

# Izražaj gangliozida GM3 i njegovih sfingolipidnih preteča u mišiću i bubregu na štakorskim modelima šećerne bolesti tip 1 i 2

---

**Novak, Anela**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2013**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:322661>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-03**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET

Anela Novak

**IZRAŽAJ GANGLIOZIDA GM3 I NJEGOVIH  
SFINGOLIPIDNIH PRETEČA U MIŠIĆU I BUBREGU NA  
ŠTAKORSKIM MODELIMA ŠEĆERNE BOLESTI TIP 1 I 2**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Split, 2013.

Disertacija je izrađena na Katedri za medicinsku kemiju i biokemiju, Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju i Katedri za imunologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu

Voditelj rada: doc. dr. sc. Tina Tičinović Kurir

*Hvala prof. dr. sc. Aniti Markotić i doc. dr. sc. Tini Tičinović Kurir koje su bile idejne začetnice i stalna potpora u svakom dijelu ostvarenja ovog rada.*

# SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA.....	6
<b>1. UVOD.....</b>	<b>8</b>
1.1. Šećerna bolest.....	8
1.1.1 Klasifikacija i dijagnoza šećerne bolesti.....	8
1.1.2 Inzulin i njegovi metabolički učinci.....	10
1.1.3 Patofiziologija šećerne bolesti.....	14
1.1.3.1. Patofiziologija šećerne bolesti tip 1.....	14
1.1.3.2. Mehanizmi inzulinske rezistencije.....	14
1.1.3.3. Kronične komplikacije šećerne bolesti.....	16
1.1.3.4. Dijabetička nefropatija.....	17
1.2. Glikosfingolipidi.....	19
1.2.1. Građa glikosfingolipida.....	20
1.2.2. Funkcija glikosfingolipida.....	22
1.2.3. Gangliozid GM3.....	24
1.3. Glikosfingolipidi i šećerna bolest.....	27
1.3.1 Uloga GM3 u inzulinskoj signalizaciji.....	27
1.3.2 Izražaj gangliozida GM3 i njegovih preteča u mišićima.....	30
1.3.3 Izražaj gangliozida i njegovih preteča u bubrezima.....	32
<b>2. CILJEVI I HIPOTEZE.....</b>	<b>38</b>
<b>3. METODE I MATERIJALI.....</b>	<b>40</b>
3.1. Pokusne životinje.....	40
3.2. Štakorski modeli šećerne bolesti.....	40
3.2.1 Model šećerne bolesti tip 1.....	40
3.2.2 Model šećerne bolesti tip 2.....	41
3.2.3 Tjelesna masa i biokemijski parametri.....	41
3.2.4 Trajanje eksperimenta.....	42
3.3. Imunohistokemijska analiza.....	42
3.3.1 Kvantitativna analiza imunofluorescencijskog bojanja.....	43
3.4. Tankoslojna kromatografija visokog razlučivanja (HPTLC).....	44
3.4.1 Homogenizacija i ekstrakcija.....	45
3.4.2 Dijaliza.....	45
3.4.3 Alkalna hidroliza.....	45
3.4.4 Tankoslojna kromatografija visokog razlučivanja.....	46

3.4.5	Bojenje HPTLC ploča orcinolom.....	46
3.4.6	Imunobojenje HPTLC ploča.....	46
3.5.	PCR reakcija u stvarnom vremenu.....	47
3.5.1	Izolacija RNA.....	47
3.5.2	Postupak izolacije RNA.....	48
3.5.3	Sinteza komplementarne DNA (cDNA).....	49
3.5.4	Postupak sinteze cDNA.....	49
3.5.5	PCR reakcija u stvarnom vremenu.....	49
3.5.6	Obrada podataka.....	50
3.6.	Statistički postupci.....	51
<b>4.</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>52</b>
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA.....</b>	<b>63</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>71</b>
<b>7.</b>	<b>SAŽETAK.....</b>	<b>73</b>
<b>8.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>74</b>
<b>9.</b>	<b>POPIS LITERATURE.....</b>	<b>75</b>
<b>10.</b>	<b>ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>86</b>

## POPIS OZNAKA I KRATICA

<b>ADP</b>	adenozin difosfat
<b>AGE</b>	kasni produkti glikozilacije (engl. <i>advanced glycation endproduct</i> )
<b>ATP</b>	adenozin trifosfat
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>GAPDH</b>	gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza
<b>GD1a</b>	IV <sup>3</sup> Neu5Ac,II3Neu5Ac-GgOse <sub>4</sub> Cer
<b>GD1b</b>	II <sup>3</sup> (Neu5Ac) <sub>2</sub> -GgOse <sub>4</sub> Cer
<b>GD3</b>	II <sup>3</sup> (Neu5Ac) <sub>2</sub> - LacCer
<b>GFAT</b>	glutamin: fruktoza-6 fosfat amidotransferaza
<b>GlcNAc</b>	N-acetilglukozamin
<b>GLUT</b>	prijenosnik za glukozu (engl. <i>glucose transporter</i> )
<b>GM1 (ili GM1a)</b>	II <sup>3</sup> Neu5Ac-GgOse <sub>4</sub> Cer
<b>GM1b</b>	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-GgOse <sub>4</sub> Cer
<b>GM2</b>	II <sup>3</sup> Neu5Ac-GgOse <sub>3</sub> Cer
<b>GM3(Neu5Ac)</b>	II <sup>3</sup> Neu5Ac -LacCer; na petom ugljikovu atomu sijalinske kiseline preko dušika je vezan acetilni ostatak, CH <sub>3</sub> - CO –
<b>GM3(Neu5Gc)</b>	II <sup>3</sup> Neu5Ac -LacCer; na petom ugljikovu atomu sijalinske kiseline preko dušika je vezan glikolilni ostatak, CH <sub>2</sub> OH - CO –
<b>GSH</b>	glutation u reduciranom stanju
<b>GSL</b>	glikosfingolipid
<b>GSSG</b>	glutation disulfid
<b>GUK</b>	glukoza u krvi
<b>HPTLC</b>	tankoslojna kromatografija visokog razlučivanja (engl. <i>high performance thin layer chromatography</i> )
<b>IL-6</b>	interleukin 6
<b>IRS</b>	proteini supstrati za inzulinski receptor (engl. <i>insulin receptor substrate proteins</i> )

<b>LacCer(C<sub>16</sub>)</b>	laktozilceramid, ceramid sadrži masnu kiselinu sa 16 ugljikovih atoma
<b>LacCer(C<sub>24</sub>)</b>	laktozilceramid, ceramid sadrži masnu kiselinu s 24 ugljikova atoma
<b>LDL</b>	lipoproteini niske gustoće (engl. <i>low density lipoprotein</i> )
<b>MAPK</b>	mitogeno aktivirana protein kinaza (engl. <i>mitogen- activated protein kinase</i> )
<b>MCP-1</b>	monocitni kemotaktični protein 1(engl. <i>monocyte chemotactic protein-1</i> )
<b>mRNA</b>	glasnička ribonukleinska kiselina (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i> )
<b>NAD</b>	nikotinamid adenin dinukleotid
<b>NADP</b>	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
<b>Neu5Ac ili NeuAc</b>	na petom ugljikovu atomu sijalinske kiseline preko dušika je vezan acetilni ostatak, CH <sub>3</sub> - CO -
<b>Neu5Gc ili NeuGc</b>	na petom ugljikovu atomu sijalinske kiseline preko dušika je vezan glikolilni ostatak, CH <sub>2</sub> OH - CO -
<b>OGTT</b>	test opterećenja glukozom (engl. <i>oral glucose tolerance test</i> )
<b>PAI-1</b>	inhibitor aktivatora plazminogena-1 (engl. <i>plasminogen activator inhibitor-1</i> )
<b>PI3K</b>	fosfatidil inozitol 3-kinaza (engl. <i>phosphoinositide-3-kinase</i> )
<b>PKC</b>	protein kinaza C
<b>RAGE</b>	receptor za AGE
<b>RNA</b>	ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
<b>SMK</b>	slobodne masne kiseline
<b>SGLT2</b>	natrij-glukoza kotransporter tip 2 (engl. <i>sodium-glucose cotransporter 2</i> )
<b>TNF-α</b>	čimbenik tumorske nekroze α (engl. <i>tumor necrosis factor α</i> )
<b>VLDL</b>	lipoprotein vrlo niske gustoće (engl. <i>very low density lipoprotein</i> )



# 1. UVOD

## 1.1. Šećerna bolest

Šećerna bolest (*diabetes mellitus*) je sindrom poremećaja metabolizma ugljikohidrata, masti i bjelančevina, uzrokovan nedostatnim lučenjem inzulina ili smanjenom osjetljivošću tkiva na inzulin. To je najčešća metabolička bolest, čija incidencija u zadnjem desetljeću dramatično raste i predstavlja veliki javnozdravstveni problem. Predviđanja Međunarodne dijabetičke udruge (IDF, *International Diabetes Federation*) govore o porastu broja osoba sa šećernom bolešću s 246 milijuna u 2007. godini na 380 milijuna u 2025. godini (1).

Premda je šećerna bolest prepoznata još u starim civilizacijama, razumijevanje patofiziologije bolesti i učinkovito liječenje događa se tek u 20. stoljeću. Najstariji zapis bolesti nalazimo na tzv. Ebersovom papirusu koji datira iz 1552. godine prije nove ere u kojem egipatski liječnik Hesi-Ra opisuje bolest učestalog mokrenja.

U 2. stoljeću nove ere Areatus uvodi naziv dijabetes prema grčkoj riječi *diabaínein* (prolaziti) jer uočava da se tekućina ne zadržava u tijelu već samo kroz njega prolazi kao kroz cijev. U 11. stoljeću, nazivu dijabetes dodaje se oznaka *mellitus* prema latinskoj riječi *mel* (med), sladak kao med i tako nastaje današnji naziv bolesti *diabetes mellitus* (3).

### 1.1.1. Klasifikacija i dijagnoza šećerne bolesti

Etiološki je bolest podijeljena u četiri velike skupine: tip 1 šećerne bolesti, tip 2 šećerne bolesti, gestacijska šećerna bolest i posebni tipovi šećerne bolesti.

Šećerna bolest tip 1 posljedica je imunosno ili idiopatski posredovanog razaranja beta-stanica Langerhansovih otočića gušterače, s posljedičnim gubitkom sposobnosti stvaranja, te ubrzo i apsolutnog pomanjkanja inzulina.

Šećerna bolest tip 2 nije entitet, već sindrom više različitih bolesti s različitim prevladavanjem stupnja rezistencije na inzulin ili smanjenog lučenja inzulina. Dijagnozu gestacijske šećerne bolesti postavljamo kada se šećerna bolest prvi put javlja ili dijagnosticira u trudnoći.

U posebne tipove šećerne bolesti ubrajaju se genetski poremećaji beta-stanica i djelovanja inzulina, bolesti egzokrinog dijela gušterače, endokrinopatije te šećerna bolest nastala kao posljedica virusnih infekcija ili uzimanja lijekova (3) (Tablica 1).

**Tablica 1.** Klasifikacija šećerne bolesti

Tip bolesti	Obilježja
Tip 1	uzrokovano razaranjem beta-stanica gušterače i posljedičnim apsolutnim nedostatkom inzulina
Tip 2	uzrokovano inzulinskom rezistencijom i neodgovarajućim nadomjesnim inzulinskim lučenjem
Drugi specifični tipovi	uzrokovani drugim razlozima npr.: genskim poremećajem beta-stanične funkcije, genskim poremećajem inzulinskog djelovanja, bolestima egzokrinog dijela gušterače, lijekovima, kemikalijama
Gestacijski	ispoljen ili dijagnosticiran prvi puta tijekom trudnoće

Tip 2 šećerne bolesti je najučestaliji u Sjedinjenim Američkim Državama, Kanadi i Europi te čini oko 80% slučajeva bolesti. Pet do 10% bolesnika ima tip 1 šećerne bolesti, a preostali slučajevi šećerne bolesti nastali su zbog drugih uzroka (4).

Dijagnoza šećerne bolesti postavlja se temeljem vrijednosti glukoze određenih u krvi nakon gladovanja (natašte), tijekom testa opterećenja glukozom (OGTT, engl. *oral glucose tolerance test*) ili slučajnim uzimanjem uzorka krvi, uz nazočnost kliničkih znakova bolesti ili njihovo odsustvo, prema kriterijima opisanim u Tablici 2 (2).

**Tablica 2.** Dijagnostički kriteriji šećerne bolesti; ADA (American Diabetes Association) 2003.

---

1.	Simptomi šećerne bolesti + koncentracija glukoze u krvi > 11,1 mmol/l (slučajni uzorak tijekom dana bez obzira na vrijeme proteklo od posljednjeg obroka). Simptomi šećerne bolesti – poliurija, polidipsija, neplanirani gubitak težine
2.	Koncentracija glukoze u krvi natašte > 7,0 mmol/l
3.	Postprandijalna koncentracija glukoze u krvi tijekom OGTT-a > 11,1 mmol/l

---

### 1.1.2. Inzulin i njegovi metabolički učinci

Temelj patofiziologije šećerne bolesti je apsolutni ili relativni manjak inzulina i različiti stupanj inzulinske rezistencije. Inzulin je peptid koji se stvara u beta-stanicama Langerhansovih otočića gušterače. Sastoji se od 51 aminokiseline, a izgrađen je u obliku dva lanca: lanac A koji ima 21 aminokiselinu i lanac B s 30 aminokiselina koji su međusobno povezani s dvije disulfidne veze. Relativna molekularna težina inzulina iznosi 5 808 daltona. Endogeni inzulin ima poluživot u cirkulaciji od 3 do 5 minuta, pa se za 10 do 15 minuta gotovo sav odstrani iz krvotoka. Razgrađuje se u jetri, bubrezima i placenti uz pomoć enzima inzulinaze. Jednim prolazom kroz jetru ukloni se oko 50% cirkulirajućeg inzulina (5).

Gen za inzulin smješten je na kratkom kraku 11. kromosoma. Jedinstveni obrazac transkripcijskih čimbenika koji se nalaze u jezgri beta-stanice aktivira transkripciju preproinzulin mRNA s DNA za inzulin. Neaktivni oblik preproinzulina, koji se sintetizira na osnovu mRNA u endoplazmatskoj mrežici, postranslacijskom modifikacijom se prevodi u proinzulin. Proinzulin se sastoji od tri dijela (lanac A i B, te polipeptid C). Otcjepljenjem polipeptida C u Golgijevom aparatu dobije se zreli inzulin. Inzulin je zajedno s polipeptidom C u jednakom omjeru i s vrlo malim količinama proinzulina

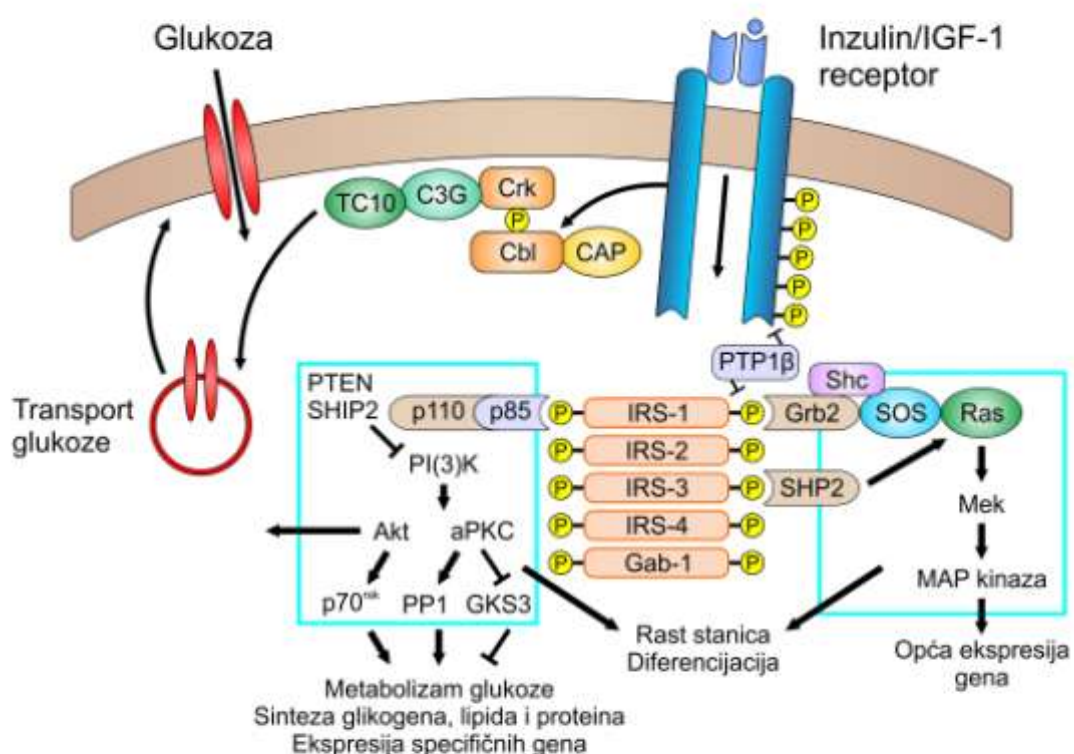
smješten u sekretijskim granulama u citoplazmi  $\beta$  stanica i na podražaj se izlučuje u cirkulaciju.

Gušterača čovjeka dnevno luči u portalnu cirkulaciju oko 30 jedinica inzulina pulzacijski, u periodima od oko 5 minuta. Bazalna koncentracija inzulina u perifernoj krvi natašte prosječno iznosi 10  $\mu$ U/ml (0,4 ng/ml ili 61 pmol/L). U zdravog čovjeka nakon standardnog obroka inzulin se izluči iz sekretijskih granula beta-stanica u cirkulaciju i njegova koncentracija poraste deset puta unutar 8 do 10 minuta (prva faza). Nakon početnog vrhunca, lučenje inzulina djelomično se smanji da bi se ponovno povećalo zbog pojačane sinteze novog inzulina te maksimalni porast bilježi u 35 do 45 minuti (druga faza). Po normalizaciji glikemije koncentracija inzulina pada na bazalne vrijednosti u 90 do 120 minuti (6).

Osim u bazalnim uvjetima, glukoza je ključni regulator sekrecije inzulina iz beta-stanica gušterače. Također, uz prisustvo glukoze, i drugi čimbenici pojačavaju lučenje inzulina, kao što su pojedine aminokiseline, ketoni, vagalna stimulacija, gastrointestinalni peptidi i neurotransmiteri. Porast koncentracije glukoze u plazmi ( $> 3,9$  mmol/L) potiče izlučivanje inzulina iz beta-stanica gušterače. Naime, glukoza olakšanom difuzijom putem membranskog prijenosnika za glukozu (GLUT 2, engl. *glucose transporter type 2*) koji je neovisan o inzulinu ulazi u beta-stanicu. Ulaskom u beta-stanicu glukokinaza katalizira fosforilaciju glukoze u glukoza-6-fosfat koji se metabolizira glikolizom uz proizvodnju ATP-a. Porast omjera koncentracije ATP/ADP u stanici uzrokuje zatvaranje ATP-ovisnih kalijevih kanala i depolarizaciju stanice. Slijedi aktivacija  $Ca^{2+}$  kanala reguliranih naponom i posljedični porast koncentracije  $Ca^{2+}$  u citosolu, što dovodi do egzocitoze inzulina (7, 8).

Djelovanje inzulina na ciljane stanice započinje vezivanjem inzulina na proteinski receptor u staničnoj membrani. Inzulinski receptor (IR) je heterotetramerni receptor izražen na stanicama jetre, masnog tkiva i skeletnih mišića. Sastoji se od četiri odvojene podjedinice, dvije alfa-podjedinice, smještene prema vanstaničnom prostoru, i dvije beta-podjedinice, koje prodiru kroz membranu i strše u staničnu citoplazmu. Inzulin se veže za alfa-podjedinice izvan stanice. Zbog promjene međudjelovanja alfa-podjedinica na

beta-podjedinice aktivira se njihova kinazna aktivnost. Autofosforilira se dio beta-podjedinica koje prodiru u stanicu. Autofosforilacija beta-podjedinica aktivira lokalnu tirozin-kinazu, koja uzrokuje fosforilaciju mnogih drugih unutarstaničnih enzima, uključujući i skupinu nazvanu supstrati inzulinskog receptora (IRS) (6, 9,10) (Slika 1).



**Slika 1.** Djelovanje inzulina na ciljnu stanicu. Prema Saltiel AR, Kahn CR (10).

Ova fosforilacija čini osnovu za daljnje udruživanje s nizvodnim signalnim proteinima koji se razilaze u tri različita puta: put fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K, engl. *phosphoinositide-3-kinase*) koji posreduje metaboličke

odgovore uključujući metabolizam glukoze/ lipida/ proteina i inzulinom poticano preuzimanje glukoze, put CAP/Cbl koji je dodatno potreban za translokaciju glavnog prijenosnika za glukozu, GLUT4 u plazmatsku membranu i put ovisan o mitogeno aktiviranoj protein kinazi (MAPK, engl. *mitogen-activated protein kinase*) koji rezultira staničnom proliferacijom i diferencijacijom (11).

Glavna funkcija inzulina je stvaranje energijskih zaliha iz hranjivih tvari, a učinke ostvaruje na jetri, skeletnim mišićima i masnom tkivu. Direktno ili indirektno utječe i na funkciju gotovo svih tkiva u organizmu.

U jetri inzulin potiče anaboličke, a koži kataboličke procese. Potičući aktivnost glukokinaze i glikogen sintaze te inhibicijom fosforilaze, pospješuje glikogenezu, a koži glikogenolizu. Inzulin potiče sintezu proteina, triglicerida i lipoproteina vrlo niske gustoće (VLDL, engl. *very low density lipoprotein*) u jetri.

U mišićima inzulin potiče sintezu proteina povećavajući prijenos aminokiselina kroz membrane te porastom sinteze proteina na ribosomima. Inzulin također povećava sintezu glikogena u skeletnim mišićima potičući prijenos glukoze kroz membranu većom sintezom prijenosnika za glukozu GLUT4, porastom aktivnosti glikogen sintaze i inhibicijom aktivnosti glikogen fosforilaze.

U masnom tkivu, inzulin nizom mehanizama potiče skladištenje masti. Kao prvo, povećava ekspresiju lipoprotein lipaza u perifernim tkivima, prijeko potrebnih za hidrolizu lipoproteina u cirkulaciji i unos slobodnih masnih kiselina u adipocite. Drugo, potičući prijenos glukoze kroz membranu adipocita povećava količinu glicerol-3-fosfata potrebnog za esterifikaciju slobodnih masnih kiselina u trigliceride. Treće, inzulin priječi lipolizu u stanicama ometajući aktivnost hormon ovisne lipaze (5,10).

### **1.1.3. Patofiziologija šećerne bolesti**

#### **1.1.3.1. Patofiziologija šećerne bolesti tip 1**

Šećerna bolest tip 1 (T1DM) je kronična bolest uzrokovana izostankom sinteze inzulina. Bolesti prethodi dugotrajni, prikriveni proces razaranja beta-stanica. Nakon uništenja 70-90% beta-stanica gušterače pojavljuju se simptomi šećerne bolesti. Primarna oštećenja nastaju zbog stanično posredovanog imunološkog odgovora protiv beta-stanica gušterače. Sekundarno nastaju protutijela na nekoliko frakcija: glutamičku kiselu dekarboksilazu (GAD, engl. *glutamic acid decarboxylase*), protutijela na Langerhansove otočiće (ICA, engl. *islet cell autoantigen*), antigen citoplazme  $\beta$ -stanica (ICCA, engl. *islet cell cytoplasmic autoantigen*), na endogeni inzulin (IAA, engl. *insulin autoantibody*) i na tirozin fosfate (IA-1 I IA-2) (13, 14). Pronalazak protutijela u serumu upućuje na postojanje predijabetesa. Neke osobe mogu imati pozitivna protutijela ali ne moraju razviti bolest, što ukazuje na činjenicu da iako postoji imunološka reakcija na stanice gušterače oštećenje beta-stanica nastaje tek nakon dodatnog "okidača". Čimbenici okoliša kao što su virusne infekcije (coxsackie virus, citomegalovirus, virusom rubele, virusom mumpsa), upotreba nekih lijekova ili unos toksina, cijepljenje, psihološki stres i klimatski utjecaj povezuju se s povećanim rizikom razvoja T1DM. Čini se da čimbenici okoliša moduliraju vrijeme nastanka T1DM u osoba s genetskom predispozicijom (12).

#### **1.1.3.2. Mehanizmi inzulinske rezistencije**

Inzulinska rezistencija (IR) definira se kao odgovor na inzulin manji od normalnog, što dovodi do hiperinzulinemije, s ciljem održavanja euglikemijskih uvjeta. Popratno obilježje IR je kompenzacijska hiperinzulinemija zbog pojačanog lučenja beta-stanica. Glavne značajke IR su slabo inhibirana glukoneogeneza, poremećeno preuzimanje glukoze u mišićima i slabo inhibirana lipoliza u masnom tkivu (15).

Inzulinska rezistencija, odnosno stanje poremećene sposobnosti odgovora na djelovanje inzulina predstavlja primarni patofiziološki poremećaj u šećernoj bolesti tip 2.

Najvažniji čimbenik IR je pretilost, koja je obično složenog poligenetskog i okolišnog podrijetla. Pozitivna korelacija između porasta tjelesne težine i razvoja inzulinske rezistencije poznata je već desetljećima, ali se precizna uzročna veza mora još utvrditi, jer značajan udio pretilih nikada ne pokazuje metaboličke poremećaje. Danas se zna da je masno tkivo endokrini organ koji komunicira sa središnjim živčanim sustavom i perifernim tkivima. Endokrinim, parakrinim ili autokrinim signalima masne stanice reguliraju rad drugih stanica smještenih u mozgu, mišićima, jetri ili gušterači. Masno tkivo ima tri osnovne funkcije i to: 1) pohranu triglicerida i oslobađanje slobodnih masnih kiselina, 2) katabolizam triglicerida i stvaranje SMK i glicerola koji su uključeni u metabolizam glukoze u jetri i drugim tkivima, te 3) sekreciju adipokina. Pored toga, masno je tkivo aktivno uključeno i u metaboličke procese kao što su angiogeneza, adipogeneza, stvaranje i razgradnja izvanstaničnog matriksa, steroidni metabolizam, imunološki odgovor organizma i hemostaza. Neumjerena metabolička aktivnost masnog tkiva povezuje se s inzulinskom rezistencijom, dislipidemijom, hipertenzijom, hiperkoagulabilnošću i kardiovaskularnim rizikom. Najvažniji hormoni koje luči masno tkivo su adipokini, kao što su leptin, adiponektin, rezistin, serpin, inhibitor plazminogenog aktivatora 1 (PAI-1, engl. *plasminogen activator inhibitor-1*),  $\alpha$ -2 glikoprotein, te citokini od kojih su najvažniji interleukin-6 (IL-6) i čimbenik nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ , engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) (17).

Prve provedene studije su pokazale da proupalni citokin TNF- $\alpha$  može inducirati inzulinsku rezistenciju (18, 19). U studijama koje su slijedile utvrđena je udruženost IR i s povišenim interleukinom 6, monocitnim kemotaktičnim proteinom-1 (MCP-1, engl. *monocyte chemotactic protein-1*), PAI-1, adiposinom te sniženim adiponektinom. S druge strane, poznato je da se gubitkom težine povećava inzulinska osjetljivost što je dijelom posredovano smanjenim lučenjem TNF- $\alpha$  iz adipocita. TNF- $\alpha$  je glavni autokrini/parakrini čimbenik koji pokreće lučenje slobodnih masnih kiselina iz masnog tkiva u krvotok. TNF- $\alpha$  posreduje potiskivanje mnogih gena odgovornih za



preuzimanje i pohranu glukoze i SMK. Djelovanjem TNF- $\alpha$  dolazi do pojačane lipolize uz otpuštanje SMK i citokina. TNF- $\alpha$  i SMK remete inzulinsko signaliziranje u tkivima posebice u mišićima (20, 21).

### **1.1.3.3. Kronične komplikacije šećerne bolesti**

Dugoročne posljedice šećerne bolesti nazivaju se kroničnim komplikacijama i mogu zahvatiti svaki organ ili sustav. Najčešće su to promjene krvnožilnog sustava koje se dijele na mikroangiopatije i makroangiopatije.

Mikroangiopatije su promjene na malim krvnim žilama i kada su izražena na žilama, mrežnici i glomerulima koje uzrokuju razvoj dijabetičke neuropatije, retinopatije i nefropatije.

Makroangiopatije su promjene na velikim krvnim žilama i odgovorne su za veću pojavnost infarkta miokarda, moždanog infarkta i periferne gangrene u bolesnika sa šećernom bolešću. Sve kronične komplikacije mogu se naći u bolesnika sa šećernom bolešću tip 1 i tip 2, samo su neke komplikacije češće uz određeni tip bolesti.

Dosadašnje studije jasno su pokazale povezanost između razvoja kroničnih komplikacija šećerne bolesti i loše regulacije glikemije (22). Oštećenja tkiva u šećernoj bolesti ovisna su o trajanju bolesti i visini glikemije. Ostale važnije odrednice koje imaju ulogu u nastanku komplikacija su genetska predispozicija i arterijska hipertenzija (23).

U osnovi, riječ je o oštećenju stanica koje nemaju sposobnost umanjiti ulazak glukoze u uvjetima hiperglikemije, a to su endotelne stanice, mezangijske stanice i Schwannove stanice perifernih živaca. Razlika je određena prisustvom tkivno specifičnih prijenosnika za glukozu (GLUT, engl. *glucose transporters*) neovisnih o inzulinu kao što su GLUT-1, GLUT-2 i GLUT-3. Najznačajniji prijenosnik glukoze ovisan o inzulinu je GLUT-4 koji se nalazi gotovo isključivo u stanicama skeletnih mišića i masnog tkiva koje je bitno u metabolizmu ugljikohidrata.

Porast sadržaja glukoze unutar stanice najvažniji je čimbenik u nastanku dijabetičkih komplikacija. Povišena unutarstanična razina glukoze

aktivira četiri biokemijska mehanizma važna u nastanku dijabetičkih komplikacija (24).

#### **1.1.3.4. Dijabetička nefropatija**

Oštećenja bubrega u šećernoj bolesti nazivaju se dijabetičkom nefropatijom, a karakterizira je zadebljanje bazalne membrane glomerula, hipertrofija bubrega i nakupljanje izvanstaničnog matriksa u glomerulima (25).

Postoji samo nekoliko bolesti bubrega koje imaju tako predvidiv tijek poput dijabetičke nefropatije. Prirodni tijek bolesti može se podijeliti u nekoliko stadija (26). Na rani stadij hiperfunkcije bubrega, koju karakterizira glomerularna hiperfiltracija nadovezuje se razdoblje kliničke latencije koje može trajati do 20 godina. Nakon toga slijedi razdoblje u kojem mikroalbuminurija napreduje do jasne nefropatije, karakterizirano brzim smanjenjem glomerularne filtracije u razdoblju od nekoliko godina, te konačno, završnog stadija bubrežnog zatajenja.

Glomerularna filtracija povećana je u početku bolesti bez obzira radi li se o šećernoj bolesti tip 1 ili 2 (27). Postoje dvije teorije kojima se objašnjava ova promjena: vaskularna i tubularna.

Prema vaskularnoj teoriji hiperfiltracija i hiperperfuzija posljedice su povišenog hidrostatskog tlaka u kapilarama glomerula, do kojeg dolazi uslijed dilatacije aferentne i konstrikcije eferentne arteriole, odnosno poremećaja u autoregulaciji protoka krvi kroz bubreg. Uslijed dilatacije preglomerulskih krvnih žila tlak iz aorte se prenosi u glomerule i nastaje glomerulska hipertenzija. U ovu povratnu spregu uključen je živčani sustav i niz medijatora poput renin-angiotenzin sustava (RAS), natrijuretičkog peptida, dušikovog monoksida, prostaglandina i drugih (28).

Bubrezi reapsorbiraju 99% plazmatske glukoze. Najvažniji protein je natrij-glukoza kotransporter tip dva (SGLT2, engl. *sodium-glucose cotransporter 2*) koji se nalazi u S1 dijelu proksimalnih tubula i odgovoran je za apsorpciju 90% glukoze (29). Prema tubularnoj teoriji u stanjima hiperglikemije, visoka razina glukoze u proksimalnom tubulu dovodi do povećanja reapsorpcije glukoze prvenstveno putem natrij-glukoznog

kottransportera. Povećana ekspresija (engl. *up-regulation*) SGLT2 predstavlja adaptacijski mehanizam kod neregulirane šećerne bolesti. Tako se kod dijabetičara posljedično povećava uz glukozu i reapsorpcija natrija u proksimalnim tubulima. Rezultat toga je smanjenje koncentracije natrija u distalnim tubulima i makuli denzi, što tubuloglomerularnom povratnom spregom dovodi do povećanja glomerularne filtracije (30). Druga uočena rana promjena na samom početku šećerne bolesti je povećanje bubrega kao posljedica hiperplazije i hipertrofije stanica bubrega. Rasch i suradnici su morfometrijskim metodama na modelima šećerne bolesti inducirane streptozocinom pokazali povećanje težine i volumena bubrega, ali samo na račun povećanja volumena i mase tubula (31). Povećanje mase tubula dovodi do povećanja transportne aktivnosti samim principom veće mase, što dijelom može objasniti povećanu apsorpciju u proksimalnim tubulima. Nije jasno što prije nastaje, hiperfiltracija ili povećanje bubrega i uzrokuje li jedna promjena drugu ili nastaju istovremeno (32).

Upravo tubularnom teorijom može se objasniti pojava tzv. "*salt paradox*" koji se opisuje u ranim stadijima dijabetičke nefropatije kod bolesnika sa šećernom bolešću tip 1, kao i na štakorskim modelima inducirane šećerne bolesti.

Vallon i suradnici su još 1993. god. na štakorskim modelima STZ inducirane šećerne bolesti htjeli vidjeti hoće li se renin-angiotenzinski sustav aktivirati smanjenjem unosom soli i poništiti hiperfiltraciju (125). Na iznenađenje autora, postigli su sasvim suprotan učinak. Smanjeni unos soli izazvao je povećani bubrežni protok, povećanu glomerularnu filtraciju (GFR, engl. *glomerular filtration rate*) te povećanu težinu bubrega kod dijabetičkih štakora. Kod zdravih kontrola to nije izazvalo značajnije promjene, što je u skladu s fiziološkim postulatima jer je ekskrecija soli podjednaka unosu soli bez učinka na bubrežni protok ili GFR (33).

Ukoliko dođe do promjena u bubrežnom protoku, GFR i ekskreciji soli sve tri promjene teku paralelno. Ova istraživanja su pokazala da su promjene bubrežnog protoka i GFR potpuno u suprotnosti s količinom unesene soli, te je ova promjena nazvana "*salt paradox*". Ovaj paradoks se ne može objasniti samo neurohumoralnim ili vaskularnim teorijama. Izgledno je da je u šećernoj

bolesti pojačana osjetljivost stanica proksimalnih tubula, prethodno opisanim mehanizmima. Povećani transport u proksimalnim tubulima smanjuje sadržaj natrija u tubulima što tubuloglomerularnom povratnom spregom povećava glomerularnu filtraciju s ciljem da održi količinu elektrolita i tekućine stalnim u dijelovima nefrona distalno od makule denze.

Zaključno se može kazati da se ravnoteža soli u zdravim bubrezima prvenstveno odvija u distalnom nefronu. S druge strane, u dijabetičkom bubregu povećana je osjetljivost proksimalnih tubula na količinu unesene soli što dovodi do paradoksalnog učinka soli na GFR. Upravo je glomerularna hiperfiltracija prva promjena koja se uočava kod dijabetičkog bubrega, te predstavlja važan patološki stres (34).

## **1.2. Glikosfingolipidi**

Glikosfingolipidi (GSL) pripadaju složenim lipidima koji su sastavni dijelovi stanične membrane svih stanica sisavaca, ali se nalaze i u unutarstaničnim organelama. Građeni su od oligosaharidnog lanca vezanog za lipidnu strukturu nazvanu ceramid. Ceramid je građen od masne kiseline vezane za amino skupinu nezasićenog amino alkohola sfingozina. Glikosfingolipidi se razlikuju od većine fosfolipida (osim sfingomijelina) koji nastaju iz diacilglicerola koji kao okosnicu sadrže alkohol glicerol.

Prvu molekulu GSL opisao je Ludwig Johann Wilhem Thudichum, poznat kao "otac neurokemije", krajem devetnaestog stoljeća. Riječ sfingo – koju je uveo Thudichum prema čudovištu Sfinji iz grčke mitologije koristi se i danas. Prava funkcija mnogih GSL nije razjašnjena i do danas, iako je u međuvremenu otkriveno više od 400 molekula GSL (35).

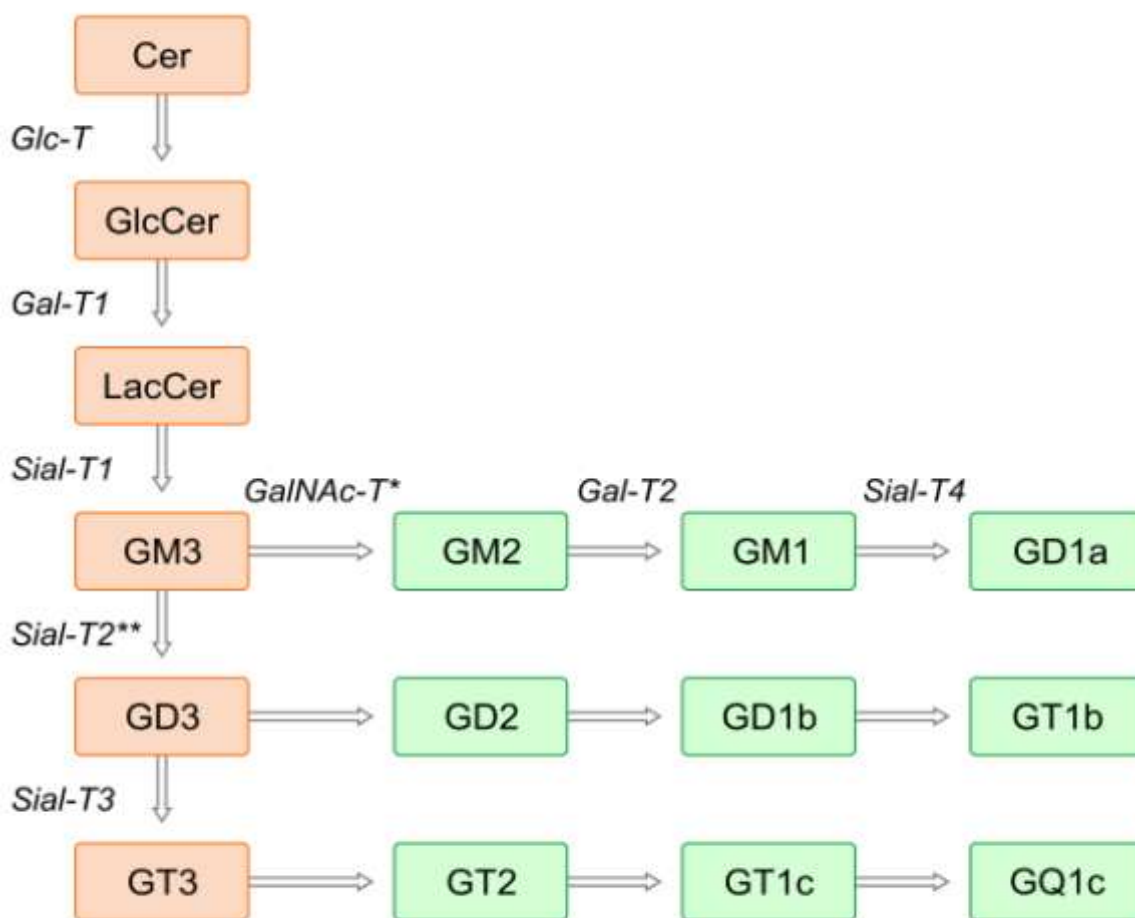
### 1.2.1. Građa gangliozida

Raznovrsnost GSL posljedica je velikog broja mogućih redoslijeda povezivanja šećera u oligosaharidnom lancu. Gangliozidi su najsloženije građeni glikosfingolipidi. Osim neutralnih šećernih ostataka, sadrže jedan ili više ostataka sijalinske kiseline. Od sijalinskih kiselina u životinjskim tkivima najčešće je zastupljena N-acetilneuraminska kiselina (NeuAc), a rjeđe N-glikoilneuraminska kiselina (NeuGc) (36, 37). Neuraminska kiselina je pri fiziološkom pH disocirana, pa stoga gangliozidi nose negativan naboj. Za sintezu ovih složenih lipida potrebni su aktivirani šećeri UDP- glukoza, UDP-galaktoza i UDP-N-acetil-galaktozamin (38).

Glikosfingolipide nazivamo sekundarnim proizvodima gena (39,40). To znači da informacija za njihove šećerne strukture nije neposredno pohranjena u staničnoj DNA. GSL se sintetiziraju slijedom reakcija koje kataliziraju glikoziltransferaze.

Glikoziltransferaze određuju redoslijed šećera u ugljikohidratnom lancu GSL, prepoznajući aktivirane šećere i međuprodukte u sintezi GSL.

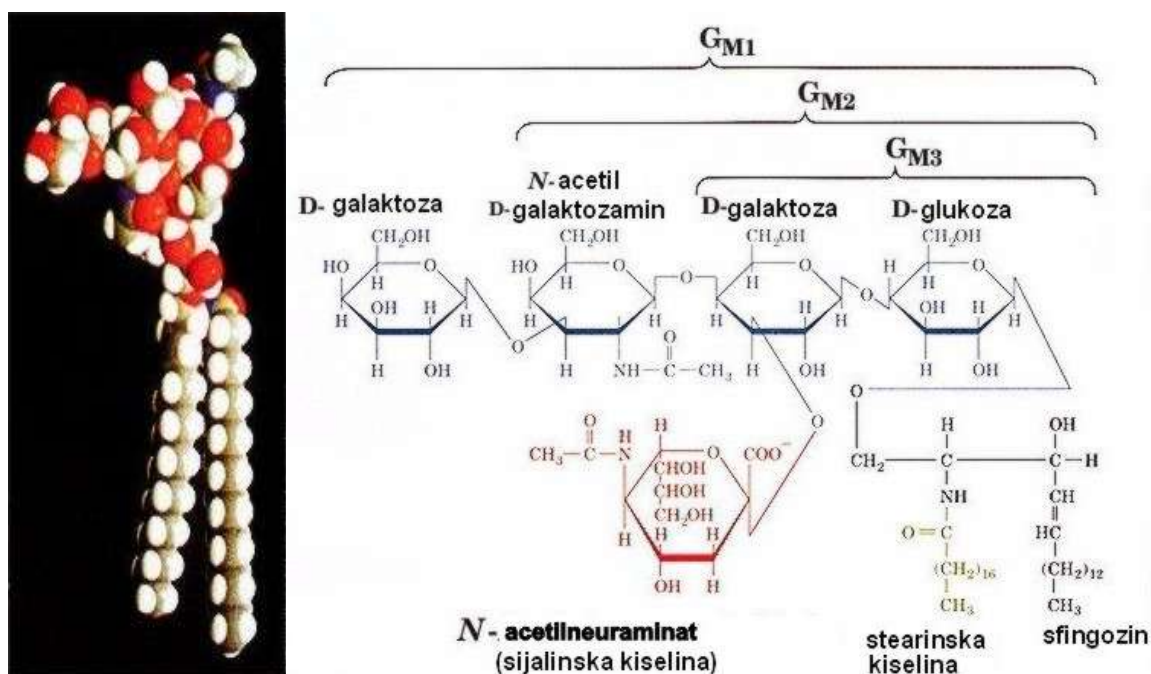
Tako je informacija o građi GSL pohranjena posredno u DNA, jer DNA kodira slijed aminokiselina u glikoziltransferazama. Sinteza GSL specifičnih za pojedinu stanicu određena je tako sintezom proteina, na razini njihove transkripcije. Sintezu gangliozida, kako je prikazano na slici 2, kataliziraju glikoziltransferaze na citoplazmatskoj strani membrane Golgijevog aparata (41).



**Slika 2.** Početni slijed u sintezi gangliozida. Prema Iber i sur. (41).

Nomenklatura GSL temelji se na preporukama IUPAC-IUB (*International Union of Pure and Applied Chemistry - International Union of Biochemistry*) i Svennerholmovoj nomenklaturi (42, 43). Po preporuci povjerenstva IUPAC-IUB nazivlje GSL se sastoji iz tri dijela. Prvi dio označuje pripadnost odgovarajućoj seriji: Gg za ganglioseriju, Gb za globoseriju, Lc za laktoseriju i nLc za neolaktoseriju. Drugi dio pokazuje broj sadržanih šećera i krati se s Ose<sub>x</sub>, gdje je x broj molekula šećera. Treći dio označava lipidni dio, i to kraticom Cer. Primjerice, molekula građe Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer se imenuje nLcOse<sub>4</sub>Cer. Daljnje skraćivanje imena može se

postići izostavljanjem oznake Ose i Cer. Tako će nLcOse4Cer konačno biti nLc4. U ovome radu za imenovanje gangliozida bit će raabljjen nazivje po Svennerholmu. Ime se tvori tako da slovo G označava gangliozid, a slova M, D, T, Q i P broj sijalinskih kiselina (M - mono, D - di, T - tri, Q - tetra, P - penta). Brojevi n = 1,2,3 i 4 označavaju broj šećera vezanih za ceramid, i to po formuli n = 5 - broj vezanih šećera. Mala slova uz ime gangliozida označavaju broj sijalinskih kiselina na unutrašnjoj galaktozi: a - jedna sijalinska kiselina, b - dvije sijalinske kiseline, c - tri sijalinske kiseline. Građa gangliozida GM1, GM2 i GM3 prikazana je na slici 3 (44).



**Slika 3.** Građa gangliozida GM1, GM2 i GM3. Prema Voet D i Voet JG (44).

Od masnih kiselina u ceramidu najzastupljenije su lignocerinska, C24 (s 24 ugljikova atoma) i palmitoleinska kiselina, C16 (sa 16 ugljikovih atoma) (40).

## 1.2.2. Funkcija glikosfingolipida

Kemijska građa GSL u kojoj se u svakoj molekuli jasno razlikuje hidrofobni ceramidni dio i hidrofilni oligosaharidni lanac upućuje na lokalizaciju GSL unutar staničnih membrana, pri čemu je ceramidni dio molekule uklopljen u membranu, a oligosaharidni se pruža u izvanstanični prostor. Ovakav položaj GSL uvjetuje njihovu biološku ulogu (35).

Simons i Ikonen (45) su predložili novi princip građe membrane po kojem se na dinamičke nakupine sfingolipida i kolesterola kao na "splavi" unutar membranskog dvosloja vezuju proteini tijekom gibanja membrana unutar stanice i prijenosa signala. "Splavi" se odvajaju od drugih regija dvosloja u kojima prevladava nezasićeni fosfatidilkolin. Smatra se da samo glikosfingolipidi koji su nakupljeni u te tzv. "glikosignalne domene" imaju biološku aktivnost (46). Mikrodomene GSL unutar plazma membrana imaju ulogu u nizu bioloških procesa kao što su stanični rast, diferencijacija, morfogeneza i adhezija stanica.

Mnogi GSL su identificirani kao vezna mjesta za toksine, viruse i bakterije. Najpoznatiji primjer je GM1 gangliozid koji je membranski receptor enterotoksina *V. cholera* (47). Poznati su i kao antigeni krvnih grupa, te je na osnovi razlika u sastavu GSL kod pojedinih krvnih grupa napravljena podjela u ABO-sustavu (48). Neutrofili, monociti i pojedine subpopulacije T limfocita izražavaju glikosfingolipide s glikozidnim ostatkom sialil-Lewis x (sLe<sup>x</sup>) koji omogućava adheziju leukocita na endotelne stanice krvnih žila (49,50). Posebice su važne promjene u izražaju GSL tijekom embriogeneze, jer su GSL odgovorni za specifična svojstva međusobnog prijanjanja stanica (51). Na membranama jajne stanice, zigote i blastule nalaze se GSL globoserije, a kasnije dolazi do pomaka prema sintezi GSL lakto i ganglioserijske. Ovaj pomak je rezultat razvojno regulirane kontrole sinteze specifičnih glikoziltransferaza odgovornih za sintezu različitih serija GSL (51).

Različiti citokini utječu na sintezu gangliozida, ali vrijedi i obrnuto, da neki gangliozidi inhibiraju sintezu citokina u staničnim kulturama. Naprimjer, TNF- $\alpha$  povećava izražaj gangliozida GD3 (52) GM3 (53), dok gangliozidi GM2 i GM3 inhibiraju sintezu TNF- $\alpha$  (54). Interferon- $\gamma$  povećava izražaj neutralnih



GSL GlcCer i LacCer te gangliozida GM3, a smanjuje izražaj GSL s dugim ugljikohidratnim lancima u ljudskim endotelnim stanicama (55). Gangliozidi, sfingozin i lizosfingolipidi inhibiraju aktivnost protein kinaze C vjerojatno putem kompetitivnog vezanja hidrofobnog dijela sfingolipida za domenu protein kinaze C gdje se inače vezuje diacilglicerol (56, 57).

### **1.2.3. Gangliozid GM3**

Gangliozidi su najsloženije građeni GSL. To su kiseli glikosfingolipidi, što znači da osim neutralnih šećera sadrže i barem jedan kiseli šećer. Neutralni šećer je npr. glukoza, jer pri fiziološkom pH ne djeluje niti lužnato niti kiselo (niti prima niti otpušta  $H^+$ ). Od kiselih šećera sadrže jedan ili više ostataka sijalinske kiseline koja im daje negativni naboj. Od sijalinskih kiselina u životinjskim tkivima najčešće je zastupljena N-acetilneuraminska kiselina (NeuAc).

Struktura gangliozida određena je specifičnim glikoziltransferazama u stanicama te je do danas opisana struktura više od 60 gangliozida. Gangliozida ima najviše u staničnim membranama živčanih stanica (5-10% ukupnih lipida), ali se u manjim količinama nalaze i u većini drugih staničnih membrana. Prvi i najjednostavniji član ovog metaboličkog slijeda je GM3 gangliozid koji je ujedno i najzastupljeniji gangliozid izvan živčanog tkiva.

Preteča je i niza složenijih gangliozida, što određuje njegov sadržaj u pojedinim stanicama i tkivima kao što je prikazano u tablici 3 (58).

**Tablica 3.** Sadržaj gangliozida GM3 u ljudskim tkivima (58)

Tkiva	Gangliozidi	GM3, % od ukupnog sadržaja gangliozida	Metoda određivanja GM3
Jetra	214-220*	90-91,6	TLC, kolorimetrija
Bubrezi	30-60	74	"
Slezena	200-300	--	"
Placenta	100-200	--	"
Mišići			"
skeletalni	50-80	70	"
srčani	--	50	"
Koža	30-35	--	"
Masno tkivo	10-15	80-90	"
Aorta	46	82	"
Štitnjača	120	48	"
Mozak			
kora	3000-3500	--	"
bijela tvar	1000	4,1	"
siva tvar	--	3,8	"

GM3 je esencijalna sastavnica splavi plazma membrane, čija uloga nije do kraja poznata. Smatra se da je zbog svojeg položaja u membrani stanica uključen u niz površinskih funkcija stanica kao što su vezanje za receptore, međustanična adhezija, prijenos signala, regulacija proliferacije i diferencijacije stanica, modulacija funkcije različitih membranski vezanih proteina (59).

Gangliozid GM3 (NeuAc $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Cer) nastaje vezivanjem jedne sialinske kiseline na laktozilceramid, reakcijom koju katalizira enzim GM3 sintaza (beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 5, St3Gal5) (60). Sialinske kiseline se obično nalaze na terminalnim krajevima ugljikohidratnih

grupa glikolipida, a zbog svog negativnog naboja uglavnom su smještene na površini stanica i smatraju se ključnom za niz bioloških učinaka glikolipida.

GM3 sintaza pripada velikoj obitelji sijaliltransferaza koje kataliziraju prijenos sijalinske kiseline (Sia) s CMP-Sia na ugljikohidratni akceptor. Postoji dvadeset članova obitelji sijaliltransferaza koje su grupirane u četiri obitelji, ovisno na koji se ugljikohidrat i kako vezuje sijalinska kiselina. GM3 sintaza pripada ST3Gal obitelji čija je uloga prijenos sijalinske kiseline na terminalnu molekulu galaktoze  $\alpha$  2,3-vezivanjem. Do danas je kod miševa i ljudi identificirano šest članova ove obitelji. Član ove obitelji, ST3Gal5 je enzim potreban za sintezu gangliozida GM3 zbog čega se jednostavnije naziva GM3 sintaza.

ST3Gal5 *knockout* miševi pokazuju veću osjetljivost na inzulin poboljšavajući fosforilaciju inzulinskog receptora u mišićima. Ovi miševi su zaštićeni od razvoja inzulinske rezistencije inducirane dijetom s velikim udjelom masnoća, zbog čega se pretpostavlja da je GM3 gangliozid negativni regulator inzulinskog receptora (61, 62).

Razgradnja gangliozida započinje njihovim prijenosom s plazma membrane endocitoznim mjehurićima u lizosome. Razgradnju oligosaharidnog lanca gangliozida kataliziraju odgovarajući enzimi iz grupe glikozidaza. Glikozidaze hidroliziraju glikozidnu vezu između dva šećerna ostatka. Sijalidaza (neuraminidaza Neu) otcjepljuje sijalinsku kiselinu, galaktozidaza otcjepljuje galaktozu, a glukozidaza glukozu. Važnu ulogu u regulaciji funkcije stanične membrane ima neuraminidaza Neu3 upravo modulacijom sadržaja gangliozida u plazma membrani (58).

Gangliozid GM3 je važan u prijenosu signala niza čimbenika rasta. Primjerice, pokazalo se da GM3 inhibira učinke čimbenika rasta fibroblasta i trombocita (63), a može utjecati i na rast stanica putem mikrodomena bogatih GM3 (64). Na humanim endotelnim stanicama umbilikalne vene (HUVECs) ustanovljen je supresivni učinak GM3 na proangiogenetski učinak endotelnog vaskularnog faktora rasta (VEGF, engl. *vascular endothelial growth factor*) (65).

Također se pokazala uloga GM3 u onkogenezi. Primjerice, inhibicijom fosforilacije tirozin kinaze receptora za čimbenike rasta na membranama

tumorskih stanica GM3 može suprimirati rast tumorskih stanica (66-73). Pokazano je da GM3 može inhibirati prodor tumorskih stanica potičući interakciju integrina s membranskim proteinima i time porast stanične adhezije na interstanični matriks (74, 75). Smatra se da GM3 ima imunomodulacijski učinak utjecajem na proliferaciju T stanica i njihovu produkciju citokina i povećava osjetljivost T stanica na *in vitro* stimulacije (76, 77).

Ustanovljeno je da poremećeni metabolizam glukoze, lipida i visceralna debljina utječu na razinu GM3 u serumu. Nađena je povišena razina gangliozida GM3 u serumu bolesnika sa šećernom bolešću, ali i drugim metaboličkim poremećajima koje su u korelaciji s razinom glikemije i lipida. Naime, bolesnici sa šećernom bolešću tip 2 koji su pretili (indeks tjelesne mase ITM>30) imaju značajno više razine GM3 koje su u korelaciji s razinom lipoproteina niske gustoće (LDL, engl. low density lipoprotein), naročito malih aterogenih LDL čestica. GM3 je ustanovljen i u aterosklerotskim lezijama koje su dominantno posredovane kolesterolom iz malih LDL čestica (78).

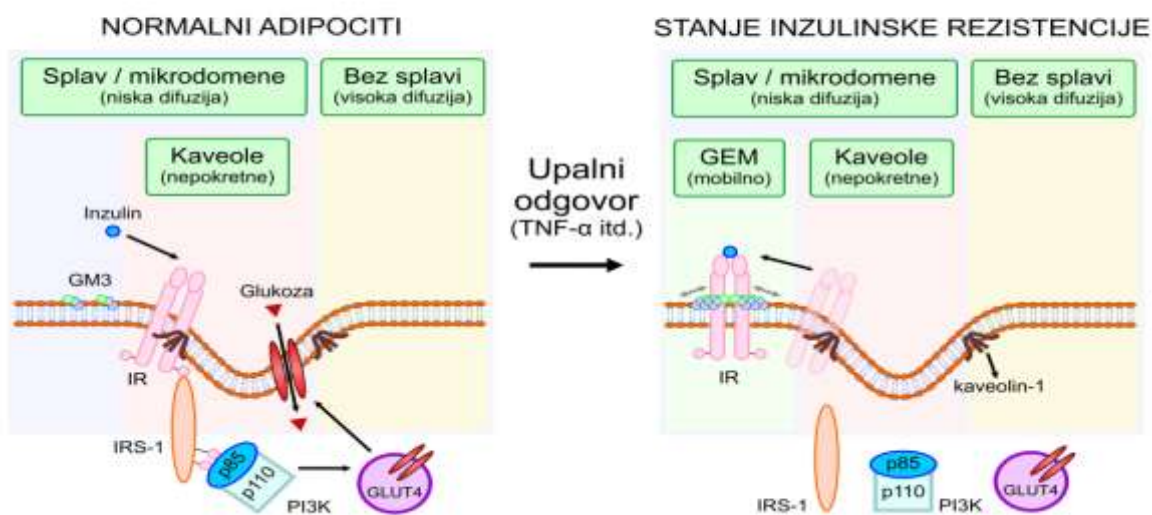
### **1.3. Glikosfingolipidi i šećerna bolest**

#### **1.3.1. Uloga GM3 u inzulinskoj signalizaciji**

Prva uočena i detaljnije proučena funkcija gangliozida bila je receptorska funkcija. Niz radova potvrdilo je ulogu gangliozida GM3 u nastanku inzulinske rezistencije. J. Inokuchi, proučavajući gangliozid GM3, predložio je koncept za metaboličke bolesti, uključujući šećernu bolest tip 2, kao bolesti membranskih mikrodomena uslijed poremećenog izražaja gangliozida (78).

Inzulinski receptor pripada skupini receptora smještenih u mikrodomeni plazma membrane (tzv. lipidnoj splavi) bogatoj glikosfingolipidima, posebice gangliozidom GM3 (53, 78). Posebna podskupina lipidnih splavi su kaveole. Kaveole su udubljena plazma membrane koja nastaju iz lipidnih splavi polimerizacijom integralnih membranskih proteina kaveolina (80). Inzulinski receptor može se vezivati neovisno za kaveolin i za GM3 (81).

Glikosfingolipidi, uglavnom ganglioizid GM3, okružuje inzulinski receptor u lipidnoj splavi i modulira njegovo signaliziranje. Tagami i sur. su pokazali da je u adipocitima u stanju inzulinske rezistencije putem TNF- $\alpha$  inducirana endogena sinteza ganglioizida GM3 (82). Na prijelazu transmembranske i izvanstanične domene beta-podjedinice IR nalazi se aminokiselina lizin, esencijalna za vezivanje s ganglioizidom GM3 koji je smješten na površini stanice. Kada se GM3 nalazi u suvišku, pojačano se vezuje za inzulinski receptor, što dovodi do njegove disocijacije od kaveolina-1 i pomaka iz kaveole u lipidnoj splavi. Ovaj pomak IR iz kaveole onemogućuje aktivaciju inzulinskog receptora (Slika 4) (82, 83).



**Slika 4.** Model membranske mikrodomene. Prema Inokuchi J (78)

To je posljedica ne samo povećanog sadržaja staničnog GM3 već i povećane aktivnosti GM3 sintaze i sadržaja mRNA GM3 sintaze što ukazuje da TNF- $\alpha$  regulira sintezu GM3 na nivou transkripcije u adipocitima (82). Poznato je da TNF- $\alpha$  u kulturama adipocita inducira stanje inzulinske rezistencije koju karakterizira smanjena sposobnost inzulina da potakne

fosforilaciju beta-podjedinice inzulinskog receptora, a potom i fosforilaciju mnogih drugih unutarstaničnih enzima, uključujući IRS (83).

U kulturi mišjih adipocita s niskom koncentracijom TNF- $\alpha$  ne može se postići inzulinska rezistencija posredovana učinkom TNF- $\alpha$ . Za ovaj učinak potreban je duži tretman adipocita (od najmanje 72h) što je u suprotnosti s ostalim akutnim učincima ovog citokina (84). Ovaj usporeni efekt TNF- $\alpha$  u korelaciji je s progresivnim porastom sadržaja GM3 na površini stanica. Da bi dokazali da je upravo molekula GM3 odgovorna za razvoj inzulinske rezistencije adipocita tretiranih TNF- $\alpha$ , korišten je inhibitor sinteze glukozilceramida, D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (D-PDMP) koji ometa stvaranje glikosfingolipida iz glukozilceramida (85). D-PDMP potpuno neutralizira TNF $\alpha$ -inducirani porast GM3 u adipocitima i normalizira TNF $\alpha$ -induciran defekt fosforilacije IRS-1 i inzulinsko signaliziranje. Sva ova saznanja potvrđena su istraživanjima na *knockout* miševima za GM3 sintazu koji ne mogu stvarati gangliozyd GM3. Kod ovih miševa poboljšana je inzulinska osjetljivost i zaštita od razvoja inzulinske rezistencije uz masnu ishranu (62).

Osim ometanja vezivanja inzulina za inzulinski receptor, kao posljedica promjena u membranskim mikrodomenama opisuje se još jedan mogući mehanizam kojim sfingolipidi remete inzulinsko signaliziranje. Važna sastavnica nizvodnih signalnih bjelančevina inzulinskog puta je Akt2/protein kinaza B- $\beta$  (PKB- $\beta$ ), koja je ujedno i središnji regulator anaboličkih enzima odgovornih za sintezu i pohranu triglicerida i glikogena. *Knockout* miševi kojima nedostaje Akt2/ PKB- $\beta$  razvijaju inzulinsku rezistenciju i šećernu bolest (86).

Chavez i suradnici su na kulturi miotubula inhibirali kiselu ceramidazu, koja pretvara ceramid u sfingozin, što je povećalo sadržaj ceramida i inhibiralo Akt/PKB. Ove studije podržavaju hipotezu da je ceramid, ali ne i glikozilirani ceramid ili sfingozin, primarni antagonist Akt/PKB (87, 88) što bi značilo da ceramid i glukozilceramid različitim mehanizmima antagoniziraju inzulinski učinak. Ceramid modulacijom Akt/PKB, dok glukozilceramidi smanjujući fosforilaciju inzulinskog receptora (89).

Osim na kulturama stanica, udruženost gangliozida i inzulinske rezistencije pokazana je i na životinjskim modelima u Zucker *fa/fa* štakora i *ob/ob* miševa, poznatih tipičnih modela inzulinske rezistencije koji stvaraju značajno veće količine TNF- $\alpha$  u odnosu na masno tkivo kontrolnih, mršavijih životinja. Interesantno je da osim TNF- $\alpha$  nisu nađeni u većim količinama drugi citokini kao što su IL-1 ili IFN $\gamma$ . Northern blot analizom mRNA za GM3 sintazu ustanovljen je značajno veći sadržaj mRNA u ova dva tipična modela inzulinske rezistencije u odnosu na kontrolne životinje (90)

Udruženost glikosfingolipida i inzulinske rezistencije potvrđuju i bolesnici s Gaucherovom bolesti, lizosomskom bolesti nakupljanja glikosfingolipida koja je uzrokovana nedostatkom enzima glukocerebrozidaze potrebnog za hidrolizu glukozilceramida na glukozu i ceramid. Manjak enzima dovodi do nakupljanja glukozilceramida, ali i svih spojeva kojima je glukozilceramid preteča (91).

Farmakološkom inhibicijom sinteze glukozilceramida (preteče GM3) i konverzije ceramida u glikosfingolipide poboljšava se inzulinska osjetljivost Zucker *fa/fa* štakora i *ob/ob* miševa (92,93). Inhibicija serin palmitoiltransferaze (SPT), ceramid sintaze i dihidroceramid desaturaze, esencijalnih enzima u biosintetskom putu svih sfingolipida, povećava inzulinsku osjetljivost u staničnim kulturama, izoliranim tkivima, i na životinjskim modelima miševa i štakora (89).

### **1.3.2. Izražaj gangliozida GM3 i njegovih preteča u mišićima**

Najvažnija tkiva koja reguliraju razinu glukoze u krvi su jetra (unos, pohrana i proizvodnja) i mišići (unos i pohrana). Oko 80-85% cirkulirajuće glukoze preuzimaju mišići, dok svega 4-5% masne stanice. Uloga masnih stanica u glukoregulaciji je indirektna, putem metabolizma lipida i stvaranjem niza adipocitokina koji utječu na inzulinsku osjetljivost mišića i jetre. Smanjeno preuzimanje glukoze u skeletnim mišićima ključni je korak u nastanku inzulinske rezistencije. Vezanje inzulina na inzulinski receptor aktivira niz unutarstaničnih signala koji dovode do pomaka mješavica koje sadržavaju

glavne prijenosnike za glukozu (GLUT4), zatim do njihovog spajanja s membranom, te ulaska glukoze u stanice mišića i masnog tkiva. Smanjena sposobnost translokacije GLUT4 u plazma membranu jedan je od mehanizama inzulinske rezistencije u šećernoj bolesti tip 2 (94).

Molekularni mehanizmi pohranjivanja GLUT4 u mješanicama i translokacija u plazma membranu još nisu razjašnjeni. Objavljeno je niz radova u kojima se povezuje nastanak inzulinske rezistencije s nakupljanjem lipida u mišićnim stanicama. Infuzija zasićenih masti u krvotok miševa i štakora putem jugularnog katetera uzrokuje akutnu inzulinsku rezistenciju u mišićima posredovanu nakupljanjem sfingolipida (95). Pojačano nakupljanje glikosfingolipida u membranama mišićnih i masnih stanica uključeno je u regulaciju inzulinskog signaliziranja i prometa GLUT4 mješanica u mišićnim i masnim stanicama (93). Naime, dodatak sfingolipida i ceramida inhibira odgovor inzulinskog receptora i translokaciju GLUT4 na plazma membranu potaknutu inzulinom (96). Suprotno tome, deplecija glikosfingolipida značajno ubrzava translokaciju GLUT4 na plazma membranu potaknutu inzulinom i nastajanje GLUT4 mješanica iz Golgijevog sustava u masnim stanicama (93, 97) i time poboljšava inzulinsku osjetljivost i kontrolu glikemije.

Dosadašnja istraživanja na životinjskim modelima inzulinske rezistencije i šećerne bolesti tip 2 (Zucker *fa/fa* štakora i *ob/ob* miševa) ustanovila su povećan sadržaj gangliozida GM3 u adipocitima i njihovu ulogu u inzulinskom signaliziranju kao što je objašnjeno u prethodnom poglavlju (82). Da bi ustanovili ima li i u drugim tkivima, uglavnom jetri i mišićima, gangliozid GM3 istu ulogu u inzulinskom signaliziranju, provedeno je niz ispitivanja s inhibitorima sinteze glukozilceramida i na knockout miševima za GM3 sintazu.

Tako su tkiva mišića Zucker *fa/fa* štakora obrađena anti-GM3 antitijelima i analizirana metodom imunofluorescencije pokazivala intenzivniju fluorescenciju u odnosu na kontrolu. Nakon tretiranja životinja s Genz-123346 (inhibitorom glukozilceramid sintaze) na rezovima mišića obrađenih anti-GM3 antitijelima smanjila se fluorescencija kod debelih Zucker *fa/fa* štakora na približno jednaku fluorescenciji kao kod kontrolnih mršavih životinja. Ovo je pokazalo da se inhibicijom sinteze gangliozida normalizira njihov tkivni sadržaj



(89). I na ovim modelima se pokazalo da je mehanizam kojim GM3 utječe na inzulinsko signaliziranje povezan s fosforilacijom tirozin kinaze inzulinskog receptora. Nakon akutne stimulacije inzulinom, Zucker *fa/fa* štakori tretirani s Genz-123346 imali su povećanu aktivnost tirozin fosforilacije u odnosu na netretiranu grupu. Na istom modelu ustanovljena je smanjena fosforilacija i Akt nizvodne signalne molekule čija se aktivnost značajno povećala nakon tretiranja životinja s Genz 123346 (93).

Yamashita i suradnici su pokazali da se u skeletnim mišićima *knockout* miševa za GM3 sintazu (GM3S) fosforilacija inzulinskog receptora i preuzimanje glukoze odvija puno brže u odnosu na GM3S<sup>+/+</sup> ili GM3S<sup>+/-</sup> miševe, koji pokazuju i veću inzulinsku osjetljivost (62).

Oštećeno inzulinsko signaliziranje nalazimo i kod intramiocelularnog nakupljanja lipida. Najzastupljeniji intracelularni lipidi pripadaju sfingomijelinskom putu čiji je drugi glasnik ceramid, biološki vrlo aktivan i uključen u niz staničnih procesa poput apoptoze i upale. Veliki broj studija je pokazao da upravo ceramid inhibira inzulinski signalni put u mišićnoj stanici. Ceramid se može stvarati iz sfingomijelina membrane ili de novo uz enzim palmitoiltransferaza koji se aktivira u suvišku zasićenih masnih kiselina (98). Turinsky i suradnici prvi su dokazali nakupljanje ceramida u mišićima na Zucker *fa/fa* štakorima (99).

Dosada nije istražen izražaj gangliozida GM3, i njegovih preteča laktozilceramida (LacCer), glukozilceramida (GlcCer) i ceramida (Cer) u mišiću na modelu šećerne bolesti tip 2 inducirane streptozotocinom i masnom prehranom kao i na modelu šećerne bolesti tip 1 inducirane streptozotocinom.

### 1.3.3. Izražaj gangliozida GM3 i njegovih preteča u bubrezima

Bubrezi sudjeluju u homeostazi glukoze procesima glukoneogeneze, filtracije, reapsorpcije i metaboliziranja glukoze. Svi ti procesi su poremećeni u šećernoj bolesti. Niz provedenih studija pokazale su povezanost metabolizma glukoze, inzulinske rezistencije i metabolizma glikosfingolipida (100) sugerirajući ulogu GSL u razvoju dijabetičke nefropatije i oštećenja bubrega u metaboličkom sindromu.

Poznata je dvojna uloga GSL, koji s jedne strane igraju važnu ulogu u staničnom prepoznavanju, adheziji stanica i prijenosu signala, a s druge strane u proliferaciji i diferencijaciji stanica važnih za morfogenezu i onkogenezu (101). Gangliozidi se često opisuju i kao regulatori kontrole rasta stanice (102).

U dosadašnjim istraživanjima o ulozi gangliozida u dijabetičkim bubrezima i njihovoj mogućoj ulozi postoje oprečni rezultati pa smo ih preglednije prikazali kroz dvije teorije.

#### Teorija 1: Smanjeni izražaj gangliozida uzrokuje nefropatiju

Kwak i suradnici su na štakorskim modelima šećerne bolesti inducirane streptozocinom, 15 dana od induciranja šećerne bolesti pronašli povećan volumen i količinu fibroznog matriksa, dok je sadržaj gangliozida bio smanjen u odnosu na kontrolne skupine. Određivanjem gangliozida metodom tankoslojne kromatografije ustanovili su smanjeni izražaj gangliozida, a naročito GM3 u glomerulima (103).

Među predloženim patogenetskim mehanizmima je i koncept da su gangliozidi najvažniji za membranski električni naboj (104). U bubrezima, glomerularna kapilarna membrana normalno ne dopušta filtraciju bjelančevina plazme. Građena je slično kao i membrane drugih kapilara osim što ima tri, a ne samo dva glavna sloja 1) endotel kapilare 2) bazalnu membranu i 3) sloj epitelnih stanica. Najvažnija značajke ove membrane je njezin negativni električni naboj, naročito bazalne membrane koji tako sprječava prolazak negativno nabijenih plazmatskih bjelančevina. U spomenutoj studiji autori

smatraju da upravo smanjeni sadržaj gangliozida dovodi do smanjene selektivnosti glomerularne membrane s posljedičnim promjenama hidrostatskog tlaka i onkotske ravnoteže. To bi moglo uzrokovati oštećenje stanica tubula zbog veće izloženosti povećanom hidrostatskom tlaku.

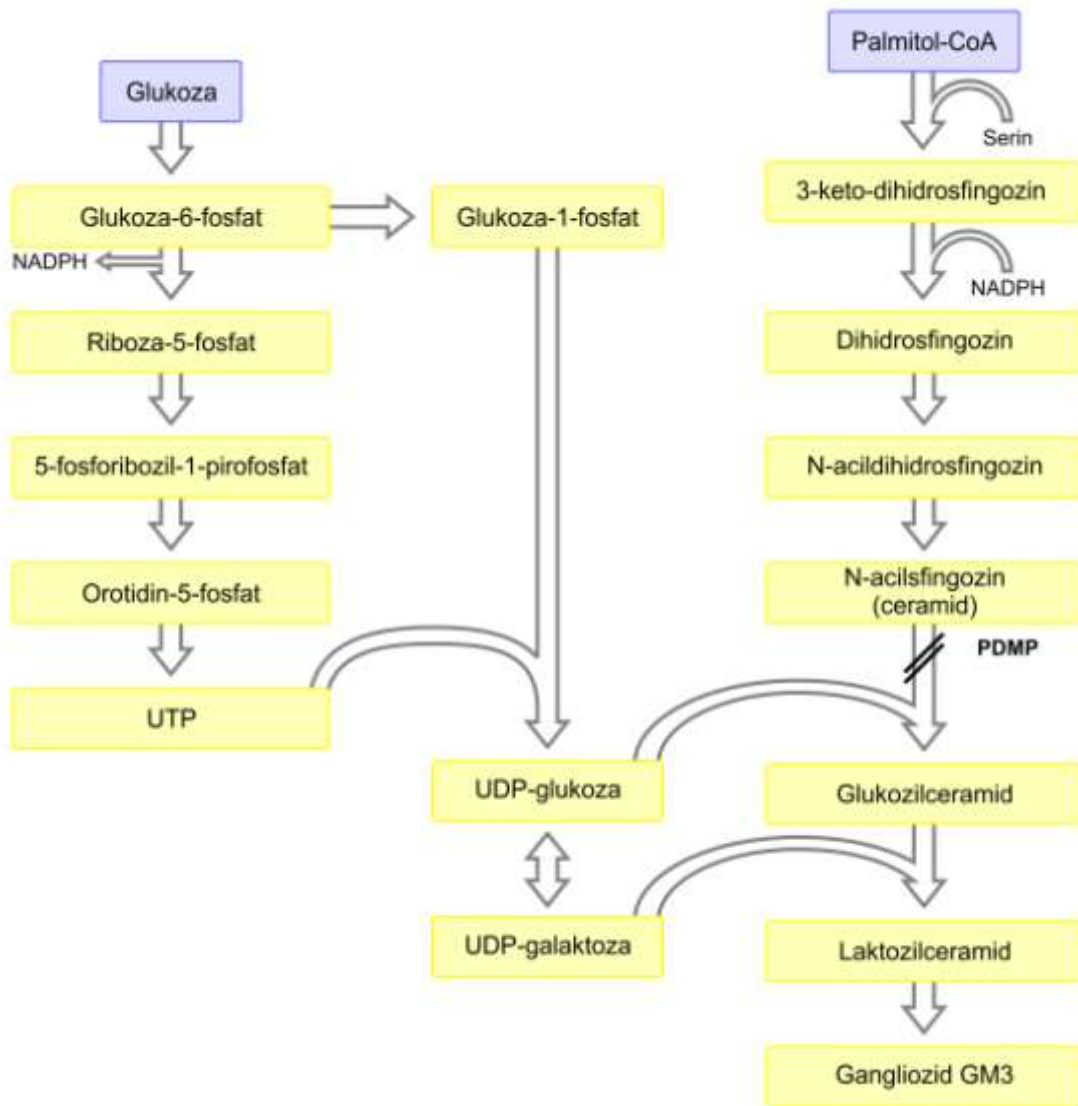
## Teorija 2: Povećani izražaj gangliozida uzrokuje nefropatiju

Međutim, mnogo je veći broj studija koje su pokazale povećani izražaj gangliozida GM3 u bubrežima dijabetičkih štakora (100).

U stanjima hiperglikemije, u stanicama sa slobodnim utokom glukoze (mezangij, endotel, Schwanove stanice) stvaraju se u suvišku preteče u sintezi glikosfingolipida, važnih regulatora proliferacije stanica (105).

Povišena unutarstanična razina glukoze u stanjima neregulirane šećerne bolesti povećava aktivnost sva četiri (poliolni, heksozaminski, put protein kinaze C, put AGE) biokemijska metabolička puta. Većina unutarstanične glukoze se metabolizira glikolizom. Međutim, u stanjima hiperglikemije dio fruktoza-6-fosfata skreće prema heksozaminskom putu u kojem uz enzim glutamin:fruktoza-6-fosfat aminotransferaza (GFAT) prelazi u glukozamin-6-fosfat i konačno u aktivirani šećer uridin difosfat N-acetilglukozamin (UDP-GlcNAc) (79).

Sinteza glikosfingolipida ovisna je o dva produkta heksozaminskog puta: aktiviranim šećerima UDP-glukozi i UDP-galaktozi te NADPH, važnom kofaktoru u sintezi dihidrosfingozina, preteči ceramida (106) (Slika 5).



**Slika 5.** Poveznice heksozaminskog i puta sinteze gangliozida

Zador i sur. su kod Sprague-Dawley štakora na modelu šećerne bolesti inducirane streptozotocinom ustanovili povećanje bubrega, a metodom tankoslojne kromatografije porast sadržaja glukozilceramida i gangliozida GM3, uz povećanu koncentraciju UDP-Glc u ukupnom tkivu bubrega. Na istim modelima, tretiranje životinja inhibitorom glukozilceramid sintaze (D-PDMP) dovelo je do povlačenja hipertrofije bubrega (106).

Utjecaj aktiviranog heksozaminskog puta na proliferaciju i rast mezangijskih stanica ispitivano je dodavanjem glukozamina, koji se u suvišku stvara aktivacijom ovog metaboličkog puta, kulturi mezangijskih stanica bubrega.

Ustanovljeno je da glukozamin dovodi do hipertrofije mezangijskih stanica povećanom ekspresijom p21 i aretom stanica u  $G_0/G_1$  fazi staničnog ciklusa povećavajući izražaj gangliozida, prvenstveno GM2 i GM1. Isti učinak se dobio i dodavanjem GM2 i GM1 kulturama mezangijskih stanica (107).

Drugi važni metabolički put u nastanku kroničnih komplikacija šećerne bolesti su krajnji produkti glikozilacije (AGE, prema engl. *advance glycation endproducts*) koji nastaju neenzimatskom reakcijom između ketonskih skupina šećera ili aldehida s aminoskupinama proteina. To je proces koji se odvija kroz više stadija koji su u početku reverzibilni, da bi nastankom kovalentnih veza među molekulama proteina proces postao ireverzibilan oštećujući strukturu, enzimatsku ili signalnu funkciju glikoziliranih proteina. Gangliozidi se smatraju jednom od patofizioloških poveznica između krajnjih produkata glikozilacije i dijabetičke nefropatije. Masson i suradnici su dokazali pozitivnu korelaciju između porasta koncentracije AGE produkata i povećanog izražaja a-serije gangliozida, a smanjenog izražaja b-serije gangliozida u mezangijskim stanicama bubrega na modelima dijabetičkih db/db miševa. Na istim modelima ustanovljena je povećana aktivnost GM3 sintaze za 80%, dok je aktivnost GD3 sintaze bila smanjena za 50%. Inhibicija GM3 sintaze djelomično je poništila učinak AGE produkata na proliferaciju mezangijskih stanica (105).

Bubreg je tkivo bogato GLS, posebice gangliozidom GM3 kojeg najviše ima u plazma membrani, posebno u specijaliziranim membranskim mikrodomenama tzv. lipidnim splavima, gdje modulira funkciju različitih receptora koji se nalaze u ovim mikrodomenama. Natrij-glukočni kotransporteri smješteni su u lipidnim splavima (108) i njihova promjenjena aktivnost na modelu STZ inducirane šećerne bolesti ukazuje na ulogu membranskih lipida u transportnoj aktivnosti tubula (100). U stanjima hiperglikemije povećava se tako uz glukozu i reapsorpcija natrija u proksimalnim tubulima. Rezultat toga je smanjenje koncentracije natrija u distalnim tubulima i makuli denzi, što tubuloglomerularnom povratnom spregom dovodi do povećanja glomerularne filtracije, prvog stadija u razvoju dijabetičke nefropatije (30).

U dosadašnjim istraživanjima ostao je nepoznat izražaj GM3 u tubulima bubrega na modelu šećerne bolesti tip 1 i 2. Na tragu ovih istraživanja u ovoj studiji smo analizirali i usporedili izražaj GM3 u bubrežnim glomerulima i tubulima na modelu šećerne bolesti tip 1 i 2. Na istim modelima analizirali smo i laktozilceramid, glukozilceramid i ceramid u sfingolipidnom ekstraktu homogenizata bubrežnog tkiva te izražaj gena za GM3 sintazu (St3gal5) enzima potrebnog za sintezu gangliozida GM3.

## 2. CILJEVI I HIPOTEZE

### Ciljevi istraživanja su:

1. imunohistokemijskim metodama analizirati izražaj gangliozida GM3 u mišiću i bubregu na štakorskim modelima šećerne bolesti tip 1 i šećerne bolesti tip 2 i utvrditi postoji li razlika u izražaju GM3 u mišiću ovisno o tipu šećerne bolesti.
2. analizirati izražaj gangliozida GM3 u mišiću i bubregu na proučavanim modelima i metodom tankoslojne kromatografije visokog razlučivanja uz imunobojanje istim specifičnim protutijelom na GM3 kao i kod imunohistokemijskog određivanja.
3. analizirati izražaj preteče u sintezi GM3 (laktozilceramid, glukozilceramid i ceramid) u mišiću i bubregu na proučavanim modelima bojanjem tankoslojnog kromatograma visokog razlučivanja orcinolom.
4. Analizirati izražaj gena za GM3 sintazu (St3gal5) u bubregu na proučavanim modelima, metodom PCR reakcije u stvarnom vremenu.

### Hipoteze istraživanja su:

1. izražaj gangliozida GM3 u mišiću štakorskog modela šećerne bolesti tip 2 se povećava, odnosno štakorski model šećerne bolesti tip 2 inducirane streptozotocinom i masnom prehranom može poslužiti za proučavanje utjecaja glikosfingolipida na inzulinsku rezistenciju umjesto dosad korištenih modela

2. izražaj gangliozida GM3 u bubrežnim tubulima se povećava kao prvi znak oštećenja bubrega neovisno o tipu šećerne bolesti.
  
3. Povećani izražaj gangliozida GM3 u bubregu uzrokovan je povećanim izražajem njegovih preteča i GM3 sintaze.



## 3. METODE I MATERIJALI

### 3.1. Pokusne životinje

Mužjaci štakora soja Sprague-Dawley uzgajani su pod kontroliranim uvjetima (temperatura,  $22\pm 1$  °C; uz dnevne izmjene 14 sati svjetla i 10 sati mraka) u Nastambi za male pokusne životinje Sveučilišta u Splitu. Hranu i vodu uzimali su *ad libitum*. Štakori u dobi od mjesec dana, kada su težili 140-160 g upotrijebljeni su u daljnjem istraživanju.

Štakori su bili podvrgnuti dvjema prehrambenim režimima. Prva skupina se hranila *ad libitum* uobičajenom hranom za pokusne štakore koja se u ukupnom postotku kalorijskog unosa sastoji od 27% proteina, 9% masti i 64% ugljikohidrata (4RF24 GLP, Mucedola srl, Settimo Milanese, Italija). Druga skupina se hranila *ad libitum* visoko-masnom hranom koja se sastoji od 58% masti, 25% proteina i 17% ugljikohidrata u ukupnom kalorijskom unosu. Štakori su se na početku pokusa dva tjedna hranili odgovarajućom hranom, nakon čega su primili odgovarajuću injekciju, ovisno o skupini (109).

### 3.2. Štakorski modeli šećerne bolesti

#### 3.2.1. Model šećerne bolesti tip 1

Za indukciju modela šećerne bolesti tip 1 (T1DM) štakori su podijeljeni u dvije skupine:

1. skupina (n=5) je primila intraperitonejsku injekciju streptozotocina (STZ) (S0130, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) u dozi od 55 mg/kg (110). STZ je toksičan za  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića u gušterači koje proizvode inzulin te štakori nakon primanja injekcije STZ-a unutar 2-4 dana razvijaju šećernu bolest (naziv skupine: STZ).
2. skupina (n=5) je primila intraperitonejsku injekciju citratnog pufera (pH 4,4) u dozi od 1 ml/kg (naziv skupine: kontrola-STZ).

Uspješnost induciranja modela šećerne bolesti provjeravala se mjerenjem glukoze u kapljici krvi uzete iz repne vene štakora.

### 3.2.2. Model šećerne bolesti tip 2

Za indukciju modela šećerne bolesti tip 2 (T2DM) štakori su podijeljeni u dvije skupine:

1. skupina (n=5) se hranila *ad libitum* dva tjedna hranom s visokim udjelom masti (engl. *high fat diet*, HFD) koja se sastoji od 58% masti, 25% proteina i 17% ugljikohidrata u ukupnom kalorijskom unosu. Nakon dva tjedna primili su intraperitonejsku injekciju STZ-a u citratnoj otopini u dozi od 35 mg/kg (naziv skupine: HFD +STZ).
2. skupina (n=5) se hranila dva tjedna hranom s visokim udjelom masti *ad libitum*, a nakon dva tjedna primila je intraperitonejsku injekciju citratnog pufera (pH 4,4) u dozi od 1 ml/kg otopine (naziv skupine: HFD).

Uspješnost induciranja modela šećerne bolesti provjeravala se mjerenjem glukoze u kapljici krvi uzete iz repne vene štakora.

### 3.2.3. Tjelesna masa i biokemijski parametri

Ispitivanim životinjama redovito je mjerena tjelesna masa i koncentracija glukoze u plazmi. Glukoza je određivana iz kapljice krvi uzete iz repne vene štakora pomoću One Touch Vita glukometra (LifeScan, High Wycombe, UK) prije injiciranja STZ-a, svaka četiri dana i pred žrtvovanje. Štakori koji su 4 dana nakon injekcije STZ-a natašte imali koncentraciju glukoze u plazmi  $\geq 16$  mmol/l smatrali su se dijabetičkim štakorima i koristili su se za daljnja istraživanja. Tjelesna masa štakora određivana je na početku pokusa i na dan žrtvovanja. Ispitivanim životinjama svakodnevno je praćena količina konzumirane hrane i vode, količina dnevnog urina (pregled piljevine) i opći status.

### 3.2.4. Trajanje eksperimenata

Ispitivane životinje žrtvovane su 2 tjedna nakon indukcije modela šećerne bolesti tip 1 i tip 2. Životinje su pred žrtvovanje bile podvrgnute inhalacijskoj anesteziji izofluranom (4% u kisiku za indukciju, 2% za održavanje anestezije). Nakon otvaranja trbušne šupljine s peanom se klemala lijeva bubrežna i lijeva femoralna arterija te izvađen lijevi bubreg i gornji dio lijevog mišića kvadricepsa za analizu tkiva metodama tankoslojne kromatografije i PCR reakcije u stvarnom vremenu, a potom je slijedila transkardijalna perfuzija. Transkardijalna perfuzija se provodila preko ascedentne aorte kojom smo pristupili iglom kroz lijevu klijetku, prvo primijenom heparinizirane fiziološke otopine, a zatim 2%-tne otopine paraformaldehida u izotoničnom fosfatnom puferu (PBS, engl. *phosphate buffer saline*). Perfuzija paraformaldehydom prouzrokovala je trenutačnu smrt štakora.

### 3.3. Imunohistokemijska analiza

Izvađena tkiva mišića i bubrega su postfiksirana u istom fiksativu korištenom za transkardijalnu perfuziju u trajanju od 2-5 sati pri 4°C, a zatim su prenesena u 0,01 M PBS. Nakon krioprotekcije u 20%-tnoj saharozii tijekom noći, tkivo bubrega i mišića je rezano pomoću kriotoma (Thermo Shandon Cryotome, Pittsburgh, PA). Tkivo bubrega rezano je paralelno s kraćom osovinom bubrega, debljine 12 µm i položena na silanizirana predmetna stakalca. Tkiva mišića rezana su po poprečnoj osovini, debljine 14 µm. Od svake životinje, i za tkivo bubrega i mišića uzet je svaki drugi rez do ukupno pet rezova.

Rezovi tkiva su inkubirani protutijelima tijekom 24 sata na sobnoj temperaturi pilećim primarnim protutijelom na gangliozid GM3 (Neu5Ac). Protutijela su razrijeđena u 0,1 M PBS-u s dodatkom 0,5% goveđeg serumskog albumina (BSA, engl. bovine serum albumin) i 0,02% natrijevog azida. Nespecifično vezanje protutijela spriječeno je prethodnom inkubacijom

rezova s 1% BSA u 0,1 M PBS-u, u trajanju od 1 sat. Vezano primarno protutijelo učinilo se vidljivim pomoću specifičnog magarećeg protu-pilećeg sekundarnog protutijela IgY (IgG) (kat. br. 703-095-155, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, SAD), konjugiranog s bojom Texas-Red u PBS-u (razrjeđenje 1:150). Nakon posljednjeg ispiranja u PBS-u stakalca su prekrivena pokrovnica na kojima se nalazila tekućina Immuno-Mount (Shandon, Pittsburgh, PA, USA) te ostavljena da se osuše na zraku. Negativne kontrole uključivale su izostavljanje primarnog protutijela što je rezultiralo nebojenim tkivom.

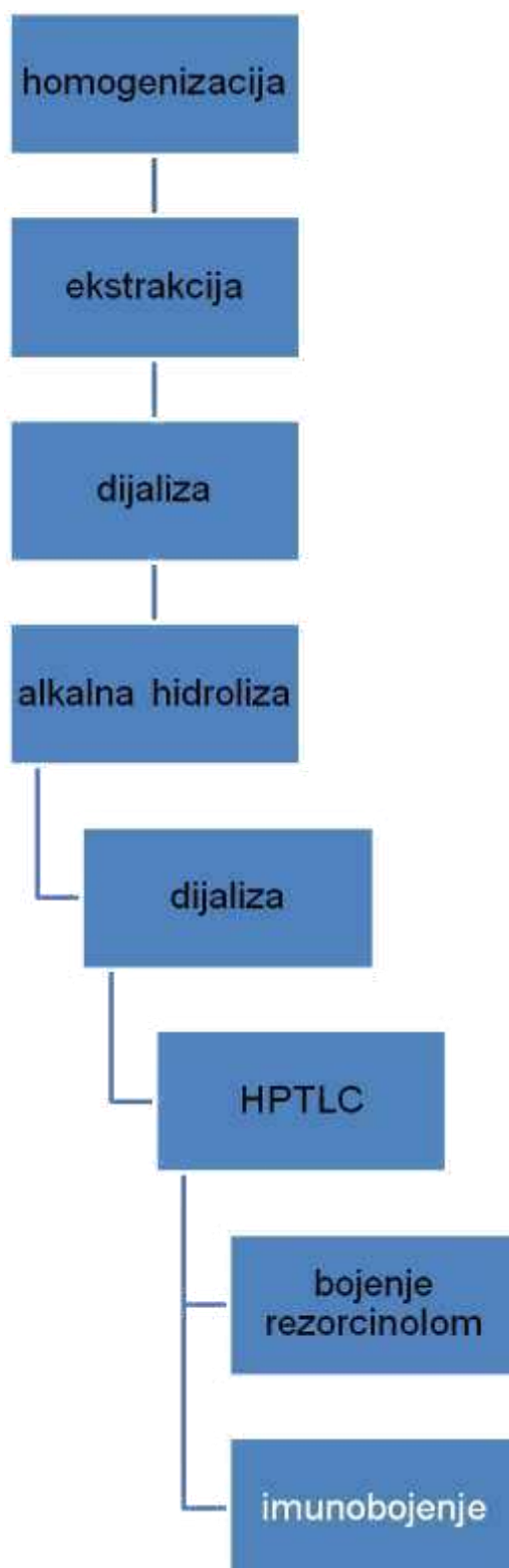
### **3.3.1. Kvantitativna analiza imunofluorescencijskog bojanja**

Histološki rezovi snimani su mikroskopom (Olympus BX61, Tokyo, Japan), opremljenim digitalnom kamerom (Olympus DP71, Tokyo, Japan) pomoću računalnog programa Cell A Imaging Software for Life Sciences Microscopy (Olympus, Tokyo, Japan). Slike su snimljene ujednačenim postupcima. Povećanje (40x), vrijeme ekspozicije, objedinjavanje piksela (eng. *binning*), pojačanje signala (engl. *gain*) identični su za svaku sliku. Nakon toga, slike su unešene u računalni program MetaMorph (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, SAD) u kojem su obrađivane kao monokromne mikrofotografije (2040x1536 piksela, 12 bitova, 0-4096 nijansi sive boje).

Na bubrezima odvojeno su analizirani glomeruli i tubuli. Za glomerule prvo su izdvojene samo slike s jednim ili dva glomerula, a potom se za analizu uzimala svaka druga slika do ukupno 5 glomerula za svaki bubreg. Ako je na slici bilo dva glomerula analizirao se desni. Za tubule se svaka slika podijelila na četiri kvadranta i svi tubuli koji su se nalazili u gornjem desnom kvadrantu, svake druge slike su se analizirali. Na vidnim poljima veličine 100x100 µm mjerio se intenzitet fluorescencije i površina.

### 3.4. Tankoslojna kromatografija visokog razlučivanja

Pokusi su rađeni prema sljedećoj shemi:



### 3.4.1. Homogenizacija i ekstrakcija

Tkivo od 20 životinja, svaki uzorak odvojeno, prvo je usitnjeno skalpelom, a zatim suspendiran u dvostrukom volumenu deionizirane vode u odnosu na mokru masu tkiva. Slijedila je homogenizacija 10 minuta u homogenizatoru te su ukupni lipidi ekstrahirani deseterostrukim volumenom (u odnosu na mokru masu tkiva) smjese kloroform (K):metanol (M): voda = 30:60:8 (v/v/v), u ultrazvučnoj kupelji. Otapalo s ekstrahiranim lipidima je filtrirano, a talog ponovno ekstrahirano deseterostrukim volumenom smjese K:M = 2:1 (v/v). Oba filtrata su pomiješana, a otapalo otpareno na rotacijskom vakuumskom uparivaču pri 37 °C. Sve korištene kemikalije bile su stupnja čistoće *pro analysi*. Kloroform i metanol su prije upotrebe redestilirani.

### 3.4.2. Dijaliza

Suhi uzorak dispergiran je u deioniziranoj vodi i to u što manjem volumenu koji je dovoljan za potpuno dispergiranje lipida koji su zaostali nakon uparavanja. Dobivena otopina prelivena je u celofansko crijevo promjera 19 mm (Medicell International Ltd, London, Engleska). Crijevo je zatim podvezano i uronjeno u posudu s vodom (oko 5 l). Dijaliza je provedena na +4 °C uz stalno miješanje. Voda je promijenjena 5 puta, svakih 12 sati unutar tri dana. Ovako su uklonjeni svi ioni zaostali nakon ekstrakcije, a voda je uklonjena liofilizacijom.

### 3.4.3. Alkalna hidroliza

Suhom ostatku uzorka dodan je najmanji mogući volumen 1 M NaOH koji je bio dovoljan za potpuno dispergiranje gangliozida, a da oni ostanu u obliku micela koje ne mogu proći kroz pore celofanskog crijeva prilikom slijedeće dijalize. Alkalna hidroliza provedena je u trajanju od 2 sata na 37 °C, a nakon toga je izvršena neutralizacija s 1 M octenom kiselinom. Ponovno je, u svrhu uklanjanja iona, provedena dijaliza kao što je prije opisano, te je uzorak uparen do suha. Suhi ostatak frakcije gangliozida otopljen je u smjesi

otapala K:M = 2:1 (v/v) i to u volumenu koji odgovara 2 mg mokre mase mišića i bubrega po  $\mu$ l.

#### **3.4.4. Tankoslojna kromatografija visokog razlučivanja (HPTLC)**

Gangliozidi su odvojeni tankoslojnom kromatografijom visokog razlučivanja (HPTLC, engl. *high performance thin-layer chromatography*) na staklenim Silikagel 60 pločama (10 cm x 10 cm, debljina silikagela 0,2 mm, Merck, Darmstadt, Njemačka). Kako bi se uklonili i najmanji tragovi vode, silikagel ploče su prije upotrebe aktivirane i to tako da su ostavljene 1 sat u termostatu, na temperaturu od 110 °C. Nakon toga čuvane su u eksikatoru, iznad P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Uzorci su zatim nanесeni na ploču pomoću automatskog aplikatora (TLC aplikator, CAMAG, Muttenz, Švicarska).

Gangliozidi su odvajani razvijanjem ploča u acetonu 24 minute. Ploče su se zatim sušile 10 minuta u digestoru, a zatim razvijale u razvijачu sastava K:M:voda = 120:85:20 koji sadrži 2 mmol/l CaCl<sub>2</sub>. Nakon 36 minuta razvijanje je prekinuto te su ploče sušene, prvo u digestoru, a zatim 45 minuta u eksikatoru uz uljni vakuum.

#### **3.4.5. Bojenje HPTLC ploča orcinolom**

Pojedine gangliozidne frakcije učinjene su vidljivima uranjanjem osušenih ploča u otopinu 0,3% orcinola u 3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nakon uranjanja ploče su stavljene 30 minuta u termostat na 100 °C nakon čega se razvila karakteristična ljubičasta boja.

#### **3.4.6. Imunobojenje HPTLC ploča**

Specifično protutijelo na gangliozid GM3 razrijeđeno je otopinom PBS-a uz dodatak 1% (w/v) goveđeg serumskog albumina i 0,02% NaN<sub>3</sub> (w/v) (otopina A). Sekundarno magareće protupileće IgG protutijelo, pročišćeno afinitetnom kromatografijom i vezano s alkalnom fosfatazom (Dianova, Hamburg, Njemačka) koristilo se u razrijeđenju 1:2000 u otopini A. Vezana

protutijela učinila su se vidljivima pomoću supstrata za alkalnu fosfatazu, 0,05% (w/v) 5-brom-4-klor-3-indolilfosfata (Biomol, Hamburg, Njemačka) u glicinskom puferu. Plave GM3 vrpce očitane su pomoću uređaja Molecular imager Chemi Doc XRS+(Bio-Rad, CA, SAD).

Silikagel je fiksiran pomoću poliizobutilmetakrilata (Degalan P28; Röhm, Darmstadt, Njemačka), a nespecifično vezanje onemogućeno je 15- minutnom inkubacijom ploče u otopini A. Zatim su ploče prekrivene u trajanju od 1 h otopinom ganglioziidnog protutijela, a nevezana protutijela uklonjena su ispiranjem svake ploče pet puta otopinom B (0,05% Tween 21, 0,02% NaN<sub>3</sub> u PBS-u). Nakon jednosatne inkubacije sa sekundarnim protutijelima, ploče su ponovno isprane otopinom B, a zatim dvostruko isprane glicinskim puferom (0.1 M glicin, 1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 10.4), u svrhu uklanjanja fosfata. Vezana protutijela vizualizirana su s 0.05% (w/v) 5-brom-4-klor-3-indolilfosfatom (Biomol, Hamburg, Njemačka) u glicinskom puferu. Analiza na svako protutijelo ponovljena je dvaput, s identičnim rezultatima.

### **3.5. PCR reakcija u stvarnom vremenu**

#### **3.5.1. Izolacija RNA**

Prvi korak je bio izolirati RNA iz prikupljenog uzorka tkiva. Pri izolaciji su korišteni: reagens za lizu stanica (engl. *Qiazol lysis reagent*), kloroform, izopropanol, 75% etanol, voda (engl. *DNase/RNase free water*). Od uređaja i pribora korišteni su stakleni homogenizator, uređaj za vorteksiranje, uređaj za centrifugiranje te spektrofotometar (Tablica 4).



**Tablica 4.** Materijali za izolaciju RNA

Reagens	Proizvođač
Reagens za lizu stanica (engl. <i>QIAzol lysis reagent</i> )	Qiagen, Njemačka
Kloroform (engl. <i>chloroform</i> )	J.T. Baker, Nizozemska
Izopropanol ( <i>2-propanol</i> )	T.T.T. Hrvatska
Etanol apsolutni	Alkaloid, Skopje, Makedonija
Voda (engl. <i>DNase/RNase free water</i> )	Gibco, SAD
Kitovi za reverznu transkripciju cDNA visokog kapaciteta	Invitrogen, SAD
Smjesa boje Sybr Green PCR master	Applied Biosystems, UK
Početnice (rSt3gal5)	Sigma-Aldrich

### 3.5.2. Postupak izolacije RNA

Svi koraci postupka radili su se na ledu, osim kad je naznačeno drugačije. Na 100 mg tkiva stavljeno je 1 mL reagensa za lizu stanica (QLR). Zatim je učinjena homogenizacija tkiva u staklenom homogenizatoru od 20 do 40 sekundi nakon čega je uzorak prebačen u 1,5 mL tubicu te ostavljen na sobnoj temperaturi 5 minuta. Dodano je 0,2 mL kloroforma na 1 mL QLR i vorteksirano je 15 sekunda te je uzorak ostavljen na sobnoj temperaturi 2-3 minute. Sljedeći korak je centrifugiranje (12000xg / 15 min / 4 °C). Nakon toga uzorak je razdvojen u 2 faze, te je gornja prozirna fazu prebačena u novu tubicu te je dodano 0,5 mL izopropanola na 1 mL QLR. Nakon vorteksiranja uzorak je ostavljen na sobnoj temperaturi 10 minuta. Nakon sljedećeg centrifugiranja (12000xg / 10 min/ 4 °C) odstranjen je supernatant. Na dnu se vidio bijeli RNA talog, kojemu je dodan 1 mL 75% etanola, te je uzorak opet centrifugiran (7500xg/ 5 min/ 4 °C). Potom je uklonjen supernatant i ostavljen RNA talog da se suši na zraku. Zadnji korak je otopanje RNA taloga u vodi (engl. *DNase/RNase free water*). Nakon toga bilo je moguće odrediti

koncentraciju RNA spektrofotometrijski (NanoDrop Spectometer). RNA se čuva na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3.5.3. Sinteza komplementarne DNA (cDNA)**

Dobivena RNA je prepisivana u komplementarnu DNA (cDNA) enzimom reverznom transkriptazom. Za sintezu cDNA korišteni su kitovi za reverznu transkripciju cDNA visokog kapaciteta čije su komponente enzim reverzna transkriptaza (engl. MultiScribe™ Reverse Transcriptase), 10xRT pufer, 25xdNTPMix(100 mM), 10xRT nasumične početnice (random Primers), inhibitor ribonukleaza (RNase inhibitor), voda bez nukleaza (Nuclease free H<sub>2</sub>O). Od aparata je bio potreban PCR uređaj Arktik Thermal Cycler 48 well dual block.

### **3.5.4. Postupak sinteze cDNA**

Miješanjem sljedećih komponenti u tubici na ledu dobivena je 2X RT reakcijska smjesa (10  $\mu\text{L}$ ): MultiScribe™ Reverse Transcriptase (1,0  $\mu\text{l}$ ), 10xRT Buffer (2  $\mu\text{l}$ ), 25xdNTPMix-100 mM (0,8  $\mu\text{l}$ ), 10xRT Random Primers (2  $\mu\text{l}$ ), RNase inhibitor (1  $\mu\text{l}$ ), Nuclease free H<sub>2</sub>O (3,2  $\mu\text{l}$ ). Zatim je dodan 1  $\mu\text{g}$  RNA te voda bez RNaze (engl. DNase/RNase free water) do 20  $\mu\text{L}$ . Sadržaj tubice nježno je promiješan. Uzorci su potom stavljeni u PCR-uređaj (Arktik Thermal Cycler 48 well dual block) nakon čega je krenula reakcija pod slijedećim uvjetima: 10 min/25  $^{\circ}\text{C}$ , 120 min/37  $^{\circ}\text{C}$ , 5 min/85  $^{\circ}\text{C}$ , te +4  $^{\circ}\text{C}$  do daljnjeg. Nakon toga u tubice koje sadrže 20  $\mu\text{l}$  c-DNA dodano je još 180  $\mu\text{l}$  Dnase/RNase slobodne vode te je dobivena koncentracija cDNA koja je predviđena za daljni rad. Dobivena se cDNA može koristiti za kvantitativni PCR ili pak pohraniti na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3.5.5. PCR reakcija u stvarnom vremenu**

Za kvantifikaciju izražaja gena korištena je PCR reakcija u stvarnom vremenu (engl. *Real-time PCR*). Za PCR su pripremljene u ploči s jažicama

mješavine za svaki uzorak (sve držeći na ledu) i to: Sybr Green master mix (12,5 µL), početnice (svaka po 1,25 µL) te po 5 µL cDNA i 5 µL vode što čini konačni volumen od 25 µL. Ploča je stavljana u uređaj pod slijedećim uvjetima: 50 °C/2 min, 95 °C/10 min, 95 °C/15 s/60 °C/1 min (40 ciklusa) 95 °C/15 s, 60 °C/1 min, 95 °C/15 s. Koristili smo uređaj 7500 QT- PCR System (*Applied Biosystems*) (Tablica 4).

Sekvence početnica za GM3 sintazu su GAATTATGTAGACCCTGCCCG i CCATGCTGTACTIONTACCCTTA, a za kontrolni gen RPS23 su CACGCAAAGGGAATTGTACTIONT i GTTCAAGCAACCGTCATTGG.

### 3.5.6. Obrada podataka

Kao rezultat PCR reakcije u stvarnom vremenu dobivene su Ct vrijednosti koje predstavljaju izražaj određenih gena u tkivu bubrega u određenom ciklusu izražaja tj. ekspresije. Mjerene su relativne ekspresije ciljnog gena i uspoređivane s kontrolnim genom (u našem slučaju gen RPS23 koji kodira za 40S ribosomalni protein S23, za zdravo i bolesno tkivo). Ct vrijednosti ciljnog i kontrolnog gena su potom uspoređivane prema formuli  $2^{(Ct\ kontrola - Ct\ cilj\ gen)}$  čime su dobivene relativne vrijednosti promjena (ciljnog gena u odnosu na kontrolni) za bolesno i zdravo tkivo.

Potom je izračunat omjer relativne vrijednosti za bolesno tkivo i relativne vrijednosti za zdravo tkivo na temelju čega se dobije relativna promjena ekspresije ciljnog gena u bolesnom tkivu u odnosu na zdravo. Za kontrolu se koristio gen RPS23 čija se ekspresija ne mijenja (geni koji su potrebni za održavanje bazičnih funkcija u stanicama engl. *housekeeping gene*). Svi uzorci su rađeni u duplikatima.

### 3.6. Statistički postupci

Za statističku analizu, koristile su se neparametrijske inačice statističkih testova. Razlike između skupina uspoređene su Mann-Whitney U testom. Vrijednost  $P < 0,05$  predstavlja granicu statističke značajnosti. Statistička analiza svih podataka napravljena je korištenjem računalne aplikacije MedCalc za Windows verzija 11.5.1.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgija).

Za izračun veličine uzorka korišteni su podaci dobiveni pilot istraživanjem na 5 štakora, gdje je uspoređen izražaj gangliozida GM3 na modelu šećerne bolesti tip 1 (skupina STZ i kontrola-STZ) te je utvrđena srednja vrijednost i standardna devijacija izražaja gangliozida GM3 za obje skupine. Izračunom je dobiveno da je uz  $\alpha$  od 5% i uz snagu istraživanja od 90% potrebno najmanje 5 štakora u svakoj skupini.

## 4. REZULTATI

Za potvrdu uspješne indukcije šećerne bolesti u štakorskim modelima tipa 1 i 2 mjerena je koncentracija glukoze u plazmi i tjelesna masa pokusnih životinja.

Dva tjedna nakon indukcije šećerne bolesti uočeno je statistički značajno povećanje koncentracije glukoze u plazmi u skupini T1DM i T2DM u usporedbi s kontrolnim skupinama ( $p < 0,05$ ). Tjelesna masa štakora T1DM skupine bila je statistički značajno manja u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ). Između skupine T2DM i kontrolne skupine nije bilo statistički značajne razlike u promjeni tjelesne mase (Tablica 5).

**Tablica 5.** Karakteristike ispitivane i kontrolne skupine životinja

Varijabla / Skupina	T1DM	C-T1DM	T2DM	C-T2DM
Tjelesna masa (g)	202,2±21	230,8±52.3	321,4±39,9	319,2±33,2
Glukoza u krvi (mmol/L)	21,6±2,85*	5,48±0,73	22,48±1,35*	6,10±0,42

Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednost  $\pm$  SD za 5 životinja po skupini.

\* označava  $p < 0,05$  naspram kontrole (za sve usporedbe).

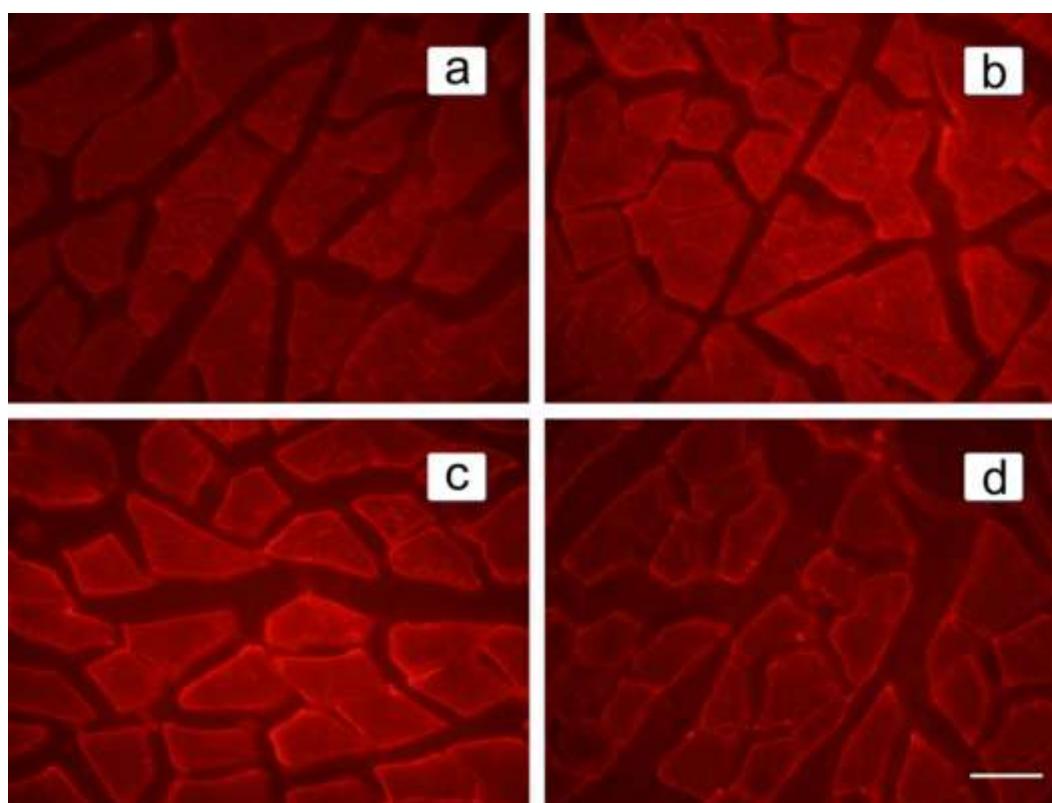
### 4.1. Izražaj glikosfingolipida u tkivu mišića

Imunofluorescentnom mikroskopijom zabilježen je statistički značajan porast intenziteta imunofluorescencije GM3 u mišićima T2DM štakora u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,001$ ), uz smanjeni intenzitet imunofluorescencije GM3 u mišićima T1DM štakora ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 6, slika 6).

**Tablica 6.** Intenzitet imunofluorescencije mišićnog GM3 ispitivanih i kontrolnih životinja

Skupina	Intenzitet imunofluorescencije (srednja vrijednost $\pm$ SD) (au)	<i>P</i> vrijednost
T1DM	16,47 $\pm$ 3,25	<0,05
C-T1DM	19,33 $\pm$ 2,80	
T2DM	28,41 $\pm$ 7,18	<0,001
C-T2DM	18,64 $\pm$ 4,20	

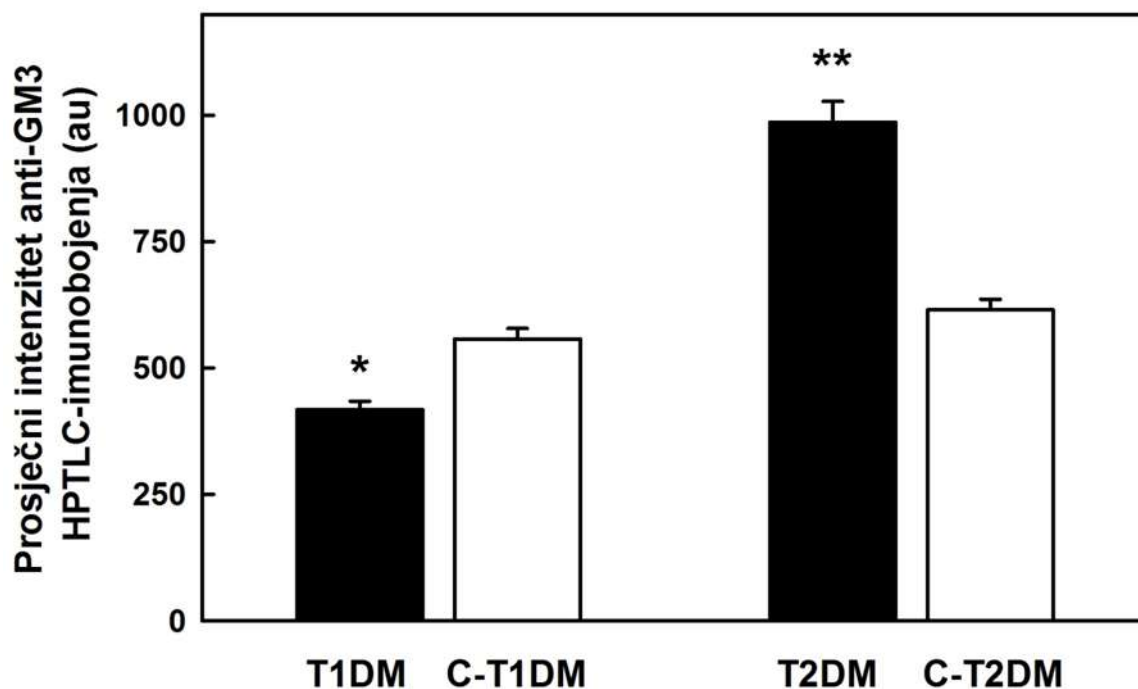
\*au - arbitrarna jedinica



**Slika 6.** Intenzitet imunofluorescencije GM3 u reprezentativnim presjecima mišića u T1DM (a), C-T1DM (b), T2DM (c) i C-T2DM (d).

Povećanje: 40x. Mjerilo 300  $\mu$ m (vrijedi za sve slike).

Prosječni intenzitet obojenja anti-GM3 tankoslojnom kromatografijom visokog razlučivanja (HPTLC) u ukupnom glikosfingolipidnom ekstraktu mišićnog tkiva T2DM štakora je bio statistički značajno povišen u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,001$ ). Prosječni intenzitet obojenja anti-GM3 u ukupnom glikosfingolipidnom ekstraktu mišićnog tkiva T1DM štakora bio je statistički značajno manji u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ) (Slika 7).



**Slika 7.** Prosječan intenzitet anti-GM3 HPTLC-imunobojenja (au) u tkivu mišića T1DM/T2DM (crni stupci) i C-T1DM/C-T2DM (bijeli stupci) 2 tjedna nakon indukcije dijabetesa. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM.

\*označava značajnu razliku među skupinama ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,001$ ).

Prosječni intenzitet obojenja preteča u sintezi GM3 (laktozilceramid, glukozilceramid i ceramid) tankoslojnom kromatografijom visokog razlučivanja (HPTLC) orcinolom u ukupnom glikosfingolipidnom ekstraktu mišićnog tkiva T2DM štakora bio je statistički značajno povišen u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ). Prosječni intenzitet obojenja preteča u sintezi GM3 u ukupnom glikosfingolipidnom ekstraktu mišićnog tkiva T1DM štakora bio je statistički značajno manji za ceramid u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ) (Tablica 7).

**Tablica 7.** Prosječan intenzitet HPTLC-bojenja orcinolom preteča u sintezi GM3 (laktozilceramid, glukozilceramid i ceramid) u tkivu mišića T1DM/T2DM i C-T1DM/C-T2DM 2 tjedna nakon indukcije šećerne bolesti.

Skupina	Intenzitet HPTLC bojenja (srednja vrijednost $\pm$ SEM) (au)		
	Cer	GlcCer	LacCer
T1DM	708,1 $\pm$ 21,5*	528,4 $\pm$ 26,9	456,9 $\pm$ 17,5
C-T1DM	816,4 $\pm$ 37,4	586,4 $\pm$ 16,1	511,8 $\pm$ 21,5
T2DM	1220,5 $\pm$ 29,8*	965,5 $\pm$ 11,2*	817,3 $\pm$ 19,6*
C-T2DM	916,2 $\pm$ 21,4	597,6 $\pm$ 18,3	526,1 $\pm$ 20,8

\* $P < 0,05$



## 4.2. Izražaj glikosfingolipida u bubrežnom tkivu

Dva tjedna nakon indukcije šećerne bolesti uočeno je statistički značajno povećanje koncentracije glukoze u plazmi u skupini T1DM i T2DM u usporedbi s kontrolnim skupinama ( $p < 0,05$ ). Tjelesna masa štakora T1DM skupine bila je statistički značajno manja u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ). Skupine T2DM je imala porast tjelesne mase u odnosu na kontrolnu skupinu, ali statistički nije bilo značajne razlike. Masa bubrega i omjer masa bubrega/masa tijela štakora su statistički bili povećani u skupini T1DM i T2DM u odnosu na kontrolne skupine (Tablica 8).

**Tablica 8.** Karakteristike ispitivanih i kontrolnih skupina životinja

Varijabla / Skupina	T1DM	C-T1DM	T2DM	C-T2DM
Tjelesna masa (g)	202,2±21	230,8±52,3	321,4±39,9	319,2±33,2
Masa bubrega (g)	1,16±0,16*	0,93±0,11	2,06±0,02*	1,23±0,02
Masa bubrega/masa tijela (mg/g)	5,8±0,8*	4,1±0,6	6,4±0,9*	3,9±0,4
Glukoza u krvi (mmol/L)	21,6±2,85*	5,48±0,73	22,48±1,35*	6,10±0,42

Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD za 5 životinja po skupini

\* označava  $P < 0,05$  naspram kontrolne skupine (za sve usporedbe)

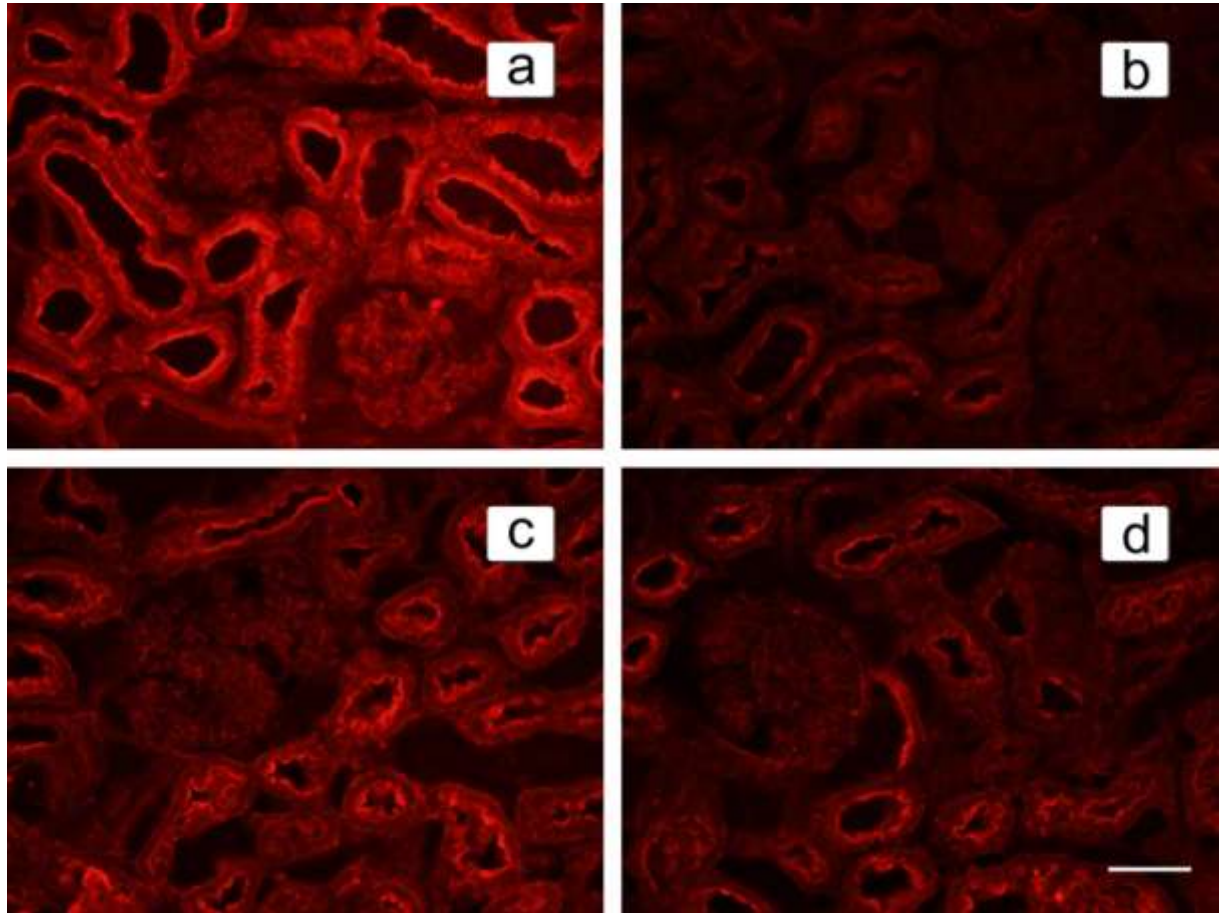
**Tablica 9.** Intenzitet imunofluorescencije GM3 u glomerulima i tubulima ispitivanih i kontrolnih životinja

Skupina	Intenzitet imunofluorescencije (srednja vrijednost $\pm$ SD)	<i>P</i> vrijednost
Glomeruli		
T1DM	29,27 $\pm$ 6,45	<0,001
C-T1DM	23,13 $\pm$ 4,80	
T2DM	18,80 $\pm$ 10,38	0,451
C-T2DM	18,23 $\pm$ 6,30	
Tubuli		
T1DM	40,83 $\pm$ 9,51	<0,001
C-T1DM	28,44 $\pm$ 7,47	
T2DM	33,76 $\pm$ 14,60	<0,001
C-T2DM	20,84 $\pm$ 7,11	

au – arbitrarne jedinice

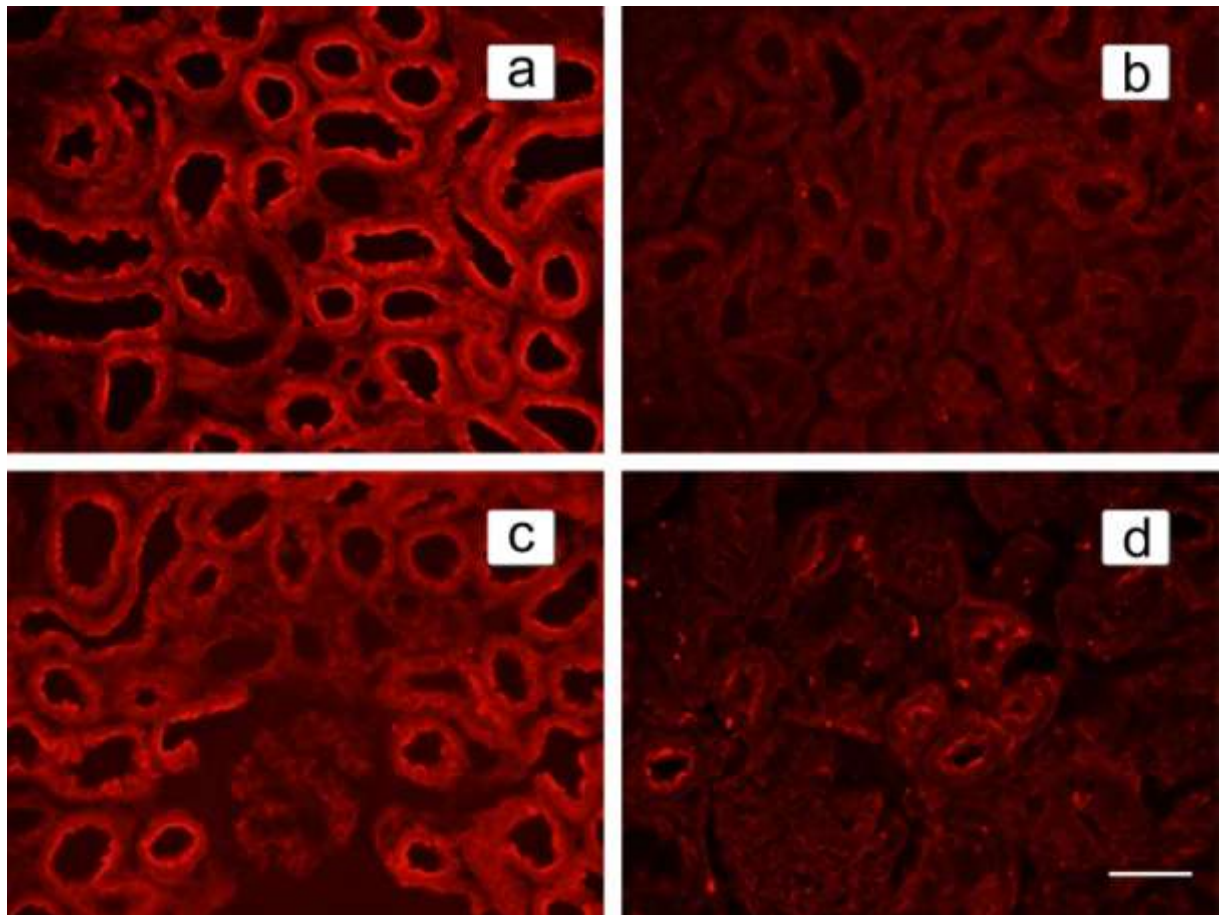
Intenzitet imunofluorescencije GM3 u tubulima T1DM štakora bio je 1,7 puta veći u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,001$ ), dok je intenzitet imunofluorescencije u glomerulima T1DM bio 1,25 puta veći u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,001$ ).

U T2DM štakora statistički je bio značajno veći intenzitet imunofluorescencije GM3 u tubulima ( $p < 0,001$ ) dok se intenzitet imunofluorescencije GM3 u glomerulima nije statistički razlikovao. Prosječna površina glomerula i tubula između dijabetičkih i kontrolnih skupina nije se statistički razlikovala ( $p > 0,05$ ) (Tablica 9, Slika 8 i 9).



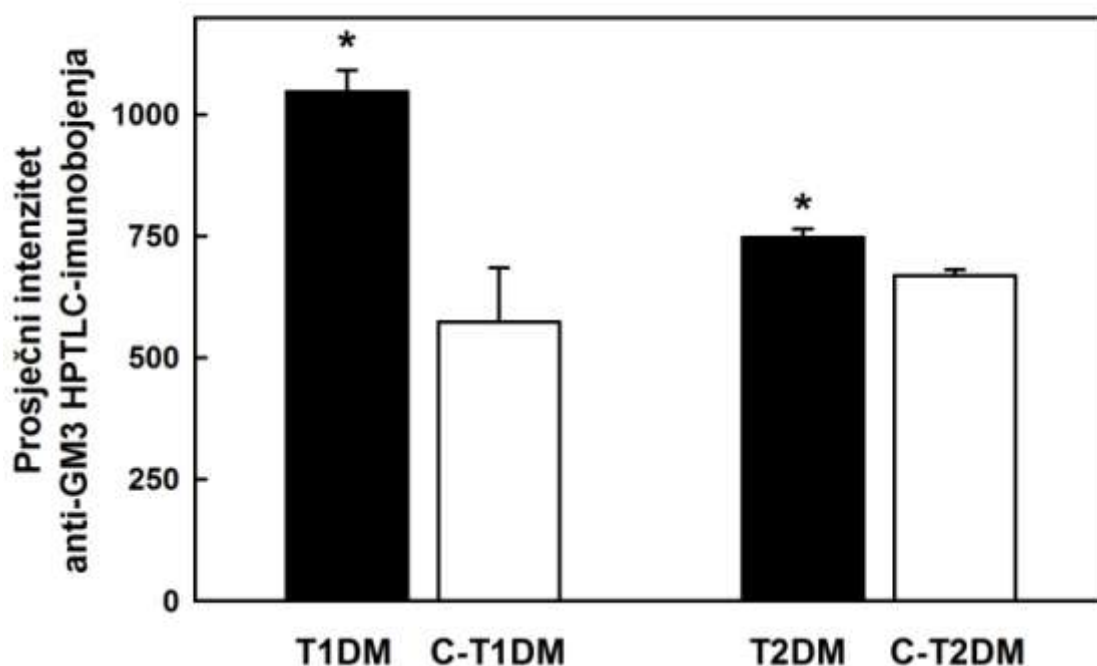
**Slika 8.** Reprezentativni presjeci intenziteta imunofluorescencije GM3 bubrežnih glomerula u T1DM (a), C-T1DM (b), T2DM (c) i C-T2DM (d).

Uvećanje: 40x. Mjerilo 300  $\mu$ m (vrijedi za sve slike).



**Slika 9.** Reprezentativni presjeci intenziteta imunofluorescencije GM3 bubrežnih tubula u T1DM (a), C-T1DM (b), T2DM (c) i C-T2DM (d). Povećanje: 40x. Mjerilo 300  $\mu\text{m}$  (vrijedi za sve slike).

Prosječni intenzitet obojenja anti-GM3 tankoslojnom kromatografijom visokog razlučivanja (HPTLC) u ukupnom glikosfingolipidnom ekstraktu bubrežnog tkiva bio je dva puta veći u T1DM štakora u odnosu na kontrolnu skupinu. Manje, ali statistički značajno povećan porast bio je u ukupnom glikosfingolipidnom ekstraktu bubrežnog tkiva T2DM štakora u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 10).



**Slika 10.** Prosječni intenzitet anti-GM3 HPTLC-imunobojenja u bubrežom tkivu T1DM/T2DM (crni stupci) i C-T1DM/C-T2DM (bijeli stupci) 2 tjedna nakon indukcije šećerne bolesti. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM; \*označava značajnu razliku među skupinama

Prosječni intenzitet obojenja preteča u sintezi GM3 (laktozilceramid, glukozilceramid i ceramid) tankoslojnom kromatografijom visokog razlučivanja (HPTLC) orcinolom u ukupnom glikosfingolipidnom ekstraktu bubrega T2DM štakora je bio statistički značajno povišen u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ). Prosječni intenzitet obojenja preteča u sintezi GM3 u ukupnom glikosfingolipidnom ekstraktu bubrežnog tkiva T1DM štakora je bio statistički značajno veći u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ) (Tablica 10).

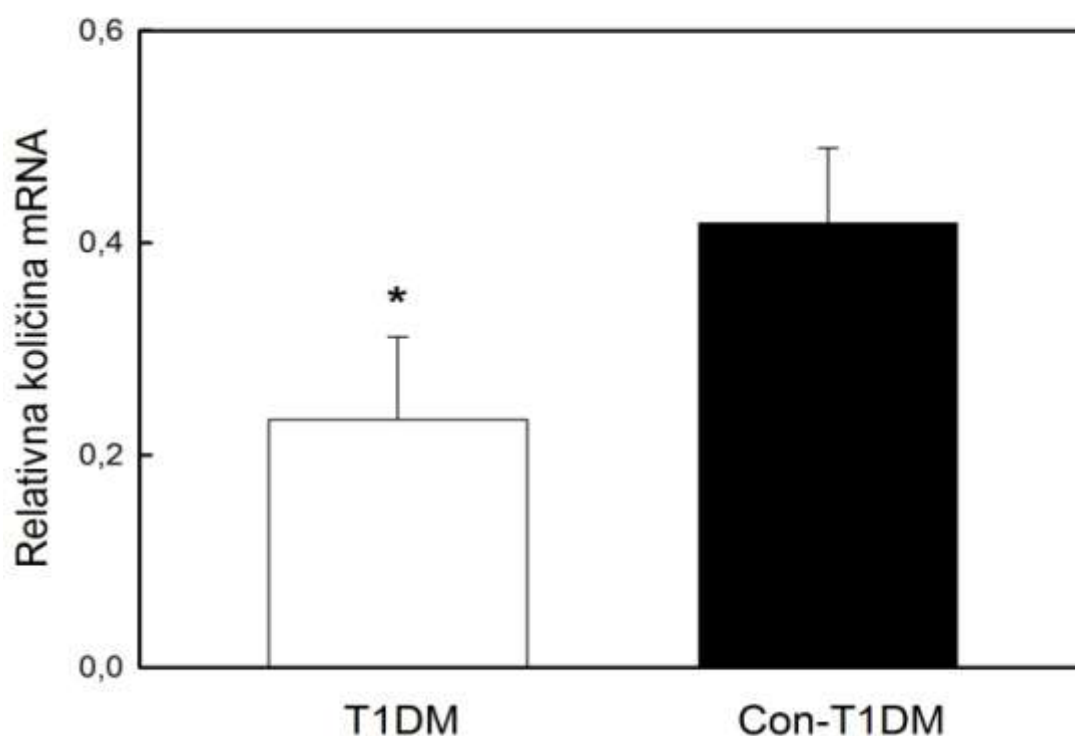
**Tablica 10.** Prosječan intenzitet HPTLC-bojenja orcinolom preteča u sintezi GM3 (laktozilceramid, glukozilceramid i ceramid) u tkivu bubrega T1DM/T2DM i C-T1DM/C-T2DM 2 tjedna nakon indukcije šećerne bolesti

Skupina	Intenzitet HPTLC bojenja (srednja vrijednost $\pm$ SEM) (au)		
	Cer	GlcCer	LacCer
T1DM	1478,5 $\pm$ 31,5*	1118,2 $\pm$ 36,6*	986,5 $\pm$ 24,1*
C-T1DM	938,7 $\pm$ 18,2	764,4 $\pm$ 25,8	712,5 $\pm$ 29,7
T2DM	1114,1 $\pm$ 25,3*	997,3 $\pm$ 22,2*	912,6 $\pm$ 23,1*
C-T2DM	908,2 $\pm$ 22,9	695,1 $\pm$ 20,8	724,8 $\pm$ 23,6

\* $P < 0,05$

### 4.3. Izražaja gena za GM3 sintazu (St3gal5) u tkivima bubrega T1DM PCR reakcijom u stvarnom vremenu

PCR metodom u tkivu bubrega T1DM štakora nađen je statistički značajno smanjen izražaj mRNA za GM3 sintazu (St3gal5) za 44% u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 11).



**Slika 11.** Relativna količina mRNA određena PCR-om u stvarnom vremenu. Količine St3gal5 transkripata su komparativno kvantificirane  $\Delta$ Ct metodom i normalizirane prema onima za RPS23

Podatci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD; \*označava značajnu razliku među skupinama

## 5. RASPRAVA

Glikosfingolipidi su zbog svojeg položaja u membrani stanica uključeni u niz površinskih funkcija stanica kao što su vezanje za receptore, međustanična adhezija, prijenos signala, regulacija proliferacije i diferencijacije stanica, modulacija funkcije različitih membranski vezanih proteina (59).

Niz studija na kulturama stanica, tkivima i životinjskim modelima ukazala su na ulogu glikosfingolipida u patogenezi inzulinske rezistencije i metaboličkih bolesti uključujući šećernu bolest tipa 2, pretilost i hiperlipidemiju. To potvrđuje i poboljšanje inzulinske osjetljivosti Zucker *fa/fa* štakora i *ob/ob* miševa farmakološkom inhibicijom sinteze glukozilceramida (preteče GM3) i konverzije ceramida u glikosfingolipide (95). Također inzulinska osjetljivost poboljšana je i kod miševa s delecijom gena za GM3 sintazu (62).

U dosadašnjim istraživanjima nije istražen sadržaj gangliozida GM3 i njegovih preteča u mišićima na modelu šećerne bolesti tip 2 inducirane streptozotocinom i masnom hranom i na modelu šećerne bolesti tip 1 inducirane streptozotocinom.

Znanstveni doprinos ove disertacije je potvrda povećanog sadržaja GM3 i njegovih preteča u mišićima na štakorskom modelu šećerne bolesti tip 2 inducirane streptozotocinom i masnom hranom. Također, pristupačniji i jeftiniji životinjski model šećerne bolesti tip 2 korišten u ovom istraživanju oponaša patofiziologiju šećerne bolesti tip 2 te je pogodniji za znanstvena istraživanja od dosad korištenih modela inzulinske rezistencije.

Bubrezi sudjeluju u homeostazi glukoze procesima glukoneogeneze, filtracije, reapsorpcije i metaboliziranja glukoze. Svi ti procesi su poremećeni u šećernoj bolesti. Dosadašnja saznanja upućuju na ulogu glikosfingolipida u razvoju dijabetičke nefropatije (105). Rezultati istraživanja sadržaja gangliozida GM3 na modelu šećerne bolesti tip 1 inducirane streptozotocinom su oprečni, a ostao je nepoznat izražaj GM3 u bubregu na modelu šećerne bolesti tip 2. Budući da u ranijim istraživanjima nije ispitana raspodjela gangliozida u bubregu na modelu šećerne bolesti tip 1 i tip 2, potpuno je ostao



nepoznat izražaj gangliozida u tubulima bubrega na modelima šećerne bolesti.

Znanstveni doprinos ove disertacije je po prvi put prikazana i uspoređena raspodjela gangliozida GM3 u glomerulima i tubulima na modelu šećerne bolesti tip 1 i 2.

Rezultati istraživanja prikazani u ovoj disertaciji mogu se raspraviti imajući u vidu ulogu glikosfingolipida, posebice gangliozida GM3 u inzulinskoj rezistenciji i procesima nastanka dijabetičke nefropatije te pruža mogućnost farmakološke intervencije.

## **5.1. Izražaj glikosfingolipida u tkivu mišića**

Dosadašnja istraživanja na životinjskom modelu inzulinske rezistencije i šećerne bolesti tip 2 (Zucker fa/fa štakora i ob/ob miševa) ukazala su na povećan sadržaj gangliozida GM3 u mišićnim i masnim stanicama. (14, 17-19)

U ovoj je studiji imunoflorescentnom mikroskopijom zabilježen statistički značajan porast intenziteta imunoflorescencije GM3 u mišićima T2DM štakora u odnosu na kontrolnu skupinu uz smanjenje intenziteta imunoflorescencije GM3 u mišićima T1DM štakora u odnosu na kontrolnu skupinu. Rezultati tankoslojne kromatografije visokog razlučivanja potvrdili su statistički značajan porast prosječnog intenziteta obojenja anti GM3 u ukupnom glikosfingolipidnom ekstraktu mišićnog tkiva T2DM štakora. Manji prosječni intenzitet obojenja anti GM3 i njegovih preteča nađen je u ukupnom glikosfingolipidnom ekstraktu mišićnog tkiva T1DM štakora u odnosu na kontrolnu skupinu.

Nalaz povećanog izražaja gangliozida GM3 i njegovih preteča u mišiću štakorskog modela šećerne bolesti tip 2 potvrđuje dosadašnje spoznaje posredovanja gangliozida GM3 u inzulinskoj rezistenciji i šećernoj bolesti tip 2. Naime, visoka razina slobodnih masnih kiselina u plazmi uzročno je povezana sa šećernom bolešću. Najzastupljenija palmitinska kiselina (sa 16 ugljikovih atoma), preteča je u sintezi ceramida i GM3.

Na štakorskim modelima debljinom inducirane inzulinske rezistencije, farmakološkom inhibicijom sinteze glikosfingolipida iz ceramida poboljšala se inzulinska osjetljivost Zucker fa/fa štakora i ob/ob miševa (92, 93). Te studije su pokazale da smanjenjem nivoa glikosfingolipida na normalne razine značajno povećavaju inzulinsku osjetljivost. Inzulinska osjetljivost poboljšana je i kod miševa s delecijom gena za GM3 sintazu (62).

Povećan sadržaj glikosfingolipida u mišićima moguće je posljedica povećanog dotoka slobodnih masnih kiselina ili povećane sinteze u mišićnom tkivu. Budući da je inzulinska rezistencija u šećernoj bolesti tip 2 posredovana povećanom količinom TNF- $\alpha$ , moguće je da signalni put TNF- $\alpha$  putem aktivacije nuklearni čimbenik  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, engl. nuclear factor -  $\kappa$ B) utječe na proliferaciju gena za sintezu GM3 što dovodi do povećanog sadržaja GM3 u mišićima štakora T2DM skupine. Povećana količina gangliozida GM3 okružuje inzulinski receptor u lipidnoj splavi i modulira njegovo signaliziranje.

Smanjen sadržaj GM3 i njegovih preteča u mišićima štakora T1DM potvrđuje postavku da inzulinska rezistencija ne sudjeluje u patogenezi tipa 1 šećerne bolesti, uz mogući katabolički učinak struktura mišića zbog manjka inzulina.

Rezultati ovog istraživanja, odnosno nalaz povećanog sadržaja glikosfingolipida i njegovih preteča na modelu šećerne bolesti tip 2 potvrđuje dosadašnje spoznaje o ulozi glikosfingolipida u inzulinskoj signalizaciji.

## **5.2. Izražaj glikosfingolipida u bubrežnom tkivu**

U dosadašnjim istraživanjima malo je podataka o sadržaju i ulozi glikosfingolipida i gangliozida GM3 u bubrežima na modelima šećerne bolesti tip 1 (103, 106), a do sada nije istražen sadržaj glikosfingolipida na modelu šećerne bolesti tip 2. Kwak i suradnici su našli smanjeni sadržaj gangliozida GM3 u glomerulima na štakorskim modelima streptozotocinom inducirane šećerne bolesti tip 1 (103). Suprotno, Zador i suradnici su na istim modelima šećerne bolesti, u ukupnom tkivu bubrega našli povećan sadržaj GM3 uz nepromjenjenu aktivnost glukozilceramid sintaze (106).

U ovoj studiji intenzitet imunofluorescencije GM3 u tubulima T1DM štakora bio je statistički značajno veći u odnosu na kontrolnu skupinu. Također, intenzitet imunofluorescencije GM3 u glomerulima T1DM štakora bio je statistički značajno veći u odnosu na kontrolnu skupinu. U T2DM štakora pronašli smo statistički značajno povećan sadržaj GM3 u tubulima, dok se intenzitet imunofluorescencije GM3 u glomerulima T2DM nije statistički razlikovao. To su potvrdili i rezultati obojenja anti-GM3 HPTLC. Prosječni intenzitet obojenja u ukupnom glikosfingolipidno ekstraktu bubrežnog tkiva je bio dva puta veći u T1DM štakora. Manje, ali također statistički značajno povećan bio je i anti-GM3 u ukupnom glikosfingolipidnom ekstraktu bubrežnog tkiva T2DM štakora u odnosu na kontrolnu skupinu.

Nalaz povećanog sadržaja GM3 u tubulima na oba modela šećerne bolesti ukazuje na moguću ulogu GM3 u oštećenju tubula u sklopu dijabetičke nefropatije. Noviji koncept upućuje da su promjene u bubrežnim tubulima pokretači patofizioloških promjena u dijabetičkoj nefropatiji. Naime, bubrezi sudjeluju u homeostazi glukoze procesima glukoneogeneze, filtracije, reapsorpcije i metabolizma glukoze.

U stanjima hiperglikemije, heksozaminskim putem u suvišku se stvaraju UTP i NADPH, važni kofaktori u sintezi glikosfingolipida. Stvaranje glikosfingolipida tako predstavlja jedan od putova iskorištavanja suviška glukoze u ranim stadijima šećerne bolesti. NADPH je neophodni kofaktor u sintezi i dihidrosfingozina i masnih kiselina, koji su prekursori ceramida. UTP je prekursor uridin difosfoheksoza, aktiviranih šećera (UDP-glukoza i UDP-galaktoza) koji su supstrati enzima glikoziltransferaza. Proces glikozilacije ceramida do nastanka GM3 se odvija u tri stupnja, preko glukozilceramida, laktozilceramida i konačno GM3 dodavanjem sijalinske kiseline.

U hiperglikemiji potaknut je rast proksimalnih tubula i povećana je aktivnost natrij-glukoznih kotransportera tip 2 koji dovode do porasta reapsorpcije glukoze i natrija u proksimalnim tubulima. Posljedično manji dotok natrija u *makuli denzi* tubuloglomerularnom povratnom spregom povećava glomerularnu filtraciju (111).

Upravo prve promjene na bubrežima u šećernoj bolesti su glomerularna hiperfiltracija i povećanje tubula (34). I u našem istraživanju

zabilježeno je statistički značajno povećanje mase bubrega i omjera masa bubrega /masa tijela štakora u skupini štakora sa T1DM i T2DM u odnosu na kontrolne skupine, što upućuje na početne promjene u šećernoj bolesti. Bubrež je tkivo bogato GLS, posebice gangliozidom GM3, kojeg najviše ima u plazma membrani, posebno u specijaliziranim membranskim mikrodomenama tzv. lipidnim splavima i time modulira funkciju različitih receptora koji se nalaze u ovim mikrodomenama. Natrij-glukočni kotransporteri smješteni su u lipidnim splavima (108) i promijenjena aktivnost na modelu STZ inducirane šećerne bolesti ukazuje na ulogu membranskih lipida u transportnoj aktivnosti tubula (100). Povećan sadržaj GM3 u tubulima u našem istraživanju na modelu šećerne bolesti tip 1 i tip 2 ukazuje na moguće posredovanje GM3 gangliozida u početnim oštećenjima tubula u šećernoj bolesti. Također, s obzirom na zastupljenost GM3 u bubrezima i negativnog naboja koji potječe od ionizacije sijalinske kiseline pretpostavlja se i uloga GM3 u funkciji filtracijske, o naboju ovisne, membrane glomerula. Zatečeni nalaz povećanog sadržaja GM3 u glomerulima štakora T1DM i nepromjenjen nalaz sadržaja GM3 u glomerulima štakora T2DM ukazuje na moguće veće oštećenje glomerulske filtracijske membrane u tipu 1 šećerne bolesti.

Kao što je predloženo ranije, dijabetička nefropatija se može predstaviti kao "stečena sfingolipidoza" gdje molekula GM3 možda ima ulogu u patofiziologiji dijabetičke nefropatije (106).

Upravo bolje poznavanje prvih promjena na molekularnoj razini važni su za rano prepoznavanje bolesnika koji imaju povećani rizik nastanka oštećenja bubrega. Bolje razumijevanje uloge i regulacije transporta glukoze može predstavljati i mjesto djelovanja nekih novih lijekova kao što su gliflozini, inhibitori SGLT2 kojima se možda može usporiti ili zaustaviti napredovanje bubrežnog zatajenja, upravo djelujući na prvi znak oštećenja, a to je glomerularna hiperfiltracija.

Uzimajući u obzir da smo u ovoj studiji našli povećani sadržaj gangliozida GM3 u tubulima, i to na oba modela šećerne bolesti, možemo pretpostaviti o ulozi GM3 u ranoj patogenezi dijabetičke tubulopatije. Jedan od mogućih mehanizama je poremećaj natrij-glukoza kotransportera koji se nalaze u lipidnim splavima epitelnih stanica tubula bogatih glikosfingolipidima.

Ograničenje ove studije je činjenica što nisu određivani markeri oštećenja bubrežne funkcije, jer se uzelo u obzir prekratko trajanje šećerne bolesti kada se događaju tek prve molekularne promjene, dok se klinički uočljive promjene još ne očekuju i ne mogu detektirati do sada dostupnim tehnikama.

### **5.3. Izražaj gena za GM3 sintazu (St3gal5) u tkivima bubrega T1DM PCR reakcijom u stvarnom vremenu**

U našoj studiji u bubrezima T1DM štakora nađen je smanjen izražaj gena za GM3 sintazu (St3gal5) za 44% u odnosu na kontrolnu skupinu, što je u suprotnosti s nalazom povećanog sadržaja GM3 u bubrezima.

Povećani sadržaj GM3 uz smanjen izražaj gena za GM3 sintazu može se objasniti sporijom razgradnjom GM3, konverzijom GD3 u GM3 (otpuštanjem jedne sialinske kiseline) i povećanom aktivnošću GM3 sintaze.

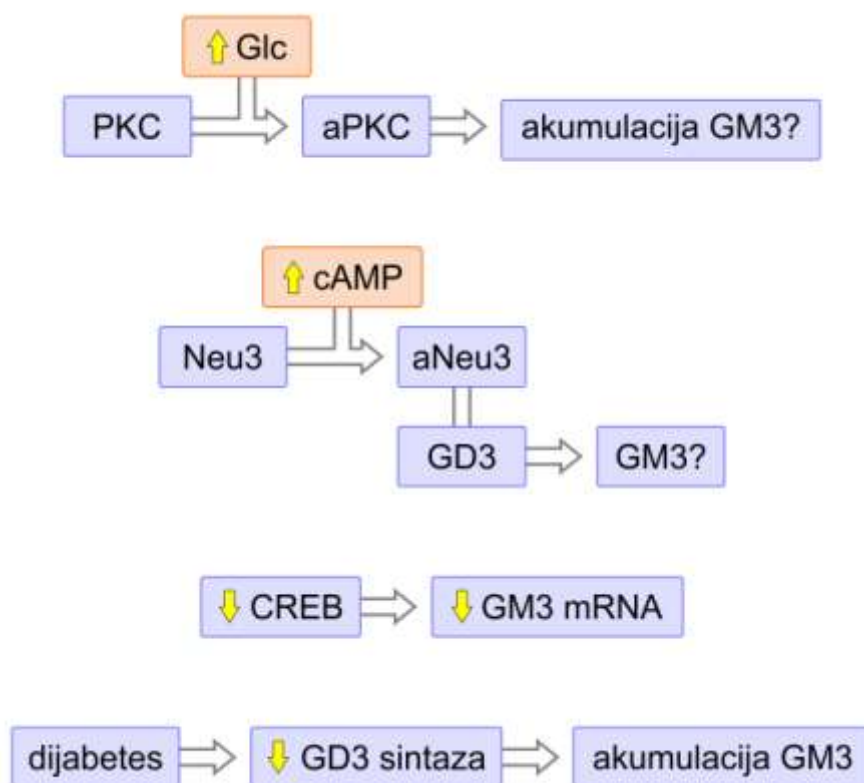
Kod povećane aktivnosti protein kinaze C dolazi do nagomilavanja nekih membranskih proteina i lipida uključujući GM1 (112) oko jezgre, prije nego što idu u lizosome ili u recikliranje do membrane. Moguće da se GM3 sporije razgrađuje i da je stoga povećan kod DM1 unatoč sniženoj razini mRNA. Nekoliko studija je pokazalo da se u stanjima hiperglikemije povećava aktivnost protein kinaze C (PKC) (113). U bubrezima kod dijabetičke nefropatije značajno je povećana aktivnost PKC (114).

Nadalje, kod T1DM povećana je razina cAMP (115) koji aktivira sialidazu Neu3 na plazma membrani (116). Neu3 katalizira otpuštanje sialinske kiseline s GD3, i tako smanjuje sadržaj GD3 a povećava GM3, jer GD3 uz Neu3, otpuštanjem sialinske kiseline prelazi u GM3. GD3 je inače, nakon GM3, drugi po zastupljenosti gangliozid u bubregu (117).

U kori bubrega na modelima *db/db* modelima šećerne bolesti pokazana je povećana aktivnost GM3 sintaze za 80%, a smanjenje aktivnosti GD3 sintaze za 50% u usporedbi s kontrolama (*db/m*) (105). Može se pretpostaviti da unatoč smanjenom izražaju mRNA za GM3 sintazu, zbog pojačane aktivnosti enzima GM3 sintaze s jedne strane i smanjene aktivnosti GD3

sintaze s druge strane dolazi do akumulacije gangliozida GM3. Vjerojatno na aktivnost ovih enzima utječu procesi fosforilacije i defosforilacije koji su poremećeni u stanjima hiperglikemije (119).

CREB protein (engl. *cAMP Response Element Binding-Protein*) potiče prijelaz mRNA za GM3 sintazu (120). Francis i suradnici su našli snižene razine mRNA za CREB kod T1DM (121) tako da sniženi nalaz mRNA za GM3 sintaze možemo tumačiti sniženom razinom CREBa (slika 12).



**Slika 12.** Moguća objašnjenja povećanog sadržaja GM3 i smanjene ekspresije GM3 sintaze

Zava i suradnici su opisali dvije izoforme ljudske GM3 sintaze nastale iz iste mRNA. Izoforme se različito glikoziliraju post-translacijskim modifikacijama i to može uzrokovati razliku u njihovoj enzimskoj aktivnosti (122). Kim i suradnici su identificirali četiri izoforme ljudske GM3 sintaze (123), dok su opisane tri izoforme mišje GM3 sintaze nastale iz dvije varijante mRNA. Različite izoforme pokazuju i različitu aktivnost. Za jednu varijantu je

npr. karakteristična brža razgradnja u lizosomima (124). U različitim tkivima nalaze različite razine jedne od izoformi GM3 sintaza. U ljudskim bubrezima u većoj količini nalazimo hSAT-1a-2 varijantu (118,123).

Inhibicija sinteze glikosfingolipida može značajno poboljšati inzulinsku osjetljivost i homeostazu glukoze te stoga može predstavljati novi terapijski pristup za liječenje šećerne bolesti. Poznavanje složenih biokemijskih mehanizma koji utječu na metabolizam i sadržaj gangliozida pomoći će u razvoju novih strategija liječenja. Kao objašnjenje naših rezultata, predloženo je nekoliko teorija (slika 12). Za dokazivanje ovih teorija, potrebna su daljnja istraživanja. PCR-om u stvarnom vremenu korištenjem različitih početnica i određivanje bubrežne aktivnosti GM3 sintaze kao i određivanje izražaja GD3 i GM2 u bubregu moglo bi razjasniti kontradikciju nalaza smanjenog izražaja GM3 sintaza i povećanog izražaja gangliozida GM3.

## 6. ZAKLJUČAK

### Izražaj glikosfingolipida u mišićima na modelima šećerne bolesti tip 1 i 2

1. Tankoslojnom kromatografijom visokog razlučivanja (HPTLC) našli smo manji sadržaj GM3 i njegovih preteča u mišićima T1DM štakora u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je kod T2DM štakora veći sadržaj GM3 i njegovih preteča u odnosu na kontrolnu skupinu.
2. Metodom imunofluorescentne mikroskopije u mišićima T1DM štakora našli smo nešto manji sadržaj GM3 u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je sadržaj GM3 bio 1,6 puta veći u T2DM štakora u odnosu na kontrolnu skupinu.
3. Povećani izražaj gangliozida GM3 u mišiću štakorskog modela šećerne bolesti tip 2 potvrđuje dosadašnja istraživanja, odnosno ukazuje da štakorski model šećerne bolesti tip 2 inducirane streptozotocinom i masnom prehranom može poslužiti za proučavanje utjecaja glikosfingolipida i farmakološkog utjecaja na inzulinsku rezistenciju umjesto dosad korištenih modela.

### Izražaj glikosfingolipida u bubrezima na modelima šećerne bolesti tip 1 i 2

1. Tankoslojnom kromatografijom visokog razlučivanja (HPTLC) našli smo dva puta veći sadržaj GM3 u ukupnom tkivu bubrega T1DM štakora u odnosu na kontrolu. Prosječni intenzitet obojenja preteča u sintezi GM3 (laktozilceramid, glukozilceramid i ceramid) orcinolom u ukupnom glikosfingolipidnom ekstraktu bubrega T1DM štakora također je bio statistički značajno veći u odnosu na kontrolnu skupinu.  
Kod T2DM štakora našli smo tek neznatno povećani sadržaj GM3 u ukupnom tkivu bubrega u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je prosječni intenzitet obojenja njegovih preteča bio statistički povećan u odnosu na kontrolnu skupinu.



2. Metodom imunofluorescentne mikroskopije u T1DM štakora našli smo 1,7 puta veći sadržaj GM3 u tubulima, dok je u glomerulima sadržaj povećan za 1,25 puta u odnosu na kontrolne skupine. U T2DM štakora značajno je veći sadržaj GM3 u tubulima dok je u glomerulima sadržaj nepromjenjen.
3. PCR metodom u T1DM nađena je smanjen izražaj gena GM3 sintaze (St3gal5) za 44% u bubrezima dijabetičkih štakora u odnosu na kontrolnu skupinu.
4. Ovaj nalaz povećanog sadržaja GM3 u tubulima u odnosu na glomerule na oba modela šećerne bolesti može upućivati na ulogu ovog gangliozida u dijabetičkoj tubulopatiji, promjenama koje imaju važnu ulogu u patogenezi dijabetičke nefropatije, najčešće mikrovaskularne komplikacije šećerne bolesti.

## 7. SAŽETAK

**Cilj studije:** Utvrditi izražaj gangliozida GM3 i njegovih glikosfingolipidnih preteča u bubregu i mišiću na štakorskim modelima šećerne bolesti tip 1 i tip 2.

**Metode:** Model šećerne bolesti tip 1 (T1DM) induciran je intraperitonejskom injekcijom streptozotocina (STZ) u dozi od 55 mg/kg, a model šećerne bolesti tip 2 (T2DM) je induciran kombinacijom manje doze STZ-a (35 mg/kg) i masne hrane (udio masti 58%). Štakori su žrtvovani dva tjedna nakon induciranja šećerne bolesti, a zatim je analiziran izražaj gangliozida GM3 i njegovih sfingolipidnih preteča u tkivu bubrega i mišića metodama tankoslojne kromatografije visokog razlučivanja (HPTLC) i imunofluorescentnom mikroskopijom. PCR reakcijom u stvarnom vremenu određivan je izražaj gena za GM3 sintaze u tkivu bubrega skupine T1DM.

**Rezultati:** U mišićima skupine T2DM statistički je značajno povećan sadržaj GM3 u odnosu na kontrolnu skupinu. Sadržaj GM3 statistički je značajno povećan u tubulima bubrega štakora T1DM i T2DM u usporedbi s pripadajućim kontrolnim skupinama. Sadržaj GM3 je statistički povećan u glomerulima T1DM štakora. PCR metodom nađena je smanjena ekspresija gena za GM3 sintazu u bubrezima štakora T1DM.

**Zaključak:** Povećani izražaj gangliozida GM3 u mišiću štakorskog modela šećerne bolesti tip 2 inducirane streptozotocinom i masnom prehranom potvrđuje dosadašnja istraživanja o posredovanju gangliozida GM3 u patogenezi šećerne bolesti tip 2. Povećani sadržaj GM3 u tubulima u oba modela šećerne bolesti može upućivati na ulogu gangliozida GM3 u patogenezi dijabetičke tubulopatije. Štakorski modeli šećerne bolesti tip 2 induciran streptozocinom i masnom hranom mogao bi se koristiti za istraživanja farmakoloških utjecaja na inzulinsku rezistenciju umjesto dosad korištenih modela.

## 8. SUMMARY

**Aim of the study:** was to determine the expression of the ganglioside GM3 and its sphingolipid precursors in kidneys and muscles in rat models of type 1 and 2 diabetes.

**Methods:** the model of type 1 diabetes (T1DM) was induced with an intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) at a dose of 55 mg/kg, the model of type 2 diabetes (T2DM) was induced with a combination of a lower dose STZ (35 mg/kg) and a high-fat diet (58% fat). Rats were sacrificed two weeks after diabetes induction and then the expression of the ganglioside GM3 and its sphingolipid precursor in kidneys and muscles was analyzed by high performance thin layer chromatography (HPTLC) and immunofluorescence microscopy. The expression of the gene for GM3 synthase in kidney for the T1DM group was determined using real-time PCR.

**Results:** In muscles of the T2DM group expression of GM3 was significantly increased compared to the control group. The expression of GM3 was significantly increased in tubules of T1DM and T2DM groups in comparison to their controls. The expression of GM3 was significantly increased in glomerules of T1DM rats. Using real time PCR method we found a decreased expression of GM3 synthase in kidneys of T1DM rats compared to controls.

**Conclusion:** Increased expression of GM3 ganglioside in muscles of rat model for type 2 diabetes induced by streptozotocin and high-fat diet confirms recently obtained results showing that ganglioside GM3 plays one of key roles in pathogenesis of type 2 diabetes. Increased expression of GM3 in tubules of both diabetes models suggest that there is a significant role of ganglioside GM3 in pathogenesis of diabetic tubulopathy. The rat model for diabetes type 2 induced by streptozocine and a high-fat diet could be a new widely used model for researching pharmacological influences on insulin resistance instead of the models that are currently used.

## 9. LITERATURA

1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2013;36 Suppl 1:S67-74.
2. American Diabetes Association. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO consultation. Part 1:diagnosis and classification of diabetes mellitus. WHO/NCD/NCS. Geneva: World Health Organization, 2003.
3. Reece EA. The history of diabetes mellitus. In: Reece EA, Coustan DR. *Diabetes mellitus in Pregnancy*. New York-Edinburgh-London-Melbourne: Churchill Livingstone, 1988;3-16.
4. Nolan CJ, Damm P, Prentki M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet*. 2011;378(9786):169-81.
5. Ravlić-Gulan J. Inzulin, glukagon i šećerna bolest. U: Guyton AC, Hall JE, ur. *Medicinska fiziologija*, 11 izdanje. Medicinska naklada. 2006;962-9.
6. Mashrani U, German MS: Pancreatic Hormones and Diabetes Mellitus. U: Gardner DG, Shoback D, ur. *Greenspan's Basic&Clinical Endocrinology*. 9. izdanje. The McGraw-Hill Companies; 2011;17:574-82.
7. Chang L, Chiang SH, Saltiel AR. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med* 2004;10(7-12):65-71.
8. MacDonald PE, Joseph JW, Rorsman P. Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005;360(1464):2211-25.
9. Pirola L, Johnston AM, Van Obberghen E. Modulation of insulin action. *Diabetologia*. 2004;47:170-84.
10. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414:799-806.
11. Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci*. 2001;26:657-64.

12. Knip M, Veijola R, Virtanen SM, Hyöty H, Vaarala O, Akerblom HK. Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005;54:S125-36.
13. Mehers KL, Gillespie KM. The genetic basis for type 1 diabetes. *Br Med Bull*. 2008;88:115-29.
14. Ounissi-Benkalha H, Polychronakos C. The molecular genetics of type 1 diabetes: new genes and emerging mechanisms. *Trends Mol Med*. 2008;14:268-75.
15. Reaven GM. Insulin resistance and its consequences. U: LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, ur. *Diabetes Mellitus: A fundamental and clinical text*. 3. izdanje. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins. 2004;899 - 915.
16. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005;365(9468):1415- 28.
17. Mlinar B, Marc J, Pfeifer M. Molekularni mehanizmi inzulinske rezistencije, pretilosti i metaboličkog sindroma. *Biochemia Medica*. 2006;16(1):8-24.
18. Hotamisligil GS, Shargill NS and Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993; 259(5091):87-91.
19. Feinstein R, Kanety H, Papa MZ, Lunenfeld B, Karasik A. Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J Biol Chem*. 1993;268(35):26055-8.
20. Youd JM, Rattigan S, Clark MG. Acute impairment of insulin-mediated capillary recruitment and glucose uptake in rat skeletal muscle in vivo by TNF-alpha. *Diabetes* 2000;49:1904-9.
21. Moller DE. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trend Endocrinol Metab* 2000;11:212-7.
22. Taguchi T, Brownlee M. Biochemical mechanisms of tissue damage. U: Pickup JC, Williams G. *Textbook of Diabetes: Selected Chapters*. 3rd ed. Blackwell Publishing Ltd; 2005;47:1-13.
23. Danne T, Weber B, Hartmann R et al. Long-term glycemic control has a nonlinear association to the frequency of back-ground retinopathy in adolescents with diabetes. *Diabetes care*. 1994;17:1390-6.

24. Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. BCL-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation endproducts in bovine endothelial cells. *J Clin Invest.* 1996; 97:1422-8.
25. Ziyadeh FN. The extracellular matrix in diabetic nephropathy. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation* 1993;22(5):736-44.
26. Mogensen CE, Christensen CK. Predicting diabetic nephropathy in insulin dependent patients. *N Engl J Med.* 1984;311:89-93.
27. Mogensen CE. Glomerular filtration rate and renal plasma flow in short term and long-term juvenile diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest.* 1971;28:91-100.
28. Thomson SC, Vallon V, Blantz RC. Kidney function in early diabetes: the tubular hypothesis of glomerular filtration. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;286:F8-15.
29. Bakris GL, Fonseca VA, Sharma K, Wright EM. Renal sodium-glucose transport: role in diabetes mellitus and potential clinical implications. *Kidney Int.* 2009;75(12):1272-7.
30. Nair S, Wilding JPH. Sodium Glucose Cotransporter 2 Inhibitors as a New Treatment for Diabetes Mellitus. *JCEM.* 2010;95(1):34-42.
31. Rasch R, Dørup J. Quantitative morphology of the rat kidney during diabetes mellitus and insulin treatment. *Diabetologia.* 1997;40(7):802-9.
32. Vallon V, Blantz RC, Thomson S. Glomerular Hyperfiltration and the Salt Paradox in Early Type 1 Diabetes Mellitus: A Tubulo-Centric View. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:530-7.
33. Vallon V, Huang DY, Deng A, Richter K, Blantz RC and Thomson S. Salt-Sensitivity of Proximal Reabsorption Alters Macula Densa Salt and Explains the Paradoxical Effect of Dietary Salt on Glomerular Filtration Rate in Diabetes Mellitus. *J Am Soc Nephro.* 2002;13:1865–71.
34. Vallon V, Thomson SC. Renal function in diabetic disease models: the tubular system in the pathophysiology of the diabetic kidney. *Annu Rev Physiol.* 2012;74:351-75.

35. Stults CLM, Sweeley CC, Macher BA. Glycosphingolipids: Structure, biological source and properties. *Methods Enzymol.* 1989;179:167-214.
36. Varki A. Diversity in the sialic acids. *Glycobiology.* 1992;2:25-40.
37. Schauer R, Kelm S, Reuter G, Roggentin P, Shaw L. Biochemistry and role of sialic acids. In Rosenberg A. (ed). *Biology of the Sialic Acids.* Plenum Press, New York. 1995; pp.7-67.
38. Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL. *Biochemistry, V izdanje.* Freeman WH and Company, New York. 2002; p. 720-2.
39. Hakomori S. Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Ann Rev Biochem.* 1981;50:733-64.
40. Lloyd KO, Furukawa K. Biosynthesis and functions of gangliosides: recent advances. *Glycoconjugate J.* 1998;15:627-36.
41. Iber H, Kaufmann R, Pohlentz G, Schwarzmann G, Sandhoff K. Identity of GA1, GM1a and GD1b synthase in Golgi vesicles from rat liver. *FEBS Lett.* 1989;248:18-22.
42. IUPAC-IUB Commission on biochemical nomenclature. The nomenclature of lipids. *Eur J Biochem.* 1997;79:11-21.
43. Svennerholm L. Chromatographic separation of human brain gangliosides. *J Neurochem.* 1963;10:613-23.
44. Voet D, Voet JG. *Biochemistry, II izdanje.* Wiley, New York 1996.
45. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 1997;387:569-72
46. Hakomori SI, Handa K, Iwabuchi K, Yamamura S, Prinetti A. New insights in glycosphingolipid function: "glycosignaling domain", a cell surface assembly of glycosphingolipids with signal transducer molecules, involved in cell adhesion coupled with signaling. *Glycobiology.* 1998;8:xi-xvii.
47. Karlsson KA. Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. *Annu Rev Biochem.* 1989;58:309-50.
48. Hakomori S. *Glycosphingolipide. Spektrum der Wissenschaft.* 1986;juni:90-101.
49. Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:767-804.

50. Lasky LA. Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:113-39.
51. Fenderson BA, Eddy EM, Hakomori S. Glycoconjugate expression during embryogenesis and its biological significance. *Bioessays.* 1990;12:173-9.
52. Furukawa K, Arita Y, Satomi N, Eisinger M, Lloyd KO. Tumor necrosis factor enhances GD3 ganglioside expression in cultured human melanocytes. *Arch Biochem Biophys.* 1990;281:70-5.
53. Kabayama K, Sato T, Kitamura F, et al. TNF $\alpha$ -induced insulin resistance in adipocytes as a membrane microdomain disorder: involvement of ganglioside GM3. *Glycobiology.* 2005;15(1):21-9.
54. Kimata H, Yoshida A. Differential effects of gangliosides on Ig production and proliferation by human B cells. *Blood.* 1994; 84:1193-2000.
55. Gillard BK, Jones MA, Turner AA, Lewis DE, Marcus DM. Interferon- $\alpha$  alters expression of endothelial cell-surface glycosphingolipids. *Arch Biochem Biophys.* 1990; 279:122-9.
56. Igarashi Y. Functional roles of sphingosine, sphingosine-1-phosphate, and methylsphingosines: in regard to membrane sphingolipid signaling pathways. *J Biochem. (Tokyo)* 1997;122:1080-7.
57. Tiemeyer MP, Swank-Hill MP, Schnaar RL. A membrane receptor for gangliosides is associated with central nervous system myelin. *J Biol Chem.* 1990;265:11990-9.
58. Prokazova NV, Samoilova NN, Gracheva EV, Golovanova NK. Ganglioside GM3 and its biological functions. *Biochemistry (Moscow).* 2009;74:235-49.
59. Zeller CB, Marchase RB. Gangliosides as modulators of cell function. *Am J Physiol.* 1992;262:C1341-C1355.
60. Ishii A, Ohta M, Watanabe Y, et al. Expression cloning and functional characterization of human cDNA for ganglioside GM3 synthase. *J Biol Chem.* 1998;273(48):31652-5.
61. Takashima S. Characterization of Mouse Sialyltransferase Genes: Their Evolution and Diversity. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008;72:1155-67.



62. Yamashita T, Hashiramoto A, Haluzik M, et al. Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:3445–9.
63. Toledo MS, Suzuki E, Handa K, Hakomori S. Effect of ganglioside and tetraspanins in microdomains on interaction of integrins with fibroblast growth factor receptor. *J Biol Chem*. 2005;280:16227–34.
64. Toledo MS, Suzuki E, Handa K, Hakomori S. Cell growth regulation through GM3-enriched microdomain (glycosynapse) in human lung embryonal fibroblast WI38 and its oncogenic transformant VA13. *J Biol Chem*. 2004;279: 34655–64.
65. Mukherjee P, Faber AC, Shelton LM, et al. Ganglioside GM3 suppresses the proangiogenic effect of vascular endothelial growth factor and ganglioside GD1a. *Journal of lipid research*. 2008;Vol 49:929-38.
66. Rebbaa A, Hurh J, Yamamoto H, Kersey DS, Bremer EG. Ganglioside GM3 inhibition of EGF receptor mediated signal transduction. *Glycobiology*. 1996;6:399-406.
67. Noll EN, Lin J, Nakatsuji Y, Miller RH, Black PM. GM3 as a novel growth regulator for human gliomas. *Exp Neurol*. 2001;168:300-9.
68. Fujimoto Y, Izumoto S, Suzuki T, et al. Ganglioside GM3 inhibits proliferation and invasion of glioma. *Neurooncol*. 2005;71:99-106.
69. Kawamura S, Ohyama C, Watanabe R, et al. Glycolipid composition in bladder tumor: a crucial role of GM3 ganglioside in tumor invasion. *Int J Cancer*. 2001;94:343-7.
70. Wang XQ, Sun P, Paller AS. Ganglioside GM3 blocks the activation of epidermal growth factor receptor induced by integrin at specific tyrosine sites. *J Biol Chem*. 2003;278:48770-8.
71. Wang XQ, Sun P, Go L, Koti V, Fliman M, Paller AS. Ganglioside GM3 promotes carcinoma cell proliferation via urokinase plasminogen activator-induced extracellular signal-regulated kinase-independent p70S6 kinase signaling. *J Invest Dermatol*. 2006; 6:2687-96.
72. Mitsuzuka K, Handa K, Satoh M, Arai Y, Hakomori SA. Specific microdomain ("glycosynapse 3") controls phenotypic conversion and

- reversion of bladder cancer cells through GM3-mediated interaction of alpha3beta1 integrin with CD9. *J Biol Chem.* 2005;280:35545-53.
73. Satoh M, Ito A, Nojiri H, et al. Enhanced GM3 expression, associated with decreased invasiveness, is induced by brefeldin A in bladder cancer cells. *Int J Oncol.* 2001;19:723-31.
74. Kawakami Y, Kawakami K, Steelant WF, et al. Tetraspanin CD9 is a "proteolipid," and its interaction with alpha 3 integrin in microdomain is promoted by GM3 ganglioside, leading to inhibition of laminin-5-dependent cell motility. *J Biol Chem.* 2002;277:34349-58.
75. Ono M, Handa K, Sonnino S, Withers DA, Nagai H, Hakomori S. GM3 ganglioside inhibits CD9-facilitated haptotactic cell motility: coexpression of GM3 and CD9 is essential in the downregulation of tumor cell motility and malignancy. *Biochemistry.* 2001;40:6414-21.
76. Ladisch S, Becker H, Ulsh L. Immunosuppression by human gangliosides: I. Relationship of carbohydrate structure to the inhibition of T cell responses. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1125:180-8.
77. Zhu Y, Gumlaw N, Karman J, et al. Lowering glycosphingolipid levels in CD4+ T cells attenuates T cell receptor signaling, cytokine production, and differentiation to the Th17 lineage. *J Biol Chem.* 2011;286:14787-94.
78. Inokuchi J. Physiopathological function of hematoside (GM3 ganglioside). *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2011;87(4):179-98.
79. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. *Diabetes.* 2005;54:1615-25.
80. Hommelgaard AM, Roepstorff K, Vilhardt F, Torgersen ML, Sandvig K, van Deurs B. Caveolae: stable membrane domains with a potential for internalization. *Traffic.* 2005;6(9):720-4.
81. Inokuchi J. Membrane microdomains and insulin resistance. *FEBS Lett.* 2010;584(9):1864-71.
82. Tagami S, Inokuchi JJ, Kabayama K, et al. Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance. *J Biol Chem.* 2002;277(5):3085-92.

83. Kabayama K, Sato T, Saito K, et al. Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(34):13678-83.
84. Guo D, Donner DB. Tumor necrosis factor promotes phosphorylation and binding of insulin receptor substrate 1 to phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 1996;271:615-8.
85. Inokuchi J, Radin N. Preparation of the active isomer of 1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol, inhibitor of murine glucocerebrosidase. *J Lipid Res*. 1987;28:565-71.
86. Cho H, Mu J, Kim JK, et al. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2(PKB beta). *Science*. 2001;292:1728-31.
87. Chavez JA, Knotts TA, Wang LP, et al. A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *J Biol Chem*. 2003;278:10297-303.
88. Chavez JA, Holland WL, Bar J, et al. Acid ceramidase overexpression prevents the inhibitory effects of saturated fatty acid on insulin signaling. *J Biol Chem*. 2005;280:20148-53.
89. Summers SA. Sphingolipids and insulin resistance: the five Ws. *Current Opinion in Lipidology*. 2010;21:128-35.
90. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259:87-91.
91. Langeveld M, Ghauharali KJ, Sauerwein HP, et al. Type I Gaucher disease, a glycosphingolipid storage disorder, is associated with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(3):845-51.
92. Aerts JM, Ottenhoff R, Powlson AS, et al. Pharmacological inhibition of glucosylceramide synthase enhances insulin sensitivity. *Diabetes*. 2007;56(5):1341-9.
93. Zhao H, Przybylska M, Wu IH, et al. Inhibiting glycosphingolipid synthesis improves glycemic control and insulin sensitivity in animal models of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2007;56(5):1210-8.

94. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin N Am.* 2004;88:787-835.
95. Holland WL, Summers SA. Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocr Rev.* 2008;29(4):381-402.
96. Summers SA, Garza LA, Zhou H, Birnbaum MJ. Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Mol Cell Biol.* 1998;18(9):5457-64.
97. Cheng ZJ, Singh RD, Wang TK, et al. Stimulation of GLUT4 (glucose transporter isoform 4) storage vesicle formation by sphingolipid depletion. *Biochem J.* 2010;427(1):143-50.
98. Strackowski M, Kowalska I. The Role of Skeletal Muscle Sphingolipids in the Development of Insulin Resistance. *The Review of Diabetic Studies.* 2008;5:13-24.
99. Turinsky J, O'Sullivan DM, Bayly BP. 1,2-Diacylglycerol and ceramid levels in insulin resistant tissues of the rat in vivo. *J Biol Chem.* 1990;265:16880-5.
100. Cowart LA. Glycosphingolipids and kidney disease. In *Sphingolipids and Metabolic Disease*, Landes Bioscience. 2011;121-31.
101. Hakomori I. Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *J Biol Chem.* 1990;265:18713-6.
102. Masson E, Wiernsperger N, Lagarde M, El Bawab S. Involment of ganglioside in glucosamine-induced proliferation decrease of retinal pericytes. *Glycobiology.* 2005;15:585-91.
103. Kwak DH, Rho YI, Kwon OD, et al. Decreases of ganglioside GM3 in streptozotocin-induced diabetic glomeruli of rats. *Life Science.* 2003;72:1997-2006.
104. Andrews PM. Glomerular epithelial alterations resulting from sialic acid surface coat removal. *Kidney International.* 1979;15:376–85.
105. Masson E, Troncy L, Ruggiero D, Wiernsperger N, Lagarde M, El Bawab S. a-Series Gangliosides Mediate the Effects of Advanced Glycation End

- Products on Pericyte and Mesangial Cell Proliferation. *Diabetes*. 2005;54:220-7.
106. Zador IZ, Deshmukh GD, Kunkel R, Johnson K, Radin NS, Shayman JA. A role for glycosphingolipid accumulation in the renal hypertrophy of streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1993;91(3):797-803.
  107. Masson E, Wiernsperger N, Lagarde M, Ei Bawab S. Glucosamine induces cell-cycle arrest and hypertrophy of mesangial cells: implication of gangliosides. *Biochem J*. 2005;388:537-44.
  108. Welker P, Böhlick A, Mutig K, et al. Renal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter activity and vasopressin-induced trafficking are lipid raft-dependent. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;295(3):F789-802.
  109. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res*. 2005;52(4):313-20.
  110. Rerup CC. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev*. 1970;22(4):485-518.
  111. Albertoni Borghese MF, Majowicz MP, Ortiz MC, Passalacqua MR, Sterin Speziale NB, Vidal NA. Expression and activity of SGLT2 in diabetes induced by streptozotocin: relationship with the lipid environment. *Nephron Physiol*. 2009;112(3):p45-52.
  112. Alvi F, Idkowiak-Baldys J, Baldys A, Raymond JR, Hannun YA. Regulation of membrane trafficking and endocytosis by protein kinase C: emerging role of the pericentron, a novel protein kinase C-dependent subset of recycling endosomes. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007;64(3):263-70.
  113. Derubertis FR, Craven PA. Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes. Mechanisms and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Diabetes*. 1994;43(1):1-8.
  114. Wang H, Jiang YW, Zhang WJ, et al. Differential activations of PKC/PKA related to microvasculopathy in diabetic GK rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012; 302(2):E173-182.

115. Chiappe CGE. Cyclic AMP, adenylate cyclase and cyclic AMP-phosphodiesterase activities in diabetic rat adipocytes. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam*. 1986;36(1):39-46.
116. Azuma Y, Sato H, Higai K, Matsumoto K. Enhanced expression of membrane-associated sialidase Neu3 decreases GD3 and increases GM3 on the surface of Jurkat cells during etoposide-induced apoptosis. *Biol Pharm Bull*. 2007;30(9):1680-4.
117. Saito M, Sugiyama K. Gangliosides in rat kidney: composition, distribution, and developmental changes. *Arch Biochem Biophys*. 2001;386(1):11-16.
118. Uemura S, Yoshida S, Shishido F, Inokuchi J. The cytoplasmic tail of GM3 synthase defines its subcellular localization, stability, and in vivo activity. *Mol Biol Cell*. 2009;20(13):3088-100.
119. Yu RK, Bieberich E. Regulation of glycosyltransferases in ganglioside biosynthesis by phosphorylation and dephosphorylation. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;177(1-2):19-24.
120. Choi HJ, Chung TW, Kang NY, et al. Transcriptional regulation of the human GM3 synthase (hST3Gal V) gene during monocytic differentiation of HL-60 cells. *FEBS Lett*. 2003;555(2):204-8.
121. Francis G, Martinez J, Liu W, et al. Intranasal insulin ameliorates experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*. 2009;58(4):934-45.
122. Zava S, Milani S, Sottocornola E, Berra B, Colombo I. Two active and differently N-glycosylated isoforms of human ST3Gal-V are produced from the placental mRNA variant by a leaky scanning mechanism. *FEBS Lett*. 2010;584(8):1476-80.
123. Kim KW, Kim SW, Min KS, Kim CH, Lee YC. Genomic structure of human GM3 synthase gene (hST3Gal V) and identification of mRNA isoforms in the 5'-untranslated region. *Gene*. 2001;273(2):163-71.
124. Uemura S. The regulation of ganglioside GM3 synthesis. *Yakugaku Zasshi*. 2012;132(8):895-901.
125. Vallon V, Wead LM, Blantz RC: Renal hemodynamics and plasma and kidney angiotensin II in established diabetes mellitus in rats: Effect of sodium and salt restriction. *J Am Soc Nephrol*. 1995;5:1761-7.

## 10. ŽIVOTOPIS

**Datum rođenja:** 14. kolovoza 1970. godine  
**Mjesto rođenja:** Split  
**Adresa :** Tavelićeva 48, Split  
**Adresa ustanove:** KBC Split, lokalitet Križine, Šoltanska 1, 21 000 Split  
**e-pošta:** anovak@mefst.hr  
**Bračni status:** udana, majka jednog djeteta

### OBRAZOVANJE :

1988 – 1994 Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Studij u Splitu  
2002 – 2006 Specijalizacija interne medicine u Kliničkoj bolnici Split i  
Kliničkoj bolnici "Sestre milosrdnice" Zagreb  
2003 – 2005 Poslijediplomski doktorski studij iz Kliničke medicine,  
Medicinski Fakultet Sveučilišta u Splitu  
2006 Položen specijalistički ispit iz interne medicine  
2008 – 2010 Subspecijalizacija iz endokrinologije i dijabetologije  
(KBC Split i KBC Zagreb)

### STRUČNO ISKUSTVO:

1995 – 1996 KB Split  
1997 – 2002 DZ Split  
2002 – do danas KBC Split (spec. interne medicine)  
2010 – do danas Subspecijalist endokrinologije i dijabetologije  
2010- do danas Asistent na Katedri Kliničke propedeutike Medicinskog  
fakulteta Sveučilišta u Splitu

## **ZNASTVENI RADOVI:**

1. Novak A, Režić Mužinić N, Čikeš Čulić V, Božić J, Tičinović Kurir T, Ferhatović L, Puljak L, Markotić A. Renal distribution of ganglioside GM3 in rat models of types 1 and 2 diabetes. *J Physiol Biochem.* 2013;(In press)
2. Ferhatovic L, Banozic A, Kostic S, Ticinovic Kurir T, Novak A, Vrdoljak L, Heffer M, Sapunar D, Puljak L. Expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and pain-related behavior in rat models of type 1 and type 2 diabetes. *Anesth Analg.* 2013;116(3):712-21.
3. Vlak T, Labar L, Sapina G, Novak A, Sabić M. The influence of teriparatide (Forteo) on low back pain incidence in postmenopausal osteoporotic woman. *Reumatizam.* 2007;54(2):93-5.
4. Tičinović Kurir T, Božić J, Markotić A i Novak A. Nove spoznaje o steroidnom dijabetesu. *Acta med croatica.* 2012;66:303-10

## **Knjige**

Tičinović-Kurir Tina, Patofiziologija endokrinopatija, Patofiziologija kroničnih komplikacija šećerne bolesti

## **Sudjelovanje na kongresima**

Bozic J, Novak A, Ticinovic Kurir T, Rezic-Muzinic N, Cikes-Culic V, Puljak L, Ferhatovic L, Markotic A, Valic Z. Analysis of renal ganglioside GM3 distribution in rat models of type 1 and type 2 diabetes FASEB J April 9, 2013 27:702.2

Bozic J, Ticinovic Kurir T, Novak A, Supe-Domic D, Salamunic I, Jurin Z, Bilopavlovic N, Valic M and Valic Z. Difference in bone metabolism between experienced SCUBA divers and controls FASEB J April 9, 2013 27:712.21

Božić J, Novak A, Mastelić A, Tičinović Kurir T, Terzić J, Čikeš Čulić V, Ferhatović L, Krnić M, Puljak L and Markotić A, Increased expression of renal



ganglioside GM3 and decreased expression of GM3 synthase mRNA in the rat model of type 1 diabetes. Hrvatski dijabeološki kongres 2013.Pula

Božić J, Tičinović Kurir T, Novak A, Vučemilović H, Puljak L and Markotić A, Comparison of muscular ganglioside GM3 expression in the rat models of type 1 and type 2 diabetes. Hrvatski dijabeološki kongres 2013.Pula

Valic Z, Bozic J, Ticinovic Kurir T, Novak A, Supe-Domic D and Valic M. Increased bone mineral density in experienced SCUBA divers FASEB J March 29, 2012 26:1082.4

Ferhatovic L, Banozic A, Kostic S, Kurir Ticinovic T, Novak L, Vrdoljak L, Sapunar D, Puljak L. Sensory changes and increase of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II in animal models of diabetes type 1 and 2. Presentation number: PF246. 14th World Congress on Pain. Milan, Italy. August 27-31, 2012.

Novak A, Kokić S, Hrvatske smjernice za liječenje šećerne bolesti tipa 2 i implementacija Saborske rezolucije o šećernoj bolesti, 69. dani dijabetologa Hrvatske, Medix. 2011;96.

Tonkić A, Pešutić-Pisac V, Alfirević D, Tonkić M, Miše S, Šundov Ž, Šimunić M, Novak A, Titlić M, Maras-Šimunić M, Miše S. Gastric Cancer in Southern Croatia/ Sikirić, Predrag ; Seiwert, Sven ; Mozsik, Gyula, Tetsuo ; Arakawa, Koji Takeuchi (ur.). - Bologna : Medimond , 2003. 133-137. 11th International Conference on Ulcer research Dubrovnik, Hrvatska, 15-20.09.2003.

Tonkic A, Pesutic-Pisac V, Alfirevic D, Tonkic M, Miše S, Šundov Z, Novak A, Titlic M, Mise S, Maras-Simunic M. Colorectal carcinoma in Southern Croatia. Monduzzi Editore / Predrag Sikiric, Sven Seiwert, Gyula Mozsik, Tetsuo Arakawa, Koji Takeuchi (ur.). - Bologna : 11th International conference on ulcer research Dubrovnik, Hrvatska, 15-20.09.2003.

**STRANI JEZICI:**

- aktivno poznavanje engleskog jezika
- završen drugi stupanj tečaja talijanskog jezika

**ČLANSTVA:**

Hrvatski liječnički zbor

Hrvatska liječnička komora

Hrvatsko endokrinološko društvo

Hrvatsko dijabetološko društvo

Endocrinology World Association

Sudjelovala na brojnim domaćim i međunarodnim kongresima i simpozijima kao slušatelj i predavač