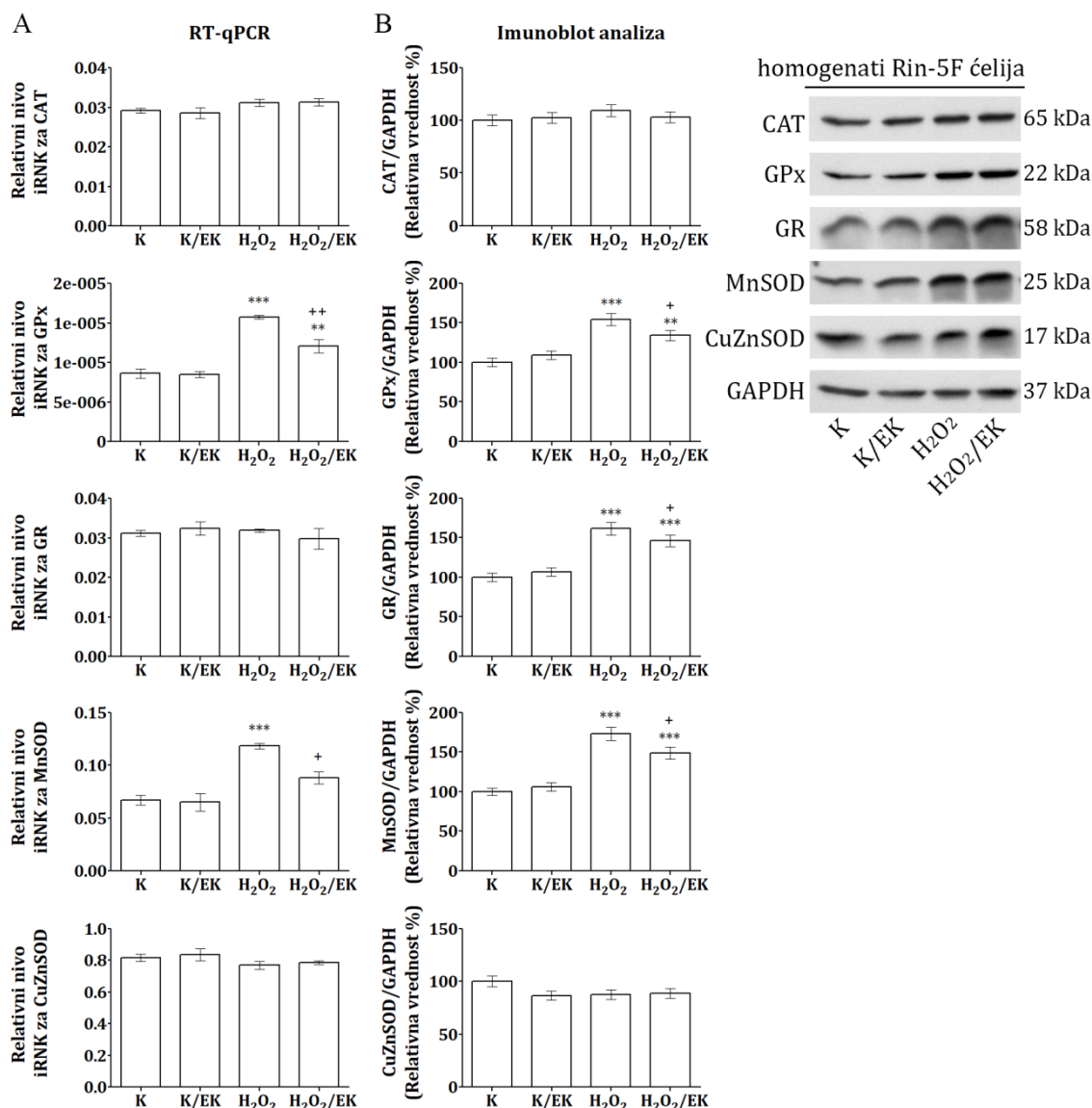
#### 4.5.2.2.3. Ekspresija enzima antioksidativne zaštite u Rin-5F ćelijama nakon tretmana H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Uočene promene u aktivnosti enzima antioksidativne zaštite mogu biti posledica različitih mehanizama koji se aktiviraju u uslovima oksidativnog stresa i u prisustvu EK. S' obzirom da su prisustvo i aktivnost proteina regulisani, između ostalog, i na nivou transkripcije, sledeći korak bio je ispitivanje ekspresije gena za enzime antioksidativne zaštite u kontrolnim i ćelijama tretiranim H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u prisustvu/odsustvu EK analizom nivoa transkripcije njihovih gena RT-qPCR metodom. Nakon toga, imunoblot analizom određeni su nivoi proteina analiziranih enzima (Slika 4.14).

U odnosu na kontrolne ćelije, nivo iRNK za GPx u tretmanu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bio je uvećan za 83% (p < 0,001), dok je u kotretmanu (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/EK) nivo iRNK za GPx bio

umanjen za oko 23% odnosu na tretman H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p < 0,01). Nakon H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tretmana detektovano je povećanje ekspresije gena za MnSOD od 76% (p < 0,001) u odnosu na kontrolu dok je u kotretmanu (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/EK) zabeleženo smanjenje ekspresije MnSOD od 25% (p < 0,05) u poređenju sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tretmanom. Ekspresija gena za CAT, GR i CuZnSOD se nije menjala sa tretmanom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kao i nakon H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/EK kotretmana (Slika 4.14.A).

Uočene promene na nivou transkripcije gena za enzime antioksidativne zaštite bile su praćene promenama na nivou proteina (Slika 4.14.B). Imunoblot analizom homogenata ćelija uočen je porast nivoa GPx, GR i MnSOD proteina u tretmanu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u odnosu na kontrolne ćelije za 54% (p < 0,001), 62% (p < 0,001) i 73% (p < 0,001). U H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/EK kotretmanu nivoi GPx, GR i MnSOD proteina bili su smanjeni za 13% (p < 0,05), 10% (p < 0,05) i 14% (p < 0,05) u odnosu na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tretman. Relativni nivoi CAT i CuZnSOD proteina ostali su nepromenjeni.



**Slika 4.14. Efekat ekstrakta kičice (EK) na ekspresiju enzima antioksidativne zaštite u Rin-5F ćelijama tretiranim vodonik peroksidom (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).** (A) Kvantitativna RT-PCR analiza iRNK za CAT, GPx, GR, MnSOD i CuZnSOD. Izolacija RNK i priprema komplementarne DNK (cDNK) iz Rin-5F ćelija je urađena nakon 3h tretmana ćelija 75 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u prisustvu/odsustvu 0,25 mg/mL EK. Ekspresije gena za enzime antioksidativne zaštite su određene relativno u odnosu na nivo iRNK za GAPDH, a grafički su prikazane srednje vrednosti ± SEM iz tri nezavisna eksperimenta urađena u triplikatu. (B) Imunoblot analiza CAT, GPx, GR, MnSOD i CuZnSOD proteina u homogenatima kontrolnih i Rin-5F ćelija tretiranih H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u prisustvu/odsustvu EK. Prikazani su reprezentivni blotovi iz tri nezavisna eksperimenta. Relativni nivoi proteina enzima antioksidativne zaštite su izraženi u odnosu na GAPDH i grafički prikazani kao srednja vrednost ± SEM u odnosu na optičku gustinu kontrole arbitrarno označene kao 100%. CAT – katalaza; GPx – glutation peroksidaza; GR – glutation reduktaza; MnSOD – mangan superoksid dismutaza; CuZnSOD – bakar-cink superoksid dismutaza. K – kontrolne ćelije; K/EK – kontrolne ćelije tretirane EK (0,25 mg/mL) u trajanju od 3h; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – ćelije tretirane 75 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u trajanju od 3h; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/EK – ćelije kotretirane 75 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 0,25 mg/mL EK u trajanju od 3h. \*\* p < 0,01,

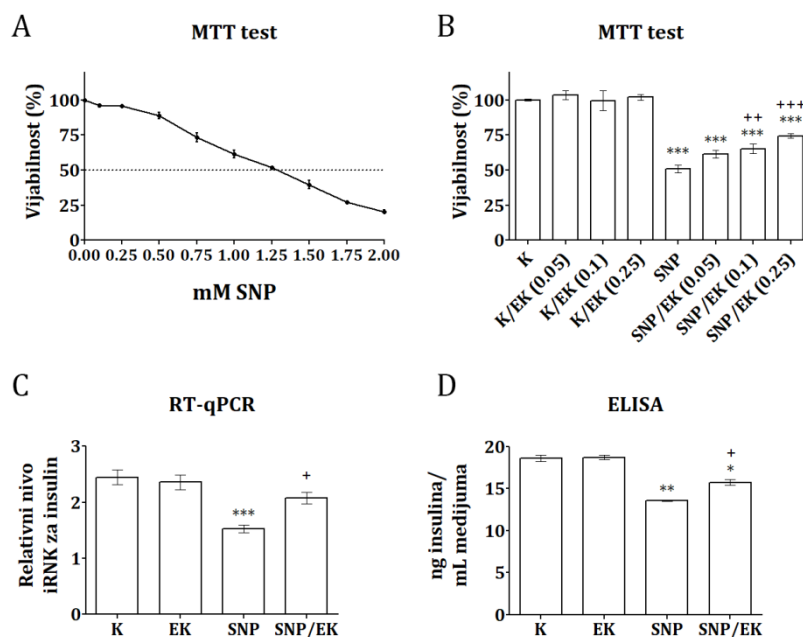
\*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na K; +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ , +++  $p < 0,001$  za kotretman  $H_2O_2$ /EK u odnosu na  $H_2O_2$ .

4.5.2.3. Ispitivanje efekta ekstrakta kičice na Rin-5F ćelije u uslovima oksidativnog stresa izazvanog primenom SNP-a

4.5.2.3.1. *Preživljavanje i funkcionalnost Rin-5F ćelija nakon tretmana SNP-om*

Nakon tretmana Rin-5F ćelija rastućim koncentracijama SNP-a u trajanju od 24h određena je  $IC_{50}$  doza SNP-a (1,25 mM) koja je korišćena u narednim eksperimentima (Slika 4.15.A). Kotretman ćelija  $IC_{50}$  dozom SNP-a i EK povećao je preživljavanje ćelija, pri čemu je najveći efekat imala koncentracija EK 0,25 mg/mL (procenat preživelih ćelija u odnosu na tretman SNP-om povećao se za oko 24%;  $p < 0,001$ ) (Slika 4.15.B).

Analizom ekspresije i sekrecije insulina utvrđena je smanjena funkcionalnost Rin-5F ćelija nakon tretmana SNP-om. U poređenju sa kontrolnim ćelijama, nivo iRNK za insulin u SNP tretmanu bio je smanjen za 38% ( $p < 0,001$ ) (Slika 4.15.C) dok je nivo insulina oslobođenog u medijum bio umanjen za 27% ( $p < 0,01$ ) (Slika 4.15.D). Kotretman ćelija SNP/EK povećao je nivo iRNK za insulin u odnosu na tretman SNP-om za oko 36% ( $p < 0,05$ ) kao i nivo oslobođenog insulina za 16% ( $p < 0,05$ ).



**Slika 4.15. Ekstrakt kičice (EK) povećava preživljavanje i funkcionalnost Rin-5F ćelija tretiranih natrijum nitroprusidom (SNP).** (A) MTT test preživljavanja nakon tretmana Rin-5F ćelija rastućim koncentracijama SNP-a u trajanju od 24h. (B) MTT test preživljavanja nakon kotretmana Rin-5F ćelija 1,25 mM SNP-om (IC<sub>50</sub> doza) i netoksičnim koncentracijama EK. (C) Kvantitativna RT-PCR analiza iRNK za insulin u Rin-5F ćelijama nakon kotretmana 1,25 mM SNP-om i 0,25 mg/mL EK. (D) Nivo insulina oslobođenog u medijum nakon kotretmana Rin-5F ćelija 1,25 mM SNP-om i 0,25 mg/mL EK. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM iz minimum tri nezavisna eksperimenta. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 u odnosu na kontrolne ćelije (K); + p < 0,05, ++ p < 0,01, +++ p < 0,001 za kotretman SNP/EK u odnosu na SNP.

#### 4.5.2.3.2. Analiza parametara oksidativnog stresa u Rin-5F ćelijama nakon tretmana SNP-om

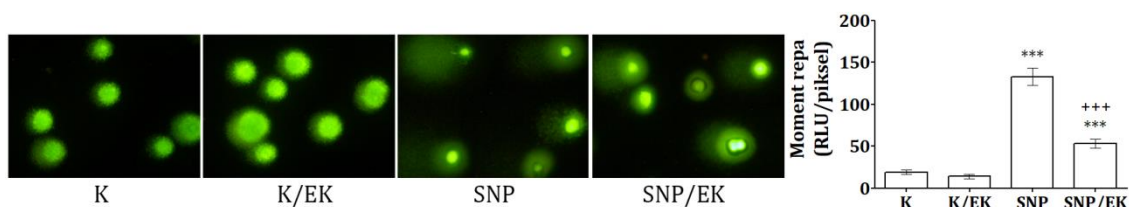
Na slici 4.16. prikazan je uticaj ekstrakta kičice na stepen oštećenja DNK molekula nakon tretmana SNP-om u trajanju od 24h. U odnosu na ćelije tretirane SNP-om, kod kojih je količina DNK u repu komete bila veća 7 puta (p < 0,001) u poređenju sa kontrolom, kotretman SNP/EK smanjio je količinu DNK u repu komete 2,5 puta (p < 0,001).

Tretman SNP-om povećao je nivo lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolne ćelije 4,9 puta (p < 0,001). Nivo MDA u kotretmanu SNP/EK smanjio se u odnosu na SNP tretman za 27% (p < 0,001) (Tabela 4.8). Takođe, nivo GSSP-a u tretmanu SNP-om povećao se u odnosu na kontrolne ćelije 3,6 puta (p < 0,001), dok je odnos GSH/GSSG opao za 21% (p < 0,05). Kotretman SNP/EK smanjio je



nivo GSSP-a u odnosu na SNP tretman za oko 21% ( $p < 0,05$ ). U poređenju sa SNP tretmanom, odnos GSH/GSSG se povećao u kotretmanu ali uočeno povećanje nije bilo statistički značajno (Tabela 4.8).

Tretman SNP-om uticao je i na promene aktivnosti enzima antioksidativne zaštite (Tabela 4.8). U odnosu na kontrolne ćelije, u SNP tretmanu uočen je pad aktivnosti CAT, GPx i GR za 26% ( $p < 0,001$ ), 30% ( $p < 0,01$ ), odnosno za 51% ( $p < 0,001$ ). Aktivnost MnSOD u ćelijama tretiranim SNP-om porasla je 2,1 ( $p < 0,001$ ), a aktivnost CuZnSOD 1,9 puta ( $p < 0,001$ ). SNP/EK kotretman je povećao aktivnosti CAT, GPx i GR u odnosu na tretman SNP-om za 19% ( $p < 0,05$ ), 32% ( $p < 0,05$ ), odnosno za 43% ( $p < 0,05$ ) i smanjio aktivnosti MnSOD i CuZnSOD za 29% ( $p < 0,05$ ), odnosno za 20% ( $p < 0,05$ ).



**Slika 4.16. Ekstrakt kičice (EK) smanjuje oštećenje DNK u Rin-5F ćelijama tretiranim natrijum nitroprusidom (SNP).** Stepen oštećenja DNK u ćelijama utvrđen je primenom alkalnog komet eseja, uz primenu momenta repa komete kao parametra oštećenja. Prikazane su reprezentativne slike kometa iz tri nezavisna eksperimenta. Prisustvo DNK u repu komete je određeno upotrebom TriTekCometScore™Freeware (v.1.5) programa i prikazano grafički kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. K – kontrolne ćelije; K/EK – kontrolne ćelije tretirane EK (0,25 mg/mL) u trajanju od 24h; SNP – ćelije tretirane 1,25 mM SNP-om u trajanju od 24h; SNP/EK – ćelije kotretirane 1,25 mM SNP-om i 0,25 mg/mL EK u trajanju od 24h. \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na K; +++  $p < 0,001$  za kotretman SNP/EK u odnosu na SNP.

**Tabela 4.8. Opšti parametri oksidativnog stresa u Rin-5F ćelijama tretiranim SNP-om**

	C	K/EK	SNP	SNP/EK
<b>TBARS<sup>a</sup></b>	16,23 ± 2,87	23,12 ± 3,34	79,43 ± 3,17 ***	58,16 ± 1,14 ***; +
<b>GSH/GSSG</b>	22,59 ± 1,13	23,48 ± 1,17	17,80 ± 0,89 *	21,41 ± 1,07
<b>GSSP<sup>b</sup></b>	74,42 ± 3,72	58,24 ± 2,91	265,57 ± 13,28 ***	209,43 ± 10,47 ***; +
<b>CAT aktivnost<sup>c</sup></b>	3,74 ± 0,08	3,96 ± 0,07	2,77 ± 0,20 ***	3,30 ± 0,10 +
<b>GPx aktivnost<sup>c</sup></b>	1,88 ± 0,14	1,90 ± 0,06	1,32 ± 0,11 **	1,74 ± 0,04 +
<b>GR aktivnost<sup>c</sup></b>	42,53 ± 1,03	44,84 ± 1,70	20,71 ± 2,71 ***	29,62 ± 2,17 **; +
<b>MnSOD aktivnost<sup>c</sup></b>	1,34 ± 0,12	1,45 ± 0,22	2,78 ± 0,17 ***	1,96 ± 0,21 +
<b>CuZnSOD aktivnost<sup>c</sup></b>	3,18 ± 0,16	3,25 ± 0,28	5,99 ± 0,29 ***	4,78 ± 0,26 **; +

Lipidna peroksidacija (TBARS), odnos redukovanog i oksidovanog glutaciona (GSH/GSSG), nivo S-glutationilovanih proteina (GSSP), enzimska aktivnost katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GPx), glutation reduktaze (GR), mangan i bakar-cink superoksid dismutaza (MnSOD i CuZnSOD). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM iz minimum tri nezavisna eksperimenta. K – kontrolne ćelije; K/EK – kontrolne ćelije tretirane EK (0,25 mg/mL) u trajanju od 24h; SNP – ćelije tretirane 1,25 mM SNP-om u trajanju od 24h; SNP/EK – ćelije kotretirane 1,25 mM SNP-om i 0,25 mg/mL EK u trajanju od 24 h. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 u odnosu na K; + p < 0,05, +++ p < 0,001 za kotretman SNP/EK u odnosu na SNP.

<sup>a</sup> nM MDA/100 mg proteina

<sup>b</sup> μM GSH/mg proteina

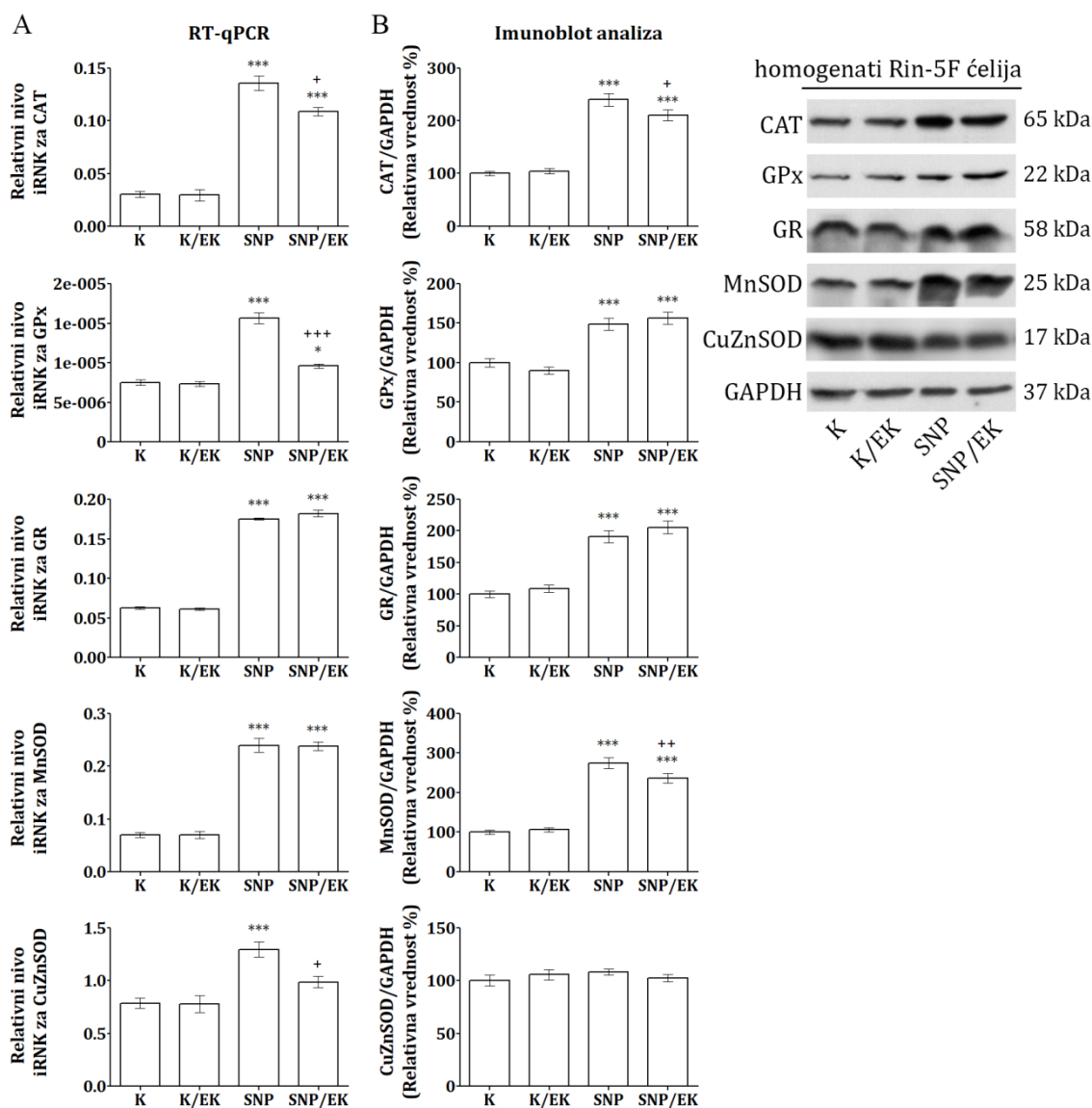
<sup>c</sup> U aktivnosti/mg proteina

#### 4.5.2.3.3. Ekspresija enzima antioksidativne zaštite u Rin-5F ćelijama nakon tretmana SNP-om

U odnosu na kontrolne ćelije, SNP-tretman Rin-5F ćelija bio je praćen povećanjem ekspresije gena svih ispitivanih enzima (Slika 4.17.A). Ekspresija gena za CAT povećala se 4,5 puta (p < 0,001), za GPx 2,1 puta (p < 0,001), za GR 2,8 puta (p < 0,001), za MnSOD 3,4 puta (p < 0,001), dok se ekspresija gena za CuZnSOD povećala 1,6 puta (p < 0,001). Kotretman SNP/EK smanjio je ekspresije gena za CAT za 20% (p < 0,05), za GPx za 39% (p < 0,001) i za CuZnSOD za 24% (p < 0,05), dok su ekspresije gena za GR i MnSOD u kotretiranim ćelijama bile na nivou zabeleženom u tretmanu SNP-om.

Imunoblot analizom homogenata ćelija tretiranih SNP-om uočeno je povećanje nivoa CAT proteina 2,4 puta (p < 0,001) u odnosu na kontrolne ćelije i smanjenje u kotretmanu SNP/EK u odnosu na tretman za 12% (p < 0,05)

(Slika 4.17.B). Nivoi GPx i GR proteina koji su u tretmanu SNP-om bili povećani za 49% ( $p < 0,001$ ), odnosno 90% ( $p < 0,001$ ), u kotretmanu SNP/EK su ostali na povišenom nivou. Povećani nivo MnSOD proteina u tretmanu SNP (2,7 puta veći u odnosu na kontrolu;  $p < 0,001$ ) smanjio se za 14% ( $p < 0,01$ ) u kotretmanu SNP/EK. Nivo CuZnSOD proteina nije se menjao sa tretmanom/kotretmanom ćelija.



**Slika 4.17. Efekat ekstrakta kičice (EK) na ekspresiju enzima antioksidativne zaštite u Rin-5F ćelijama tretiranim natrijum nitroprusidom (SNP).** (A) Kvantitativna RT-PCR analiza iRNK za CAT, GPx, GR, MnSOD i CuZnSOD. Izolacija RNK i priprema komplementarne DNK (cDNK) iz Rin-5F ćelija je urađena nakon 24h tretmana ćelija 1,25 mM SNP-om u prisustvu/odsustvu 0,25 mg/mL EK. Ekspresije gena za enzime antioksidativne zaštite prikazane su relativno u odnosu na nivo iRNK za GAPDH. Grafički su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  SEM iz tri nezavisna eksperimenta urađena u triplicatu.

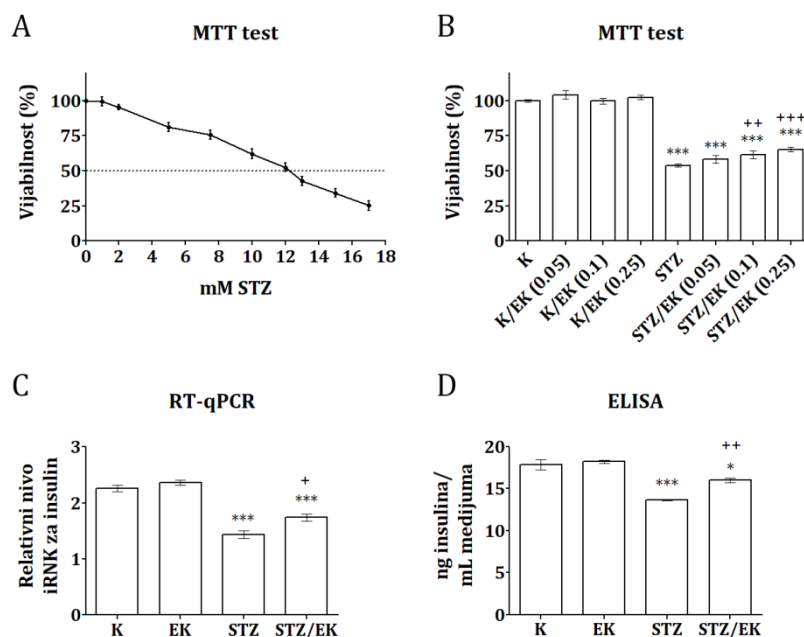
(B) Imunoblot analiza CAT, GPx, GR, MnSOD i CuZnSOD proteina u homogenatima kontrolnih i Rin-5F ćelija tretiranih SNP-om u prisustvu/odsustvu EK. Prikazani su reprezentativni blotovi iz tri nezavisna eksperimenta. Grafički su prikazani relativni nivoi proteina enzima antioksidativne zaštite u odnosu na GAPDH. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM u odnosu na optičku gustinu kontrolnog uzorka koji je arbitrarno označen kao 100%. CAT – katalaza; GPx – glutation peroksidaza; GR – glutation reduktaza; MnSOD – mangan superoksid dismutaza; CuZnSOD – bakar-cink superoksid dismutaza. K – kontrolne ćelije; K/EK – kontrolne ćelije tretirane EK (0,25 mg/mL) u trajanju od 24h; SNP – ćelije tretirane 1,25 mM SNP-om u trajanju od 24h; SNP/EK – ćelije kotretirane 1,25 mM SNP-om i 0,25 mg/mL EK u trajanju od 24h. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na K; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  za kotretman SNP/EK u odnosu na SNP.

#### 4.5.2.4. Ispitivanje efekta ekstrakta kičice na Rin-5F ćelije u uslovima oksidativnog stresa izazvanog primenom STZ-a

##### 4.5.2.4.1. Preživljavanje i funkcionalnost Rin-5F ćelija nakon tretmana STZ-om

Tretmanom Rin-5F ćelija rastućim koncentracijama STZ-a u trajanju od 24h određena je  $IC_{50}$  doza za STZ (12 mM) (Slika 4.18.A). Kada su ćelije tretirane u kombinaciji 12 mM STZ i EK najznačajnije povećanje procenta preživelih ćelija uočeno je sa primenom 0,25 mg/mL EK (procenat od 53,76% preživelih ćelija nakon STZ tretmana je porastao na 65,23% u STZ/EK kotretmanu;  $p < 0,001$ ) (Slika 4.18.B). Stoga je u daljim eksperimentima korišćena kombinacija 12 mM STZ i 0,25 mg/mL EK.

Tretman STZ-om smanjio je nivo iRNK za insulin na 64% u poređenju sa nivoom detektovanim kod kontrolnih ćelija ( $p < 0,001$ ), dok je kotretman STZ/EK značajno povećao ekspresiju insulina (za 21% u odnosu na STZ tretman;  $p < 0,05$ ) (Slika 4.18.C). Nivo oslobođenog insulina, koji je u tretmanu STZ-om bio smanjen za 24% u odnosu na kontrolu ( $p < 0,001$ ), u kotretmanu STZ/EK se povećao u odnosu na STZ tretman za 17% ( $p < 0,01$ ) (Slika 4.18.D).



**Slika 4.18. EK povećava preživljavanje i funkcionalnost Rin-5F ćelija tretiranih streptozotocinom (STZ).** (A) MTT test preživljavanja nakon tretmana Rin-5F ćelija rastućim koncentracijama STZ-a u trajanju od 24h. (B) MTT test preživljavanja nakon kotretmana Rin-5F ćelija 12 mM STZ-om (IC<sub>50</sub> doza) i netoksičnim koncentracijama EK. (C) Kvantitativna RT-PCR analiza iRNK za insulin u Rin-5F ćelijama nakon kotretmana 12 mM STZ-om i 0,25 mg/mL EK. (D) Nivo insulina oslobođenog u medijum nakon kotretmana Rin-5F ćelija 12 mM STZ-om i 0,25 mg/mL EK. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM iz minimum tri nezavisna eksperimenta. \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,001 u odnosu na kontrolne ćelije (K); + p < 0,05, ++ p < 0,01, +++ p < 0,001 za kotretman STZ/EK u odnosu na STZ. Preuzeto i modifikovano iz (Đorđević i sar., 2019).

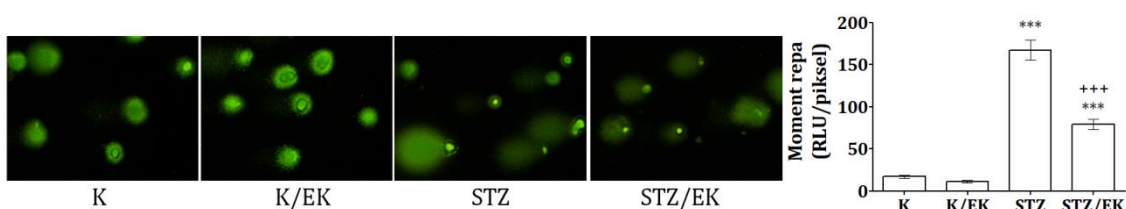
#### 4.5.2.4.2. Analiza parametara oksidativnog stresa u Rin-5F ćelijama nakon tretmana STZ-om

Kao DNK alkilujućí agens, STZ dovodi do fragmentacije DNK molekula u β-ćelijama. Moment repa komete u Rin-5F ćelijama tretiranim STZ-om povećao se 9 puta u odnosu na kontrolne ćelije (p < 0,001) (Slika 4.19). Kotretman STZ/EK je smanjio stepen DNK oštećenja budući da je moment repa komete u kotretiranim ćelijama bio 2,1 puta manji u odnosu na STZ tretirane ćelije (p < 0,001).

U ćelijama tretiranim STZ-om nivoi MDA i GSSP-a bili su povećani za 77% (p < 0,001), odnosno za 125% (p < 0,001) (Tabela 4.9). Sa druge strane, odnos GSH/GSSG je bio niži za 25% (p < 0,05) u odnosu na kontrolne ćelije. Primena ekstrakta je poboljšala parametre oksidativnog stresa u Rin-5F ćelijama – u poređenju sa STZ tretmanom nivoi MDA i GSSP-a u kotretiranim ćelijama bili su

niži za 27% ( $p < 0,01$ ), odnosno za 40% ( $p < 0,001$ ), dok je odnos GSH/GSSG blago porastao (za oko 8%). Tretman kontrolnih ćelija EK nije uticao na promene nivoa MDA, GSSP i GSH/GSSG.

U poređenju sa kontrolnim ćelijama, aktivnosti CAT, MnSOD i CuZnSOD značajno su porasle nakon STZ tretmana. Aktivnost CAT bila je uvećana za 53% ( $p < 0,001$ ), MnSOD za 97% ( $p < 0,001$ ), dok se aktivnost CuZnSOD povećala za 55% ( $p < 0,001$ ) (Tabela 4.9). Kotretman STZ/EK smanjio je aktivnosti MnSOD i CuZnSOD u odnosu na STZ tretman (za 22% ( $p < 0,01$ ), odnosno za 11% ( $p < 0,05$ )), dok se aktivnost CAT u kotretiranim ćelijama smanjila do nivoa zabeleženog u kontrolnim ćelijama. Aktivnosti GPx i GR se nisu značajno menjale u tretmanima, mada je blago povećana aktivnost GR uočena nakon STZ tretmana. Tretman kontrolnih ćelija EK nije uticao na promene aktivnosti enzima.



**Slika 4.19. Ekstrakt kičice (EK) smanjuje oštećenje DNK u Rin-5F ćelijama tretiranim streptozotocinom (STZ).** Step en oštećenja DNK u ćelijama utvrđen je primenom alkalnog komet eseja, uz primenu momenta repa komete kao parametra oštećenja. Prikazane su reprezentativne slike komete iz tri nezavisna eksperimenta. Prisustvo DNK u repu komete je određeno upotrebom TriTekCometScore™Freeware (v.1.5) programa i prikazano grafički kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. K - kontrolne ćelije; K/EK - kontrolne ćelije tretirane EK (0,25 mg/mL) u trajanju od 24h; STZ - ćelije tretirane 12 mM STZ-om u trajanju od 24h; STZ/EK - ćelije kotretirane 12 mM STZ-om i 0,25 mg/mL EK u trajanju od 24h. \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na K; \*\*\*  $p < 0,001$  za kotretman STZ/EK u odnosu na STZ. Preuzeto i modifikovano iz (Đorđević i sar., 2019).

**Tabela 4. 9. Opšti parametri oksidativnog stresa u Rin-5F ćelijama tretiranim STZ-om**

	C	K/EK	STZ	STZ/EK
<b>TBARS<sup>a</sup></b>	41,13 ± 2,06	42,54 ± 2,13	72,68 ± 3,63 <sup>***</sup>	52,78 ± 2,64 <sup>++</sup>
<b>GSH/GSSG</b>	23,95 ± 1,2	22,98 ± 1,15	17,91 ± 0,9 <sup>*</sup>	19,4 ± 0,97
<b>GSSP<sup>b</sup></b>	65,31 ± 3,27	68,36 ± 3,42	146,95 ± 7,35 <sup>***</sup>	88,35 ± 4,42 <sup>+++</sup>
<b>CAT aktivnost<sup>c</sup></b>	4,83 ± 0,2	5,16 ± 0,42	7,41 ± 0,37 <sup>***</sup>	5,06 ± 0,5 <sup>++</sup>
<b>GPx aktivnost<sup>c</sup></b>	2,92 ± 0,18	2,86 ± 0,18	3,06 ± 0,3	2,98 ± 0,25
<b>GR aktivnost<sup>c</sup></b>	42,19 ± 1,85	43,69 ± 3,1	51,52 ± 3,77	42,28 ± 4,75
<b>MnSOD aktivnost<sup>c</sup></b>	1,03 ± 0,04	1,04 ± 0,05	2,03 ± 0,08 <sup>***</sup>	1,59 ± 0,08 <sup>**</sup> ; ++
<b>CuZnSOD aktivnost<sup>c</sup></b>	3,44 ± 0,14	3,62 ± 0,11	5,34 ± 0,08 <sup>***</sup>	4,77 ± 0,08 <sup>***</sup> ; +

Lipidna peroksidacija (TBARS), odnos redukovano i oksidovano glutationa (GSH/GSSG), nivo S-glutationilovanih proteina (GSSP), enzimska aktivnost katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GPx), glutation reduktaze (GR), mangan i bakar-cink superoksid dismutaza (MnSOD i CuZnSOD). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM iz minimum tri nezavisna eksperimenta. K – kontrolne ćelije; K/EK – kontrolne ćelije tretirane EK (0,25 mg/mL) u trajanju od 24h; STZ – ćelije tretirane 12 mM STZ-om u trajanju od 24h; STZ/EK – ćelije kotretirane 12 mM STZ-om i 0,25 mg/mL EK u trajanju od 24 h. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 u odnosu na K; + p < 0,05, ++ p < 0,01, +++ p < 0,001 za kotretman STZ/EK u odnosu na STZ. Preuzeto i modifikovano iz (Đorđević i sar., 2019).

<sup>a</sup> nM MDA/100 mg proteina

<sup>b</sup> μM GSH/mg proteina

<sup>c</sup> U aktivnosti/mg proteina

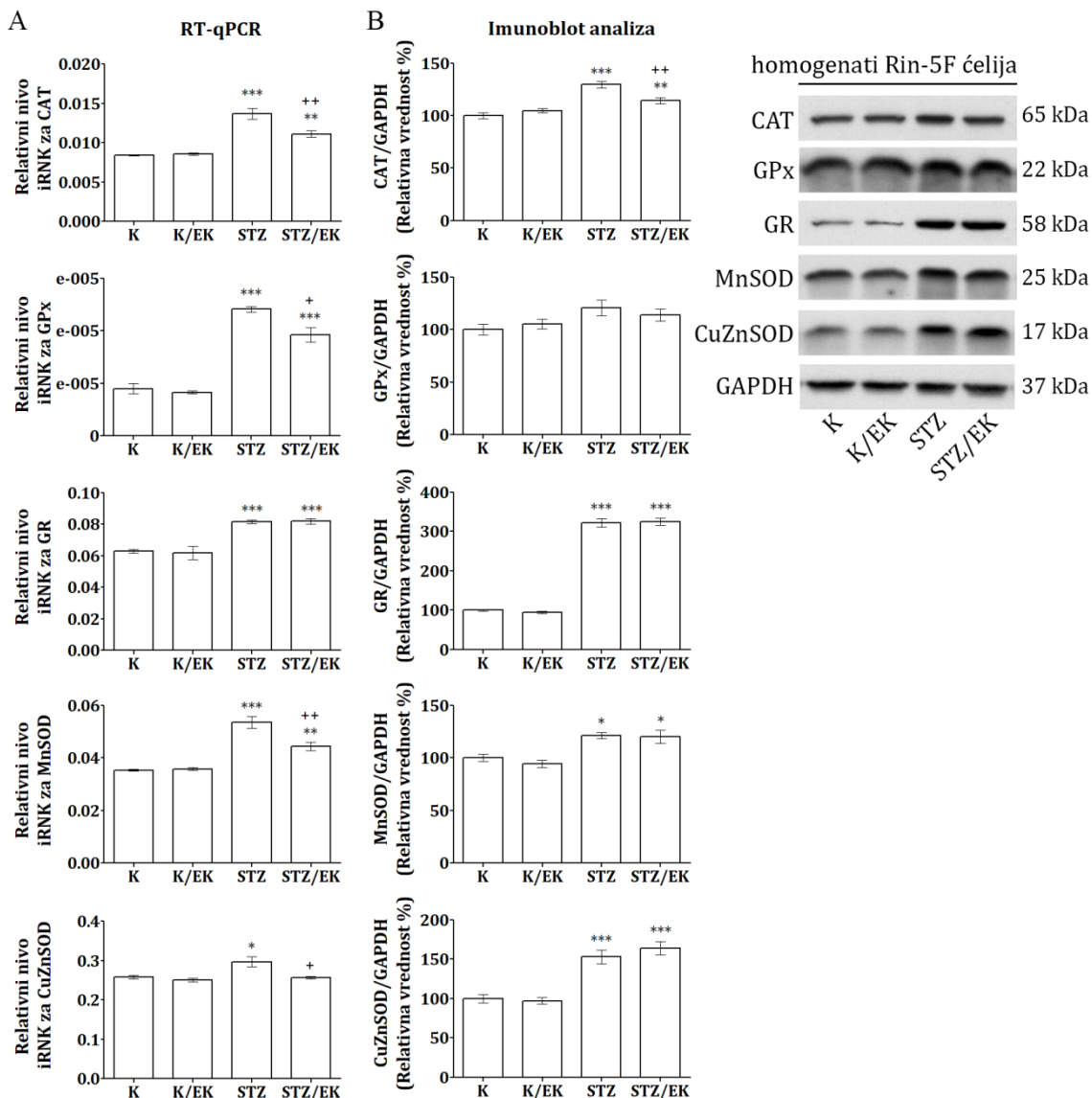
#### 4.5.2.4.3. Ekspresija enzima antioksidativne zaštite u Rin-5F ćelijama nakon tretmana STZ-om

Efekat EK na nivoe iRNK i proteina enzima antioksidativne zaštite u Rin-5F ćelijama tretiranim STZ-om u prisustvu/odsustvu EK prikazan je na slici 4.20. Nivo iRNK za CAT povećao se u STZ tretmanu za 62% (p < 0,001) u odnosu na kontrolne ćelije, dok se u kotretmanu STZ/EK nivo iRNK za CAT u odnosu na tretman STZ-om smanjio za 19% (p < 0,01) (Slika 4.20.A). U odnosu na kontrolne ćelije, ekspresija gena za GPx povećala se 2,7 puta (p < 0,001) u tretmanu STZ-om, dok je ekspresija gena za GR bila povećana za oko 30% (p < 0,001). Kotretman STZ/EK smanjio je nivo iRNK za GPx za 20% (p < 0,05) u odnosu na STZ tretman, dok je nivo iRNK za GR ostao nepromenjen. Povećani nivo iRNK za MnSOD nakon tretmana STZ-om (veći za 52% u odnosu na kontrolu; p < 0,001) bio je smanjen u kotretmanu STZ/EK za oko 17% (p < 0,01). Nivo iRNK za CuZnSOD se nakon STZ tretmana

povećao za 15% ( $p < 0,05$ ) dok je nakon STZ/EK kotretmana ostao na kontrolnom nivou. Tretman kontrolnih ćelija EK nije značajno uticao na nivo iRNK ispitivanih enzima.

Imunoblot analizom homogenata Rin-5F ćelija detektovan je povećan nivo CAT proteina u STZ tretmanu u odnosu na kontrolne ćelije za 30% ( $p < 0,001$ ) (Slika 4.20.B). Nakon STZ/EK kotretmana, prisustvo CAT proteina bilo je smanjeno za oko 12% u odnosu na tretman STZ-om ( $p < 0,01$ ). Nivo GPx proteina bio je sličan u svim ispitivanim uslovima, uz malo ali statistički neznačajno povećanje u STZ tretmanu. Sa druge strane, nivo GR proteina bio je povećan 3 puta i u tretmanu STZ-om i u kotretmanu STZ/EK ( $p < 0,001$ ). Nivoi MnSOD i CuZnSOD proteina su se nakon tretmana STZ-om povećali za 21% ( $p < 0,05$ ), odnosno za 53% ( $p < 0,001$ ) bez značajnih promena nakon STZ/EK kotretmana. Tretman kontrolnih ćelija EK nije bitno uticao na promene nivoa proteina ispitivanih enzima.





**Slika 4.20. Efekat ekstrakta kičice (EK) na ekspresiju enzima antioksidativne zaštite u Rin-5F ćelijama tretiranim streptozotocinom (STZ).** (A) Kvantitativna RT-PCR analiza iRNK za CAT, GPx, GR, MnSOD i CuZnSOD. Izolacija RNK i priprema komplementarne DNK (cDNK) iz Rin-5F ćelija je urađena nakon 24h tretmana ćelija 12 mM STZ-om u prisustvu/odsustvu 0,25 mg/mL EK. Ekspresije gena za enzime antioksidativne zaštite prikazane su relativno u odnosu na nivo iRNK za GAPDH. Grafički su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  SEM iz tri nezavisna eksperimenta urađena u triplikatu. (B) Imunoblot analiza CAT, GPx, GR, MnSOD i CuZnSOD proteina u homogenatima kontrolnih i Rin-5F ćelija tretiranih STZ-om u prisustvu/odsustvu EK. Prikazani su reprezentativni blotovi iz tri nezavisna eksperimenta. Grafički su prikazani relativni nivoi proteina enzima antioksidativne zaštite u odnosu na GAPDH. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM u odnosu na optičku gustinu kontrolnog uzorka koji je arbitrarno označen kao 100%. CAT – katalaza; GPx – glutation peroksidaza; GR – glutation reduktaza; MnSOD – mangan superoksid dismutaza; CuZnSOD – bakar-cink superoksid dismutaza. K – kontrolne ćelije; K/EK – kontrolne ćelije tretirane EK (0,25 mg/mL) u trajanju od 24h; STZ – ćelije tretirane 12 mM STZ-om u trajanju od 24h; STZ/EK – ćelije kotretirane 12 mM STZ-om i 0,25 mg/mL EK u trajanju od 24h. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na

K; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , za kotretman STZ/EK u odnosu na STZ. Preuzeto i modifikovano iz (Đorđević i sar., 2019).

#### 4.5.2.5. Uticaj ekstrakta kičice na regulatorne procese u $\beta$ -ćelijama u uslovima oksidativnog stresa indukovanog STZ-om

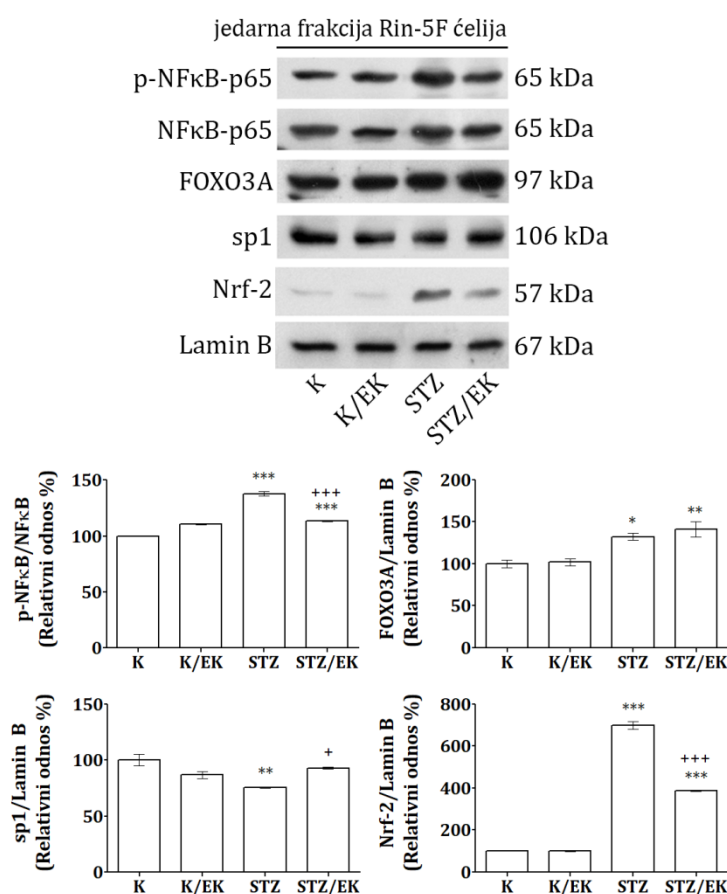
Imajući u vidu da oksidativni stres utiče na stabilnost, ćelijsku raspodelu i aktivnost proteina, to se u uslovima oksidativnog stresa koji prati dijabetes mogu očekivati i promene u aktivnosti regulatornih proteina uključenih u proces transkripcije i signalne puteve preživljavanja u ćeliji, što za posledicu može imati kako promene na nivou ekspresije ciljnih gena tako i propadanje i poremećaj u funkcionisanju  $\beta$ -ćelija (Guo i sar., 2013).

S' obzirom da je STZ korišćen za izazivanje eksperimentalnog modela dijabetesa kod pacova, dalja analiza efekata EK na regulatorne mehanizme koji se aktiviraju u uslovima oksidativnog stresa rađena je na Rin-5F ćelijama tretiranim STZ-om čije dejstvo uključuje formiranje ROS i NO vrsta. Ovakva analiza je omogućila vezu između *in vivo* i *in vitro* modela bolesti.

##### 4.5.2.5.1. Aktivnost faktora uključenih u regulaciju transkripcije gena za enzime antioksidativne zaštite u $\beta$ -ćelijama

Uočene promene na nivou iRNK za enzime antioksidativne zaštite u uslovima oksidativnog stresa ukazuju na moguće promene uzvodnih faktora uključenih u regulaciju ekspresije datih gena. Stoga je imunoblot analizom jedarnih frakcija pripremljenih iz Rin-5F ćelija nakon STZ tretmana u prisustvu/odsustvu EK analizirano prisustvo NF $\kappa$ B-p65, FOXO3A, Sp1 i Nrf-2, faktora za koje je poznato da regulišu transkripciju gena za ispitivane enzime (Slika 4.21). Redoks-senzitivni transkripcioni faktor NF $\kappa$ B-p65 ostvaruje svoju transkripcionu aktivnost nakon translokacije u jedro i fosforilacije. Analizom fosforilisane (Ser<sup>311</sup>) forme NF $\kappa$ B-p65, koja je esencijalna za njegovu transkripcionu aktivnost (Duran i sar., 2003), uočena je aktivacija NF $\kappa$ B-p65 nakon STZ tretmana. Naime, nivo fosforilisane forme NF $\kappa$ B-p65 (p-NF $\kappa$ B-p65) u ćelijama tretiranim STZ-om bio je 38% ( $p < 0,001$ ) iznad nivoa zabeleženog u kontrolnim ćelijama. Nakon STZ/EK kotretmana aktivnost NF $\kappa$ B-p65 je bila umanjena budući da je zabeleženi nivo

p-NFκB-p65 bio za 18% niži u odnosu na tretman STZ-om ( $p < 0,001$ ). U odnosu na kontrolne ćelije, nivo FOXO3A bio je povećan i u tretmanu STZ-om (za 32%;  $p < 0,05$ ) i u kotretmanu STZ/EK (za 41%;  $p < 0,01$ ). U poređenju sa kontrolom, prisustvo Sp1 proteina u jedarnim frakcijama nakon STZ tretmana bilo je smanjeno za 24% ( $p < 0,01$ ) dok je nakon kotretmana STZ/EK nivo Sp1 bio na kontrolnom nivou. Prisustvo Nrf-2 proteina u jedru, u odnosu na kontrolu, bilo je povećano 7 puta ( $p < 0,001$ ) nakon STZ tretmana Rin-5F ćelija, dok je kotretman STZ/EK smanjio prisustvo Nrf-2 u jedarnim frakcijama za 45% u odnosu na tretman STZ-om ( $p < 0,001$ ). U kontrolnim ćelijama tretman EK nije uticao na promene nivoa ispitivanih regulatornih proteina. Ovi rezultati ukazuju na to da oksidativni stres u  $\beta$ -ćelijama izazvan STZ-om utiče na promene u prisustvu i aktivnosti redoks-senzitivnih transkripcionih faktora i da tretman ekstraktom kičice može da uravnoteži njihovo prisustvo, samim tim i aktivnost.



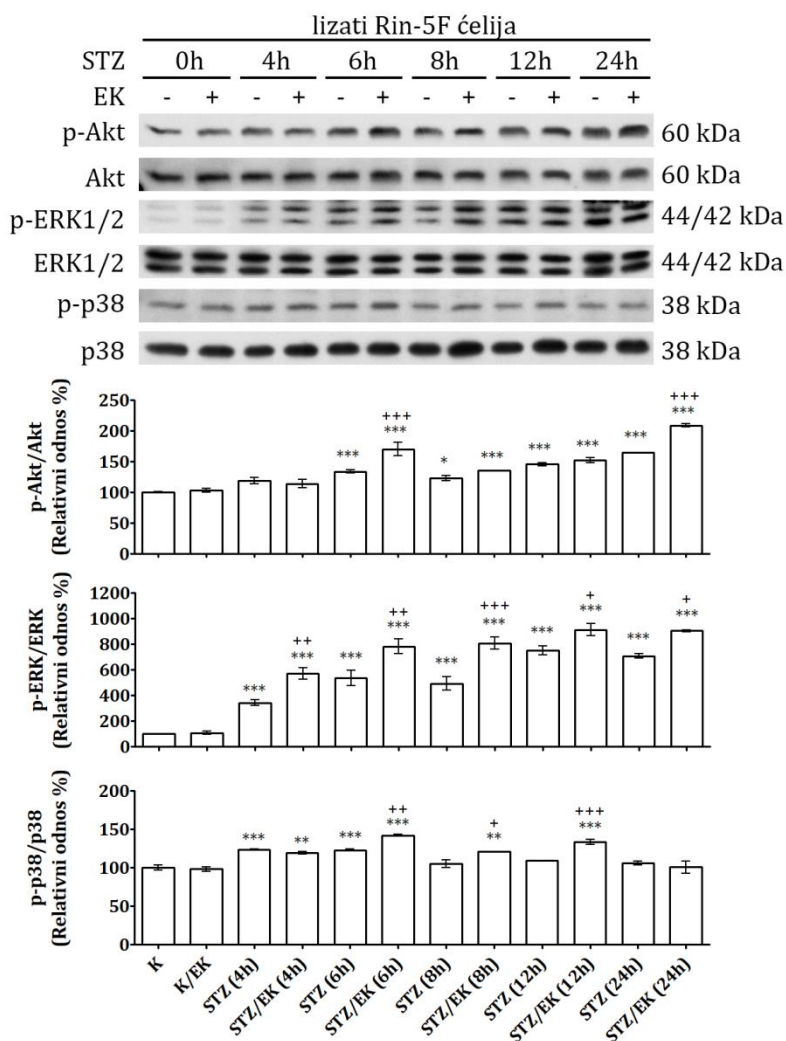
**Slika 4.21. Efekat ekstrakta kičice (EK) na aktivnost regulatora transkripcije enzima antioksidativne zaštite u  $\beta$ -ćelijama.** Imunoblot analiza prisustva NFκB-p65 (fosforilisane (p-) i ukupne forme), FOXO3A, Sp1 i Nrf-2 u jedarnim frakcijama Rin-5F ćelija pripremljenih nakon 24h tretmana 12 mM STZ-om u prisustvu/odsustvu 0,25 mg/mL EK. Prikazani su reprezentativni blotovi iz tri nezavisna eksperimenta. Grafički su prikazani relativni odnos p-NFκB-p65/NFκB-p65 i relativni nivo FOXO3A, Sp1 i Nrf-2 u odnosu na Lamin B. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM u odnosu na optičku gustinu kontrolnog uzorka koji je arbitrarno označen kao 100%. K - kontrolne ćelije; K/EK - kontrolne ćelije tretirane EK (0,25 mg/mL) u trajanju od 24h; STZ - ćelije tretirane 12 mM STZ-om u trajanju od 24h; STZ/EK - ćelije kotretirane 12 mM STZ-om i 0,25 mg/mL EK u trajanju od 24h. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na K; +  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , za kotretman STZ/EK u odnosu na STZ. Preuzeto i modifikovano iz (Đorđević i sar., 2019).

#### 4.5.2.5.2. *Analiza regulatora signalnih puteva preživljavanja i ekspresije/sekrecije insulina u $\beta$ -ćelijama*

Kako bi se u uslovima oksidativnog stresa utvrdio efekat EK na signalne puteve uključene u procese apoptoze, preživljavanja i ekspresije insulina u  $\beta$ -ćelijama, ispitana je aktivnost Akt, ERK i p38 kinaza, kao i jedarni nivo PDX-1 i MafA transkripcionih faktora. Imajući u vidu da promene u aktivnosti kinaza i transkripcionih faktora mogu nastupiti u ranijim vremenskim tačkama u okviru ispitivanog perioda od 24h, a u cilju preciznijeg praćenja potencijalnih promena, Rin-5F ćelije su tretirane 12 mM STZ-om u prisustvu/odsustvu 0,25 mg/mL EK tokom 4h, 6h, 8h, 12h i 24h.

Imunoblot analizom ćelijskih lizata uočene su dinamične promene u prisustvu fosforilisanih (aktivnih) formi Akt (p-Akt), ERK1/2 (p-ERK1/2) i p38 (p-p38) kinaza (Slika 4.22). U poređenju sa kontrolnim uzorcima, nivo p-Akt bio je povećan nakon STZ tretmana i STZ/EK kotretmana u svim ispitivanim tačkama, sa izuzetkom tačke 4h. Najveća aktivnost Akt kinaze zabeležena je nakon tretmana od 24h – u ćelijama tretiranim STZ-om nivo p-Akt bio je za 64% ( $p < 0,001$ ) iznad nivoa zabeleženog u kontrolnim ćelijama, dok se u STZ/EK kotretmanu nivo p-Akt povećao za dodatnih 27% ( $p < 0,001$  u odnosu na STZ tretman). Takođe, nakon tretmana od 6h aktivnost p-Akt bila je povećana za 34% ( $p < 0,001$ ) u ćelijama tretiranim STZ-om, dok je u STZ/EK kotretmanu aktivnost Akt bila dodatno povećana za 27% ( $p < 0,001$  u odnosu na STZ tretman). U ostalim ispitivanim tačkama kotretman nije dodatno uticao na promene u aktivnosti Akt kinaze. U odnosu na kontrolne ćelije, aktivnost ERK1/2 kinaze bila je značajno povećana nakon tretmana ćelija i bila je konstantno veća u STZ/EK kotretmanu u poređenju sa odgovarajućim STZ tretmanom. Najveći nivo p-ERK zabeležen je nakon 12h – tretman STZ-om pojačao je aktivnost ERK kinaze 7,5 puta ( $p < 0,001$ ) dok je kotretman STZ/EK dodatno pojačao aktivnost za oko 21% ( $p < 0,05$  u odnosu na STZ tretman). Najveća aktivnost p38 kinaze zabeležena je nakon 4h i 6h tretmana STZ-om (veća za 23% ( $p < 0,001$ ) u odnosu na kontrolne ćelije), dok je najveća aktivnost p38 kinaze u kotretmanu STZ/EK uočena nakon 6h (nivo p-p38 veći za 15% ( $p < 0,01$ ) u odnosu na STZ tretman). Nakon 8h i 12h tretmana STZ-om

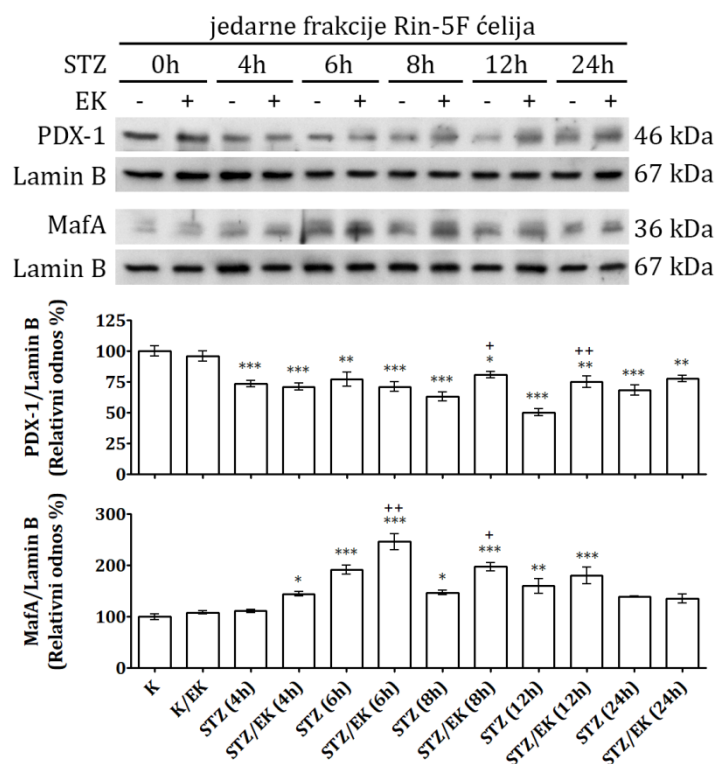
aktivnost p38 kinaze bila je na kontrolnom nivou dok je u kotretmanu STZ/EK bila povećana u odnosu na odgovarajuće aktivnosti u tretmanu za 15% ( $p < 0,05$ ), odnosno za 22% ( $p < 0,001$ ). Nakon 24h aktivnost p38 kinaze vratila se na kontrolni nivo i u tretiranim i u kotretiranim ćelijama. EK nije uticao na promene aktivnosti ispitivanih kinaza u kontrolnim ćelijama.



**Slika 4.22. Efekat ekstrakta kičice (EK) na aktivnost Akt, ERK1/2 i p38 kinaza u Rin-5F ćelijama tretiranim streptozotocinom (STZ).** Imunoblot analiza aktivnih (p-) i ukupnih formi Akt, ERK1/2 i p38 kinaza u lizatima Rin-5F ćelija pripremljenih nakon tretmana 12 mM STZ-om u prisustvu/odsustvu 0,25 mg/mL EK u trajanju od 4h, 6h, 8h, 12h i 24h. Prikazani su reprezentativni blotovi iz tri nezavisna eksperimenta. Grafički prikazani relativni odnosi p-Akt/Akt, p-ERK/ERK i p-p38/p38 izraženi su kao srednja vrednost  $\pm$  SEM u odnosu na relativnu optičku gustinu kontrolnog uzorka koji je arbitrarno označen kao 100%. K - kontrolne ćelije (STZ 0h); K/EK - kontrolne ćelije tretirane EK (0,25 mg/mL); STZ (Xh) - ćelije tretirane 12 mM STZ-om u trajanju od Xh; STZ/EK (Xh) - ćelije kotretirane 12 mM STZ-om i 0,25 mg/mL EK u trajanju od Xh. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na K; +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ , +++  $p < 0,001$  za

kotretman STZ/EK (Xh) u odnosu na odgovarajući STZ (Xh). Preuzeto i modificovano iz (Đorđević i sar., 2019).

U poređenju sa kontrolnim ćelijama, nivo PDX-1 u jedrima Rin-5F ćelija je bio smanjen u svim ispitivanim vremenskim tačkama, kako u tretmanu STZ-om tako i u kotretmanu STZ/EK (Slika 4.23). Najveći pad nivoa PDX-1 u STZ tretmanu uočen je nakon 8h (za 37%;  $p < 0,001$ ) i 12h (za 50%;  $p < 0,001$ ). U istim vremenskim tačkama zabeležen je najmanji pad nivoa PDX-1 nakon STZ/EK kotretmana, budući da je nivo PDX-1 u jedru bio veći za 34% ( $p < 0,01$  za STZ/EK (8h)), odnosno za 13% ( $p < 0,05$  za STZ/EK (12h)) u odnosu na odgovarajuće tretmane STZ-om. Nakon 4h, 6h i 24h uočen je približno sličan pad u nivou PDX-1 u STZ tretmanu i kotretmanu STZ/EK. Za razliku od PDX-1, detektovano je povećanje nivoa MafA proteina u jedrima Rin-5F ćelija (Slika 4.23). Najveći porast u ćelijama tretiranim STZ-om uočen je nakon 6h kada je količina MafA bila za 92% ( $p < 0,001$ ) iznad nivoa zabeleženog u kontrolnim ćelijama. Kotretman STZ/EK u trajanju od 6h dodatno je povećao nivo MafA za 28% ( $p < 0,01$  u odnosu na STZ tretman (6h)). Prisustvo MafA, koje je u jedrima Rin-5F ćelija tretiranih STZ-om u trajanju od 8h bilo povećano u odnosu na kontrolne ćelije za 47% ( $p < 0,05$ ), povećalo se za dodatnih 34% ( $p < 0,05$ ) u kotretmanu STZ/EK. Nakon 12h količina MafA bila je podjednako veća u tretmanu i kotretmanu, dok se nakon 24h nivo MafA u jedrima tretiranih i kotretiranih ćelija nije statistički razlikovao od nivoa uočenog u kontrolnim ćelijama. Tretman kontrolnih ćelija EK nije bitno uticao na promene u nivou ispitivanih transkripcionih faktora u jedrima Rin-5F ćelija. Ipak, u uslovima oksidativnog stresa izazvanog primenom STZ-a, tretman EK značajno je uticao kako na prisustvo tako i na aktivnost ispitivanih medijatora signalnih puteva uključenih u preživljavanje  $\beta$ -ćelija i ekspresiju i sekreciju insulina.



**Slika 4.23. Efekat ekstrakta kičice (EK) na nivo PDX-1 i MafA u jedrima Rin-5F ćelija tretiranim streptozotocinom (STZ).** Imunoblot analiza PDX-1 i MafA u jedarnim frakcijama Rin-5F ćelija pripremljenih nakon tretmana 12 mM STZ-om u prisustvu/odsustvu 0,25 mg/mL EK u trajanju od 4h, 6h, 8h, 12h i 24h. Prikazani su reprezentativni blotovi iz tri nezavisna eksperimenta. Grafički su prikazani relativni odnosi PDX-1 i MafA u odnosu na Lamin B. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM u odnosu na relativnu optičku gustinu kontrolnog uzorka koji je arbitrarno označen kao 100%. K - kontrolne ćelije (STZ 0h); K/EK - kontrolne ćelije tretirane EK (0,25 mg/mL); STZ (Xh) - ćelije tretirane 12 mM STZ-om u trajanju od Xh; STZ/EK (Xh) - ćelije kotretirane 12 mM STZ-om i 0,25 mg/mL EK u trajanju od Xh. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na K; +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$  za kotretman STZ/EK (Xh) u odnosu na odgovarajući STZ (Xh). Preuzeto i modifikovano iz (Đorđević i sar., 2019).



## 5. DISKUSIJA

---

Dijabetes je globalni zdravstveni problem zbog visoke stope oboljevanja kao i štetnih posledica bolesti sa letalnim ishodom. Lečenje dijabetesa uključuje održavanje koncentracije glukoze u fiziološkim granicama i sprečavanje razvoja pratećih komplikacija upotrebom insulina i lekova sa hipoglikemijskim dejstvom uz promenu načina života. Međutim, aktuelna terapija dijabetesa ne pruža zadovoljavajuće rezultate zbog čega postoji potreba za njeno unapređenje. Uzimajući u obzir pozitivne efekte biljaka koje se u tradicionalnoj medicini koriste za tretman dijabetesa, biljni preparati se izdvajaju kao potencijalno značajne pomoćne lekovite supstance za prevenciju i lečenje dijabetesa. Iako u poređenju sa insulinom i lekovima sa hipoglikemijskim dejstvom nisu podjednako efikasne u snižavanju koncentracije glukoze u cirkulaciji, lekovite biljke ispoljavaju i druge efekte koji mogu biti korisni u lečenju bolesti i pratećih komplikacija (Subbulakshmi i Naik, 2001). Za neke biljne preparate je utvrđeno da doprinose simptomatskom olakšanju i prevenciji sekundarnih komplikacija bolesti, kod drugih je pokazano da doprinose regeneraciji  $\beta$ -ćelija i prevazilaženju insulinske rezistencije, dok je kod nekih pokazano da imaju antioksidativno dejstvo i da utiču na snižavanje nivoa holesterola (Jarald i sar., 2008). U sastavu biljaka se nalazi veliki broj aktivnih komponenti koje svoje dejstvo ostvaruju putem različitih mehanizama uključujući i njihove uzajamne aditivne i sinergističke efekte. Stoga identifikacija aktivnih komponenti prisutnih u biljkama može biti značajna kako za razvoj novih lekova tako i za potvrdu, standardizaciju i racionalnu upotrebu tradicionalnih biljnih preparata. U našoj zemlji kao i mnogim zemljama Mediterana, biljka kičica se zbog svog blagotvornog dejstva tradicionalno koristi za tretman dijabetesa.

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije imala su za cilj rasvetljavanje mehanizama antioksidativnog i protektivnog dejstva EK koji doprinose očuvanju strukture i funkcije  $\beta$ -ćelija pankreasa i ublažavanju komplikacija u eksperimentalnom modelu dijabetesa pacova. U tu svrhu najpre je ispitan fitohemijski sastav i antioksidativni potencijal EK pripremljenog od nadzemnih

delova biljaka. Zatim je ispitan efekat ekstrakta na sistemski oksidativni stres kao i antioksidativni efekat u jetri i bubregu pacova na model sistemu dijabetesa izazvanom višekratnim injeciranjem rastvora STZ-a. Posebna pažnja je posvećena ispitivanju uticaja EK na molekularne mehanizme uključene u regulaciju preživljavanja i funkcionalnosti  $\beta$ -ćelija pankreasa.

### **5.1. Fitohemijska karakterizacija i antioksidativni potencijal ekstrakta kičice**

Poznato je da fitohemijski sastav biljaka određuje njihovu biološku aktivnost. Kvalitativna i kvantitativna karakterizacija metanolnog ekstrakta nadzemnih delova kičice (EK) pokazala je da sekoiridoidi i polifenoli (uključujući ksantone i flavonoide) čine najzastupljenije komponente ekstrakta. Ovi rezultati u skladu su sa prethodnim fitohemijskim ispitivanjima sastava nadzemnih delova kičice (Šiler i sar., 2014; Stefkov i sar., 2014). Sekoiridoidi, koji su identifikovani kao dominantna jedinjenja u EK, predstavljaju iridoidne glikozide prisutne u izobilju u svim predstavnicima familije Gentianaceae. S'obzirom da su kvalitativni sadržaj i međusobni kvantitativni odnos sekoiridoida specifični za svaku vrstu, ovi sekundarni metaboliti se često koriste kao filogenetski i taksonomski markeri (Jensen i Schripsema, 2002; van der Sluis, 1985). Literaturni podaci ukazuju da svercijamarin, sverozid i genciopikrin, a koji su detektovani u EK kao najzastupljenija jedinjenja iz grupe sekoiridoida, imaju širok spektar biološkog dejstva, uključujući antifungicidno, antibakterijsko (Šiler i sar., 2010), gastroprotektivno (Niiho i sar., 2006), hepatoprotektivno (Kondo i sar., 1994), sedativno (Bhattacharya i sar., 1976) i antitumorsko dejstvo (Ishiguro i sar., 1988). Sa druge strane, polifenolna jedinjenja identifikovana u EK (kafeinska, *p*-kumarna, ferulinska i sinapinska kiselina, luteolin, apigenin, kvercetin, izokvercitrin, astragalin, naringenin i ksantoni) poseduju jaka antioksidativna svojstva (Choi i sar., 2013; Erlund i sar., 2001; Jung, H.A. i sar., 2006; Martinez i sar., 2012; Romanova i sar., 2001; Teixeira i sar., 2013; Valentova i sar., 2014). Antioksidativna svojstva polifenola u direktnoj su vezi sa njihovom strukturom. Naime, prisustvo jednog ili više aromatičnih prstenova sa jednom ili više

hidroksilnih grupa polifenolnim jedinjenjima omogućava neutralizaciju slobodnih radikala pri čemu sama postaju relativno stabilni radikali (Halliwell i Gutteridge, 2015).

Antioksidativna aktivnost EK najpre je ispitana upotrebom različitih *in vitro* kolorimetrijskih testova koji omogućavaju brzu i jednostavnu analizu antioksidativnog potencijala supstanci od interesa. Značaj upotrebe ovih testova u preliminarnim ispitivanjima se ogleda u tome što slab antioksidativni potencijal u *in vitro* uslovima znači da će ispitivana supstanca verovatno imati slabu antioksidativnu aktivnost *in vivo*. EK je ispoljio snažnu antioksidativnu aktivnost u *in vitro* uslovima. Detektovana sposobnost neutralizacije  $H_2O_2$  i  $NO\cdot$  je za sve analizirane koncentracije EK bila veća od standardnih supstanci. Efikasna neutralizacija  $H_2O_2$  i  $NO\cdot$  od strane EK može se pripisati detektovanim polifenolnim jedinjenjima. U skladu sa tim, rezultati ove doktorske disertacije pokazali su korelaciju između *in vitro* antioksidativne aktivnosti EK i ukupne količine polifenola, odnosno fenola i flavonoida. Za razliku od detektovane efikasne neutralizacije  $H_2O_2$  i  $NO\cdot$ , EK je ispoljio nižu sposobnost neutralizacije DPPH $\cdot$  radikala u poređenju sa referentnom askorbinskom kiselinom. Opisane razlike mogu se pripisati različitim mehanizmima antioksidativne reakcije u korišćenim testovima koji uključuju prisustvo međusobno različitih reaktivnih vrsta. Ispitivanje redukujućeg potencijala pokazalo je da EK ima sposobnost redukcije  $Fe^{3+}$  do  $Fe^{2+}$ , što zajedno sa pokazanom sposobnošću EK da helira  $Fe^{2+}$  ukazuje na njegovu sposobnost da spreči Fentonovu reakciju i formiranje slobodnih radikala ( $OH\cdot$  i  $HO\cdot$ ). Sposobnost ekstrakta da redukcije  $Fe^{3+}$  do  $Fe^{2+}$  je od naročitog značaja za efikasan transport kiseonika u eritrocitima koji zahteva reverzibilno vezivanje  $O_2$  za fero hemoglobin ( $HbFe^{2+}$ ) (Umbreit, 2007). Prikazani rezultati u skladu su sa prethodnim istraživanjima koja su pokazala značajnu antioksidativnu aktivnost kako samog ekstrakta kičice tako i pojedinačnih komponenti prisutnih u ekstraktu (Nićiforović i Abramović, 2014; Romanova i sar., 2001; Šiler i sar., 2014; Valenta i sar., 2001, 2003). S' obzirom na detektovani značajan antioksidativni potencijal EK u *in vitro* uslovima, u daljem toku istraživanja analiziran je njegov antioksidativni efekat u *in vivo* eksperimentalnom modelu dijabetesa.

## 5.2. Ekstrakt kičice poboljšava biohemijske parametre dijabetesa

Antioksidativni i protektivni efekti EK u *in vivo* uslovima ispitani su na eksperimentalnom modelu dijabetesa kod pacova izazvanom STZ-om. Četiri nedelje nakon izazivanja dijabetesa, kod životinja su zabeleženi tipični simptomi bolesti: gubitak telesne mase praćen porastom nivoa glukoze, GlyHb, triglicerida (TG), LDL holesterola i padom nivoa insulina u cirkulaciji. Zabeleženi gubitak telesne mase kod dijabetičnih pacova može se pripisati padu nivoa insulina usled narušavanja strukture i funkcije  $\beta$ -ćelija, što za posledicu ima umanjeno dejstvo ovog hormona. Kao analog glukoze, STZ se selektivno akumulira u  $\beta$ -ćelijama pankreasa posredstvom GLUT-2 transportera i dovodi do razaranja  $\beta$ -ćelija i smanjenja nivoa insulina u cirkulaciji. U normalnim fiziološkim uslovima povišen nivo glukoze u cirkulaciji podstiče sekreciju insulina koji aktivira receptore za insulin (IR) na membranama adipocita, srčanog i skeletnih mišića. Aktivacijom IR pokreće se signalna kaskada koja dovodi do translokacije GLUT-4 transportera na ćelijsku membranu, preuzimanja glukoze od strane adipocita i mišićnih ćelija i snižavanja nivoa glukoze u cirkulaciji (White i Copps, 2016). Pored toga, insulin u masnom tkivu sprečava proces lipolize i pojačava sintezu TG koji se skladište u adipocitima. U nedostatku insulina mišićne ćelije i adipociti ne mogu da koriste glukozu kao primarni izvor energije pa se potrebna energija obezbeđuje razgradnjom lipida i proteina što za posledicu ima gubitak telesne mase (Chen i Ianuzzo, 1982). Takođe, usled izostanka antilipolitičkog efekta insulina u adipocitima pojačava se proces hidrolize TG što dovodi do porasta nivoa slobodnih masnih kiselina (SMK) u cirkulaciji i njihovog nagomilavanja u jetri. Porast nivoa SMK u jetri pojačava proizvodnju i sekreciju lipoproteina veoma male gustine (eng. *very-low-density lipoprotein* - VLDL). Pored toga, usled nedostatka insulina smanjena je aktivnost lipoprotein lipaze (LPL) koja katalizuje hidrolizu TG iz lipoproteina što dovodi do povećanja nivoa TG i LDL holesterola (Subramanian i Chait, 2012). Povećanje nivoa LDL holesterola uz povećanje stope njegove oksidacije u uslovima dijabetesa predstavlja jedan od glavnih faktora koji dovode do razvoja ateroskleroze i ishemijske bolesti srca (Yang i sar., 2012).

Redovni unos EK smanjio je koncentraciju glukoze i povećao nivo insulina u cirkulaciji što je bilo udruženo sa smanjenjem nivoa TG i LDL holesterola i ublaženim gubitkom telesne mase dijabetičnih pacova. Pokazani hipoglikemijski efekat primene EK u saglasnosti je sa prethodnim istraživanjima koja su ukazala da EK povećava iskoristljivost glukoze u perifernim tkivima, smanjuje resorpciju glukoze u crevima, povećava sintezu glikogena i smanjuje proces glukoneogeneze u jetri (Sefi i sar., 2011; Stefkov i sar., 2014). U istraživanju Loizzo i saradnika (2008), koje je za cilj imalo ispitivanje efekta ekstrakata različitih biljaka koje se koriste u narodnoj medicini na aktivnost digestivnih enzima, pokazano je da hloroformski ekstrakt pripremljen od nadzemnih delova kičice smanjuje aktivnost  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze. Smanjujući aktivnost ovih digestivnih enzima, ekstrakt usporava razgradnju skroba i oligosaharida i time smanjuje resorpciju glukoze (Loizzo i sar., 2008). Pored toga, pokazano je i da pojedinačna polifenolna jedinjenja koja su identifikovana u EK u okviru ove teze mogu smanjiti resorpciju ugljenih hidrata iz creva putem inhibicije aktivnosti  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze kao i blokiranjem transportera za glukozu zavisnih od  $\text{Na}^+$ . Polifenoli za koje je pokazano da smanjuju apsorpciju glukoze iz creva nekim od navedenih mehanizama uključuju naringenin, kvercetin, apigenin, luteolin, kafeinsku i ferulinsku kiselinu (Adisakwattana i sar., 2009; Johnston i sar., 2005; Li i sar., 2006; Tadera i sar., 2006; Welsch i sar., 1989).

Ispitujući efekat metanolnog ekstrakta nadzemnog dela kičice na metabolizam ugljenih hidrata u jetri, Stefkov i sar. (2014) su pokazali da ekstrakt povećava aktivnost glikogen fosforilaze  $\alpha$  i smanjuje aktivnost glukozo-6-fosfataze. Usled smanjene aktivnosti glukozo-6-fosfataze smanjuje se nivo glukoze u jetri ali i povećava nivo glukozo-6-fosfata koji podstiče aktivnost glikogen sintaze što, zajedno sa povećanom aktivnošću glikogen fosforilaze  $\alpha$ , povećava proizvodnju glikogena (Stefkov i sar., 2014). Upotreba kvercitrina (kvercetin-O-glukozid) i apigenina kod dijabetičnih pacova takođe blokira aktivnost glukozo-6-fosfataze (Babujanarthanam i sar., 2010; Panda i Kar, 2007), dok primena etil-acetatne frakcije pirinčanih mekinja, koja sadrži značajnu količinu ferulinske, *p*-kumarne i sinapinske kiseline, povećava aktivnost glukokinaze i proizvodnju glikogena u jetri *db/db* miševa (Jung i sar., 2007). Naringenin i kafeinska kiselina podstiču

preuzimanje glukoze od strane ćelija skeletnih mišića i na taj način dodatno doprinose regulaciji koncentracije glukoze (Lee i sar., 2007; Zygmunt i sar., 2010).

U okviru ove doktorske disertacije pokazana je povećana koncentracija insulina u serumu dijabetičnih pacova tretiranih EK, što je naročito bilo izraženo u pretretiranoj grupi životinja. To je u skladu sa podacima Sefi i saradnika (2011) koji su pokazali da ekstrakt pripremljen iz listova kičice značajno povećava koncentraciju insulina u serumu dijabetičnih pacova. U istraživanju Stefkov i saradnika (2014) ukazano je da ekstrakt kičice, zahvaljujući gorkom ukusu sekoiridoida i ksantona, može podstaći proces izlučivanja hormona i enzima u gastrointestinalnom traktu i povećati sekreciju insulina iz preostalih  $\beta$ -ćelija pankreasa; povećana količina insulina u cirkulaciji, za uzvrat, doprinosi poboljšanju metabolizma glukoze. Osim toga, pokazano je i da ishrana bogata polifenolima može doprineti povećanoj sekreciji insulina od strane  $\beta$ -ćelija pankreasa (Hanhineva i sar., 2010). Rezultati prikazani u ovoj tezi upućuju na to da povećanje nivoa insulina nakon tretmana EK može biti i rezultat očuvanja strukturnih i funkcionalnih parametara (povećane zaštite) ostrvaca pankreasa o čemu će, kao i o regulatornim mehanizmima koji utiču na povećano preživljavanje i funkcionalnost  $\beta$ -ćelija, biti više reči u [Poglavlju 5.5](#).

Tretman dijabetičnih pacova EK poboljšao je njihov lipidni status – smanjio je nivo LDL holesterola kod pretretirane grupe i nivo TG kod obe grupe dijabetičnih životinja. Ovi rezultati su u saglasnosti sa istraživanjima u kojima je pokazano da ekstrakt pripremljen iz listova kičice značajno smanjuje koncentracije triglicerida i ukupnog holesterola u serumu dijabetičnih pacova (Sefi i sar., 2011). Primena svercijamarina kod pacova sa DT2 izazvanim STZ-om značajno smanjuje nivo triglicerida, ukupnog i LDL holesterola u serumu i povećava osetljivost na insulin (Vaidya i sar., 2012), dok tretman rutinom smanjuje koncentraciju glukoze i poboljšava lipidni status kod dijabetičnih pacova (Fernandes i sar., 2010) i osoba obolelih od dijabetesa (Sattanathan i sar., 2011). U preglednom članku o kardioprotektivnom dejstvu polifenola prisutnih u hrani, autori Zern i Fernandez (2005) navode da polifenoli smanjuju preuzimanje holesterola iz limfe a time i nivo holesterola koji hilomikronima dospeva u jetru. Da bi se nadoknadila koncentracija holesterola u jetri povećava se ekspresija i aktivnost LDL receptora

na površini hepatocita što smanjuje nivo LDL holesterola u cirkulaciji. Pored toga, polifenoli u jetri smanjuju aktivnosti MTP (eng. *microsomal triglyceride transfer protein*) i ACAT2 (eng. *acyl-CoA cholesterol acyltransferase*) kao i nivo apolipoproteina B-100, čime smanjuju sintezu i sekreciju VLDL čestica. Polifenoli istovremeno povećavaju aktivnost LPL što dodatno smanjuje nivo VLDL i TG u cirkulaciji (Zern i Fernandez, 2005). Na osnovu ovih podataka, može se pretpostaviti da primena EK, koji je bogat različitim polifenolnim jedinjenjima, može putem opisanog mehanizma uticati na poboljšanje lipidnog statusa dijabetičnih pacova i time smanji rizik od razvoja ateroskleroze. Prikazani rezultati su pokazali da je pozitivan efekat primene EK bio izraženiji kod pretretirane grupe dijabetičnih životinja što ukazuje na to da bi tretman EK nakon razvoja dijabetesa bio efikasniji ukoliko bi se ekstrakt koristio kao dodatak ishrani preventivno, pre razvoja bolesti.

Ovako definisan model eksperimentalnog dijabetesa u daljim istraživanjima je korišćen za ispitivanje uticaja EK na sistemski oksidativni stres praćenjem stepena oštećenja eritrocita, a zatim i za ispitivanje efekta EK na ublažavanje oksidativnog stresa u jetri i bubregu što može biti od značaja za odlaganje pratećih komplikacija bolesti.

### **5.3. Ekstrakt kičice smanjuje sistemski oksidativni stres i doprinosi očuvanju strukturnih i funkcionalnih parametara eritrocita**

Ulogom u transportu kiseonika, eritrociti su neprestano izloženi povećanom riziku od oksidativnog oštećenja i prvi odgovaraju na povišen nivo oksidativnog stresa u uslovima hiperglikemije. Zbog toga stepen oštećenja eritrocita može odražavati izloženost organizma sistemskom oksidativnom stresu. Kao parametri sistemskog oksidativnog stresa prepoznati su povišeni nivo lipidne peroksidacije kao i sniženi nivo ukupnog antioksidativnog potencijala (eng. *total antioxidant capacity*, TAC) u plazmi. Porast nivoa TBARS posledica je povećanog nivoa sistemskih ili hidroperoksida poreklom iz neurona, dok opadanje TAC-a reflektuje pad ukupnog nivoa antioksidativnih supstanci u plazmi (Serra i sar., 2009). Upotreba vitamina C, E,  $\beta$ -karotena ili hrane bogate polifenolima može značajno

povećati TAC (Psotova i sar., 2001). Iako upotreba testova za određivanje TAC može biti korisna za sticanje uvida u relativnu antioksidativnu aktivnost supstance od interesa u različitim biološkim tečnostima, dobijene rezultate treba tumačiti u skladu sa mehanizmom antioksidativne reakcije u korišćenom testu (Halliwell i Gutteridge, 2015). Takođe, za određivanje TAC polifenolnih jedinjenja u *in vivo* sistemu treba uzeti u obzir različite stope apsorpcije i metabolizma pojedinačnih polifenola. Nakon apsorpcije u crevima polifenoli i njihovi metaboliti dospevaju u jetru gde može doći do njihove dodatne digestije. Nakon toga metaboliti polifenola dospevaju u cirkulaciju i transportuju se do ciljnih tkiva gde se akumuliraju i ostvaruju svoja biološka dejstva ili se uklanjaju iz organizma putem urina ili žuči (Scalbert i sar., 2002). U zavisnosti od vrste, polifenoli dostižu maksimalnu koncentraciju u plazmi u roku od 30 min do nekoliko sati, pri čemu je i vreme poluživota polifenola određeno sličnim vremenskim intervalom (Manach i sar., 2005). Imajući u vidu da antioksidativni kapacitet polifenola zavisi od njihovog nivoa u cirkulaciji, određivanje TAC za smešu različitih polifenola u jednoj vremenskoj tački ne može adekvatno da prikaže njen antioksidativni potencijal. Stoga je efekat EK na sistemski oksidativni stres u ovoj doktorskoj disertaciji ispitan na eritrocitima izolovanim iz životinja praćenjem promena biomarkera karakterističnih za oksidativni stres. Rezultati su pokazali da dijabetes uzrokuje poremećaj u održavanju redoks ravnoteže u eritrocitima. Kod dijabetičnih životinja uočen je povećan stepen glikozilacije i oksidacije proteina, povećan nivo lipidne peroksidacije kao i poremećaj u endogenom sistemu antioksidativne zaštite eritrocita. Redovni unos EK kod dijabetičnih životinja smanjio je stepen oksidativnih oštećenja eritrocita i poboljšao njihov antioksidativni potencijal, što je bilo udruženo sa smanjenjem stepena glikacije/glikozilacije proteina u eritrocitima.

Zbog velikog udela polinezasićenih masnih kiselina, membrane eritrocita su naročito podložne procesu lipidne peroksidacije (Rizvi i sar., 2005). Značajan porast nivoa lipidne peroksidacije u eritrocitima dijabetičnih pacova prikazan u ovoj disertaciji dosledan je sa rezultatima prethodnih studija (Mohamed i sar., 2013; Ozkol i sar., 2013) i ukazuje na povećanu proizvodnju ROS-ova i/ili smanjenu efikasnost sistema antioksidativne zaštite. Usled povećanog nivoa



lipidne peroksidacije u eritrocitima smanjuje se fluidnost membrane što dovodi do morfoloških i funkcionalnih promena u eritrocitima (Bryszewska i sar., 1995). Primena EK je mogla da doprinese zaštiti membrana eritrocita od lipidne peroksidacije zahvaljujući sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Prethodna istraživanja su jasno pokazala da svercijamarin, ferulinska kiselina, kempferol, kvercetin i rutin smanjuju nivo lipidne peroksidacije kod pacova sa eksperimentalno izazvanim dijabetesom (Al-Numair i sar., 2015; Elbe i sar., 2015; Jaishree i Badami, 2010; Wang i sar., 2015).

Smanjene aktivnosti SOD, CAT i GR enzima u eritrocitima dijabetičnih pacova detektovane u ovoj doktorskoj disertaciji su u skladu sa prethodnim istraživanjima (Mihailović i sar., 2012; Ozkol i sar., 2013; Ramkumar i sar., 2014; Sureka i sar., 2015). Prikazani rezultati ukazuju na to da u odsustvu efikasne zaštite koju pružaju SOD, CAT i GR, uočeno blago povećanje aktivnosti GPx u eritrocitima dijabetičnih životinja nije dovoljno da spreči štetne posledice povećane količine slobodnih radikala. U eritrocitima dijabetičnih pacova uočen je i smanjen odnos GSH/GSSG što može biti posledica smanjene redukcije GSSG usled niže aktivnosti GR. Primena EK je normalizovala aktivnosti enzima antioksidativne zaštite, odnos GSH/GSSG i nivo S-glutationilovanih proteina i time značajno popravila antioksidativni kapacitet eritrocita dijabetičnih životinja. Ovi rezultati su u skladu sa podacima koji pokazuju da ekstrakt kičice povećava aktivnost enzimskih i neenzimskih antioksidanasa u pankreasu dijabetičnih pacova (Sefi i sar., 2011) i da astragalín, kempferol i kvercetin doprinose očuvanju količine GSH u eritrocitima u uslovima oksidativne hemolize (Choi i sar., 2013). Poboljšanje aktivnosti SOD, CAT i GR u eritrocitima dijabetičnih životinja tretiranih ekstraktom kičice moglo je doprineti i očuvanje katalitičkog potencijala enzima usled neutralizacije slobodnih radikala i sprečavanja njihovog formiranja od strane polifenolnih jedinjenja prisutnih u ekstraktu. Prema literaturnim podacima, prisustvo NO• blokira katalitičku hem grupu CAT čime smanjuje njenu aktivnost i povećava količinu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i oštećenje tkiva (Brown, 1995).

Poboljšanje redoks statusa u eritrocitima dijabetičnih pacova tretiranih EK može biti rezultat kako direktne inhibicije slobodnih radikala tako i poboljšane kontrole glikemije. Povećana koncentracija glukoze u cirkulaciji podstiče proces

neenzimatske reakcije između slobodne aldehidne grupe glukoze i slobodnih aminokiselinskih grupa Hb i formiranje GlyHb. Koncentracija GlyHb se povećava proporcionalno porastu koncentracije glukoze u krvi pa se u kliničkim ispitivanjima koristi u cilju praćenja razvoja bolesti i efikasnosti terapije (Wolffenbuttel i sar., 1996). Proces glikacije, pored Hb, zahvata i druge proteine u eritrocitima i serumu dijabetičnih osoba i uzrokuje formiranje i nagomilavanje krajnjih proizvoda glikacije (AGE) koji promenama strukturnih i funkcionalnih svojstava proteina dovode do razvoja komplikacija (Nawale i sar., 2006). Prethodne studije su pokazale da glikacija SOD, CAT i GR smanjuje njihovu enzimatsku aktivnost (Blakytyn i Harding, 1992; Yan i Harding, 1997). Pored toga, Mihailović i saradnici (2012) su pokazali da se smanjena aktivnost CAT i SOD u eritrocitima dijabetičnih pacova dovodi u vezu sa povećanom posttranslacionom O-GlcNAc modifikacijom ovih enzima. Smanjenje stepena glikacije proteina seruma i glikozilacije proteina u eritrocitima dijabetičnih pacova nakon primene EK može se pripisati ranije opisanim mehanizmima hipoglikemijskog efekta ekstrakta i/ili njegovih pojedinačnih komponenti.

Povećani nivo glukoze u cirkulaciji negativno utiče na osnovnu funkciju eritrocita – razmenu gasova. Kao posledica promena biohemijskih parametara u plazmi i eritrocitima tokom dijabetesa dolazi do poremećaja reoloških osobina eritrocita i, posledično, protoka krvi. Na ćelijskom nivou, u ovako pogođene parametre eritrocita ubrajaju se sposobnost agregacije i deformabiliteta (Caimi i sar., 1993). Poznato je da se stopa agregacije eritrocita tokom dijabetesa povećava a pokazana je i pozitivna korelacija između procesa agregacije i koncentracije  $\alpha 2$  makroglobulina u plazmi (Torregiani i sar., 1995). Pored toga, deformabilitet eritrocita, koji ima važnu ulogu u procesu razmene gasova u mikrocirkulaciji, je značajno smanjen u dijabetesu. Glavni faktori koji utiču na deformabilitet eritrocita uključuju oblik ćelije, mehanička svojstva ćelijske membrane i citoskeleta i unutarćelijski viskozitet (Cho i sar., 2008). Signalni put PI3K/Akt je takođe uključen u regulaciju deformabiliteta eritrocita jer je pokazano da se blokiranjem ovog signalnog puta upotrebom vortmanina, specifičnog inhibitora PI3K, smanjuje deformabilitet eritrocita (Suhr i sar., 2012). Usled smanjenog deformabiliteta i povećane agregacije eritrocita povećava se viskoznost krvi što dodatno doprinosi

poremećaju mikrocirkulacije u dijabetesu (Cho i sar., 2008). Povećana aktivnost Akt kinaze u eritrocitima i smanjen nivo  $\alpha 2M$  u serumu dijabetičnih pacova tretiranih EK, prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji, sugerišu da primena EK može smanjiti viskoznost krvi i time doprineti poboljšanju mikrocirkulacije u dijabetesu čime bi se obezbedila adekvatna oksigenacija tkiva i organa. Ovakav efekat EK može poticati od flavona apigenina za koji je pokazano da inhibira proces adhezije trombocita (Navarro-Nunez i sar., 2008). S' obzirom da zreli eritrociti nemaju jedro i da stoga zavise od prethodno sintetisanih proteina, prikazani rezultati ukazuju da upotreba antioksidanasa kao dodataka u ishrani može da doprinese održavanju strukture i funkcije eritrocita.

#### **5.4. Ekstrakt kičice ublažava oksidativni stres i doprinosi očuvanju funkcije jetre i bubrega dijabetičnih pacova**

Poboljšanje biohemijskih parametara karakterističnih za dijabetes kao i funkcionalnih osobina eritrocita kod dijabetičnih životinja navodi na zaključak da primena EK, preko poboljšanja mikrocirkulacije i omogućavanja adekvatne ishrane tkiva i organa, može smanjiti rizik za razvoj komplikacija koje prate dijabetes ili pak usporiti njihov razvoj i ublažiti štetne posledice. Poznato je da hiperglikemija i sa njome udruženi oksidativni stres predstavljaju glavne uzročnike razvoja mikrovaskularnih komplikacija u dijabetesu, kao što su hepatopatija i nefropatija.

Jetra ima važnu ulogu u regulisanju normalne homestaze glukoze – tokom gladovanja proizvodi glukozu a nakon obroka višak glukoze skladišti u vidu glikogena. Neto proizvodnja glukoze u jetri rezultat je procesa glukoneogeneze, sinteze glikogena, glikogenolize i glikolize (Petersen i sar., 2017). Regulacija metabolizma glukoze u jetri u velikoj meri je regulisana insulinom. Naime, vezivanje insulina za IR na membrani hepatocita smanjuje proces glikogenolize. Pored toga, insulin smanjuje proizvodnju glukoze u jetri i indirektno putem inhibicije procesa lipolize i sekrecije glukagona kao i promenama neuronalnih signala u jetri izazvanih delovanjem insulina u mozgu (Edgerton i sar., 2017). Imajući to u vidu, nedostatak insulina u uslovima dijabetesa povećava proizvodnju glukoze u jetri, što dodatno doprinosi pogoršanju hiperglikemije. S' obzirom da bez

adekvatnog delovanja insulina mišićne ćelije i adipociti ne mogu da koriste glukozu kao izvor energije, o čemu je već bilo reči, povećava se akumulacija glukoze u tkivima neosetljivim na insulin, kao što su bubrezi, retina, periferni nervi i krvni sudovi. Povećanje nivoa glukoze u pomenutim tkivima, putem mehanizama koji uključuju autooksidaciju glukoze, povećanu proizvodnju  $\cdot O_2$  u mitohondrijama, aktivaciju NF $\kappa$ B transkripcionog faktora kao i pojačanu aktivnost puta poliola, puta heksozamina, procesa glikacije i PKC, a koji su detaljno opisani u uvodnom delu ([Poglavlje 1.2.3.](#)), dovodi do njihovog oštećenja i razvoja komplikacija.

Za rano dijagnostikovanje dijabetesa i pratećih komplikacija u kliničkoj praksi se kao biohemijski markeri koristi nekoliko enzima i jedinjenja, uključujući AST, ALT, BUN i kreatinin. Aspartat i alanin aminotransferaze (AST i ALT) predstavljaju enzime koji se u visokoj koncentraciji nalaze u hepatocitima gde katalizuju prenos  $\alpha$ -amino grupa sa aspartata (AST) i alanina (ALT) na  $\alpha$ -keto grupu ketoglutarne kiseline. Tom prilikom nastaju oksaloacetatna i piruvinska kiselina koje učestvuju u ciklusu limunske kiseline. Oštećenje jetre dovodi do povećanja nivoa AST i ALT u serumu pa se stoga njihova koncentracija koristi kao pokazatelj oštećenja jetre (Soares i sar., 2013). Određivanje nivoa BUN-a i kreatinina u serumu predstavlja najjednostavniji način za praćenje funkcionisanja bubrega (Dabla, 2010). Ova organska jedinjenja nastaju kao sporedni proizvodi tokom metabolizma proteina u jetri (BUN), odnosno kreatina i kreatin-fosfata (kreatinin) u mišićima i u fiziološkim uslovima se izlučuju iz organizma putem urina. Povećane koncentracije AST i ALT enzima, odnosno BUN-a i kreatinina u serumu dijabetičnih životinja četiri nedelje nakon poslednje doze STZ-a prikazane u ovoj studiji ukazuju na oštećenja jetre i bubrega i poremećaj njihovog funkcionisanja. Osim toga, kod dijabetičnih životinja je zabeleženo povećanje relativne mase jetre i bubrega, što ukazuje na hipertrofiju organa. Hipertrofija jetre u odnosu na telesnu masu može biti posledica akumulacije triglicerida u jetri usled povećanog priliva masnih kiselina u uslovima hipoinsulinemije, kao i smanjenog kapaciteta izlučivanja lipoproteina iz jetre usled poremećaja u sintezi apolipoproteina B (Ohno i sar., 1999). Do hipertrofije glomerula dolazi u ranoj fazi razvoja patoloških promena u bubregu usled lokalnih promena u proizvodnji pojedinih faktora rasta i/ili njihovih receptora (Malatiali i sar., 2008). Primena EK

značajno je smanjila koncentracije ALT, AST, BUN-a i kreatinina i smanjila relativne mase organa, ukazujući na protektivni efekat EK na funkcionisanje jetre i bubrega u uslovima dijabetesa. Treba napomenuti da je pozitivni efekat primene EK na parametre funkcionisanja jetre bio nešto izraženiji kod pretretirane grupe dijabetičnih životinja u odnosu na posttretman, dok su parametri funkcionisanja bubrega bili u istoj meri poboljšani nakon oba tretmana ekstraktom. Hepatoprotektivni efekat EK je zabeležen u literaturi (Mroueh i sar., 2004), dok je, prema dostupnim podacima, renoprotektivni efekat ekstrakta po prvi put pokazan u ovoj doktorskoj disertaciji. Hepatoprotektivni efekat EK može se pripisati najzastupljenijim komponentama detektovanim u njegovom sastavu, odnosno svercijamarinu, sverozidu i genciopikrinu za koje je pokazano da ispoljavaju hepatoprotektivno dejstvo (Kondo i sar., 1994). Pored toga, ispoljeni protektivni efekat EK u jetri i bubregu dijabetičnih životinja može biti posledica pokazanog hipoglikemijskog ali i antioksidativnog dejstva akumuliranih polifenolnih jedinjenja i njihovih metabolita poreklom iz EK.

Oksidativni stres nastao kao posledica hiperglikemije prouzrokuje oštećenja molekula DNK, lipida i proteina u tkivima i organima, što je pokazano i u okviru ove studije. Oksidativno oštećenje membranskih lipida predstavlja jedan od prvih koraka koji vodi do povećane produkcije slobodnih radikala. Tretman EK je prevenirao razvoj lipidne peroksidacije u jetri i bubregu dijabetičnih životinja čime se može pretpostaviti njegov doprinos očuvanju integriteta membrane i funkcionalnosti ovih organa. Ovi rezultati su u saglasnosti sa istraživanjima u kojima je pokazano da ferulinska kiselina smanjuje koncentraciju MDA u jetri i bubregu dijabetičnih miševa (Ramar i sar., 2012), kao i da primena svercijamarina, najzastupljenije komponente u EK, smanjuje nivo lipidne peroksidacije u serumu, jetri i bubrezima pacova tretiranih D-galaktozaminom (Jaishree i Badami, 2010). Ispitujući efekat kempferola na ublažavanje oksidativnog stresa kod pacova sa dijabetesom izazvanim primenom STZ-a, grupa autora je pokazala da kempferol smanjuje nivo TBARS i lipidnih hidroperoksida u jetri i bubregu i povećava nivo enzimskih i neenzimskih antioksidanasa (Al-Numair i sar., 2015). Smanjenje nivoa lipidne peroksidacije i povećanje endogenih antioksidanasa je zabeleženo i nakon tretmana dijabetičnih pacova rutinom (Kamalakkannan i Stanely Mainzen Prince,

2006). Pored toga, pokazano je i da primena kvercetina redukuje nivo lipidne peroksidacije u jetri i bubregu miševa sa dijabetesom izazvanim primenom aloksana (Alam i sar., 2014). Tretman dijabetičnih miševa kvercetinom u istoj studiji smanjio je i stepen oksidativnog oštećenja molekula DNK u pomenutim organima. U skladu sa ovim rezultatom, primena EK kod dijabetičnih životinja u ovoj disertaciji je značajno smanjila stepen oštećenja molekula DNK u jetri i bubregu čime je dodatno pokazano citoprotektivno dejstvo ekstrakta u uslovima dijabetesa. Da kvercetin, ali i druge komponente prisutne u EK štite molekul DNK od oštećenja pokazano je u različitim modelima oksidativnog stresa. Tako kvercetin smanjuje nivo 8-hidroksidezoksiguanozina, jednog od markera oštećenja molekula DNK, u bubregu pacova tretiranih olovom (Liu i sar., 2010), a pokazan je i njegov protektivni efekat nakon tretmana životinja dietilnitrozaminom (DEN), potentnog hepatokarcinogenog jedinjenja prisutnog u duvanskom dimu (Gupta i sar., 2010). Primena apigenina takođe smanjuje genotoksični efekat DEN-a u jetri (Ali i sar., 2014). Pretretman Sprague-Dawley pacova kafeinskom kiselinom doprinosi očuvanju diploidije u ćelijama jetre i bubrega narušene primenom metamfetamina (Koriem i sar., 2013), dok tretman ferulinskom kiselinom smanjuje nivo DNK oštećenja u uslovima oksidativnog stresa izazvanog sepsom (Bacanli i sar., 2014).

Redoks status jetre i bubrega određen je odnosom redukovanog i oksidovanog glutationa (GSH/GSSG). Kao što je već naglašeno, GSH predstavlja jedan od najvažnijih neenzimskih antioksidanasa u ćeliji. U uslovima povećanog oksidativnog stresa GSH učestvuje u uklanjanju slobodnih radikala i tom prilikom se redukuje što za posledicu ima smanjenje odnosa GSH/GSSG. Osim smanjenog odnosa GSH/GSSG u jetri i bubregu dijabetičnih pacova, u ovoj doktorskoj disertaciji je uočen i porast nivoa GSSP kao posledice oksidativnog stresa. Ovi rezultati su u saglasnosti sa podacima o smanjenom nivou GSH u jetri i bubregu pacova sa dijabetesom izazvanim primenom STZ-a (Sellamuthu i sar., 2013; Singh i sar., 2013; Sugumar i sar., 2016). Tretman EK značajno je smanjio prisustvo GSSP u jetri i bubregu dijabetičnih pacova što je korelisalo sa povećanjem odnosa GSH/GSSG i ukazalo na to da EK štiti tkivo jetre i bubrega od oksidativnog stresa.

Ovo protektivno dejstvo EK se može pripisati poboljšanju endogenog sistema antioksidativne zaštite u jetri i bubregu nakon primene EK na šta ukazuju rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji. U bubregu dijabetičnih životinja aktivnosti CAT, MnSOD i CuZnSOD enzima su bile smanjene dok su aktivnosti GPx i GR bile povećane što je u skladu sa prethodnim istraživanjima (Kedziora-Kornatowska i sar., 2000; Mekinova i sar., 1995; Mihailović i sar., 2013b). Pojačana aktivnost GPx, verovatno je pokrenuta povećanjem prisustva ROS-ova, i u skladu je sa povećanjem prisustva samog GPx proteina koje je uočeno u bubregu dijabetičnih životinja. Iako nije uočeno povećanje nivoa GR proteina, povećana aktivnost ovog enzima može biti pokrenuta usled povećanja nivoa njegovog supstrata GSSG, a koji se produkuje posredstvom GPx. Smanjene aktivnosti CAT, MnSOD i CuZnSOD korelisale su sa smanjenim nivoom ovih enzima u bubregu dijabetičnih životinja. Pored toga, pad u aktivnosti CAT, MnSOD i CuZnSOD u uslovima dijabetesa može se pripisati i inhibitornom dejstvu slobodnih radikala na katalitičke centre enzima (Brown, 1995). Povećanje aktivnosti CAT, MnSOD i CuZnSOD u bubregu dijabetičnih životinja nakon tretmana EK delimično se može pripisati povećanju nivoa proteina za date enzime, ali i uticaju ekstrakta na smanjenje nivoa glikozilacije samih enzima. Na ovakav zaključak sa jedne strane, upućuju rezultati prikazani u ovoj tezi gde je pokazano da primena EK dovodi do smanjenja nivoa glikozilacije proteina u eritrocitima dijabetičnih životinja, a sa druge strane literaturni podaci. Istraživanja su pokazala da je smanjena aktivnost CuZnSOD i CAT u bubregu dijabetičnih životinja posledica smanjenog nivoa proteina i transkripcije gena datih enzima, kao i njihove povećane posttranslacione modifikacije O-GlcNAc-om (Arambašić i sar., 2013; Mihailović i sar., 2013a).

Pad u aktivnosti CAT, MnSOD, CuZnSOD, GPx i GR enzima u jetri dijabetičnih pacova zabeležen u okviru ove doktorske disertacije može biti posledica delovanja različitih mehanizama pokrenutih oksidativnim stresom. Pad u aktivnosti CuZnSOD u jetri dijabetičnih životinja može se pripisati padu nivoa CuZnSOD proteina, dakle regulaciji na nivou transkripcije. Sa druge strane, proteinski nivoi GR, GPx i MnSOD bili su značajno uvećani dok je nivo proteina CAT ostao nepromenjen. Ovi rezultati se unekoliko razlikuju od rezultata zabeleženih u bubregu dijabetičnih životinja i ukazuju na to da su u različitim organima u

regulaciju aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u uslovima dijabetesa uključeni različiti mehanizmi. Tome u prilog idu i oprečni podaci u vezi sa aktivnošću enzima antioksidativne zaštite u različitim organima, različitim životinjskim modelima i modelima eksperimentalnog dijabetesa (pregledano u Maritim i sar., 2003). Na osnovu toga, kao i podataka o uticaju pojačane glikozilacije CAT, MnSOD i CuZnSOD enzima na smanjenje njihove aktivnosti u jetri dijabetičnih pacova (Mihailović i sar., 2013a), može se pretpostaviti da je sličan mehanizam posttranslacione modifikacije uključen u detektovani pad u aktivnosti CAT, MnSOD, GPx i GR enzima u jetri dijabetičnih pacova prikazan u ovoj tezi. Dinić i saradnici (2013a) ukazuju na to da se u uslovima oksidativnog stresa kao posledice dijabetesa ekspresija CAT i CuZnSOD u jetri reguliše na nivou transkripcije, ne isključujući pritom posttranslacione mehanizme regulacije, dok su za ekspresiju MnSOD od velikog značaja i posttranskripcioni i posttranslacioni mehanizmi regulacije. Može se zaključiti da poboljšanje aktivnosti GR, GPx, MnSOD i CAT enzima u jetri dijabetičnih pacova nakon tretmana EK nije bilo posledica daljeg povećanja proteinskog nivoa ovih enzima. Imajući to u vidu, poboljšanje aktivnosti ovih enzima može biti posledica već opisanog hipoglikemijskog efekta EK koji posledično može smanjiti stepen glikozilacije enzima i tako uticati na njihovu veću aktivnost.

Imajući u vidu rezultate prikazane u okviru ove doktorske disertacije, protektivni efekat EK na funkcionisanje jetre i bubrega kod dijabetičnih životinja može se pripisati udruženom delovanju različitih mehanizama posredovanim ekstraktom, od hipoglikemijskog i antioksidativnog dejstva pa do uticaja na transkripcione i posttranslacione mehanizme regulacije aktivnosti enzima antioksidativne zaštite.

### **5.5. Ekstrakt kičice poboljšava preživljavanje i funkcionalnost $\beta$ -ćelija pankreasa u dijabetesu putem različitih mehanizama delovanja**

Bez obzira na postignuti napredak na polju lečenja dijabetesa, oporavak i održavanje mase funkcionalnih  $\beta$ -ćelija i dalje predstavlja veliki izazov. Imajući u vidu ulogu oksidativnog stresa u narušavanju strukture i funkcije  $\beta$ -ćelija proističe



da bi se njegovim ublažavanjem moglo sprečiti ili bar usporiti propadanje  $\beta$ -ćelija koje karakteriše dijabetes. Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji pokazali su da je tretman dijabetičnih pacova EK doprineo očuvanju strukture i funkcije Langerhansovih ostrvaca pankreasa pa samim tim i povećanju nivoa insulina i boljoj kontroli glikemije. Ispitivanjem molekularnih mehanizama koji se nalaze u osnovi ovog protektivnog dejstva EK pokazano je smanjenje oštećenja molekula DNK, lipida i proteina i poboljšanje nivoa endogenog sistema antioksidativne zaštite u  $\beta$ -ćelijama u uslovima oksidativnog stresa izazvanog primenom  $H_2O_2$ , SNP-a i STZ-a. Modulisanjem prisustva i aktivnosti redoks-senzitivnih transkripcionih regulatora NF $\kappa$ B-p65, FOXO3A, Sp1 i Nrf-2 tretman EK je uticao na poboljšanje transkripcione regulacije CAT, MnSOD, CuZnSOD, GPx i GR enzima. Osim toga, pozitivan efekat EK na preživljavanje  $\beta$ -ćelija i ekspresiju/sekreciju insulina mogao bi se delimično pripisati i njegovom uticaju na fine promene u aktivnosti Akt, ERK i p38 kinaza kao i PDX-1 i MafA regulatornih proteina.

Kao što je već diskutovano, hipoglikemijski efekat EK može biti posledica povećanja iskoristljivosti glukoze u perifernim tkivima, smanjenja resorpcije glukoze u crevima, regulacije metabolizma glukoze u jetri i povećanja sekrecije insulina usled stimulativnog dejstva polifenolnih jedinjenja iz EK na proces izlučivanja hormona i enzima u gastrointestinalnom traktu. Pored toga, hipoglikemijski efekat EK može se ostvariti i putem povećanja nivoa insulina u serumu dijabetičnih životinja usled pokazanog uticaja EK na očuvanje strukture i funkcije Langerhansovih ostrvaca pankreasa. Ovi rezultati u saglasnosti su sa ranije pokazanim pozitivnim efektom ekstrakta pripremljenog iz lista kičice na brojnost i veličinu ostrvaca pankreasa dijabetičnih pacova kod kojih je dijabetes izazvan primenom STZ-a (Sefi i sar., 2011). Kao što je prikazano u ovoj tezi, histološkim i imunohistohemijskim ispitivanjem preseka pankreasa dijabetičnih životinja uočena je narušena morfologija ostrvaca i smanjeno prisustvo ćelija obojenih insulinom dok su ćelije pozitivne na glukagon i somatostatin bile dominantna populacija u središnjem regionu ostrvaca. Tretman dijabetičnih pacova EK uticao je na očuvanje morfologije ostrvaca i povećanje mase  $\beta$ -ćelija što je doprinelo povećanoj proizvodnji insulina. Povećano prisustvo GLUT-2 i p-Akt

uočeno u ostrvcima dijabetičnih pacova tretiranih EK dodatno podržavaju ove rezultate. Naime, gubitak ekspresije GLUT-2 transportera u  $\beta$ -ćelijama pankreasa se dovodi u vezu sa poremećajem GSIS procesa i razvojem hiperglikemije (Hou i sar., 2009). S' obzirom da signalni put PI3K/Akt ima važnu ulogu u regulaciji mase  $\beta$ -ćelija i sekreciji insulina, narušavanje ovog signalnog puta remeti normalno funkcionisanje  $\beta$ -ćelija i oslobađanje insulina (Leibiger i sar., 2010). Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije ukazuju na postojanje pozitivne korelacije između aktivnosti Akt kinaze i ekspresije GLUT-2 transportera u ostrvcima pankreasa, što je u saglasnosti sa podacima koji ukazuju na vezu između aktivacije Akt kinaze i sinteze GLUT-2 u jetri (Rathinam i Pari, 2016). Pozitivni efekat EK na obojenost ćelija Langerhansovih ostrvaca antitelima na insulin i GLUT-2 bio je izraženiji kod pretretirane grupe dijabetičnih životinja, ukazujući na umanjenje štetnih posledica dijabetesa ukoliko se EK konzumira i pre razvijanja dijabetesa, a što je već diskutovano u kontekstu regulacije nivoa glukoze i insulina u serumu.

Protektivni efekat EK na  $\beta$ -ćelije pankreasa u saglasnosti je sa podacima da primena svercijamarina, najzastupljenijeg jedinjenja u EK, štiti Langerhansova ostrvca od oštećenja izazvana primenom STZ-a i doprinosi povećanju nivoa insulina u cirkulaciji usled regeneracije  $\beta$ -ćelija (Dhanavathy, 2015). Isti autor ukazuje da se svercijamarin, zahvaljujući pokazanim antihiperglikemijskim, antihiperlipidemijskim, cito- i histoprotektivnim dejstvom, može koristiti u tretmanu dijabetesa i pratećih komplikacija. Ispitivanjem efekta kvercetina na akutni pankreatitis miševa pokazano je da ovaj flavonoid ispoljava antioksidativno i antiinflamatorno dejstvo (Carvalho i sar., 2010). Tretman kvercetinom smanjuje infiltraciju neutrofila i proizvodnju proinflamatornih citokina TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6 i povećava proizvodnju antiinflamatornog citokina IL-10 čime usporava razvoj akutnog pankreatitisa. U preglednom članku o ekstrakciji kempferola i njegovih glikozida ističe se da je hipoglikemijski efekat flavonoida pokazan na različitim životinjskim modelima i da primena ovih polifenolnih jedinjenja doprinosi povećanju, stabilizaciji i održavanju sekrecije insulina u ostrvcima čoveka tokom dužeg vremenskog perioda (Cid-Ortega i Monroy-Rivera, 2018). Imajući to u vidu, pozitivno dejstvo EK na regulaciju nivoa glukoze i insulina kod dijabetičnih pacova bi se moglo pripisati i različitim flavonoidima prisutnim u ekstraktu.

Efekat EK na preživljavanje i funkcionalnost  $\beta$ -ćelija ispitan je na Rin-5F  $\beta$ -ćelijama tretiranim  $H_2O_2$ , SNP-om i STZ-om. Tretman Rin-5F ćelija  $IC_{50}$  dozama odabranih agenasa smanjio je funkcionalnost ćelija, praćenu analizom ekspresije i sekrecije insulina, i izazvao značajna oksidativna oštećenja ćelija procenjena na osnovu analize stepena oštećenja molekula DNK, lipidne peroksidacije, nivoa S-glutationilacije proteina i odnosa GSH/GSSG. Uporedna analiza parametara oksidativnog oštećenja ćelija izazvanog  $H_2O_2$ , SNP-om i STZ-om ukazuje da je tretman STZ-om izazvao najveći stepen oštećenja DNK u  $\beta$ -ćelijama, dok su detektovane promene ostalih biomarkera nakon primene različitih prooksidanasa bile na sličnom nivou. Primenom EK povećan je procenat vijabilnih ćelija kao i ekspresija i sekrecija insulina, a koji su bili redukovani nakon tretmana  $H_2O_2$ , SNP-om i STZ-om. EK je u različitoj meri uticao na povećanje procenta vijabilnih ćelija nakon tretmana, što je i očekivano ako se uzmu u obzir mehanizmi putem kojih primenjena jedinjenja izazivaju oksidativni stres. Kao što je već rećeno u okviru rezultata ([Poglavlje 4.5.2.](#)),  $H_2O_2$  direktno dovodi do oksidativnih oštećenja ćelija, citotoksićni efekat SNP-a je prvenstveno zasnovan na oslobađanju  $NO^*$ , dok STZ svoje dejstvo ispoljava direktnom alkilacijom molekula DNK koja posledićno dovodi do povećane proizvodnje razlićitih ROS i RNS vrsta, što najviše simulira kompleksne uslove oksidativnog stresa koji prate dijabetes. Veći efekat EK na preživljavanje ćelija nakon  $H_2O_2$ - i SNP-tretmana u odnosu na tretman STZ-om bi mogao biti posledica pokazane sposobnosti ekstrakta da efikasno neutrališe  $H_2O_2$  odnosno  $NO^*$ .

Porast vijabilnosti i funkcionalnosti  $\beta$ -ćelija nakon tretmana EK pratilo je smanjenje oštećenja molekula DNK, lipidne peroksidacije i nivoa GSSP kao i porast odnosa GSH/GSSG. Ovi rezultati su u saglasnosti sa prethodno pokazanim protektivnim efektom EK na oksidativna oštećenja molekula DNK, lipida i proteina u pankreasu dijabetićnih životinja (Sefi i sar., 2011), i mogu biti posledica prisustva ksantona, flavonoida i fenolnih kiselina u sastavu ekstrakta. Antioksidativna aktivnost EK se moće pripisati luteolinu, apigeninu i kvercetinu za koje je pokazano da štite DNK od oštećenja posredovanih  $H_2O_2$  (Romanova i sar., 2001). Pored toga, pokazano je da konstituenti EK kao što su svercijamarin, kempferol, kvercetin, rutin i ferulinska kiselina mogu da redukuju nivo lipidne peroksidacije

kod pacova sa dijabetesom izazvanim primenom STZ-a (Al-Numair i sar., 2015; Elbe i sar., 2015; Jaishree i Badami, 2010; Wang i sar., 2015).

Antioksidativni efekat EK na Rin-5F ćelije ogleđa se i u njegovom uticaju na aktivnost enzima antioksidativne zaštite koja je bila poremećena nakon tretmana odabranim prooksidansima (STZ, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i SNP). Smanjena aktivnost CAT, GPx i GR nakon tretmana SNP-om, odnosno GPx i GR nakon tretmana H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bila je povećana nakon kotretmana ćelija ekstraktom. Sa druge strane, povećanje aktivnosti CAT nakon H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i STZ tretmana, GR nakon STZ tretmana, odnosno MnSOD i CuZnSOD nakon svih tretmana bilo je redukovano nakon primene EK. Ovi rezultati ukazuju na to da se antioksidativni efekat EK u ćelijama može ostvariti preko dodatne aktivacije antioksidativnih enzima ali i putem drugih mehanizama koji ne uključuju dalju aktivaciju enzima. Tako bi se sposobnost EK da ublaži narušavanje redoks balansa u β-ćelijama mogla objasniti potencijalom ekstrakta da neutrališe slobodne radikale. Putem ovog mehanizma delovanja smanjila bi se potreba ćelije za daljom aktivacijom enzima antioksidativne zaštite. Pored toga, prikupljanjem slobodnih radikala bi se umanjio njihov inhibitorski efekat na katalitičku aktivnost enzima što bi posledično smanjilo potrebu za povećavanjem nivoa enzima kako bi se postigla potrebna aktivnost. Već je bilo reči o tome da NO• blokira katalitički centar CAT čime smanjuje njenu aktivnost (Brown, 1995), a utvrđeno je i da NO• blokira i aktivnost GPx (Asahi i sar., 1995). U skladu sa ovako pretpostavljenim mehanizmom antioksidativnog delovanja EK, u ovoj tezi je pokazana sposobnost EK da efikasno prikuplja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i NO• vrste što se može pripisati njegovim konstituentima kao što su luteolin, apigenin, kvercetin i sinapsinska kiselina (Nićiforović i Abramović, 2014; Romanova i sar., 2001).

Još jedan mehanizam antioksidativnog delovanja EK bio bi njegov indirektni efekat na aktivnost enzima antioksidativne zaštite preko uticaja na molekularne mehanizme uključene u transkripcionu regulaciju ovih enzima. U skladu sa tim kao i pretpostavkom da su transkripcioni regulatori među prvim proteinima koji bivaju pogođeni oksidativnim stresom sa posledičnim efektom na njihove ciljane gene (Guo i sar., 2013), rezultati istraživanja u okviru ove teze su pokazali da dolazi do promena u prisustvu i aktivnosti redoks-senzitivnih transkripcionih regulatora enzima antioksidativne zaštite. Ovaj indirektni efekat EK na aktivnost

antioksidativnih enzima ispitan je i pokazan na modelu oksidativnog stresa indukovano u Rin-5F ćelijama STZ-om s obzirom da je isti agens korišćen za izazivanje dijabetesa kod pacova kao i da mehanizam njegovog delovanja uključuje ROS i RNS vrste. Tretman  $\beta$ -ćelija STZ-om pratilo je povećanje nivoa NF $\kappa$ B-p65 i Nrf-2 faktora u jedru, a za koje je poznato da se aktiviraju nakon translokacije u jedro (Itoh i sar., 2003; Karin i Ben-Neriah, 2000; van den Berg i sar., 2001). Aktivacija NF $\kappa$ B-p65 u  $\beta$ -ćelijama nakon primene STZ-a može se pripisati pojačanoj produkciji ROS-ova kao što je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i/ili njegovi derivati (Sen i Packer, 1996). Osim toga, pokazano je da povećan nivo ROS-ova dovodi do stabilizacije Nrf-2 proteina, njegove translokacije u jedro i transkripcione aktivacije gena za antioksidativne enzime vezivanjem Nrf-2 za ARE regulatorne elemente u okviru promotorskih regiona gena (Jaiswal, 2004). Imajući u vidu da je NF $\kappa$ B uključen u regulaciju ekspresije gena za SOD (Hoffmann i sar., 2006; Xu i sar., 1999) i da Nrf-2 kontroliše bazalnu i/ili inducibilnu ekspresiju brojnih endogenih antioksidanasa i enzima faze II, uključujući CAT, SOD, GR i GPx (Dinić i sar., 2016; Kim i Vaziri, 2010; Zhu i sar., 2005), povećanje nivoa iRNK za CAT, GPx, GR i MnSOD u ćelijama tretiranim STZ-om prikazano u ovoj disertaciji može biti rezultat aktivacije NF $\kappa$ B i Nrf-2. S' obzirom da je aktivnost NF $\kappa$ B i Nrf-2 bila snižena nakon primene EK u ćelijama tretiranim STZ-om, može se pretpostaviti da je sposobnost ekstrakta da neutrališe slobodne radikale umanjila aktivaciju NF $\kappa$ B i Nrf-2 faktora što se posledično odrazilo na niži nivo ekspresije gena za CAT, GPx i SOD. S' obzirom da kotretman EK nije uticao na promene aktivnosti FOXO3A u odnosu na tretman STZ-om može se pretpostaviti da FOXO3A podjednako doprinosi transkripcionoj aktivaciji CAT i MnSOD u tretmanu STZ-om i u STZ/EK kotretmanu. Za razliku od  $\beta$ -ćelija tretiranih STZ-om gde je nivo Sp1 proteina u jedru bio umanjen u odnosu na kontrolu, kod STZ/EK kotretiranih ćelija nivo Sp1 faktora se održao na nivou uočenom kod kontrolnih ćelija. Imajući u vidu da je Sp1 ključan za konstitutivnu i inducibilnu ekspresiju CuZn/MnSOD (Minc i sar., 1999; Xu i sar., 2002) kao i da ima pozitivan uticaj na regulaciju ekspresije CAT enzima (Glorieux i sar., 2015), na osnovu prikazanih rezultata može se pretpostaviti da je Sp1 imao veći uticaj na transkripcionu aktivaciju SOD i CAT nakon kotretmana ekstraktom. Umanjenje nivoa iRNK i proteina za CAT nakon primene EK sa jedne strane, kao i povećanje

nivoa genske ekspresije i proteina za GR enzim nakon STZ tretmana i STZ/EK kotretmana, snažno sugerišu da su prisustvo ali i aktivnost CAT i GR enzima uglavnom regulisani na nivou transkripcije. Postojanje malih ali statistički neznačajnih razlika u prisustvu SOD i GPx proteina između tretmana STZ-om i STZ/EK kotretmana uprkos značajnim razlikama u nivou odgovarajućih iRNK nakon ovih tretmana upućuju na postojanje dodatnih, posttranslacionih mehanizama uključenih u regulaciju nivoa i aktivnosti ovih antioksidativnih enzima. Uočene promene na nivou ekspresije gena i količine proteina za enzime antioksidativne zaštite nakon tretmana odabranim agensima u odsustvu/prisustvu EK ukazuju na postojanje transkripcionih, posttranskripcionih i/ili posttranslacionih molekularnih mehanizama kojima se dodatno reguliše aktivnost enzima.

Povećano preživljavanje  $\beta$ -ćelija nakon kotretmana ekstraktom može delimično biti rezultat povećane aktivnosti Akt, ERK i p38 kinaza, za koje je poznato da regulišu ćelijski rast i preživljavanje, kao i ekspresiju i sekreciju insulina i njegov signalni put u ćeliji. Istraživanja rađena na transgenim miševima sa konstitutivno eksprimiranom Akt kinazom vezanom za promotor gena za insulin pokazala su da je, između ostalog, povećana stopa proliferacije ćelija odgovorna za povećanje mase  $\beta$ -ćelija pankreasa (Bernal-Mizrachi i sar., 2001; Cho i sar., 2001; Tuttle i sar., 2001). Konstitutivna ekspresija Akt kinaze se takođe dovodi u vezu sa povećanjem rezistencije transgenih miševa na razvoj dijabetesa izazvanog primenom STZ-a. Fosforilacija i aktivacija Akt i ERK1/2 kinaza nakon tretmana adiponektinom, preko smanjenja procesa apoptoze povećava vijabilnost ostrvaca i  $\beta$ -ćelija i pojačava ekspresiju gena za insulin i GSIS proces (Wijesekara i sar., 2010). Sa druge strane, smanjenje Akt Ser<sup>473</sup> fosforilacije praćeno je padom aktivnosti signalnog puta insulina (Bozulic i Hemmings, 2009). U okviru ove doktorske disertacije je pokazano da se nivo p-Akt (Ser<sup>473</sup>) povećava nakon primene EK na  $\beta$ -ćelije tretirane STZ-om, što koreliše sa očuvanjem nivoa p-Akt i prisustvom insulina u ostrvcima dijabetičnih pacova nakon tretmana ekstraktom, ukazujući na potencijal EK da poboljša sekreciju insulina i aktivnost njegovog signalnog puta u očuvanim  $\beta$ -ćelijama. Brojni faktori rasta i hormoni podstiču proces replikacije u  $\beta$ -ćelijama glodara nakon aktivacije ERK1/2 kinaze (Stewart i

sar., 2015). Tako hormoni, kao što su prolaktin, insulin i trijodotironin postižu maksimalnu stimulaciju procesa replikacije u  $\beta$ -ćelijama tek nakon aktivacije ERK1/2 i PI3K/Akt/mTOR signalnih puteva (Amaral i sar., 2004; Beith i sar., 2008; Kim i sar., 2014). Prolazna aktivacija ERK kinaze ne dovodi do proliferacije  $\beta$ -ćelija što ukazuje da je za aktivaciju procesa replikacije  $\beta$ -ćelija neophodna neprekidna aktivacija ERK (Lingohr i sar., 2002). U uslovima lipotoksičnosti ERK1/2 ispoljava antiapoptotski efekat i povećava preživljavanje  $\beta$ -ćelija (Panse i sar., 2015). Isti autori ukazuju da aktivnost ERK1/2 nije presudna za proces GSIS ali ne isključuju mogućnost da ERK1/2 ispoljava indirektne efekte na sekreciju insulina. Ovakav zaključak podržavaju studije koje su pokazale da u zavisnosti od prisustva glukoze ERK1/2 posreduje u regulaciji procesa transkripcije gena za insulin čime doprinosi produkciji insulina (Khoo i sar., 2003; Lawrence i sar., 2008). Imajući u vidu rezultate ovih istraživanja, rezultati prikazani u ovoj disertaciji upućuju na to da je povećanje vijabilnosti i funkcionalnosti  $\beta$ -ćelija kotretiranih STZ-om i EK delimično posledica i aktivacije ERK1/2 kinaze od strane ekstrakta. Aktivnost p38 kinaze zavisi kako od tipa ćelije tako i od tipa stresora koji je aktivira (Hou i sar., 2008). Tako na primer, blokiranje signalnog puta p38 kinaze sprečava proizvodnju proinflamatornih citokina u presađenim humanim ostrvacima i povećava njihovu funkcionalnost (Matsuda i sar., 2005). To se pak može objasniti supresijom p38 puta u preostalim makrofagama koje proizvode citokine i endotelijalnim ćelijama koje eksprimiraju iNOS. Istraživanja su takođe pokazala da se p38 aktivira u uslovima oksidativnog stresa gde igra važnu ulogu u regulaciji procesa preživljavanja ćelija i apoptoze (Mendelson i sar., 1996). Hou i saradnici (2008) su pokazali da aktivacija p38 kinaze upotrebom rekombinantnog adenovirusa sprečava umiranje MIN6  $\beta$ -ćelija izazvano primenom ROS-ova, dok blokiranje aktivnosti p38 specifičnim inhibitorima povećava smrtnost ćelija. Shodno tome, pojačana fosforilacija p38 kinaze pod dejstvom EK može doprineti povećanom preživljavanju  $\beta$ -ćelija. Rezultati prikazani u ovoj tezi jasno ukazuju da u uslovima oksidativnog stresa ekstrakt kičice, preko aktivacije Akt, ERK1/2 i p38 kinaza, podstiče procese proliferacije i preživljavanja  $\beta$ -ćelija čime doprinosi kako očuvanju mase  $\beta$ -ćelija tako i poboljšanju ekspresije, sekrecije i delovanja insulina.

Pokazano je da EK povećava nivo insulina u serumu dijabetičnih pacova, kao i ekspresiju i sekreciju insulina u Rin-5F ćelijama tretiranim STZ-om. Ovakav rezultat bi se delimično mogao pripisati uticaju ekstrakta na prolazno povećanje prisustva MafA i na ublažavanje pada nivoa PDX-1 u jedrima Rin-5F ćelija u uslovima oksidativnog stresa izazvanog primenom STZ-a. PDX-1 i MafA su regulatorni proteini prisutni u  $\beta$ -ćelijama pankreasa i imaju ključnu ulogu u regulaciji ekspresije gena za insulin (Zhao i sar., 2005). Pored toga što reguliše ekspresiju gena za insulin, MafA je uključen i u regulaciju njegove sekrecije (Wang i sar., 2007). PDX-1 i MafA ostvaruju svoju aktivnost unutar jedra gde obezbeđuju transkripcionu regulaciju ciljnih gena, i smatra se da njihovo nagomilavanje u citoplazmi odražava inhibiciju njihove aktivnosti (Fujimoto i Polonsky, 2009; Harmon i sar., 2009). Funkcionalni značaj PDX-1 proteina za  $\beta$ -ćelije pankreasa ogleda se u činjenici da delimični nedostatak ovog regulatora dovodi do razaranja i nefunkcionalnosti  $\beta$ -ćelija i razvoja dijabetesa kod glodara i ljudi. Pored toga, razvoj hiperglikemije kod ZDF (eng. *Zucker diabetic fatty*) pacova praćen je gubitkom ekspresije PDX-1 i insulina u  $\beta$ -ćelijama (Harmon i sar., 1999). Još uvek nije u potpunosti razjašnjeno na koji način PDX-1 reguliše preživljavanje i funkcionisanje  $\beta$ -ćelija, mada je pokazano da PDX-1 posreduje u antiapoptotskom efektu insulina. Naime, pokazano je da primena insulina u fiziološkim koncentracijama povećava nivo PDX-1 u jedru čime štiti humana i mišija ostrvca od apoptoze izazvane uklanjanjem seruma i ukazuju na mogućnost upotrebe dobijenih rezultata za razvoj novih pristupa za povećanje preživljavanja  $\beta$ -ćelija (Johnson i sar., 2006). Takođe, za buduća istraživanja koja bi za cilj imala razvoj novih agenasa za sprečavanje i lečenje dijabetesa treba uzeti u obzir i potencijalnu ulogu PDX-1 u neapoptotskom procesu umiranja  $\beta$ -ćelija (razmatrano u Fujimoto i Polonsky, 2009). Rezultati prikazani u okviru ove doktorske disertacije su u saglasnosti sa istraživanjem u kome je pokazano da hronično izlaganje povećanoj koncentraciji glukoze smanjuje nivo PDX-1 u jedru u HIT-T15  $\beta$ -ćelijama što za posledicu ima smanjenu ekspresiju gena za insulin (Olson i sar., 1995). Tretman istih HIT-T15 ćelija antioksidansom N-acetilcisteinom u istim uslovima sprečava gubitak sposobnosti vezivanja PDX-1 za promotorsku sekvencu gena za insulin čime povećava aktivnost promotora i količinu produkovanog insulina (Tanaka i



sar., 1999). Tretman  $\beta$ TC-3 ćelija  $H_2O_2$  smanjuje sposobnost vezivanja PDX-1 za promotore ciljnih gena dok se ta sposobnost drugih transkripcionih regulatora ključnih za razvoj  $\beta$ -ćelija ne menja (Guo i sar., 2013). Isti autori su pokazali da se jedarni nivo MafA značajno smanjuje nakon tretmana  $\beta$ TC-3 ćelija  $H_2O_2$ , kao i nakon razvoja hiperglikemije kod *db/db* miševa. HIT-T15  $\beta$ -ćelije gajene u uslovima hroničnog gluko-oksidativnog stresa imaju smanjenu jedarnu količinu MafA, dok tretman ćelija N-acetilcisteinom u istim uslovima sprečava gubitak MafA i povećava njegovu aktivnost na promotoru gena za insulin (Harmon i sar., 2005). Nasuprot tome, u okviru ove disertacije je pokazano da oksidativni stres izazvan primenom STZ-a uzrokuje prolazno povećanje jedarnog nivoa MafA koji se dodatno povećao sa primenom EK. Ovakva razlika u prisustvu MafA u jedrima  $\beta$ -ćelija u ovoj i prethodnim studijama može se pripisati različitim mehanizmima koje pokreću primenjeni prooksidansi i/ili specifičnom ćelijskom odgovoru različitih ćelijskih linija korišćenih u istraživanju. Pored toga, eksperimenti u okviru ove disertacije su rađeni u ranijim pasažima ćelija, a moguće je da oksidativni stres tek kasnije dovodi do narušavanja stabilnosti MafA proteina. U prilog ovoj tvrdnji ide uočena smanjena količina MafA proteina u jedrima HIT-T15  $\beta$ -ćelija u glukotoksičnim uslovima u kasnijim pasažima (p123-128) u odnosu na ranije pasaže (p71-75) (Harmon i sar., 2005), što ukazuje na to da je krajnji efekat oksidativnog stresa na količinu MafA proteina vremenski zavisna. Na osnovu literaturnih podataka i rezultata prikazanih u ovoj tezi može se zaključiti da je dejstvo EK na nivo MafA i PDX-1 proteina u jedru mogao uticati na detektovano povećanje ekspresije gena za insulin i povećano preživljavanje  $\beta$ -ćelija u uslovima oksidativnog stresa. Povećana ekspresija i sekrecija insulina bi, posledično, mogla da doprinese povećanom preživljavanju  $\beta$ -ćelija preko aktivnosti PDX-1.

Povećana proizvodnja inflamatornih citokina i povećana količina oksidativnog stresa, zajedno sa drugim faktorima, doprinose procesu umiranja  $\beta$ -ćelija u uslovima hronične hiperglikemije. Istraživanja ukazuju da, pored apoptotskog umiranja ćelija, i gubitak identiteta zrelih  $\beta$ -ćelija uzrokuje smanjenje njihove mase u dijabetesu (Butler i sar., 2007; Cinti i sar., 2016; Guo i sar., 2013; Jonas i sar., 1999; Rahier i sar., 2008). Procesi dediferencijacije  $\beta$ -ćelija u progenitorske ćelije i transdiferencijacije u  $\alpha$ -ćelije predstavljaju važne mehanizme

koji dovode do propadanja  $\beta$ -ćelija u dijabetesu (razmatrano u Remedi i Emfinger, 2016). PDX-1 i MafA su ključni transkripcioni regulatori razvoja i održavanja identiteta zrelih  $\beta$ -ćelija. Usled gubitka ekspresije PDX-1 i MafA u ostrvcima pankreasa gube se fenotipske karakteristike  $\beta$ -ćelija i smanjuje nivo insulina, što dovodi do dediferencijacije  $\beta$ -ćelija i povećane ekspresije gena koji se inače ne eksprimiraju u  $\beta$ -ćelijama (Ahlgren i sar., 1998; Cinti i sar., 2016; Guo i sar., 2013; Nishimura i sar., 2015). Tokom razvoja dijabetesa gubi se inhibitorni efekat insulina na sekreciju i dejstvo glukagona, što ukazuje na to da bi se, u odsustvu sekrecije insulina, hiperglikemija mogla korigovati narušavanjem signalnog puta glukagona. Smatra se da bi pravovremeno i intenzivno ublažavanje uticaja glukotoksičnosti na disfunkciju  $\beta$ -ćelija u dijabetesu moglo doprineti očuvanju endogenih  $\beta$ -ćelija (Remedi i Emfinger, 2016). Prikazani rezultati idu u prilog tome da se EK u celini, ili neke njegove komponente mogu koristiti u cilju ublažavanja razarajućeg efekta glukotoksičnosti, a time doprineti očuvanju funkcije  $\beta$ -ćelija u uslovima dijabetesa.

Nedostatak funkcionalnih  $\beta$ -ćelija koji odlikuje oba preovlađujuća tipa dijabetesa podstiče razvoj novih terapijskih pristupa koji bi mogli doprineti povećanju mase  $\beta$ -ćelija. Veliki doprinos u tom pravcu može dati bolje razumevanje faktora i signalnih puteva uključenih u preživljavanje i proliferaciju  $\beta$ -ćelija što bi otvorilo mogućnost za iznalaženje novih terapijskih agenasa za delovanje na ciljne regulatorne procese. Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da EK poboljšava strukturne i funkcionalne karakteristike Langerhansovih ostrvaca uticajem na mehanizme endogene antioksidativne zaštite i pokretanjem signalnih puteva uključenih u preživljavanje i proliferaciju  $\beta$ -ćelija. Rasvetljavanje mehanizama kojim EK u celini ili pojedinačne komponente ekstrakta i njihovi metaboliti doprinose povećanom preživljavanju i poboljšanju antioksidativnog kapaciteta otvara mogućnosti za potencijalna terapijska delovanja koja bi za cilj imala povećanje mase  $\beta$ -ćelija i njihovu bolju funkcionalnost.

## 6. ZAKLJUČCI

---

U skladu sa postavljenim ciljevima doktorske disertacije, prikazani rezultati upućuju na sledeće zaključke:

1. Kvalitativna i kvantitativna analiza fitohemijskog sastava metanolnog ekstrakta nadzemnih delova kičice (*Centaureum erythraea*) (EK) pokazala je da najzastupljenije komponente ekstrakta čine sekoiridoidi (svercijamarin, sverozid, genciopikrin, loganin i sekologanin) i polifenoli (kvercetin, rutin, izokvercitrin, kempferol, astragalin, luteolin, apigenin, naringenin, dekusatin, eustomin, demetileustomin, metilbelidifolin, *p*-kumarna, sinapinska, kafeinska i ferulinska kiselina), koji ispoljavaju širok spektar biološke aktivnosti uključujući antioksidativno, antidijabetogeno, gastroprotektivno i hepatoprotektivno dejstvo;

2. EK je ispoljio snažnu antioksidativnu aktivnost u *in vitro* uslovima:

- sposobnost neutralizacije DPPH•, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i NO•, helacije Fe<sup>2+</sup> kao i visok redukujući potencijal.
- sposobnost EK da neutrališe H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i NO• bila je efikasnija od odgovarajućih standardnih supstanci.
- sposobnost redukcije Fe<sup>3+</sup> do Fe<sup>2+</sup> u kombinaciji sa sposobnošću helacije Fe<sup>2+</sup> ukazuje na potencijal EK da spreči Fentonovu reakciju i formiranje slobodnih radikala (OH• i HO•).
- antioksidativna aktivnost EK može se pripisati polifenolnim jedinjenjima imajući u vidu detektovanu korelaciju između *in vitro* antioksidativne aktivnosti EK i ukupne količine polifenola, odnosno fenola i flavonoida;

3. EK je ispoljio antidijabetogeni efekat kod pretretiranih i posttretiranih dijabetičnih životinja:

- ublažavanjem gubitka telesne mase, smanjenjem nivoa glukoze i GlyHb i povećanjem nivoa insulina u cirkulaciji kod obe grupe dijabetičnih pacova što je bilo udruženo sa poboljšanjem lipidnog

statusa - smanjenjem nivoa TG kod obe grupe dijabetičnih životinja i nivoa LDL holesterola kod pretretirane grupe.

- Izraženiji pozitivan efekat EK na regulaciju nivoa glukoze, insulina i LDL holesterola kod pretretirane grupe dijabetičnih životinja ukazuje da bi tretman EK nakon razvoja dijabetesa bio efikasniji ukoliko bi se ekstrakt koristio kao dodatak ishrani preventivno, pre razvoja bolesti.

4. EK je ispoljio antioksidativni efekat kod pretretiranih i posttretiranih dijabetičnih životinja što se može pripisati njegovom hipoglikemijskom dejstvu, sposobnosti stimulisanja aktivnosti endogenog sistema antioksidativne zaštite kao i efektu neutralizacije slobodnih radikala, uzimajući u obzir detektovano:

- smanjenje nivoa sistemskog oksidativnog stresa, odnosno redukciju gliko-oksidativnih oštećenja lipida i proteina, povećanje odnosa GSH/GSSG, povećanje aktivnosti CAT, CuZnSOD i GR enzima u eritrocitima kao i smanjenje stepena glikacije serumskih proteina i glikozilacije proteina u eritrocitima dijabetičnih pacova.
- smanjenje oksidativnih oštećenja DNK, lipida i proteina, povećanje odnosa GSH/GSSG u jetri i bubregu, odnosno povećanje aktivnosti CAT, MnSOD i CuZnSOD u bubregu i poboljšanje aktivnosti GR, GPx, MnSOD i CAT enzima u jetri dijabetičnih životinja.

5. Pre- i post-tretman dijabetičnih životinja EK doprineo je smanjenju nivoa  $\alpha 2M$  u serumu i povećanju aktivnosti Akt kinaze u eritrocitima, sugerišući da primena EK može smanjiti agregaciju i povećati deformabilitet eritrocita, odnosno smanjiti viskoznost krvi i time doprineti poboljšanju mikrocirkulacije u dijabetesu što može smanjiti rizik za razvoj pratećih komplikacija uključujući hepatopatiju i nefropatiju. U skladu sa tim, pokazatelji funkcionisanja jetre (ALT, AST) i bubrega (BUN i kreatinin) bili su poboljšani nakon tretmana dijabetičnih životinja ekstraktom.

6. Povećanje nivoa insulina i bolja kontrola glikemije dijabetičnih pacova nakon tretmana EK može se pripisati očuvanju strukture i funkcije Langerhansovih ostrvaca.
- EK je doprineo očuvanju morfologije ostrvaca (prisustvo i raspodela  $\beta$ -,  $\alpha$ - i  $\delta$ -ćelija u ostrvcima) i povećanju mase  $\beta$ -ćelija.
  - Za razliku od odsustva aktivne forme Akt kinaze (p-Akt) i GLUT-2 transportera u ostrvcima dijabetičnih životinja, nakon primene EK detektovano je prisustvo GLUT-2, dok je prisustvo p-Akt u ostrvcima bilo na nivou kontrole.
  - Pozitivan efekat EK na prisustvo insulina i GLUT-2 u ostrvcima bio je izraženiji kod pretretirane grupe dijabetičnih životinja ukazujući da umanjenje štetnih posledica dijabetesa može biti efikasnije ukoliko se EK konzumira preventivno, i pre razvijanja dijabetesa.
7. Primena EK poboljšava preživljavanje i funkcionalnost (produkciju insulina)  $\beta$ -ćelija u uslovima oksidativnog stresa delovanjem na različite nivoe regulatornih mehanizama:
- protektivnim efektom EK na oksidativna oštećenja DNK, lipida i proteina kao i povećanjem odnosa GSH/GSSG.
  - modulisanjem aktivnosti i ekspresije enzima antioksidativne zaštite (CAT, MnSOD, CuZnSOD, GPx, GR)
  - uravnotežavanjem prisustva i aktivnosti redoks-senzitivnih transkripcionih regulatora NF $\kappa$ B, Nrf-2, Sp1, FOXO3A uključenih u regulaciju transkripcije gena za enzime antioksidativne zaštite.
  - aktivacijom Akt, ERK1/2 i p38 kinaza EK podstiče procese proliferacije i preživljavanja  $\beta$ -ćelija čime doprinosi očuvanju mase  $\beta$ -ćelija i poboljšanju ekspresije i sekrecije insulina.

- prolaznim povećanjem prisustva MafA i ublažavanjem pada nivoa PDX-1 u jedrima  $\beta$ -ćelija EK može dodatno uticati na detektovano povećanje ekspresije gena za insulina i povećano preživljavanje  $\beta$ -ćelija.
8. Opisani efekti EK na ostrvca pankreasa i  $\beta$ -ćelije ukazuju na značaj daljeg razjašnjavanja mehanizama antioksidativnog i protektivnog dejstva EK i njegovih komponenti u cilju potencijalnog terapijskog delovanja u dijabetesu.

## 7. LITERATURA

---

- Aberham, A., Pieri, V., Croom, E.M., Ellmerer, E., Stuppner, H., 2011. Analysis of iridoids, secoiridoids and xanthenes in *Centaurium erythraea*, *Frasera caroliniensis* and *Gentiana lutea* using LC-MS and RP-HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 54(3), 517-525.
- Ackermann, A.M., Gannon, M., 2007. Molecular regulation of pancreatic beta-cell mass development, maintenance, and expansion. *J Mol Endocrinol* 38(1-2), 193-206.
- Adisakwattana, S., Chantarasinlapin, P., Thammarat, H., Yibchok-Anun, S., 2009. A series of cinnamic acid derivatives and their inhibitory activity on intestinal alpha-glucosidase. *J Enzyme Inhib Med Chem* 24(5), 1194-1200.
- Ahlgren, U., Jonsson, J., Jonsson, L., Simu, K., Edlund, H., 1998. beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipfl1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* 12(12), 1763-1768.
- Ahmed, N., 2005. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 67(1), 3-21.
- Aikens, J., Dix, T.A., 1991. Peroxyl radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *J Biol Chem* 266(23), 15091-15098.
- Aikin, R., Hanley, S., Maysinger, D., Lipsett, M., Castellarin, M., Paraskevas, S., Rosenberg, L., 2006. Autocrine insulin action activates Akt and increases survival of isolated human islets. *Diabetologia* 49(12), 2900-2909.
- Aizawa, T., Komatsu, M., 2005. Rab27a: a new face in beta cell metabolism-secretion coupling. *J Clin Invest* 115(2), 227-230.
- Al-Numair, K.S., Chandramohan, G., Veeramani, C., Alsaif, M.A., 2015. Ameliorative effect of kaempferol, a flavonoid, on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Redox Rep* 20(5), 198-209.
- Alam, M.M., Meerza, D., Naseem, I., 2014. Protective effect of quercetin on hyperglycemia, oxidative stress and DNA damage in alloxan induced type 2 diabetic mice. *Life Sciences* 109(1), 8-14.
- Ali, F., Rahul, Naz, F., Jyoti, S., Siddique, Y.H., 2014. Protective effect of apigenin against N-nitrosodiethylamine (NDEA)-induced hepatotoxicity in albino rats. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 767, 13-20.
- Amaral, M.E., Cunha, D.A., Anhe, G.F., Ueno, M., Carneiro, E.M., Velloso, L.A., Bordin, S., Boscherio, A.C., 2004. Participation of prolactin receptors and phosphatidylinositol 3-kinase and MAP kinase pathways in the increase in pancreatic islet mass and sensitivity to glucose during pregnancy. *J Endocrinol* 183(3), 469-476.

- American Diabetes Association, 2014. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 37 Suppl 1, S81-90.
- Ames, B.N., 1989. Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free Radic Res Commun* 7(3-6), 121-128.
- Andre, M.C., Larondelle, Y., Eners, D., 2010. Dietary antioxidants and oxidative stress from a human and plant perspective, a review. *Current Nutrition & Food Science* 6(1), 2-11.
- Arambašić, J., Mihailović, M., Uskoković, A., Dinić, S., Grdović, N., Marković, J., Poznanović, G., Bajec, D., Vidaković, M., 2013. Alpha-lipoic acid upregulates antioxidant enzyme gene expression and enzymatic activity in diabetic rat kidneys through an O-GlcNAc-dependent mechanism. *Eur J Nutr* 52(5), 1461-1473.
- Arnette, D., Gibson, T.B., Lawrence, M.C., January, B., Khoo, S., McGlynn, K., Vanderbilt, C.A., Cobb, M.H., 2003. Regulation of ERK1 and ERK2 by Glucose and Peptide Hormones in Pancreatic  $\beta$  Cells. *Journal of Biological Chemistry* 278(35), 32517-32525.
- Asahi, M., Fujii, J., Suzuki, K., Seo, H.G., Kuzuya, T., Hori, M., Tada, M., Fujii, S., Taniguchi, N., 1995. Inactivation of Glutathione Peroxidase by Nitric Oxide: IMPLICATION FOR CYTOTOXICITY. *Journal of Biological Chemistry* 270(36), 21035-21039.
- Babujanarthanam, R., Kavitha, P., Pandian, M.R., 2010. Quercitrin, a bioflavonoid improves glucose homeostasis in streptozotocin-induced diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes. *Fundam Clin Pharmacol* 24(3), 357-364.
- Bacanli, M., Aydın, S., Taner, G., Göktaş, H.G., Şahin, T., Başaran, A.A., Başaran, N., 2014. The protective role of ferulic acid on sepsis-induced oxidative damage in Wistar albino rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 38(3), 774-782.
- Beckman, C.H., 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57(3), 101-110.
- Beith, J.L., Alejandro, E.U., Johnson, J.D., 2008. Insulin stimulates primary beta-cell proliferation via Raf-1 kinase. *Endocrinology* 149(5), 2251-2260.
- Bellamy, L., Casas, J.P., Hingorani, A.D., Williams, D., 2009. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 373(9677), 1773-1779.
- Ben-Neriah, Y., 2002. Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nature Immunology* 3, 20.
- Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z., Ferencik, M., 1999. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 65(18-19), 1865-1874.



- Bernal-Mizrachi, E., Fatrai, S., Johnson, J.D., Ohsugi, M., Otani, K., Han, Z., Polonsky, K.S., Permutt, M.A., 2004. Defective insulin secretion and increased susceptibility to experimental diabetes are induced by reduced Akt activity in pancreatic islet beta cells. *J Clin Invest* 114(7), 928-936.
- Bernal-Mizrachi, E., Wen, W., Stahlhut, S., Welling, C.M., Permutt, M.A., 2001. Islet beta cell expression of constitutively active Akt1/PKB alpha induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia. *J Clin Invest* 108(11), 1631-1638.
- Bhattacharya, S.K., Reddy, P.K., Ghosal, S., Singh, A.K., Sharma, P.V., 1976. Chemical constituents of Gentianaceae XIX: CNS-depressant effects of swertiamarin. *J Pharm Sci* 65(10), 1547-1549.
- Biewenga, G.P., Haenen, G.R., Bast, A., 1997. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmacol* 29(3), 315-331.
- Blakytyn, R., Harding, J.J., 1992. Glycation (non-enzymic glycosylation) inactivates glutathione reductase. *Biochem J* 288 ( Pt 1), 303-307.
- Blaschek, W., Ebel, S., Hackenthal, E., Holzgrabe, U., Keller, K., Reichling, J., Schulz, V., 2006. HagerROM 2006. Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe. Version 5.0. Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 26, 1199-1200.
- Boaz, M., Smetana, S., Weinstein, T., Matas, Z., Gafer, U., Iaina, A., Knecht, A., Weissgarten, Y., Brunner, D., Fainaru, M., Green, M.S., 2000. Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 356(9237), 1213-1218.
- Boni-Schnetzler, M., Ehses, J.A., Faulenbach, M., Donath, M.Y., 2008. Insulinitis in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 10 Suppl 4, 201-204.
- Bonner-Weir, S., Inada, A., Yatoh, S., Li, W.C., Aye, T., Toschi, E., Sharma, A., 2008. Transdifferentiation of pancreatic ductal cells to endocrine beta-cells. *Biochem Soc Trans* 36(Pt 3), 353-356.
- Bouayed, J., Bohn, T., 2010. Exogenous antioxidants--Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev* 3(4), 228-237.
- Boveris, A., 1984. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol* 105, 429-435.
- Bozulic, L., Hemmings, B.A., 2009. PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation. *Curr Opin Cell Biol* 21(2), 256-261.
- Brigelius-Flohe, R., Maiorino, M., 2013. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* 1830(5), 3289-3303.
- Brissova, M., Shiota, M., Nicholson, W.E., Gannon, M., Knobel, S.M., Piston, D.W., Wright, C.V., Powers, A.C., 2002. Reduction in pancreatic transcription factor

- PDX-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 277(13), 11225-11232.
- Brooks-Worrell, B., Palmer, J.P., 2012. Immunology in the Clinic Review Series; focus on metabolic diseases: development of islet autoimmune disease in type 2 diabetes patients: potential sequelae of chronic inflammation. *Clin Exp Immunol* 167(1), 40-46.
- Brown, G.C., 1995. Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. *Eur J Biochem* 232(1), 188-191.
- Brownlee, M., 1995. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 46, 223-234.
- Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414(6865), 813-820.
- Bryszewska, M., Zavodnik, I.B., Niekurzak, A., Szosland, K., 1995. Oxidative processes in red blood cells from normal and diabetic individuals. *Biochem Mol Biol Int* 37(2), 345-354.
- Bugianesi, E., McCullough, A.J., Marchesini, G., 2005. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology* 42(5), 987-1000.
- Burnette, W.N., 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112(2), 195-203.
- Burns, C.J., Squires, P.E., Persaud, S.J., 2000. Signaling through the p38 and p42/44 Mitogen-Activated Families of Protein Kinases in Pancreatic  $\beta$ -Cell Proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 268(2), 541-546.
- Busby, R.W., Schelvis, J.P.M., Yu, D.S., Babcock, G.T., Marletta, M.A., 1999. Lipoic Acid Biosynthesis: LipA Is an Iron-Sulfur Protein. *Journal of the American Chemical Society* 121(19), 4706-4707.
- Butkinaree, C., Park, K., Hart, G.W., 2010. O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta* 1800(2), 96-106.
- Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., Butler, P.C., 2003. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52(1), 102-110.
- Butler, P.C., Meier, J.J., Butler, A.E., Bhushan, A., 2007. The replication of beta cells in normal physiology, in disease and for therapy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3(11), 758-768.
- Caimi, G., Serra, A., Presti, R.I., 1993. Red cell calcium accumulation (total and cytosolic) and erythrocyte membrane fluidity in several clinical conditions. *Clin. Hemorheol.* 13, 227-235.

- Çakatay, U., Kayalı, R., Sivas, A., Tekeli, F., 2005. Prooxidant activities of alpha-lipoic acid on oxidative protein damage in the aging rat heart muscle. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 40(3), 231-240.
- Çakatay, U., Kayalı, R., 2005. Plasma protein oxidation in aging rats after alpha-lipoic acid administration. *Biogerontology* 6(2), 87-93.
- Cantor, J., Haskins, K., 2007. Recruitment and activation of macrophages by pathogenic CD4 T cells in type 1 diabetes: evidence for involvement of CCR8 and CCL1. *J Immunol* 179(9), 5760-5767.
- Cardaci, S., Filomeni, G., Rotilio, G., Ciriolo, M.R., 2008. Reactive oxygen species mediate p53 activation and apoptosis induced by sodium nitroprusside in SH-SY5Y cells. *Mol Pharmacol* 74(5), 1234-1245.
- Cardinal, J.W., Margison, G.P., Mynett, K.J., Yates, A.P., Cameron, D.P., Elder, R.H., 2001. Increased susceptibility to streptozotocin-induced beta-cell apoptosis and delayed autoimmune diabetes in alkylpurine-DNA-N-glycosylase-deficient mice. *Molecular and Cellular Biology* 21(16), 5605-5613.
- Carlsson, P., Mahlapuu, M., 2002. Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. *Dev Biol* 250(1), 1-23.
- Carney, J.M., Starke-Reed, P.E., Oliver, C.N., Landum, R.W., Cheng, M.S., Wu, J.F., Floyd, R.A., 1991. Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl-alpha-phenylnitron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(9), 3633-3636.
- Carvalho, K.M.M.B., Morais, T.C., Melo, T.S.d., Brito, G.A.d.C., Andrade, G.M.d., Rao, V.S., Santos, F.A., 2010. The Natural Flavonoid Quercetin Ameliorates Cerulein-Induced Acute Pancreatitis in Mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 33(9), 1534-1539.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59(3), 527-605.
- Chen, C., Kong, A.N., 2004. Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. *Free Radic Biol Med* 36(12), 1505-1516.
- Chen, H., Karne, R.J., Hall, G., Campia, U., Panza, J.A., Cannon, R.O., 3rd, Wang, Y., Katz, A., Levine, M., Quon, M.J., 2006. High-dose oral vitamin C partially replenishes vitamin C levels in patients with Type 2 diabetes and low vitamin C levels but does not improve endothelial dysfunction or insulin resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290(1), H137-145.
- Chen, V., Ianuzzo, C.D., 1982. Dosage effect of streptozotocin on rat tissue enzyme activities and glycogen concentration. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 60(10), 1251-1256.
- Cheng, H.M., Gonzalez, R.G., 1986. The effect of high glucose and oxidative stress on lens metabolism, aldose reductase, and senile cataractogenesis. *Metabolism* 35(4 Suppl 1), 10-14.

- Chew, G.T., Watts, G.F., Davis, T.M., Stuckey, B.G., Beilin, L.J., Thompson, P.L., Burke, V., Currie, P.J., 2008. Hemodynamic effects of fenofibrate and coenzyme Q10 in type 2 diabetic subjects with left ventricular diastolic dysfunction. *Diabetes Care* 31(8), 1502-1509.
- Cho, H., Mu, J., Kim, J.K., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Crenshaw, E.B., 3rd, Kaestner, K.H., Bartolomei, M.S., Shulman, G.I., Birnbaum, M.J., 2001. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 292(5522), 1728-1731.
- Cho, N.H., Shaw, J.E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J.D., Ohlrogge, A.W., Malanda, B., 2018. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract* 138, 271-281.
- Cho, Y.I., Mooney, M.P., Cho, D.J., 2008. Hemorheological disorders in diabetes mellitus. *J Diabetes Sci Technol* 2(6), 1130-1138.
- Choi, J., Kang, H.J., Kim, S.Z., Kwon, T.O., Jeong, S.I., Jang, S.I., 2013. Antioxidant effect of astragaloside isolated from the leaves of *Morus alba* L. against free radical-induced oxidative hemolysis of human red blood cells. *Arch Pharm Res* 36(7), 912-917.
- Chun, O.K., Chung, S.J., Song, W.O., 2007. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. *J Nutr* 137(5), 1244-1252.
- Chung, S.S., Ho, E.C., Lam, K.S., Chung, S.K., 2003. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol* 14(8 Suppl 3), S233-236.
- Cid-Ortega, S., Monroy-Rivera, J.A., 2018. Extraction of Kaempferol and Its Glycosides Using Supercritical Fluids from Plant Sources: A Review. *Food Technol Biotechnol* 56(4), 480-493.
- Cinti, F., Bouchi, R., Kim-Muller, J.Y., Ohmura, Y., Sandoval, P.R., Masini, M., Marselli, L., Suleiman, M., Ratner, L.E., Marchetti, P., Accili, D., 2016. Evidence of beta-Cell Dedifferentiation in Human Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 101(3), 1044-1054.
- Claiborne, A., 1985. Catalase activity, u: Greenwald, A.R. (Ed.) *Handbook Methods For Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 283-284.
- Cole, L., Kramer, P.R., 2016. *Sugars, Fatty Acids, and Energy Physiology, Human Physiology, Biochemistry and Basic Medicine*. Academic Press, London.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J., 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 17(10), 1195-1214.
- Crane, F.L., Navas, P., 1997. The diversity of coenzyme Q function. *Mol Aspects Med* 18 Suppl, S1-6.
- Crapo, J.D., Oury, T., Rabouille, C., Slot, J.W., Chang, L.Y., 1992. Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(21), 10405-10409.

- Culpeper, N., 1995. *Culpeper's complete herbal: A book of natural remedies of ancient ills*. NTC/Contemporary Publishing Company, Lincolnwood, IL.
- Curry, D.L., Bennett, L.L., Grodsky, G.M., 1968. Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology* 83(3), 572-584.
- Dabla, P.K., 2010. Renal function in diabetic nephropathy. *World J Diabetes* 1(2), 48-56.
- Dallak, M., Jaliah, B.I., 2010. Antioxidant activity of citrullus colocynthis pulp extract in the RBC's of alloxan-induced diabetic rats. *Pakistan Journal of Physiology* 6(1), 1-5.
- Dalle-Donne, I., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., Tell, G., Lungarella, G., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A., 2005. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. *Mass Spectrometry Reviews* 24(1), 55-99.
- Danaei, G., Finucane, M.M., Lu, Y., Singh, G.M., Cowan, M.J., Paciorek, C.J., Lin, J.K., Farzadfar, F., Khang, Y.H., Stevens, G.A., Rao, M., Ali, M.K., Riley, L.M., Robinson, C.A., Ezzati, M., 2011. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet* 378(9785), 31-40.
- Das, K.C., Lewis-Molock, Y., White, C.W., 1995. Activation of NF-kappa B and elevation of MnSOD gene expression by thiol reducing agents in lung adenocarcinoma (A549) cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 269(5), L588-L602.
- Davies, J.M., 2012. Oxidative Damage to Proteins, u: Chatgialloglu, C., Studer, A. (Eds.), *Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials*.
- Davies, M.J., 2005. The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta* 1703(2), 93-109.
- De Grey, A.D., 2002. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>\*: the forgotten radical. *DNA Cell Biol* 21(4), 251-257.
- Dear, T.N., Campbell, K., Rabbitts, T.H., 1991. Molecular cloning of putative odorant-binding and odorant-metabolizing proteins. *Biochemistry* 30(43), 10376-10382.
- Deshpande, A.D., Harris-Hayes, M., Schootman, M., 2008. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Phys Ther* 88(11), 1254-1264.
- Dhanavathy, G., 2015. Immunohistochemistry, histopathology, and biomarker studies of swertiamarin, a secoiridoid glycoside, prevents and protects streptozotocin-induced beta-cell damage in Wistar rat pancreas. *J Endocrinol Invest* 38(6), 669-684.
- DiLorenzo, T.P., Graser, R.T., Ono, T., Christianson, G.J., Chapman, H.D., Roopenian, D.C., Nathenson, S.G., Serreze, D.V., 1998. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for all but the end stages of diabetes development in nonobese diabetic mice and use a prevalent T cell receptor

- alpha chain gene rearrangement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(21), 12538-12543.
- Dinić, S., Arambašić, J., Mihailović, M., Uskoković, A., Grdović, N., Marković, J., Karadžić, B., Poznanović, G., Vidaković, M., 2013a. Decreased O-GlcNAcylation of the key proteins in kinase and redox signalling pathways is a novel mechanism of the beneficial effect of alpha-lipoic acid in diabetic liver. *Br J Nutr* 110(3), 401-412.
- Dinić, S., Grdović, N., Uskoković, A., Đorđević, M., Mihailović, M., Jovanović Arambašić, J., Poznanović, G., Vidaković, M., 2016. CXCL12 protects pancreatic beta-cells from oxidative stress by a Nrf2-induced increase in catalase expression and activity. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 92(9), 436-454.
- Dinić, S., Uskoković, A., Mihailović, M., Grdović, N., Arambašić Jovanović, J., Marković, J., Poznanović, G., Vidaković, M., 2013b. Ameliorating effects of antioxidative compounds from four plant extracts in experimental models of diabetes. *Journal of the Serbian Chemical Society* 78(3), 365-380.
- Dinis, T.C., Maderia, V.M., Almeida, L.M., 1994. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys* 315(1), 161-169.
- Dinkova-Kostova, A.T., Talalay, P., 2008. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res* 52 Suppl 1, S128-138.
- Dintzis, M.S., Liggitt, D., 2012. *Pancreas*, u: Treuting, M.P., Dintzis, M.S. (Eds.), *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas*. Academic Press, London.
- Dizdaroglu, M., 1998. Mechanisms of free radical damage to DNA, u: Aruoma, I.O., Halliwell, B. (Eds.), *DNA and Free Radicals: Techniques, Mechanisms & Applications*. OICA International, Saint Lucia, pp. 3-26.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 97, 654-660.
- Donath, M.Y., Schumann, D.M., Faulenbach, M., Ellingsgaard, H., Perren, A., Ehses, J.A., 2008. Islet inflammation in type 2 diabetes: from metabolic stress to therapy. *Diabetes Care* 31 Suppl 2, S161-164.
- Đorđević, M., Grdović, N., Mihailović, M., Arambašić Jovanović, J., Uskoković, A., Rajić, J., Sinadinović, M., Tolić, A., Mišić, D., Šiler, B., Poznanović, G., Vidaković, M., Dinić, S., 2019. Centaurium erythraea extract improves survival and functionality of pancreatic beta-cells in diabetes through multiple routes of action. *Journal of Ethnopharmacology* 242, 112043.
- Đorđević, M., Mihailović, M., Arambašić Jovanović, J., Grdović, N., Uskoković, A., Tolić, A., Sinadinović, M., Rajić, J., Mišić, D., Šiler, B., Poznanović, G., Vidaković, M., Dinić, S., 2017. Centaurium erythraea methanol extract protects red blood

- cells from oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 202, 172-183.
- Drabkin, A., Austin, H., 1935. Spectrophotometric studies preparations from washed blood cells. *Journal of Biological Chemistry* 112, 51-55.
- Drews, G., Krippeit-Drews, P., Dufer, M., 2010. Oxidative stress and beta-cell dysfunction. *Pflugers Arch* 460(4), 703-718.
- Du, X.L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I.G., Goldberg, H., Ziyadeh, F., Wu, J., Brownlee, M., 2000. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(22), 12222-12226.
- Duran, A., Diaz-Meco, M.T., Moscat, J., 2003. Essential role of RelA Ser311 phosphorylation by zetaPKC in NF-kappaB transcriptional activation. *The EMBO journal* 22(15), 3910-3918.
- Edgerton, D.S., Kraft, G., Smith, M., Farmer, B., Williams, P.E., Coate, K.C., Printz, R.L., O'Brien, R.M., Cherrington, A.D., 2017. Insulin's direct hepatic effect explains the inhibition of glucose production caused by insulin secretion. *JCI Insight* 2(6), e91863-e91863.
- Edwards, C.J., Fuller, J., 1996. Oxidative stress in erythrocytes. *Comparative Haematology International* 6(1), 24-31.
- Eggler, A.L., Gay, K.A., Mesecar, A.D., 2008. Molecular mechanisms of natural products in chemoprevention: induction of cytoprotective enzymes by Nrf2. *Mol Nutr Food Res* 52 Suppl 1, S84-94.
- Eggler, A.L., Liu, G., Pezzuto, J.M., van Breemen, R.B., Mesecar, A.D., 2005. Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(29), 10070.
- Elbe, H., Vardi, N., Esrefoglu, M., Ates, B., Yologlu, S., Taskapan, C., 2015. Amelioration of streptozotocin-induced diabetic nephropathy by melatonin, quercetin, and resveratrol in rats. *Hum Exp Toxicol* 34(1), 100-113.
- Erlund, I., Meririnne, E., Alfthan, G., Aro, A., 2001. Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *J Nutr* 131(2), 235-241.
- Esterbauer, H., Cheeseman, K.H., 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186, 407-421.
- Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Cooke, M.S., 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res* 567(1), 1-61.
- Faivre, B., Menu, P., Labrude, P., Vigneron, C., 1998. Hemoglobin autooxidation/oxidation mechanisms and methemoglobin prevention or reduction processes in the bloodstream. Literature review and outline of

- autooxidation reaction. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 26(1), 17-26.
- Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18(10), 872-879.
- Fernandes, A.A.H., Novelli, E.L.B., Okoshi, K., Okoshi, M.P., Muzio, B.P.D., Guimarães, J.F.C., Junior, A.F., 2010. Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 64(3), 214-219.
- Floyd, R.A., 1991. Oxidative damage to behavior during aging. *Science* 254(5038), 1597.
- Folsom, A.R., Halliwell, B., Lee, D.-H., Harnack, L., Jacobs, D.R., Jr, 2004. Does supplemental vitamin C increase cardiovascular disease risk in women with diabetes? *The American Journal of Clinical Nutrition* 80(5), 1194-1200.
- Forbes, J.M., Cooper, M.E., 2013. Mechanisms of Diabetic Complications. *Physiological Reviews* 93(1), 137-188.
- Ford, E.S., Mokdad, A.H., Giles, W.H., Brown, D.W., 2003. The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes* 52(9), 2346-2352.
- Fridovich, I., 1997. Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 272(30), 18515-18517.
- Fridovich, I., Freeman, B., 1986. Antioxidant defenses in the lung. *Annu Rev Physiol* 48, 693-702.
- Friedewald, W.T., Levy, R.I., Fredrickson, D.S., 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18(6), 499-502.
- Fujimoto, K., Polonsky, K.S., 2009. Pdx1 and other factors that regulate pancreatic beta-cell survival. *Diabetes, obesity & metabolism* 11 Suppl 4(Suppl 4), 30-37.
- Fukai, T., Ushio-Fukai, M., 2011. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal* 15(6), 1583-1606.
- Gaede, P., Poulsen, H.E., Parving, H.H., Pedersen, O., 2001. Double-blind, randomised study of the effect of combined treatment with vitamin C and E on albuminuria in Type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 18(9), 756-760.
- Garcia-Compean, D., Jaquez-Quintana, J.O., Gonzalez-Gonzalez, J.A., Maldonado-Garza, H., 2009. Liver cirrhosis and diabetes: risk factors, pathophysiology, clinical implications and management. *World J Gastroenterol* 15(3), 280-288.
- Garcia Soriano, F., Virag, L., Jagtap, P., Szabo, E., Mabley, J.G., Liaudet, L., Marton, A., Hoyt, D.G., Murthy, K.G., Salzman, A.L., Southan, G.J., Szabo, C., 2001. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nat Med* 7(1), 108-113.
- Garratt, D.C., 1964. *The Quantitative Analysis of Drugs*. Chapman and Hall Limited, Tokyo.



- Geraldes, P., King, G.L., 2010. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res* 106(8), 1319-1331.
- Gerber, P.A., Rutter, G.A., 2017. The Role of Oxidative Stress and Hypoxia in Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Antioxidants & redox signaling* 26(10), 501-518.
- Ghosh, S., May, M.J., Kopp, E.B., 1998. NF- $\kappa$ B AND REL PROTEINS: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. *Annual Review of Immunology* 16(1), 225-260.
- Ghyselinck, N.B., Dufaure, J.P., 1990. A mouse cDNA sequence for epididymal androgen-regulated proteins related to glutathione peroxidase. *Nucleic Acids Res* 18(23), 7144.
- Gill, G., 2001. Regulation of the initiation of eukaryotic transcription. *Essays Biochem* 37, 33-43.
- Girotti, A.W., 1985. Mechanisms of lipid peroxidation. *J Free Radic Biol Med* 1(2), 87-95.
- Glatzle, D., Vuilleumier, J.P., Weber, F., Decker, K., 1974. Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia* 30(6), 665-667.
- Glorieux, C., Calderon, P.B., 2017. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem* 398(10), 1095-1108.
- Glorieux, C., Zamocky, M., Sandoval, J.M., Verrax, J., Calderon, P.B., 2015. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radic Biol Med* 87, 84-97.
- Goldin, A., Beckman Joshua, A., Schmidt Ann, M., Creager Mark, A., 2006. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 114(6), 597-605.
- Gomes, M.B., Negrato, C.A., 2014. Alpha-lipoic acid as a pleiotropic compound with potential therapeutic use in diabetes and other chronic diseases. *Diabetology & metabolic syndrome* 6(1), 80-80.
- Grankvist, K., Marklund, S.L., Taljedal, I.B., 1981. CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem J* 199(2), 393-398.
- Greenberg, S., Frishman, W.H., 1990. Co-enzyme Q10: a new drug for cardiovascular disease. *J Clin Pharmacol* 30(7), 596-608.
- Gross, J.L., de Azevedo, M.J., Silveiro, S.P., Canani, L.H., Caramori, M.L., Zelmanovitz, T., 2005. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care* 28(1), 164-176.
- Guinez, C., Morelle, W., Michalski, J.C., Lefebvre, T., 2005. O-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins? *Int J Biochem Cell Biol* 37(4), 765-774.

- Guo, S., Dai, C., Guo, M., Taylor, B., Harmon, J.S., Sander, M., Robertson, R.P., Powers, A.C., Stein, R., 2013. Inactivation of specific  $\beta$  cell transcription factors in type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Investigation* 123(8), 3305-3316.
- Gupta, C., Vikram, A., Tripathi, D.N., Ramarao, P., Jena, G.B., 2010. Antioxidant and antimutagenic effect of quercetin against DEN induced hepatotoxicity in rat. *Phytotherapy Research* 24(1), 119-128.
- Guyen, A., Yavuz, O., Cam, M., Ercan, F., Bukan, N., Comunoglu, C., Gokce, F., 2006. Effects of melatonin on streptozotocin-induced diabetic liver injury in rats. *Acta Histochemica* 108(2), 85-93.
- Guzik, T.J., Mussa, S., Gastaldi, D., Sadowski, J., Ratnatunga, C., Pillai, R., Channon, K.M., 2002. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 105(14), 1656-1662.
- Haber, F., Weiss, J., 1934. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc Lond Ser A* 147, 332-351.
- Halliwell, B., 1996. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radic Res* 25(5), 439-454.
- Halliwell, B., 2000. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiovasc Res* 47(3), 410-418.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 2015. *Free radicals in biology and medicine*, 5th ed. Oxford University Press, Oxford.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 246(2), 501-514.
- Halliwell, B., Whiteman, M., 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 142(2), 231-255.
- Hamilton, S.J., Chew, G.T., Watts, G.F., 2009. Coenzyme Q10 improves endothelial dysfunction in statin-treated type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 32(5), 810-812.
- Hamza, N., Berke, B., Cheze, C., Agli, A.N., Robinson, P., Gin, H., Moore, N., 2010. Prevention of type 2 diabetes induced by high fat diet in the C57BL/6J mouse by two medicinal plants used in traditional treatment of diabetes in the east of Algeria. *J Ethnopharmacol* 128(2), 513-518.
- Hamza, N., Berke, B., Cheze, C., Le Garrec, R., Lassalle, R., Agli, A.N., Robinson, P., Gin, H., Moore, N., 2011. Treatment of high fat diet induced type 2 diabetes in C57BL/6J mice by two medicinal plants used in traditional treatment of diabetes in the east of Algeria. *J Ethnopharmacol* 133(2), 931-933.
- Han, X., Shen, T., Lou, H., 2007. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Sciences* 8(9), 950-988.

- Hanhineva, K., Torronen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkanen, H., Poutanen, K., 2010. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int J Mol Sci* 11(4), 1365-1402.
- Harding, A.H., Wareham, N.J., Bingham, S.A., Khaw, K., Luben, R., Welch, A., Forouhi, N.G., 2008. Plasma vitamin C level, fruit and vegetable consumption, and the risk of new-onset type 2 diabetes mellitus: the European prospective investigation of cancer--Norfolk prospective study. *Arch Intern Med* 168(14), 1493-1499.
- Harmon, J.S., Bogdani, M., Parazzoli, S.D., Mak, S.S., Oseid, E.A., Berghmans, M., Leboeuf, R.C., Robertson, R.P., 2009. beta-Cell-specific overexpression of glutathione peroxidase preserves intranuclear MafA and reverses diabetes in db/db mice. *Endocrinology* 150(11), 4855-4862.
- Harmon, J.S., Gleason, C.E., Tanaka, Y., Oseid, E.A., Hunter-Berger, K.K., Robertson, R.P., 1999. In vivo prevention of hyperglycemia also prevents glucotoxic effects on PDX-1 and insulin gene expression. *Diabetes* 48(10), 1995.
- Harmon, J.S., Stein, R., Robertson, R.P., 2005. Oxidative stress-mediated, post-translational loss of MafA protein as a contributing mechanism to loss of insulin gene expression in glucotoxic beta cells. *J Biol Chem* 280(12), 11107-11113.
- Hauptmann, N., Cadenas, E., 1997. *The Oxygen Paradox: Biochemistry of Active Oxygen, Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses.* CSH Monograph Archive. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 1-20.
- Heilig, C.W., Concepcion, L.A., Riser, B.L., Freytag, S.O., Zhu, M., Cortes, P., 1995. Overexpression of glucose transporters in rat mesangial cells cultured in a normal glucose milieu mimics the diabetic phenotype. *J Clin Invest* 96(4), 1802-1814.
- Ho, E., Karimi Galougahi, K., Liu, C.C., Bhindi, R., Figtree, G.A., 2013. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol* 1, 483-491.
- Hodgson, J.M., Watts, G.F., Playford, D.A., Burke, V., Croft, K.D., 2002. Coenzyme Q10 improves blood pressure and glycaemic control: a controlled trial in subjects with type 2 diabetes. *Eur J Clin Nutr* 56(11), 1137-1142.
- Hoffmann, A., Natoli, G., Ghosh, G., 2006. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* 25(51), 6706-6716.
- Hou, J.C., Williams, D., Vicogne, J., Pessin, J.E., 2009. The glucose transporter 2 undergoes plasma membrane endocytosis and lysosomal degradation in a secretagogue-dependent manner. *Endocrinology* 150(9), 4056-4064.
- Hou, N., Torii, S., Saito, N., Hosaka, M., Takeuchi, T., 2008. Reactive oxygen species-mediated pancreatic beta-cell death is regulated by interactions between stress-activated protein kinases, p38 and c-Jun N-terminal kinase, and mitogen-activated protein kinase phosphatases. *Endocrinology* 149(4), 1654-1665.

- Huertas, A., Das, S.R., Emin, M., Sun, L., Rifkind, J.M., Bhattacharya, J., Bhattacharya, S., 2013. Erythrocytes induce proinflammatory endothelial activation in hypoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 48(1), 78-86.
- Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut", 2018. Zdravstveno-statistički godišnjak Republike Srbije 2017.
- International Diabetes Federation, 2017. *IDF Diabetes Atlas*, 8th edn.
- Ishiguro, K., Yamaki, M., Takagi, S., Ikeda, Y., Kawakami, K., Ito, K., Nose, T., 1988. Studies on iridoid-related compounds. V. Antitumor activity of iridoid dervs. periodate oxidation products. *J Pharmacobiodyn* 11(2), 131-136.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., Nabeshima, Y.-i., 1997. An Nrf2/Small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 236(2), 313-322.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., Yamamoto, M., 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes & Development* 13(1), 76-86.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., O'Connor, T., Yamamoto, M., 2003. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes to Cells* 8(4), 379-391.
- Jaishree, V., Badami, S., 2010. Antioxidant and hepatoprotective effect of swertiamarin from *Enicostemma axillare* against D-galactosamine induced acute liver damage in rats. *J Ethnopharmacol* 130(1), 103-106.
- Jaiswal, A.K., 2004. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med* 36(10), 1199-1207.
- Jančić, R., 1988. *Sto naših najpoznatijih lekovitih biljaka*. Naučna knjiga, Beograd.
- Jarald, E., Joshi, S.B., Jain, D.C., 2008. *Diabetes VS Herbal Medicines*. *iums-ijpt* 7(1), 97-90.
- Jarić, S., Macukanović-Jocić, M., Djurdjević, L., Mitrović, M., Kostić, O., Karadžić, B., Pavlović, P., 2015. An ethnobotanical survey of traditionally used plants on Suva planina mountain (south-eastern Serbia). *J Ethnopharmacol* 175, 93-108.
- Jensen, S.R., Schripsema, J., 2002. *Chemotaxonomy and pharmacology of Gentianaceae*, u: Struwe, L., Albert, V. (Eds.), *Gentianaceae - Systematics and Natural History*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 573-631.
- Johansson, L.H., Borg, L.A., 1988. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem* 174(1), 331-336.
- Johnson, J.D., Ahmed, N.T., Luciani, D.S., Han, Z., Tran, H., Fujita, J., Mislser, S., Edlund, H., Polonsky, K.S., 2003. Increased islet apoptosis in Pdx1<sup>+/-</sup> mice. *J Clin Invest* 111(8), 1147-1160.

- Johnson, J.D., Bernal-Mizrachi, E., Alejandro, E.U., Han, Z., Kalynyak, T.B., Li, H., Beith, J.L., Gross, J., Warnock, G.L., Townsend, R.R., Permutt, M.A., Polonsky, K.S., 2006. Insulin protects islets from apoptosis via Pdx1 and specific changes in the human islet proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(51), 19575-19580.
- Johnston, K., Sharp, P., Clifford, M., Morgan, L., 2005. Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Lett* 579(7), 1653-1657.
- Jonas, J.C., Sharma, A., Hasenkamp, W., Ilkova, H., Patane, G., Laybutt, R., Bonner-Weir, S., Weir, G.C., 1999. Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes. *J Biol Chem* 274(20), 14112-14121.
- Jones, K.A., Kadonaga, J.T., Luciw, P.A., Tjian, R., 1986. Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, Sp1. *Science* 232(4751), 755-759.
- Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T., Edlund, H., 1994. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371(6498), 606-609.
- Jung, E.H., Kim, S.R., Hwang, I.K., Ha, T.Y., 2007. Hypoglycemic effects of a phenolic acid fraction of rice bran and ferulic acid in C57BL/KsJ-db/db mice. *J Agric Food Chem* 55(24), 9800-9804.
- Jung, H.A., Su, B.N., Keller, W.J., Mehta, R.G., Kinghorn, A.D., 2006. Antioxidant xanthenes from the pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). *J Agric Food Chem* 54(6), 2077-2082.
- Jung, M., Park, M., Lee, H.C., Kang, Y.H., Kang, E.S., Kim, S.K., 2006. Antidiabetic agents from medicinal plants. *Curr Med Chem* 13(10), 1203-1218.
- Kaczynski, J., Cook, T., Urrutia, R., 2003. Sp1- and Kruppel-like transcription factors. *Genome Biol* 4(2), 206.
- Kahn, S.E., 2003. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 46(1), 3-19.
- Kahn, S.E., Hull, R.L., Utzschneider, K.M., 2006. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444(7121), 840-846.
- Kamalakkannan, N., Stanely Mainzen Prince, P., 2006. Rutin improves the antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Mol Cell Biochem* 293(1-2), 211-219.
- Kane, M.P., Abu-Baker, A., Busch, R.S., 2005. The utility of oral diabetes medications in type 2 diabetes of the young. *Curr Diabetes Rev* 1(1), 83-92.
- Kaneto, H., Matsuoka, T.A., Kawashima, S., Yamamoto, K., Kato, K., Miyatsuka, T., Katakami, N., Matsuhisa, M., 2009. Role of MafA in pancreatic beta-cells. *Adv Drug Deliv Rev* 61(7-8), 489-496.
- Kaneto, H., Miyatsuka, T., Kawamori, D., Yamamoto, K., Kato, K., Shiraiwa, T., Katakami, N., Yamasaki, Y., Matsuhisa, M., Matsuoka, T.A., 2008. PDX-1 and

- MafA play a crucial role in pancreatic beta-cell differentiation and maintenance of mature beta-cell function. *Endocr J* 55(2), 235-252.
- Kangralkar, V.A., Patil, S.D., Bandivadekar, R.M., 2010. Oxidative stress and diabetes: a review. *Int J Pharm Appl* 1(1), 38-45.
- Karin, M., Ben-Neriah, Y., 2000. Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF- $\kappa$ B Activity. *Annual Review of Immunology* 18(1), 621-663.
- Karin, M., Takahashi, T., Kapahi, P., Delhase, M., Chen, Y., Makris, C., Rothwarf, D., Baud, V., Natoli, G., Guido, F., Li, N., 2001. Oxidative stress and gene expression: The AP-1 and NF- $\kappa$ B connections. *Biofactors* 15(2-4), 87-89.
- Kataja-Tuomola, M.K., Kontto, J.P., Mannisto, S., Albanes, D., Virtamo, J.R., 2010. Effect of alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation on macrovascular complications and total mortality from diabetes: results of the ATBC Study. *Ann Med* 42(3), 178-186.
- Katz, J., Benoist, C., Mathis, D., 1993. Major histocompatibility complex class I molecules are required for the development of insulinitis in non-obese diabetic mice. *Eur J Immunol* 23(12), 3358-3360.
- Kaufman, R.J., Back, S.H., Song, B., Han, J., Hassler, J., 2010. The unfolded protein response is required to maintain the integrity of the endoplasmic reticulum, prevent oxidative stress and preserve differentiation in  $\beta$ -cells. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 12(s2), 99-107.
- Kaur, G., Dufour, J.M., 2012. Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis* 2(1), 1-5.
- Kayali, R., Çakatay, U., Akçay, T., Altuğ, T., 2006. Effect of alpha-lipoic acid supplementation on markers of protein oxidation in post-mitotic tissues of ageing rat. *Cell Biochemistry and Function* 24(1), 79-85.
- Kedziora-Kornatowska, K.Z., Luciak, M., Paszkowski, J., 2000. Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the diabetic kidney: effect of treatment with angiotensin convertase inhibitors. *IUBMB Life* 49(4), 303-307.
- Kesari, A.N., Kesari, S., Singh, S.K., Gupta, R.K., Watal, G., 2007. Studies on the glycemic and lipidemic effect of *Murraya koenigii* in experimental animals. *J Ethnopharmacol* 112(2), 305-311.
- Khoo, S., Griffen, S.C., Xia, Y., Baer, R.J., German, M.S., Cobb, M.H., 2003. Regulation of insulin gene transcription by ERK1 and ERK2 in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 278(35), 32969-32977.
- Kim, H.J., Vaziri, N.D., 2010. Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 298(3), F662-671.
- Kim, S.K., Hebrok, M., 2001. Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev* 15(2), 111-127.
- Kim, T.K., Lee, J.S., Jung, H.S., Ha, T.K., Kim, S.M., Han, N., Lee, E.J., Kim, T.N., Kwon, M.J., Lee, S.H., Kim, M.K., Rhee, B.D., Park, J.H., 2014. Triiodothyronine induces

- proliferation of pancreatic beta-cells through the MAPK/ERK pathway. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 122(4), 240-245.
- Kloppel, G., Lohr, M., Habich, K., Oberholzer, M., Heitz, P.U., 1985. Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv Synth Pathol Res* 4(2), 110-125.
- Knekt, P., Reunanen, A., Jarvinen, R., Seppanen, R., Heliövaara, M., Aromaa, A., 1994. Antioxidant vitamin intake and coronary mortality in a longitudinal population study. *Am J Epidemiol* 139(12), 1180-1189.
- Kohen, R., Nyska, A., 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 30(6), 620-650.
- Kondo, Y., Takano, F., Hojo, H., 1994. Suppression of chemically and immunologically induced hepatic injuries by gentiopicroside in mice. *Planta Med* 60(5), 414-416.
- Konishi, H., Tanaka, M., Takemura, Y., Matsuzaki, H., Ono, Y., Kikkawa, U., Nishizuka, Y., 1997. Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(21), 11233-11237.
- Kops, G.J.P.L., Dansen, T.B., Polderman, P.E., Saarloos, I., Wirtz, K.W.A., Coffey, P.J., Huang, T.-T., Bos, J.L., Medema, R.H., Burgering, B.M.T., 2002. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 419(6904), 316-321.
- Korriem, K.M.M., Abdelhamid, A.Z., Younes, H.F., 2013. Caffeic acid protects tissue antioxidants and DNA content in methamphetamine induced tissue toxicity in Sprague Dawley rats. *Toxicology Mechanisms and Methods* 23(2), 134-143.
- Kruk, J., 2014. Association between vegetable, fruit and carbohydrate intake and breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 15(11), 4429-4436.
- Kumar, A., Takada, Y., Boriek, A.M., Aggarwal, B.B., 2004. Nuclear factor- $\kappa$ B: its role in health and disease. *Journal of Molecular Medicine* 82(7), 434-448.
- Kumarasamy, Y., Nahar, L., Cox, P.J., Jaspars, M., Sarker, S.D., 2003. Bioactivity of secoiridoid glycosides from *Centaureum erythraea*. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 10(4), 344-347.
- Kyrø, C., Skeie, G., Loft, S., Landberg, R., Christensen, J., Lund, E., Nilsson, L.M., Palmqvist, R., Tjønneland, A., Olsen, A., 2013. Intake of whole grains from different cereal and food sources and incidence of colorectal cancer in the Scandinavian HELGA cohort. *Cancer Causes & Control* 24(7), 1363-1374.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259), 680-685.
- Langsjoen, P.H., Langsjoen, A.M., 1999. Overview of the use of CoQ10 in cardiovascular disease. *Biofactors* 9(2-4), 273-284.

- Lansdown, R.V., 2013. *Centaurium erythraea*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T202950A16703434. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T202950A16703434.en>.
- Lawrence, M., Shao, C., Duan, L., McGlynn, K., Cobb, M.H., 2008. The protein kinases ERK1/2 and their roles in pancreatic beta cells. *Acta Physiologica* 192(1), 11-17.
- Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.L., Fernandez-Mejia, C., 2009. [Transcription factors in the adult beta cell]. *Rev Invest Clin* 61(5), 428-446.
- Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.L., Fernandez-Mejia, C., 2011. Beta-Cell Function and Failure in Type 1 Diabetes, u: Wagner, D. (Ed.) *Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy*. IntechOpen.
- Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.L., Fernandez-Mejia, C., 2013. Oxidative Stress in Diabetes Mellitus and the Role Of Vitamins with Antioxidant Actions, u: J., M.-G.A. (Ed.) *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*. IntechOpen.
- Leclercq, I.A., Da Silva Morais, A., Schroyen, B., Van Hul, N., Geerts, A., 2007. Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: mechanisms and consequences. *J Hepatol* 47(1), 142-156.
- Lee, E.S., Uhm, K.-O., Lee, Y.M., Han, M., Lee, M., Park, J.M., Suh, P.-G., Park, S.-H., Kim, H.S., 2007. CAPE (caffeic acid phenethyl ester) stimulates glucose uptake through AMPK (AMP-activated protein kinase) activation in skeletal muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 361(4), 854-858.
- Lee, J.-S., Surh, Y.-J., 2005. Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Letters* 224(2), 171-184.
- Leibiger, B., Moede, T., Uhles, S., Barker, C.J., Creveaux, M., Domin, J., Berggren, P.-O., Leibiger, I.B., 2010. Insulin-feedback via PI3K-C2 $\alpha$  activated PKB $\alpha$ /Akt1 is required for glucose-stimulated insulin secretion. *The FASEB Journal* 24(6), 1824-1837.
- Leibowitz, G., Bachar, E., Shaked, M., Sinai, A., Ketzinel-Gilad, M., Cerasi, E., Kaiser, N., 2010. Glucose regulation of beta-cell stress in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 12 Suppl 2, 66-75.
- Lenzen, S., 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51(2), 216-226.
- Lenzen, S., Drinkgern, J., Tiedge, M., 1996. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 20(3), 463-466.
- Levinthal, N.G., Tavill, S.A., 1999. Liver disease and diabetes mellitus. *Clinical Diabetes* 17(2).
- Li, J.M., Che, C.T., Lau, C.B., Leung, P.S., Cheng, C.H., 2006. Inhibition of intestinal and renal Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter by naringenin. *Int J Biochem Cell Biol* 38(5-6), 985-995.



- Li, Q., Verma, I.M., 2002. NF- $\kappa$ B regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology* 2, 725.
- Lim, S.C., Lekshminarayanan, R., Goh, S.K., Ong, Y.Y., Subramaniam, T., Sum, C.F., Ong, C.N., Lee, B.L., 2008. The effect of coenzyme Q10 on microcirculatory endothelial function of subjects with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 196(2), 966-969.
- Lingohr, M.K., Dickson, L.M., McCuaig, J.F., Hugl, S.R., Twardzik, D.R., Rhodes, C.J., 2002. Activation of IRS-2-mediated signal transduction by IGF-1, but not TGF- $\alpha$  or EGF, augments pancreatic beta-cell proliferation. *Diabetes* 51(4), 966-976.
- Liochev, S.I., 1999. The mechanism of "Fenton-like" reactions and their importance for biological systems. A biologist's view. *Met Ions Biol Syst* 36, 1-39.
- Liu, C.-M., Ma, J.-Q., Sun, Y.-Z., 2010. Quercetin protects the rat kidney against oxidative stress-mediated DNA damage and apoptosis induced by lead. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 30(3), 264-271.
- Loizzo, M.R., Saab, A.M., Tundis, R., Menichini, F., Bonesi, M., Piccolo, V., Statti, G.A., de Cindio, B., Houghton, P.J., 2008. In vitro inhibitory activities of plants used in Lebanon traditional medicine against angiotensin converting enzyme (ACE) and digestive enzymes related to diabetes. *J Ethnopharmacol* 119(1), 109-116.
- Lonn, E.M., Yusuf, S., Dzavik, V., Doris, C.I., Yi, Q., Smith, S., Moore-Cox, A., Bosch, J., Riley, W.A., Teo, K.K., 2001. Effects of Ramipril and Vitamin E on Atherosclerosis. *Circulation* 103(7), 919-925.
- Lortz, S., Tiedge, M., Nachtwey, T., Karlsen, A.E., Nerup, J., Lenzen, S., 2000. Protection of insulin-producing RINm5F cells against cytokine-mediated toxicity through overexpression of antioxidant enzymes. *Diabetes* 49(7), 1123-1130.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1), 265-275.
- Lubos, E., Loscalzo, J., Handy, D.E., 2011. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 15(7), 1957-1997.
- Lushchak, V.I., 2012. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids* 2012, 736837.
- Malatiali, S., Francis, I., Barac-Nieto, M., 2008. Phlorizin prevents glomerular hyperfiltration but not hypertrophy in diabetic rats. *Experimental diabetes research* 2008, 305403-305403.
- Maldonado, M., Hampe, C.S., Gaur, L.K., D'Amico, S., Iyer, D., Hammerle, L.P., Bolgiano, D., Rodriguez, L., Rajan, A., Lernmark, A., Balasubramanyam, A., 2003. Ketosis-prone diabetes: dissection of a heterogeneous syndrome using an immunogenetic and beta-cell functional classification, prospective analysis, and clinical outcomes. *J Clin Endocrinol Metab* 88(11), 5090-5098.

- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Rémésy, C., 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81(1), 230S-242S.
- Manna, P., Das, J., Ghosh, J., Sil, P.C., 2010. Contribution of type 1 diabetes to rat liver dysfunction and cellular damage via activation of NOS, PARP, I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B, MAPKs, and mitochondria-dependent pathways: Prophylactic role of arjunolic acid. *Free Radic Biol Med* 48(11), 1465-1484.
- Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins, J.B., 3rd, 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 17(1), 24-38.
- Marshall, S., Bacote, V., Traxinger, R.R., 1991. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem* 266(8), 4706-4712.
- Martinez, A., Hernandez-Marin, E., Galano, A., 2012. Xanthenes as antioxidants: a theoretical study on the thermodynamics and kinetics of the single electron transfer mechanism. *Food Funct* 3(4), 442-450.
- Mason, R.M., Wahab, N.A., 2003. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14(5), 1358-1373.
- Mates, J.M., Segura, J.A., Alonso, F.J., Marquez, J., 2008. Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Arch Toxicol* 82(5), 273-299.
- Matschinsky, F.M., 1996. Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 45(2), 223-241.
- Matsuda, T., Omori, K., Vuong, T., Pascual, M., Valiente, L., Ferreri, K., Todorov, I., Kuroda, Y., Smith, C.V., Kandeel, F., Mullen, Y., 2005. Inhibition of p38 pathway suppresses human islet production of pro-inflammatory cytokines and improves islet graft function. *Am J Transplant* 5(3), 484-493.
- Mauer, S.M., Steffes, M.W., Ellis, E.N., Sutherland, D.E., Brown, D.M., Goetz, F.C., 1984. Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. *J Clin Invest* 74(4), 1143-1155.
- Maxwell, S.R., Thomason, H., Sandler, D., Leguen, C., Baxter, M.A., Thorpe, G.H., Jones, A.F., Barnett, A.H., 1997. Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 27(6), 484-490.
- Mazure, N.M., Brahimi-Horn, M.C., Pouyssegur, J., 2003. Protein kinases and the hypoxia-inducible factor-1, two switches in angiogenesis. *Curr Pharm Des* 9(7), 531-541.
- McCarty, M.F., 1998. Complementary measures for promoting insulin sensitivity in skeletal muscle. *Med Hypotheses* 51(6), 451-464.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244(22), 6049-6055.

- Mehta, J.L., Rasouli, N., Sinha, A.K., Molavi, B., 2006. Oxidative stress in diabetes: a mechanistic overview of its effects on atherogenesis and myocardial dysfunction. *Int J Biochem Cell Biol* 38(5-6), 794-803.
- Mekinova, D., Chorvathova, V., Volkovova, K., Staruchova, M., Grancicova, E., Klvanova, J., Ondreicka, R., 1995. Effect of intake of exogenous vitamins C, E and beta-carotene on the antioxidative status in kidneys of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Nahrung* 39(4), 257-261.
- Mendelson, K.G., Contois, L.R., Tevosian, S.G., Davis, R.J., Paulson, K.E., 1996. Independent regulation of JNK/p38 mitogen-activated protein kinases by metabolic oxidative stress in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(23), 12908-12913.
- Miao, L., St Clair, D.K., 2009. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med* 47(4), 344-356.
- Mihailović, M., Arambašić, J., Uskoković, A., Dinić, S., Grdović, N., Marković, J., Bauder, J., Poznanović, G., Vidaković, M., 2013a.  $\beta$ -Glucan administration to diabetic rats alleviates oxidative stress by lowering hyperglycaemia, decreasing non-enzymatic glycation and protein O-GlcNAcylation. *Journal of Functional Foods* 5(3), 1226-1234.
- Mihailović, M., Arambašić, J., Uskoković, A., Dinić, S., Grdović, N., Marković, J., Mujić, I., Šijački, D.A., Poznanović, G., Vidaković, M., 2013b.  $\beta$ -Glucan administration to diabetic rats reestablishes redox balance and stimulates cellular pro-survival mechanisms. *Journal of Functional Foods* 5(1), 267-278.
- Mihailović, M., Arambašić, J., Uskoković, A., Dinić, S., Grdović, N., Marković, J., Poznanović, G., Vidaković, M., 2012. Alpha-lipoic acid preserves the structural and functional integrity of red blood cells by adjusting the redox disturbance and decreasing O-GlcNAc modifications of antioxidant enzymes and heat shock proteins in diabetic rats. *Eur J Nutr* 51(8), 975-986.
- Miller, E.R., III, Pastor-Barriuso, R., Dalal, D., Riemersma, R.A., Appel, L.J., Guallar, E., 2005. Meta-Analysis: High-Dosage Vitamin E Supplementation May Increase All-Cause Mortality. *Annals of Internal Medicine* 142(1), 37-46.
- Mills, G.C., 1957. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem* 229(1), 189-197.
- Minc, E., de Coppet, P., Masson, P., Thiery, L., Dutertre, S., Amor-Guéret, M., Jaulin, C., 1999. The Human Copper-Zinc Superoxide Dismutase Gene (SOD1) Proximal Promoter Is Regulated by Sp1, Egr-1, and WT1 via Non-canonical Binding Sites. *Journal of Biological Chemistry* 274(1), 503-509.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247(10), 3170-3175.
- Miwa, T., Adachi, T., Ito, Y., Hirano, K., Sugiura, M., 1983. Purification and properties of glutathione peroxidase from human liver. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 31(1), 179-185.

- Mogensen, C.E., Christensen, C.K., Vittinghus, E., 1983. The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes* 32 Suppl 2, 64-78.
- Mohamed, J., Shing, S.W., Idris, M.H., Budin, S.B., Zainalabidin, S., 2013. The protective effect of aqueous extracts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. UKMR-2) against red blood cell membrane oxidative stress in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Clinics (Sao Paulo)* 68(10), 1358-1363.
- Mohanty, J.G., Nagababu, E., Rifkind, J.M., 2014. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Front Physiol* 5, 84.
- Morre, D.M., Lenaz, G., Morre, D.J., 2000. Surface oxidase and oxidative stress propagation in aging. *J Exp Biol* 203(Pt 10), 1513-1521.
- Motohashi, H., Yamamoto, M., 2004. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med* 10(11), 549-557.
- Mroueh, M., Saab, Y., Rizkallah, R., 2004. Hepatoprotective activity of *Centaureum erythraea* on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother Res* 18(5), 431-433.
- Nair, A.B., Jacob, S., 2016. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm* 7(2), 27-31.
- Nath, K.A., Grande, J., Croatt, A., Haugen, J., Kim, Y., Rosenberg, M.E., 1998. Redox regulation of renal DNA synthesis, transforming growth factor-beta1 and collagen gene expression. *Kidney Int* 53(2), 367-381.
- Navarro-Nunez, L., Lozano, M.L., Palomo, M., Martinez, C., Vicente, V., Castillo, J., Benavente-Garcia, O., Diaz-Ricart, M., Escolar, G., Rivera, J., 2008. Apigenin inhibits platelet adhesion and thrombus formation and synergizes with aspirin in the suppression of the arachidonic acid pathway. *J Agric Food Chem* 56(9), 2970-2976.
- Navarro-Tableros, V., Sanchez-Soto, M.C., Garcia, S., Hiriart, M., 2004. Autocrine regulation of single pancreatic beta-cell survival. *Diabetes* 53(8), 2018-2023.
- Nawale, R.B., Mourya, V.K., Bhise, S.B., 2006. Non-enzymatic glycation of proteins: a cause for complications in diabetes. *Indian J Biochem Biophys* 43(6), 337-344.
- Naziroglu, M., Butterworth, P.J., 2005. Protective effects of moderate exercise with dietary vitamin C and E on blood antioxidative defense mechanism in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Can J Appl Physiol* 30(2), 172-185.
- Nemoto, S., Finkel, T., 2002. Redox Regulation of Forkhead Proteins Through a p66shc-Dependent Signaling Pathway. *Science* 295(5564), 2450.
- Nenoi, M., Ichimura, S., Mita, K., Yukawa, O., Cartwright, I.L., 2001. Regulation of the catalase gene promoter by Sp1, CCAAT-recognizing factors, and a WT1/Egr-related factor in hydrogen peroxide-resistant HP100 cells. *Cancer Res* 61(15), 5885-5894.

- Neužil, J., Thomas, S.R., Stocker, R., 1997. Requirement for, Promotion, or Inhibition by  $\alpha$ -Tocopherol of Radical-Induced Initiation of Plasma Lipoprotein Lipid Peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine* 22(1), 57-71.
- Newgard, C.B., McGarry, J.D., 1995. Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. *Annu Rev Biochem* 64, 689-719.
- Nićiforović, N., Abramović, H., 2014. Sinapic Acid and Its Derivatives: Natural Sources and Bioactivity. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13(1), 34-51.
- Niiho, Y., Yamazaki, T., Nakajima, Y., Yamamoto, T., Ando, H., Hirai, Y., Toriizuka, K., Ida, Y., 2006. Gastroprotective effects of bitter principles isolated from Gentian root and Swertia herb on experimentally-induced gastric lesions in rats. *Journal of Natural Medicines* 60(1), 82-88.
- Nimse, S.B., Pal, D., 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances* 5(35), 27986-28006.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M.A., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H.P., Giardino, I., Brownlee, M., 2000. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404(6779), 787-790.
- Nishimura, W., Takahashi, S., Yasuda, K., 2015. MafA is critical for maintenance of the mature beta cell phenotype in mice. *Diabetologia* 58(3), 566-574.
- O'Brien, B.A., Harmon, B.V., Cameron, D.P., Allan, D.J., 1996. Beta-cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin model. *J Pathol* 178(2), 176-181.
- Ohno, T., Horio, F., Tanaka, S., Terada, M., Namikawa, T., Kitoh, J., 1999. Fatty liver and hyperlipidemia in iddm (insulin-dependent diabetes mellitus) of streptozotocin-treated shrews. *Life Sciences* 66(2), 125-131.
- Olson, L.K., Sharma, A., Peshavaria, M., Wright, C.V., Towle, H.C., Rodertson, R.P., Stein, R., 1995. Reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to a supraphysiologic glucose concentration is associated with loss of STF-1 transcription factor expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(20), 9127.
- Opitz, O.G., Rustgi, A.K., 2000. Interaction between Sp1 and cell cycle regulatory proteins is important in transactivation of a differentiation-related gene. *Cancer Res* 60(11), 2825-2830.
- Ovaskainen, M.L., Torronen, R., Koponen, J.M., Sinkko, H., Hellstrom, J., Reinivuo, H., Mattila, P., 2008. Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *J Nutr* 138(3), 562-566.
- Overvad, K., Diamant, B., Holm, L., Holmer, G., Mortensen, S.A., Stender, S., 1999. Coenzyme Q10 in health and disease. *Eur J Clin Nutr* 53(10), 764-770.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J Nutr* 44, 307-315.

- Ozkol, H., Tuluçe, Y., Dilsiz, N., Koyuncu, I., 2013. Therapeutic potential of some plant extracts used in Turkish traditional medicine on streptozocin-induced type 1 diabetes mellitus in rats. *J Membr Biol* 246(1), 47-55.
- Pacher, P., Obrosova, I.G., Mabley, J.G., Szabo, C., 2005. Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies. *Curr Med Chem* 12(3), 267-275.
- Pahl, H.L., 1999. Activators and target genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. *Oncogene* 18, 6853.
- Palmer, H.J., Paulson, K.E., 1997. Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression. *Nutr Rev* 55(10), 353-361.
- Panasenko, O.M., Gorudko, I.V., Sokolov, A.V., 2013. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems. *Biochemistry (Mosc)* 78(13), 1466-1489.
- Panda, S., Kar, A., 2007. Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone) regulates hyperglycaemia, thyroid dysfunction and lipid peroxidation in alloxan-induced diabetic mice. *J Pharm Pharmacol* 59(11), 1543-1548.
- Panse, M., Gerst, F., Kaiser, G., Teutsch, C.A., Dölker, R., Wagner, R., Häring, H.U., Ullrich, S., 2015. Activation of Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases 1 and 2 (ERK1/2) by Free Fatty Acid Receptor 1 (FFAR1/GPR40) Protects from Palmitate-Induced Beta Cell Death, but Plays no Role in Insulin Secretion. *Cellular Physiology and Biochemistry* 35(4), 1537-1545.
- Paolisso, G., Balbi, V., Volpe, C., Varricchio, G., Gambardella, A., Saccomanno, F., Ammendola, S., Varricchio, M., D'Onofrio, F., 1995. Metabolic benefits deriving from chronic vitamin C supplementation in aged non-insulin dependent diabetics. *J Am Coll Nutr* 14(4), 387-392.
- Paolisso, G., D'Amore, A., Balbi, V., Volpe, C., Galzerano, D., Giugliano, D., Sgambato, S., Varricchio, M., D'Onofrio, F., 1994. Plasma vitamin C affects glucose homeostasis in healthy subjects and in non-insulin-dependent diabetics. *Am J Physiol* 266(2 Pt 1), E261-268.
- Park, S.-K., Kim, J.-a., Seomun, Y., Choi, J., Kim, D.-H., Han, I.-O., Lee, E.H., Chung, S.-K., Joo, C.-K., 2001. Hydrogen Peroxide Is a Novel Inducer of Connective Tissue Growth Factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 284(4), 966-971.
- Park, Y., Kim, Y., Kim, K., 2012. Measurement Techniques for Red Blood Cell Deformability: Recent Advances, u: Moschandreu, T. (Ed.) *Blood Cell - An Overview of Studies in Hematology*. IntechOpen, pp. 167-194.
- Parker, K.M., England, J.D., Da Costa, J., Hess, R.L., Goldstein, D.E., 1981. Improved colorimetric assay for glycosylated hemoglobin. *Clin Chem* 27(5), 669-672.
- Parsons, T.D., Coorsen, J.R., Horstmann, H., Almers, W., 1995. Docked granules, the exocytic burst, and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells. *Neuron* 15(5), 1085-1096.

- Pastor, N., Weinstein, H., Jamison, E., Brenowitz, M., 2000. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J Mol Biol* 304(1), 55-68.
- Paul, R.G., Bailey, A.J., 1996. Glycation of collagen: the basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes. *Int J Biochem Cell Biol* 28(12), 1297-1310.
- Pautz, A., Franzen, R., Dorsch, S., Böddinghaus, B., Briner, V.A., Pfeilschifter, J., Huwiler, A., 2002. Cross-talk between nitric oxide and superoxide determines ceramide formation and apoptosis in glomerular cells. *Kidney International* 61(3), 790-796.
- Pelagić, V., 1973. Lečenje lekovitim biljem, Šesto izdanje ed. Narodna knjiga, Beograd.
- Persaud, S.J., Muller, D., Jones, P.M., 2008. Insulin signalling in islets. *Biochem Soc Trans* 36(Pt 3), 290-293.
- Petersen, M.C., Vatner, D.F., Shulman, G.I., 2017. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 13(10), 572-587.
- Pietta, P., Minoggio, M., Bramati, L., 2003. Plant Polyphenols: Structure, Occurrence and Bioactivity, u: Rahman, A.-u. (Ed.) *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, pp. 257-312.
- Psoťova, J., Zahalkova, J., Hrbac, J., Simanek, V., Bartek, J., 2001. Determination of total antioxidant capacity in plasma by cyclic voltammetry. Two case reports. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 145(2), 81-83.
- Rafieian-Kopaei, M., Baradaran, A., Rafieian, M., 2013. Oxidative stress and the paradoxical effects of antioxidants. *J Res Med Sci* 18(7), 629.
- Rahier, J., Guiot, Y., Goebbels, R.M., Sempoux, C., Henquin, J.C., 2008. Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 10 Suppl 4, 32-42.
- Ramar, M., Manikandan, B., Raman, T., Priyadarsini, A., Palanisamy, S., Velayudam, M., Munusamy, A., Marimuthu Prabhu, N., Vaseeharan, B., 2012. Protective effect of ferulic acid and resveratrol against alloxan-induced diabetes in mice. *Eur J Pharmacol* 690(1-3), 226-235.
- Ramkumar, K.M., Vijayakumar, R.S., Vanitha, P., Suganya, N., Manjula, C., Rajaguru, P., Sivasubramanian, S., Gunasekaran, P., 2014. Protective effect of gallic acid on alloxan-induced oxidative stress and osmotic fragility in rats. *Hum Exp Toxicol* 33(6), 638-649.
- Rashidi, A., Kirkwood, T.B., Shanley, D.P., 2009. Metabolic evolution suggests an explanation for the weakness of antioxidant defences in beta-cells. *Mech Ageing Dev* 130(4), 216-221.
- Rathinam, A., Pari, L., 2016. Myrtenal ameliorates hyperglycemia by enhancing GLUT2 through Akt in the skeletal muscle and liver of diabetic rats. *Chemico-biological interactions* 256, 161-166.

- Reed, L.J., 1998. From lipoic acid to multi-enzyme complexes. *Protein Sci* 7(1), 220-224.
- Regensteiner, J.G., Popylisen, S., Bauer, T.A., Lindenfeld, J., Gill, E., Smith, S., Oliver-Pickett, C.K., Reusch, J.E., Weil, J.V., 2003. Oral L-arginine and vitamins E and C improve endothelial function in women with type 2 diabetes. *Vasc Med* 8(3), 169-175.
- Registar za dijabetes u Srbiji, 2016. Incidencija i mortalitet od dijabetesa u Srbiji.
- Remedi, M.S., Emfinger, C., 2016. Pancreatic beta-cell identity in diabetes. *Diabetes Obes Metab* 18 Suppl 1, 110-116.
- Repetto, M., Semprine, J., Boveris, A., 2012. Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination, u: Catala, A. (Ed.) *Lipid Peroxidation*. IntechOpen, London, pp. 2-30.
- Rhodes, C.J., 2000. IGF-I and GH post-receptor signaling mechanisms for pancreatic beta-cell replication. *J Mol Endocrinol* 24(3), 303-311.
- Richter, C., Gogvadze, V., Laffranchi, R., Schlapbach, R., Schweizer, M., Suter, M., Walter, P., Yaffee, M., 1995. Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim Biophys Acta* 1271(1), 67-74.
- Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Ascherio, A., Giovannucci, E., Colditz, G.A., Willett, W.C., 1993. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 328(20), 1450-1456.
- Rizvi, S.I., Zaid, M.A., Anis, R., Mishra, N., 2005. Protective role of tea catechins against oxidation-induced damage of type 2 diabetic erythrocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32(1-2), 70-75.
- Robertson, R.P., 2004. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem* 279(41), 42351-42354.
- Rohn, T.T., Nelson, L.K., Waeg, G., Quinn, M.T., 1998. U-101033E (2,4-diaminopyrrolopyrimidine), a potent inhibitor of membrane lipid peroxidation as assessed by the production of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde, and 4-hydroxynonenal--protein adducts. *Biochem Pharmacol* 56(10), 1371-1379.
- Rojo, A.I., Salinas, M., Martín, D., Perona, R., Cuadrado, A., 2004. Regulation of Cu/Zn-Superoxide Dismutase Expression via the Phosphatidylinositol 3 Kinase/Akt Pathway and Nuclear Factor- $\kappa$ B. *The Journal of Neuroscience* 24(33), 7324.
- Romanova, D., Vachalkova, A., Cipak, L., Ovesna, Z., Rauko, P., 2001. Study of antioxidant effect of apigenin, luteolin and quercetin by DNA protective method. *Neoplasma* 48(2), 104-107.
- Rorsman, P., Eliasson, L., Renström, E., Gromada, J., Barg, S., Göpel, S., 2000. The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. *Physiology* 15(2), 72-77.
- Rorsman, P., Renstrom, E., 2003. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46(8), 1029-1045.



- Ruch, R.J., Cheng, S.J., Klaunig, J.E., 1989. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis* 10, 1003-1008.
- Sacco, M., Pellegrini, F., Roncaglioni, M.C., Avanzini, F., Tognoni, G., Nicolucci, A., 2003. Primary prevention of cardiovascular events with low-dose aspirin and vitamin E in type 2 diabetic patients: results of the Primary Prevention Project (PPP) trial. *Diabetes Care* 26(12), 3264-3272.
- Saini, R., 2011. Coenzyme Q10: The essential nutrient. *J Pharm Bioallied Sci* 3(3), 466-467.
- Sakuraba, H., Mizukami, H., Yagihashi, N., Wada, R., Hanyu, C., Yagihashi, S., 2002. Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia* 45(1), 85-96.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sattanathan, K., Dhanapal, C.K., Manavalan, R., 2011. Antihypertensive and other beneficial health effects of Rutin supplementation in diabetic patients.
- Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., Remesy, C., 2002. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother* 56(6), 276-282.
- Scalbert, A., Williamson, G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130(8S Suppl), 2073S-2085S.
- Sefi, M., Fetoui, H., Lachkar, N., Tahraoui, A., Lyoussi, B., Boudawara, T., Zeghal, N., 2011. *Centaurium erythraea* (Gentianaceae) leaf extract alleviates streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *J Ethnopharmacol* 135(2), 243-250.
- Sellamuthu, P.S., Arulselvan, P., Kamalraj, S., Fakurazi, S., Kandasamy, M., 2013. Protective Nature of Mangiferin on Oxidative Stress and Antioxidant Status in Tissues of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *ISRN Pharmacology* 2013, 10.
- Sen, C.K., 2000. Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr Top Cell Regul* 36, 1-30.
- Sen, C.K., Packer, L., 1996. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 10(7), 709-720.
- Sen, S., Kar, M., Roy, A., Chakraborti, A.S., 2005. Effect of nonenzymatic glycation on functional and structural properties of hemoglobin. *Biophys Chem* 113(3), 289-298.
- Serra, J.A., Dominguez, R.O., Marschoff, E.R., Guareschi, E.M., Famulari, A.L., Boveris, A., 2009. Systemic oxidative stress associated with the neurological diseases of aging. *Neurochem Res* 34(12), 2122-2132.

- Shay, K.P., Moreau, R.F., Smith, E.J., Smith, A.R., Hagen, T.M., 2009. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790(10), 1149-1160.
- Shiose, A., Kuroda, J., Tsuruya, K., Hirai, M., Hirakata, H., Naito, S., Hattori, M., Sakaki, Y., Sumimoto, H., 2001. A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J Biol Chem* 276(2), 1417-1423.
- Siems, W.G., Sommerburg, O., Grune, T., 2000. Erythrocyte free radical and energy metabolism. *Clin Nephrol* 53(1 Suppl), S9-17.
- Sies, H., 1974. Biochemistry of the peroxisome in the liver cell. *Angew Chem Int Ed Engl* 13(11), 706-718.
- Šiler, B., Mišić, D., 2016. Chapter 11 - Biologically Active Compounds from the Genus *Centaurium* s.l. (Gentianaceae): Current Knowledge and Future Prospects in Medicine, u: Atta ur, R. (Ed.) *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, pp. 363-397.
- Šiler, B., Mišić, D., Nestorović, J., Banjanac, T., Glamočlija, J., Soković, M., Ćirić, A., 2010. Antibacterial and antifungal screening of *Centaurium pulchellum* crude extracts and main secoiridoid compounds. *Nat Prod Commun* 5(10), 1525-1530.
- Šiler, B., Živković, S., Banjanac, T., Cvetković, J., Nestorović Živković, J., Ćirić, A., Soković, M., Mišić, D., 2014. Centauries as underestimated food additives: Antioxidant and antimicrobial potential. *Food Chemistry* 147, 367-376.
- Silverman, N., Maniatis, T., 2001. NF- $\kappa$ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes & Development* 15(18), 2321-2342.
- Sinclair, A.J., Taylor, P.B., Lunec, J., Girling, A.J., Barnett, A.H., 1994. Low plasma ascorbate levels in patients with type 2 diabetes mellitus consuming adequate dietary vitamin C. *Diabet Med* 11(9), 893-898.
- Singh, M., Shin, S., 2009. Changes in erythrocyte aggregation and deformability in diabetes mellitus: a brief review. *Indian J Exp Biol* 47(1), 7-15.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175(1), 184-191.
- Singh, R., Bhardwaj, P., Sharma, P., 2013. Antioxidant and toxicological evaluation of *Cassia sopherain* streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Pharmacognosy Res* 5(4), 225-232.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A.J., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.
- Soares, A.A., De Sá-Nakanishi, B.A., Bracht, A., Da Costa, M.S., Koehnlein, A.E., De Souza, G.C., Peralta, M.R., 2013. Hepatoprotective Effects of Mushrooms. *Molecules* 18(7).

- Solomon, S.S., Majumdar, G., Martinez-Hernandez, A., Raghov, R., 2008. A critical role of Sp1 transcription factor in regulating gene expression in response to insulin and other hormones. *Life Sci* 83(9-10), 305-312.
- Song, G., Ouyang, G., Bao, S., 2005. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 9(1), 59-71.
- Spitaler, M.M., Graier, W.F., 2002. Vascular targets of redox signalling in diabetes mellitus. *Diabetologia* 45(4), 476-494.
- Stagner, J.I., Samols, E., Weir, G.C., 1980. Sustained oscillations of insulin, glucagon, and somatostatin from the isolated canine pancreas during exposure to a constant glucose concentration. *J Clin Invest* 65(4), 939-942.
- Stampfer, M.J., Hennekens, C.H., Manson, J.E., Colditz, G.A., Rosner, B., Willett, W.C., 1993. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med* 328(20), 1444-1449.
- Stefkov, G., Miova, B., Dinevska-Kjovkarovska, S., Stanoeva, J.P., Stefova, M., Petrushevska, G., Kulevanova, S., 2014. Chemical characterization of *Centaureum erythraea* L. and its effects on carbohydrate and lipid metabolism in experimental diabetes. *J Ethnopharmacol* 152(1), 71-77.
- Steinberg, S.F., 2008. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev* 88(4), 1341-1378.
- Stewart, A.F., Hussain, M.A., Garcia-Ocana, A., Vasavada, R.C., Bhushan, A., Bernal-Mizrachi, E., Kulkarni, R.N., 2015. Human beta-cell proliferation and intracellular signaling: part 3. *Diabetes* 64(6), 1872-1885.
- Stoffers, D.A., Zinkin, N.T., Stanojevic, V., Clarke, W.L., Habener, J.F., 1997. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat Genet* 15(1), 106-110.
- Stoyanovsky, D.A., Osipov, A.N., Quinn, P.J., Kagan, V.E., 1995. Ubiquinone-Dependent Recycling of Vitamin E Radicals by Superoxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 323(2), 343-351.
- Straub, S.G., Sharp, G.W.G., 2004. Hypothesis: one rate-limiting step controls the magnitude of both phases of glucose-stimulated insulin secretion. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 287(3), C565-C571.
- Suarez-Pinzon, W.L., Strynadka, K., Rabinovitch, A., 1996. Destruction of rat pancreatic islet beta-cells by cytokines involves the production of cytotoxic aldehydes. *Endocrinology* 137(12), 5290-5296.
- Subbulakshmi, G., Naik, M., 2001. Indigenous foods in the treatment of diabetes mellitus. *Bombay Hospital Journal* 43(4), 548-561.
- Subramanian, S., Chait, A., 2012. Hypertriglyceridemia secondary to obesity and diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1821(5), 819-825.
- Sugumar, M., Doss, D.V.A., Maddisetty, P.N.P., 2016. Hepato-renal protective effects of hydroethanolic extract of *Senna alata* on enzymatic and nonenzymatic

- antioxidant systems in streptozotocin induced diabetic rats. *Integrative Medicine Research* 5(4), 276-283.
- Suhr, F., Brenig, J., Muller, R., Behrens, H., Bloch, W., Grau, M., 2012. Moderate exercise promotes human RBC-NOS activity, NO production and deformability through Akt kinase pathway. *PLoS One* 7(9), e45982.
- Sundaram, R.K., Bhaskar, A., Vijayalingam, S., Viswanathan, M., Mohan, R., Shanmugasundaram, K.R., 1996. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. *Clin Sci (Lond)* 90(4), 255-260.
- Sureka, C., Ramesh, T., Begum, V.H., 2015. Attenuation of erythrocyte membrane oxidative stress by *Sesbania grandiflora* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem Cell Biol* 93(4), 385-395.
- Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., Matsuoka, T., 2006. Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 52(2), 149-153.
- Takahashi, M.-A., Asada, K., 1983. Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 226(2), 558-566.
- Tamura, M., Oshino, N., Chance, B., 1982. Some characteristics of hydrogen- and alkylhydroperoxides metabolizing systems in cardiac tissue. *J Biochem* 92(4), 1019-1031.
- Tan, N.Y., Khachigian, L.M., 2009. Sp1 phosphorylation and its regulation of gene transcription. *Mol Cell Biol* 29(10), 2483-2488.
- Tanaka, Y., Gleason, C.E., Tran, P.O.T., Harmon, J.S., Robertson, R.P., 1999. Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(19), 10857.
- Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E.M., Garrido, J., Borges, F., 2013. Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. *Biomed Res Int* 2013, 251754.
- Telci, A., Cakatay, U., Kayali, R., Erdogan, C., Orhan, Y., Sivas, A., Akcay, T., 2000. Oxidative protein damage in plasma of type 2 diabetic patients. *Horm Metab Res* 32(1), 40-43.
- Thomas, H.E., Trapani, J.A., Kay, T.W., 2010. The role of perforin and granzymes in diabetes. *Cell Death Differ* 17(4), 577-585.
- Thornalley, P.J., 1990. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem J* 269(1), 1-11.
- Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J., Lenzen, S., 1997. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46(11), 1733-1742.
- Torregiani, F., Umansky-Zeverin, M., Riqueline, B., Rasia, R., 1995. Hemorheological alterations in diabetic patients. *Clin Hemorheol* 15, 678-690.

- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9), 4350-4354.
- Tsai, E.C., Hirsch, I.B., Brunzell, J.D., Chait, A., 1994. Reduced Plasma Peroxyl Radical Trapping Capacity and Increased Susceptibility of LDL to Oxidation In Poorly Controlled IDDM. *Diabetes* 43(8), 1010.
- Tsantes, A.E., Bonovas, S., Travlou, A., Sitaras, N.M., 2006. Redox imbalance, macrocytosis, and RBC homeostasis. *Antioxid Redox Signal* 8(7-8), 1205-1216.
- Tucakov, J., 2014. Lečenje biljem. Vulkan izdavaštvo, Beograd.
- Tuttle, R.L., Gill, N.S., Pugh, W., Lee, J.P., Koeberlein, B., Furth, E.E., Polonsky, K.S., Naji, A., Birnbaum, M.J., 2001. Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKBalpha. *Nat Med* 7(10), 1133-1137.
- Umbreit, J., 2007. Methemoglobin--it's not just blue: a concise review. *Am J Hematol* 82(2), 134-144.
- Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohe, R., Aumann, K.D., Roveri, A., Schomburg, D., Flohe, L., 1995. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 252, 38-53.
- Vaidya, H., Prajapati, A., Rajani, M., Sudarsanam, V., Padh, H., Goyal, R.K., 2012. Beneficial effects of swertiamarin on dyslipidaemia in streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Phytother Res* 26(8), 1259-1261.
- Valentao, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Bastos, M.L., 2001. Antioxidant activity of *Centaureum erythraea* infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity. *J Agric Food Chem* 49(7), 3476-3479.
- Valentao, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Bastos, M.L., 2003. Hydroxyl radical and hypochlorous acid scavenging activity of small centaury (*Centaureum erythraea*) infusion. A comparative study with green tea (*Camellia sinensis*). *Phytomedicine* 10(6-7), 517-522.
- Valentova, K., Vrba, J., Bancirova, M., Ulrichova, J., Kren, V., 2014. Isoquercitrin: pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food Chem Toxicol* 68, 267-282.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1), 44-84.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160(1), 1-40.
- van den Berg, R., Haenen, G.R.M.M., van den Berg, H., Bast, A., 2001. Transcription factor NF- $\kappa$ B as a potential biomarker for oxidative stress. *British Journal of Nutrition* 86(S1), S121-S127.

- van der Sluis, W.G., 1985. Chemotaxonomical investigations of the genera *Blackstonia* and *Centaureum* (Gentianaceae). *Plant Systematics and Evolution* 149(3), 253-286.
- Vennos, C., Schwabl, H., Bommeli, C., 2013. Phytotherapeutics in Treating Diabetes, u: Watson, R.R., Preedy, R.V. (Eds.), *Bioactive Food as Dietary Interventions*. Academic Press, Cambridge, MA, USA.
- Vennos, C., Uehlinger, S., 2010. Das Potenzial von Padma<sup>®</sup> 28 bei Folgeerkrankungen des Diabetes mellitus. *Schweizerische Zeitschrift für Ganzheitsmedizin / Swiss Journal of Integrative Medicine* 22(6), 344-348.
- Villeneuve, N.F., Lau, A., Zhang, D.D., 2010. Regulation of the Nrf2-Keap1 antioxidant response by the ubiquitin proteasome system: an insight into cullin-ring ubiquitin ligases. *Antioxid Redox Signal* 13(11), 1699-1712.
- Vincent, J.L., Zhang, H., Szabo, C., Preiser, J.C., 2000. Effects of nitric oxide in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 161(6), 1781-1785.
- Virag, L., Szabo, C., 2002. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 54(3), 375-429.
- Virtanen, J.K., Voutilainen, S., Nurmi, T., Tuomainen, T.-P., Mursu, J., 2013. Intake of fruit, berries, and vegetables and risk of type 2 diabetes in Finnish men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *The American Journal of Clinical Nutrition* 99(2), 328-333.
- Waeber, G., Thompson, N., Nicod, P., Bonny, C., 1996. Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor. *Mol Endocrinol* 10(11), 1327-1334.
- Wajchenberg, B.L., 2007. beta-cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment. *Endocr Rev* 28(2), 187-218.
- Wang, H., Brun, T., Kataoka, K., Sharma, A.J., Wollheim, C.B., 2007. MAFA controls genes implicated in insulin biosynthesis and secretion. *Diabetologia* 50(2), 348-358.
- Wang, Y.B., Ge, Z.M., Kang, W.Q., Lian, Z.X., Yao, J., Zhou, C.Y., 2015. Rutin alleviates diabetic cardiomyopathy in a rat model of type 2 diabetes. *Exp Ther Med* 9(2), 451-455.
- Wang, Z., Gucek, M., Hart, G.W., 2008. Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: site-specific phosphorylation dynamics in response to globally elevated O-GlcNAc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(37), 13793-13798.
- Watada, H., Kajimoto, Y., Umayahara, Y., Matsuoka, T., Kaneto, H., Fujitani, Y., Kamada, T., Kawamori, R., Yamasaki, Y., 1996. The human glucokinase gene beta-cell-type promoter: an essential role of insulin promoter factor 1/PDX-1 in its activation in HIT-T15 cells. *Diabetes* 45(11), 1478-1488.
- Wei, Y., Chen, P., de Bruyn, M., Zhang, W., Bremer, E., Helfrich, W., 2010. Carbon monoxide-releasing molecule-2 (CORM-2) attenuates acute hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *BMC Gastroenterol* 10, 42.

- Wells-Knecht, K.J., Zyzak, D.V., Litchfield, J.E., Thorpe, S.R., Baynes, J.W., 1995. Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry* 34(11), 3702-3709.
- Wells, L., Vosseller, K., Hart, G.W., 2001. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. *Science* 291(5512), 2376-2378.
- Welsch, C.A., Lachance, P.A., Wasserman, B.P., 1989. Dietary phenolic compounds: inhibition of Na<sup>+</sup>-dependent D-glucose uptake in rat intestinal brush border membrane vesicles. *J Nutr* 119(11), 1698-1704.
- Werstuck, G.H., Khan, M.I., Femia, G., Kim, A.J., Tedesco, V., Trigatti, B., Shi, Y., 2006. Glucosamine-Induced Endoplasmic Reticulum Dysfunction Is Associated With Accelerated Atherosclerosis in a Hyperglycemic Mouse Model. *Diabetes* 55(1), 93-101.
- White, M.F., 2003. Insulin signaling in health and disease. *Science* 302(5651), 1710-1711.
- White, M.F., Copps, K.D., 2016. Chapter 33 - The Mechanisms of Insulin Action, u: Jameson, J.L., De Groot, L.J., de Kretser, D.M., Giudice, L.C., Grossman, A.B., Melmed, S., Potts, J.T., Weir, G.C. (Eds.), *Endocrinology: Adult and Pediatric (Seventh Edition)*. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 556-585.e513.
- Wijesekara, N., Krishnamurthy, M., Bhattacharjee, A., Suhail, A., Sweeney, G., Wheeler, M.B., 2010. Adiponectin-induced ERK and Akt phosphorylation protects against pancreatic beta cell apoptosis and increases insulin gene expression and secretion. *The Journal of biological chemistry* 285(44), 33623-33631.
- Wolff, S.P., Dean, R.T., 1987. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochemical Journal* 245(1), 243-250.
- Wolffenbittel, B.H., Giordano, D., Founds, H.W., Bucala, R., 1996. Long-term assessment of glucose control by haemoglobin-AGE measurement. *Lancet* 347(9000), 513-515.
- Xia, P., Inoguchi, T., Kern, T.S., Engerman, R.L., Oates, P.J., King, G.L., 1994. Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes* 43(9), 1122-1129.
- Xu, G.G., Rothenberg, P.L., 1998. Insulin receptor signaling in the beta-cell influences insulin gene expression and insulin content: evidence for autocrine beta-cell regulation. *Diabetes* 47(8), 1243-1252.
- Xu, X., D'Hoker, J., Stange, G., Bonne, S., De Leu, N., Xiao, X., Van de Casteele, M., Mellitzer, G., Ling, Z., Pipeleers, D., Bouwens, L., Scharfmann, R., Gradwohl, G., Heimberg, H., 2008. Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell* 132(2), 197-207.

- Xu, Y., Kiningham, K.K., Devalaraja, M.N., Yeh, C.-C., Majima, H., Kasarskis, E.J., Clair, D.K.S., 1999. An Intronic NF-kappaB Element Is Essential for Induction of the Human Manganese Superoxide Dismutase Gene by Tumor Necrosis Factor-alpha and Interleukin-1beta. *DNA and Cell Biology* 18(9), 709-722.
- Xu, Y., Porntadavity, S., St Clair, D.K., 2002. Transcriptional regulation of the human manganese superoxide dismutase gene: the role of specificity protein 1 (Sp1) and activating protein-2 (AP-2). *Biochem J* 362(Pt 2), 401-412.
- Yamada, T., Hayasaka, S., Shibata, Y., Ojima, T., Saegusa, T., Gotoh, T., Ishikawa, S., Nakamura, Y., Kayaba, K., 2011. Frequency of Citrus Fruit Intake Is Associated With the Incidence of Cardiovascular Disease: The Jichi Medical School Cohort Study. *Journal of Epidemiology* 21(3), 169-175.
- Yan, H., Harding, J.J., 1997. Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochem J* 328 ( Pt 2), 599-605.
- Yang, H., Mohamed, A.S., Zhou, S.H., 2012. Oxidized low density lipoprotein, stem cells, and atherosclerosis. *Lipids Health Dis* 11, 85.
- Yusuf, S., Dagenais, G., Pogue, J., Bosch, J., Sleight, P., 2000. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med* 342(3), 154-160.
- Zachara, N.E., Hart, G.W., 2004. O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. *Biochim Biophys Acta* 1673(1-2), 13-28.
- Zern, T.L., Fernandez, M.L., 2005. Cardioprotective Effects of Dietary Polyphenols. *The Journal of Nutrition* 135(10), 2291-2294.
- Zhang, C., Moriguchi, T., Kajihara, M., Esaki, R., Harada, A., Shimohata, H., Oishi, H., Hamada, M., Morito, N., Hasegawa, K., Kudo, T., Engel, J.D., Yamamoto, M., Takahashi, S., 2005. MafA Is a Key Regulator of Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Molecular and Cellular Biology* 25(12), 4969-4976.
- Zhao, L., Guo, M., Matsuoka, T.-a., Hagman, D.K., Parazzoli, S.D., Poitout, V., Stein, R., 2005. The Islet  $\beta$  Cell-enriched MafA Activator Is a Key Regulator of Insulin Gene Transcription. *Journal of Biological Chemistry* 280(12), 11887-11894.
- Zhu, H., Itoh, K., Yamamoto, M., Zweier, J.L., Li, Y., 2005. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. *FEBS Lett* 579(14), 3029-3036.
- Ziegler, D., Ametov, A., Barinov, A., Dyck, P.J., Gurieva, I., Low, P.A., Munzel, U., Yakhno, N., Raz, I., Novosadova, M., Maus, J., Samigullin, R., 2006. Oral Treatment With  $\alpha$ -Lipoic Acid Improves Symptomatic Diabetic Polyneuropathy. *Diabetes Care* 29(11), 2365.
- Ziegler, D., Hanefeld, M., Ruhnau, K.J., Meissner, H.P., Lobisch, M., Schutte, K., Gries, F.A., 1995. Treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy with the anti-oxidant alpha-lipoic acid. A 3-week multicentre randomized controlled trial (ALADIN Study). *Diabetologia* 38(12), 1425-1433.



- Ziegler, D., Low, P.A., Litchy, W.J., Boulton, A.J.M., Vinik, A.I., Freeman, R., Samigullin, R., Tritschler, H., Munzel, U., Maus, J., Schütte, K., Dyck, P.J., 2011. Efficacy and Safety of Antioxidant Treatment With  $\alpha$ -Lipoic Acid Over 4 Years in Diabetic Polyneuropathy. *Diabetes Care* 34(9), 2054.
- Ziegler, D., Nowak, H., Kempler, P., Vargha, P., Low, P.A., 2004. Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: a meta-analysis. *Diabet Med* 21(2), 114-121.
- Zimmet, P., Alberti, K.G., Shaw, J., 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414(6865), 782-787.
- Zlatkis, A., Zak, B., Boyle, A.J., 1953. A new method for the direct determination of serum cholesterol. *J Lab Clin Med* 41(3), 486-492.
- Zlatković, B.K., Bogosavljević, S.S., Radivojević, A.R., Pavlović, M.A., 2014. Traditional use of the native medicinal plant resource of Mt. Rtanj (Eastern Serbia): ethnobotanical evaluation and comparison. *J Ethnopharmacol* 151(1), 704-713.
- Zygmunt, K., Faubert, B., MacNeil, J., Tsiani, E., 2010. Naringenin, a citrus flavonoid, increases muscle cell glucose uptake via AMPK. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 398(2), 178-183.

## Biografija

Miloš M. Đorđević je rođen 11.08.1988. godine u Pirotu gde je završio Osnovnu školu i Gimnaziju kao nosilac Vukove diplome. Osnovne studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija upisao je školske 2007/08. godine. Studije je završio 2010. god. sa prosečnom ocenom 8,98 i iste godine upisao master studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija, modul Eksperimentalna biomedicina. Master rad, urađen na Katedri za uporednu fiziologiju i ekofiziologiju pod rukovodstvom dr Predraga Vujovića, pod naslovom "Uticaj ishrane obogaćene mastima na koncentraciju neuroendokrinih regulatora energetske homeostaze u hipotalamusu pacova" odbranio je 2012. god sa ocenom 10, čime je završio master studije sa prosečnom ocenom 9,41. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota, upisao je školske 2013/14. Od 2013. god. zaposlen je kao istraživač pripravnik a od 2016. god kao istraživač saradnik u Odeljenju za molekularnu biologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u okviru projekta „Signalni molekuli u dijabetesu: identifikacija potencijalnih bioloških markera uključenih u modifikaciju i integraciju signalnih puteva u cilju predikcije i intervencije u dijabetesu“ (#173020), potprojekat „Genetska predispozicija za razvoj dijabetesa tip 1 i novi pristupi u prevenciji disfunkcije beta ćelija u dijabetesu: izučavanje puteva prenosa signala posredovanih CXCL12“, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Do danas je objavio 7 radova u časopisima međunarodnog značaja i ima 10 saopštenja na međunarodnim i 5 saopštenja na domaćim skupovima.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани **Милош М. Ђорђевић**

број индекса **M3001/2013**

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Молекуларни механизми антиоксидативног дејства екстракта  
кичице (*Centaureum erythraea Rafn*) у експерименталном моделу  
дијабетеса пацова**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора **Милош М. Ђорђевић**

Број индекса **M3001/2013**

Студијски програм **Молекуларна биологија**

Наслов рада **Молекуларни механизми антиоксидативног дејства  
екстракта кичице (*Centaureum erythraea* Rafn) у експерименталном  
моделу дијабетеса пацова**

Ментори др **Мелита Видаковић** и др **Светлана Динић**

Потписани **Милош М. Ђорђевић**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Молекуларни механизми антиоксидативног дејства екстракта кичице (*Centaureum erythraea* Rafn) у експерименталном моделу дијабетеса пацова**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.