

Distribucija gangliozida u mozgu štakora oboljelih od dijabetesa tipa 2

Žiroš, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:184246>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)





URJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

OBOLJ ZA BIOLOGIJU

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Ana Žiroš

**Distribucija gangliozida u mozgu štakora oboljelih od dijabetesa
tipa 2**

Završni rad

Osijek, 2018.

 **PDF**
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

ICA

Završni rad

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski sveučilišni studij Biologija
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Distribucija gangliozida u mozgu štakora oboljelih od dijabetesa tipa 2

Ana Ćirođ

Rad je izrađen na: Zavodu za zoologiju, Odjel za biologiju

Mentor: Prof. dr.sc. Marija Heffer

Neposredni voditelj: Doc.dr. sc. Irena Labak

Kratak sažetak završnog rada

Gangliozidi, vrsta glikosfingolipida, izraženi su u velikom broju u mozgu kao i u drugim tkivima, organima i stanicama. Razna istraživanja su pokazala njihov raspored i količinu u normalnom mozgu te mozgu oboljelih od dijabetesa tipa 2. GM3 se u većini istraživanja navodi kao gangliozid koji sudjeluje u stvaranju inzulinske rezistencije, a time i u patofiziologiji dijabetesa tipa 2, što je detaljnije razjašnjeno u tekstu.

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: štakori, dijabetes tip 2, gangliozidi, GM3, miševi

Rad je pohranjen: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.



BASIC DOCUMENTATION CARD
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Biology
Undergraduate university study programme in Biology
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Biology

Bachelor's thesis

Distribution of gangliosides in the rat's brain suffering from type 2 diabetes

Ana Ćirođ

Thesis performed at: Department of Biology, J.J. Strossmayer University in Osijek Sub-department of the Zoology

Supervisor: Pf.D. Marija Heffer, Professor

Cosupervisor: Irena Labak, PhD, Assistant Professor

Short abstract

Gangliosides, the subgroup of glycosphingolipids, are expressed mostly in the brain. We can also find them in other tissues, organs, and cells. Various research shows their distribution and their amount in normal brain and in brain of people who suffer from type 2 diabetes. GM3 is in most studies referred as ganglioside that is involved in insulin resistance, and in the pathophysiology of type 2 diabetes too, which is in detail explained below.

Original in: Croatian

Key words: rats, diabetes type 2, ganglioside, GM3, mice

Thesis deposited: on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

Ćelernu bolest (lat. *diabetes mellitus*) definiramo kao skup poremećaja u metabolizmu bjelanjčevina, masti i ugljikohidrata, te se smatra petim najčešćim uzročnikom smrti u svijetu (Shi i Hu 2014). Moćemo ju podijeliti u četiri skupine, od kojih klinički dominira dijabetes tipa II, te se u pretkliničkom stadiju inzulinska rezistencija (IR) javlja kao skup znakova i sindroma koji nastaju zbog neispravnog izlučivanja inzulina. Utjecaj dijabetesa na središnji živčani sustav postalo je veliko područje interesa, te su do sada provedena brojna istraživanja koja pokazuju veliku promjenu metabolizma dijabetičkog mozga (Mans i sur. 1988; Krukoff i Patel 1990). Pokazalo se kako koncentracija glukoze u dijabetičkom mozgu opada kao posljedica hiperglikemije, te utječe i na metabolizam neurotransmitera u mozgu (Mooradian i Morin 1991; Bellush i Reid 1991). Broj oboljelih u konstantnom je porastu, te prema istraživanjima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, eng. *World Health Organization*) danas od dijabetesa pati više od 400 milijuna ljudi u svijetu, od čega sve više djece (Web1).

Hiperglikemija biva najčešće uzrokovana nedovoljnim djelovanjem ili lučenjem inzulina, no moguća je i kombinacija oba poremećaja (Kokić 2009). S ciljem identificiranja mehanizama koji mogu postaviti temelje za hiperglikemiju te pomoći razvijanju novih terapija za liječenje dijabetesa, razvijeni su razni životinjski modeli za istraživanje dijabetesa. Čakor se pokazao kao najdominantniji model zbog karakteristika navedenih u daljnjem tekstu, te ga PubMed navodi kao glavnu eksperimentalnu životinju u više od milijun istraživanja.

Gangliozidi su glavni glikolipidi neuronskih plazmatskih membrana. Njihova hidrofobna membranska sidra, ceramidni ostatci, nastaju u endoplazmatskom retikulumu (ER), galaktozacija ceramida odvija se na Golgiu i trans-Golgijevoj mreži (TGN, eng. *trans-Golgi network*), a njihova konstitutivna degradacija uglavnom u endolizosomskom odjeljku (Kolter i Sandhoff 1999). Iako se u centralnom živčanom sustavu nalaze mnogobrojni gangliozidi, dominantna su samo četiri: GM1, GD1, GD1b i GT1b. GM1 se u živčanom sustavu nalazi pretežitom oko sinapsi i djeluje kao membranski stabilizator koji blokira neuronsku staničnu smrt, te pri dijabetičkoj hiperglikemiji utječe na degeneraciju neurona. Najjednostavniji gangliozid, GM3, ima važnu ulogu u mehanizmu djelovanja inzulinskih receptora, čija signalizacija proizlazi iz glikosfingolipidno obogaćene membranske membrane (lipidnih splavi) koji sadrže gangliozide. Smanjenje njegove koncentracije bitno smanjuje inzulinsku rezistenciju, stoga je GM3 gangliozid opisan kao negativni regulator signalizacije inzulinskog receptora. Također je

a autofosforilaciju topljivih receptora, što upućuje na receptora (Nojiri i sur. 1991).

U radu je detaljnije opisana povezanost GM3 gangliozida s IRS-1 (eng. *insulin receptor substrate 1*) te kako preko signalne kaskade IR-IRS-PI3-kinaza (IR i *insulin receptor* -> IRS i *insulin receptor substrate* -> PI3 kinaza) utječe na inzulinsku rezistenciju te kako se distribuiraju gangliozidi pri normoglikemiji (u zdravom mozgu) te u hiperglikemiji, tj. dijabetičkom mozgu.

2. OSNOVNI DIO

2.1. Klasifikacija šećerne bolesti

Simptomi šećerne bolesti karakterizirani su naglim gubitkom tjelesne težine koji se javlja unatoč povećanoj gladi i žeđi, konstantnim stvaranjem osjećaja umora te čestim uriniranjem (Web1; Kokić 2009). Tolerancija glukoze ima tri stupnja:

- 1) normoglikemija
- 2) IGT ili eng. *impaired glucose tolerance*
- 3) šećerna bolest.

Šećerna bolest može se podijeliti u 4 skupine: šećerna bolest tip I, šećerna bolest tip II, drugi specifični tipovi te gestacijska šećerna bolest.

Tip I šećerne bolesti pretežitom se razvija u djetinjstvu, te je poznat kao juvenilni tip dijabetesa. Unatoč vjerovanju da bolest ima nagli početak, autoimuni proces započinje godinama ranije. Nastaje kao posljedica autodestrukcije β -stanica Langerhansovih otočnika, te obuhvaća 5-10% ukupnih bolesnika sa šećernom bolešću (Tateishi i sur. 2008). Bolest se očituje hiperglikemijom i ketoacidozom nakon što je više od 90% β -stanica uništeno, a genetička podloga bolesti povezana je s HLA lokusom na kromosomu 6p21. U bijelaca više od 90% bolesnika posjeduje HLA-DR3 ili HLA-DR4 alele, ili oba, dok ih opća populacija posjeduje oko 40%. Ukoliko se šećerna bolest tipa I pojavi u starijoj dobi, moguć je razvoj Gravesove, Addisonove te drugih autoimunih bolesti.

Šećerna bolest tipa II obuhvaća 90-95% bolesnika. Većina oboljele populacije starija je od 40 godina, no zbog vođenja nezdravog načina života i manjka tjelesne aktivnosti nerijetko se pojavljuje i u djetinjstvu te adolescentskoj dobi. Uzrokovana je kombinacijom inzulinske

tijelo ne može iskoristavati inzulin kojega proizvodi. e pretilo, a kao odgovor nastaje stanje hiperinzulinizma kojim organizam pokušava održati normalne razine glukoze u krvi. Na posljétku dolazi do hiperglikemije i pada razine inzulina.

U druge specifične tipove pripadaju etiološki svrstani tipovi šećerne bolesti, poput monogenetskih defekta β -stanica, genetičkih defekata u inzulinskoj aktivnosti, bolesti egzokrinog dijela gušterače i drugi. Šećerna bolest također se može pojaviti i uz različite genetičke sindrome, poput Downovog ili Klinefelterovog sindroma.

Gestacijska šećerna bolest pojavljuje se kao odgovor na netoleranciju glukoze koja nastaje u vrijeme trudnoće. U većini slučajeva razina glukoze normalizira se nakon porođaja, no neke bolesnice i dalje pokazuju znakove poremećenog metabolizma glukoze i nakon trudnoće (Damjanov i sur. 2014).

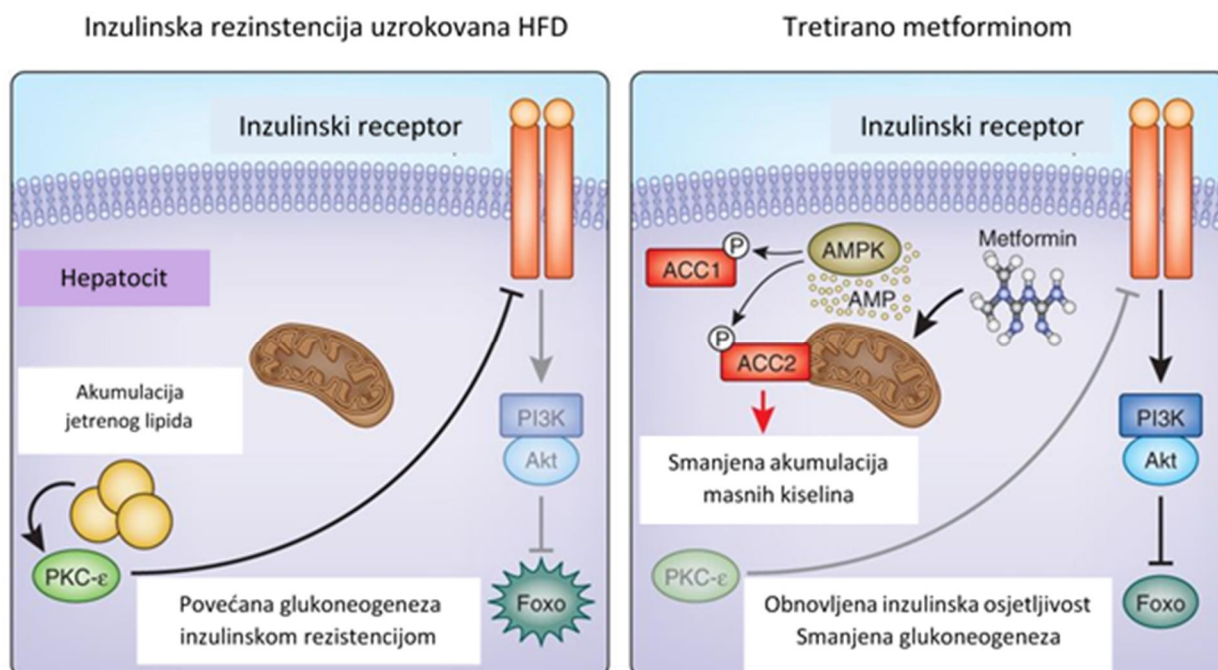
2.1.1. Patofiziologija dijabetesa tipa 2

Dijabetes tipa 2 je najčešći oblik dijabetesa i ja je patofiziologija dosta složena zbog uključenosti brojnih poremećaja fizioloških mehanizama u njen nastanak. Najvažniji od mehanizama su neenzimska glikozilacija proteina, aktivacija protein-kinaze C te unutarstanična hiperglikemija s poremećenim metabolizmom poliola (Damjanov i sur. 2014). Karakterizira ga pretilost, a raspodjela masnog tkiva kao zalihe energije i kao organa koji komunicira s ostalim organima i tkivima u tijelu, u organizmu igra bitnu ulogu.

Tijekom ove bolesti, zbog inzulinske rezistencije dolazi do hiperglikemije koja može biti posljedica pojačanog stvaranja glukoze procesom glukoneogeneze u jetri, kao i razgradnje glikogena procesom glikolize. Inzulinska rezistencija zapravo predstavlja odgovor inzulinskog receptora na inzulin koji je puno manji nego što bi trebao biti u normalnim uvjetima. Zbog slabijeg ulaska glukoze u periferna tkiva, dolazi do pojačavanja direktnog lučenja inzulina iz gušterače (Kokić 2013). Osim inzulinske rezistencije, moguća je i rezistencija na leptin koja dovodi do nakupljanja lipida u mišićima, jetri, gušterači te srcu. Osim pretilosti kao glavnog čimbenika inzulinske rezistencije, navodi se i oksidativni stres, točnije slobodni kisikovi radikali (ROS, eng. *Reactive oxygen species*). Te jedinice oštećuju DNA, a nastanak velikih količina započinje zbog hiperglikemije te visoke koncentracije masnih kiselina, koje fiziološki mehanizmi ne uspiju neutralizirati i odstraniti u potpunosti (Kokić 2013; Valko i sur. 2007).

Osim rada na intenzivnom smanjenju tjelesne težine, povećanom fizičkom aktivnošću i kontroliranom prehranom (kontrola unosa ugljikohidrata, masti i kolesterola, soli i alkohola) osobama oboljelih od dijabetesa tipa 2 prilikom liječenja daju se inzulinski pripravci, betacitotropni ili nebetacitotropni lijekovi.

Metformin je jedan od značajnijih nebetacitotropnih lijekova koji djeluje s ciljem smanjivanja otpornosti na inzulin u perifernim tkivima i jetri (Slika 1). Ujedno smanjuje i resorpciju glukoze u crijevima (Zjačič-Rotković 2009). Rösen i Wiernspergen (2006) su istraživanjem na glatorima dokazali da liječenjem ovim lijekom dolazi do povećavanja antioksidativne aktivnosti, što upućuje da metformin utječe na redukciju oksidativnog stresa koji se smatra jednim od čimbenika inzulinske rezistencije. Time ujedno smanjuje i rizik od nastajanja dijabetesa tipa 2, kao i ostalih poremećaja i komplikacija koji su vezani uz ovu bolest današnjice. Glavni predstavnik betacitotropnih lijekova je liraglutid koji poboljšava funkciju i masu beta stanica. Osim toga, umanjuje apetit te time indirektno utječe na tjelesnu masu. Djeluje tako da inhibira dipeptidil-peptidazu-4 ili DPP-4 pri čemu dolazi do smanjenja koncentracije glukoze u krvi (Novak i Metelko 2011; Montanya i Sesti 2009).



Slika 1. Djelovanje metformina na snižavanje akumulacije lipida i vraćanje inzulinske osjetljivosti (Preuzeto i prilagođeno prema Shaw 2013)

Čivotinjski modeli dijabetesa tipa 2 uključuju modele inzulinske rezistencije i/ili modele s disfunkcionalnim beta stanicama jetre. Metabolička fiziologija gljatora u mnogo emu odgovara ljudskom organizmu, uključujući i djelovanje raznih imbenika (npr. toksina, stresa, cjepiva, é) na oblikovanje bolesti (Iannaccone i Jacob 2009), zbog ega su vrlo korišteni u istraživanjima povezanim s dijabetesom (Pokorski i sur. 2018 ; Mayyas i sur. 2018; Chao i sur. 2018; Romano i sur. 2017). Takvi modeli su pretili, što odražava ljudsko stanje u kojem je pretilost povezana s razvojem dijabetesa tipa 2. Vrsta gljatora Zucker, nastala 1961.godine nakon križanja Merckovog M-soja i Sherman gljatora, posjeduje mutirani receptor leptina (Phillips i sur. 1996) koji uzrokuje hiperfagiju, zbog ega gljatori postaju pretili nakon 4 tjedna starosti. Takvi gljatori su hiperinzulinemini, hiperlipidemini i hipertenzivni, te imaju nisku toleranciju glukoze (Srinivasan i Ramarao 2007).

Pol etkom 20. stoljeća, Reed i sur. (2000) objavljuju novi gljatorski model za istraživanje dijabetesa tipa 2, poznat kao HFD/STZ (eng. *high-fat diet/streptozotocin-diabetic rat*) model gljatora, tj. opl eniti model za dijabetes tipa 2. Cilj njihova istraživanja bio je razviti model gljatora koji simulira prirodnu patologiju progresije dijabetesa, od preddijabetesnog stanja i / ili inzulinske rezistencije na stanje dijabetesa tipa 2 i hipoinzulinemije, u kratkoj vremenskoj skali. Nakon par dana izloženosti STZ tretmanu, gljatori koji su imali povi enu razinu glukoze u krvi uključeni su u studiju i testirani na metformin. Metformin inducira snižavanje razine glukoze u krvi, što je dodatno utvrdilo HFD / STZ model kao gljatorski model dijabetesa tipa 2 koji je relevantan za ljudsko stanje.

U kognitivno-psihološkim istraživanjima, gljator se pokazao kao superiorniji i inteligentniji model od ostalih organizama, jer je u mogućnosti svladati više problemskih zadataka koji su od velike važnosti za istraživanja u području neuroznanosti. Osim što je lako dostupan te financijski isplativ, veli ina gljatora poveća njegovu upotrebu modela za bolesti zbog proporcionalnosti važnih organskih podstruktura, na kojima se jasno vidi djelovanje i povezanost utjecaja pojedinih lijekova na organe i anatomske strukture. Posljednjih godina gljator postaje glavni odabir za istraživanja u području toksikologije i psihologije, posebno u farmacijskoj industriji (Iannaccone i Jacob 2009).

Prilikom ovakvih istraživanja, znanstvenici najl e e koriste modele koji su uzgajani u kontroliranim uvjetima poput odgovarajuće temperature s dovoljnom koli inom svjetla te odre enom satnicom mraka. Čivotinje uzimaju vodu, kao i svu hranu *ad libitum*. Najl e e se

podijeljenih u skupine, od kojih jedna uvijek mora biti
ni s visokim udjelom masnoće ili na hrani bogatoj
fruktozom (Chao 2018). Radi točnosti rezultata, poželjno da se tijekom istraživanja koristi
jednak broj mužjaka i ženki koji su otprilike jednake starosti te da uvijek budu tretirani na isti
način.

Istraživanja na živim organizmima uvijek moraju biti odobrena od strane Etičkog
povjerenstva, te njima treba biti rukovano prema Hrvatskom zakonu za zaštitu životinja (Web
2) i Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (Web3).

2.3. Glikosfingolipidi

Lipidne molekule široko rasprostranjene u prirodi nazivamo glikosfingolipidima (GSL).
Nalazimo ih i u plazma membranama bakterija i ljudi, a sastoje se od ugljikohidratne
jedinice i aminoalkohola sfingozina vezanog na masnu kiselinu. Sfingozin je preko amino
skupine vezan na masnu kiselinu te oni tako čine bazu pod nazivom ceramid (Web 4).

Ceramid nastaje u tri koraka:

- 1) reakcija konjugacije L-serina i palmitoil-CoA koju katalizira serin-palmitoil
transferaza
- 2) reakcija acilacije koju katalizira ceramid sintetaza pri čemu nastaje dehidroceramid
- 3) reakcija dehidrogenacije pri čemu nastaje ceramid (Mizutani i sur. 2008).

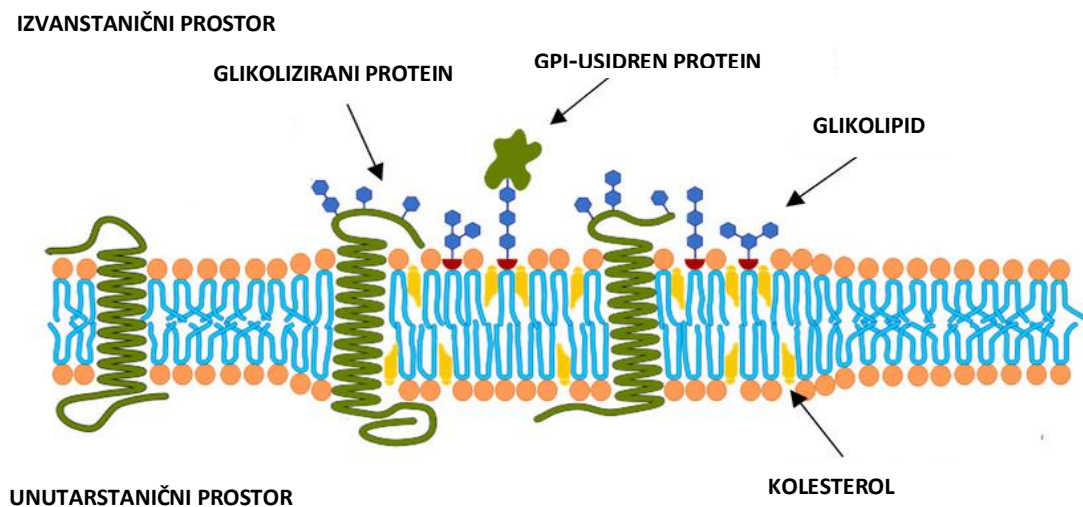
Glikosfingolipidi podklasificirani su kao neutralni (bez nabijenih gljerala ili ionskih skupina),
sijalizirani (koji imaju jedan ili više ostataka sijalinske kiseline) ili sulfatilirani. Tradicionalno,
svi sijalizirani GSL-ovi poznati su kao "gangliozi", bez obzira temelje li se na neutralnoj
gljernoj jezgri ganglio-serija (Web 5).

Glikosfingolipidi imaju više funkcija, no dvije su glavne:

- a) *trans* raspoznavanje i interakcija između stanica
- b) *cis* regulacija i modifikacija djelovanja proteina (Web 7).

Iako varijacije ceramida dodaju raznolikost na GSL strukture, glavne strukturne i funkcionalne
klasifikacije temelje se na glikanima. Prvi gljerali povezani s ceramidom u "višim" životinjama
obično su β galaktoze (GalCer, galaktoceramid) ili glukoza (GlcCer, glukoceramid), te su
ujedno i najligniji ugljikohidratni dijelovi glikosfingolipida. GalCer i njegovi analogni sulfatidi,

...e, glavni su glikani u mozgu, gdje imaju esencijalne
... je GlcCer glavni u regulaciji kože i njene propusnosti
za vodu. Ugljikohidratni dio strži u ekstracelularni prostor, izvan membrane, dok ceramid, tj.
lipidni dio glikosfingolipda zauzima mjesto unutar lipidnog dvosloja. Nisu nasumično
raspoređeni u lipidnom dvosloju već tvore pravilne strukture, tzv. lipidne splavi (eng. *small
lateral microdomains*, SML) (Web 5; Web7) (Slika 2).



Slika 2. Lipidni splav (Preuzeto i prilagođeno s Web8)

2.4. Ganglioziidi

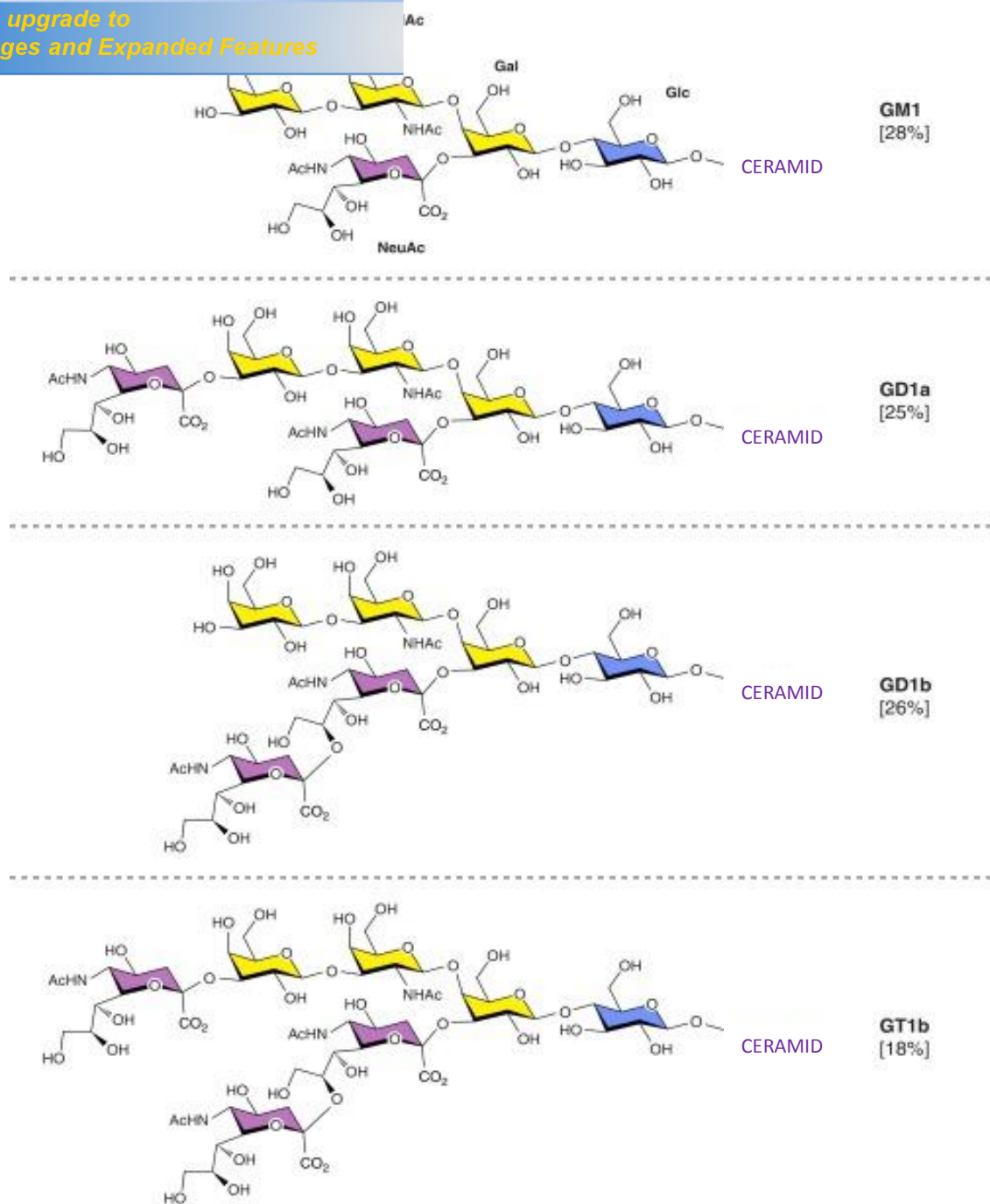
Ganglioziidi su podskupina glikosfingolipida koji su prisutni posvuda na membranama većine stanica organizma, iako najviše dominiraju u živčanom sustavu (Yu i sur. 2011). Glavni su glikolipidi neuronskih plazmatskih membrana te se sastoje od glikana pričvršćenog na ceramid. Ceramidi se sastoje od dugolanog amino alkohola sfingozina, s primarnim C2 amino-ugljikom, koji je N-acetiliran s dugolananim amidom masnih kiselina. Moždani ganglioziinski ceramidi obično imaju C1- i C2-hidroksilne grupe, te C4-C5 dvostruku vezu, s C1-hidroksilom povezanim za glikanski lanac (Sandhoff i Harzer 2013; Rösner 2003).

Ganglioze je otkrio 1930-ih Ernst Klenk (Klenk 1937;1939), kada je analizirao postmortalno moždano tkivo pacijenata s Tay-Sachsovom bolešću, kobni infantilni oblik amaurotskog idiotizma. Ganglioze GM2 koji sadrži jednu sialinsku kiselinu prvi je izoliran iz mozga žrtve Tay-Sachsove bolesti u kojoj se akumulira i nazvan je "ganglioze" temeljem svog položaja u živčanim skupinama ili "ganglionu" u mozgu. Isto tako, glukozilceramid (GlcCer) je najprije izoliran iz slezene pacijenta s Gaucherovim bolešću gdje se akumulira (Jalanko i Braulke 2009; Web 5).

U to vrijeme klinička dijagnoza "amaurotskog idiotizma" obuhvaćala je nasljednu bolest koja je karakterizirana velikim brojem lipidom-ispunjenih stanica u živčanom sustavu i visceralnim organima, mentalnoj retardaciji i oštećenju vida ili sljepoće. Uz pomoć biokemijskih, enzimskih, molekularnih genetskih, morfoloških i životinjskih studija, klinička slika amaurotskog idiotizma podijeljena je u posljednjih pet desetljeća u dvije glavne skupine bolesti na molekularnoj razini: lizosomalne ganglioze skladišne bolesti, koje uključuju GM1- ganglioze i 4 oblika GM2-ganglioze, te 10 oblika neuronskih lipofusinoza ceroida do sada slabo karakteriziranih (Jalanko i Braulke 2009).

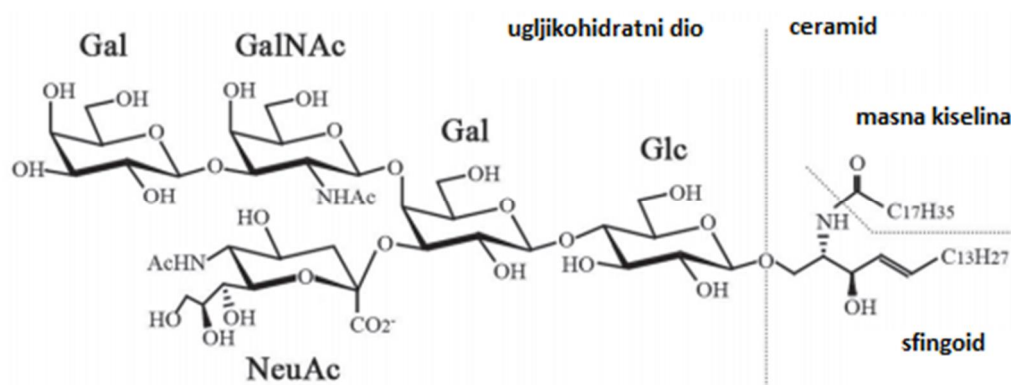
2.4.2. Biosinteza i nomenklatura ganglioza

U mozgu uvijek dominiraju samo četiri ganglioze (GM1, GD1, GD1b i GT1b) (Slika 3) koji imaju istu glikansku jezgu pričvršćenu na ceramid, ali različit broj sialinskih kiselina vezanih na različitim mjestu. Iako su prisutni i drugi gangliozi, GM1, GD1, GD1b i GT1b čine ukupno 97% moždanih ganglioza (Tettamanti i sur. 1973). Njihova se sinteza odvija postepeno pomoću glikotransferaza koje prenose svaki monosaharid iz njegove aktivne forme (UDP-Gly-UDP-Gal, UDP-GalNAc, ili CMP-NeuAc) u rastuću glikansku lanac. Ono što je do sada poznato, je da GM1 sudjeluje u ranoj mijelinizaciji, GD1a je marker sinaptogeneze, a GT1b je karakterističan za zrele neurone, no cjelokupna funkcija im još nije definirana (Rösner 2003).



Slika 3. Ćetiri glavna gangliozida u ljudskom mozgu (Preuzeto i prilagoĎeno prema Schnaar i sur. 2014.)

lji se na njihovoj grafi. Označavaju se slovima GM i mu. G označava gangliozid, a M mono, tj. jednu sialinsku kiselinu. Umjesto slova M, može se nalaziti slovo D, T, Q, P, H i S pri čemu redom označavaju da se radi o gangliozidu s dva (D), tri (T), četiri (Q), pet (P), šest (H) i sedam (S) sialinskih kiselina. Brojevi označavaju broj šećera koji su vezani za ceramid, stoga oznaka GM1 predstavlja gangliozid s jednom sialinskom kiselinom te četiri šećera vezana na bazu ceramid (Svennerholm 1963)(Slika 4).



Slika 4. Struktura GM1 (Preuzeto i prilagođeno prema Yu i sur. 2011)

Pokazalo se da GM1 smanjuje edem mozga, stabilizira neuronske stanice membrane (Sohn i sur., 2006), smanjuje ishemijsko oštećenje mozga pod normoglikemijskim uvjetima, štiti neurone od neurodegeneracije, smanjuje nastalu kognitivnu disfunkciju nakon cerebralne ishemije *in vivo* i ublažava ekscitotoksičnu neuronsku smrt *in vitro* (Wu i sur., 2001). Rezultati Zhang i sur. (2010) pokazali su da primjena GM1 značajno smanjuje broj mrtvih, degenerativnih DNA fragmenata koji nastaju uslijed dijabetičke hiperglikemije. Mehanizam neuroprotektivnih učinaka GM1 nije u potpunosti razumljiv. Jedan predloženi mehanizam je da prekomjerno oslobađanje glutamata u sinapsama aktivira NMDA receptor (NMDAR), koji naknadno povećava dotok kalcija u intracelularni prostor. Kalcij izaziva aktivaciju različitih lipaza, proteaza, DNaza i na kraju dovodi do stanice smrti (Runden-Pran i sur., 2005).

Do sada su gotovo isključivo opisani nasljedni nedostaci u biosintezi gangliozida koji uzrokuju kobne neurodegenerativne bolesti, poput Guillain-Barre sindroma, koji je izazvan autoimunim odgovorom na površinske stanice gangliozida ili Alzheimerovu bolest. Za tu bolest

ljanjem amiloid-beta peptida, te je utvrđeno brojnim
li (Matsuzaki i sur. 2010). Neki gangliozidi sudjeluju
u patofiziologiji inzulinske rezistencije, tj. u modifikaciji djelovanja inzulinskih receptora. Radi
se o gangliozidu GM3, najjednostavnijem kiselom glikosfingolipidu i je smanjenje
koncentracije u stanicama dovodi do smanjenja inzulinske rezistencije (Zhao i sur. 2007).

2.4.3. Ekstrakcija gangliozida

Da bi se mogao proučiti metabolizam i transport gangliozida, potrebno je odrediti koncentraciju i sastav ovih lipida u tjelesnim tekućinama (plazmi, cerebrospinalnoj tekućini). Za ekstrakciju glikolipida iz tkiva i stanica koriste se organska otapala, najčešće otopina kloroform-metanol-voda u različitim omjerima kako bi se istogili i uklonili proteini i nukleinske kiseline, istovremeno povećavajući topljivost glikosfingolipida (uz ostale lipide). Radi dobivanja što boljih rezultata potrebna je rigorozna istota u vidu uklanjanja radioaktivnih kontaminata, što može postati problem kad se gangliozidi moraju izolirati iz vrlo malih uzoraka. Pročišćavanje uključuje odvajanje otapala, ionsku izmjenu i adsorpcijsku kromatografiju. Zbog njihove amfipatske prirode, glikolipidi su prikladni za TLC (eng. *thin layer chromatography*) analizu.

Kompletne strukturne analize glikolipida zahtijevaju kombinaciju tehnika za određivanje sastava, sekvenci, položaja vezanja i anomernih konfiguracija glikanskog dijela i masne kiseline, te dugolanane baze ceramidnog dijela. Sastav glikana određuje se hidrolizom i analizom oslobođenih monosaharida, a informacije o njihovoj sekvenciji, povezivanju i anomernoj konfiguraciji mogu se dobiti kombiniranjem enzimске hidrolize pomoću specifičnih glikozidaza s TLC. Određivanje veze najčešće se provodi analizom metilacije, a anomerne konfiguracije mogu se dobiti spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije (NMR). Intaktni glikani oslobađaju se iz mnogih GSL enzima korištenjem ceramidnih glikanaza ili endoglikoceramidaza.

Analizi glikolipidnih glikana pomoću NMR ili MS prethodi njihovom pročišćavanju korištenjem kromatografskih metoda. Smjese glikolipida mogu se frakcionirati pomoću TLC, a bojanje TLC ploha reagensima koji reagiraju s glikanom mogu omogućiti detekciju pojedinačnih glikolipida. Pomoću različitih reagensa moguće je prepoznati gangliozide (npr. resorcinol-HCl detektira Sia) ili neutralne monosaharide (npr., orcinol-sumporna kiselina detektira sve monosaharide) u TLC vrpci. Reagensi su također dostupni za otkrivanje sulfatnih

bił no se za postupak proł iđavanja sirovog ekstrakta afija ionske izmjene. Ti postupci razdvajaju nepolarne ili neionske lipide iz polarnih lipida (npr. glikosfingolipide) i one koje sadrđe nabijene skupine (tj. gangliozidi, fosfolipidi i sulfatidi). Glikolipidi na TLC ploł ama mogu se takołer detektirati monoklonskim protutijelima, lektinima ili łak netaknutim mikroorganizmima koji ekspiriraju receptore specifiłne za glikan koji prepoznaju specifiłne glikanske znałajke. U vełim koliłinama glikolipidi se odvajaju pomołu kolonske kromatografije ili TLC visokih performansi na silika-ploł ama (Web 5).

2.4.4. Distribucija gangliozida u zdravom mozgu

Kotani i sur. (1993.) su tehnikom imunofluorescencije s monoklonskim antitijelima miđa proułavali distribuciju gangliozida u mozgu odraslog đakora. U radu su specifiłno bili prepoznati gangliozidi GM1, GD1a, GD1b, GT1b i GQ1b. GM1 je pronałen u mijelinu i glija stanicama, GD1a ekspiriran je iskljułivo u molekularnom sloju, dok je GD1b nałen u granuliranom sloju i to na povrđini granuliranih stanica. GQ1b nałen je takołer na granuliranom sloju, ali u cerebelarnom glomerulu. GT1b je ekspiriran i u granuliranom i molekularnom sloju đto upułuje na njegovu distribuciju u svim slojevima (Kotani i sur. 1993).

Drugo istrađivanje distribucije gangliozida u mozgu izvrđili su Vajn i sur. (2013), ali na miđevima kao modelima. Navedeni autori su, osim mozga, ispitivali i podrułje lełne mođdine i to u tri ravnine: koronalnoj, sagitalnoj i horizontalnoj ravnini. Utvrdili su da je GM1 ekspiriran najviđe u bijeloj tvari, iako ga se mođe pronał i i u nekim jezgrama mozga. Takołer se nalazi na mijeliniziranim vlaknima u niđim slojevima korteksa, na dijelu prednje komisure, no izostaje u podrułju amigdaloidnih jezgri. Nije pronałen u piramidalnim stanicama CA1 i CA2 Amonovog roga, kao ni u granularnim stanicama dentatnog girusa. Svi ostali gangliozidi su pronałeni na podrułju dentatnog girusa, kao i u slojevima hipokampusa.

GD1a i GT1b se najviđe distribuiraju u svojoj tvari, no mogu se nał i i u bijeloj. Raspored im je sliłan na rostralnim dijelovima telencefalona, s tim da je GT1b rađiren na malo viđe struktura u mozgu. GD1a je posebice ekspiriran u piramidalnim stanicama CA3 Amonovog roga, te u olfaktornom bulbusu, dok ga u neđto manjim koliłinama ima u CA1 stanicama. GD1b ekspiriran je na podrułju dentatnog girusa kao i GT1b. GT1b je slabo izrađen u glomerularnom sloju olfaktornog bulbusa te u CA3 stanicama. Na podrułju kore mozga pronałena je izrazita ekspresija GD1a, GD1b i GT1b, i to u svim slojevima, dok podrułje

ozidi, od kojih je GD1a najslabije izražen na području

Epitalamusu u potpunosti nedostaje ekspresija GD1a, dok područje medijalne i lateralne habenularne jezgre izrazito pokazuju distribuciju GD1b i GT1b gangliozida. GM1 je vrlo slabo eksprimiran na ovom području, a hipotalamske jezgre obuhvaćaju distribuciju svih navedenih gangliozida, osim GD1a koji nedostaje.

Mali mozak zauzimaju svi gangliozidi (GD1a, GD1b i GT1b), osim GM1 koji je pronađen samo u bijeloj tvari. Svi ostali se nalaze i u granularnom sloju, kao i u molekularnom sloju te u sloju Purkinijevih stanica.

U području kralježničke moždine, svi gangliozidi su ograničeni na neka određena područja, dok GD1b se nalazi u bijeloj i sivoj tvari moždine. GM1 pronalazimo u kortikospinalnom traktu, kao i u nekim drugim bijelim tvarima koji okružuju sivu tvar. U sivoj tvari je vrlo slabo izražen, kao i GD1a, dok GT1b nalazimo u lameli sive tvari (Web6).

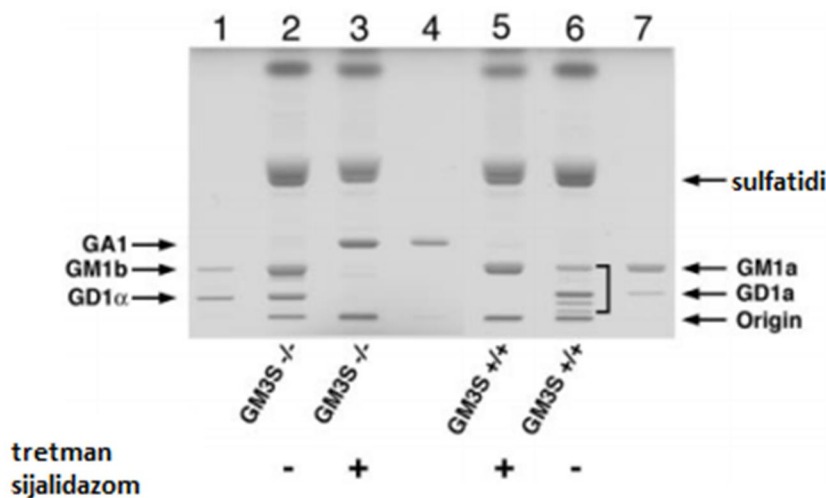
Rezultati Vajn i sur. (2013) pokazali su široku ekspresiju GD1b i GT1b kroz mišji središnji živčani sustav (CNS), dok je imunoreaktivnost na GM1 uglavnom u traktovima bijele tvari, a imunoreaktivnost GD1a kaudalno se smanjuje prema superiorni kolikulus. Posebno snažnu ekspresiju GD1a, GD1b i GT1b nalazimo u olfaktornom bulbusu, neokorteksu, bazalnim ganglijima, amigdali, septalnim regijama, talamičkim jezgrama, hipotalamusnim jezgrama i hipokampalnom području.

Snažna ekspresija GD1b i GT1b nalazi se u sva tri sloja cerebeluma (molekularni sloj, Purkinjeov stanični sloj i granularni sloj stanica) i cerebelarnim jezgrama, dok je GD1a umjereno eksprimirana u cerebralnom korteksu, ali potpuno odsutan u cerebelarnim jezgrama. Rezultati također pokazuju da je GM1 ograničen na bijelu tvar u malom mozgu.

2.4.5. Distribucija gangliozida u dijabetičnom mozgu

U istraživanju Yamashite i sur. (2013) detaljno je proučavan GM3 te je dokazano da one stanice koje eksprimiraju ovaj gangliozid prikazuju poremećaj u inzulinskoj rezistenciji. Ujedno, GM3 supresira fosforilaciju inzulinskog receptora koja je stimulirana inzulinom, kao što i direktno inhibira autofosforilaciju onih receptora koji su topljivi. To sve dovodi do zaključka da ovaj gangliozid ima izravni učinak na cjelokupnu funkciju receptora (Yamashita i sur. 2003).

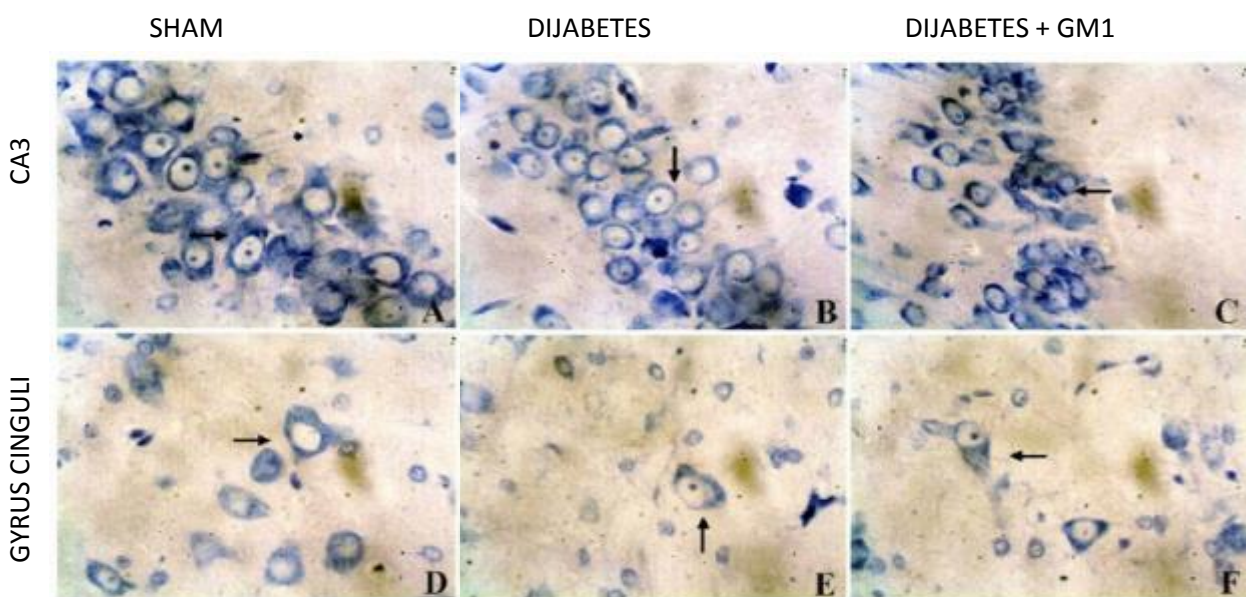
ku da gangliozid GM3 izravno utječe na funkciju kojima se mjerila razina glukoze, inzulina i masnoće, kao i hormoni. Da bi se odredila fiziološka uloga gangliozida GM3, te utjele li *in vivo* GM3 gangliozid na signalizaciju inzulinskih receptora, koristili su miševe s promijenjenim genom (GM3S, također poznatim kao Siat9) koji kodira GM3 sintazu. Dvije generacije miševa su bile proučavane; GM3S^{-/-} (eng. *GM3 synthase knockout mice*, miševi s promijenjenim genom koji nisu bili u mogućnosti sintetizirati gangliozid GM3) i GM3S^{+/+} (divlji tip). Gangliozidi poput GM1a, GD1a, GD1b i GT1b pronađeni su u GM3S^{+/+} generaciji miša, dok su bili potpuno odsutni u GM3S^{-/-} generaciji (Slika 5). U GM3S^{-/-} generaciji vidljiva je ekspresija GM1b i GD1 gangliozida. Znanstvenici su to povezali s aktivnosti GM3 sintetaze, jer GM1a, GD1a, GD1b i GT1b zahtijevaju aktivnost GM3 sintetaze, dok GM1b i GD1 nije potrebna navedena aktivnost. Rezultati su pokazali kako je GM3 gangliozid negativni regulator signaliziranja inzulina, što omogućuje novi pogled na način regulacije inzulinskog receptora gangliozidima. Pojačana fosforilacija inzulinskog receptora nakon vezanja liganda uzrokovala je povećanu osjetljivost na inzulin, a koncentracija mRNA GM3 sintetaze iznimno se povećala kod pretilih glodavaca u odnosu na one nisu unosili hranu s visokim udjelom masnoće. Mutirani miševi imali su povećane odgovore na testove tolerancije na glukozu i inzulin, te je odsutnost GM3 gangliozida pružala zaštitu od inzulinske rezistencije izazvane prehranom s visokim udjelom masti. Spoznaja da nedostatak GM3 može utjecati na inzulinsku rezistenciju povećava mogućnost da inhibicija sinteze GM3 gangliozida može poslužiti kao terapijski pristup dijabetesu tipa 2 koji je otporan na inzulin. (Yamashita i sur. 2003; Tagami i sur. 2002).



Slika 5. Prikaz gangliozida u mozgu miševa generacije GM3S^{-/-} i GM3S^{+/+} (Preuzeto i prilagođeno prema Yamashita i sur. 2003)

su utjecaj GM1 gangliozida na degenerativne DNA ke hiperglikemije. Ćtakori su podijeljeni u grupe, od

kojih je jedna bila kontrolna i *sham* operirana grupa (kirurĝki normalno tretirana grupa istim protokolom kao i ostale, no bez primjene terapijskog dijela eksperimenta). Degenerirani neuroni pronađeni su u hipokampalnom CA3 (Slika 6B) i cinguliranom korteksu (lat. *Gyrus cinguli*) (Slika 6E) u ģtakora oboljelih od dijabetesa. Brojevi degenerativnih neurona u istim područjima smanjeni su kod GM1 tretiranih ģtakora (Slika 6C, Slika 6F), dok je broj degenerativnih neurona u cinguliranom korteksu bio veći i kod ģivotinja s dijabetesom nego u normoglikemijskoj skupini. Liječenje s GM1 u dijabetičkim ishemijskim ģtakorima značajno je smanjilo broj degenerativnih neurona na području CA3 tijekom 1 i 3 sata i u cinguliranom korteksu u reperfuzijama od 3 do 6 sati, u usporedbi s dijabetičkim ishemijskim ģivotinjama (Zhang i sur. 2010).



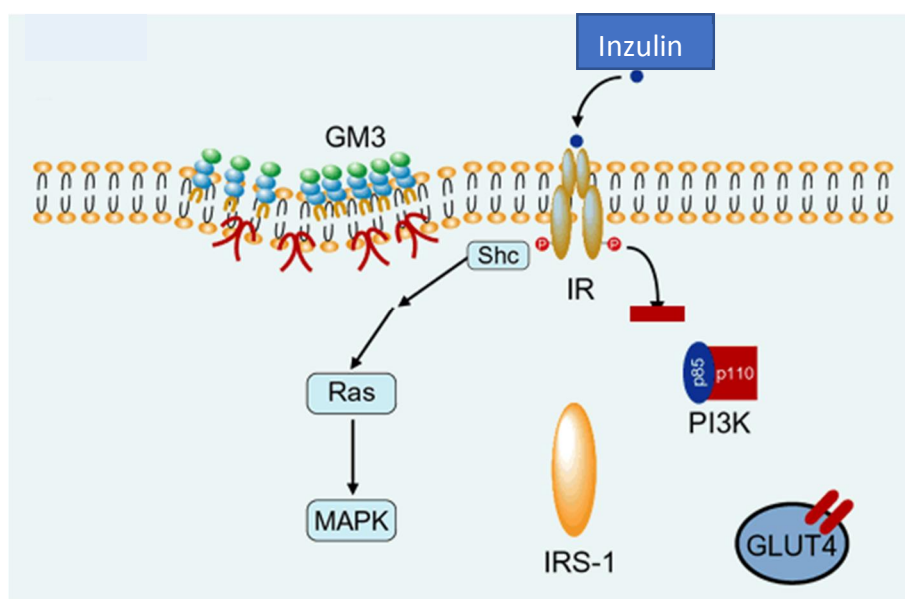
Slika 6. Prikaz degenerativnih neurona u hipokampalnom CA3 i *gyrus cinguli* tijekom 3 sata reperfuzije (Preuzeto i prilagođeno prema Zhang i sur. 2010.)

Iz navedenih istraĝivanja moĝe se zakljuĉiti da je razina gangliozida smanjena kod dijabetičkog mozga u usporedbi sa zdravim mozgovima; međutim, liječenje inzulinom dijabetičkih ģivotinja moĝe povratiti glikolipidne frakcije (Kumar i Menon 1993). Također postoje izvještaji da je glikozilacija proteina povećana u dijabetičkom mozgu (Kumthekar i Katyare 1992).

iju mijelinskog baziĉnog proteina (Chan 1987), stoga ti na fosforilaciju proteina i proizvesti posljedĉnu promjenu u normalnoj strukturi i funkcijama mijelinske ovojnice. Povećane razine drugih glikolipida mogu rezultirati njihovim taloženjem u mozgu, što dovodi do promjena u funkciji moćdanog tkiva. Liječenje inzulinom kod dijabetiĉnih ĉivotinja vratilo je glikolipidne razine u normalu, što pokazuje da dijabetes moće biti odgovoran za promjene u membrani, te tako utječe na metabolizam mozga (Kumar i Menon 1993).

2.5. Utjecaj GM3 gangliozida na mehanizam inzulinske rezistencije

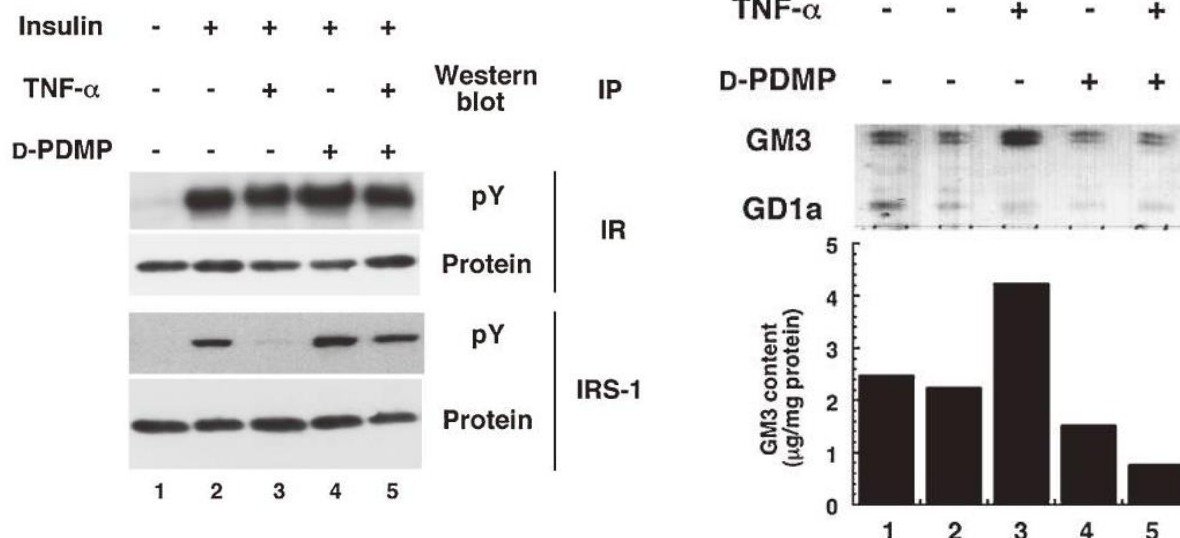
Joć uvijek nisu u potpunosti poznati mehanizmi kako GM3 uzrokuje stvaranje inzulinske rezistencije, no pretpostavke su slijedeće. Moćuje je da je GM3 u interefenciji s fosforilacijom supstrata IRS-1 (eng. *insulin receptor substrate 1*) (Slika 7). Fosforilacija serina u IRS-1, uzrokuje inhibicijsko djelovanje IRS-1 koji Će tako utjecati na smanjenje tirozin kinazne aktivnosti receptora inzulina (Hotamisligil i sur. 1994). GM3 inaće slući kao preteća za sloćenije gangliozide poput GM1a ili GD1a, te pripada gangliozidima koji se nalaze u ekstraneuralnim tkivima, a zapravo ga najviše ima u adipocitima (Prokazova i sur., 2009). GM3 moće djelovati tako da inhibira fosforilaciju tirozina na IRS-1, no ako inhibiramo sintezu GM3, ne dolazi do takvog djelovanja na IRS-1, a time i na sami receptor inzulina (Hotamisligil i sur. 1994).



Slika 7. Eliminacija IRS-1 iz mikrodomene i prekid metaboliĉkog djelovanja inzulina u stanju inzulinske rezistencije (Preuzeto i prilagoćeno prema Web 9)

receptorom (IR) aktivira unutarnju tirozinsku kinazu. Aktivirani IR sposoban je otpremiti i fosforilirati adaptorske proteine, poput IR supstrata (IRS). Fosforilirani IRS aktivira PI3 kinazu (PI3K). Aktivirana PI3K translocirana je na lipidne splavi (eng. *lipid rafts*) te pretvara PIP2 (eng. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) u PIP3 (eng. *phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate*), nakon čega PIP3 regrutira PDK1 (eng. *phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) da fosforilira protein kinazu B (Akt). Potpuna aktivacija Akt potrebna je za signalizaciju fosforilacijom drugog mjesta pomoću mTORC2 (eng. *target of rapamycin complex 2*). Navedena IR-IRS-PI3K-Akt signalna kaskada predstavlja metabolički put pokrenut inzulinom i rezultira translokacijom glukoznog transportera 4 na plazma membranu kako bi se olakšao unos glukoze (Zoncu i sur. 2011).

U radu iz 2011. godine Inokuchi je također potvrdio Yamashitinu tvrdnju o GM3 i inzulinskoj rezistenciji iz 2003. godine. Signalna kaskada IR-IRS-PI3-kinaza (IR i *insulin receptor* → IRS i *insulin receptor substrate* → PI3 kinaza) je bitan metabolički put za koji je pokretanje odgovoran inzulin. Do komunikacije inzulina s TNF α (eng. *tumor necrosis factor α*) dolazi kada se ne uzrokuje supresija IRS-1 i GLUT-4, pri tome ujedno dolazi do povećanja koncentracije GM3, kao i GM3 sintaze. TNF α utječe tako da nadomješta sintezu GM3 i to na razini transkripcije u masnim stanicama, adipocitima. Da bi se dokazala uključenost povećane koncentracije GM3, i to u onim adipocitima koji su izloženi tretmanu s TNF α s inzulinskom rezistencijom Inokuchi je koristio D-PDMP (eng. *D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol*). Time se treba postići i uklanjanje glikosfingolipida. Ujedno njime je dokazan utjecaj u adipocitima na smanjenje rasta koncentracije GM3, što na kraju upućuje da u miševima i čakorima nedostatak GM3 sintaze uvelike pokazuje utjecaj na povećanje signalizacije inzulina, za razliku od povećanja koncentracije GM3 sintaze koja dovodi do nedostatka i inzulinske rezistencije (Slika 8) (Inokuchi 2011).



Slika 8. Prikaz bendova gdje TNF α utječe na pojačavanje ekspresije GM3, dok prevencija sinteze GM3 ukida supresiju inzulinske signalizacije (Preuzeto i prilagođeno prema Inokuchi 2011)

GM3 je prisutan i u serumu i povezan s lipoproteinima. Kod bolesnika s hiperglikemijom i hiperlipidemijom, razine GM3 su povišene, kao i kod pacijenata koji boluju od oba poremećaja istovremeno. Također, serumski GM3 je itekako povećan kod bolesnika s dijabetesom tipa 2 i izuzetno velikom pretilosti. Veća koncentracija LDL-a povezana je s povećanjem GM3. Stoga osim mjerenja količine i proučavanja distribucije GM3 u mozgu, potrebno je i istraživanje njegove koncentracije u drugim organima poput mišića i masnog tkiva (konkretno u adipocitima), kao i u serumu, jer se raznim istraživanjima dokazala njegova korisnost kao markera za rane dijagnoze bolesti poput poremećaja inzulinske rezistencije i ateroskleroze (Inokuchi 2011).

Loša prehrana te neaktivan stil života sve više dovode do pojave dijabetesa, koji je jedan od najčešćih uzroka smrti 21. stoljeća. Kombinacija inzulinske rezistencije te disfunkcija β-stanica Langerhansovih otočica dovode do hiperglikemije, a zatim do dijabetesa tipa 2 od kojeg boluje najveći broj oboljelih, zbog čega se konstantno radi na novim tretmanima liječenja. Prilikom pokusa najviše se koriste gltakori Sprague-Dawley soja, čija prehrana s visokim udjelom masti/fruktozom u kratkom vremenskom roku rezultira povećanim postotkom glukoze i inzulina u krvi (Runtuwene i sur. 2016).

Brojna istraživanja spomenuta u tekstu upućuju najviše na GM3 ganglioizid i kako je njegova sinteza direktno uključena u dijabetes, kao i na to da GM3 predstavlja ključni dio koji dovodi do razvoja inzulinske rezistencije. Inhibicija sinteze GM3 može doprinijeti velikim promjenama prilikom ovakvih metaboličkih poremećaja. U nekim slučajevima, primjerice pri poboljšavanju inzulinske rezistencije, nije potrebno ukidanje sinteze GM3 u potpunosti, već samo normalizacija koncentracije navedenog ganglioizida. To dovodi do normalne signalizacije inzulina, zahvaljujući D-PDMP-u koji utječe na TNFα. Također, spoznaja gdje se ganglioizidi GD1a i GT1b najviše eksprimiraju u zdravom mozgu, može pomoći pri usporedbi s ekspresijom u dijabetičnom mozgu te time i pri izradi tretmana za liječenje osoba oboljelih od dijabetesa tipa 2. Naravno, ne samo njihova ekspresija, već i distribucija ostalih poznatih ganglioizida, može doprinijeti velikom napretku u liječenju protiv ove kronične i degenerativne bolesti.

Bellush, L. L., Reid, S. G. (1991) Altered behavior and neurochemistry during short-term insulin withdrawal in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 40: 217-222.

Chan, K. F. (1987) Ganglioside-modulated protein phosphorylation in myelin. *Journal of Biological Chemistry* 262: 2415-2422.

Chao, P. C., Li, Y., Chang, C. H., Shieh, J. P., Cheng, J. T., Cheng, K. C. (2018) Investigation of insulin resistance in the popularly used four rat models of type-2 diabetes. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 101: 155-161.

Damjanov, I., Seiwerth, S., Jukić, S., Nola, M. (2014) Bolesti gučterač e. U: Raić, A. (ur.) Patologija. Medicinska naklada, Zagreb, str. 516-522.

Hotamisligil, G. S., Murray, D. L., Choy, L. N., Spiegelman, B. M. (1994) Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 4854-4858.

Iannaccone, P. M., Jacob, H. J. (2009) Rats!. *Disease Models & Mechanisms* 2: 206-210.

Inokuchi, K. (2011) Adult neurogenesis and modulation of neural circuit function. *Current opinion in neurobiology* 21: 360-364.

Jalanko, A., Braulke, T. (2009) Neuronal ceroid lipofuscinoses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1793 697-709.

Klenk, E. (1937) Die Fettstoffe des Gehirns bei Amaurotischer Idiotie und Niemann-Pick'scher Krankheit. *Ber. Ges. Physiol* 96: 659-660.

Klenk, E. (1939) Niemann-Pick'sche Krankheit und Amaurotische Idiotie. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 262:128i 143.

Kokić, S. (2009) Dijagnostika i liječenje šećerne bolesti tipa 2. *Medix: specijalizirani medicinski dvomjesečnik* 15: 90-98.

Kokić, S. (2013) Patofiziologija šećerne bolesti tipa 2. U: Tičinović Kurir, T. (ur.) Patofiziologija endokrinopatija - odabrana poglavlja. Redak, Split, str. 61-73.

38: 1532-1568.

Kotani, M., Kawashima, I., Ozawa, H., Terashima, T., Tai, T. (1993) Differential distribution of major gangliosides in rat central nervous system detected by specific monoclonal antibodies. *Glycobiology* 3: 137-146.

Kumar, J. S., Menon, V. P. (1993) Effect of diabetes on levels of lipid peroxides and glycolipids in rat brain. *Metabolism-Clinical and Experimental* 42: 1435-1439.

Kumthekar, M. M., Katyare, S. S. (1992) Altered kinetic attributes of Na (+)+ K (+)-ATPase activity in kidney, brain and erythrocyte membranes in alloxan-diabetic rats. *Indian journal of experimental biology* 30: 26-32.

Krukoff, T. L., Patel, K. P. (1990) Alterations in brain hexokinase activity associated with streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat. *Brain Res* 522:157-160.

Mans, A. M., DeJoseph, M. R., Davis, D. W., Hawkins, R. A. (1988) Brain energy metabolism in streptozotocin-diabetes. *Biochemical journal* 249: 57-62.

Matsuzaki, K., Kato, K., Yanagisawa, K. (2010) Aβ polymerization through interaction with membrane gangliosides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1801: 868-877.

Mayyas, F., Jaradat, R., Alzoubi, K. H. (2018) Cardiac effects of fish oil in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 28: 592-599.

Mizutani, Y., Kihara, A., Chiba, H., Tojo, H., Igarashi, Y. (2008) 2-Hydroxy-ceramide synthesis by ceramide synthase family: enzymatic basis for the preference of FA chain length. *Journal of lipid research* 49: 2356-2364.

Montanya, E., Sesti, G. (2009) A review of efficacy and safety data regarding the use of liraglutide, a once-daily human glucagon-like peptide 1 analogue, in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Clinical therapeutics* 31: 2472-2488.

Mooradian, A. D., Morin, A. M. (1991) Brain uptake of glucose in diabetes mellitus: the role of glucose transporters. *The American journal of the medical sciences* 301: 173-177.

- 1991) A specific type of ganglioside as a modulator of insulin receptor tyrosine kinase activity. Possible association of ganglioside-induced inhibition of insulin receptor function and monocytic differentiation induction in HL-60 cells. *Journal of Biological Chemistry* 266: 4531-4537.
- Novak, B., Metelko, G. (2011) Liraglutid u liječenju šećerne bolesti tipa 2. *Liječnički vjesnik* 133: 269-276.
- Phillips, M. S., Liu, Q., Hammond, H. A., Dugan, V., Hey, P. J., Caskey, C. T., Hess, J. F. (1996) Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nature genetics* 13: 18-19.
- Pokorski, M., Połdzik, M., Mazzatenta, A. (2018) Antioxidant treatment for impaired hypoxic ventilatory responses in experimental diabetes in the rat. *Respiratory physiology & neurobiology* 255: 30-38.
- Prokazova, N. V., Samoilova, N. N., Gracheva, E. V., Golovanova, N. K. (2009) Ganglioside GM3 and its biological functions. *Biochemistry (Moscow)* 74: 235-249.
- Reed, M. J., Meszaros, K., Entes, L. J., Claypool, M. D., Pinkett, J. G., Gadbois, T. M., Reaven, G. M. (2000) A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism-Clinical and Experimental* 49: 1390-1394.
- Romano, S., Mitro, N., Diviccaro, S., Spezzano, R., Audano, M., Garcia-Segura, L. M., Caruso, D., Melcangi, R. C. (2017) Short-term effects of diabetes on neurosteroidogenesis in the rat hippocampus. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 167: 135-143.
- Rösen, P., Wiernsperger, N. F. (2006) Metformin delays the manifestation of diabetes and vascular dysfunction in Goto-Kakizaki rats by reduction of mitochondrial oxidative stress. *Diabetes/metabolism research and reviews* 22: 323-330.
- Rösner, H. (2003) Developmental expression and possible roles of gangliosides in brain development. U: Kostovic, I. (ur.) *Guidance Cues in the Developing Brain*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, str. 49-73.
- Runden-Pran, E., Tansø, R., Haug, F. M., Ottersen, O. P., Ring, A. (2005) Neuroprotective effects of inhibiting N-methyl-D-aspartate receptors, P2X receptors and the mitogen-activated protein kinase cascade: a quantitative analysis in organotypical hippocampal slice cultures subjected to oxygen and glucose deprivation. *Neuroscience* 136: 795-810.

- Iwa, A., Amitani, H., Amitani, M., Morinaga, A., A. (2016) Rosmarinic acid ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity in diabetic rats, potentially by modulating the expression of PEPCCK and GLUT4. *Drug design, development and therapy* 10: 2193-2202.
- Sandhoff, K., Harzer, K. (2013) Gangliosides and gangliosidoses: principles of molecular and metabolic pathogenesis. *Journal of Neuroscience* 33: 10195-10208.
- Schnaar, R. L., Gerardy-Schahn, R., Hildebrandt, H. (2014) Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiological Reviews* 94: 461-518.
- Shaw, R. J. (2013) Metformin trims fats to restore insulin sensitivity. *Nature medicine* 19: 1570-1572.
- Shi, Y., Hu, F. B. (2014) The global implications of diabetes and cancer. *The lancet* 383: 1947-1948.
- Sohn, H., Kim, Y. S., Kim, H. T., Kim, C. H., Cho, E. W., Kang, H. Y., Kim, N.S., Kim, C.H., Ryu, S.E., Lee, J.H, Ko, J. H. (2006) Ganglioside GM3 is involved in neuronal cell death. *The FASEB journal* 20: 1248-1250.
- Srinivasan, K., Ramarao, P. (2007) Animal model in type 2 diabetes research: An overview. *Indian Journal of Medical Research* 125: 451-472.
- Svennerholm, L. (1963) Chromatographic separation of human brain gangliosides. *Journal of neurochemistry* 10: 613-623.
- Tagami, S., Inokuchi, J. I., Kabayama, K., Yoshimura, H., Kitamura, F., Uemura, S., Ogawa, C., Ishii, A., Saito, M., Ohtsuka, Y., Sakaue, S., Igarashi, Y. (2002) Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance. *Journal of Biological Chemistry* 277: 3085-3092.
- Tateishi, K., He, J., Taranova, O., Liang, G., D'Alessio, A. C., Zhang, Y. (2008) Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 283: 31601-31607.
- Tettamanti, G., Bonali, F., Marchesini, S. T., Zambotti, V. (1973) A new procedure for the extraction, purification and fractionation of brain gangliosides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism* 296: 160-170.

onin, M. T., Mazur, M., Telser, J. (2007) Free radicals
 ical functions and human disease. The international
 journal of biochemistry & cell biology. 39: 44-84.

Wu, G., Xie, X., Lu, Z. H., Ledeen, R. W. (2001) Cerebellar neurons lacking complex
 gangliosides degenerate in the presence of depolarizing levels of potassium. Proceedings of the
 National Academy of Sciences 98: 307-312.

Yamashita, T., Hashiramoto, A., Haluzik, M., Mizukami, H., Beck, S., Norton, A., Kono, M.,
 Tsuji, S., Daniotti, J. L., Werth, N., Sandhoff, K., Sandhoff, R., Proia, R. L. (2003) Enhanced
 insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. Proceedings of the National Academy of
 Sciences 100: 3445-3449.

Yu, R.K., Tsai, Y. T., Ariga, T., Yanagisawa, M. (2011) Structures, biosynthesis, and functions
 of gangliosides-an overview. Journal of oleo science 60: 537-544.

Zhang, J. Z., Jing, L., Ma, Y., Guo, F. Y., Chang, Y., Li, P. A. (2010) Monosialotetrahexosy-1
 ganglioside attenuates diabetes-enhanced brain damage after transient forebrain ischemia and
 suppresses phosphorylation of ERK1/2 in the rat brain. Brain research 1344: 200-208.

Zhao, H., Przybylska, M., Wu, I. H., Zhang, J., Siegel, C., Komarnitsky, S., Yew, N.S., Cheng,
 S. H. (2007) Inhibiting glycosphingolipid synthesis improves glycemic control and insulin
 sensitivity in animal models of type 2 diabetes. Diabetes 56: 1210-1218.

Zjał íl -Rotkvił, V. (2009) Oralni hipoglikemizantni lijekovi u lijeē enju ġel erne bolesti. Medix:
 specijalizirani medicinski dvomjeseē nik 15: 107-113.

Zoncu, R., Efeyan, A., Sabatini, D. M. (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer,
 diabetes and ageing. Nature reviews Molecular cell biology 12: 21-35.

WEB IZVORI:

Web1. World Health Organization: Global report on diabetes.
http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204871/9789241565257_eng.pdf?sequence=1
 (10.8.2017.)

Web2. Narodne novine: Zakon o zaēiti ġivotinja. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2017_10_102_2342.html (7.9.2017.)

zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe.
[beni/2013_05_55_1129.html](#) (7.9.2017.)

Web4. Cold Spring Harbor perspectives in biology 3: Glycosphingolipid functions.
<http://cshperspectives.cshlp.org/content/3/7/a004788.long> (16.7.2017.)

Web5. The National Center for Biotechnology Information: Essentials of Glycobiology, 3rd edition. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310274/> (14.6.2018.)

Web6. Vajn, K., Viljetić, B., Degmečić, I. V., Schnaar, R. L., Heffer, M. : Differential Distribution of Major Brain Gangliosides in the Adult Mouse Central Nervous System. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0075720> (19.7.2017.)

Web7. The National Center for Biotechnology Information: Essentials of Glycobiology, 2nd edition. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1909/> (14.6.2018.)

Web8. Research Gate: Lateral organization of the transmembrane domain and cytoplasmic tail of influenza virus hemagglutinin revealed by time resolved imaging. https://www.researchgate.net/publication/279828978_Lateral_organization_of_the_transmembrane_domain_and_cytoplasmic_tail_of_influenza_virus_hemagglutinin_revealed_by_time_resolved_imaging (20.6.2018)

Web9. Glyco Forum: Type2 Diabetes and Ganglioside GM3. <http://glycoforum.gr.jp/science/word/glycopathology/GD-B03E.html> (2.7.2018.)