

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: **2024-11-23**



**ODJEL ZA
BIOLOGIJU**
Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

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



Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Ana Žiroš

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

Završni rad

Osijek, 2018.

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 firo–

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 istraffivanja su pokazala njihov raspored i koli inu u normalnom mozgu te mozgu oboljelih od dijabetesa tipa 2. GM3 se u ve ini istraffivanja navodi kao gangliozid koji sudjeluje u stvaranju inzulinske rezistencije, a time i u patofiziologiji dijabetesa tipa 2, –to je detaljnije razja–njeno u tekstu.

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: –takori, dijabetes tip 2, gangliozidi, GM3, mi–evi

Rad je pohranjen: na mreftnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju zavr–nih i diplomskih radova Nacionalne i sveu ili–ne knjifnice 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 firo–

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.

Meternu bolest (lat. *diabetes mellitus*) definiramo kao skup poremećaja u metabolizmu bjelancevina, masti i ugljikohidrata, te se smatra petim najčešćim uzrokom smrti u svijetu (Shi i Hu 2014). Možemo 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 nedostatkom inzulina, no moguće je i kombinacija oba poremećaja (Koki 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. Također 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 Golgiju 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 pretežno 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 ó *insulin receptor* -> IRS ó *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; Koki 2009). Tolerancija glukoze ima tri stupnja:

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

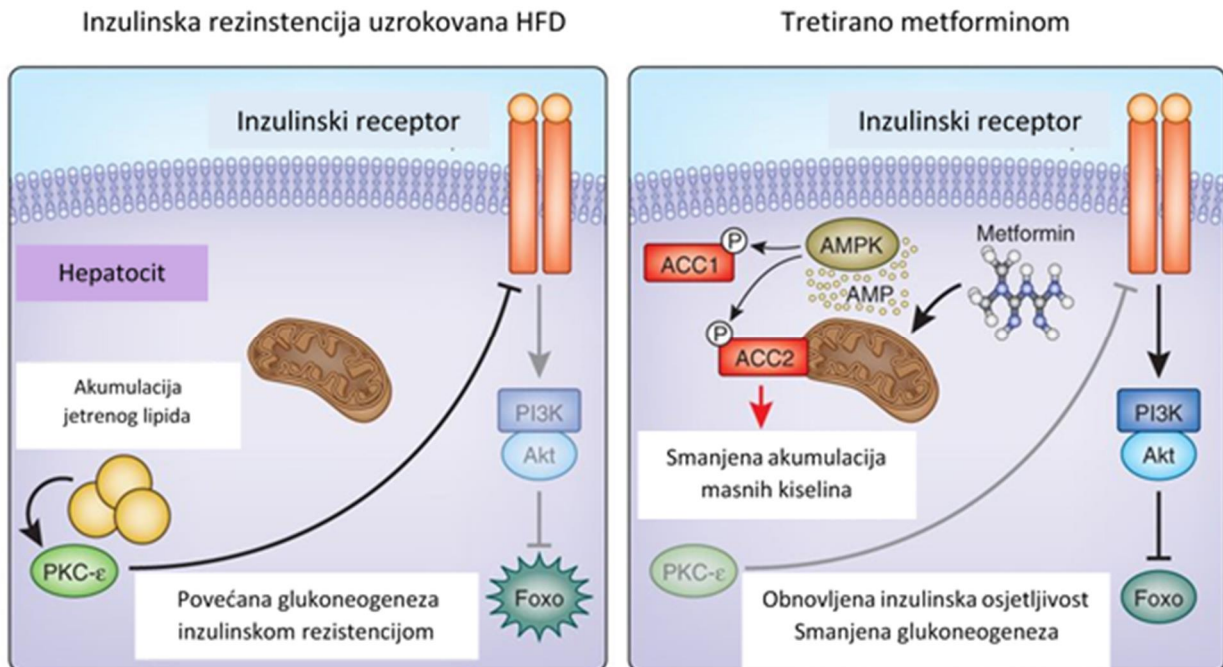
Šećerna bolest može se podijeliti u 4 skupine: šećerna bolest tip I, šećerna bolest tip II, drugi specifični tipovi te gestacijska šećerna bolest.

Tip I šećerne bolesti pretežitito 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 otočica, te obuhvaća 5-10% ukupnih bolesnika sa šećernom bolešću (Tateishi i sur. 2008). Bolest se obično je hiperglikemijom i ketoacidozom nakon što je više od 90% β -stanica uništeno, a genetički 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, moguće 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 povećanja nezdravog načina života i manjka tjelesne aktivnosti nerijetko se pojavljuje i u djetinjstvu te adolescentskoj dobi. Uzrokovana je kombinacijom inzulinske

Osim rada na intenzivnom smanjenju tjelesne težine, povećano fizičko aktivno – u 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 (Zjanić i Rotković 2009). Rösen i Wiernspergen (2006) su istraživanjem na miševima dokazali da liječenje ovim lijekom dolazi do povećanja 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 leptina 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)

inivotinski model dijabetesa tipa 2 uklju uju modele inzulinske rezistencije i/ili modele s disfunkcionalnim beta stanicama jetre. Metaboli ka fiziologija –takora u mnogo emu odgovara ljudskom organizmu, uklju uju i djelovanje raznih imbenika (npr. toksina, stresa, cjepiva, í) na oblikovanje bolesti (Iannaccone i Jacob 2009), zbog ega su vrlo kori–teni u istraflivanjima povezanim s dijabetesom (Pokorski i sur. 2018 ; Mayyas i sur. 2018; Chao i sur. 2018; Romano i sur. 2017). Takvi modeli su pretili, –to odraflava ljudsko stanje u kojem je pretilost povezana s razvojem dijabetesa tipa 2. Vrsta –takora Zucker, nastala 1961.godine nakon kriflanja Merckovog M-soja i Sherman –takora, posjeduje mutirani receptor leptina (Phillips i sur. 1996) koji uzrokuje hiperfagiju, zbog ega –takori postaju pretili nakon 4 tjedna starosti. Takvi –takori su hiperinzulinemi ni, hiperlipidemi ni i hipertenzivni, te imaju nisku toleranciju glukoze (Srinivasan i Ramarao 2007).

Po etkom 20. stolje a, Reed i sur. (2000) objavljuju novi –takorski model za istraflivanje dijabetesa tipa 2, poznat kao HFD/STZ (eng. *high-fat diet/streptozotocin-diabetic rat*) model –takora, tj. op eniti model za dijabetes tipa 2. Cilj njihova istraflivanja bio je razviti model –takora 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 izlofenosti STZ tretmanu, –takori koji su imali povi–enu razinu glukoze u krvi uklju eni su u studiju i testirani na metformin. Metformin inducira sniflavanje razine glukoze u krvi, –to je dodatno utvrdilo HFD / STZ model kao –takorski model dijabetesa tipa 2 koji je relevantan za ljudsko stanje.

U kognitivno-psiholo–kim istraflivanjima, –takor se pokazao kao superiorniji i inteligentniji model od ostalih organizama, jer je u mogu nosti svladati vi–e problemskih zadataka koji su od velike vaflnosti za istraflivanja u podru ju neuroznanosti. Osim –to je lako dostupan te financijski isplativ, veli ina –takora pove ava njegovu upotrebu modela za bolesti zbog proporcionalnosti vaflnih organskih podstruktura, na kojima se jasno vidi djelovanje i povezanost utjecaja pojedinih lijekova na organe i anatomske strukture. Posljednjih godina –takor postaje glavni odabir za istraflivanja u podru ju toksikologije i psihologije, posebno u farmacijskoj industriji (Iannaccone i Jacob 2009).

Prilikom ovakvih istraflivanja, znanstvenici naj e– e koriste modele koji su uzgajani u kontroliranim uvjetima poput odgovaraju e temperature s dovoljnom koli inom svjetla te odre enom satnicom mraka. fiivotinje uzimaju vodu, kao i svu hranu *ad libitum*. Naj e– e se

podijeljenih u skupine, od kojih jedna uvijek mora biti
ni s visokim udjelom masno e ili na hrani bogatoj
fruktozom(Chao 2018). Radi to nosti rezultata, poželjno da se tijekom istraffivanja koristi
jednak broj muffjaka i fenki koji su otprilike jednake starosti te da uvijek budu tretirani na isti
na in.

Istraffivanja na flivim organizmima uvijek moraju biti odobrena od strane Eti kog
povjerenstva, te njima treba biti rukovano prema Hrvatskom zakonu za za–titu flivotinja (Web
2) i Pravilniku o za–titi flivotinja koje se koriste u znanstvene svrhe (Web3).

2.3. Glikosfingolipidi

Lipidne molekule –iroko rasprostranjene u prirodi nazivamo glikosfingolipidima (GSL).
Nalazimo ih i u plazma membranama bakterija i ovjeka, 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 ine 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 emu nastaje dehidroceramid
- 3) reakcija dehidrogenacije pri emu nastaje ceramid (Mizutani i sur. 2008).

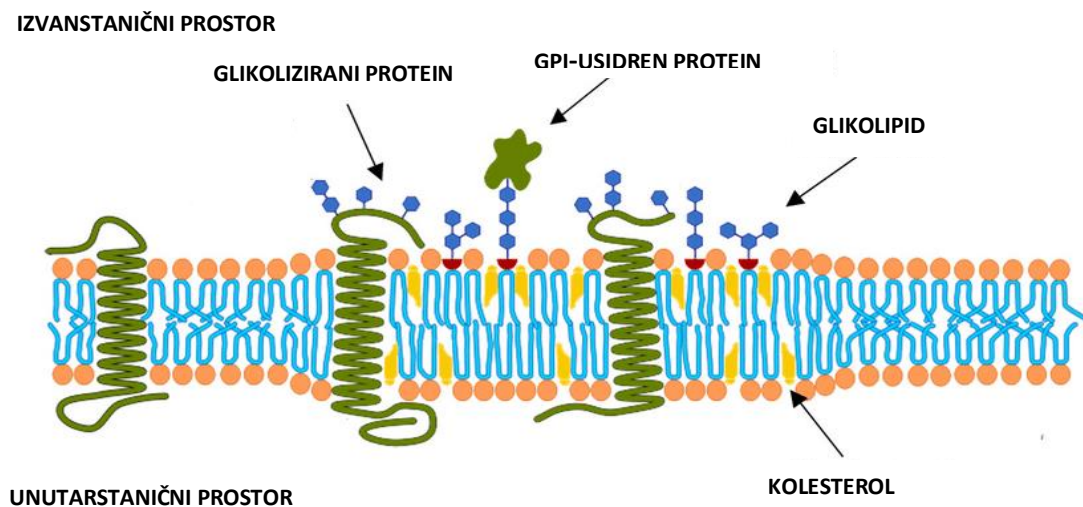
Glikosfingolipidi podklasificirani su kao neutralni (bez nabijenih –e era ili ionskih skupina),
sijalizirani (koji imaju jedan ili vi–e ostataka sijalinske kiseline) ili sulfatilirani. Tradicionalno,
svi sijalizirani GSL-ovi poznati su kao "gangliozidi", bez obzira temelje li se na neutralnoj
–e ernoj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

Glikosfingolipidi imaju vi–e funkcija, no dvije su glavne:

- a) *trans* raspoznavanje ó interakcija izme u stanica
- b) *cis* regulacija ó modifikacija djelovanja proteina (Web 7).

Iako varijacije ceramida dodaju raznolikost na GSL strukture, glavne strukturne i funkcionalne
klasifikacije temelje se na glikanima. Prvi –e eri povezani s ceramidom u "vi–im" flivotinjama
obi no su galaktoze (GalCer, galaktoceramid) ili glukoza (GlcCer, glukoceramid), te su
ujedno i naj e– i ugljikohidratni dijelovi glikosfingolipida. GalCer i njegovi analogni sulfatidi,

te, glavni su glikani u mozgu, gdje imaju esencijalne funkcije. GlcCer glavni je u regulaciji kofe i njene propusnosti za vodu. Ugljikohidratni dio str- i u ekstracelularni prostor, izvan membrane, dok ceramid, tj. lipidni dio glikosfingolipda zauzima mjesto unutar lipidnog dvosloja. Nisu nasumi no raspore eni u lipidnom dvosloju ve tvore pravilne strukture, tzv. lipidne splavi (eng. *small lateral microdomains*, SML) (Web 5; Web7) (Slika 2).



Slika 2. Lipidni splav (Preuzeto i prilago eno s Web8)

2.4. Gangliozi

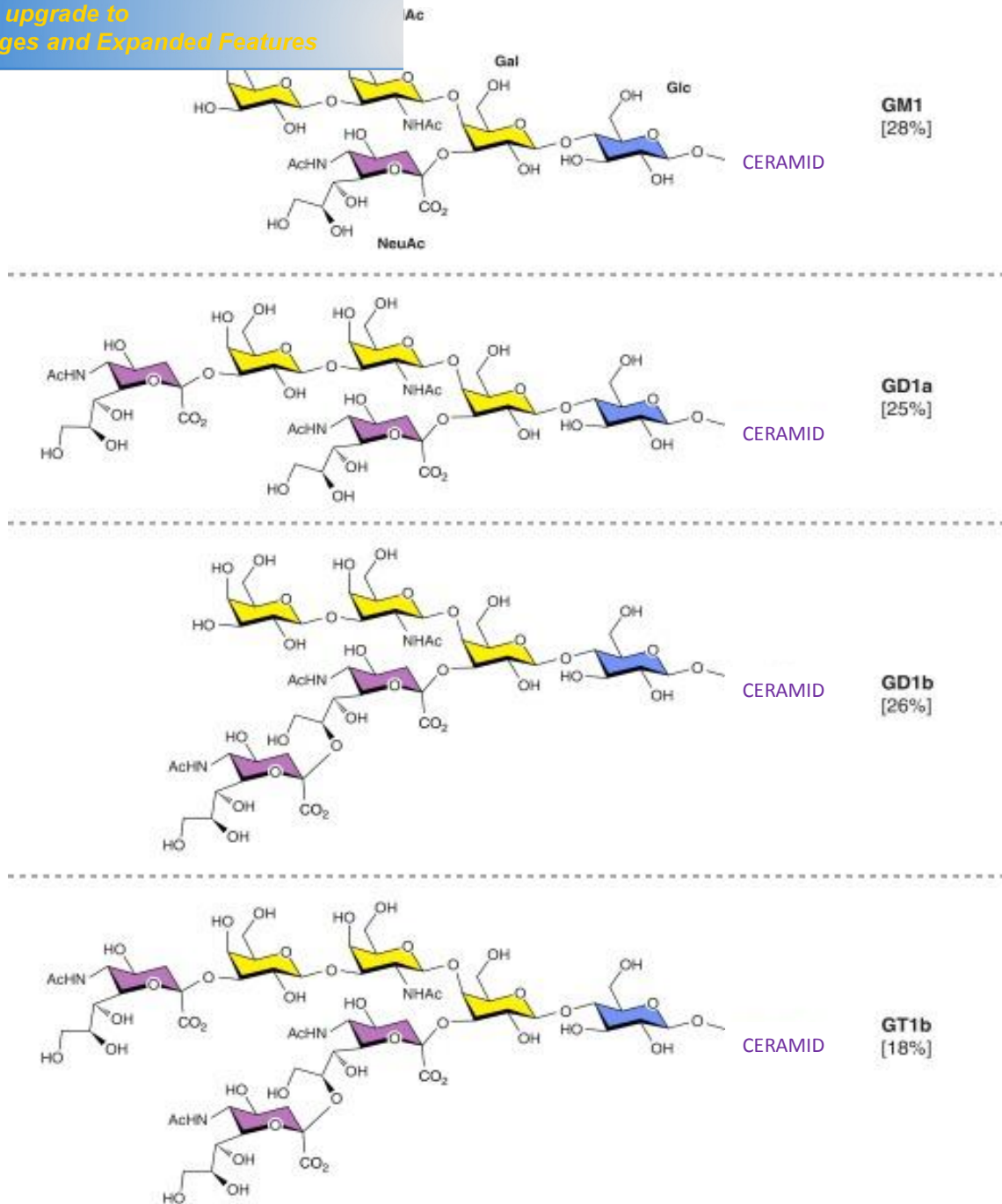
Gangliozi su podskupina glikosfingolipida koji su prisutni posvuda na membranama ve ine stanica organizma, iako najvi-e dominiraju u fliv anom sustavu (Yu i sur. 2011). Glavni su glikolipidi neuronskih plazmanskih membrana te se sastoje od glikana pri vr- enog na ceramid. Ceramidi se sastoje od dugolan anog amino alkohola sfingozina, s primarnim C2 amino-ugljikom, koji je N-acetiliran s dugolan anim amidom masnih kiselima. Mofidani ganglioziinski ceramidi obi no imaju C1- i C2-hidroksilne grupe, te C4-C5 dvostruku vezu, s C1-hidroksilom povezanim za glikanski lanac (Sandhoff i Harzer 2013; Rösner 2003).

Ganglioziđe je otkrio 1930-ih Ernst Klenk (Klenk 1937;1939), kada je analizirao postmortalno mofđano tkivo pacijenata s Tay-Sachsovom bolesti, kobni infantilni oblik amaurotskog idiotizma. Ganglioziđ GM2 koji sadrži jednu sijalinsku kiselinu prvi je izoliran iz mozga firtve Tay-Sachsove bolesti u kojoj se akumulira i nazvan je "ganglioziđ" temeljem svog polođaja u fliv anim skupinama ili "ganglionu" u mozgu. Isto tako, glukozilceramid (GlcCer) je najprije izoliran iz slezene pacijenta s Gaucherovim boleštom gdje se akumulira (Jalanko i Braulke 2009; Web 5).

U to vrijeme klini ka dijagnoza "amaurotskog idiotizma" obuhva ala je nasljednu bolest koja je karakterizirana velikim brojem lipidom-ispunjenih stanica u fliv anom sustavu i visceralnim organima, mentalnoj retardaciji i o-te enju vida ili sljepo e. Uz pomo biokemijskih, enzimskih, molekularnih genetskih, morfolo-kih i flivotinjskih studija, klini ka slika amaurotskog idiotizma podijeljena je u posljednjih pet desetlje a u dvije glavne skupine bolesti na molekularnoj razini: lizosomalne ganglioziđne skladi-đe bolesti, koje uklju uju GM1- ganglioziđoze i 4 oblika GM2-ganglioziđoze, te 10 oblika neuronskih lipofuscinoza ceroida do sada slabo karakteriziranih (Jalanko i Braulke 2009).

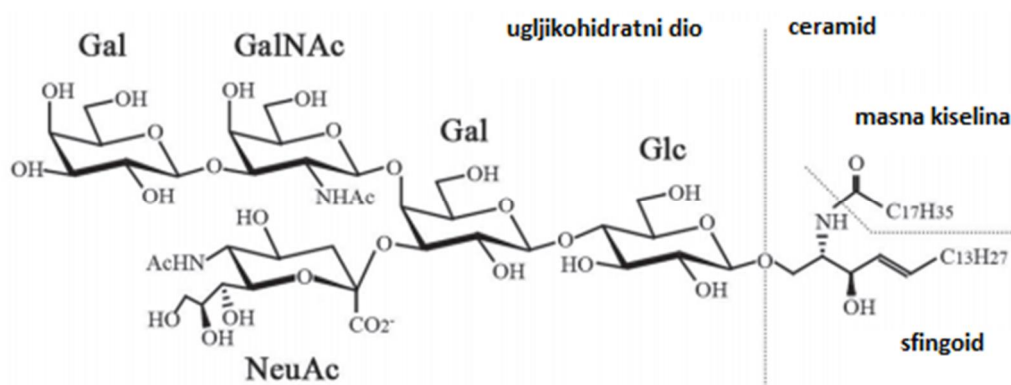
2.4.2. Biosinteza i nomenklatura ganglioziđa

U mozgu ovjeka dominiraju samo etiri ganglioziđa (GM1, GD1, GD1b i GT1b) (Slika 3) koji imaju istu glikansku jezgu pri vr- enu na ceramid, ali razli it broj sijalinskih kiselina vezanih na razli itom mjestu. Iako su prisutni i drugi ganglioziđi, GM1, GD1, GD1b i GT1b ine ukupno 97% mofđanih ganglioziđa (Tettamanti i sur. 1973). Njihova se sinteza odvija postepeno pomo u glikotransferaza koje prenose svaki monosaharid iz njegove aktivne forme (UDP-Gly-UDP-Gal, UDP-GalNAc, ili CMP-NeuAc) u rastu i glikanski lanac. Ono -to je do sada poznato, je da GM1 sudjeluje u ranoj mijelinizaciji, GD1a je marker sinaptogeneze, a GT1b je karakteristi an za zrele neurone, no cjelokupna funkcija im jo- nije definirana (Rösner 2003).



Slika 3. etiri glavna gangliosida u ljudskom mozgu (Preuzeto i prilagođeno prema Schnaar i sur. 2014.)

lji se na njihovoj gra i. Ozna avaju se slovima GM i mu šGō ozna ava gangliozid, a šMō mono, tj. jednu sijalinsku kiselinu. Umjesto slova M, moŕe se nalaziti slovo D, T, Q, P, H i S pri emu redom ozna avaju da se radi o gangliozidu s dva (D), tri (T), etiri (Q), pet (P), –est (H) i sedam (S) sijalinskih kiselina. Brojevi ozna avaju broj –e era koji su vezani za ceramid, stoga oznaka GM1 predstavlja gangliozid s jednom sijalinskom kiselinom te etiri –e era vezana na bazu ceramid (Svennerholm 1963)(Slika 4).



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

Pokazalo se da GM1 smanjuje edem mozga, stabilizira neuronske stani ne membrane (Sohn i sur., 2006), smanjuje ishemijsko o–te enje mozga pod normoglikemijskim uvjetima, –titi neurone od neurodegeneracije, smanjuje nastalu kognitivnu disfunkciju nakon cerebralne ishemije *in vivo* i ublaŕava ekscitotoksi nu neuronsku smrt *in vitro* (Wu i sur., 2001). Rezultati Zhang i sur. (2010) pokazali su da primjena GM1 zna ajno smanjuje broj mrtvih, degenerativnih DNA fragmenata koji nastaju uslijed dijabeti ke hiperglikemije. Mehanizam neuroprotektivnih u inaka GM1 nije u potpunosti razumljiv. Jedan predloŕeni mehanizam je da prekomjerno osloba anje glutamata u sinapsama aktivira NMDA receptor (NMDAR), koji naknadno pove ava dotok kalcija u intracelularni prostor. Kalcij izaziva aktivaciju razli itih lipaza, proteaza, DNaza i na kraju dovodi do stani ne smrti (Runden-Pran i sur., 2005).

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

lanjem 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 ije 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 istalofili i uklonili proteini i nukleinske kiseline, istovremeno povećavaju i topljivost glikosfingolipida (uz ostale lipide). Radi dobivanja što to njihovih rezultata potrebna je rigorozna istraživanja 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 mogu se prepoznati gangliozide (npr. resorcinol-HCl detektira Sia) ili neutralne monosaharide (npr., orcinol-sumporna kiselina detektira sve monosaharide) u TLC vrpici. Reagensi su također dostupni za otkrivanje sulfatnih

bi no se za postupak pro i– avanja sirovog ekstrakta afija ionske izmjene. Ti postupci razdvajaju nepolarne ili neionske lipide iz polarnih lipida (npr. glikosfingolipide) i one koje sadrže nabijene skupine (tj. gangliozidi, fosfolipidi i sulfatidi). Glikolipidi na TLC plo ama mogu se tako er detektirati monoklonskim protutijelima, lektinima ili ak netaknutim mikroorganizmima koji ekspiriraju receptore specifi ne za glikan koji prepoznaju specifi ne glikanske zna ajke. U ve im koli inama glikolipidi se odvajaju pomo u kolonske kromatografije ili TLC visokih performansi na silika-plo ama (Web 5).

2.4.4. Distribucija gangliozida u zdravom mozgu

Kotani i sur. (1993.) su tehnikom imunofluorescencije s monoklonskim antitijelima mi–a prou avali distribuciju gangliozida u mozgu odraslog –takora. U radu su specifi no bili prepoznati gangliozidi GM1, GD1a, GD1b, GT1b i GQ1b. GM1 je prona en u mijelinu i glija stanicama, GD1a ekspiriran je isklju ivo u molekularnom sloju, dok je GD1b na en u granuliranom sloju i to na povr–ini granuliranih stanica. GQ1b na en je tako er na granuliranom sloju, ali u cerebelarnom glomerulu. GT1b je ekspiriran i u granuliranom i molekularnom sloju –to upu uje na njegovu distribuciju u svim slojevima (Kotani i sur. 1993).

Drugo istraflivanje distribucije gangliozida u mozgu izvr–ili su Vajn i sur. (2013), ali na mi–evima kao modelima. Navedeni autori su, osim mozga, ispitivali i podru je le ne mo fline i to u tri ravnine: koronalnoj, sagitalnoj i horizontalnoj ravnini. Utvrdili su da je GM1 ekspiriran najvi–e u bijeloj tvari, iako ga se mo fte prona i i u nekim jezgrama mozga. Tako er se nalazi na mijeliniziranim vlaknima u niflim slojevima korteksa, na dijelu prednje komisure, no izostaje u podru ju amigdaloidnih jezgri. Nije prona en u piramidalnim stanicama CA1 i CA2 Amonovog roga, kao ni u granularnim stanicama dentatnog girusa. Svi ostali gangliozidi su prona eni na podru ju dentatnog girusa, kao i u slojevima hipokampusa.

GD1a i GT1b se najvi–e distribuiraju u svojoj tvari, no mogu se na i i u bijeloj. Raspored im je sli an na rostralnim dijelovima telencefalona, s tim da je GT1b ra–iren na malo vi–e struktura u mozgu. GD1a je posebice ekspiriran u piramidalnim stanicama CA3 Amonovog roga, te u olfaktornom bulbusu, dok ga u ne–to manjim koli inama ima u CA1 stanicama. GD1b ekspiriran je na podru ju dentatnog girusa kao i GT1b. GT1b je slabo izraflen u glomerularnom sloju olfaktornog bulbusa te u CA3 stanicama. Na podru ju kore mozga prona ena je izrazita ekspresija GD1a, GD1b i GT1b, i to u svim slojevima, dok podru je

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).

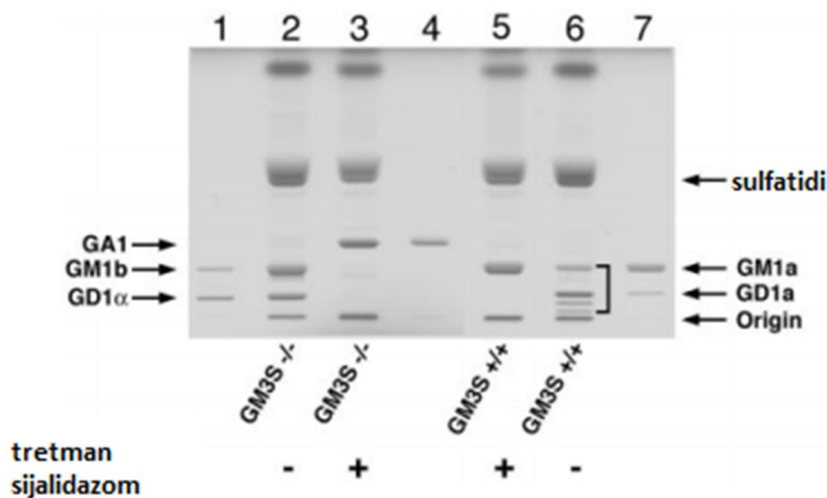
Rezultati Vajn i sur. (2013) pokazali su široku ekspresiju GD1b i GT1b kroz mišji središnji živčani sustav (CNS), dok je imunoreaktivnost na GM1 uglavnom u traktovima bijele tvari, a imunoreaktivnost GD1a kaudalno se smanjuje prema superiornom kolikulusu. Posebno snažnu ekspresiju GD1a, GD1b i GT1b nalazimo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

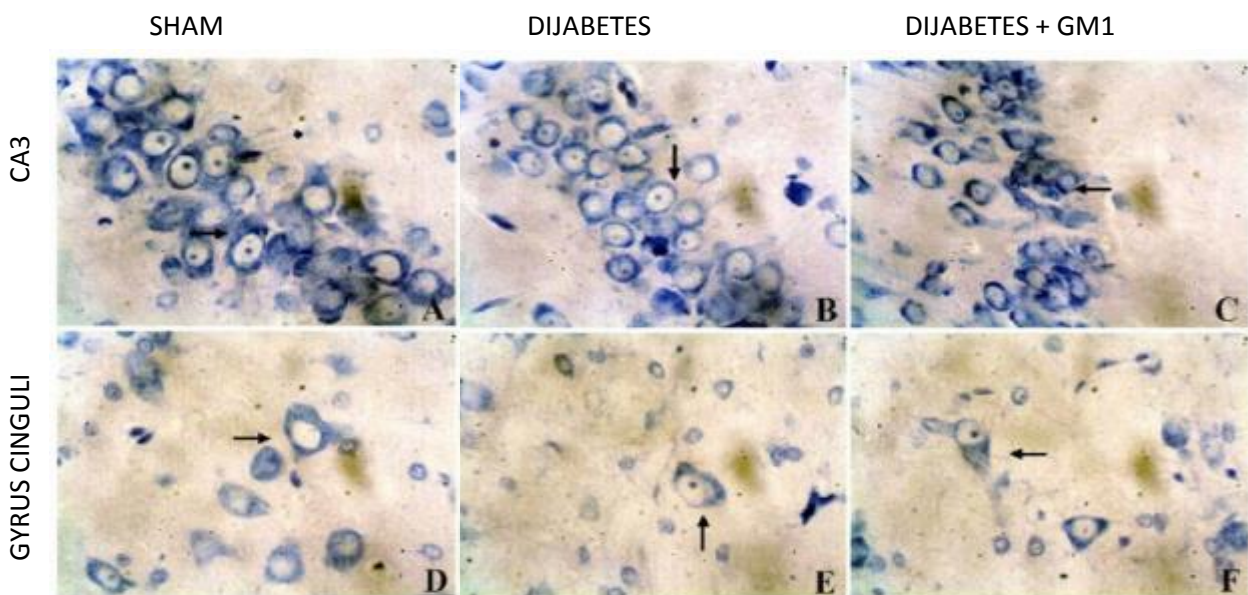
ku da gangliozid GM3 izravno utje e na funkciju kojima se mjerila razina glukoze, inzulina i masno e, kao i hormoni. Da bi se odredila fiziolo-ka uloga gangliozida GM3, te utje e li *in vivo* GM3 gangliozid na signalizaciju inzulinskih receptora, koristili su mi-eve s promijenjenim genom (GM3S, tako er poznatim kao Siat9) koji kodira GM3 sintazu. Dvije generacije mi-eva su bile prou avane; GM3S^{-/-} (eng. *GM3 synthase knockout mice*, mi-evi s promijenjenim genom koji nisu bili u mogu nosti sintetizirati gangliozid GM3) i GM3S^{+/+} (divlji tip). Gangliozidi poput GM1a, GD1a, GD1b i GT1b prona eni su u GM3S^{+/+} generaciji mi-a, 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, -to omogu uje novi pogled na na in regulacije inzulinskog receptora gangliozidima. Poja ana fosforilacija inzulinskog receptora nakon vezanja liganda uzrokovala je pove anu osjetljivost na inzulin, a koncentracija mRNA GM3 sintetaze iznimno se pove ala kod pretilih glodavaca u odnosu na one nisu unosili hranu s visokim udjelom masno e. Mutirani mi-evi imali su pove ane odgovore na testove tolerancije na glukozu i inzulin, te je odsutnost GM3 gangliozida prufala za-titu od inzulinske rezistencije izazvane prehranom s visokim udjelom masti. Spoznaja da nedostatak GM3 mofle utjecati na inzulinsku rezistenciju pove ava mogu nost da inhibicija sinteze GM3 gangliozida mofle poslufliti 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 mi-eva generacije GM3S^{-/-} i GM3S^{+/+} (Preuzeto i prilago eno prema Yamashita i sur. 2003)

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

kojih je jedna bila kontrolna ó sham operirana grupa (kirur-ki normalno tretirana grupa istim protokolom kao i ostale, no bez primjene terapeutskog dijela eksperimenta). Degenerirani neuroni prona eni su u hipokampalnom CA3 (Slika 6B) i cinguliranom korteksu (lat. *Gyrus cinguli*) (Slika 6E) u -takora oboljelih od dijabetesa. Brojevi degenerativnih neurona u istim podru jima smanjeni su kod GM1 tretiranih -takora (Slika 6C, Slika 6F), dok je broj degenerativnih neurona u cinguliranom korteksu bio ve i kod flivotinja s dijabetesom nego u normoglikemijskoj skupini. Lije enje s GM1 u dijabeti kim ishemijskim -takorima zna ajno je smanjilo broj degenerativnih neurona na podru ju CA3 tijekom 1 i 3 sata i u cinguliranom korteksu u reperfuzijama od 3 do 6 sati, u usporedbi s dijabeti kim ishemijskim flivotinjama (Zhang i sur. 2010).



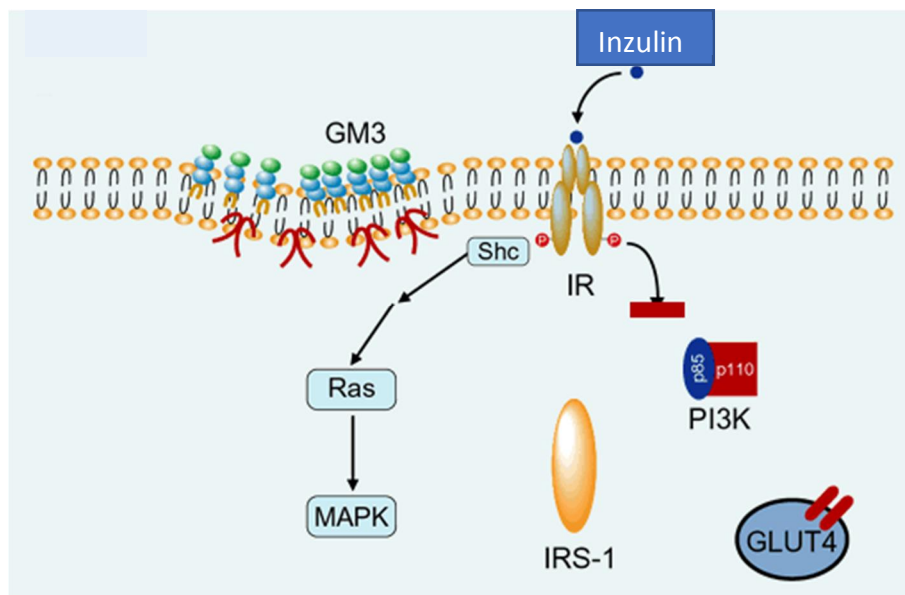
Slika 6. Prikaz degenerativnih neurona u hipokampalnom CA3 i *gyrus cinguli* tijekom 3 sata reperfuzije (Preuzeto i prilago eno prema Zhang i sur. 2010.)

Iz navedenih istraflivanja mofle se zaklju iti da je razina gangliozida smanjena kod dijabeti kog mozga u usporedbi sa zdravim mozgovima; me utim, lije enje inzulinom dijabeti nih flivotinja mofle povratiti glikolipidne frakcije(Kumar i Menon 1993). Tako er postoje izvje-taji da je glikozilacija proteina pove ana u dijabeti kom mozgu (Kumthekar i Katyare 1992).

iju mijelinskog bazi nog proteina (Chan 1987), stoga ti na fosforilaciju proteina i proizvesti posljedi nu promjenu u normalnoj strukturi i funkcijama mijelinske ovojnice. Pove ane razine drugih glikolipida mogu rezultirati njihovim taloženjem u mozgu, –to dovodi do promjena u funkciji moždanog tkiva. Lije enje inzulinom kod dijabeti nih flivotinja vratilo je glikolipidne razine u normalu, –to pokazuje da dijabetes mođe biti odgovoran za promjene u membrani, te tako utje e na metabolizam mozga(Kumar i Menon 1993).

2.5. Utjecaj GM3 gangliozida na mehanizam inzulinske rezistencije

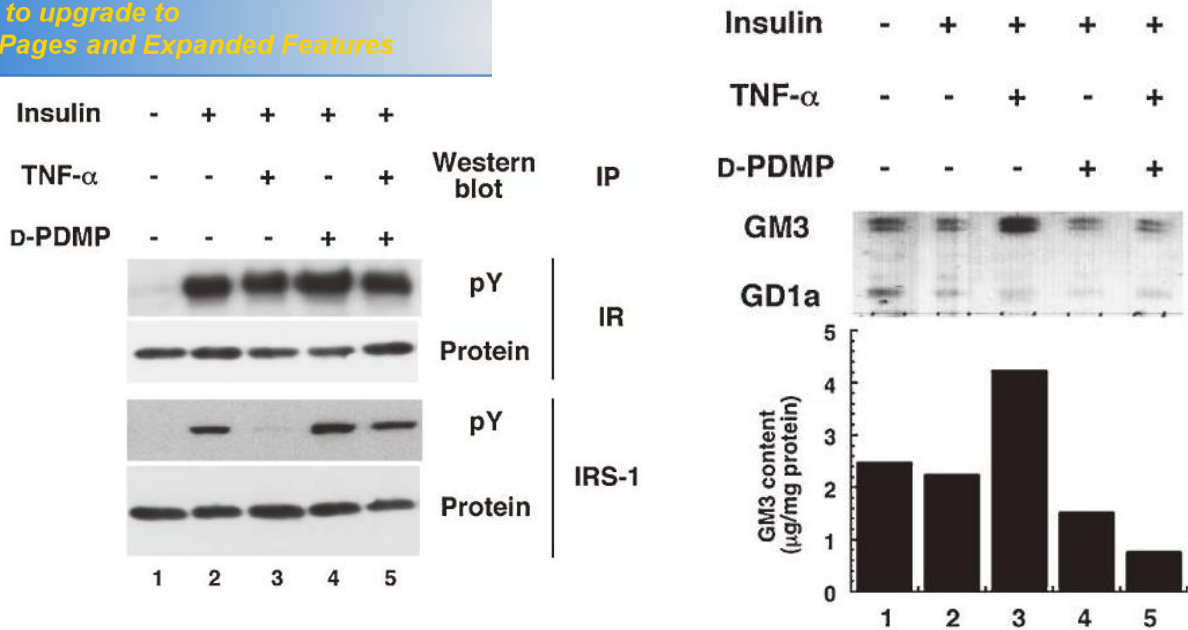
Jo– uvijek nisu u potpunosti poznati mehanizmi kako GM3 uzrokuje stvaranje inzulinske rezistencije, no pretpostavke su slijede e. Mogu e je da je GM3 u interefenciji s fosforilacijom supstrata IRS-1 (eng. *insulin receptor substrate 1*)(Slika 7). Fosforilacija serina u IRS-1, uzrokuje inhibicijsko djelovanje IRS-1 koji e tako utjecati na smanjenje tirozin kinazne aktivnosti receptora inzulina (Hotamisligil i sur. 1994). GM3 ina e sluffi kao prete a za slofenije gangliozide poput GM1a ili GD1a, te pripada gangliozidima koji se nalaze u ekstraneuralnim tkivima, a zapravo ga najvi–e ima u adipocitima (Prokazova i sur., 2009). GM3 mođe 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 metaboli kog djelovanja inzulina u stanju inzulinske rezistencije (Preuzeto i prilago eno prema Web 9)

receptorom (IR) aktivira unutarnju tirozinsku kinazu
iran 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 ega 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 pomo u mTORC2 (eng. *target of rapamycin complex 2*).
Navedena IR-IRS-PI3K-Akt signalna kaskada predstavlja metaboli ki put pokrenut inzulinom
i rezultira translokacijom glukoznog transportera 4 na plazma membranu kako bi se olak-ao
unos glukoze (Zoncu i sur. 2011).

U radu iz 2011. godine Inokuchi je tako er potvrdio Yamashitinu tvrdnju o GM3 i
inzulinskoj rezistenciji iz 2003. godine. Signalna kaskada IR-IRS-PI3-kinaza (IR ó *insulin
receptor* -> IRS ó *insulin receptor substrate* -> PI3 kinaza) je bitan metaboli ki put za ije je
pokretanje odgovoran inzulin. Do komunikacije inzulina s TNF (eng. *tumor necrosis factor
α*) dolazi kada se ne uzrokuje supresija IRS-1 i GLUT-4, pri tome ujedno dolazi do pove anja
koncentracije GM3, kao i GM3 sintaze. TNF utje e tako da nadomje-ta sintezu GM3 i to na
razini transkripcije u masnim stanicama, adipocitima. Da bi se dokazala uklju enost pove ane
koncentracija GM3, i to u onim adipocitima koji su izlofeni tretmanu s TNF , s inzulinskom
rezistencijom Inokuchi je koristio D-PDMP (eng. *D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-
morpholino-1-propanol*). Time se treba posti i uklanjanje glikosfingolipida. Ujedno njime je
dokazan utjecaj u adipocitima na smanjenje rasta koncentracije GM3, -to na kraju upu uje da
u mi-evima i -takorima nedostatak GM3 sintaze uvelike pokazuje utjecaj na pove anje
signalizacije inzulina, za razliku od pove anja 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 istraživati njegovu koncentraciju 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 miševi 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 gangliozid 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 poboljšanju inzulinske rezistencije, nije potrebno ukidanje sinteze GM3 u potpunosti, već samo normalizacija koncentracije navedenog gangliozida. To dovodi do normalne signalizacije inzulina, zahvaljujući i D-PDMP-u koji utječe na TNF- α . Također, spoznaja gdje se gangliozidi 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 gangliozida, 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., Juki, S., Nola, M. (2014) Bolesti gu-tera e. U: Rai, 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* 262:1286-143.
- Koki, S. (2009) Dijagnostika i lije enje -e erne bolesti tipa 2. *Medix: specijalizirani medicinski dvomjese nik* 15: 90-98.
- Koki, S. (2013) Patofiziologija -e erne bolesti tipa 2. U: Ti inovi Kurir, T. (ur.) Patofiziologija endokrinopatija - odabrana poglavlja. Redak, Split, str. 61-73.

sphingolipids their metabolic pathways and the
e diseases. *Angewandte Chemie International Edition*

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) A 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, B. (2011) Liraglutid u lije enju –e erne bolesti tipa 2. *Lije ni ki 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., Podzik, 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 GotoóKakizaki 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.

- Awai, 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 PEPCK and GLUT4. *Drug design, development and therapy* 10: 219362202.
- 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) Monosialotetrahexosyl-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.

Zja i -Rotkvi , V. (2009) Oralni hipoglikemizantni lijekovi u lije enju –e erne bolesti. Medix:
specijalizirani medicinski dvomjese 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 za-titi flivotinja. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2017_10_102_2342.html (7.9.2017.)

za-titi flivotinja 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., Viljeti , B., Degme i , 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.)