

Utjecaj metformina na mitohondrijsku respiraciju u srcu

Tudor, Darija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:921264>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Darija Tudor

**UTJECAJ METFORMINA NA MITOHONDRIJSKU
RESPIRACIJU U SRCU**

Diplomski rad

Akadska godina 2018./2019.

**Mentor:
Prof. dr. sc. Marko Ljubković**

Split, srpanj 2019.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Klasifikacija šećerne bolesti.....	2
1.2. Šećerna bolest tip 2 kao globalna epidemija	2
1.2.1. Patogeneza	3
1.2.2. Dijagnoza	4
1.2.3. Klinička slika	5
1.2.4. Terapija	5
1.3. Metformin.....	8
1.3.1. Metformin kroz povijest	8
1.3.2. Bigvanidi.....	9
1.3.3. Druge terapijske indikacije	10
1.3.4. Farmakokinetika, farmakodinamika i pretpostavljeni način djelovanja	10
1.4. Mitohondrij.....	11
1.4.1. Građa mitohondrija	11
1.4.1.1. Vanjska membrana	11
1.4.1.2. Međumembranski prostor.....	12
1.4.1.3. Unutrašnja membrana.....	12
1.4.1.4. Kriste	12
1.4.1.5. Matriks.....	12
1.4.2. Funkcija mitohondrija.....	13
1.4.2.1. β -oksidacija masnih kiselina.....	14
1.4.2.2. Ciklus limunske kiseline.....	14
1.4.3. Mitohondrij kao energijska centrala stanice	16
1.4.3.1. Respiracijski lanac	16
1.4.3.2. Oksidacijska fosforilacija	16
1.5. Bioenergetika srca	18
1.5.1. Oštećenje srca u šećernoj bolesti	18
2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE.....	20
2.1. Cilj istraživanja	21
2.2. Hipoteze istraživanja	21
3. MATERIJALI I METODE.....	22
3.1. Ustroj istraživanja	23
3.2. Eksperimentalne životinje	23

3.3. Priprema tkiva za in vitro procjenu respiracije	24
3.4. Mjerenje mitohondrijske respiracije.....	24
3.5. Eksperimentalni protokol	25
3.5.1. Procjena mitohondrijske respiracije putem enzimatskog kompleksa I	25
3.5.2. Procjena mitohondrijske respiracije putem enzimatskog kompleksa II	26
3.6. Statistička obrada	26
4. REZULTATI.....	27
5. RASPRAVA	32
6. ZAKLJUČCI.....	39
7. POPIS CITIRANE LITERATURE	41
8. SAŽETAK	48
9. SUMMARY	51
10. ŽIVOTOPIS.....	53

Zahvaljujem se...

*Svom mentoru. Hvala što Ste mi omogućili da obilježim svoj akademski put na mjestu gdje je
moja ljubav prema medicini počela.*

Svojim prijateljima. Radi vas „medicina“ ima potpuno drugo značenje.

Svojoj obitelji. Bez vaše podrške i razumijevanja ne bih bila tu gdje jesam.

*Najviše od svega, svojim roditeljima. Hvala što ste me naučili da su trud i marljiv rad jedini
ispravan put.*

POPIS KRATICA:

OGTT – engl. *Oral glucose tolerance test* (test oralnog opterećenja glukozom)

IFG – engl. *Impaired fasting glucose* (oštećena tolerancija glukoze natašte)

IGT – engl. *Impaired glucose tolerance* (poremećena tolerancija glukoze)

MODY – engl. *Maturity-onset diabetes of the young* (adultni dijabetes mladih)

GLP1 – engl. *Glucagon-like peptide -1* (peptid sličan glukagonu)

GIP – engl. *Gastric inhibitory polypeptid* (želučani inhibicijski polipeptid)

SGLT2 – engl. *Sodium-dependent glucose cotransporters* (o natriju ovisan prijenosnik glukoze)

ATP – adenzin trifosfat

AMPK – adenzin monofosfatom aktivirana protein kinaza

OCT1 – engl. *Organic cation transporter 1* (organski kationski transporter)

NADH – nikotinamid adenin dinukleotid

FADH₂ – flavin adenin dinukleotid

1. UVOD

Šećerna bolest je kronična, metabolička bolest. To je stanje kronične hiperglikemije obilježeno poremećenim metabolizmom ugljikohidrata, proteina i masti. Karakterizirana je akutnim metaboličkim te kasnim komplikacijama na velikim i malim krvnim žilama. Nastaje kao posljedica apsolutnog ili relativnog manjka inzulina, povećanog stvaranja glukoze te prekomjernog djelovanja hormona sa suprotnim učinkom od inzulina (1).

1.1. Klasifikacija šećerne bolesti

Prema klasifikaciji Američkog dijabetološkog društva iz 2018. godine, šećernu bolest klasificiramo u sljedeće kategorije (2):

1. Tip 1 (uzrokovano autoimunosno posredovanom destrukcijom beta stanica Langerhansovih otočića što najčešće vodi apsolutnom manjku inzulina);
2. Tip 2 (uzrokovano progresivnim gubitkom funkcije beta stanica, najčešće na podlozi inzulinske rezistencije);
3. Gestacijski tip (šećerna bolest dijagnosticirana u drugom i trećem tromjesečju trudnoće kod trudnica koje prije trudnoće nisu imale bolest);
4. Specifični tipovi šećerne bolesti nastali kao posljedica različitih uzroka (primjerice monogeniski dijabetički sindrom – MODY, šećerna bolest kao posljedica insuficijencije egzokrinog dijela gušterače, lijekovima izazvana šećerna bolest).

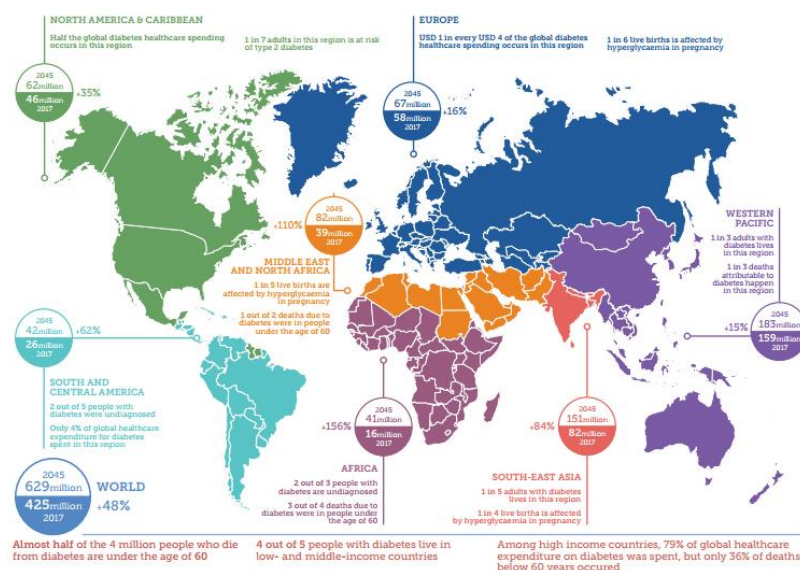
1.2. Šećerna bolest tip 2 kao globalna epidemija

Tip 2 šećerne bolesti karakteriziran je neosjetljivošću na inzulin koja nastaje na podlozi inzulinske rezistencije, smanjenom produkcijom inzulina i u konačnici, gubitkom funkcije beta stanica gušterače. Ovaj tip je najučestaliji oblik šećerne bolesti, ima ga oko 90% svih bolesnika (3).

Javnozdravstveni značaj šećerne bolesti ogleda se u tome što je to bolest koja u cijelom svijetu, kako u razvijenim tako i u nerazvijenim zemljama bilježi dramatičan porast. Prema podacima Međunarodne dijabetološke federacije procjenjuje se da je 2017. godine od šećerne bolesti bolovalo 425 milijuna ljudi od čega je 87% do 91% bolesnika imalo tip 2 šećerne bolesti. Također, isti podaci predviđaju da će, ukoliko se ovakav trend porasta učestalosti bolesti nastavi, 2045. godine broj oboljelih iznositi 629 milijuna. Prevalencija tipa 2 šećerne bolesti raste mnogo brže u odnosu na tip 1 što se pripisuje povećanoj pretilosti, smanjenoj

fizičkoj aktivnosti i starenju stanovništva. Prevalencija je najniža u ruralnim područjima zemalja u razvoju a najviša u etničkim skupinama koje su poprimile zapadnjačke obrasce življenja (Slika 1). Razlike prema spolu su malene, u korist muškaraca. Učestalost raste s dobi neovisno o spolu (4).

Šećerna bolest je, zbog kroničnog tijeka i brojnih pratećih komplikacija, vodeći uzročnik morbiditeta i mortaliteta te važan rizični čimbenik, prvenstveno za kardiovaskularne bolesti (4,5).



Slika 1. Prevalencija šećerne bolesti u svijetu 2017. i 2045.godine.

(preuzeto s: https://diabetesatlas.org/IDF_Diabetes_Atlas_8e_interactive_EN/)

1.2.1. Patogeneza

Inzulinska rezistencija, oštećena sekrecija inzulina, pojačana jetrena produkcija glukoze i abnormalni metabolizam masti glavne su odrednice šećerne bolesti tipa 2. Iako je primarni poremećaj još uvijek kontroverzan, većina studija govori u prilog tome da inzulinska rezistencija prethodi abnormalnoj sekreciji a bolest se razvija tek onda kada sekrecija inzulina postane nedostatna. U ranim stadijima bolesti tolerancija glukoze ostaje približno normalna unatoč inzulinskoj rezistenciji zahvaljujući pojačanom odgovoru beta stanica gušterače koje kompenziraju stanje povećanom sekrecijom inzulina. Kako bolest napreduje, inzulinska rezistencija i hiperinzulinemija progrediraju a odgovor beta stanica postaje nedostatan te se razvija IGT (engl. *Impaired glucose tolerance* – poremećaj tolerancije glukoze) karakteriziran postprandijalnom hiperglikemijom. Daljni pad u inzulinskoj sekreciji uz istovremeni porast jetrene produkcije glukoze vodi ka razvoju šećerne bolesti sa hiperglikemijom natašte (1).

Inzulinska rezistencija očituje se kao smanjena sposobnosti inzulina da ostvaruje svoj učinak u ciljnim tkivima (jetra, mišićno i masno tkivo) a rezultat je genetske podločnosti i pretilosti. Utilizacija glukoze je posljedično 30 do 60% manja u tih bolesnika nego u normalnoj populaciji. Točan molekularni mehanizam odgovoran za nastanak inzulinske rezistencije još uvijek nije poznat. Unatoč tome što je razina inzulinskih receptora i tirozin kinazna aktivnost u skeletnom mišiću smanjena, smatra se da je to posljedica hiperinzulinemije a ne primarni poremećaj. Postreceptorsko oštećenje, inzulinom regulirana fosforilacija/defosforilacija igra središnju ulogu. Posljedično dolazi do nakupljanja lipida unutar miocita koji mogu oštetiti mitohondrijsku oksidativnu fosforilaciju i produkciju ATP-a te generirati povećanu produkciju reaktivnih kisikovih spojeva (1).

Pretilost, osobito ona centralne ili visceralne distribucije važan je dio patogenetskog procesa. Povećana produkcija slobodnih masnih kiselina i nekih adipokina iz masnog tkiva može izazvati inzulisku rezistenciju u jetri i skeletnom mišiću. Slobodne masne kiseline smanjuju utilizaciju glukoze u skeletnom mišiću, povećavaju jetrenu produkciju glukoze te oštećuju funkciju beta stanica. Istovremeno, produkcija inzulina – senzibilizirajućih peptida kao što je adiponektin u masnom tkivu je smanjena (1,2).

Inzulinska rezistencija u jetri rezultira nemogućnošću hiperinzulinemije da suprimira jetrenu glukoneogenezu i posljedično dolazi do hiperglikemije na tašte i smanjene postprandijalne sinteze glikogena. Također, zbog promjena u metabolizmu masnog tkiva povećana je i jetrena produkcija VLDL-a (1,2).

1.2.2. Dijagnoza

Toleranciju glukoze opisujemo kroz tri razmjerno široke kategorije: normalna homeostaza glukoze, šećerna bolest i poremećena homeostaza glukoze. Istovremeno, toleranciju glukoze procjenjujemo kroz tri parametra: vrijednost glukoze u krvi natašte, vrijednost glukoze nakon opterećenja glukozom u OGTT testu, te kroz vrijednost HbA1C. Prema smjernicama Izvršnog odbora za dijagnozu i klasifikaciju šećerne bolesti (tijelo sastavljeno od predstavnika Američkog dijabetološkog društva, Europskog društva za proučavanje šećerne bolesti i Međunarodne dijabetološke federacije) kriteriji za dijagnozu su sljedeći: vrijednost glukoze u krvi $\geq 7,0$ mmol/L (126 mg/dL) natašte i/ili glukoza $\geq 11,1$ mmol/L (200 mg/dL) 2 h nakon oralnog opterećenja i/ili vrijednost HbA1c $\geq 6,5\%$. Također vrijednost glukoze $\geq 11,1$ mmol/L (200 mg/dL) u uzorku krvi uzetom nasumično uz odgovarajuću kliničku sliku, dovoljna je za postavljanje dijagnoze (6).

Kategorija poremećene homeostaza glukoze uključuje IFG (engl. *Impaired fasting glucose*) koja je definirana vrijednostima glukoze u krvi 5,6–6,9 mmol/L (100–125 mg/dL) zatim IGT (engl. *Impaired glucose tolerance*) karakteriziranu vrijednostima glukoze između 7,8 i 11 mmol/L (140 i 199 mg/dL) nakon oralnog opterećenja te vrijednosti HbA1C u rasponu od 5,7 do 6,4%. Pojedinci iz bilo koje od ove tri podskupine imaju dokazano veći rizik razvoja šećerne bolesti te kardiovaskularnih bolesti (7).

1.2.3. Klinička slika

Konstelacija simptoma poliurije, polidipsije i polifagije karakterističnih za šećernu bolest nije čest nalaz kod tipa 2. Mnogi bolesnici otkriju bolest slučajno, u sklopu laboratorijske obrade indicirane iz nekog drugog razloga ili tek kad se razviju kasne komplikacije. Bolesnici su obično pretili ili normalne tjelesne težine, obično bez spontanog gubitka težine a prezentiraju se uglavnom u sklopu kliničke slike neke od komplikacija. Komplikacije šećerne bolesti dijelimo na akutne i kronične (1).

Kronične komplikacije bolesti dijelimo na vaskularne i nevaskularne. Vaskularne uključuju mikroangiopatiju (retinopatija i nefropatija) te makroangiopatiju (koronarna arterijska bolesti, periferna vaskularna bolest i cerebrovaskularna bolest). Nevaskularne komplikacije uključuju senzornu, motoričku i autonomnu neuropatiju. Od akutnih komplikacija svojstvenih tipu 2 treba izdvojiti hiperosmolarnu komu, što je teški poremećaj metabolizma karakteriziran hiperglikemijom, dehidracijom i hiperosmolarnošću seruma bez ketonemije i značajnijih promjena pH vrijednosti arterijske krvi (1).

1.2.4. Terapija

Cjeloviti pristup liječenju tipa 2 šećerne bolesti uz promjenu životnog stila (promjenu načina prehrane i tjelesnu aktivnost) uključuje i farmakoterapiju peroralnim hipoglikemicima, terapiju pridruženih stanja (dislipidemija, hipertenzija, pretilost, koronarna bolest) te probir na eventualne komplikacije. Farmakoterapija se zasniva na primjeni lijekova koje s obzirom na mehanizam djelovanja svrstavamo u nekoliko skupina (8):

1. Bigvanidi;

Metformin, kao najznačajniji predstavnik ove skupine svoj učinak ostvaruje smanjujući jetrenu produkciju glukoze uz istovremeno povećanje njene periferne utilizacije.

2. Inzulinski sekretagozi;

Radi se o skupini lijekova koji stimuliraju sekreciju inzulina djelujući na ATP – ovisni kalijski kanal na membrani beta stanica gušterače. Najučinkovitiji su u liječenju bolesti tijekom prvih pet godina, dok još uvijek postoji endogena sekrecija inzulina. Klorpropamid, tolbutamid i tolazamid prva su generacija derivata sulfonilureje i više se ne koriste. Glibenklamid i glimepirid predstavnici su druge generacije a nateglinid i repaglinid nisu derivati sulfonilureje ali su srodnog mehanizma djelovanja.

3. Inhibitori alfa-glukozidaze;

Akarboza i miglitol, kao inhibitori crijevnog enzima alfa-glukozidaze smanjuju razgradnju oligosaharida i gastrointestinalnu apsorpciju glukoze.

4. Inkretinomimetici;

Inkretini (GLP-1, GIP) su skupina hormona probavnog sustava, koji djeluju tako da povećavaju oslobađanje inzulina iz beta stanica Langerhansovih otočića gušterače, usporavaju apsorpciju hranjivih tvari u krvotok smanjujući pražnjenje želuca, te smanjuju otpuštanje glukagon iz alfa stanica Langerhansovih otočića gušterače. Oba spoja inaktivira enzim dipeptidil-peptidaza 4. Glavni predstavnici skupine su eksenatid (sintetski analog GLP1), odobren u obliku injekcija te sitagliptin (inhibitor dipeptidil-peptidaze 4), dostupan za peroralnu primjenu.

5. SGLT2 inhibitori;

Gliflozini su lijekovi koji blokiraju SGLT2 kotransporter u proksimalnom tubulu bubrega. Smanjujući na taj način tubularnu reapsorpciju glukoze oni povećavaju njenu urinarnu ekskreciju.

6. Tiazolidindioni;

Pioglitazon, kao predstavnik skupine smanjuje rezistenciju na inzulin i povećava utilizaciju glukoze. Djeluje kao ligand receptora za aktivator proliferacije peroksisoma-gama (PPAR-gama).

7. Agonisti amilina.

Pramlintid, sintetski analog amilina, modulira razinu posprandijalne glukoze i dostupan je za parenteralnu primjenu.

Prema smjernicama Američkog dijabetološkog društva iz 2018. godine, u trenutku postavljana dijagnoze tipa 2 šećerne bolesti započinje se sa farmakoterapijom prema vrijednostima HbA1C. HbA1C ili glicirani hemoglobin je frakcija hemoglobina koja na sebi nosi neenzimskom reakcijom vezanu glukozu i pokazatelj je tromjesečnog prosjeka vrijednosti glukoze u krvi (9).

Ukoliko je vrijednost HbA1C manja od 9%, indicirana je monoterapija metforminom uz promjenu životnog stila. Vrijednosti HbA1C veće ili jednake 9% zahtijevaju dualnu terapiju metforminom i dodanim agensom (bilo kojim lijekom iz gore navedenih skupina ili inzulinom). Vrijednost HbA1C veće ili jednake 10%, razina glukoze veća ili jednaka 300 mg/dL te pojava komplikacija bolesti indikacija su za kombiniranu terapiju inzulinom (9).

1.3. Metformin

U trenutku postavljanja dijagnoze šećerne bolesti tipa 2 u farmakoterapijskom pristupu prvi lijek izbora je metformin. Metformin je učinkovit, siguran i razmjerno jeftin lijek koji dokazano smanjuje rizik kardiovaskularnih incidenata i smrtnog ishoda (10). Kao prva linija liječenja ima povoljan utjecaj na vrijednosti HbA1C, redukciju tjelesne težine i kardiovaskularni mortalitet (11).

1.3.1. Metformin kroz povijest

Metformin pripada skupini bigvanida koji potječu iz biljke francuski jorgovan (lat. *Galega officinalis*) koja se još od Srednjeg vijeka koristila u narodnoj medicini (12). Inicijalnu uporabu *G. officinalis* doživjela je u liječenju epilepsije, vrućice, žeđi i poliurije (13). Kemijske analize *G. officinalis* učinjene sredinom 1800-ih godina, pronašle su da je biljka bogata gvanidinom za koji je 1918. godine otkriveno da snižava razinu glukoze u krvi životinja. Tijekom 1920-ih otkriveno je da neki monogvanidinski derivati (osobito galegin) kao i digvanidini (sintalin) također učinkovito snižavaju razinu glukoze u krvi životinja što je vodilo njihovoj uporabi u liječenju šećerne bolesti. Tijekom vremena su se pokazali toksičnima te su se zbog toga, kao i zbog rastuće uporabe inzulina, prestali koristiti.

Metformin zajedno s fenforminom i buforminom pripada skupini bigvanida, dobivenih povezivanjem dvije molekule gvanidina. Dvadesetih godina prošlog stoljeća Werner i Bell daju prvi znanstveni opis metformina (dimetilbigvanid), a Slota i Tschesche otkrivaju njegov antiglikemijski učinak (na zecu) (14).

Unatoč tome, pravi potencijal ovih tvari ostao je neprepoznat u to doba, zbog izrazito visokih doza koje su bile potrebne da bi se ostvario skromni hipoglikemijski učinak u nedijabetičkih životinja te su oni zaboravljeni tijekom narednih desetljeća. Osoba zaslužna za otkrivanje stvarnog potencijala metformina je Jean Sterne, vizionar koji je 1957. godine hipoglikemijski potencijal metformina preveo u terapijski. Provođeci istraživanja u bolnici u Parizu na ispitanicima s juvenilnom i odraslom prezentacijom šećerne bolesti, zaključio je da bi metformin mogao zamijeniti terapiju inzulinom u pacijenata s prezentacijom bolesti u odrasloj dobi. Pacijenti sa juvenilnim oblikom šećerne bolesti bi u sklopu terapije metforminom trebali manju dozu inzulina, ali ga ne bi mogli apsolutno izostaviti (15).

1.3.2. Bigvanidi

Uslijedilo je otkriće fenformina 1957. i buformina 1958. godine (16). Tada provedene studije na pacijentima s prezentacijom šećerne bolesti u odrasloj dobi pokazale su veći hipoglikemijski učinak fenformina u odnosu na druge bigvanide te je lijek stekao globalnu popularnost kao alternativa derivatima sulfonilureje, osobito u SAD-u gdje metformin ni buformin nisu bili u uporabi (17).

Najvažnija nuspojava vezana uz uporabu bigvanida je laktična acidoza te ujedno i razlog zašto je fenformin 1978. godine povučen sa tržišta u SAD-u (18). Istovremeno, učestalost laktične acidoze pri uporabi metformina pokazala se znatno manjom i uglavnom se pripisivala uporabi lijeka u pacijenata koji su bili kontraindicirani zbog kronično oštećene bubrežne funkcije ili akutnog bubrežnog zatajenja (19). Međutim, sama povezanost metformina sa skupinom bigvanida razlog je zašto je Američka agencija za hranu i lijekove dugo oklijevala dok lijek konačno nije odobrila za uporabu 1994. godine. Godinu dana kasnije u New England Journal of medicine objavljena je nova studija koja je potrdila njegovu učinkovitost u pacijenata sa šećernom bolesti neovisnom o inzulinu (20). Ta dva događaja označila su prekretnicu u uporabi metformina. Kako je povjerenje liječničke struke raslo, lijek se sve više propisivao a sintetizirane su i formule sa smanjenim gastrointestinalnim nuspojavama te također fiksne kombinacije sa drugim peroralnim hipoglikemicima u kojima je koncentracija metformina stalna a koncentracija druge aktivne supstance prilagođena s ciljem smanjenja rizika od hipoglikemije (21,22). Sa stajališta terapije šećerne bolesti tipa 2 najznačajnijom se pokazala UKPDS studija (Prospektivna studija šećerne bolesti Ujedinjenog kraljevstva) provedena 1970-ih koja je redefinirala temelje terapijske strategije ovog poremećaja. Studija je pokazala da uz sniženje razine glukoze u krvi uz nizak rizik od hipoglikemije, normalizaciju tjelesne težine, dugotrajna terapija metforminom smanjuje kardiovaskularni rizik i poboljšava preživljenje (23). Tako je metformin postao najpropisivaniji peroralni hipoglikemik širom svijeta i trenutno se nalazi na listi ključnih lijekova Svjetske zdravstvene organizacije (24).

1.3.3. Druge terapijske indikacije

Unatoč tome što je kliničku afirmaciju doživio prvenstveno kroz terapiju tipa 2 šećerne bolesti, mnoge su studije pokazale da bi metformin mogao biti koristan u liječenju ili prevenciji nekih drugih stanja. Tako je pokazano da njegova uporaba u pacijenata sa šećernom bolesti tipa 1 poboljšala glikemijsku kontrolu i smanjila potrebnu dozu inzulina (25). Neke su studije pokazale da je lijek u stanju usporiti progresiju preddijabetesa (IGT/IFG) u šećernu bolest tipa 2 a nekima je dokazana korist i u liječenju gestacijskog dijabetesa (26,27). Pokazao se korisnim u liječenju i poboljšanju prognoze niza drugih stanja kojima je svojstvena inzulinska rezistencija kao što su: sindrom policističnih jajnika, lipodistrofija vezana uz HIV, *acanthosis nigricans* pa čak i nekih neurodegenerativni poremećaji tipa demencije (28-31). Dapače, neke su studije pretpostavile i moguću ulogu u smanjenju rizika od karcinoma, osobito crijeva gdje je izloženost lijeku velika (32).

1.3.4. Farmakokinetika, farmakodinamika i pretpostavljeni način djelovanja

Metformin (1,1-dimetilbigvanid) je relativno planarna hidrofilna molekula. Oralne doze od 500 do 1000 mg brzo se apsorbiraju u tankom crijevu postižući maksimalnu koncentraciju u plazmi od oko 2 µg/ml, približno 2,5h nakon administracije sa stabilnim rasponom koncentracije od 0,3–1,5 µg/ml. Vrijeme poluživota iznosi 1,5 do 6,5 sati. Lijek se ne metabolizira već se izlučuje urinom u nepromijenjenom obliku i to 20% filtracijom a 80% sekrecijom (33).

Tri su pretpostavljena načina djelovanja metformina (34):

1. Inhibicijom glukoneogeneze i glikogenolize smanjuje proizvodnju glukoze u jetri;
2. Povećanjem inzulinske osjetljivosti poboljšava periferni unos i iskoristivost glukoze u mišićima;
3. Odgađanje apsorpcije glukoze u tankom crijevu.

Unatoč tome što je generalni učinak metformina u šećernoj bolesti poznat, točan molekularni mehanizam njegovog djelovanja nije u potpunosti poznat i aktualna je tema brojnih rasprava. Poboljšanje osjetljivosti na inzulin pripisuje se pozitivnom učinku metformina na ekspresiju inzulinskih receptora i tirozin kinaznu aktivnosti (35). Što se tiče njegovog učinka u jetri, predloženo je nekoliko mehanizama kojima se objašnjava inhibicijski učinak metformina na glukoneogenezu u jetri uključujući promjene u enzimskoj aktivnosti kao i smanjeni ulazak supstrata glukoneogeneze u jetru (36,37).

Razlog zašto metformin svoje hipoglikemičke učinke ostvaruje mahom preko jetre nalazi se u činjenici da upravo hepatociti predominantno eksprimiraju organski kationski transporter 1 (OCT1) koji olakšava stanični ulazak metformina. Posljedično, koncentracija metformina u jetri značajno je viša nego u drugim tkivima te doseže stotine $\mu\text{mol/l}$ periportalno (38,39).

Poznato je da administracija metformina rezultira fosforilacijom i aktivacijom AMP-om aktivirane protein kinaze (AMPK) u jetri što vodi različitim farmakološkim učincima, uključujući inhibiciju sinteze glukoze i lipida (40). Međutim, AMPK nije direktno mjesto djelovanja metformina (41). U zadnje vrijeme, neka istraživanja govore o mogućem utjecaju metformina na mitohondrijsku funkciju, konkretno o interferenciji sa nekim komponentama respiracijskog lanca (42).

1.4. Mitohondrij

Mitohondrij je stanična organela eukariotskih stanica. Mitohondriji su prisutni u svim dijelovima citoplazme ali njihov ukupni broj u jednoj stanici varira od manje od stotinu do nekoliko tisuća, ovisno o količini energije koja je potrebna stanici (43).

1.4.1. Građa mitohondrija

Mitohondriji se veoma razlikuju veličinom i oblikom. Neki su kuglasti i promjera samo nekoliko stotina nanometara, a drugi su duguljasti, široki otprilike $1\mu\text{m}$ a dugi do $7\mu\text{m}$. Sastoje se od dvije membrane gređene od fosfolipidnog dvosloja i bjelančevina: vanjske membrane i unutrašnje membrane. Unutrašnja membrana formira nabore koje nazivamo kristama te omeđuje prostor ispunjen matriksom (Slika 2).

1.4.1.1. Vanjska membrana

Vanjska membrana mitohondrija građena je od fosfolipida i proteina u približnom omjeru 1:1, slično kao stanična membrana. Sadržava veliki broj integralnih membranskih proteina zvanih porini. Glavni protein preko kojeg se odvija transport kroz vanjsku membranu je voltažni anionski kanal. On je primarni transporter nukleotida, metabolita i iona iz citosola u međumembranski prostor. Vanjska membrana također sadržava enzime uključene u različite aktivnosti kao što su produljenje masnih kiselina, oksidacija epinefrina, degradacija triptofana. Održanje integriteta vanjske membrane važno je iz razloga što je njena disrupcija povezana sa oslobađanjem proteina međumembranskog prostora u citosol i sigurnom staničnom smrti (44).

1.4.1.2. Međumembranski prostor

Međumembranski prostor je prostor između vanjske i unutrašnje membrane mitohondrija. Naziva se još i perimitohondrijskim prostorom. S obzirom na relativnu permeabilnost vanjske membrane za male molekule, koncentracija iona i glukoze jednaka je u međumembranskom prostoru kao i u citosolu (44).

1.4.1.3. Unutrašnja membrana

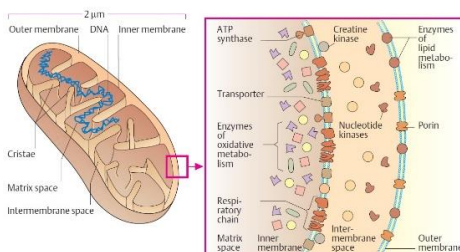
Unutrašnja membrana mitohondrija također je građena od proteina i fosfolipida, u nešto većem težinskom omjeru, približno 3:1. Za razliku od vanjske membrane, ne sadržava porine i prilično je nepropusna za sve molekule. Gotovo sve molekule zahtijevaju poseban nosač, translokazu unutrašnje membrane, za prolazak u ili iz matriksa. Fosfolipid kardiolipin je, uz enzime respiracijskog lanca, ATP-sintazu i različite membranske prenositelje, sastavni dio unutrašnje membrane mitohondrija (44).

1.4.1.4. Kriste

Unutrašnja membrana formira nabore ili kriste koji višestruko povećavaju njezinu površinu, a samim time i kapacitet proizvodnje energijski bogatog fosfata ATP-a. Posljedično je u nekim stanicama površina unutarnje membrane mitohondrija peterostruko veća od površine vanjske membrane. Broj krista varira i veći je u stanicama sa većim energetskeim zahtjevima, kao što su primjerice mišićne stanice (44).

1.4.1.5. Matriks

Matriks mitohondrija prostor je koji omeđuje unutrašnja membrana. Procjenjuje se da sadržava dvije trećine mitohondrijskih proteina. Mjesto je proizvodnje ATP-a. Sadržava enzime odgovorne za oksidaciju piruvata i masnih kiselina te enzime ciklusa limunske kiseline. Također u matriksu nalazimo tRNA i nekoliko kopija mitohondrijske DNA (44).



Slika 2. Građa mitohondrija

(preuzeto s: <https://alevelbiology.co.uk/notes/mitochondria-structure-and-functions/>)

1.4.2. Funkcija mitohondrija

Najvažnije funkcije mitohondrija su proizvodnja stanične energetske valute ATP-a u procesu oksidativne fosforilacije te regulacija staničnog metabolizma (45). Produkcija ATP-a u mitohondriju proces je koji se odvija u aerobnim uvjetima, oksidacijom produkata glikolize nastalih u citosolu: piruvata i NADH. Supstrati za proizvodnju ATP-a potječu i od masnih kiselina koje se prethodno metaboliziraju u procesu β -oksidacije te od aminokiselina.

Mitohondriji također igraju ulogu i u nekim drugim metaboličkim procesima kao što su (43):

1. Produkcija reaktivnih kisikovih spojeva;

Mitohondriji su između ostalog važno mjesto nastanka kisikovih radikala, izrazito reaktivnih kisikovih spojeva kojima se osim uloge u međustaničnoj signalizaciji pripisuju i štetni učinci u patofiziologiji mnogih bolesti.

2. Apoptoza;

Apoptoza ili programirana stanična smrt energetski je ovisan, koordiniran proces izrazito bitan za normalni rast i obnovu organizma. Upravo su mitohondriji ključni u tom procesu jer sadržavaju efekte apoptoze.

3. Sinteza porfirina;

Poznato je da se prvih nekoliko reakcija sinteze biološki najvažnijeg porfirina – hema iz hemoglobina, zbiva u mitohondriju.

4. Sinteza steroida;

Svi steroidni hormoni sisavaca nastaju od kolesterola preko pregnenolona u nizu reakcija koje se zbivaju u mitohondrijima stanice koja ih proizvodi. Ključnu ulogu ima citokromni enzim kidanja bočnog lanca P450 smješten u unutarnjoj mitohondrijskoj membrani.

5. Hormonska signalizacija.

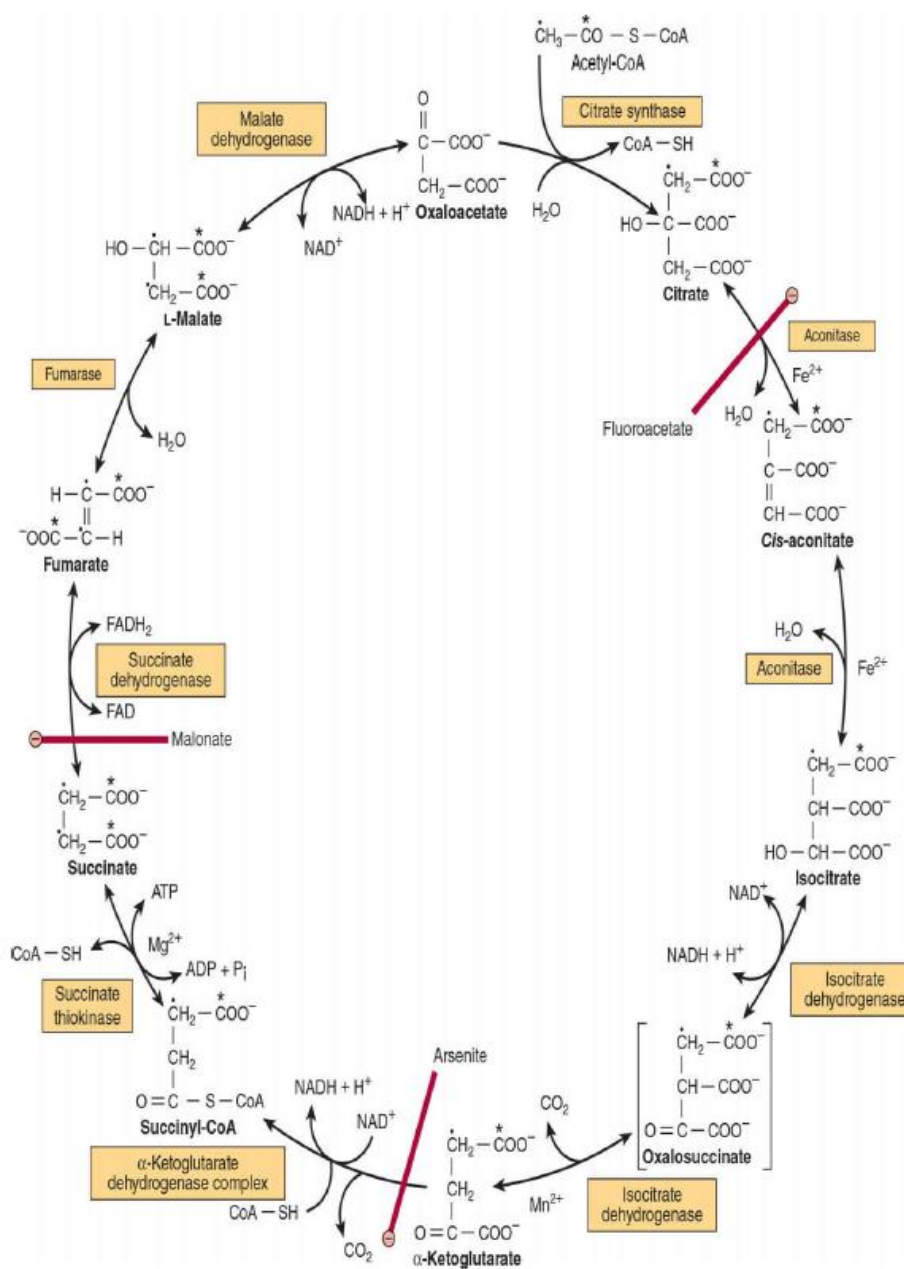
Sami mitohondriji posjeduju neke steroidne receptore te tako sudjeluju u unutarstaničnoj signalizaciji posredovanoj primjerice estrogenima.

1.4.2.1. β -oksidacija masnih kiselina

Beta-oksidacija je metabolički proces kojim se masne kiseline, prethodno modificirane u obliku acil-CoA, postepeno razgrađuju do konačnog produkta, acetil-CoA. S obzirom da dugolančani acil-CoA ne može proći kroz unutarnju mitohondrijsku membranu, ključnu ulogu ima karnitin-palmitoil-transferza I, enzim prisutan u vanjskoj membrani mitohondrija koji pretvara acil-CoA u acilkarnitin, koji je sposoban proći kroz unutarnju mitohondrijsku membranu i pristupiti enzimima sustava β -oksidacije. Unutar mitohondrija, svaki se ciklus β -oksidacije sastoji od niza četiriju reakcija u kojima se razgradnjom acil-CoA oslobađa jedna molekula acetil-CoA koja svoj daljnji metabolički put nastavlja u Krebsovom ciklusu (46).

1.4.2.2. Ciklus limunske kiseline

Ciklus limunske kiseline (Krebsov ciklus, ciklus trikarbonskih kiselina) niz je enzimskih reakcija u kojima se oksidira acetilni ostatak iz acetil-CoA i reduciraju koenzimi koji se ponovo oksidiraju u respiracijskom lancu, što je spregnuto sa proizvodnjom ATP-a (Slika 3). Predstavlja konačni i zajednički put oksidacije ugljikohidrata, proteina i masti zbog toga što se glukoza, masne kiseline i većina aminokiselina metaboliziraju do acetil-CoA ili nekog od intermedijera ciklusa. Enzimi ciklusa limunske kiseline slobodno plutaju u matriksu ili su vezani za unutrašnju membranu mitohondrija. Ciklus započinje reakcijom između acetil-CoA i oksaloacetata, pri čemu nastaje citrat. Citrat se zatim izomerizira u izocitrat uz pomoć enzima akonitaza. Izocitrat zatim ulazi u reakciju dehidrogenacije koju katalizira izocitrat – dehidrogenaza, pri čemu nastaje oksalosukcinat koji se potom dekarboksilira do α -ketoglutarata. α -ketoglutarat ulazi u reakciju oksidacijske dekarboksilacije pri čemu nastaje sukcinil-CoA koji se potom pretvara u sukcinat. Sukcinat u daljnim reakcijama preko fumarata i malata služi kao izvor za obnovu oksaloacetata. Kao rezultat oksidacije koje kataliziraju dehidrogenaze ciklusa limunske kiseline, iz svake molekule acetil-CoA koja se katabolizira u jednom krugu ciklusa, nastaju tri molekule NADH i jedna FADH₂. Ti reducirani koenzimi prelaze u respiracijski lanac, gdje reoksidacijom svakog NADH nastaje ~2,5 ATP, a iz FADH₂ ~1,5 ATP. U reakciji koju katalizira sukcinat tiokinaza, fosforilacijom na razini supstrata, stvara se 1 ATP (47).



Slika 3. Ciklus limunske kiseline

(izvor: Bender DA, Mayes PA. The Citric Acid Cycle: The Central Pathway of Carbohydrate, Lipid and Amino Acid Metabolism. U: Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PJ. Harper's Illustrated Biochemistry, 31. izd. New York: McGraw-Hill; 2018. str. 387.)

1.4.3. Mitohondrij kao energijska centrala stanice

Aerobni organizmi crpe slobodnu energiju pohranjenu u supstratima respiracijskog lanca kroz proces koji se zbiva u unutrašnjosti mitohondrija i to je razlog zašto je upravo toj staničnoj organeli dodijeljen naziv „elektrana stanice“.

1.4.3.1. Respiracijski lanac

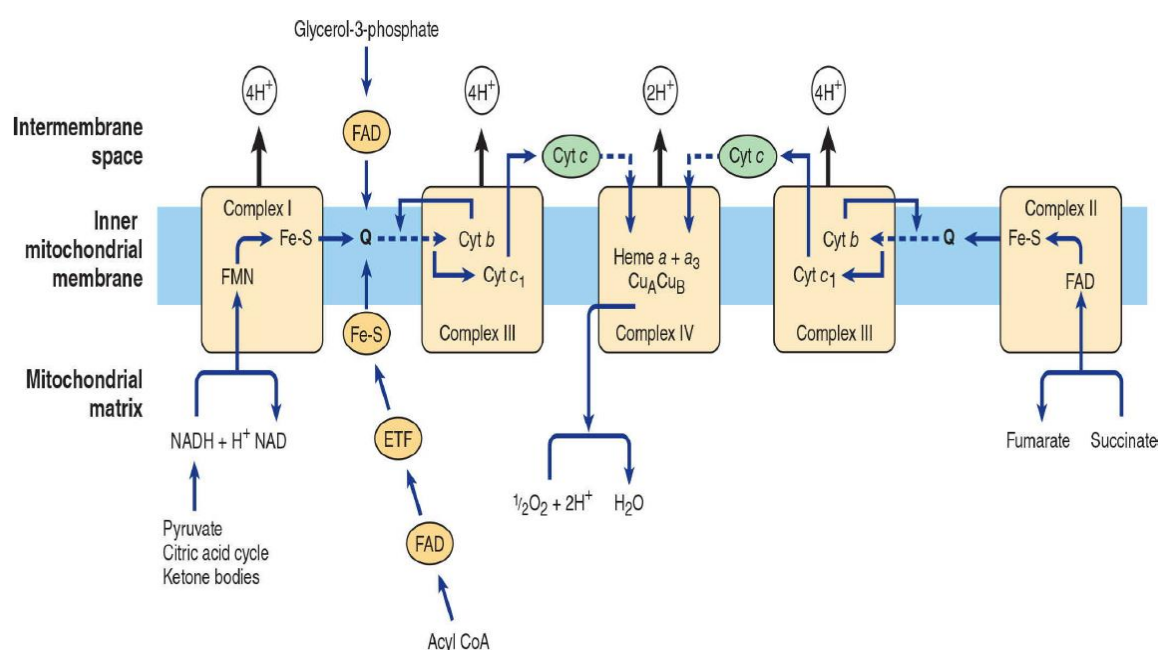
Respiracijski lanac podrazumijeva niz oksidacijsko – redukcijskih enzimskih reakcija kojima se oksidiraju ekvivalenti redukcije a pri tom nastali protonski gradijent iskorištava se u procesu oksidacijske fosforilacije za sintezu energetski bogatog fosfata – ATP. Komponente respiracijskog lanca četiri su proteinska kompleksa smještena u unutrašnjoj membrani mitohondrija: kompleks I (NADH-Q-oksidoireduktaza) prenosi elektrone sa NADH na koenzim Q ili ubikinon; kompleks III (Q-citokrom *c*-oksidoireduktaza) prenosi elektrone na citokrom *c* te kompleks IV (citokrom *c*-oksidaaza) koji kao posljednja komponenta lanca prenosi elektrone na kisik reducirajući ga u vodu. Neki supstrati prenose elektrone na koenzim Q preko kompleksa II (sukcinat-Q-reduktaze). Koenzim Q i citokrom *c* pokretni su nositelji elektrona. Tijek elektrona preko kompleksa I, III i IV omogućuje crpljenje protona kroz unutrašnju membranu mitohondrija u međumembranski prostor (Slika 4).

NADH-Q-oksidoireduktaza ili kompleks I veliki je protein, oblika slova L, izgrađen od više podjedinica. Katalizira prijenos elektrona s NADH i koenzima Q uz istodobni prijenos četiri protona kroz unutrašnju membranu mitohondrija. U kompleksu II, elektroni se sa FADH_2 , nastalog oksidacijom sukcinata u fumarat u ciklusu limunske kiseline prenose preko nekoliko Fe-S centara na koenzim Q. Kompleks III prenosi elektrone sa koenzima Q na citokrom *c* također uz prenošenje četiri protona u međumembranski prostor. Kompleks IV oksidira citokrom *c* uz istodobnu redukciju kisika do vode te prenosi dva protona u međumembranski prostor (45).

1.4.3.2. Oksidacijska fosforilacija

Prijenos elektrona respiracijskim lancem utječe na stvaranje ATP-a procesom oksidacijske fosforilacije. Spregnutost ta dva procesa opisao je još 1961. godine Peter Mitchell kroz kemiosmotsku teoriju, pretpostavljajući da protonska motorna sila koja je nastala zbog razlike u elektrokemijskom potencijalu (negativan na stranu matriksa) upravlja mehanizmom sinteze ATP-a. Kompleksi I, III i IV djeluju kao protonske crpke a s obzirom da je unutrašnja membrana mitohondrija samo djelomično propusna za protone, dolazi do njihove akumulacije u međumembranskom prostoru i stvaranja protonskog gradijenta (45).

Protonski gradijent upravlja ATP-sintazom koja u prisutnosti P i ADP stvara ATP. ATP sintaza enzim je ugrađen u unutrašnju membranu mitohondrija. Podjedinice ATP-sintaze formiraju okruglastu strukturu F1, koja se proteže u matriks i posjeduje fosforilacijski mehanizam. F1 je nastavak proteinskog kompleksa F0 koji se sastoji od nekoliko podjedinica koje u unutrašnjoj membrani formiraju protonski kanal. Prolazak protona kroz F0 dovodi do njegove rotacije što mijenja konformaciju β -podjedinice F1 i utječe na čvrstoću vezanja i otpuštanja ATP-a (45).



Slika 4. Mitohondrijski respiracijski lanac

(izvor: Botham KM, Mayes PA. The Respiratory Chain & Oxidative Phosphorylation. U: Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PJ. Harper's Illustrated Biochemistry, 31. izd. New York: McGraw-Hill; 2018. str. 315.)

1.5. Bioenergetika srca

S obzirom na vitalnu potrebu za repetitivnim kontrakcijama, energetske potrebe srčanog mišića su ogromne. Samim time, srce kao izrazito metabolički aktivno tkivo, jako je bogato mitohondrijima. Razmjer te metaboličke aktivnosti najbolje odražava činjenica da je to tkivo u organizmu čovjeka s najvećom potrošnjom kisika po jedinici mase. Srčani mišić je u stanju koristiti različite supstrate za proizvodnju energije uključujući ugljikohidrate, lipide, aminokiseline i ketonska tijela. U zdravom srcu, u normalnim uvjetima, glavno mitohondrijsko gorivo je acetil-CoA dobiven iz masnih kiselina te piruvat dobiven glikolizom. Doprinos aminokiselina i ketonskih tijela u oksidativnom metabolizmu kardiomiocita je generalno malen, s obzirom da nisku dostupnost tih supstrata u fiziološkim uvjetima (48).

1.5.1. Oštećenje srca u šećernoj bolesti

Srčani je mišić jedno od ključnih mjesta oštećenja u tipu 2 šećerne bolesti i to ne samo u sklopu makrovaskularnih komplikacija (prvenstveno koronarne bolesti), već neke studije govore u prilog tome da sama hiperglikemija uz hiperlipidemiju i inzulinsku rezistenciju strukturno oštećuje kardiomiocyte i smanjuje njihovu sposobnost oporavka pri reperfuziji. Riječ je o dijabetičkoj kardiomiopatiji, promjeni u srčanoj strukturi i funkciji koja se ne može pripisati koronarnoj arterijskoj bolesti ni hipertenziji (49).

U razvoju i progresiji dijabetičke kardiomiopatije, pretpostavlja se da mitohondriji igraju značajnu ulogu, i to kao oštećena struktura, ali i izvor određenih patoloških procesa. Tako su nedavne studije na životinjskim modelima šećerne bolesti pokazale značajno smanjeni stupanj sprege između potrošnje kisika i proizvodnje ATP-a (engl. *uncoupling*) u srčanim mitohondrijima (50), što može dovesti do energetske insuficijencije i kontraktilne disfunkcije miokarda. Navedene promjene mitohondrijskih funkcionalnih parametara, pogotovo u kombinaciji s drugim unutarstaničnim poremećajima koji su posljedica šećerne bolesti, poput poremećene funkcije sarkoplazmatske mrežice (51), mogu dovesti i do promjena u regulaciji ionske ravnoteže u stanici. Primjer su poremećaji u mitohondrijskoj regulaciji iona kalcija, što može dovesti do daljnjeg negativnog utjecaja na proizvodnju ATP-a, ali i poremetiti normalnu dinamiku sistoličko-dijastoličkih oscilacija tog iona u čitavom kardiomiocitu te posljedično izazvati sistoličku i dijastoličku disfunkciju (52). Ako se opisanim poremećajima pridruže i poremećaji mitohondrijske proteomike, također zabilježeni u dijabetičkim modelima (tipa 1 i tipa 2), jasno je da dijabetes dovodi do značajnih patoloških promjena srčane bioenergetike. Srčani mitohondriji su također i potencijalni izvor patoloških procesa u miokardu. Naime, u

njima se stvaraju i slobodni kisikovi spojevi (engl. *reactive oxygen species* - ROS), čija je proizvodnja u dijabetesu vjerojatno povećana (53). S obzirom da je riječ o visokoreaktivnim spojevima koji izazivaju oštećenje raznih unutarstaničnih struktura, u dijabetesu mitohondriji, osim kao ciljna organela oštećenja, vjerojatno postaju i medijator patofizioloških procesa, što dovodi do njihove daljnje propagacije.

Opisane promjene mitohondrijske funkcije, ali i promjene zabilježene na razini čitavog organa, poput hipertrofije lijevog ventrikula ili intersticijske fibroze su neke od komponenti patofiziološkog procesa koji pogađa dijabetesom zahvaćeno srce (54). S obzirom da je dijabetička kardiomiopatija detektirana kao nezavisni čimbenik rizika za razvoj srčanog zatajenja, pretpostavlja se da bi terapija ciljano usmjerena na gore navedene procese mogla prevenirati nepovoljan ishod u pacijenata oboljelih od šećerne bolesti (54).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

2.1. Cilj istraživanja

Glavni cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj metformina na mitohondrijski respiracijski lanac u srčanom mišiću.

2.2. Hipoteze istraživanja

1. Metformin djelomično blokira kompleks I mitohondrijskog respiracijskog lanca *in vitro*.
2. Metformin nema utjecaja na komplekse II, III i IV respiracijskog lanca mitohondrija *in vitro*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ustroj istraživanja

U svrhu ispitivanja utjecaja metformina na srčanu mitohondrijsku respiraciju, proveden je kontrolirani pokus na 10 štakora soja engl. *Sprague Dawley* uzgojenih u nastambi Medicinskog fakulteta u Splitu.

Ispitivanje utjecaja lijeka izvršeno je *in vitro* na homogenatu dobivenom mljevenjem komadića tkiva lijevog ventrikula štakorskog srca.

Testirane su dvije koncentracije metformina: 30 $\mu\text{mol/l}$ i 500 $\mu\text{mol/l}$. Koncentracija od 30 $\mu\text{mol/l}$ predstavlja maksimalnu koncentraciju koja se postiže u plazmi pacijenata liječenih metforminom pri standardnom režimu doziranja lijeka, dok koncentracija od 500 $\mu\text{mol/l}$ predstavlja najnižu koncentraciju koja je u pilot eksperimentima pokazala izraženu inhibiciju mitohondrijske respiracije (38).

Objekte testirane su na 5 štakora pri čemu je svaka životinja bila sama sebi kontrola.

Ispitivanje mitohondrijske respiracije rađeno je pomoću O2k-FluoRespirometra (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austrija).

3.2. Eksperimentalne životinje

Za potrebe rada žrtvovano je ukupno 10 štakora soja engl. *Sprague Dawley*, dobi između 1 i 2 mjeseca. Korištene su životinje oba spola, 5 muških i 5 ženskih. Masa životinja varirala je između 150 i 350 grama, sukladno dobi. Štakori su uzgojeni u nastambi Medicinskog fakulteta u Splitu.

Svaka je životinja, neposredno prije eksperimenta, anestetizirana te joj je operativno izvađeno kucajuće srce. Za uvod u anesteziju korišten je inhalacijski anestetik sevofluran, a prolongirana anestezija postignuta je intraperitonealnom injekcijom 10%-tnog ketaminola i 2%-tnog ksilapana u omjeru 2:1. Doza obaju anestetika prilagođena je masi pojedine životinje.

Svi postupci obavljeni na eksperimentalnim životinjama odobreni su od strane nadležnog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Splitu.

3.3. Priprema tkiva za in vitro procjenu respiracije

Nakon potvrde odsutnosti bolnog refleksa (pritiskom na šapicu) štakoru je otvoren prsni koš, izvađeno kucajuće srce i prebačeno u hladnu PBS otopinu (engl. *Phosphate buffered saline* sadrži: NaCl 137 mmol/l, KCl 2,7 mmol/l, fosfatni pufer 10 mmol/l). Nakon kratkotrajnog ispiranja u PBS-u (1 minutu) škaricama je izdvojen komadić lijevog ventrikula štakora i odmah prebačen u kardioplegičnu otopinu BIOPS (sadrži: CaK₂EGTA 2,77 mmol/l, K₂EGTA 7,23 mmol/l, Na₂ATP 5,77 mmol/l, Na₂fosfokreatin 15 mmol/l, MgCl₂ * 6H₂O 6,56 mmol/l, K-MES 50 mmol/l, taurin 20 mmol/l, imidazol 20 mmol/l, DTT 0,5 mmol/l). U toj je otopini, pod kontrolom lupe, izvršena dodatna obrada uzorka: uklonjen perikard i po potrebi uzorak smanjen na željenu veličinu (3-6 mg).

Sve otopine korištene u eksperimentu, za cijelo vrijeme eksperimenta, držane su u posudama uronjenim u led. I tubica i uređaj za mljevenje su sve do trenutka mljevenja držani u zamrzivaču kako bi cijelo vrijeme održali nisku temperaturu tkiva.

Nakon vaganja, uzorak je kratkotrajno ispran u respiracijskom puferu MiR05 (engl. *Mitochondrial respiration medium 05* sastava: EGTA 0,5 mmol/l, MgCl₂ * 6H₂O 3 mmol/l, KH₂PO₄ 10 mmol/l, laktobionat 60 mmol/l, D-sukroza 110 mmol/l, taurin 20 mmol/l, HEPES 20 mmol/l, BSA 1g/l), a potom je prebačen u tubicu za mljevenje ispunjenu s 350 ml istog pufera. Mljevenje je izvršeno korištenjem uređaja PBI-Shredder SG3 (engl. *Pressure BioSciences, Inc.*), a dobiveni homogenat je prebačen u eksperimentalnu tubicu volumena 50 ml, ohlađenu na ledu. Manji dio tkiva koji mljevenjem nije homogeniziran je potom izvagan te je određena konačna masa tkiva koja će se koristiti za eksperiment.

3.4. Mjerenje mitohondrijske respiracije

Nakon homogeniziranja, uzorak je ravnomjerno raspodijeljen u dvije metaboličke komorice O2k-FluoRespirometrijskog uređaja. Prije početka eksperimentalnog protokola, uzorak je ostavljen nekoliko minuta u otvorenoj metaboličkoj komorici kako bi se prilagodio postavljenoj eksperimentalnoj temperaturi (30 °C). Potom je započeto je s dodavanjem metaboličkih supstrata i inhibitora potrebnih za ispitivanje mitohondrijske respiracije, prema dolje opisanom protokolu. Za vrijeme čitavog eksperimenta, koncentracija kisika se održavala u rasponu od 200 do 230 µmol/l. U tom rasponu koncentracija, dostupnost kisika je daleko iznad koncentracije koja bi bila ograničavajući čimbenik respiracije (55).

3.5. Eksperimentalni protokol

S ciljem ispitivanja utjecaja metformina na srčanu mitohondrijsku respiraciju, za svaki su eksperiment snimanja izvršena u dvije metaboličke komorice pri čemu je jedna komorica bila intervencijska (dodan metformin), a druga kontrolna (dodan jednak volumen deionizirane vode). S iznimkom metformina, u obje je komorice redoslijed dodavanja supstrata i inhibitora bio isti.

Svi supstrati korišteni u eksperimentu su dodavani u saturacijskim koncentracijama. Također, inhibitori respiracije (rotenon i antimicin A) su korišteni u koncentracijama koje dokazano ostvaruju potpunu blokadu pripadajućih enzimatskih kompleksa.

Svakog eksperimentalnog dana, otopine piruvata i metformina (Metformin hidroklorid; Sigma-Aldrich) su svježe pripremljene, dok su ostali supstrati i inhibitori korišteni iz prethodno pripremljenih otopina pohranjenih na -20 °C.

Intenzitet mitohondrijske respiracije je izračunat iz dinamike pada razine kisika u metaboličkoj komorici i izražen je kao $\text{pmolO}_2/\text{s/mg}$ tkivne mase.

Protokol je dizajniran na način da omogući procjenu mitohondrijske respiracije putem enzimatskog kompleksa I i kompleksa II kao i utjecaj metformina na iste.

Dodatkom supstrata kompleksa I mitohondrijskog respiracijskog lanca, piruvata (5 mmol/l) i malata (2 mmol/l) te nakon toga ADP-a (adenozin difosfat, 2,5 mmol/l) u komore, izmjerena je bazalna respiracija te su sve ostale naknadno izmjerene razine respiracije izražene kao postotak bazalne (relativna respiracija).

3.5.1. Procjena mitohondrijske respiracije putem enzimatskog kompleksa I

Nakon određivanja bazalne respiracije, u eksperimentalnu je komoricu dodana ispitivana koncentracija metformina (30 ili 500 $\mu\text{mol/l}$), a u kontrolnu komoricu jednak volumen deionizirane vode. Od trenutka dodavanja metformina, respiracija je mjerena u obje komorice u 5., 30., 60., 90. i 120. minuti te je za svaku izmjerenu minutu izražena kao postotak bazalne respiracije pripadajuće komorice.

3.5.2. Procjena mitohondrijske respiracije putem enzimatskog kompleksa II

Nakon dvosatnog snimanja respiracije koja se odvijala putem kompleksa I, u komorice su dodani inhibitor kompleksa I, rotenon ($1\ \mu\text{mol/l}$) i supstrat kompleksa II mitohondrijskog respiracijskog lanca, sukcinat ($10\ \text{mmol/l}$) čime je blokiran utok elektrona u respiracijski lanac preko kompleksa I, a pokrenut preko kompleksa II. Izmjerena respiracija u obje komorice izražena je kao postotak bazalne respiracije pripadajuće komorice.

Eksperiment je završen dodatkom inhibitora kompleksa III, antimicina A ($2,5\ \mu\text{mol/l}$), čime je potpuno blokiran tok elektrona po respiracijskom lancu.

3.6. Statistička obrada

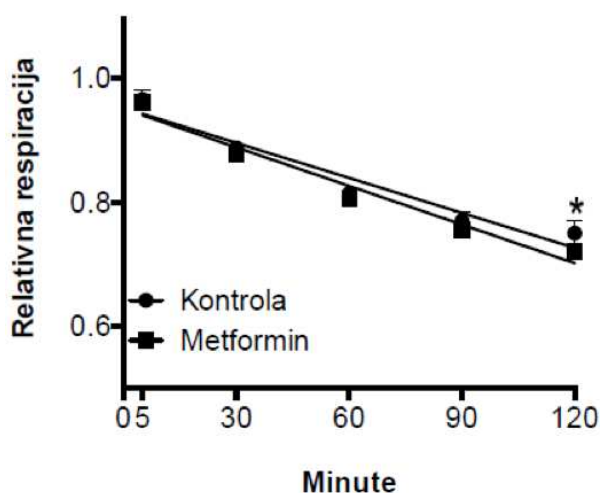
Usporedba razine mitohondrijske respiracije u istim vremenskim točkama između komorice s dodanim metforminom i kontrolne komorice je napravljena korištenjem dvosmjernе ANOVE s Bonferronijevim post-hoc testom. Isti je statistički test korišten za usporedbu razine mitohondrijske respiracije između pojedinih vremenskih točaka unutar iste eksperimentalne skupine.

Pravac dinamike pada mitohondrijske respiracije u svakoj eksperimentalnoj komorici je dobiven linearnom regresijom te je napravljena usporedba između kontrolnog mjerenja i mjerenja u prisutnosti metformina za svaki eksperiment.

Statistička analiza napravljena je korištenjem programa GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, SAD). Svi podaci izraženi su kao aritmetička sredina $\pm$ standardna pogreška. Za svaki statistički test, $P < 0.05$ je smatran značajnom razlikom.

4. REZULTATI

Na Slici 5A. prikazani su rezultati usporedbe srčane mitohondrijske respiracije putem kompleksa I u prisutnosti metformina u koncentraciji od 30 $\mu\text{mol/l}$ s kontrolnim mjerenjem (napravljenim bez prisutnosti metformina). Prikazana je respiracija u petoj, tridesetoj, šezdesetoj, devedesetoj i sto dvadesetoj minuti nakon primjene metformina, odnosno vremenske kontrole. Kao što je vidljivo na slici, primjena metformina nije značajno utjecala na mitohondrijsku potrošnju kisika (respiraciju), osim u 120 minuti. Dva sata nakon početka primjene metformina u klinički korištenoj koncentraciji, respiracija je u prisutnosti metformina iznosila 72 ± 2 % bazalne, dok je u kontrolnoj skupini iznosila 75 ± 4 % od bazalne, što čini statistički značajnu razliku od 3 %.

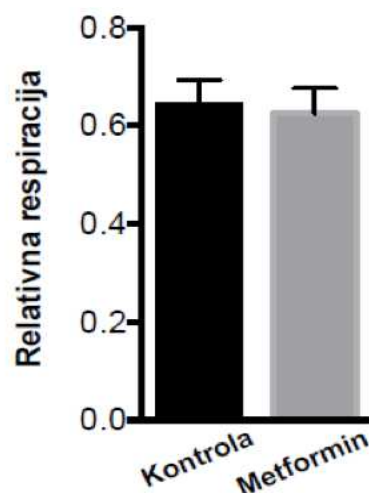


Slika 5A. Metformin 30 $\mu\text{mol/l}$ – odnos relativne respiracije i proteklog vremena

Podaci su izraženi kao aritmetička sredina $\pm$ standardna pogreška

* dvosmjerna ANOVA s Bonferronijevim post-hoc testom, $P < 0.05$

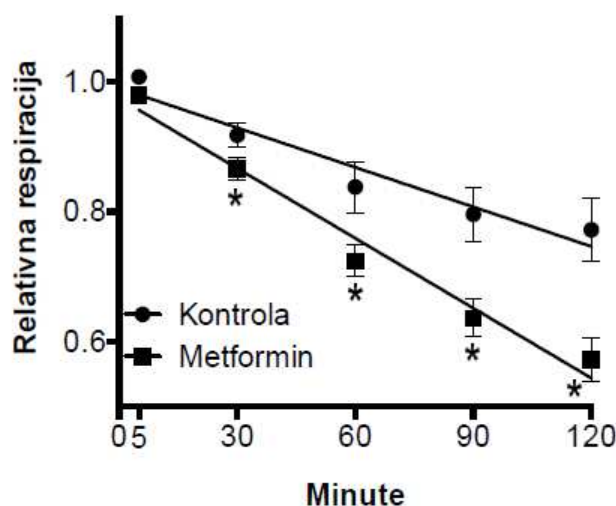
Utjecaj metformina na respiraciju u prisutnosti sukcinata je grafički prikazan na Slici 5B. Kako je vidljivo na slici, respiracija potaknuta supstratom kompleksa II mitohondrijskog respiracijskog lanca nije bila značajno različita u slučaju prisutnosti 30 $\mu\text{mol/l}$ metformina u sustavu (respiracija 64 ± 10 % od bazalne za kontrolu nasuprot 63 ± 10 % za metformin 30).



Slika 5B. Metformin 30 $\mu\text{mol/l}$ – utjecaj na respiraciju potaknutu sukcinatom

Podaci su izraženi kao aritmetička sredina $\pm$ standardna pogreška

Rezultati istraživanja utjecaja metformina u koncentraciji od 500 $\mu\text{mol/l}$ na srčanu mitohondrijsku respiraciju *in vitro* su prikazani na Slici 6A. Na Slici 6A je vidljivo da 5 minuta nakon početka primjene metformina u navedenoj koncentraciji, mitohondrijska respiracija potaknuta supstratima kompleksa I (piruvat i malat) nije značajno promijenjena prisutnošću metformina *in vitro* (101 ± 2 % od bazalne respiracije za kontrolu, 98 ± 2 % za metformin). Međutim, mjerenje u 30. minuti od početka primjene metformina 500 ukazuje da je respiracija mjerena u komorici u koju je dodan ovaj bigvanidin značajno niža od respiracije u kontrolnom sustavu (92 ± 4 % od bazalne respiracije za kontrolu, 87 ± 4 % za metformin). Respiracija je niža i u 60. minuti (84 ± 9 % od bazalne respiracije za kontrolu, 72 ± 6 % za metformin), 90. minuti (80 ± 9 % od bazalne respiracije za kontrolu, 64 ± 7 % za metformin), kao i u 120. minuti, kada u prisutnosti metformina 500 mitohondrijska respiracija iznosi 74 % kontrolne respiracije.



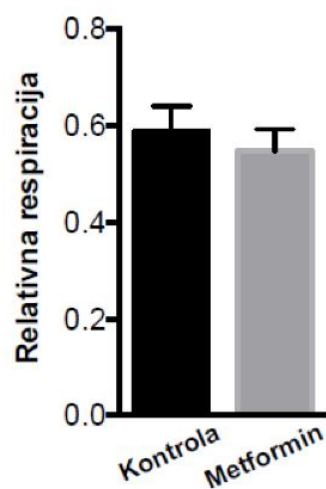
Slika 6A. Metformin 500 $\mu\text{mol/l}$ – odnos relativne respiracije i proteklog vremena

Podaci su izraženi kao aritmetička sredina $\pm$ standardna pogreška

* dvosmjerna ANOVA s Bonferronijevim post-hoc testom,
 $P < 0.05$

Dodatnom analizom podataka o utjecaju metformina 500 na mitohondrijsku respiraciju potaknutu supstratima kompleksa I, vidljivo je da se smanjenje respiracije u prisutnosti metformina povećava s vremenom. U mjerenom razdoblju od 120 minuta, respiracija u prisutnosti metformina je iznosila 95% kontrolne u 30. minuti, 86% kontrolne u 60., 80% kontrolne u 90. i 74% u 120. minuti, što je statistički značajno smanjenje respiracije u svakoj mjerenoj vremenskoj točki u odnosu na kontrolni eksperiment.

Unatoč nađenoj razlici mitohondrijske respiracije potaknute supstratima kompleksa I između kontrolne skupine i skupine s metforminom 500, navedena koncentracija metformina nije imala utjecaj na respiraciju potaknutu supstratom kompleksa II, sukcinatom (Slika 6B.).



Slika 6B. Metformin 500 $\mu\text{mol/l}$ – utjecaj na respiraciju potaknutu sukcinatom

Podaci su izraženi kao aritmetička sredina $\pm$ standardna pogreška

5. RASPRAVA

Ovaj diplomski rad je pokazao da primjena metformina u koncentraciji od 500 $\mu\text{mol/l}$ pokazuje vremenski rastući blokirajući učinak na kompleks I mitohondrijskog respiracijskog lanca u *in vitro* uvjetima, dok istovremeno nema utjecaja na komplekse II, III, IV. Istovremeno, primjena metformina u koncentraciji od 30 $\mu\text{mol/l}$ nije značajno utjecala na mitohondrijsku potrošnju kisika.

Metformin primijenjen peroralno u obliku tableta od 500 mg ili 850 mg postiže plazmatske koncentracije u rasponu od 0,129 do 90 mg/l (56). Samim time, upotreba ovog bigvanida u koncentraciji od 30 $\mu\text{mol/l}$ reprezentativni je primjerak kojim smo u *in vitro* uvjetima pokušali reproducirati uvjete u tijelu čovjeka. Iz rezultata je vidljivo da metformin u ovoj koncentraciji nije značajnije utjecao na mitohondrijsku respiraciju potaknutu supstratima kompleksa I niti u jednoj od mjerenih vremenskih točaka, s iznimkom 120 minute. U 120. minuti respiracija u komori s metforminom iznosila je 72 ± 2 % bazalne, dok je u kontrolnoj komori bila 75 ± 4 % bazalne. Unatoč pokazanoj statistički značajnoj razlici, pitanje je nosi li tako mala razlika ujedno i kliničku značajnost? S obzirom da je 120. minuta bila zadnja vremenska točka mjerenja u našem eksperimentu, ne može se isključiti mogućnost da bi u slučaju produženja eksperimenta došlo i do daljnjeg pada respiracije pod utjecajem metformina. To postaje potencijalno važno ako se uzme u obzir metabolizam samog lijeka u *in vivo* uvjetima. Poznato je da je poluvijek života metformina 1,5-6,5 h te da se lijek ne metabolizira, već izlučuje prvenstveno putem bubrega u nepromijenjenom obliku. Stoga se s priličnom sigurnošću može isključiti postojanje nekog metabolita kojem bi mogli pripisati navedene učinke, ali istovremeno otvara pitanje eventualne akumulacije lijeka u tijelu čovjeka, točnije u mitohondrijima, osobito pacijenata na kroničnoj terapiji (57).

U prilog tome govore rezultati testiranja metformina u koncentraciji od 500 $\mu\text{mol/l}$. S obzirom da koncentracija od 30 $\mu\text{mol/l}$ nije pokazala učinak koji bi se mogao smatrati klinički značajnim, testirana je i ova mnogostruko veća koncentracija. Inhibicijski učinak na respiraciju potaknutu piruvatom i malatom sa statistički značajnom razlikom u svakoj mjerenoj vremenskoj točki sa iznimkom 5. minute ukazuje na postojanje inhibicijskog utjecaja metformina na mitohondrijsku respiraciju, makar u koncentraciji 15 puta većoj od plazmatske. Također, učinak koji ostvaruje metformin 500 pokazuje i vremensku progresiju, točnije inhibicija respiracije je veća u svakoj idućoj vremenskoj točki nego u prethodnoj. Unatoč tome što rutinskim mjerenjem koncentracije metformina u plazmi ne očekujemo susresti vrijednosti od 500 $\mu\text{mol/l}$, činjenica da ona ostvaruje navedene rezultate i to nakon određenog vremenskog odmaka ostavlja mogućnost da takav učinak postoji i kod pacijenata na terapiji metforminom

u slučaju njegove postupne akumulacije u mitohondrijima. Pri neutralnim vrijednostima pH, metformin je molekula sa suviškom pozitivnog naboja, pa je njegov unos u stanicu ovisan o kationskim transporterima. Moguće je da je mitohondrijski membranski potencijal, koji normalno iznosi oko -180 mV (višak negativnog naboja u unutrašnjosti mitohondrija), odgovoran za akumulaciju pozitivno nabijenog metformina u mitohondriju, što predlažu i još neke studije (42,58). Ta teza, kao i razmjerno kratak inkubacijski period u našim *in vitro* uvjetima, bi mogao objasniti zašto u ovom istraživanju koncentracija metformina od 30 $\mu\text{mol/l}$ nije pokazala inhibicijski učinak.

Istovremeno, metformin primjenjen niti u jednoj koncentraciji nije u prisustvu supstrata kompleksa II (sukcinata) pokazao inhibicijski učinak na mitohondrijsku respiraciju. Ona je pri koncentraciji lijeka od 30 $\mu\text{mol/l}$ iznosila $63 \pm 10\%$ od bazalne u odnosu na $64 \pm 10\%$ bazalne respiracije, koliko je iznosila u kontrolnoj skupini. Također, pri primjeni metformina u koncentraciji od 500 $\mu\text{mol/l}$ respiracija je iznosila $55 \pm 9\%$ bazalne u odnosu na $59 \pm 11\%$ koliko je detektirana u kontrolnoj skupini. Obzirom da je respiracija posredovana kompleksom II (u prisutnosti sukcinata kao supstrata) snimana u istom protokolu nakon ispitivanja utjecaja metformina na respiraciju potaknutu piruvatom i malatom, tkivo je prije dodatka sukcinata već bilo izloženo djelovanju metformina u trajanju od barem 120 min. Također, respiracija potaknuta sukcinatom se, osim putem kompleksa II respiracijskog lanca, odvija i putem kompleksa III i IV, pa izostanak utjecaja metformina na respiraciju ukazuje da lijek nema utjecaja niti na jedan od ta tri enzimatska kompleksa. Time se zaključuje da je smanjenje respiracije koja je potaknuta piruvatom i malatom posljedica najvjerojatnije utjecaja metformina na kompleks I respiracijskog lanca.

Iako sami molekularni mehanizmi interakcije metformina i mitohondrijskog kompleksa I nisu u potpunosti razjašnjeni, smatra se da je interakcija metformina s mitohondrijskim ionskim kanalima ključna za ostvarenje njegovih metaboličkih učinaka. U istraživanju provedenom od strane Halestrapa i suradnika, mitohondrijska oksidacija glutamata i malata je bila značajno smanjena pri koncentraciji metformina od 100 $\mu\text{mol/l}$, ali i pri onoj od 50 $\mu\text{mol/l}$, koja je puno bliža kliničkim koncentracijama u plazmi pacijenata. Inkubacijski periodi su bili puno duži u odnosu na ovdje primjenjene i iznosili su 24 h i 60 h. U navedenom istraživanju metformin je učinak ostvario i na stanicama hepatoma jetre, izoliranim mitohondrijima i fragmentiranim mitohondrijskim česticama (eng. Small mitochondrial particles – SMP), pri čemu su za ostvarenje istog učinka na SMP-ovima bile potrebne značajno više koncentracije i dulji vremenski period (42).

Unatoč tome što je ovaj diplomski rad uz brojna druga provedena istraživanja pokazao da metformin doista inhibira mitohondrijsku respiraciju, ostaje pitanje je li upravo to mehanizam kojim on ostvaruje svoj antidijabetički učinak?

Antihyperglikemijski učinak metformina prvenstveno je posljedica inhibicije glukoneogeneze u jetri te u manjoj mjeri, pojačanog inzulinom posredovanog unosa glukoze u skeletni mišić. Njegov učinak u gastrointestinalnom traktu razmjerno je malen, prvenstveno kroz blagu odgodu procesa apsorpcije. Polarnost molekule metformina odgovorna je za njegova farmakokinetička svojstva, točnije čini ga ovisnim o membranskim transporterima za stanični unos i sekreciju. Upravo je jetreno tkivo koje eksprimira velike razine prijenosnika SLC22A1, glavno mjesto djelovanja metformina. Također u portalnoj cirkulaciji su detektirane više razine metformina nego u ostatku organizma što bi govorilo u prilog njenoj akumulaciji u jetri (59). Tu metformin utječe na unos glukoze, glukoneogenezu, glikolizu i sintezu glikogena. Što se inzulinske osjetljivosti u jetri tiče, dokazano je da metformin povećava aktivnost inzulinskih receptora te pojačava stanični unos glukoze potičući translokaciju prijenosnika za glukozu (kao što je GLUT 1) u staničnu membranu (60). Veliki dio učinka ostvaruje i kroz suprostavljanje glukoneogenom učinku glukagona.

U skeletnom mišiću metformin pojačava tirozin kinaznu aktivnost inzulinskih receptora te ekspresiju prijenosnika glukoze, GLUT 4 (61). Dokazano je i da metformin interferira s osi inkretin – gušterača. Stimulirajući ekspresiju GLP-1 receptora i povišujući koncentraciju GLP-1, povećava sekreciju inzulina uz istovremeno smanjenje sekrecije glukagona. Iako u in vitro uvjetima nije pokazao inhibicijski učinak na enzimsku aktivnost DDP-4, u pacijenata na terapiji metforminom detektirane su snižene razine ovog enzima (62).

Nekim drugim studijama također je pokazano da bi mjesto djelovanja metformina u stanici mogao biti i mitohondrij, gdje metformin djelomično i prolazno interferira s respiracijskim lancem smanjujući na taj način energetske naboj stanice (definiran kao $\frac{[ATP]+0.5[ADP]}{[ATP]+[ADP]+[AMP]}$). Posljedični pad razine ATP-a i porast razine AMP-a vodi prema inhibiciji glukagonom posredovane sinteze cAMP-a i aktivaciji AMPK. 5-AMP aktivirana protein kinaza stanični je energetski senzor i koordinator koji aktivira metaboličke putove sinteze ATP-a (63).

Inhibicija kompleksa I, kakva je detektirana u našim eksperimentima, iako tek korištenjem visoke koncentracije metformina (500 $\mu\text{mol/l}$), za posljedicu ima smanjenu oksidaciju NADH, što smanjujući protonski gradijent preko mitohondrijske membrane vodi ka smanjenoj sintezi ATP-a, čime je energetska ravnoteža stanice pomaknuta prema sintezi AMP-a. Povećane razine AMP-a inhibiraju adenilat ciklazu, enzim odgovoran za konverziju AMP-a u cAMP, što za posljedicu ima smanjenje razine tog drugog glasnika. Pretpostavlja se da postoji povezanost između smanjene sinteze cAMP-a, glukagonske signalizacije i antidijabetičkog učinka metformina (57).

Istraživanja pokazuju da je u pacijenata s tipom dva šećerne bolesti povećana plazmatska koncentracija glukagona. Taj hormon neto učinak povišenja glukoze u krvi ostvaruje kroz stimulaciju glukoneogeneze i glikogenolize u jetri uz istovremenu supresiju glikogeneze i glikolize. Na molekularnoj razini, glukagon svoj učinak ostvaruje dominantno preko adenilat ciklaze. Produkt tog enzima, cAMP aktivira zatim protein kinazu A (PKA) koja zatim fosforilacijom nekih nizvodih ciljnih molekula ostvaruje prethodno navedene učinke. Prethodno provedena istraživanja govore u prilog tome da metformin svoj hipoglikemijski učinak ostvaruje prvenstveno suprostavljajući se glukagonom posredovanoj signalizaciji. Metformin inhibira utjecaj glukagona na razini cAMP-a, što onemogućava adekvatnu aktivaciju PKA. Povećana razina AMP-a zbog metforminom posredovane blokade kompleksa I bi mogla biti odgovorna za taj učinak (57).

Neki drugi učinci metformina također bi se mogli objasniti djelomičnom blokadom respiracijskog lanca. Poznato je da inhibicija respiracijskog lanca u mnogim stanicama pojačava ekspresiju prijenosnika glukoze i aktivnost glikolitičkih enzima. Također blokada respiracijskog lanca odgovorna je i za smanjeno korištenje laktata u procesu glukoneogeneze te bi mogla biti podloga najopasnije nuspojave vezane uz primjenu metformina – laktične acidoze. Radi se o razmjerno rijetkoj nuspojavi s obzirom da je inhibicijski učinak metformina samoograničavajuć (42). Rastuća inhibicija respiracijskog lanca koja se događa s vremenom bi istovremeno mogla dovesti do pada u membranskom potencijalu mitohondrija, što bi preveniralo daljnju akumulaciju lijeka.

Unatoč tome što je većina istraživanja provedena na tkivu jetre, metaboličkom središtu organizma i primarnom mjestu djelovanja metformina, u ovom je istraživanju pokazano da metformin isti molekularni učinak ostvaruje i srčanom tkivu štakora, što bi dodatno govorilo u prilog inhibiciji respiracijskog lanca kao pretpostavljenom mehanizmu djelovanja. Također, poznato je da je šećerna bolest jedan od najznačajnijih rizičnih faktora za razne srčane bolesti, a metformin istovremeno ima dokazane kardioprotektivne učinke neovisne o zadiranju u samu patogenezu bolesti. U eksperimentalnim studijama metformin je tako pokazao pozitivno djelovanje na metabolizam, strukturu i funkciju kardiomiocita prvenstveno kroz smanjenje oksidativnog stresa i upalnog odgovora uz istovremeno poboljšanje endotelne funkcije (64). Dio tih učinaka se može pripisati inhibiciji respiracijskog lanca, no povlači za sobom pitanje kakve posljedice može imati značajno smanjena sinteza ATP-a u tako metabolički aktivnom tkivu kao što je srčano? Također, koliko zapravo traje inhibicijski učinak metformina na mitohondrijsku potrošnju kisika i je li njegova samoograničenost posljedica isključivo promjene mitohondrijskog membranskog potencijala ili su za njega odgovorni za sada još uvijek nepoznati molekularni mehanizmi? Daljnja istraživanja će, nadamo se, pružiti odgovore i na ova pitanja.

Kao i većina temeljnih biomedicinskih istraživanja, i studija provedena u sklopu ovog diplomskog rada ima određene limitacije. Jedna od njih je, svakako, korištenje životinjskog srčanog tkiva u svrhu ispitivanja utjecaja metformina na mitohondrijsku respiraciju. Štakorsko srce, iako se od ljudskog razlikuje po nekim funkcionalnim parametrima, poput više frekvencije i ejekcijske frakcije, se ipak smatra vjerodostojnim modelom za proučavanje raznih fizioloških i patofizioloških procesa, koji su često vrlo slični u ljudskom miokardu. Uz to, ovaj se diplomski rad može smatrati i određenom prvom fazom ispitivanja utjecaja metformina u ovakvim eksperimentalnim uvjetima na mitohondrijsku funkciju. U daljem tijeku istraživanja, planira se detaljnije ispitati dinamika tog utjecaja i to u uzorcima ljudskog miokarda.

Dodatnu limitaciju istraživanja predstavlja proučavanje utjecaja metformina na respiracijski lanac samo jednom eksperimentalnom tehnikom, mjerenjem mitohondrijske potrošnje kisika u metaboličkoj komori. Uistinu, nakon ovih, početnih pokusa, koji su pokazali moguća mjesta interakcije metformina i respiratornog lanca, planiramo ispitati utjecaj lijeka na enzimatsku aktivnost pojedinih izoliranih kompleksa metodom spektrofotometrije.

Na kraju, kako su pokazali prikupljeni rezultati, metformin u koncentraciji od 30 $\mu\text{mol/l}$ nema utjecaja na kompleks I respiracijskog lanca, osim potencijalno u 120. minuti, kada je zabilježena mala, ali statistički značajna razlika u odnosu na kontrolni eksperiment bez lijeka. Obzirom da su mjerenja s višom koncentracijom metformina pokazala kako se njegov utjecaj povećava s vremenom izlaganja tkiva, postoji mogućnost da bi u duljem pokusu ova razlika postala još veća. Razlog prekida pokusa nakon 120 minute je postupno propadanje tkiva koje se održava u *in vitro* uvjetima te stoga postupno propada. Uбудućе, planiramo produžiti vremensko trajanje eksperimenta, ali uz istodobno smanjenje eksperimentalne temperature (npr. na 22 °C), kako bi se omogućila duža vijabilnost izoliranih uzoraka miokarda.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata dobivenih istraživanjem možemo zaključiti sljedeće:

1. Metformin primjenjen *in vitro* u koncentraciji od 30 $\mu\text{mol/l}$ ne ostvaruje značajni inhibicijski učinak na mitohondrijsku respiraciju u miokardu štakora.
2. Metformin primjenjen *in vitro* u koncentraciji od 500 $\mu\text{mol/l}$ pokazuje inhibicijski učinak isključivo na mitohondrijsku respiraciju koja se odvija preko kompleksa I dok istovremeno nema utjecaja na respiraciju posredovanu kompleksima II, III i IV.
3. Učinak koji ostvaruje metformin primjenjen u koncentraciji od 500 $\mu\text{mol/l}$ pokazuje vremensku progresiju kroz testirano vrijeme od 120 minuta.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Powers AC. Diabetes Mellitus: Diagnosis, Classification and Pathophysiology. U: Kasper DL, Fauci AS, Huser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J. Harrison's principles of internal medicine, 19. izd. New York: McGraw-Hill; 2015. str. 2399-420.
2. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. 2014;37:81-90.
3. Kahn CR. Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. Diabetes. 1994;43:1066-84.
4. Global burden of diabetes [Internet]. Brussels: International Diabetes federation. Diabetic atlas fifth edition; 2011. [citirano 1. ožujka 2019]. Dostupno na: <http://www.idf.org/diabetesatlas>.
5. Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, Di Angelantonio E i sur. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. Lancet. 2010;375:2215-22.
6. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. Diabetes Care. 2019;42:13-28.
7. Buijsse B, Simmons RK, Griffin SJ, Schulze MB. Risk assessment tools for identifying individuals at risk of developing type 2 diabetes. Epidemiol Rev. 2011;33:46-62.
8. Brunetti L, Kalabalik J. Management of type-2 diabetes mellitus in adults: focus on individualizing non-insulin therapies. P t. 2012;37:687-96.
9. American Diabetes Association. 8. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. Diabetes Care. 2018;4:73-85.
10. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. N Engl J Med. 2008;359:1577-89.
11. Maruthur NM, Tseng E, Hutfless S, Wilson LM, Suarez-Cuervo C, Berger Z i sur. Diabetes Medications as Monotherapy or Metformin-Based Combination Therapy for Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. Ann Intern Med. 2016;164:740-51.
12. Bailey CJ, Day C. Metformin: its botanical background. Pract Diabetes Int. 2004;21:115–7.

13. Hadden DR. Goat's rue - French lilac - Italian fitch - Spanish sainfoin: gallega officinalis and metformin: the Edinburgh connection. *J R Coll Physicians Edinb.* 2005;35:258-60.
14. Werner EA, Bell J. CCXIV.—The preparation of methylguanidine, and of $\beta\beta$ -dimethylguanidine by the interaction of dicyanodiamide, and methylammonium and dimethylammonium chlorides respectively. *J Chem Soc.* 1922;121:1790-4.
15. Bailey CJ. Metformin: historical overview. *Diabetologia.* 2017;60:1566-76.
16. Ungar G, Freedman L, Shapiro SL. Pharmacological studies of a new oral hypoglycemic drug. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1957;95:190-2.
17. McKendry JB, Kuwayti K, Rado PP. Clinical experience with DBI (phenformin) in the management of diabetes. *Can Med Assoc J.* 1959;80:773-8.
18. Luft D, Schmülling RM, Eggstein M. Lactic acidosis in biguanide-treated diabetics. *Diabetologia.* 1978;14:75-87.
19. Lalau JD. Lactic acidosis induced by metformin: incidence, management and prevention. *Drug Saf.* 2010;33:727-40.
20. DeFronzo RA, Goodman AM. Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Multicenter Metformin Study Group. *N Engl J Med.* 1995;333:541-9.
21. Davidson J, Howlett H. New prolonged-release metformin improves gastrointestinal tolerability. *Br J Diabetes Vasc Dis.* 2004;4:273–7.
22. Bailey CJ, Day C. Fixed-dose single tablet antidiabetic combinations. *Diabetes Obes Metab.* 2009;11:527-33.
23. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet.* 1998;352:854-65.
24. WHO model list of essential medicines [Internet]. Ženeva: World Health Organization; 2017. [citirano 1. ožujka 2019]. Dostupno na: <https://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>.

25. Vella S, Buetow L, Royle P, Livingstone S, Colhoun HM, Petrie JR. The use of metformin in type 1 diabetes: a systematic review of efficacy. *Diabetologia*. 2010;53:809-20.
26. Hostalek U, Gwilt M, Hildemann S. Therapeutic Use of Metformin in Prediabetes and Diabetes Prevention. *Drugs*. 2015;75:1071-94.
27. Rowan JA, Hague WM, Gao W, Battin MR, Moore MP. Metformin versus insulin for the treatment of gestational diabetes. *N Engl J Med*. 2008;358:2003-15.
28. Nestler JE. Metformin for the treatment of the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*. 2008;358:47-54.
29. Hadigan C, Corcoran C, Basgoz N, Davis B, Sax P, Grinspoon S. Metformin in the Treatment of HIV Lipodystrophy Syndrome: A Randomized Controlled Trial. *JAMA*. 2000;284:472-7.
30. Tankova T, Koev D, Dakovska L, Kirilov G. Therapeutic approach in insulin resistance with acanthosis nigricans. *Int J Clin Pract*. 2002;56:578-81.
31. Moreira PI. Metformin in the diabetic brain: friend or foe? *Ann Transl Med*. 2014;2:54.
32. Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ*. 2005;330:1304-5.
33. Scheen AJ. Clinical Pharmacokinetics of Metformin. *Clin Pharmacokinet*. 1996;30:359-71.
34. Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V i sur. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2000;49:2063-9.
35. Gunton JE, Delhanty PJ, Takahashi SI, Baxter RC. Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:1323-32.
36. Argaud D, Roth H, Wiernsperger N, Leverve XM. Metformin decreases gluconeogenesis by enhancing the pyruvate kinase flux in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem*. 1993;213:1341-8.

37. Radziuk J, Zhang Z, Wiernsperger N, Pye S. Effects of metformin on lactate uptake and gluconeogenesis in the perfused rat liver. *Diabetes*. 1997;46:1406-13.
38. Wilcock C, Bailey CJ. Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. *Xenobiotica*. 1994;24:49-57.
39. Shu Y, Sheardown SA, Brown C, Owen RP, Zhang S, Castro RA i sur. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J Clin Invest*. 2007;117:1422-31.
40. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J i sur. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 2001;108:1167-74.
41. Hardie DG. Neither LKB1 nor AMPK are the direct targets of metformin. *Gastroenterology*. 2006;131:973-5.
42. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J*. 2000;348:607-14.
43. Osellame LD, Blacker TS, Duchen MR. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2012;26:711-23.
44. Picard M, Taivassalo T, Gouspillou G, Hepple RT. Mitochondria: isolation, structure and function. *J Physiol*. 2011;589:4413-21.
45. Botham KM, Mayes PA. The Respiratory Chain & Oxidative Phosphorylation. U: Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PJ. *Harper's Illustrated Biochemistry*, 31. izd. New York: McGraw-Hill; 2018. str. 310-20.
46. Kathleen M, Botham KM, Mayes PA. Oxidation of Fatty Acids: Ketogenesis. U: Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PJ. *Harper's Illustrated Biochemistry*, 31. izd. New York: McGraw-Hill; 2018. str. 514-20.
47. Bender DA, Mayes PA. The Citric Acid Cycle: The Central Pathway of Carbohydrate, Lipid and Amino Acid Metabolism. U: Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PJ. *Harper's Illustrated Biochemistry*, 31. izd. New York: McGraw-Hill; 2018. str. 385-90.

48. Kolwicz SC, Purohit S, Tian R. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ Res*. 2013;113:603-16.
49. Ansley DM, Wang B. Oxidative stress and myocardial injury in the diabetic heart. *J Pathol*. 2013;229:232-41.
50. Boudina S, Sena S, Theobald H, Sheng X, Wright JJ, Hu XX i sur. Mitochondrial energetics in the heart in obesity-related diabetes: direct evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins. *Diabetes*. 2007;56:2457-66.
51. Belke DD, Swanson EA, Dillmann WH. Decreased sarcoplasmic reticulum activity and contractility in diabetic db/db mouse heart. *Diabetes*. 2004;53:3201-8.
52. Fauconnier J, Lanner JT, Zhang SJ, Tavi P, Bruton JD, Katz A i sur. Insulin and inositol 1,4,5-trisphosphate trigger abnormal cytosolic Ca²⁺ transients and reveal mitochondrial Ca²⁺ handling defects in cardiomyocytes of ob/ob mice. *Diabetes*. 2005;54:2375-81.
53. Volpe CMO, Villar-Delfino PH, Dos Anjos PMF, Nogueira-Machado JA. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. *Cell Death Dis*. 2018;9:119.
54. Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. *Rev Endocr Metab Disord*. 2010;11:31-9.
55. Gnaiger E, Steinlechner-Maran R, Méndez G, Eberl T, Margreiter R. Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *J Bioenerg Biomembr*. 1995;27:583-96.
56. Kajbaf F, De Broe ME, Lalau JD. Therapeutic Concentrations of Metformin: A Systematic Review. *Clin Pharmacokinet*. 2016;55:439-59.
57. Pernicova I, Korbonits M. Metformin-mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10:143-56.
58. Fontaine E. Metformin-Induced Mitochondrial Complex I Inhibition: Facts, Uncertainties, and Consequences. *Front Endocrinol*. 2018;9:753.

59. Nies AT, Koepsell H, Damme K, Schwab M. Organic cation transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy. *Handb Exp Pharmacol*. 2011;105-67.
60. Gunton JE, Delhanty PJ, Takahashi S, Baxter RC. Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:1323-32.
61. Fischer Y, Thomas J, Rosen P, Kammermeier H. Action of metformin on glucose transport and glucose transporter GLUT1 and GLUT4 in heart muscle cells from healthy and diabetic rats. *Endocrinology*. 1995;136:412-20.
62. Lindsay JR, Duffy NA, McKillop AM, Ardill J, O'Harte FP, Flatt PR i sur. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV activity by oral metformin in Type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2005;22:654-7.
63. Miller RA, Birnbaum MJ. An energetic tale of AMPK-independent effects of metformin. *J Clin Invest*. 2010;120:2267-70.
64. Nesti L, Natali A. Metformin effects on the heart and the cardiovascular system: A review of experimental and clinical data. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2017;27:657-69.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: ispitati utjecaj metformina na mitohondrijski respiracijski lanac u srčanom mišiću štakora.

Materijali i metode: Proveden je kontrolirani pokus na 10 štakora soja engl. *Sprague Dawley* uzgojenih u nastambi Medicinskog fakulteta u Splitu. Ispitivanje utjecaja lijeka izvršeno je *in vitro* na homogenatu dobivenom mljevenjem komadića tkiva lijevog ventrikula štakorskog srca. Ispitivanje mitohondrijske respiracije je izvršeno pomoću elektrode osjetljive na kisik. Mitohondrijska respiracija je poticana korištenjem dviju vrsta metaboličkih supstrata. Dodatkom piruvata i malata u metaboličku komoricu *in vitro*, zabilježena je mitohondrijska respiracija koja se odvija posredstvom enzimatskog kompleksa I respiracijskog lanca. Korištenje sukcinata (u prisutnosti rotenona) omogućilo je snimanje respiracije koja se odvija putem kompleksa II. Testiran je utjecaj dviju koncentracija metformina, i to koncentracije od 30 $\mu\text{mol/l}$, koja se obično postiže primjenom terapijskih doza lijeka u plazmi bolesnika te koncentracije od 500 $\mu\text{mol/l}$.

Rezultati: Primjena metformina u koncentraciji od 30 $\mu\text{mol/l}$ nije značajno utjecala na mitohondrijsku potrošnju kisika (respiraciju) osim u 120. minuti kada je iznosila 72 ± 2 % bazalne. Pet minuta nakon početka primjene metformina u koncentraciji od 500 $\mu\text{mol/l}$, mitohondrijska respiracija nije značajno promijenjena prisutnošću metformina *in vitro* (101 ± 2 % od bazalne respiracije za kontrolu, 98 ± 2 % za metformin). Međutim, od 30. do 120. minute detektiran je statistički značajan pad u mitohondrijskoj potrošnji kisika sa 87 ± 4 % za metformin (u odnosu na 92 ± 4 % od bazalne respiracije za kontrolu) u 30. minuti na 57 ± 7 % bazalne za metformin (u odnosu na 77 ± 11 % od bazalne respiracije za kontrolu) u 120. minuti.

Metformin primjenjen ni u jednoj koncentraciji nije u prisustvu supstrata kompleksa II (sukcinata) pokazao značajan inhibicijski učinak na mitohondrijsku respiraciju. Ona je pri koncentraciji lijeka od 30 $\mu\text{mol/l}$ iznosila 63 ± 10 % od bazalne u odnosu na 64 ± 10 % bazalne respiracije koliko je iznosila u kontrolnoj skupini. Također pri primjeni metformina u koncentraciji od 500 $\mu\text{mol/l}$ respiracija je iznosila 55 ± 9 % bazalne u odnosu na 59 ± 11 % koliko je detektirana u kontrolnoj skupini.

Zaključci: Metformin primjenjen *in vitro* u koncentraciji od 30 $\mu\text{mol/l}$ ne ostvaruje značajni inhibicijski učinak na mitohondrijsku respiraciju. Metformin primjenjen *in vitro* u koncentraciji od 500 $\mu\text{mol/l}$ pokazuje o vremenu ovisan, progredirajući inhibicijski učinak isključivo na respiraciju posredovanu kompleksom I.

9. SUMMARY

Diploma thesis title: The effect of metformin on mitochondrial respiration in the heart.

Objectives: To examine the effect of metformin on mitochondrial respiratory chain in rat myocardium.

Materials and methods: A controlled experiment on 10 rats of Sprague Dawley strain was conducted. The rats were raised in a controlled environment at the animal facility of the University of Split School of Medicine. The effect of metformin was examined *in vitro* using rat left ventricular homogenate. Oxygen sensitive electrode was used to examine mitochondrial respiration which was stimulated by using two different metabolic substrates. By adding pyruvate and malate, respiration mediated by the complex I of the respiratory chain has been recorded. Addition of succinate (in the presence of rotenone) enabled measurement of respiration involving complex II of the respiratory chain. Two different concentrations of metformin were tested. Concentration of 30 $\mu\text{mol/l}$ is usually detected in plasma of patients taking metformin in their therapy. The other tested metofrmin concentration was 500 $\mu\text{mol/l}$.

Results: Metformin applied in the concentration of 30 $\mu\text{mol/l}$ did not significantly affect mitochondrial oxygen consumption except after 120 minutes of application when measured respiration was 72 ± 2 % of basal. With 500 $\mu\text{mol/l}$ metformin, 5 minutes after applying the drug no significant effect on mitochondrial respiration *in vitro* was detected. However, from 30. to 120. minute, a statistically significant decrease in mitochondrial oxygen consumption was observed. From initial 87 ± 4 % of basal respiration at 30. minute, in the presence of metformin the respiration has fallen to 57 ± 7 % of basal in 120. minute (compared with respiration in control chamber which was 92 ± 4 % at 30. minute and 77 ± 11 % at 120. minute).

Neither of the used metformin concentrations exhibited any inhibitory effect on mitochondrial respiration in the presence of complex II substrate. After applying the drug in the concentration of 30 $\mu\text{mol/l}$ the detected respiration was 63 ± 10 % of basal compared with 64 ± 10 % of basal measured in control chamber. Also, after applying metformin in the concentration of 500 $\mu\text{mol/l}$, the measured respiration was 55 ± 9 % of basal compared with 59 ± 11 % which was detected in the control chamber.

Conclusions: Metformin applied *in vitro* in the concentration of 30 $\mu\text{mol/l}$ does not exhibit an inhibitory effect on mitochondrial respiration. Metformin applied *in vitro* in the concentration of 500 $\mu\text{mol/l}$ demonstrates a time dependent, progressive inhibitory effect on mitochondrial respiration which is mediated trough complex I of the respiratory chain.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNJE INFORMACIJE

Ime i prezime: Darija Tudor

Državljanstvo: hrvatsko

Datum i mjesto rođenja: 4. studenog 1994. godine, Split

Telefon: +385 99 314 6274

Elektronička pošta: darija_tudor@hotmail.com

OBRAZOVANJE

2001.-2009. Osnovna škola „Spinut“, Split

2009.-2013. Prirodoslovno – matematička gimnazija, Split

2013.-2019. Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu

MATERINSKI JEZIK

Hrvatski jezik

OSTALI JEZICI

Engleski jezik (aktivno)

NAGRADE

Dobitnica Rektorove nagrade Sveučilišta u Splitu za izvrsnost za akademsku godinu 2015./2016.

Dobitnica Dekanove nagrade za izvrstan uspjeh za akademsku godinu 2013./2014.

Dobitnica stipendije grada Splita u periodu 2013.-2019.

AKTIVNOSTI

Demonstratorica na Katedri za anatomiju – 2014./2015.

Sudjelovanje na Glyco 23 – internacionalnom simpoziju o glikokonjugatima u Splitu, 2015. godine.

Sudjelovanje na 8. Hrvatskom kongresu farmakologije s međunarodnim sudjelovanjem u Splitu, Hrvatska, od 15. – 18. rujna 2016.

Sudjelovanje na 11. ISABS konferenciji iz forenzike i antropološke genetike sa predavanjima Mayo klinike iz područja individualizirane medicine.

Kao predstavnica Sveučilišta u Splitu gostovala u emisiji „Hrvatska za pet“ 2. travnja 2019.