

Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski studij biologije

Julijana Kljajić

Oksidativni-antioksidativni status seruma štakora
oboljelih od dijabetesa

Završni rad

Mentorica: Prof.dr.sc.Elizabeta Has-Schön

Neposredna voditeljica: dr.sc.Rosemary Vuković

Osijek, 2016. godina

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Završni rad

Odjel za biologiju

Preddiplomski studij biologije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

OKSIDATIVNI-ANTIOKSIDATIVNI STATUS SERUMA ŠTAKORA OBOLJELIH OD DIJABETESA

Julijana Kljajić

Rad je izrađen: Laboratorij za biokemiju, Odjel za biologiju, Osijek

Mentorica: Prof.dr.sc.Elizabeta Has-Schön

Neposredna voditeljica: dr.sc.Rosemary Vuković

Dijabetes tipa 2 je metabolički poremećaj kojeg karakterizira kronična hiperglikemija zbog poremećaja sekrecije inzulina. Hiperglikemija potiče povećani rad mitohondrija te dolazi do povećanog nakupljanja reaktivnih kisikovih tvari koji uzrokuju oksidativni stres. S ciljem određivanja markera oksidativnog stresa i utjecaja lijekova liraglutida i metformina na aktivnost antioksidativnih enzima, kod dijabetičnih i pretilih štakora soja Sprague-Dawley, mjerena je aktivnost katalaze (CAT), glutation-peroksidaze (GPX) i superoksid-dismutaze (SOD) u krvnom serumu. Rezultati su pokazali sniženu aktivnost CAT u serumu dijabetičnih mužjaka i ženki (HSHFD), dok se aktivnosti GPX i SOD nisu statistički značajno promijenile u odnosu na kontrolnu skupinu. Lijekovi liraglutid i metformin nisu pokazali značajan utjecaj na aktivnosti CAT, GPX i SOD u serumu dijabetičnih mužjaka i ženki tretiranih metforminom ili liraglutidom (HSHFD-Met, HSHFD-Lir) u odnosu na odgovarajuće skupine HSHFD. Postoje spolne razlike u razini oksidativnog stresa i aktivnosti antioksidativnih enzima. Lijekovi mogu promijeniti antioksidativni kapacitet više kod ženki nego kod mužjaka. Metformin i liraglutid smanjuju aktivnost antioksidativnih enzima kod mužjaka.

Broj stranica: 28

Broj slika: 12

Broj literaturnih navoda: 38

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: Antioksidativni enzimi, dijabetes tipa 2, liraglutid, metformin, oksidativni stres, serum štakora

DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

BSc thesis

Undergraduate Study of Biology

Department of Biology

Scientific area: Natural science

Scientific field: Biology

SERUM OXIDATIVE-ANTIOXIDATIVE STATUS OF DIABETIC RATS

Julijana Kljajić

Thesis performed at: Laboratory of Biochemistry, Department of Biology, Osijek

Supervisor: Ph.D. Elizabeta Has-Schön, Professor

Assistant in charge: Ph.D. Rosemary Vuković

Type 2 diabetes is a metabolic disorder characterized by chronic hyperglycemia due to insulin secretion disorder. Hyperglycemia promotes increased work of mitochondria and leads to increased accumulation of ROS that cause oxidative stress. In order to determine markers of oxidative stress and the influence of drug liraglutide and metformin on antioxidant enzymes in diabetic and obese rats Sprague-Dawley (SD), activity of catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) and superoxide dismutase (SOD) was measured in blood serum. The results showed reduced CAT activity in serum of diabetic males and females (HSHFD), while the SOD and GPX activities were not significantly changed compared to the control group. Drugs liraglutide and metformin did not show significant effect on CAT, GPX and SOD activity in diabetic males and females treated with metformin or liraglutide (HSHFD-Met, HSHFD-Lir) in relation to the relevant HSHFD groups. There are sex-related differences in the level of oxidative stress and antioxidative enzymes activity. Drugs may modify antioxidative capacity more in females than males. Metformin and liraglutide decrease activity of antioxidative enzymes in males.

Number of pages: 28

Number of figures: 12

Number of references: 38

Original in: Croatian

Key words: Antioxidative enzymes, diabetes type 2, liraglutide, metformin, oxidative stress, rat serum

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Dijabetes tipa 2	1
1.2 Lijekovi liraglutid i metformin	1
1.3. Oksidativni stres i antioksidativni enzimi	3
2. MATERIJALI I METODE	5
2.1. Pokusne životinje	5
2.2 Određivanje aktivnosti katalaze u krvnom serumu štakora	6
2.3. Određivanje aktivnosti glutacion-peroksidaze u krvnom serumu štakora	6
2.4. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze u krvnom serumu štakora	6
2.5 Određivanje koncentracije ukupnih topljivih proteina	7
2.6. Statistička obrada podataka	7
3. REZULTATI	8
3.1. Aktivnost katalaze	8
3.2. Aktivnost glutacion-peroksidaze	10
3.3. Aktivnost superoksid-dismutaze	14
4. RASPRAVA	17
5. ZAKLJUČAK	20
6. LITERATURA	21

1. UVOD

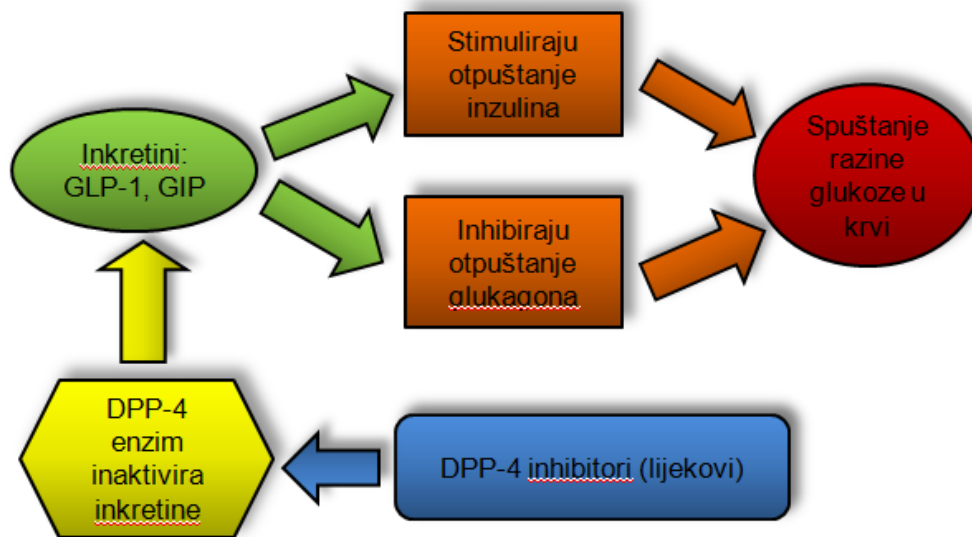
1.1. Dijabetes tipa 2

Dijabetes je metabolički poremećaj kojeg karakterizira kronična hiperglikemija tj. visoka koncentracija glukoze u krvi zbog poremećaja sekrecije inzulina, što u konačnici rezultira poremećajima u metabolizmu ugljikohidrata, masti i proteina. Za razliku od dijabetesa tipa 1, kod kojeg postoji apsolutno pomanjkanje inzulina zbog uništenja Langerhansovih otočića u gušterači, za dijabetes tipa 2 je karakteristična inzulinska rezistencija te disfunkcija beta stanica (Erejuwa, 2012). Simptomi dijabetesa su povećana glad, žeđ, učestalo uriniranje, nagli gubitak težine te konstantan osjećaj umora. Glavni uzrok nastanka bolesti je pretilost, ali uz to postoje i genetičke predispozicije. Čak je 80-90% oboljelih od dijabetesa tipa 2 pretilo pa je i jedan od glavnih ciljeva intenzivno sniženje tjelesne težine niskokaloričnom prehranom i fizičkom aktivnošću (Kokić, 2009). Povećane adipozne stanice kod oboljelih od dijabetesa, nekontrolirane inhibicijskim učinkom inzulina, otpuštaju slobodne masne kiseline i druge medijatore kao što su leptin i resistin. Oni mogu utjecati na aktivnost inzulina i funkciju beta stanica gušterače te dovesti do povećane glukoneogeneze u jetri i smanjenog unosa glukoze u periferna tkiva (Winer i Sowers, 2004). Uz dijabetes vežu se i razne druge komplikacije kao što su retinopatija, nefropatija, vaskularna oboljenja poput ateroskleroze te povećan rizik od srčanog udara (Oberley, 1998).

1.2 Lijekovi liraglutid i metformin

Lijekovi koji se danas koriste u liječenju dijabetesa tipa 2 dijele se na tri osnovne skupine: betacitotropni lijekovi, nebetacitotropni lijekovi i inzulinski pripravci. Liraglutid pripada betacitotropnoj skupini tj. on je inkretin. Inkretinski učinak se očituje u boljoj sekreciji inzulina nakon oralne stimulacije glukozom u odnosu na intravensku stimulaciju. Pojačan je dvama crijevnim hormonima, želučanim inhibicijskim peptidom (GIP, engl. *gastric inhibitori peptide*) i glukagonu sličnim peptidom 1 (GLP-1, engl. *glukagon-like peptide 1*). Liraglutid je analog GLP-1 s 95% analogije te djeluje na način da inhibira enzim dipeptidil-peptidazu-4 (DPP-4, engl. *dipeptidyl peptidase 4*). Inaktivacijom tog enzima smanjuje se razgradnja inkretina koji djeluju tako da povećavaju otpuštanje inzulina, smanjuju otpuštanje glukagona, te smanjuju pražnjenje želuca, što u konačnici dovodi do smanjenja koncentracije šećera u krvi (Novak i Metelko, 2011) (Slika 1). Također, liraglutid poboljšava funkcije beta stanica, povećava njihovu masu, smanjuje apetit te tjelesnu masu (Montanya i Sesti 2009).

Prirodni GLP-1 se razgradi u roku od 2-3 minute, što predstavlja veliki izazov u razvoju lijekova, tj njegovih analoga otpornih na tako brzu razgradnju (Quan i sur., 2016). Kod liraglutida je dodana masna kiselina na poziciju 26 koja veže albumin i tako osigurava cirkulaciju molekule i njezinu dužu aktivnost te ju također okreće na način koji ju štiti od razgradnje DPP-4-om (Dalle i sur., 2013).



Slika 1. Prikaz djelovanja lijekova (DPP-4 inhibitora) (preuzeto s web 1).

Još jedan značajan lijek je i metformin koji spada u skupinu nebetacitotropnih lijekova. Temeljni princip djelovanja mu je smanjivanje otpornosti na inzulin u jetri kao i u perifernim tkivima te smanjenje resorpcije glukoze u crijevima. Metformin ne utječe na lučenje inzulina, već smanjuje prekomjernu produkciju glukoze u jetri potencirajući učinke inzulina (Zjačić-Rotković, 2009). Učinci metformina na glukoneogenezu jetre počivaju na aktivaciji AMP-aktiviranoj protein kinazi (AMPK). Aktivacijom AMPK snižava se aktivnost enzima acetyl-CoA-karboksilaze što rezultira smanjenjem akumulacije lipida u jetri i povećanjem osjetljivosti na inzulin (Chieh-Hua-Lu i sur. 2016). Jedno od istraživanja je pokazalo kako je kod štakora liječenih metforminom došlo do sniženja količine oksidiranih enzima seruma i lipidnih peroksida tkiva te povećanja ukupne antioksidativne aktivnosti iz čega se moglo zaključiti da metformin reducira oksidativni stres (Rosen i Wiernsperger, 2006). Također mnoga istraživanja su pokazala kako metformin smanjuje rizik od nastanka komplikacija povezanih s dijabetesom, kao što su kardiovaskularna oboljenja i srčani udar te dijabetična retinopatija, nefropatija pa čak i neuropatija (Esteghamati i sur., 2013).

1.3. Oksidativni stres i antioksidativni enzimi

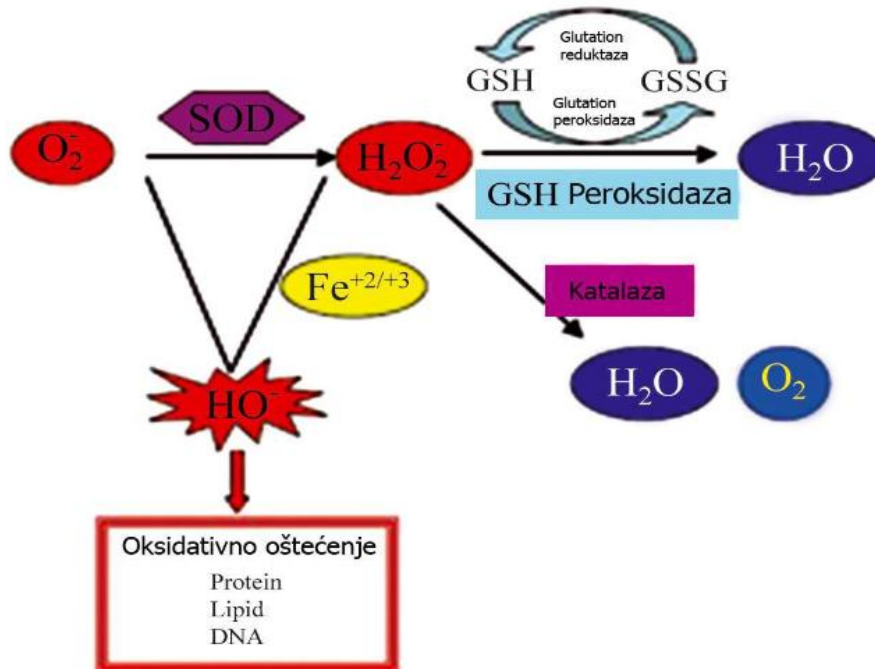
Oksidativni stres se definira kao neravnoteža između stvaranja reaktivnih kisikovih tvari (ROS) i antioksidativne obrane. ROS su bilo koje kemijske molekule koje imaju nespareni elektron koji povećava reaktivnost te molekule, kao što su primjerice hidroskidni radikal (HO^{\bullet}) ili superoksidni anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (Betteridge, 2000). One nastaju pri normalnim uvjetima aerobnog metabolizma svih naših stanica, a glavni izvor su mitohondriji. Zbog sve većeg nakupljanja šećera, kod osoba oboljelih od dijabetesa dolazi do povećanog rada mitohondrija odnosno elektronskim transportnim lancem nakupljaju se sve veće količine $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Erejuwa, 2012). Hiperglikemija potiče nakupljanje ROS-a i tako pogoduje stvaranju oksidativnog stresa što uzrokuje razna oštećenja stanice, inaktivaciju enzima, apoptozu te promjenu ekspresije gena (Alhaider i sur. 2011).

Antioksidativni enzimi kao što su katalaza (CAT), superoksid-dismutaza (SOD) i glutation-peroksidaza (GPX) djeluju kao hvatači slobodnih radikala tj. kao elektron donori koji reagiraju s ROS-om. Dajući im elektron, ovi enzimi inaktiviraju ROS i na taj način štite stanicu od oksidativnog oštećenja. Aktivnost tih enzima smanjena je kod dijabetesa (Ghanbari i sur., 2016.).

CAT je antioksidativni enzim prisutan u gotovo svim živućim organizmima. Igra važnu ulogu kao regulator metabolizma vodikovog peroksida (H_2O_2), koji u organizmu prirodno nastaje u energetsom metabolizmu, ali je izuzetno reaktivan. Nakupljanje i povišene koncentracije H_2O_2 mogu uzrokovati značajna oštećenja proteina, DNA, RNA te lipida. Kako se to ne bi dogodilo, CAT prevodi H_2O_2 u vodu i kisik (Takemoto i sur., 2009) (Slika 2).

GPX štiti od oksidativnog stresa tako što reducira lipidne hidroperokside u odgovarajuće alkohole te vrši detoksikaciju H_2O_2 pri čemu se reducirani glutation (GSH) oksidira u GSSG (Jurković i sur., 2008)(Slika 2). GSH je tripeptid prisutan u svim tkivima sisavaca u koncentraciji od 1-10 mM i iznimno je važan u obrani organizma od štete uzrokovane ROS-om. Nakon što je oksidiran potrebno ga je vratiti ponovno u reducirani oblik što se odvija uz pomoć glutation-reduktaze (GR) i NADPH kao elektron-donora (Lu, 2013). Određeno je 7 vrsta GPX-a koje se dijele na citosolne GPX1, gastrointestinalne GPX2, plazmatske GPX3, fosfolipid-hidroperoksidne GPX4, te glutation-peroksidaze GPX5, GPX6 i GPX7. Biosinteza GPX-a ovisi o dostupnosti selena (Se) jer se on nalazi u aktivnom središtu kao selenocistein (Sec).

SOD katalizira dismutaciju $O_2^{\cdot-}$ na molekulu kisika (oksidacija) i H_2O_2 (redukcija) (Slika 2). SOD je prisutna u tri izoforme koje se međusobno razlikuju prema smještaju u stanici i vrsti metalnog iona koji sadrže u svom aktivnom centru. Izoenzim Cu, Zn-SOD se nalazi u citosolu (peroksisomi), a Mn-SOD se nalazi u matriksu mitohondrija. EC-SOD (ekstracelularna-SOD), izoenzim koji štiti izvanstanični prostor od štetnog učinka superoksidnog radikala, sadrži ione Cu i Zn (Tiwari i sur., 2013).



Slika 2. Djelovanje antioksidativnih enzima katalaze, superoksid-dismutaze i glutation-peroksidaze (preuzeto i modificirano prema Wakamatsu i sur., 2008)

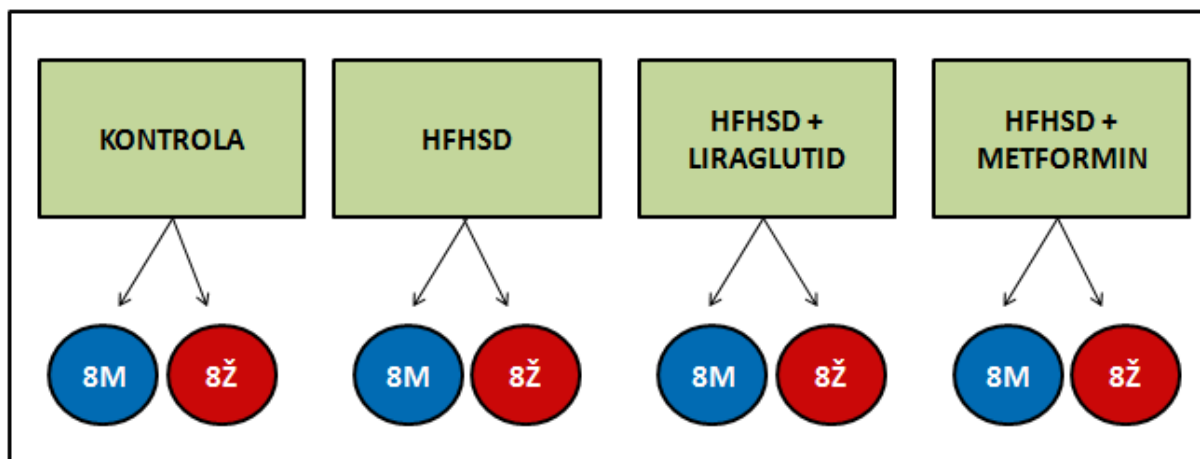
1.4. Cilj

Cilj ovog rada bio je odrediti markere oksidativnog stresa kod dijabetičnih i pretilih odraslih štakora soja Sprague-Dawley, liječenih metforminom i liraglutidom te utjecaj tih lijekova na aktivnost antioksidativnih enzima: CAT, SOD i GPX.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Pokusne životinje

Životinje su uzgajane u vivariju Medicinskog fakulteta u Osijeku u sklopu istraživanja, koje je odobreno od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Osijeku. Tijekom eksperimenta životinjama je rukovano prema Hrvatskom zakonu za zaštitu životinja. Istraživanje je uključivalo 64 štakora Sprague-Dawley soja. Životinje su bile podijeljene u 4 skupine, kontrolna skupina životinja hranjena standardnom hranom, skupina životinja hranjena prehranom s visokim udjelom masti i soli (dijabetični štakori, HFHSD) u razdoblju od 20. do 65. tjedna starosti, te dvije skupine životinja hranjene prehranom s visokim udjelom masti i soli koji su primali terapiju, jedna skupina liraglutid ($0.3 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ po danu; HFHSD+Lir), a druga skupina metformin ($50 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ po danu; HFHSD+Met). Lijekovi su davani zajedno s prehranom s visokim udjelom masti i soli, u razdoblju od 50. do 65. tjedna starosti, kada su životinje žrtvovane. Svaka skupina životinja sadržavala je 8 mužjaka i 8 ženki (Slika 3). Životinje su bile smještene u standardne kaveze pri sobnoj temperaturi. Standardna laboratorijska hrana i voda bili su dostupni *ad libitum* (neograničeno).



Slika 3. Eksperimentalne skupine životinja. Pokus se sastojao od četiri skupine životinja: kontrolna skupina životinja hranjena standardnom hranom, skupina životinja hranjena prehranom s visokim udjelom masti i soli (dijabetični štakori, HFHSD), te dvije skupine životinja hranjene prehranom s visokim udjelom masti i soli koji su primali terapiju, jedna skupina liraglutid (HSHFD-Lir), a druga skupina metformin (HSHFD-Met) te je svaka skupina životinja sadržavala 8 mužjaka (M) i 8 ženki (Ž).

2.2 Određivanje aktivnosti katalaze u krvnom serumu štakora

Aktivnost CAT određena je spektrofotometrijski koristeći H_2O_2 kao supstrat, metodom po Aebiju (1984.). Reakcijska smjesa za mjerenje aktivnosti CAT sastojala se od 50 mM natrij-fosfatnog pufera (pH=7.0) i 0.036% otopine H_2O_2 . Reakcija započinje dodavanjem 50 μl razrijeđenog seruma u 1450 μl reakcijske smjese. Pad apsorbancije uslijed razgradnje H_2O_2 praćen je svakih 10 sekundi tijekom 2 minute pri valnoj duljini od 240 nm u UV-kiveti. Jedna jedinica aktivnosti definirana je kao količina razgrađenog H_2O_2 (μmol) po minuti po miligramu proteina. Aktivnost CAT izražena je u enzimskim jedinicama (U) po miligramu proteina ($\text{U} \times \text{g}^{-1}$ proteina).

2.3. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze u krvnom serumu štakora

Aktivnosti GPX mjerena je prema modificiranoj metodi koju je opisao Wendel (1980) koristeći H_2O_2 kao supstrat. Prema ovoj metodi aktivnost GPX određuje se indirektno mjereći stopu oksidacije NADPH u NADP^+ koja je praćena smanjenjem apsorbancije pri 340 nm. Reakcijska smjesa se sastojala od pufera (50 mM natrij-fosfatni pufer (pH=7), 0.4 mM EDTA, 1 Mm NaN), 0.12 mM NADPH, 3.2 jedinice GR-a, 1 mM GSH i 0.0007% (w/w) H_2O_2 u konačnom volumenu od 1.55 ml. Enzimska aktivnost mjerena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 340 nm, tijekom 5 minuta svakih 30 sekundi. Jedna jedinica GPX-a katalizira oksidaciju 1 μmol -a GSH u GSSG pomoću H_2O_2 u jednoj minuti pri pH 7.0 i 25 °C. Aktivnost GPX izražena je u enzimskim jedinicama (U) po miligramu proteina ($\text{U} \times \text{mg}^{-1}$ proteina).

2.4. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze u krvnom serumu štakora

Aktivnost SOD u proteinskim ekstraktima određena je prema metodi koju su opisali Flohe i Otiing (1971). Aktivnost je mjerena kao stupanj inhibicije redukcije citokroma C superoksidnim radikalom, a stopa redukcije praćena je na 550 nm. Jedna jedinica SOD-a inhibira stopu redukcije citokroma C za 50% u povezanom sustavu pomoću ksantin-oksidge (XOD) i ksantina. Reakcijska smjesa pripremana je u kiveti a sastojala se od 1450 μL reakcijskog koktela (0.05 mM otopina citokroma C, 1 mM otopinom ksantina), 25 μL razrijeđenog seruma, a 25 μL XOD koncentracije $0.1 \text{ U} \times \text{mL}^{-1}$ dodano je neposredno prije mjerenja. Porast apsorbancije praćen je na 550 nm tijekom 3 minute, svakih 30 sekundi. Jedinica SOD-a definirana je kao količina enzima potrebnog za 50-postotnu inhibiciju redukcije citokroma C. Aktivnost SOD-a izražena je kao $\text{U} \times \text{mg}^{-1}$ proteina.

2.5 Određivanje koncentracije ukupnih topljivih proteina

Koncentracija ukupnih topljivih proteina određena je metodom po Bradford-u (1976) koja se temelji na brzom pomaku maksimuma apsorbancije od 465 nm na 595 nm, kada se boja Coomassie briljant plavo veže na proteine u kiseloj otopini. Uvijek je potrebno napraviti standardnu krivulju s poznatim koncentracijama proteina zbog variranja koncentracija proteina koje se mjere u uzorcima. U ovom eksperimentu kao proteinski standard korišten je albumin goveđeg seruma.

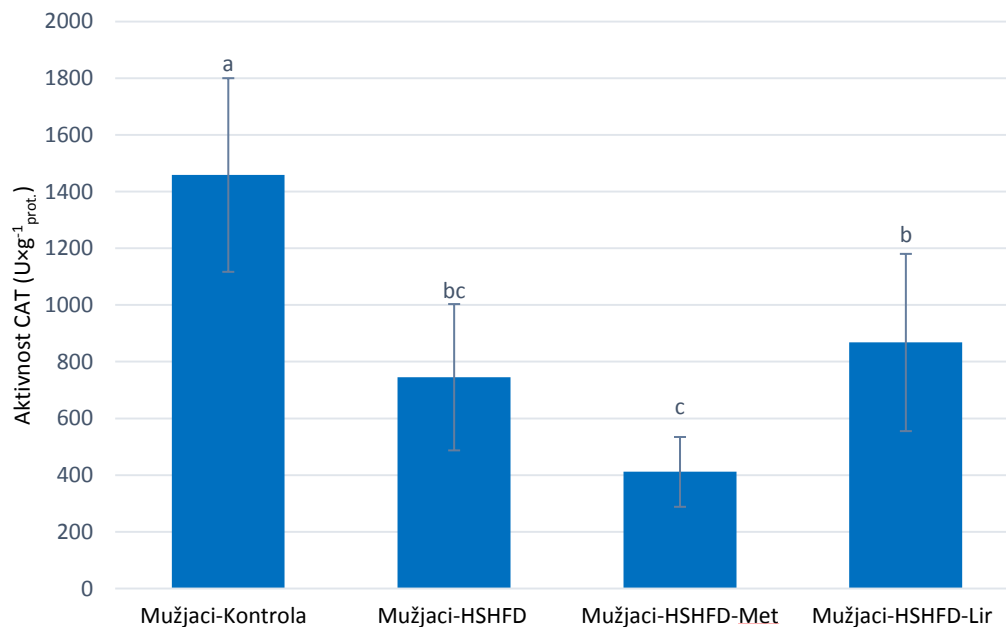
2.6. Statistička obrada podataka

Unutar svake skupine nalazilo se 8 životinja (N=8). Podaci dobiveni u ovom radu obrađeni su u statističkom programu STATISTICA 12.0 (Statsoft, Inc, Tulsa, SAD). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (SD). Razlike između srednjih vrijednosti skupina (kontrola i različiti tretmani) utvrđene su pomoću analize varijance s jednim promjenjivim faktorom (one-way ANOVA). Nakon što je utvrđeno postojanje razlika, provedeno je *post hoc* testiranje pomoću Duncan testa. Razlike između pojedinih skupina mužjaka i ženki testirane su t-testom. Svi testovi provedeni su uz razinu značajnosti od 5%.

3. REZULTATI

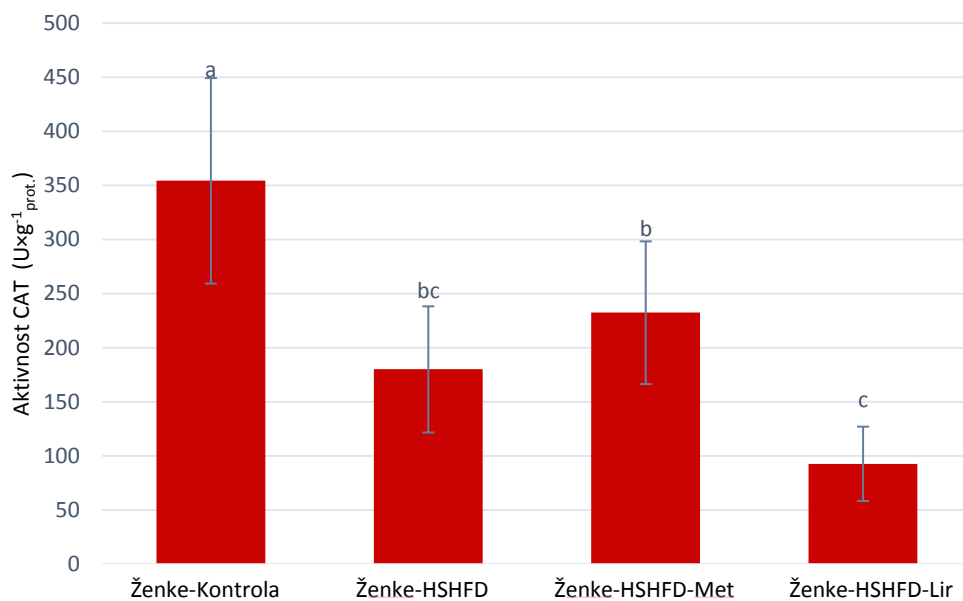
3.1. Aktivnost katalaze

U skupini mužjaka HSHFD, te u skupinama mužjaka HSHFD tretiranih metforminom i liraglutidom uočena je značajno snižena aktivnost CAT u odnosu na kontrolnu skupinu. Najveće sniženje aktivnosti zabilježeno je kod mužjaka tretiranih metforminom, aktivnost CAT je snižena za 71.78% u odnosu na kontrolnu skupnu. Skupina tretirana metforminom ima također značajno nižu aktivnost CAT u odnosu na skupinu tretiranu liraglutidom. Statistički značajne razlike nema između skupine HSHFD i skupine HSHFD-Met te između skupine HSHFD i HSHFD-Lir (Slika 4).



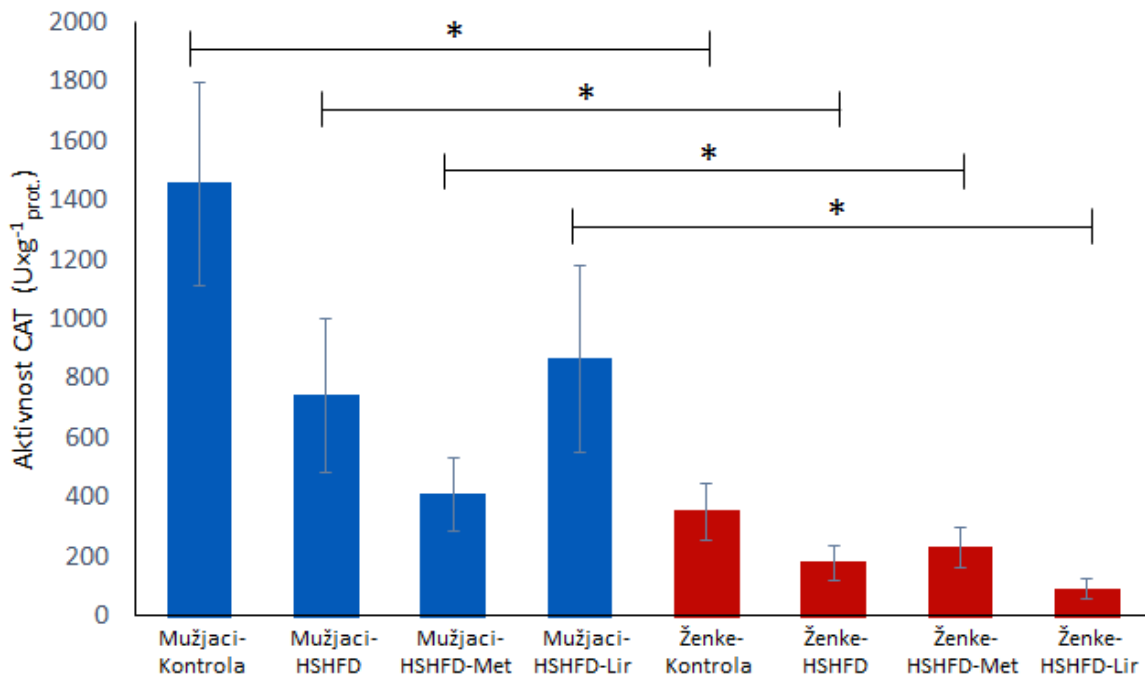
Slika 4. Aktivnost katalaze (CAT) u krvnom serumu mužjaka štakora. Kontrolna skupina životinja hranjena je standardnom hranom, skupina HFHSD hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli (dijabetični štakori), skupina HFHSD-Met hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli te je tretirana metforminom, i skupina HFHSD-Lir hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli te je tretirana liraglutidom. Rezultati (N=8) su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD. Razlike između skupina testirane su Duncan *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

Aktivnost CAT značajno je snižena kod skupina ženki HSHFD, te skupina ženki HSHFD tretiranih metforminom i liraglutidom, u odnosu na kontrolnu skupinu ženki. Kod ženki tretiranih liraglutidom zabilježeno je najveće sniženje aktivnosti od 73.85% u odnosu na kontrolnu skupinu. Aktivnost CAT kod te skupine također je značajno niža i u odnosu na ženke tretirane metforminom. Statistički značajne razlike nema između skupine ženki HSHFD i skupine ženki HSHFD tretiranih metforminom (HSHFD-Met) te između skupine ženki HSHFD i skupine HSHFD tretirane liraglutidom (HSHFD-Lir) (Slika 5).



Slika 5. Aktivnost katalaze (CAT) u krvnom serumu ženki štakora. Kontrolna skupina životinja hranjena je standardnom hranom, skupina HFHSD hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli (dijabetični štakori), skupina HFHSD-Met hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli te je tretirana metforminom i skupina HFHSD-Lir hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli te je tretirana liraglutidom. Rezultati (N=8) su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD. Razlike između skupina testirane su Duncan *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

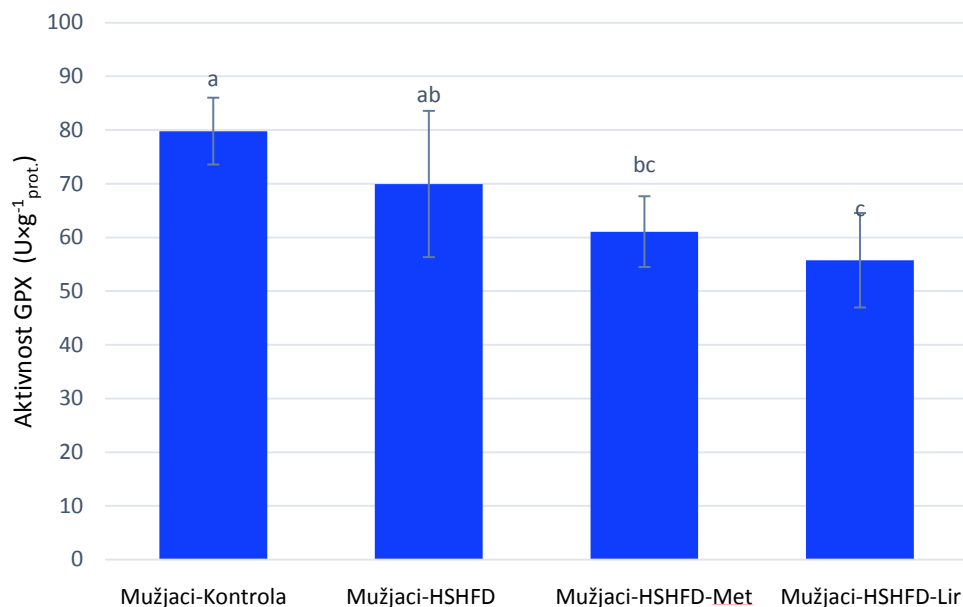
Uspoređujući aktivnosti CAT u pojedinim skupinama mužjaka i odgovarajućim skupinama ženki uočena je statistički značajna razlika u aktivnostima CAT. Aktivnost CAT je kod svih skupina ženki značajno niža u odnosu na odgovarajuće skupine mužjaka. Dok je kod mužjaka najveće sniženje aktivnosti CAT uočeno kod skupine HFHSD tretirane metforminom, kod ženki je najveće sniženje aktivnosti CAT zabilježeno unutar skupine HFHSD tretirane liraglutidom (Slika 6).



Slika 6. Usporedba aktivnosti katalaze (CAT) u serumu mužjaka i ženki štakora. Plavi stupići označavaju mužjake, a crveni stupići označavaju ženke. Kontrolna skupina životinja hranjena je standardnom hranom, skupina HFHSD hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli (dijabetični štakori), skupina HFHSD-Met hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli te je tretirana metforminom, i skupina HFHSD-Lir hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli te je tretirana liraglutidom. Razlike između pojedinih skupina ženki i mužjaka testirane su t-testom. Zvezdice (*) označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina mužjaka i ženki ($P < 0.05$).

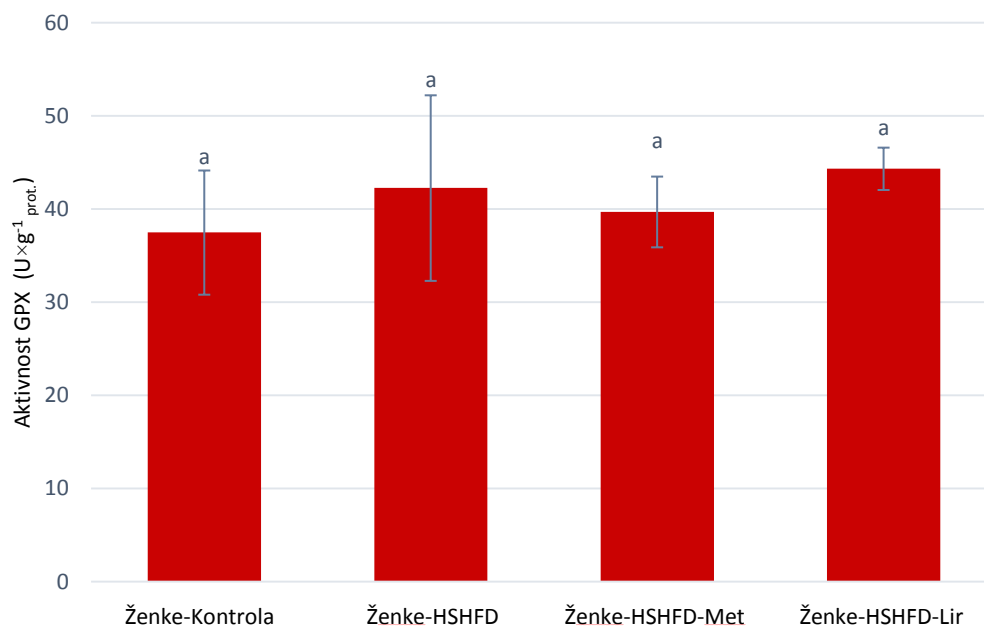
3.2. Aktivnost glutation-peroksidaze

Aktivnost GPX nije značajno snižena u skupini mužjaka HSHFD u odnosu na kontrolnu skupinu. U skupinama mužjaka HSHFD tretiranih metforminom i liraglutidom uočena je značajno snižena aktivnost GPX u odnosu na kontrolnu skupinu. U skupini mužjaka tretiranih metforminom aktivnost GPX snižena je za 23.47%, dok je u skupini mužjaka tretiranih liraglutidom snižena za 30.15%. U odnosu na skupinu mužjaka HSHFD, aktivnost GPX nije snižena u skupini HSHFD-Met, ali je u skupini HSHFD-Lir snižena za 20.31%. Statistički značajne razlike nema između skupine HSHFD-Met i skupine HSHFD-Lir (Slika 7).



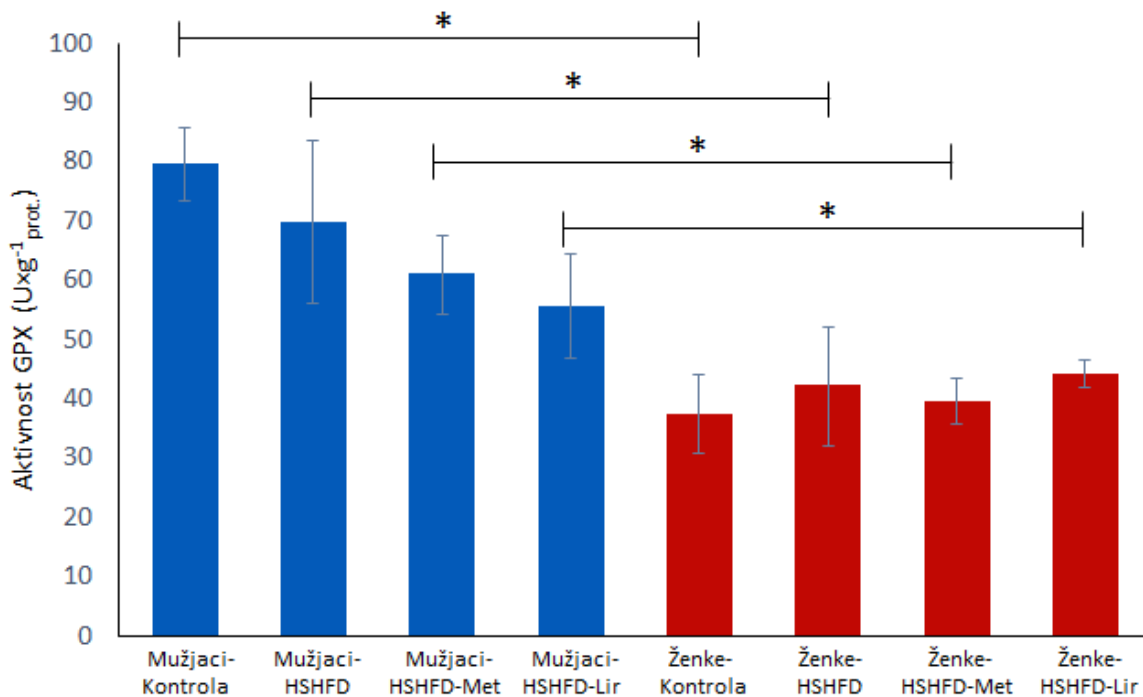
Slika 7. Aktivnost glutation-peroksidaze (GPX) u krvnom serumu mužjaka štakora. Kontrolna skupina životinja hranjena je standardnom hranom, skupina HFHSD hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli (dijabetični štakori), skupina HFHSD-Met hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli te je tretirana metforminom, i skupina HFHSD-Lir hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli te je tretirana liraglutidom. Rezultati (N=8) su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD. Razlike između skupina testirane su Duncan *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

U skupini ženki HSHFD te u skupinama ženki HSHFD tretiranih metforminom i liraglutidom nije uočeno značajno povišenje aktivnost GPX u odnosu na kontrolnu skupinu ženki. Također nema statistički značajne razlike između skupine HSHFD i skupine ženki HSHFD tretiranih metforminom te između skupine HSHFD i skupine ženki HSHFD tretiranih liraglutidom (Slika 8).



Slika 8. Aktivnost glutation-peroksidaze (GPX) u krvnom serumu ženki štakora. Kontrolna skupina životinja hranjena je standardnom hranom, skupina HFHSD hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli (dijabetični štakori), skupina HFHSD-Met hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli te je tretirana metforminom i skupina HFHSD-Lir hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli te je tretirana liraglutidom. Rezultati (N=8) su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD. Razlike između skupina testirane su Duncan *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

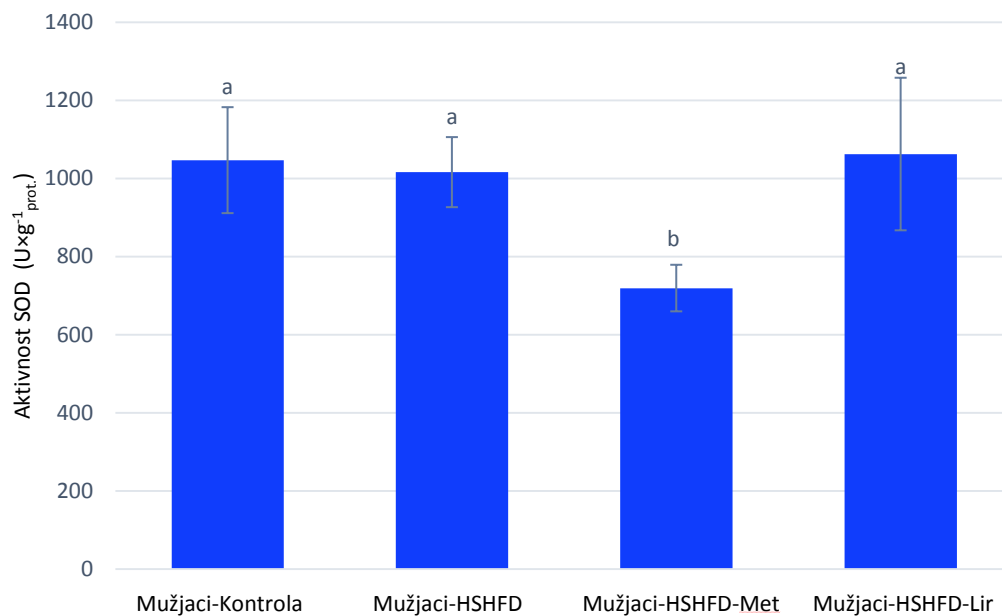
Uspoređujući aktivnosti GPX u pojedinim skupinama mužjaka i odgovarajućim skupinama ženki uočena je statistički značajna razlika u aktivnostima GPX. Aktivnost GPX je kod svih skupina ženki značajno niža u odnosu na odgovarajuće skupine mužjaka. Dok je kod mužjaka najveće sniženje aktivnosti GPX uočeno kod skupine HFHSD tretirane liraglutidom, kod ženki nije uočena statistički značajna razlika između skupina (Slika 9).



Slika 9. Usporedba aktivnosti glutacione peroksidaze (GPX) u serumu mužjaka i ženki štakora. Plavi stupići označavaju mužjake, a crveni stupići označavaju ženke. Kontrolna skupina životinja hranjena je standardnom hranom, skupina HFHSD hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli (dijabetični štakori), skupina HFHSD-Met hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli te je tretirana metforminom, i skupina HFHSD-Lir hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli te je tretirana liraglutidom. Razlike između pojedinih skupina ženki i mužjaka testirane su t-testom. Zvezdice (*) označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina mužjaka i ženki ($P < 0.05$).

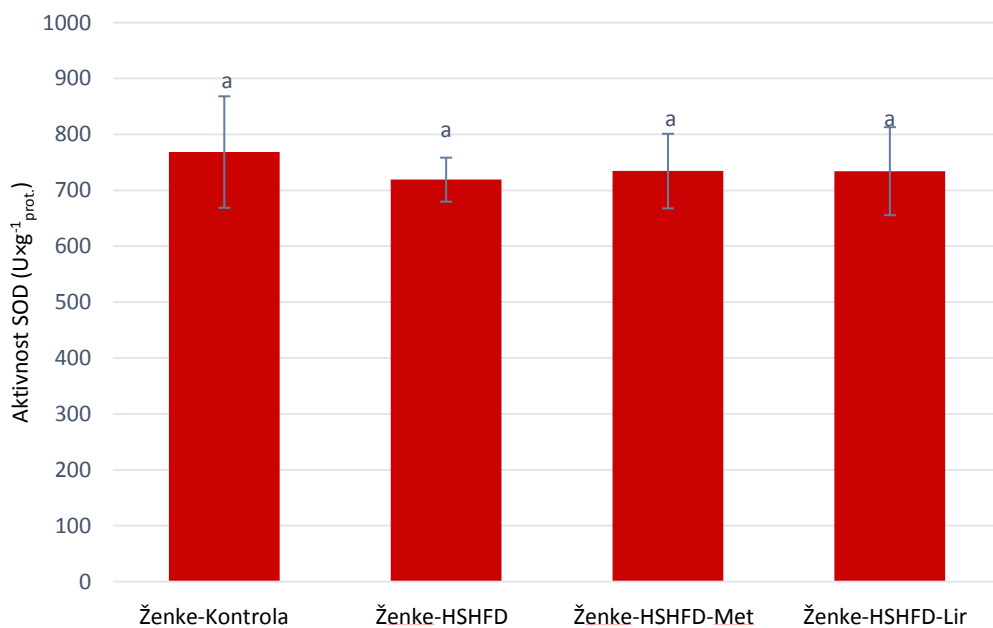
3.3. Aktivnost superoksid-dismutaze

Aktivnost SOD nije značajno snižena u skupini mužjaka HSHFD i skupini mužjaka HSHFD tretiranih liraglutidom u odnosu na kontrolnu skupinu. U skupini mužjaka HSHFD tretiranih metforminom aktivnost SOD je snižena za 31.28 % u odnosu na kontrolnu skupinu, ali je također snižena i u odnosu na skupinu mužjaka HSHFD te skupinu mužjaka HSHFD tretiranih liraglutidom (Slika 10).



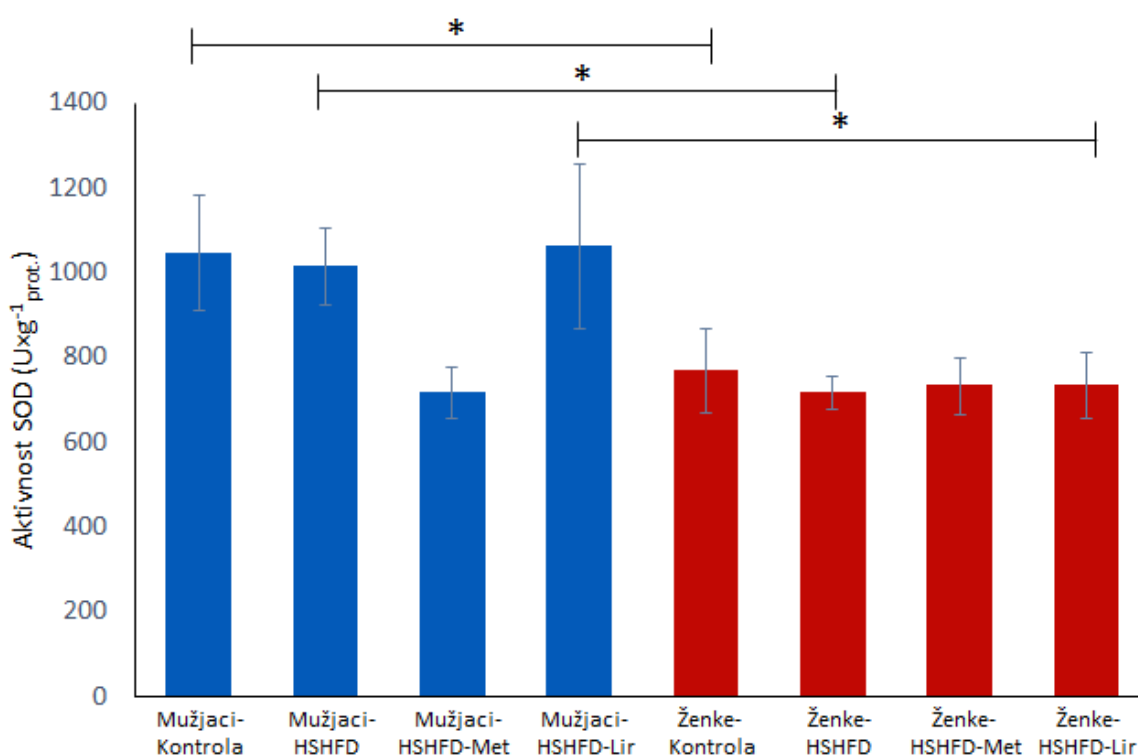
Slika 10. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u krvnom serumu mužjaka štakora. Kontrolna skupina životinja hranjena je standardnom hranom, skupina HFHSD hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli (dijabetični štakori), skupina HFHSD-Met hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli te je tretirana metforminom, i skupina HFHSD-Lir hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli te je tretirana liraglutidom. Rezultati (N=8) su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD. Razlike između skupina testirane su Duncan *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

U skupini ženki HSHFD te u skupinama ženki HSHFD tretiranih metforminom i liraglutidom nije uočeno značajno sniženje aktivnost SOD u odnosu na kontrolnu skupinu ženki. Također nema statistički značajne razlike između skupine HSHFD i skupine ženki HSHFD tretiranih metforminom te između skupine HSHFD i skupine ženki HSHFD tretiranih liraglutidom (Slika 11).



Slika 11. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u krvnom serumu ženki štakora. Kontrolna skupina životinja hranjena je standardnom hranom, skupina HFHSD hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli (dijabetični štakori), skupina HFHSD-Met hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli te je tretirana metforminom i skupina HFHSD-Lir hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli te je tretirana liraglutidom. Rezultati (N=8) su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD. Razlike između skupina testirane su Duncan *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

Uspoređujući aktivnosti SOD u pojedinim skupinama mužjaka i odgovarajućim skupinama ženki uočena je statistički značajna razlika u aktivnostima SOD. Aktivnost SOD je kod svih skupina ženki značajno niža u odnosu na odgovarajuće skupine mužjaka, osim u skupinama tretiranim metforminom gdje nema statistički značajne razlike u aktivnosti SOD između mužjaka i ženki. Dok je kod mužjaka najveće sniženje aktivnosti SOD uočeno kod skupine HFHSD tretirane metforminom, kod ženki nije uočena statistički značajna razlika između skupina (Slika 12).



Slika 12. Usporedba aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD) u serumu mužjaka i ženki štakora. Plavi stupići označavaju mužjake, a crveni stupići označavaju ženke. Kontrolna skupina životinja hranjena je standardnom hranom, skupina HFHSD hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli (dijabetični štakori), skupina HFHSD-Met hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli te je tretirana metforminom i skupina HFHSD-Lir hranjena je prehranom s visokim udjelom masti i soli te je tretirana liraglutidom. Razlike između pojedinih skupina ženki i mužjaka testirane su t-testom. Zvezdice (*) označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina mužjaka i ženki ($P < 0.05$).

4. RASPRAVA

Svrha ovog istraživanja bila je utvrditi utjecaj lijekova metformina i liraglutida na aktivnost antioksidativnih enzima CAT, GPX-a i SOD-a kod dijabetičnih i pretilih štakora. Dijabetes tipa 2 je metabolički poremećaj u kojem zbog otpornosti na inzulin ili manjka inzulina dolazi do povećanja koncentracije šećera u krvi tj. hiperglikemije (Malmenas i sur., 2013). Hiperglikemija u dijabetesu je povezana sa glikacijom proteina te usporedno s tim i proizvodnjom ROS-a koje uzrokuju razna oksidativna oštećenja stanice (Aksoy i sur., 2013). Zbog hiperglikemije, veće količine šećera ulaze u ciklus glikolize i ciklus trikarbonatnih kiselina što dovodi do povećanog rada elektronskog transportnog lanca te se nakupljaju sve veće koncentracije $O_2^{\cdot-}$ (Wiernsperger, 2003). Gargiulo i suradnici su ustanovili da su pacijenti oboljeli od dijabetesa tipa 2 imali znatno veću produkciju $O_2^{\cdot-}$ u trombocitima u odnosu na kontrolnu skupinu (Gargiulo i sur., 2002).

Rezultati istraživanja su pokazali sniženu aktivnost CAT u skupini dijabetičnih mužjaka (HSHFD), i ženki (HSHFD) u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine. Snižena aktivnost CAT zabilježena je i u tkivima bubrega dijabetičnih štakora na kojima su radili Kakkar i suradnici, što objašnjavaju mogućom inhibicijom enzima prekomjernom proizvodnjom ROS-a, posebno $O_2^{\cdot-}$ koji inaktivira CAT (Kakkar i sur., 1995). Pošto CAT prevodi H_2O_2 u vodu i kisik, njezinom smanjenom aktivnošću moguće je očekivati nešto veću koncentraciju H_2O_2 . S time možemo povezati rezultate aktivnosti GPX-a koja se nije statistički značajno promijenila u skupini dijabetičnih mužjaka (HSHFD) i ženki (HSHFD) u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine. Dakle, kada je aktivnost CAT smanjena, detoksikacija H_2O_2 postaje ovisna o aktivnosti GPX-a. Povišene koncentracije H_2O_2 mogu uzrokovati postepenu inhibiciju SOD-a (Pavlović i sur., 2000). Detoksikacijom H_2O_2 , GPX je spriječio inhibiciju SOD-a, što je moguće objašnjenje rezultata aktivnosti SOD-a koja se nije statistički značajno promijenila u skupini dijabetičnih mužjaka (HSHFD) i ženki (HSHFD) u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine. Međutim, u istraživanju koje su proveli Pan i suradnici na pacijentima oboljelim od dijabetesa tipa 2, rezultati su bili nešto drugačiji. Aktivnost CAT u serumu bila je snižena, ali također snižene su bile i aktivnosti GPX-a i SOD-a u odnosu na kontrolnu skupinu tj. zdrave ljude što objašnjavaju povećanim stvaranjem ROS-a i nastankom oksidativnih oštećenja (Pan, 2010).

Metformin je oralni antidijabetik koji se može koristiti za snižavanje razine glukoze u krvi, sam ili u kombinaciji s lijekovima sličnoga djelovanja, kod pacijenata oboljelih od dijabetesa tipa 2. Dosadašnja istraživanja pokazala su zaštitne učinke metformina prilikom srčane fibroze, multiple skleroze te lipidne peroksidacije u krvi što je upućivalo na dobra antioksidativna svojstva metformina (Alhaider i sur., 2011). Naše istraživanje je pokazalo da je u skupini dijabetičnih mužjaka tretiranih metforminom (HSHFD-Met) značajno snižena aktivnost svih antioksidativnih enzima (CAT, GPX-a i SOD-a) u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je u skupini dijabetičnih ženki tretiranih metforminom (HSHFD-Met) zabilježena snižena aktivnost samo CAT u odnosu na kontrolnu skupinu, dok se aktivnosti GPX-a i SOD-a nisu statistički značajno promijenile. Međutim, između skupine dijabetičnih mužjaka (HSHFD) i skupine mužjaka tretiranih metforminom (HSHFD-Met) nije bilo statistički značajne razlike u aktivnosti CAT i GPX-a, dok je aktivnost SOD-a bila snižena. Također ni kod ženki nije bilo statistički značajne razlike u aktivnosti CAT, GPX-a i SOD-a između skupine dijabetičnih ženki (HSHFD) i skupine ženki tretiranih metforminom (HSHFD-Met). Bonnefont i suradnici u svom istraživanju su pokazali da metformin može direktno neutralizirati HO^\bullet , ali da ne može neutralizirati H_2O_2 i $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Bonnefont-Rousselot i sur., 2003). Snižena aktivnost SOD-a rezultira povećanjem koncentracije $\text{O}_2^{\bullet-}$ koji inaktivira CAT i GPX odnosno smanjuje njihovu aktivnost. Iz dobivenih rezultata mogli bismo zaključiti da metformin nije imao utjecaja na aktivnosti CAT, GPX-a i SOD-a u serumu dijabetičnih štakora, što ne mora nužno značiti da nije imao utjecaja na cjelokupni antioksidativni status jer postoje dokazi o njegovom neposrednom djelovanju na smanjenje oksidativnog stresa. Već spomenuta neenzimska glikacija proteina je kompleks serije reakcija između reduciranog šećera i amino skupine proteina, lipida ili DNA gdje preko Amadori produkata i Schiffovih baza na kraju nastaju velike količine krajnjih produkata uznapredovale glikacije (AGE, engl. *advanced glycation end products*) pri čemu se nakuplja ROS. U dijabetesu te se reakcije odvijaju ubrzano zbog hiperglikemije te su zabilježene povećane količine AGE-a, ali i ROS-a (Rahbar i sur., 2000). Esteghamati i suradnici su ustanovili snižene količine AGE kod pacijenata oboljelih od dijabetesa koji su 3 mjeseca primali metformin zbog čega se moglo zaključiti da metformin smanjuje oksidativni stres (Esteghamati i sur., 2013). Također, metformin inhibira enzimsku aktivnost kompleksa 1 u respiracijskom lancu mitohondrija kako bi smanjio povećano nakupljanje $\text{O}_2^{\bullet-}$ uzrokovano hiperglikemijom (Rosen i Wiernsperger, 2006).

Liraglutid je analog GLP-1 sa 97% podudarnosti s ljudskim GLP-1-om, lijek koji snižava razinu glukoze u krvi na način da potencira sekreciju inzulina, povećava rast beta stanica gušterače, smanjuje apetit te regulira tjelesnu masu (Gao i sur., 2015). U skupini dijabetičnih mužjaka tretiranih liraglutidom (HSHFD-Lir) zabilježena je značajno snižena aktivnost CAT i GPX-a odnosu na kontrolnu skupinu, dok se aktivnost SOD-a nije značajno promijenila. U skupini dijabetičnih ženki tretiranih liraglutidom (HSHFD-Lir) zabilježena je snižena aktivnost samo CAT u odnosu na kontrolnu skupinu, dok se aktivnosti GPX-a i SOD-a nisu statistički značajno promijenile. Međutim, između skupine dijabetičnih mužjaka (HSHFD) i skupine mužjaka tretiranih liraglutidom (HSHFD-Lir) nije bilo statistički značajne razlike u aktivnosti CAT i SOD-a, dok je aktivnost GPX-a bila snižena. Također ni kod ženki nije bilo statistički značajne razlike u aktivnosti CAT, GPX-a i SOD-a između skupine dijabetičnih ženki (HSHFD) i skupine ženki tretiranih liraglutidom (HSHFD-Lir). Iz toga možemo zaključiti da liraglutid nije imao utjecaj na aktivnost CAT, GPX-a i SOD-a u serumu dijabetičnih štakora. U endoplazmatskom retikulumu (ER) jetre štakora soja Sprague-Dowley hranjenima prehranom s visokim udjelom masti na kojima su istraživali Yang i suradnici došlo je do smanjena oksidativnog stresa nakon tretmana liraglutidom što objašnjavaju njegovom inhibicijom signalnog puta stresa u ER-u (Yang i sur., 2014). Shiraki i suradnici su ustanovili povećanu ekspresiju CAT, GPX i SOD u endotelnim stanicama nakon tretmana liraglutidom (Shiraki i sur., 2012). Rezultati istraživanja Rizza i suradnika pokazali su da liraglutid smanjuje lipidnu peroksidaciju u plazmi pacijenata oboljeli od dijabetesa, ali nisu zabilježili značajne učinke na razinu ROS-a u plazmi (Rizzo i sur., 2014).

5. ZAKLJUČAK

1. Hiperglikemija uzrokuje povećano nakupljanje ROS-a koji dovode do oksidativnog stresa što možemo zaključiti prema sniženoj aktivnosti CAT, jednako i kod mušjaka i kod ženki dijabetičnih i pretilih štakora, do koje može doći uslijed inhibicije povećanim koncentracijama superoksida.

2. Metformin je snizio aktivnosti svih antioksidativnih enzima u krvnom serumu mušjaka u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je aktivnost SOD-a bila manja i u odnosu na dijabetičnu skupinu štakora. Za razliku od mušjaka, kod ženki je metformin djelovao samo na sniženje aktivnosti CAT.

4. Liraglutid je značajno snizio aktivnosti enzima CAT i GPX-a u serumu mušjaka u odnosu na kontrolnu skupinu dok je aktivnost GPX-a bila manja i u odnosu na dijabetičnu skupinu štakora. Za razliku od mušjaka, kod ženki je liraglutid djelovao samo na sniženje aktivnosti CAT.

5. Evidentno je da postoje spolne razlike u odgovoru antioksidativnih enzima na terapiju dijabetesa tipa 2 lijekovima kao što su metformin i laraglutid. Osim toga razlike između mušjaka i ženki postoje i u aktivnostima antioksidativnih enzima između istih skupina životinja, aktivnosti enzima su znatno veće kod mušjaka u odnosu na odgovarajuće skupine ženki (razlika je posebno izražena kod CAT).

6. LITERATURA

Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods enzymol.* 105:121-126

Aksoy N, Vural H, Sabuncu T, Aksoy A.2003. Effects of melatonin on oxidative-antioxidative status of tissues in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochem Funct.* 21:121-125

Alhaider AA, Korashy HM, Sayed-Ahmed MM, Mabrak M, Kfoury H, Mansour MA. 2011. Metformin attenuates streptozotocin- induced diabetic nephropathy in rats through modulation of oxidative stress genes expression. *Chemico-Biological Interactions.* 192:233-242.

Betteridge DJ. 2000. What Is Oxidative Stress?. *Metabolism.* Vol 49, No 2, Suppl 1:pp 3-8

Bonnefont-Rousselot D, Raji B, Walrand S, Gardes-Albert M, Jore D, Legrand A, Peynet J, Vasson MP. 2003. An Intracellular Modulation of Free Radical Production Could Contribute to the Beneficial Effects of Metformin Towards Oxidative Stress. *Metabolism.* Vol 52, No 5, pp 586-589.

Bradford MM. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitaion of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein –dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Chien Hua L, Yi-Jen H, Po-Shiuan H. 2016. Additional effect of metformin and celecoxib against lipid dysregulation and adipose tissue inflammation in high-fat fed rats with insulin resistance and fatty liver. *European Jurnal of Pharmacology*

Dalle S, Burcelin R, Gourdy P. 2013. Specific actions of GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors for the treatment of pancreatic beta cell impairment in type 2 diabetes. *Cellular Signalling* 25:570-579.

Erejuwa OO. 2012. Oxidative Stress in Diabetes Mellitus: Is There a Role for Hyperglycemic Drugs and/or antioxidants?. *Oxidative Stress and Diseases.* Dr. Voolodymyr Lushchak (Ed.) ISBN: 978-953-51-0552-7.

Esteghamati A, Eskandari D, Mirmiranpour H, Noshad S, Mousavizadeh M, Hedayati M, Nakhjavani M. 2013. Effects of metformin on markers of oxidatve stress and antioxidant reserve in patints with newly diagnosed type 2 diabetes: A randomized clinical trial. *Clinical Nutrition.* 32:179-185

- Flohe L, Otting F. 1971. Superoxide dismutase assays. *Method Enzymol* 105:93-104
- Gao H, Zeng Z, Zhang H, Zhou X, Guan L, Deng W, Xu L. 2015. The Glucagon-like Peptide-1 Analogue Liraglutide Inhibits Oxidative Stress and Inflammatory Response in the Liver of Rats with Diet-Induced Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Biol. Pharm. Bull.* 38:694-702.
- Gargiulo P, Caccese D, Pignatelli P, Brufani C, De Vito F, Marino R, Lauro R, Violi F, Di Mario U, Sanguigni V. 2002. Metformin decreases platelet superoxide anion production in diabetic patients. *Diabetes Metab Res Rev.* 18:156-159.
- Ghanbari E, Nejati V, Khazaei M. 2016. Improvement in Serum Biochemical Alterations and Oxidative Stress of Liver and Pancreas following Use of Royal Jelly in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Cell Journal.* Vol 18, No 3.
- Jurković S, Osredkar J, Marc J. 2008. Molekularni utjecaj glutation-peroksidaze u autoksidacijskim procesima. *Biochemia Medica.* 18(2):162-74.
- Kakkar P, Kalra J, Mantha SV, Prasad K. 1995. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetes rats. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 151:113-119.
- Kokić S. 2009. Dijagnostika i liječenje šećerne bolesti tipa 2. *Medix.* 15:80-81
- Lu SC. 2013. Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1830:3143-3135.
- McCord JM and Fridovich I. 1969. *J. Biol. Chem.* 244,6049-6055
- Mlmenas M, Bouchard JR, Langer J. 2013. Retrospective Real-World Adherence in Patients With Type 2 Diabetes Initiating Once-Daily Liraglutide 1.8 mg or Twice-Daily Exenatide 10 µg. *Clinical Therapeutics.* Vol 35, No 6.
- Montanya E, Sesti G. A review of Efficacy and Safety Data Regarding the Use of Liraglutide, a Once-Daily Human Glucagon-Like Peptide 1 Analogue, in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. 2009. *Clinical Therapeutics.* 31:11
- Novak B, Metelko. 2011. Liraglutid u liječenju šećerne bolesti tipa 2. *Liječ Vjesn.* 133:269-276
- Oberley LW. 1988. Free radicals and diabetes. *Free radical Biology & Medicine.* Vol 5, pp. 113-124.
- Pan H, Zhang L, Guo M, Sui H, Li H, Wu W, Qu N, Liang M, Chang D. 2010. The oxidative stress status in diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Acta Diabetol.* 47:S71-S76.

Pavlović D, Kocić R, Kocić R, Jevtović T, Radenković S, Mikić D, Stojanović M, Djordjević PB. 2000. Effect of four-week metformin treatment on plasma and erythrocyte antioxidative defense enzymes in newly diagnosed obese patients with type 2 diabetes. *Obesity and Metabolism*. 2:251-256.

Quan H, Zhang H, Wei W, Fang T. 2016. Gender-related different effects of a combined therapy of Exenatide and Metformin on overweight or obesity patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications*

Rahbar S, Natarajan R, Yerneni KK, Scott S, Gonzales N, Nadler JL. 2000. Evidence that pioglitazone, metformin and pentoxifylline are inhibitors of glycation. *Clinica Chimica Acta*. 301:65-77.

Rizzo M, Abate N, Chandalia M, Rizvi AA, Giglio RV, Nikolić D, Gammazza Marino A, Barbagallo I, Isenović ER, Banach M, Montalto G, Li Volti G. 2014. Liraglutide Reduces Oxidative Stress And Restores Heme Oxygenase-1 And Ghrelin Levels In Patients With Type 2 Diabetes: a prospective pilot study. *The journal of clinical endocrinology & metabolism*.

Rosen P, Wiernsperger NF. 2006. Metformin delays the manifestation of diabetes and vascular dysfunction in Goto-Kakizaki rats by reduction of mitochondrial oxidative stress. *Diabetes Metab Res Rev*. 22:323-330

Shiraki A, Oyama J, Komoda H, Asaka M, Komatsu A, Sakuma M, Kodama K, Sakamoto K, Kotooka N, Hirase T, Node K. 2012. The glucagon-like-peptide 1 analog liraglutide reduces TNF- α -induced oxidative stress and inflammation in endothelial cells. *Atherosclerosis* 221:375-382

Takemoto K, Tanaka M, Iwata H, Nishihara R, Ishihara K, Wang DH, Ogino K, Taniuchi K, Masuoka N. 2009. Low catalase activity in blood is associated with the diabetes caused by alloxan. *Clinica Chimica Acta* 407:43-46.

Tiwari BK, Pandey KB, Abidi AB, Rizvi SI. 2013. Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus. *Journal of Biomarkers*. 8 pp.

Wakamats TH, Dogru M, Tsubota K. 2008. Tearful relation: oxidative stress, inflammation and eye diseases. *Arq Bras Oftalmol*. 71:72-79.

Wendel A. 1980. *Enzymatic Basis of Detoxication*. Volume 1, p. 333, Academic Press, NY

Winer N, Sowers JR. 2004. Epidemyology of Diabetes. *Journal of Clinical Pharmacology*. 44:397-405.

Winsperger NF. 2003. Oxidative stressas a Terapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metab*. Vol.29, No.6, pp. 579-585.

Yang J, Ao N, Du J, Wang X. 2014. Protective effect of liraglutide against ER stressin the liver of high-fat diet-induced insulin-resistant rats. Springer

Zjačić-Rotković V. 2009. Oralni hipoglikemizantni lijekovi u liječenju šećerne bolesti. *Medix* 15:80-81

WEB IZVORI:

Web 1: <http://casesblog.blogspot.hr/2006/11/dpp-4-inhibitors-for-treatment-of.html> (pristup 10.07.2016)