

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Monika Berecki

SASTAV LIPIDA STANIČNE MEMBRANE
JETRE ŽENKI ŠTAKORA SPRAGUE
DAWLEY HRANJENIH MASNOM I
SLATKOM HRANOM I TRETIRANIH
METFORMINOM ILI LIRAGLUTIDOM

Završni rad

Osijek, 2018.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Monika Berecki

**SASTAV LIPIDA STANIČNE MEMBRANE
JETRE ŽENKI ŠTAKORA SPRAGUE
DAWLEY HRANJENIH MASNOM I
SLATKOM HRANOM I TRETIRANIH
METFORMINOM ILI LIRAGLUTIDOM**

Završni rad

Osijek, 2018.

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek, Katedra za medicinsku biologiju i genetiku.

Mentorica rada: prof. dr. sc. Marija Heffer

Rad ima 33 radna lista, 3 tablice i 3 slike.

Zahvale:

Zahvaljujem prof. dr. sc. Mariji Heffer na prihvaćanju mentorstva, prenošenju mnoštva znanja i savjeta, strpljenju, vremenu i dobroj volji te ogromnom pozitivnom utjecaju na moje prethodno i buduće obrazovanje. Pisanje ovog završnog rada, uz takvu mentoricu i uzor, za mene je bilo prekrasno iskustvo, koje me potaklo da budem još znatiželjnija, kritičnija i odlučnija u pisanju svih budućih znanstvenih radova.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Senki Blažetić za vodstvo kroz praktični dio rada, upoznavanje s tehnikama pripreme i obrade uzoraka te svo znanje stečeno u laboratoriju Odjela za biologiju. Bez njezinog strpljenja i ogromne volje, ovaj rad ne bi bilo moguće napisati

Sadržaj

Popis kratica.....	II
1. Uvod.....	1
1.1. Inzulinska rezistencija – šećerna bolest tipa 2	1
1.1.1. Inzulinski receptori i glukozni nosači.....	2
1.1.2. Inzulinska rezistencija u žena	3
1.2. Jetra	4
1.2.1. Jetra i inzulinska rezistencija.....	4
1.2.2. Sastav stanične membrane – lipidne splavi	6
1.3. Gangliozidi	7
1.3.1. Uloga gangliozida u razvoju inzulinske rezistencije	7
1.3.2. Interakcija inzulinskih receptora s kaveolinima i jednostavnim formama gangliozida	8
1.4. Antidijabetska terapija.....	9
1.4.1. Liraglutid	9
1.4.2. Metformin.....	10
1.5. Animalni modeli u istraživanju pretilosti i inzulinske rezistencije	11
2. Hipoteza	13
3. Ciljevi istraživanja	14
4. Materijali i metode	15
4.1. Materijali	15
4.2. Metode.....	15
4.2.1. Izolacija i analiza gangliozida	15
4.2.2. Kvalitativna analiza gangliozida	16
4.3. Statistička metoda	17
5. Rezultati	18
6. Rasprava.....	21
7. Zaključci	25
8. Sažetak	26
9. Summary	27
10. Reference	28
11. Životopis	34

Popis kratica

AMP	adenozin monofosfat (engl. <i>adenosine monophosphate</i>)
AMPK	proteinska kinaza aktivirana AMP-om (engl. <i>AMP-activated protein kinase</i>)
cAMP	ciklički-AMP (engl. <i>cyclic-AMP</i>)
CEM	mikrodomena bogata kaveolinom (engl. <i>caveolin-enriched microdomains</i>)
DAG	diacilglicerol (engl. <i>diacylglycerol</i>)
GFR	brzina glomerularne filtracije (engl. <i>glomerular filtration rate</i>)
GLP-1	glukagonu sličan polipeptid (engl. <i>glucagone like polipeptide</i>)
GUK	glukoza u krvi
HFHSD	dijeta bogata mastima i šećerima (engl. <i>high-fat, high-sugar diet</i>)
HFHSD+L	uzorak ženke iz skupine hranjene dijetom bogatom mastima i šećerima na terapiji liraglutidom
HFHSD+M	uzorak ženke iz skupine hranjene dijetom bogatom mastima i šećerima na terapiji metforminom
HPTLC	tankoslojna kromatografija visoke učinkovitosti (engl. <i>high-performance TLC</i>)
IGF-1	inzulinu sličan čimbenik rasta 1 (engl. <i>insulin-like growth factor 1</i>)
IGF-2	inzulinu sličan čimbenik rasta 2 (engl. <i>insulin-like growth factor 2</i>)
IRS-1	supstrat inzulinskog receptora 1 (engl. <i>insulin receptor substrate 1</i>)
IRS-2	supstrat inzulinskog receptora 2 (engl. <i>insulin receptor substrate 2</i>)
NASH	nealkoholni steatohepatitis

PCOS	sindrom policističnih jajnika (engl. <i>polycystic ovary syndrome</i>)
PI₃K	fosfoinozimid 3-kinaza (engl. <i>phosphoinositide 3-kinase</i>)
PIP₃	fosfatidilinozitol (3,4,5) -trisfosfat (engl. <i>phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate</i>)
PKC	protein-kinaza C (engl. <i>protein-kinase C</i>)
SD	standardna dijeta
TLC	tankoslojna kromatografija (engl. <i>thin-layer chromatography</i>)
TNF-α	čimbenik tumorske nekroze alfa (engl. <i>tumor necrosis factor alpha</i>)
VLDL	lipoprotein vrlo male gustoće (engl. <i>very low-density lipoprotein</i>)

1. Uvod

Šećerna bolest tip 2 kronični je metabolički poremećaj okarakteriziran visokom koncentracijom glukoze u krvi, inzulinskom rezistencijom i relativnim manjkom inzulina. (1) Vodeći je tip šećerne bolesti s prevalencijom od 90%, uz šećernu bolest tip 1 i gestacijski dijabetes, koji čine svega 10% slučajeva. Učestalost pojave šećerne bolesti tipa 2 raste proporcionalno s povećanjem prevalencije gojaznosti, koja je najveći javnozdravstveni problem današnjice. Iako se pretpostavlja da su mehanizmi nastanka bolesti vrlo slični u oba spola, njezina pojavnost je nešto češća u ženskoj populaciji, odnosno žene imaju veću statističku vjerojatnost od obolijevanja. (2) U dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da postoji poveznica sindroma policističnih jajnika (PCOS) i razvoja bolesti u mladih žena (3), ali pošto su sva dosadašnja istraživanja provedena na mladoj populaciji, ne postoji dovoljno znanstvenih podataka o longitudinalnom utjecaju prehrane i načina života na razvoj šećerne bolesti tipa 2 kod žena starije životne dobi.

1.1. Inzulinska rezistencija – šećerna bolest tipa 2

Šećerna bolest tipa 2 javlja se radi nedovoljne produkcije inzulina u organizmu koji je razvio rezistenciju na isti. (4) Inzulin se fiziološki veže za receptore ciljnih stanica, što dovodi do kaskade reakcija pomoću kojih se transportira i metabolizira glukoza. Inzulinska rezistencija javlja se kada tkiva (najčešće jetra, mišići i masno tkivo) neadekvatno odgovaraju na fiziološke razine inzulina. Prema tome, inzulinska rezistencija predstavlja defekt u prijenosu signala od inzulinskog receptora do nizvodnih ciljnih molekula. (5) Kako bi se postigle fiziološke vrijednosti glukoze u krvi, gušterača pojačano luči inzulin i hiperinzulinemijom dovodi do kompenzirane inzulinske rezistencije. Međutim, iako se koncentracija inzulina povećava s povećanjem rezistencije, nakon nekog vremena ipak dolazi do poremećaja tolerancije glukoze i hiperglikemije. To u konačnici dovodi do poremećaja funkcije β -stanica gušterače i one ne uspijevaju sintetizirati i lučiti dovoljno inzulina te dolazi do hipoinzulinemije. (6) Inzulinska rezistencija može biti izazvana brojnim poremećajima u metabolizmu glukoze, primjerice povećanom razgradnjom masti, rezistencijom na ili manjkom inkretina, visokim razinama glukagona, poremećajima u središnjem živčanom sustavu ili funkciji bubrega. Proporcija rezistencije je individualna i ovisi radi li se o primarnoj rezistenciji na inzulin uz minimalni

poremećaj njegovog lučenja ili smanjenom lučenju inzulina uz zanemarivu rezistenciju tkiva. (5) U fiziološkom stanju jetra na povišenu razinu inzulina odgovara supresijom otpuštanja glukoze zaustavljanjem glikolize i poticanjem glukoneogeneze. Međutim, kod šećerne bolesti tipa 2, i uz stimulaciju inzulinom, jetra nastavlja otpuštati glukozu u krv što posljedično dovodi do hiperglikemije. (7) Pretpostavka je da promjene u sastavu stanične membrane jetrenih stanica (hepatocita) imaju utjecaj na ekspresiju inzulinskih receptora i glukoznih nosača što ima izravni utjecaj na razvoj rezistencije.

1.1.1. Inzulinski receptori i glukozni nosači

Inzulinski receptori spadaju u skupinu transmembranskih protein-tirozin-kinaza receptora. (8) Kodirani su genom *INSR*, a njegovom transkripcijom nastaju dvije izoforme receptora (IR-A i IR-B). Posttranslacijskim modifikacijama izoformi nastaju α i β podjedinice, koje homo- ili heterodimerizacijom stvaraju disulfidno vezani transmembranski receptor. (9) Inzulin, inzulinu sličan čimbenik rasta 1 (engl. *insulin-like growth factor 1*, IGF-1) i inzulinu sličan čimbenik rasta 2 (engl. *insulin-like growth factor 2*, IGF-2) endogeni su supstrati inzulinskih receptora. Vezanje supstrata za α podjedinicu receptora rezultira autofosforilacijom tirozinskih ostataka β podjedinice. Takva strukturalna promjena dovodi do aktivacije specijaliziranih proteina (poput supstrata inzulinskog receptora, IRS) koji potiču kaskadnu reakciju unutar stanice i na taj način omogućavaju održavanje homeostaze glukoze. Aktivirani IRS-1 započinje kaskadu vezanjem na fosfoinozimid 3-kinazu (PI_3K) koja katalizira reakciju nastanka drugog glasnika fosfatidilinozitol (3,4,5) -trisfosfata (PIP_3). PIP_3 aktivira brojne druge katalaze, uključujući protein-kinazu B, odgovornu za translokaciju glukoznih nosača na staničnu membranu. (10)

Glukozni nosači (GLUT) skupina su proteina zaduženih za prijenos glukoze preko stanične membrane u oba smjera. Ovi proteini imaju važnu ulogu u održavanju koncentracije glukoze u krvi (GUK), odnosno normoglikemije. Poznato je 14 izoformi nosača, podijeljenih u 3 skupine, iako je zasada dobro razjašnjena uloga samo prvih 5 (GLUT 1-5) prikazanih u tablici (Tablica 1). (11)

Tablica 1. Smještaj i uloga glukoznih nosača GLUT 1-5.:

Nosač	Tkivo	Uloga
<i>GLUT1</i>	Fetalno, eritrociti, tkivo barijera (npr. barijera krv-mozak)	Održava bazalnu koncentraciju glukoze u stanicama; broj se povećava sniženjem GUK
<i>GLUT2</i>	Stanice bubrežnih kanalića, hepatociti, β -stanice gušterače, tanko crijevo	Dvosmjerni prijenos omogućava stanicama procjenu koncentracije glukoze u okolini; u jetri potreban za glikolizu i glukoneogenezu
<i>GLUT3</i>	Neuroni i posteljica	Visok afinitet omogućava održavanje bazalne koncentracije glukoze i u hipoglikemiji
<i>GLUT4</i>	Masno tkivo, skeletni mišići, srčani mišić	Inzulin-ovisni nosač
<i>GLUT5</i>	Enterociti, skeletni mišići, stanice testisa, bubrega, masno tkivo i neuroni	Prijenos fruktoze

1.1.2. Inzulinska rezistencija u žena

U dosadašnjim istraživanjima promatrano je nekoliko parametara koji bi mogli imati utjecaj na patogenezu šećerne bolesti tipa 2 u ženskoj populaciji. U usporednoj studiji muške i ženske populacije, najevidentnije razlike, koje bi mogle rezultirati razvojem inzulinske rezistencije, jesu preraspodjela masnog tkiva i hormonalni sastav. (12) Naime, u skupinama ispitanika s jednakim indeksom tjelesne mase, muški ispitanici imali su manje perifernog masnog tkiva uz povećan adipozitet jetre, dok su ženske ispitanice imale povišen opći adipozitet, posebice u vidu potkožnog masnog tkiva. (13) Također, uočeno je da estrogeni vjerojatno imaju protektivnu ulogu kod razvoja rezistencije jer na životinjskim modelima pokazuju utjecaj na hepatocite u vidu inhibicije otpuštanja glukoze i potiču transport glukoze u mišiće. (14) Estrogeni sudjeluju i u preraspodjeli masnog tkiva – menopauzalne žene s nedostatnim lučenjem estrogena u usporedbi s premenopauzalnim ženama s normalnim razinama hormona, imaju povišen adipozitet i rizik za razvoj inzulinske rezistencije. (15) Iako su uočene razlike u odgovoru na suvremene lijekove protiv rezistencije među spolovima, za sada još uvijek ne postoji dovoljno dokaza koji bi sa sigurnošću mogli omogućiti provođenje spolno usmjerene terapije.

1.2. Jetra

Jetra je metabolički najsloženiji organ kralježnjaka, ključan za održavanje homeostaze organizma. Osim proizvodnje i lučenja žuči te metabolizma lijekova i drugih stranih tvari (detoksikacije), u stanicama jetrenog parenhima (hepatocitima) odvijaju se i brojni procesi vezani uz metabolizam ugljikohidrata, proteina, aminokiselina i lipida. (11)

Homeostaza glukoze se u jetri održava procesima glikogeneze, glikolize i glukoneogeneze. Glikogeneza je proces prevođenja i skladištenja glukoze u obliku glikogena. U stanjima hipoglikemije hepatociti, procesom suprotnim glikogenezi – glikolizom, prevode rezerve glikogena u glukozu i otpuštaju je u krvotok. Stanice jetre imaju sposobnost stvaranja glukoze *de novo* iz određenih aminokiselina, laktata ili glicerola procesom glukoneogeneze. Sve ovo jetri daje epitet najvažnijeg organa za održavanje normoglikemije. (16, 17)

Također, jetra je odgovorna za sintezu i razgradnju proteina i aminokiselina. U njoj se sintetiziraju faktori zgrušavanja, proteini akutne faze, albumini plazme i drugi organizmu neophodni proteini. (18) U hepatocitima se, osim sinteze lipoproteina i kolesterola, odvija i proces lipogeneze – sinteze masnih kiselina i triglicerida iz acetyl-CoA, odnosno esterifikacijom masnih kiselina i glicerola. (17)

Ima neizostavnu ulogu u probavi jer producira i luči žuč potrebnu za emulgiranje masti i apsorpciju vitamina K iz hrane. Aktivna je i endokrinološki, odnosno sintetizira inzulinu sličan faktor rasta 1 (IGF-1), polipeptidni hormon važan za rast i razvoj djece te anaboličke procese u odraslih.

Jetra je iznimno važna za procese razgradnje i detoksikacije. U njoj se razgrađuju brojni hormoni (uključujući inzulini) te bilirubin, produkt razgradnje hema kojem se procesom glukuronidacije omogućava ekskrecija u žuč. (18) Ciklusom ureje, toksični produkt metabolizma amonijak prelazi u ureju, koja se urinom eliminira iz organizma. (17) Metabolizam lijekova i drugih toksičnih tvari najčešće rezultira sintezom konjugiranih spojeva netoksičnih za organizam, što također omogućava njihovu eliminaciju putem urina. (16)

1.2.1. Jetra i inzulinska rezistencija

Jedna od trenutnih teorija povezanosti inzulinske rezistencije s metaboličkim defektima unutar jetre bazira se na ciklusu koji uključuje prisutnost nealkoholne masne bolesti jetre (NASH – nealkoholni steatohepatitis), diacilglicerol (DAG) i protein-kinaze C (PKC). (19)

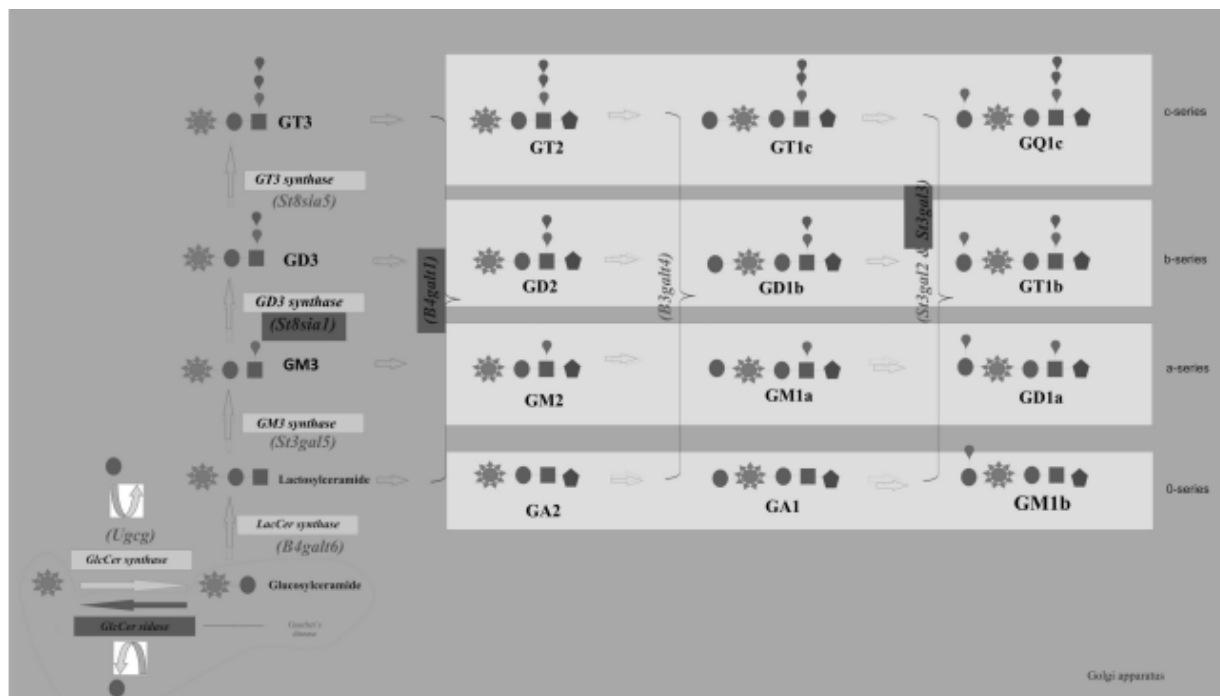
Nealkoholni steatohepatitis definira se kao sindrom oštećenja jetre, koji se histološki ne razlikuje od alkoholnog steatohepatitisa, ali se razvija neovisno o unosu alkohola. Takav oblik steatoze najčešće se javlja u žena srednje životne dobi (između 40 i 60 godina) i prekomjerne tjelesne težine, uz čestu prisutnost hiperlipidemije ili šećerne bolesti tipa 2. Patofiziološki mehanizam nastanka NASH temelji se na nakupljanju triglicerida u jetri koje je uzrokovano smanjenom sintezom lipoproteina vrlo niske gustoće (VLDL) i pojačanom sintezom triglicerida, što je posljedica smanjene oksidacije masnih kiselina uz njihov povećan unos prehranom. Prema tome, prehrana bogata mastima kod takvih pacijenata uzrokuje visoke razine triglicerida te njihovih razgradnih produkata, za koje je primijećeno da imaju ulogu u patofiziologiji inzulinske rezistencije. (20) Naime, diacilglicerol (DAG) jedan je od razgradnih produkata triglicerida iz hrane, a u inzulinskom signalnom putu sudjeluje kao drugi glasnik. Njegova uloga je aktivacija DAG-ovisnih protein kinaza C. (21) Za sada je poznato 15 izoformi protein-kinaza C, podijeljenih u skupine s obzirom na ovisnost o DAG-u i Ca^{2+} : tipične (α , β_I , β_{II} , i γ izoforme; za aktivaciju potreban Ca^{2+} , DAG i fosfolipid, npr. fosfatidilserin), nove (δ , ϵ , η , i θ izoforme; potreban DAG, ali ne Ca^{2+}) i atipične (ζ i ι / λ izoforme; neovisne o Ca^{2+} i DAG-u). Osnovna uloga PKC je fosforilacija serinskih i tirozinskih ostataka proteina te su zbog toga neizostavne u nekoliko signalnih puteva, uključujući inzulinsku signalizaciju. Naime, uočeno je da različite izoforme imaju različito djelovanje na inzulinsku signalizaciju i transport glukoze. Atipične (PKC- ζ i $-\lambda$) služe kao medijatori kaskadnih reakcija, dok DAG-ovisne (tipične i nove PKC) pokazuju snažan inhibitorski utjecaj na inzulinske receptore, vjerojatno fosforilacijom supstrata za inzulinske receptore (PKC- α , $-\delta$ i $-\theta$) ili inhibicijom autofosforilacije samih receptora (PKC- β_I i $-\beta_{II}$). (22) Razvojem inzulinske rezistencije, onemogućava se kontrola metabolizma masti inzulinom te dolazi do njihovog nakupljanja u stanicama mišića i jetre u obliku masnih kapljica unutar citoplazme. Upravo se iz tog razloga povezanost nastanka inzulinske rezistencije s razvojem nealkoholnog steatohepatitisa opisuje kao ciklus, odnosno, postojanje jednog stanja može utjecati na razvoj drugog, i obratno. (19, 20) Trenutnim istraživanjima pokušava se razaznati što je „okidač“, tj. predstavlja li inzulinska rezistencija rizik za razvoj NASH ili je ona samo još jedna od nuspojava degenerativnih promjena u sastavu hepatocita uzrokovanih prekomjernom tjelesnom težinom.

1.2.2. Sastav stanične membrane – lipidne splavi

Hepatociti su, kao i sve ostale eukariotske stanice, obavijeni staničnom membranom koja odjeljuje njihov sadržaj od okoline. Staničnu membranu čini fosfolipidni dvosloj, nepropustan za većinu topljivih molekula, i proteini odgovorni za specifične funkcije membrane. Fosfolipidni dvosloj građen je od 4 osnovna fosfolipida (fosfatidilkolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina i sfingomijelina) koji čine više od polovice lipida većine membrana. Uz njih, membrana sadržava i glikosfingolipide i kolesterol. Glikosfingolipidi su relativno mala komponenta, čineći svega 2% lipida većine staničnih membrana, a nalaze se isključivo u vanjskom sloju, ugljikohidratnim dijelom okrenuti prema staničnoj površini. S kolesterolom stvaraju male polukrute domene nazvane “lipidne splavi” koje su obogaćene proteinima s GPI-sidrom, te proteinima uključenim u staničnu signalizaciju i endocitozu. (18) Pretpostavka je da su glikosfingolipidi jedna od skupina molekula čija je ekspresija promijenjena u šećernoj bolesti tipa 2, a među njima se posebno ističu oni koji nose sijalinsku kiselinu – gangliozi.

1.3. Gangliozidi

Gangliozidi su molekule građene od lipidnog sidra – ceramida i polarnog dijela – oligosaharidnog lanca s jednom ili više sijalinskih kiselina vezanih na unutrašnju galaktozu šećernog lanca. Nalaze se na vanjskoj strani stanične membrane i imaju sposobnost uzajamnog djelovanja s drugim molekulama putem elektrostatskih i hidrofobnih interakcija te zbog toga imaju vrlo važnu ulogu u staničnoj aktivnosti, metabolizmu i signalizaciji. (23)



Slika 1. Genska regulacija biosinteze gangliozida. (Zahvala autorici doc. dr. sc. Senki Blažetić)

1.3.1. Uloga gangliozida u razvoju inzulinske rezistencije

Opaženo je da postoji poveznica između stvaranja inzulinske rezistencije i broja gangliozida u staničnim membranama. Naime, uočeno je da dijabetične životinje imaju smanjenu kompleksnost gangliozida (nedostaju složene forme poput GM1¹, GD1a, GD1b i GT1b), a istovremeno je povećan broj jednostavnih formi gangliozida (obično gangliozida GM3). Smatra se da te jednostavne forme u povišenoj koncentraciji na različite načine utječu na funkciju inzulinskih receptora.

¹ G - gangliozid; M, D, T, Q - oznaka broja sijalinskih ostataka u molekuli (mono-, di-, itd.); 1,2,3 - oznaka duljine osnovnog šećernog lanca (1 imaju najdulji lanac s 4 šećera, a 3 najkraći s 2 šećera)

Uočeno je da su jednostavne forme gangliozida (npr. GM3) odgovorne za inhibiciju aktivnosti protein-tirozin-kinaza receptora, što onemogućava provođenje signala kaskadnim reakcijama unutar stanice. Također, GM3 smanjuje intenzitet inzulinske signalizacije u staničnim kulturama. Ta otkrića dovela su do zaključka da bi prekomjerna ekspresija GM3 negativnom interferencijom sa signalom inzulinskog receptora mogla imati utjecaj na patogenezu šećerne bolesti tipa 2. (24) Fosforilacijom supstrata inzulinskih receptora IRS-1 i IRS-2, GM3 utječe na inzulinsku signalizaciju. Naime, na kultiviranim stanicama tretiranim TNF- α , inzulinsku rezistenciju prati povišenje GM3 na staničnoj površini. Posljedično dolazi do povećanja količine mRNA GM3 sintaze, odnosno povećane sinteze, ekspresije i aktivnosti GM3. To saznanje dovelo je do zaključka da TNF- α ima sposobnost nadziranja sinteze GM3 na transkripcijskoj razini u staničnim kulturama adipocita. U istom istraživanju primijećena je i povezanost većeg broja jednostavnih formi gangliozida s povećanom fosforilacijom serinskog ostatka na IRS-1. Supstrat za inzulinski receptor može biti fosforiliran na tirozinskim ili serinskim ostacima. Fosforilacijom serinskog ostatka, aktivnost receptora se inhibira što posljedično dovodi do razvoja inzulinske rezistencije. (25)

Interakcija gangliozida s inzulinskim signalnim putevima ispitana je i pomoću farmakoloških pripravaka. Inhibiranjem glukozilceramidne sinteze, odnosno sprječavanjem sinteze GM3, može se zaustaviti TNF- α inducirana inzulinska rezistencija. (25)

Kao što je već navedeno, fosforilacija tirozinskog ostatka na IRS-1 i autofosforilacija inzulinskog receptora, neophodni su procesi u staničnoj signalizaciji posredovanoj inzulinskim receptorima. (23) Uočeno je da povišene razine GM3 izravno utječu na taj proces tako što ga inhibiraju. Pojava je ispitivana na miševima s utišanim genom (engl. *knock-out*, KO) za GM3 sintazu (*St3gal5^{-/-}*). Mutirane životinje su, osim poboljšane fosforilacije inzulinskih receptora nakon vezanja liganda (inzulina), pokazale i bolji odgovor na inzulinski test tolerancije. Nadalje, mutacija je izazvala poboljšani odgovor na glukozu i zaštitila miševu od degenerativnih promjena uzrokovanih hranom bogatom mastima. (26, 27)

1.3.2. Interakcija inzulinskih receptora s kaveolinima i jednostavnim formama gangliozida

Kaveole su strukture bogate proteinima i lipidima, poput kolesterola i sfingolipida. Radi se o posebnom tipu „lipidnih splavi“, smještenih na površini većine eukariotskih stanica (posebice adipocita i endotelnih stanica) u obliku malih udubljenja stanične membrane. (28)

Kaveole su oligomeri formirani vezanjem monomera kaveolina s lipidnim splavima. Prema tome, kaveolini su odgovorni za lokalne strukturalne promjene stanične membrane. (29)

Adipociti sadrže mikrodomene bogate kaveolinom (CEM) u kojima su smješteni inzulinski receptori. Za normalnu raspodjelu takvih mikrodomena, a samim time inzulinskih receptora u njima, potreban je kolesterol. U istraživanju je dokazano da nedostatak kolesterola, endogeni ili farmakološki izazvan, dovodi do ometanja normalne funkcije kaveolina. (30) Također, u novijim istraživanjima uočeno je da se jednostavne forme gangliozida (GM3) i kaveolin natječu za vezno mjesto inzulinskih receptora, što u konačnici dovodi do preraspodjele receptora unutar mikrodomena i posljedično ometa pokretanje signalne kaskade. (25)

1.4. Antidijabetska terapija

Danas se ravnoteža razine glukoze i inzulina kod dijabetičara regulira pomoću antidijabetika. To su tvari koje omogućavaju održavanje normalne razine glukoze u krvi na način da potiču endogeno lučenje inzulina. Najčešće korišteni suvremeni antidijabetici su: meglitinidi (repaglinid), derivati sulfonilureje (gliburid, glipizid, glimepirid), lijekovi na bazi inkretina (sitagliptin, eksenatid, liraglutid), bigvanidi (metformin), derivati D-fenilalanina (nateglinid), analog amilina (pramlintid), inhibitori α -glukozidaza (miglitol, akarboza) i tiazolidindioni (pioglitazon, rosiglitazon). (31) U ovom istraživanju ženke štakora tretirane su metforminom i liraglutidom.

1.4.1. Liraglutid

Liraglutid je analog GLP-1, glukagonu sličnom peptidu koji se veže za GLP-1 receptore. Endogeni GLP-1 inkretinski je hormon koji vezanjem za specifične receptore potiče lučenje inzulina ovisno o glukozi. Zbog svojeg farmakokinetičkog profila ima produljeno vrijeme djelovanja koje omogućava 24-satnu kontrolu razine glukoze u krvi. U stanju hiperglikemije zaustavlja neprimjereno visoko lučenje glukagona, potiče lučenje inzulina, smanjuje osjećaj gladi i blago odgađa pražnjenje želuca. U suprotnom, odnosno u stanju hipoglikemije, smanjuje lučenje inzulina uz neometano lučenje glukagona. Doza lijeka primjenjuje se subkutanom injekcijom jedan puta dnevno, a osnovne uloge su mu poboljšanje regulacije glikemije i smanjenje kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta. (32, 33)

Uporaba liraglutida indicira se odraslim pacijentima sa šećernom bolesti tipa 2 kao dodatak pravilnoj prehrani i tjelovježbi, ukoliko postoje prethodne negativne reakcije na monoterapiju metforminom ili uz druge pripravke za liječenje šećerne bolesti tipa 2. Europska medicinska agencija je 2015. godine odobrila liraglutid za primjenu na gojaznim pacijentima (s indeksom tjelesne mase iznad 30) i pacijentima s prekomjernom tjelesnom težinom (s indeksom tjelesne mase iznad 27) uz prisutnost barem jednog stanja uzrokovanog prekomjernom tjelesnom težinom. Prema dosadašnjim kliničkim istraživanjima, najčešće nuspojave primjene liraglutida su problemi u gastrointestinalnom sustavu – najčešće mučnina i proljev, rjeđe povraćanje i konstipacija. Rijetke nuspojave su: dehidracija, hipoglikemija, akutni pankreatitis i oštećenja tkiva štitnjače, uključujući maligne promjene. (33, 34, 35)

1.4.2. Metformin

Iako mehanizam djelovanja metformina još uvijek nije potpuno razjašnjen, smatra se da uključuje aktivaciju AMP-ovisne kinaze, (36) inhibiciju glukagonom-potaknute produkcije cikličkog adenzin monofosfata (cAMP) (37), smanjenu aktivaciju protein-kinaze A i djelovanje na crijevni mikrobiom.

AMP-ovisna kinaza (AMPK) je enzim koji ima važnu ulogu u kontroli inzulinske signalizacije i metabolizmu glukoze i lipida. (38) Njezina aktivacija neophodna je za inhibiciju ekspresije gena za jetrene enzime koji sudjeluju u glukoneogenezi (fosfoenolpiruvat-karboksikinaze i glukoza-6-fosfataze). (39) Metformin se zbog antagonističkih svojstava često koristi umjesto AMPK u istraživačke svrhe. (40) Također, metformin povišuje koncentraciju adenzin monofosfata (AMP) u plazmi i vjerojatno na taj način smanjuje produkciju cAMP-a, drugog glasnika odgovornog za aktivaciju protein-kinaze A (cAMP-ovisne protein-kinaze), čija je uloga aktivacija enzima koji sudjeluju u glikolizi. Niža aktivnost protein-kinaze A, prema tome, inhibira glikolizu i potiče procese glukoneogeneze što dovodi do sniženja koncentracije glukoze u krvi. (37, 40) Uočen je i njegov antagonistički utjecaj s glukagonom, što bi moglo objasniti uzrok sniženja koncentracije glukoze u krvi natašte. (41) Istraživanja na dijabetičnim miševima pokazala su promjene i u sastavu crijevnog mikrobioma, što je moguća posljedica utjecaja metformina na sekreciju glukagonu sličnog peptida-1. (42)

Uz smanjenje sinteze glukagona, metformin povećava osjetljivost na inzulin, poboljšava periferni unos glukoze mobilizacijom GLUT4 nosača potaknutom povećanom aktivnošću

AMPK u skeletnim mišićima (43) te smanjuje inzulinom-potaknutu supresiju oksidacije masnih kiselina (44) i apsorpciju glukoze iz gastrointestinalnog sustava.

Metformin je, kao monoterapija ili u kombinaciji s drugim lijekovima, trenutni lijek izbora u liječenju šećerne bolesti tipa 2 širom Europske Unije. Odobren je od strane Europske medicinske agencije 1960. godine, a njegova uporaba indicirana je kod odraslih pacijenata s prekomjernom tjelesnom težinom. (45) Primjenjuje se u obliku tableta, koje često sadrže kombinaciju nekoliko antidijabetika. (46) Nuspojave metformina su rijetke i najčešće podrazumijevaju gastrointestinalne smetnje poput proljeva, povraćanja, mučnine i dehidracije. Lijek se iz organizma u potpunosti odstranjuje bubrezima pa pacijenti s umjerenim i teškim oštećenjima bubrega imaju veći rizik za razvitak laktoacidoze uzrokovane nakupljanjem laktata u organizmu. Kod takvih je pacijenata potrebno odrediti brzinu glomerularne filtracije (GFR) i na temelju rezultata postaviti individualnu terapiju sa smanjenom dozom lijeka. (47) U ženskoj populaciji, metformin se koristi kod pacijentica sa sindromom policističnih jajnika za kontrolu tjelesne težine i prevenciju komplikacija uzrokovanih šećernom bolešću tipa 2. (48) Međutim, njegova terapijska učinkovitost još uvijek nije dovoljno istražena na ženama starije životne dobi i prekomjerne tjelesne težine, iako su već prijavljene varijacije u farmakokinetičkim svojstvima lijeka pripisane fenotipskim (49) i metaboličkim razlikama među pojedincima. (50)

1.5. Animalni modeli u istraživanju pretilosti i inzulinske rezistencije

Animalni modeli s umjetno izazvanim metaboličkim bolestima predstavljaju zlatni standard u istraživanju pretilosti i mehanizama razvoja inzulinske rezistencije. (51) Najčešće se koriste glodavci kojima se takve promjene iniciraju genetskim modifikacijama ili specijalnom dijetom. Primijećeno je da je hrana najbolji način pokretanja sistemskih metaboličkih promjena zbog njezinog djelovanja na hormone te metabolizam glukoze i lipida. Na miševima, štakorima i hrčcima najčešće se promatraju pretilost, hipertenzija, hiperglikemija i dislipidemija – bolesti uzrokovane specifičnim kombinacijama dijeta obogaćenih glukozom, fruktozom, saharozom ili mastima. (52) Naime, primijećeno je da dijete obogaćene saharozom i fruktozom najviše utječu na razvoj pretilosti i povezanih metaboličkih bolesti kod štakora. (53, 54) Smatra se da je uzrok tome veća iskoristivost fruktoze u sintezi masnih kiselina u usporedbi s glukozom. (55) Prema tome, fruktoza u organizmu ima ulogu sličniju mastima nego glukozu. Također, korištenjem dijete bogate mastima dolazi do povišenja svih parametara pretilosti (tjelesne težine, udjela

masnog tkiva, GUK, kolesterola, triglicerida, slobodnih masnih kiselina, leptina i inzulina) proporcionalno s porastom udjela masti u hrani. (56) U drugom istraživanju, miševi na dijeti bogatoj mastima imali su veću tjelesnu težinu, povišene lipide i inzulin u krvi te su razvili inzulinsku rezistenciju. (57) Međutim, iako je već utvrđena povezanost visokokalorične hrane s razvojem nealkoholnog steatohepatitisa i povećanjem inzulinske rezistencije (49), niti jedna studija do sada nije se bavila međusobnom povezanošću patofizioloških mehanizama tih faktora. Nadalje, iako je provedeno nekoliko istraživanja usmjerenih na učinak antidijabetske terapije metforminom i liraglutidom kod pretilih miševa (58, 59), za štakore su se ona odnosila na isključivo genetski modificirane pretile životinje (60), ali ne i na dijetom izazvanu pretilost. Također, sve dosadašnje studije rađene su na mužjacima štakora, što postavlja pitanje općenitog utjecaja, kako prehrane, tako i antidijabetske terapije na ženke, s obzirom na već poznate razlike u mehanizmima nastanka inzulinske rezistencije među spolovima. (12)

2. Hipoteza

Masna i slatka hrana dovodi da smanjenja kompleksnosti gangliozida stanične membrane jetrenih stanica i posljedičnog povećanja količine gangliozida GM3. Antidiijabetici metformin i liraglutid različito djeluju na pretilošću izazvani disbalans, a uspješniji od dva antidiijabetika vraća omjere gangliozida na membrani u fiziološke granice.

3. Ciljevi istraživanja

- Ekstrahirati i okarakterizirati gangliozide (lipide) stanične membrane jetre iz arhive smrznutih tkiva prikupljenih od ženki štakora hranjenih standardnom hranom, odnosno masnom i slatkim hranom od kojih su neke tretirane metforminom, a druge liraglutidom te procijeniti promjene metabolizma koje se odražavaju na sastav stanične membrane.
- Proučiti postoji li povezanost rezultata s patogeneзом inzulinske rezistencije kod predijabetičnih ženki štakora.
- Procijeniti učinkovitost najčešće korištenih antidijabetika, metformina i liraglutida, u održavanju fiziološkog omjera gangliozida staničnih membrana hepatocita i regulaciji inzulinske rezistencije u ženskoj populaciji.

4. Materijali i metode

Studija je načinjena na arhivi tkiva prikupljenih u sklopu projekta 'Uloga oksidativnog stresa u razvoju poremećenog vaskularnog odgovora kod pretilih, predijabetičkih štakora starije dobi tretiranih s metforminom i liraglutidom' voditeljice prof. dr. sc. Ines Drenjančević, odobrenog od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta (Klasa: 602-04/16-08/15; Broj: 2158-61-07-16-143; dana 16. prosinca 2016.). Za dio studije koji se nalazi u završnom radu ishodoeno je dodatno odobrenje od strane istog tijela pod brojem 2158-61-07-18-100.

Radi se o studiji parova: životinje na standardnoj dijeti prema životinjama na dijeti bogatoj mastima i šećerima; životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima prema životinjama hranjenim masnom i slatkom hranom i tretiranim metforminom ili liraglutidom.

4.1. Materijali

Prikupljeno je tkivo jetre 4 skupine ženki Sprague Dawley štakora, ukupno 32 životinje. U prvoj skupini su bile životinje hranjene standardnom hranom, drugoj životinje hranjene hranom obogaćenom mastima i šećerima, trećoj životinje na obogaćenoj dijeti tretirane metforminom, a u četvrtoj životinje hranjene obogaćenom hranom i tretirane liraglutidom. Životinje su bile hranjene navedenom hranom od 44. tjedna starosti. Nakon 6 tjedana navedene dijete, trećoj i četvrtoj skupini životinja uvedena je antidijabetska terapija. Životinje su žrtvovane u dobi od 64 tjedna, a nakon toga su prikupljena tkiva. Do kraja studije uginulo je 5 ženki na liraglutidu pa je testirano preostalih 27 životinja. Tkiva su pohranjena u frižideru na -80°C do daljnjeg postupanja.

4.2. Metode

4.2.1. Izolacija i analiza gangliozida

Izolacija gangliozida rađena je iz svježih tkiva jetre prema modificiranom protokolu opisanom po Schnaaru (61). Metoda se sastoji od više koraka u kojima se pomoću različitih organskih otapala ekstrahiraju gangliozidi iz jetrenog tkiva.

Postupak izolacije gangliozida:

- Uzorci su izvagani (250 µg) i dodana im je hladna destilirana voda (450 µL) kako bi se dobio 10% vodeni homogenat. Svaki uzorak je ručno homogeniziran u Potter-Elvehjem staklenom homogenizatoru s teflonskim tučkom
- Vodnom homogenatu dodan je redestilirani metanol (1200 µL) u omjeru metanol-voda 8:3 (volumen/volumen, V/V).
- Dodan je redestilirani kloroform (600 µL) u omjeru kloroform-metanol-voda 4:8:3 (V/V/V). Za osiguranje maksimalne precipitacije hidrofobnih proteina važno je pridržavati se točnog redosljeda dodavanja pojedinih otapala.
- 15 minutnim centrifugiranjem na 2500g (Centrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg, Njemačka) odvojen je netopljivi dio smjese.
- Odvojen je supernatant, koji čini oko 80% otopine, a talog je reekstrahiran u dvostruko manjem volumenu otapala korištenog za ekstrakciju.
- U izmjereni supernatant dodana je voda i dobivena je dvofazna otopina. Faze su razdvojene 15 minutnim centrifugiranjem na 5000 g. Gornja (polarna) faza koja sadrži gangliozide je odvojena i korištena za daljnju ekstrakciju.
- Uzorci su upareni i resuspendirani u 20 µL metanola.
- Nakon resuspenzije, gangliozidi su kvalitativno analizirani tankoslojnom kromatografijom.

4.2.2. Kvalitativna analiza gangliozida

Za kvalitativnu analizu gangliozida korištena je modificirana metoda tankoslojne kromatografije (engl. *thin-layer chromatography*, TLC) po Schnaaru i Needhamu (62) na silica-gel pločicama visoke sposobnosti razlučivanja (engl. *high-performance* TLC, HPTLC). Kao standard korišten je Cronassial (lijek proizvođača La Fidia Farmaceutici koji u svom sastavu ima četiri osnovna gangliozida ekstrahirana iz goveđeg mozga: GM1, GD1a, GD1b, GT1b).

Postupak izvođenja TLC

- HPTLC pločice (Merck Millipore, Darmstadt, Njemačka) aktivirane su zagrijavanjem (15 min, 110°C) i hlađenjem u eksikatoru

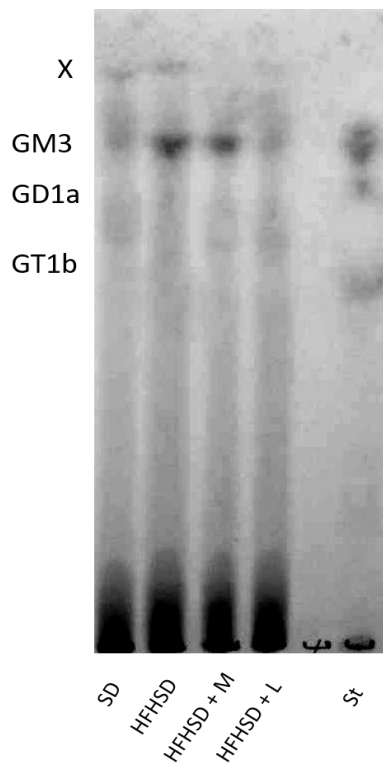
- Prethodno priređeni homogenizirani uzorci jetrenog tkiva nanoseni su na kromatografsku pločicu u volumenu 1,5 μ L kao mikrokapljice pomoću Hamilton igle. Uzorci su nanošeni postepeno, kako bi pločica prije razvijanja ostala potpuno suha. Standard je nanosen na pločicu uz uzorke.
- Pločica je razvijena u sustavu otapala kloroform-metanol-0.2% KCl u omjeru 50:42:11 (V/V/V).
- Nakon razvijanja, pločica je dobro osušena u uspravnom položaju.
- Razvijene i osušene pločice poprskane su Svennerholm reagensom nakon čega su pokrivene vrućom pločicom jednakih dimenzija i zagrijane 15 minuta na 110°C u sušioniku. Izolirani gangliozidi, odnosno sijalinska kiselina, poprimile su intenzivno ljubičastu boju.
- Pločice su fotografirane i analizirane besplatnim programom Image J (NIH, Bethesda, MD, SAD).

4.3. Statistička metoda

Shapiro-Wilk test korišten je za provjeru normalnosti distribucije podataka. Razlika u količini gangliozida testirana je Mann-Whitneyevim U testom, a razina značajnosti postavljena je na $P= 0,05$. Navedena statistička analiza provedena je u programu Statistica (inačica 13.0, StatSoft, Dell, Texas, SAD).

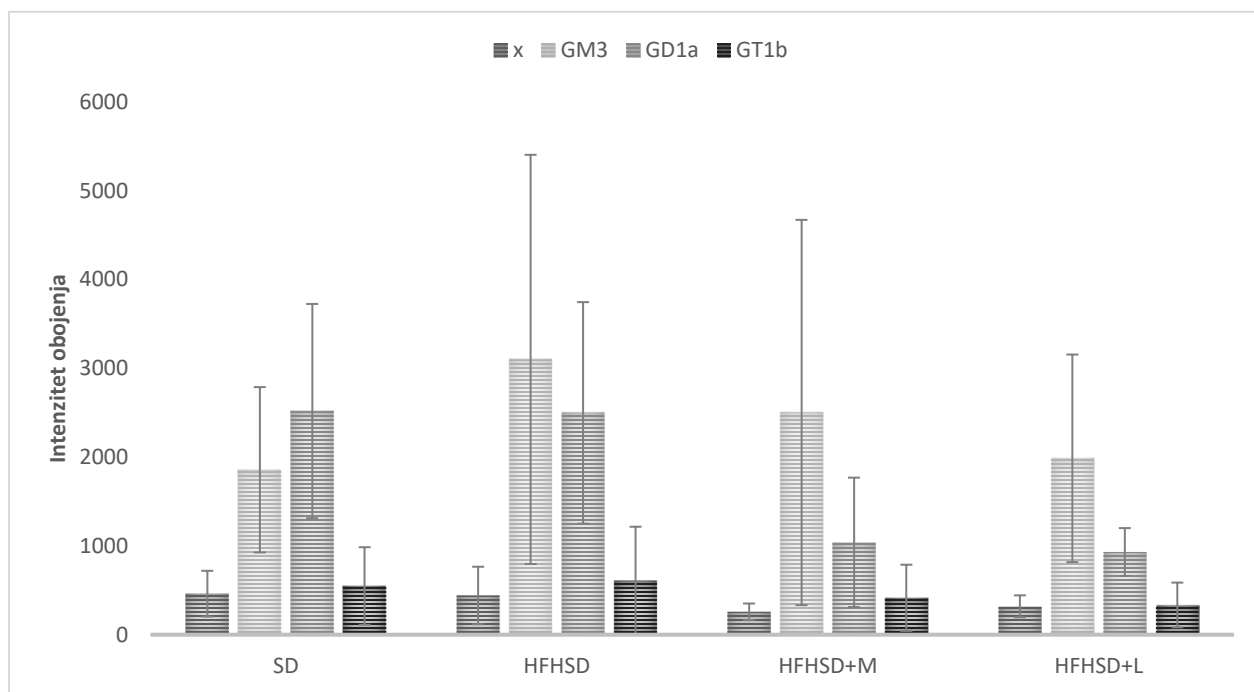
5. Rezultati

Gangliozidi su nakon izolacije razdvojeni tankoslojnom kromatografijom, vizualizirani rezorcinolom i fotografirani pametnim telefonom (EVA-L19, Huawei Technologies, Kina). Fotografije su obrađene programom ImageJ (Slika 2) i dobivene su srednje vrijednosti intenziteta obojenja pojedinih bandova – gangliozida, koje predstavljaju količinu pojedinih tipova gangliozida (Slika 3).



Slika 2. HPTLC pločice nakon vizualizacije bandova (gangliozida) rezorcinolom.

Opis kratica: X – nepoznati gangliozid, SD – uzorak životinje na standardnoj dijeti, HFHSD – uzorak životinje na prehrani bogatoj mastima i šećerom, HFHSD+M – uzorak životinje koja je uz obogaćenu prehranu bila na terapiji metforminom, HFHSD+L – uzorak životinje koja je uz obogaćenu prehranu bila na terapiji liraglutidom, St – standard



Slika 3. Prikaz intenziteta obojenja unutar skupina (SD – standardna dijeta, HFHSD – dijeta bogata mastima i šećerom, HFHSD+M – terapija metforminom, HFHSD+L – terapija liraglutidom; X – nepoznati glikosfingolipid

U kontrolnoj skupini (SD) GD1a prisutan je u najvećoj koncentraciji. U odnosu na uzorke SD skupine, kod HFHSD skupine dolazi do povećanja GM3 i GT1b gangliozida i smanjenja gangliozida X i GD1a. Iako je vidljiva promjena količine pojedinih tipova gangliozida, ona nije statistički značajna. Oba antidijabetika pokazuju smanjenje svih serija gangliozida (a, b i c), čak ispod razine karakteristične za SD grupu.

Dobivene vrijednosti su stavljene u omjer, te je dobiven koeficijent promjene vrijednosti (Tablica 2). Gledajući samostalni učinak metformina i liraglutida (usporedba sa SD skupinom) vidljivo je da imaju jednak učinak: povećavaju količinu GM3 i smanjuju količinu svih ostalih tipova gangliozida. Sličan učinak ima i HFHS dijeta, koja se od antidijabetika razlikuje po tome što povećava i količinu c serije gangliozida. Kombinacija HFHS dijete i antidijabetika dovodi do obrata u smislu da dolazi do smanjenja svih tipova gangliozida.

Tablica 2. Koeficijenti promjene dobiveni iz omjera srednjih vrijednosti intenziteta obojenosti (navedene vrijednosti nisu statistički analizirane).

Skupine životinja*	HFHSD	HFHSD+M	HFHSD+L	HFHSD+M	HFHSD+L	HFHSD+M
	vs	vs	vs	vs	vs	vs
<i>Gangliozidi</i>	SD	HFHSD	HFHSD	SD	SD	HFHSD+L
<i>X*</i>	0,956 ↓	0,584 ↓	0,724 ↓	0,558 ↓	0,693 ↓	0,806 ↓
<i>GM3</i>	1,669 ↑	0,807 ↓	0,641 ↓	1,347 ↑	1,070 ↑	1,260 ↑
<i>GD1a</i>	0,992 ↓	0,416 ↓	0,373 ↓	0,413 ↓	0,370 ↓	1,117 ↑
<i>GT1b</i>	1,110 ↑	0,683 ↓	0,551 ↓	0,758 ↓	0,611 ↓	1,239 ↑

* SD – standardna dijeta, HFHSD – dijeta bogata mastima i šećerom, HFHSD+M – terapija metforminom, HFHSD+L – terapija liraglutidom, X – nepoznati gangliozid

Izračunat je pojedinačni udio gangliozida unutar svake skupine kako bi se mogla procijeniti promjena njihovih omjera.

Tablica 3. Udio gangliozida unutar skupina dobiven iz srednjih vrijednosti intenziteta obojenosti.

Skupine životinja*	SD	HFHSD	HFHSD+M	HFHSD+L
<i>Gangliozidi</i>				
<i>X*</i>	8,577%	6,645%	6,117%	8,955%
<i>GM3</i>	34,479%	46,625%	59,345%	55,588%
<i>GD1a</i>	46,753%	37,571%	24,676%	26,064%
<i>GT1b</i>	10,191%	9,163%	9,862%	9,393%

* SD – standardna dijeta, HFHSD – dijeta bogata mastima i šećerom, HFHSD+M – terapija metforminom, HFHSD+L – terapija liraglutidom, X – nepoznati gangliozid.

Unutar skupina došlo je do promjene omjera gangliozida – u skupini hranjenoj standardnom dijetom prevladava GD1a forma, dok je u ostalim skupinama dominantan udio GM3 gangliozida. Statistički značajne razlike među skupinama nema, ali je vidljivo povećanje udjela gangliozida GM3 u skupinama HFHSD, HFHSD+M i HFHSD+L. Terapija metforminom jače utječe na povećanje udjela a serije gangliozida dok je terapija liraglutidom imala puno jači utjecaj na promjenu udjela ostalih serija gangliozida (Tablica 3).

6. Rasprava

Svrha ovoga istraživanja bila je odrediti i okarakterizirati gangliozide staničnih membrana hepatocita te na taj način utvrditi utjecaj masne i slatke hrane na strukturalne promjene u njima.

Ovo je jedino istraživanje u kojemu je takav pokus napravljen na uzorcima jetre predijabetičnih ženki štakora starije životne dobi, te prvo u kojemu je izolacija gangliozida napravljena iz svježeg tkiva jetre, koje prethodno nije perfundirano.

Sukladno s porastom tjelesne težine i sve većom prevalencijom šećerne bolesti tipa 2 u populaciji, javlja se i veća potreba za razvojem novih terapijskih metoda, s naglaskom na personaliziranu terapiju. Da bi to bilo moguće, potrebno je proučiti i razumjeti metaboličke promjene odgovorne za razvoj šećerne bolesti tipa 2 te spolno specifične razlike koje utječu na njih. U prijašnjim istraživanjima već su uočeni utjecaji masne i slatke prehrane (21) te povećanja broja jednostavnih formi gangliozida na razvoj inzulinske rezistencije (25), međutim do sada nije ispitana njihova međusobna povezanost. Sve dosadašnje studije proučavale su patogenezu inzulinske rezistencije na mužjacima (25, 26), gravidnim ženkama (63) ili genetski modificiranim životinjama (24, 64), no trenutno se populacijom s najvećim rizikom smatraju žene starije životne dobi i prekomjerne tjelesne težine. (2) Prema tome, ovo istraživanje daje uvid u promjene sastava glikolipida staničnih membrana hepatocita koje dovode do razvoja šećerne bolesti tipa 2, uvjetovane hormonalnim i metaboličkim sastavom jedinstvenim za ženski spol.

Važno je napomenuti da je za ovaj pokus korišteno svježe tkivo jetre ženki štakora te je zbog toga kvaliteta rezultata izolacije gangliozida očekivano lošija. Budući da do sada nigdje nije objašnjena izolacija gangliozida iz stanične membrane hepatocita neperfundiranog tkiva jetre, korištene su jedine trenutno poznate metode namijenjene izolaciji iz perfundiranih tkiva. (65) Nadalje, u literaturi se navodi povezanost dijete bogate mastima i šećerima s prekomjernim nakupljanjem željeza u parenhimu jetre te posljedičnim razvojem inzulinske rezistencije i šećerne bolesti tipa 2. (66) To objašnjava tamnosmeđe obojenje koje je bilo jasno vidljivo nakon uparavanja uzoraka. Uzorci životinja iz HFHSD skupine, nakon isparavanja i resuspenzije uzoraka metanolom, bili su vidno tamniji od uzoraka životinja na standardnoj dijeti. Obojenje je vidljivo i na kromatografskim pločicama – uzorci HFHSD životinja imaju tamniju pozadinu i šire bandove od ostalih uzoraka. Interferencija željezom utjecala je na kvalitetu kromatografskog

razdvajanja gangliozida, međutim, korištenjem programa za obradu fotografija ImageJ, pločice su uspješno analizirane, a rezultati iskorišteni za daljnju statističku obradu i interpretaciju.

Usporedbom intenziteta obojenosti gangliozida i njihovih udjela unutar skupina, uočene su promjene vrijednosti pojedinih vrsta gangliozida staničnih membrana hepatocita uzrokovane dijetom bogatom mastima i šećerima te terapijom antidijabeticima. Povišeni intenzitet obojenja i udio jednostavne forme gangliozida GM3 u HFHSD skupini slaže se s rezultatima prethodnih istraživanja i ide u prilog pretpostavci o prehranom uzrokovanj promjeni broja gangliozida. (24) Zbog nemogućnosti identifikacije nepoznatog gangliozida X, njegova uloga i posljedice promjene njegove količine nisu poznate, iako se iz duljine prijeđenog puta na kromatografskoj pločici (retencijskog faktora), može zaključiti da se radi o jednostavnijoj formi. Međutim, smanjenje njegovog udjela moglo bi značiti da masna i slatka hrana utječe na povišenje broja samo nekih od jednostavnih formi glikosfingolipida (npr. specifično gangliozida GM3), no to bi trebalo ispitati daljnjim pokusima. U narednim bi se istraživanjima masenom spektrometrijom trebao identificirati nepoznati gangliozid X na osnovu njegove molekularne mase. Smanjenje vrijednosti složene forme gangliozida GD1a također potvrđuje prijašnja opažanja (24, 25, 67), no povećanje količine GT1b gangliozida odstupa od dosadašnjih rezultata istraživanja, međutim ta bi promjena mogla biti posljedica otežanog očitavanja rezultata. U istraživanjima provedenim na mozgovima genetski modificiranih životinja uočena je bliska povezanost biosinteze GD1a i GT1b gangliozida objašnjena zajedničkom genskom regulacijom. (68) Prema tome, rezultat ovog istraživanja mogao bi značiti da HFHS dijeta utječe selektivno posttranslacijskim modifikacijama produkata tih gena ili da je genetska regulacija biosinteze tih gangliozida u hepatocitima drugačija od one u mozgu. Također, došlo je do promjene međusobnog omjera gangliozida – u SD skupini prevladava složena forma GD1a, dok je u HFHSD skupini najzastupljenija jednostavna forma GM3 – što također potvrđuje hipotezu o utjecaju masne i slatke prehrane na strukturalne promjene staničnih membrana hepatocita. (24, 25)

Metformin i liraglutid najčešće su korišteni antidijabetici današnjice, a njihovo doziranje modificira se samo kod pacijenata s postojećim stanjima za koja je dokazano da imaju utjecaj na farmakokinetička svojstva tih lijekova (npr. kod bubrežnih bolesnika). (33, 45) No, do sada nisu ispitane spolno specifične razlike u djelovanju lijekova koje bi mogle utjecati na uspješnost terapije.

Usporedbom vrijednosti HFHSD skupine i skupina tretiranih antidijabeticima metforminom i liraglutidom, dobiven je uvid u učinkovitost tih lijekova u održanju fizioloških omjera gangliozida staničnih membrana hepatocita kod ženki štakora. S obzirom na to da je 5 od 8 ženki tretiranih liraglutidom uginulo prije planiranog završetka pokusa, neadekvatnost terapije bila je očita i prije analize gangliozida. U usporedbi s vrijednostima HFHSD skupine, intenzitet obojenja svih gangliozida se smanjio, ali je udio pojedinih gangliozida podjednak. To bi moglo značiti da je za liječenje šećerne bolesti tipa 2 važno uspostavljanje fiziološkog omjera gangliozida uz smanjenje udjela jednostavnih formi (GM3) te da prejak inhibicija sveukupne biosinteze gangliozida može imati koban učinak na organizam zbog remećenja interakcije s ostalim lipidima i proteinima membrana. (69) No, kako bi se sa sigurnošću mogao utvrditi uzrok visoke smrtnosti ženki štakora u ovom istraživanju, prvenstveno bi se usporednim istraživanjima trebale ispitati razlike farmakokinetičkih svojstava liraglutida među mužjacima i ženkama.

Terapija metforminom dala je podjednake rezultate u vidu sveukupnog sniženja vrijednosti, međutim njegova učinkovitost bila je veća samo u sniženju vrijednosti nepoznatog gangliozida X. Udjeli su također ostali sličniji onima u HFHSD skupini. Dapače, u HFHSD+M skupini jednostavna GM3 forma je daleko najzastupljenija s obzirom na ostale skupine. Postoji mogućnost da je metformin upravo zbog slabijeg djelovanja na složene forme gangliozida bio uspješniji u vidu produljenja života ženki štakora u ovom pokusu.

Uzevši u obzir učinkovitost oba lijeka, niti jedan nije pokazao specifično djelovanje na sniženje broja jednostavnih formi gangliozida, kao ni na održavanje fizioloških omjera gangliozida u staničnim membranama hepatocita. Stoga, možemo pretpostaviti da ti antidijabetici nisu bili adekvatna terapija u ovom pokusu zbog spolne i patogenetske specifičnosti inzulinske rezistencije. Daljnje proučavanje interakcije gangliozida s nastankom inzulinske rezistencije omogućit će razvoj pouzdanijih lijekova, koji će djelovati na specifične defekte metaboličkih puteva čija je fiziološka funkcija oštećena zbog promjene sastava staničnih membrana hepatocita.

Ovo istraživanje svakako bi se trebalo ponoviti na većem broju uzoraka te bi se ubuduće trebale koristiti bolje metode za pripremu uzoraka, prvenstveno perfuzija i odstranjivanje većih krvnih žila prije homogenizacije tkiva kako bi se spriječila interferencija željezom. Kromatografsko razdvajanje moglo bi se poboljšati modifikacijom omjera organskih otapala mobilne faze, s naglaskom na povećanje udjela kloroforma, koji bi zbog svoje slabe polarnosti mogao „usporiti“

kromatografiju i omogućiti jasnije razdvajanje bandova.

Prema tome, iako se iz dobivenih rezultata može zaključiti da ne dolazi do statistički značajnih promjena u sastavu lipida stanične membrane hepatocita ženki štakora uzrokovanih masnom i slatkom prehranom te da terapija metforminom, niti liraglutidom, nema statistički značajan utjecaj na razine gangliozida membrana hepatocita, dobivene su informacije koje se mogu iskoristiti u budućim studijama te su otvorena brojna pitanja koja mogu poslužiti kao temelj za daljnja istraživanja.

7. Zaključci

Iz dobivenih rezultata istraživanja izvedeni su slijedeći zaključci:

- Moguće je da dijeta bogata mastima i šećerima smanjenjem ekspresije većine gangliozida utječe na promjene sastava lipida staničnih membrana hepatocita ženki štakora.
- Antidiabetici metformin i liraglutid pokazali su sličan učinak – niti jedan nije pokazao specifično djelovanje na sniženje broja jednostavnih formi gangliozida, kao ni na održavanje fizioloških omjera gangliozida u staničnim membranama hepatocita.
- Metformin se pokazao nešto učinkovitijim, isključivo radi visoke smrtnosti životinja tretiranih liraglutidom.

8. Sažetak

Cilj istraživanja: Ekstrahirati i okarakterizirati gangliozide (lipide) stanične membrane hepatocita i proučiti njihovu ulogu u patogenezi inzulinske rezistencije kod predijabetičnih ženki štakora. Na istim životinjama procijeniti učinkovitost uobičajene antidijabetske terapije u održavanju fiziološkog omjera gangliozida u staničnim membranama.

Nacrt studije: Istraživanje je provedeno kao studija parova.

Materijali i metode: Prikupljeno je 27 uzoraka tkiva jetre iz 4 skupine ženki Sprague Dawley štakora hranjenih standardnom ili HFHS dijetom te tretiranih metforminom odnosno liraglutidom. Uzorci su obrađeni modificiranom metodom po Schnaaru kojom se pomoću različitih organskih otapala ekstrahiraju gangliozidi iz jetrenog tkiva. Iz svake skupine nasumično su odabrana tri uzorka. Za kvalitativnu analizu gangliozida korištena je modificirana metoda tankoslojne kromatografije po Schnaaru i Needhamu. Gangliozidi su vizualizirani prskanjem HPTLC pločice rezorcinolom, fotografirani i kvantificirani programom ImageJ.

Rezultati i zaključak: Moguće je da masna i slatka hrana utječe na povećanje ekspresije jednostavne forme gangliozida GM3 i time dovodi do promjene omjera gangliozida staničnih membrana hepatocita. Antidijabetici metformin i liraglutid nemaju značajan učinak u održavanju fiziološkog omjera tih gangliozida u ženskoj populaciji.

Ključne riječi: gangliozidi; inzulinska rezistencija; jetra; liraglutid; metformin; štakori

9. Summary

Lipid composition of liver plasma membrane in female Sprague Dawley rats fed with high-fat and high-sugar diet and treated with metformin or liraglutide

Objectives: The aim of this study was to extract and differentiate hepatocyte cell membrane gangliosides (lipids) and study their role in the pathogenesis of insulin resistance in prediabetic female rats. By observing the same animals, the effectiveness of the most frequently used antidiabetic therapy was evaluated in maintaining the physiological ganglioside ratio in cell membranes.

Study design: The study was conducted as a matched pair study.

Material and methods: 27 liver tissue samples were collected from 4 groups of Sprague Dawley female rats fed with regular or HFHS diet and treated with metformin or liraglutide. The samples were processed following a modified Schnaar method which involves using various organic solvents to extract gangliosides from the liver tissue. Three samples were randomly selected from each group. A thin layer chromatography method modified by Schnaar and Needham was used for the qualitative analysis of gangliosides. They were then visualized by spraying HPTLC plates with resorcinol, photographed and quantified using a computer program ImageJ.

Results and conclusion: It is possible that high-fat and high-sugar diet increases the expression of a simple form of ganglioside GM3 and hence leads to a change in the hepatic cell membrane ganglioside ratio. Antidiabetic drugs metformin and liraglutide do not have a significant effect on maintaining the physiological proportion of these gangliosides in the female population.

Key words: gangliosides; insulin resistance; liraglutide; liver; metformin; rats

10. Reference

1. Introduction: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. Diabetes Care. American Diabetes Association; 2018. Dostupno na: http://care.diabetesjournals.org/content/41/Supplement_1/S1 Datum pristupa: 16.8.2018.
2. World Health Organization. Global report on diabetes 2016. Dostupno na: <http://www.who.int/diabetes/publications/grd-2016/en/> Datum pristupa: 16.8.2018.
3. Rubin KH, Glintborg D, Nybo M, Abrahamsen B, Andersen M. Development and Risk Factors of Type 2 Diabetes in a Nationwide Population of Women with Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(10):3848–57.
4. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins SL, Cotran RS. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 7. izd. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2005. str. 1194.–1195.
5. Gardner DG, Shoback DM, Greenspan FS. Greenspans basic and clinical endocrinology. 9. izd. New York: McGraw-Hill Medical; 2011.
6. Sutherland C, Brien RMO, Granner DK. Insulin Action Gene Regulation. *Mechanisms of Insulin Action.* 2007:110–32.
7. Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg H. Williams textbook of endocrinology. Philadelphia, PA: Elsevier; 2016.
8. Lee J, Pilch PF. The insulin receptor: structure, function, and signaling. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1994;266(2).
9. Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R. Insulin Receptor Isoforms and Insulin Receptor/Insulin-Like Growth Factor Receptor Hybrids in Physiology and Disease. *Endocr Rev.* 2009;586–623
10. Tymoczko JL, Berg JM, Stryer L. Biokemija. 6. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2013.
11. Sudar E, Velebit J, Isenović RE. Signalni put insulina u ćelijama skeletnih mišića. Beograd, Glasilo Podružnice Srpskog lekarskog društva Zaječar 2006;31(4):180-185
12. Kautzky-Willer A, Harreiter J, Pacini G. Sex and gender differences in risk, pathophysiology and complications of type 2 diabetes mellitus. *Endocr Rev.* 2016; 37:278–316
13. Garaulet M, Pérez-Llomas F, Fuente T, Zamora S, Tebar FJ. Anthropometric, computed tomography and fat cell data in an obese population: relationship with insulin, leptin,

- tumor necrosis factor-alpha, sex hormone-binding globulin and sex hormones. *Eur J Endocrinol.* 2000; 143(5):657-66
14. Louet JF, LeMay C, Mauvais-Jarvis F. Antidiabetic actions of estrogen: insight from human and genetic mouse models. *Curr Atheroscler Rep.* 2004; 6(3):180-5.
 15. Kotani K, Tokunaga K, Fujioka S, Kobatake T, Keno Y, Yoshida S, Shimomura I, Tarui S, Matsuzawa Y. Sexual dimorphism of age-related changes in whole-body fat distribution in the obese. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1994; 18(4):207-2.
 16. Guyton A C, Hall J E. *Medicinska fiziologija.* 12. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2012.
 17. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. *Harperova ilustrirana biokemija.* 28. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
 18. Junqueira LC, Carneiro J. *Osnove histologije.* 10. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2005.
 19. Bazotte RB, Silva LG, Schiavon FP. Insulin resistance in the liver: Deficiency or excess of insulin? *Cell Cycle.* 2014;13(16):2494–500.
 20. Birkenfeld AL, Shulman GI. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 Diabetes. *Hepatology.* 2014;59(2):713–23.
 21. Williams KJ, Wu X. Imbalanced insulin action in chronic over nutrition: Clinical harm, molecular mechanisms, and a way forward. *Atherosclerosis.* 2016; 247:225–82.
 22. Idris I, Gray S, Donnelly R. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia.* 2001;44(6):659–73.
 23. Geoffrey M. Cooper, Robert E. Hausman Stanica. *Molekularni pristup,* 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada 2010.
 24. Yamashita T, Hashiramoto A, Haluzik M, Mizukami H, Beck S, Norton A i sur. Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100(6):3445-3449
 25. Tagami S, Inokuchi JJ, Kabayama K, Yoshimura H, Kitamura F, Uemura S i sur. Ganglioside GM3 participates in pathological Condition of insulin Resistance. *J Biol Chem* 2002;277(5):3085-3092.

26. Zhao H, Przybylska M, Wu I-H, Zhang J, Siegel C, Komarnitsky S, i sur. Inhibiting Glycosphingolipid Synthesis Improves Glycemic Control and Insulin Sensitivity in Animal Models of Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2007;56(5):1210–8.
27. Nagafuku M, Sato T, Sato S, Shimizu K, Taira T, Inokuchi J-I. Control of homeostatic and pathogenic balance in adipose tissue by ganglioside GM3. *Glycobiology*. 2014;25(3):303–18.
28. Nixon SJ, Carter A, Wegner J, Ferguson C, Floetenmeyer M, Riches J, i sur. Caveolin-1 is required for lateral line neuromast and notochord development. *J Cell Sci*. 2007;120(13):2151–61.
29. Lajoie P, Nabi IR. Lipid Rafts, Caveolae, and Their Endocytosis. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2010; 135–63.
30. Gustavsson J, Parpal S, Karlsson M, Ramsing C, Thorn H, Borg M, i sur. Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocyte plasma membrane. *FASEB J*. 1999;13(14):1961–71.
31. Katzung B, Masters B, Trevor A. *Temeljna i klinička farmakologija*. 11. izd. Zagreb: Medicinska naklada, 2011.
32. Jacobsen LV, Flint A, Olsen AK, Ingwersen SH. Liraglutide in Type 2 Diabetes Mellitus: Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet*. 2016; 55: 657-672.
33. European Medicines Agency Evaluation of Medicines for Human Use. Assessment report for Victoza, International Nonproprietary Name: liraglutide. Dostupno na: <https://bit.ly/1s97X04> Datum pristupa: 20.8.2018.
34. Armstrong MJ, Houlihan DD, Rowe IA, Clausen WH, Elbrønd B, Gough SC i sur. Safety and efficacy of liraglutide in patients with type 2 diabetes and elevated liver enzymes: individual patient data meta-analysis of the LEAD program. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;37(2):234-42
35. Deacon CF. Potential of liraglutide in the treatment of patients with type 2 diabetes. *Vasc Health Risk Manag*. 2009; 5: 199–211.
36. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, i sur. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Inves*. 2001;108(8):1167–74.

37. Zhang L, He H, Balschi JA. Metformin and phenformin activate AMP-activated protein kinase in the heart by increasing cytosolic AMP concentration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(1).
38. Towler MC, Hardie DG. AMP-Activated Protein Kinase in Metabolic Control and Insulin Signaling. *Circulation Research*. 2007;100(3):328–41.
39. Kim YD, Park K-G, Lee Y-S, Park Y-Y, Kim D-K, Nedumaran B, i sur. Metformin Inhibits Hepatic Gluconeogenesis Through AMP-Activated Protein Kinase-Dependent Regulation of the Orphan Nuclear Receptor SHP. *Diabetes*. 2007;57(2):306–14.
40. Rena G, Pearson ER, Sakamoto K. Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? *Diabetologia*. 2013;56(9):1898–906.
41. Miller RA, Chu Q, Xie J, Foretz M, Viollet B, Birnbaum MJ. Biguanides suppress hepatic glucagon signaling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature*. 2013;494(7436):256–60.
42. Burcelin R. The antidiabetic gutsy role of metformin uncovered? *Gut*. 2013;63(5):706–7.
43. Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenholm P, Rooyackers O, i sur. Metformin Increases AMP-Activated Protein Kinase Activity in Skeletal Muscle of Subjects with Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2002;51(7):2074–81.
44. Collier CA, Bruce CR, Smith AC, Lopaschuk G, Dyck DJ. Metformin counters the insulin-induced suppression of fatty acid oxidation and stimulation of triacylglycerol storage in rodent skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291(1).
45. European Medicines Agency, 2016. Assessment report: Referral under Article 31 of Directive 2001/83/EC. Metformin containing medicinal products. Procedure number: EMEA/H/A-31/1432. Dostupno na: <https://bit.ly/2o3dmOv> Datum pristupa: 16.6.2018.
46. Maruthur NM, Tseng E, Hutfless S, Wilson LM, Suarez-Cuervo C, Berger Z i sur. Diabetes Medications as Monotherapy or Metformin-Based Combination Therapy for Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2016;164(11):740-51.
47. Imam TH. Changes in metformin use in chronic kidney disease. *Clin Kidney J*. 2017;10(3):301–4.
48. Lashen H. Review: Role of metformin in the management of polycystic ovary syndrome. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2010;1(3):117–28.

49. Hall H, Perelman D, Breschi A, Limcaoco P, Kellogg R, Mclaughlin T, i sur. Glucotypes reveal new patterns of glucose dysregulation. *PLOS Biology*. 2018;16(7).
50. Overgaard RV, Petri KC, Jacobsen LV, Jensen CB. Liraglutide 3.0 mg for Weight Management: A Population Pharmacokinetic Analysis. *Clin Pharmacokinet*. 2016;55(11):1413–22.
51. Panchal SK, Brown L. Rodent Models for Metabolic Syndrome Research. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011:1–14.
52. Wong SK, Chin K-Y, Suhaimi FH, Fairus A, Ima-Nirwana S. Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutr Metab*. 2016;13(1).
53. VasANJI Z, Cantor EJ, Juric D, Moyen M, Netticadan T. Alterations in cardiac contractile performance and sarcoplasmic reticulum function in sucrose-fed rats is associated with insulin resistance. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;291:C772–80.
54. Kasim-Karakas SE, Vriend H, Almario R, Chow LC, Goodman MN. Effects of dietary carbohydrates on glucose and lipid metabolism in golden Syrian hamsters. *J Lab Clin Med*. 1996; 128:208–13.
55. Williams G, Pickup J. *The Handbook of Diabetes*. 3. izd. Oxford: Blackwell Science Limited; 2003.
56. Ghibaudi L, Cook J, Farley C, van Heek M, Hwa JJ. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. *Obes Res*. 2002; 10:956–63.
57. Li Y, Lu Z, Zhang X, Yu H, Kirkwood KL, Lopes-Virella MF, et al. Metabolic syndrome exacerbates inflammation and bone loss in periodontitis. *J Dent Res*. 2015; 94:362–70.
58. Bugáňová M, Pelantová H, Holubová M, Šedivá B, Maletínská L, Železná B, et al. The effects of liraglutide in mice with diet-induced obesity studied by metabolomics. *J Endocrinol*. 2017;233(1):93–104.
59. Kappe C, Zhang Q, Nyström T, Sjöholm Å. Effects of high-fat diet and the anti-diabetic drug metformin on circulating GLP-1 and the relative number of intestinal L-cells. *Diabetol Metabol Syndr*. 2014; 6:70.
60. Vrang N, Jelsing J, Simonsen L, Jensen AE, Thorup I, Søbørg H, et al. The effects of 13 wk of liraglutide treatment on endocrine and exocrine pancreas in male and female ZDF

- rats: a quantitative and qualitative analysis revealing no evidence of drug-induced pancreatitis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;303(2).
61. Schnaar RL. Isolation of glycosphingolipids. *Methods Enzymol.* 1994;230, 348–370.
 62. Schnaar RL, Needham LK. Thin-layer chromatography of glycosphingolipids. *Methods Enzymol.* 1994;230, 371–389
 63. Storlien LH, Lam YY, Wu BJ, Tapsell LC, Jenkins AB. Effects of dietary fat subtypes on glucose homeostasis during pregnancy in rats. *Nutrition & Metabolism.* 2016;13(1).
 64. Larsson M, Brodin P. TRPM5 KO-mice develop less insulin resistance compared to wt-mice after diet induced obesity. *Appetite.* 2011;57.
 65. Senn H-J, Orth M, Fitzke E, Häussinger D, Stehle T, Gerok W. Biosynthesis and secretion of gangliosides by the isolated perfused rat liver. *Journal of Hepatology.* 1989;9.
 66. Brudevold R, Hole T, Hammerstrøm J. Hyperferritinemia Is Associated with Insulin Resistance and Fatty Liver in Patients without Iron Overload. *PLoS ONE.* 2008;3(10).
 67. Sandhoff R, Sandhoff K. Emerging concepts of ganglioside metabolism. *FEBS Letters.* 2018
 68. Sturgill ER, Aoki K, Lopez PH, Colacurcio D, Vajn K, Lorenzini I, et al. Biosynthesis of the major brain gangliosides GD1a and GT1b. *Glycobiology.* 2012;22(10):1289–301.
 69. Chavez JA, Summers SA. A Ceramide-Centric View of Insulin Resistance. *Cell Metabol.* 2012;15(5):585–94.

11. Životopis

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Monika Berecki

Datum i mjesto rođenja: 04. svibnja 1996., Osijek, Republika Hrvatska

Adresa stanovanja: Sjenjak 34, 31000 Osijek, Republika Hrvatska

OIB: 38556490644

Telefon: +385 98 187 3983

e-mail adresa: m.berecki@gmail.com

OBRAZOVANJE:

Trajanje: 2015. – 2018.

Ustanova: Medicinski fakultet Osijek, Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Trajanje: 2011. – 2015.

Ustanova: Prirodoslovno-matematička gimnazija Osijek

Trajanje: 2003. – 2011.

Ustanova: Osnovna škola „Mladost“ Osijek